

## Inmunogenicidad de proteínas recombinantes comparada con el empleo de herramientas bioinformáticas

### Immunogenicity of recombinant proteins compared with the use of bioinformatics tools

MsC. Dr. Orlando R. Serrano Barrera

Universidad de Ciencias Médicas, Las Tunas, Cuba.

---

#### RESUMEN

**Objetivo:** para determinar la utilidad de herramientas inmunoinformáticas para detectar péptidos que puedan ser inmunodominantes, y evaluar las diferencias entre las respuestas inmunes de los modelos animales empleados en los estudios preclínicos y en los humanos.

**Métodos:** se modeló la respuesta frente a dos proteínas exógenas: la estreptocinasa recombinante y el antígeno de superficie de la hepatitis B. A partir de sus secuencias primarias se emplearon algoritmos para identificar epítopes B y T frente a moléculas HLA de clase I y II (HLA-A\*0201, HLA-DRB1\*0301 y HLA-DRB1\*0701) y los haplotipos murinos H2-Kd y H2-Kk. Se seleccionaron los péptidos de más alta puntuación.

**Resultados:** el algoritmo ABCPred mostró una mejor capacidad de predicción de epítopes B, mientras fue mayor la coincidencia para los programas de modelación de la respuesta T. Los epítopes generados para el haplotipo H2-Kk tuvieron una similitud mayor con los presentados por las moléculas HLA seleccionadas.

**Conclusiones:** se presenta una metodología aplicable al desarrollo de vacunas de subunidades y multiepitópicas, así como para otros fármacos biotecnológicos de naturaleza peptídica, que permite optimizar las etapas preclínicas y clínicas, a muy bajo costo, mínimos requerimientos tecnológicos, utilización óptima de medios, recursos y capital humano disponibles en cualquier institución del sistema nacional de salud.

**Palabras clave:** bioinformática, inmunoinformática, modelación computacional, biología computacional, ensayos preclínicos, inmunofarmacología.

## ABSTRACT

**Objective:** Determine the usefulness of immunoinformatics tools to detect potentially immunodominant peptides, and evaluate the differences between the immune responses provided by the animal models used in preclinical and human studies.

**Methods:** Modeling was conducted of the response to two exogenous proteins: recombinant streptokinase and hepatitis B surface antigen. Based on their primary sequences, algorithms were used to identify B and T epitopes against HLA class I and II molecules (HLA-A\*0201, HLA-DRB1\*0301 and HLA-DRB1\*0701), and murine haplotypes H2-Kd and H2-Kk. The highest scoring peptides were chosen.

**Results:** ABCPred algorithm showed a better prediction capacity for B epitopes, whereas coincidence was greater in modeling programs for the T response. The epitopes generated for haplotype H2-Kk had greater similitude with those presented by the HLA molecules selected.

**Conclusions:** A methodology is presented which is applicable to the development of subunit and multiepitope vaccines, as well as other peptidic biotechnological drugs. This methodology allows optimization of the preclinical and clinical phases at a very low cost, with minimal technological requirements, optimal use of media, and resources and human capital available at any institution of the national health system.

**Key words:** bioinformatics, immunoinformatics, computational modeling, computational biology, preclinical assays, immunopharmacology

---

## INTRODUCCIÓN

La inmunoinformática es un área emergente de aplicación de la modelación computacional a los procesos inmunitarios, con implicaciones para la solución de cuestiones relevantes para la inmunobiología y la vacunología.<sup>1</sup> En los últimos años se han diseñado, creado y publicado numerosas y variadas bases de datos y herramientas inmunoinformáticas para la modelación computacional de los diferentes eventos de la respuesta inmune.<sup>1-3</sup> La inmunoinformática se ha ido integrando al desarrollo de candidatos vacunales contra agentes infecciosos y tumores malignos.<sup>2, 4, 5</sup>

La inmunoinformática tiene aplicaciones potenciales que van desde los mecanismos básicos hasta la investigación aplicada: fallos vacunales, emergencia de cepas de escape, eventos adversos relacionados con la vacunación, desarrollo de vacunas personalizadas y de nuevos adyuvantes, mejora y combinación de vacunas existentes, etcétera.<sup>6</sup> En el caso de la vacuna anti-hepatitis B se ha descrito que la sustitución de aminoácidos, sobre todo de la región 137-147, en el antígeno de superficie (AgsHB) puede traer como consecuencias cambios en la inmunogenicidad, evasión de los mecanismos inmunitarios y fallos diagnósticos.<sup>7</sup> La estreptocinasa (SK, del término en inglés *streptokinase*), por otra parte, es un eficaz agente trombolítico empleado para, entre otras aplicaciones, el tratamiento del infarto agudo del miocardio.<sup>8</sup> En algunas poblaciones los sujetos portan altos títulos de anticuerpos anti-SK y no se recomienda la utilización de este fármaco.<sup>9,10</sup> Este fenómeno ha sido reportado en Cuba, donde se ha encontrado un 30,4 % de prevalencia de anticuerpos circulantes en las personas incluidas.<sup>10</sup> La producción de una SK menos inmunogénica podría ser una alternativa para estos casos.<sup>8</sup>

Las técnicas disponibles para evaluar la inmunogenicidad de proteínas son de escaso valor para la predicción de las características clínicas de los fármacos y, por otra parte, muchos aspectos de la inmunogenicidad no han sido adecuadamente explorados por métodos experimentales.<sup>11</sup> Los métodos bioinformáticos facilitan la búsqueda de antígenos para la mayoría de las proteínas, por lo que las herramientas inmunoinformáticas pueden simular las respuestas inmunes a un producto, sea o no empleado en la vacunación, y ahorrar tiempo y costos.<sup>12, 13</sup>

## MÉTODOS

### Evaluación de la utilidad de los algoritmos bioinformáticos en la predicción de la inmunogenicidad de proteínas terapéuticas recombinantes

A partir de la secuencia primaria de la estreptocinasa recombinante cubana, contenida en la base de datos UniProt bajo el número de acceso Q53284, se emplearon tres algoritmos para identificar epítopes B: BepiPred, Bcepred y ABCpred. Se seleccionaron dos herramientas para la identificación de los epítopes de células T: SYFPEITHI y BIMAS. Se escogieron los cinco primeros epítopes en cada caso. Se trabajó con moléculas MHC (del inglés *Major Histocompatibility Complex*) reportadas como más frecuentes en la población cubana: HLA-A\*0201, HLA-DRB1\*0301 y HLA-DRB1\*0701.<sup>14, 15</sup> Los hallazgos *in silico* se compararon con las regiones antigénicas de la estreptocinasa encontradas por métodos *in vitro* y reportadas en la literatura.

### Comparación de la inmunogenicidad de proteínas recombinantes entre modelos de laboratorio y humanos

A partir de las secuencias primarias de la estreptocinasa recombinante (UniProt Q53284) y del antígeno de superficie de la hepatitis B (GenBank X02763.1), se trabajó con un algoritmo para modelar epítopes B (ABCpred) y otro para epítopes T (SYFPEITHI). Se seleccionaron los primeros cinco epítopes obtenidos con las herramientas inmunoinformáticas. Se consideraron los haplotipos murinos de modelos empleados en la experimentación biomédica: H2-Kd y H2-Kk.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Predicción de la inmunogenicidad de proteínas terapéuticas recombinantes

Uno de los principales objetivos del desarrollo de vacunas y de la evaluación inmunofarmacológica e inmunotoxicológica de fármacos es la identificación de los componentes microbianos que generan una respuesta inmune, sea protectora o no. La predicción de los epítopes B de la SK recombinante cubana, a partir de los algoritmos bioinformáticos empleados, aparece en la tabla 1.

Se observa algún grado de solapamiento entre los péptidos 1 (ABCpred) y 4 (BepiPred), 2 (ABCpred) y 3 (BepiPred) y 4 (ABCpred) y 5 (BepiPred). ABCpred fue, por tanto, el algoritmo que mostró una mejor capacidad de predicción.

Un estudio de inmunolocalización de epítopes lineales reconocidos por anticuerpos de tipo IgG en la estructura primaria de la SK encontró los sitios S379-T390 y Y397-N410, que se relacionan con los identificados por ABCpred y que se corresponden con regiones compartidas por los predichos por otros algoritmos.<sup>16</sup>

Tabla 1. Predicción de epítopes de células B para la estreptocinasa recombinante cubana

Algoritmo	Péptido 1		Péptido 2		Péptido 3		Péptido 4		Péptido 5	
	Pos.	Epítope	Pos.	Epítope	Pos.	Epítope	Pos.	Epítope	Pos.	Epítope
BepiPred	169	NPDDDFRP	281	EKPYDPF	355	EDNHDD	372	PEGENA	405	TPIPDN PNDK
Bcepred	7	LLDRPSV	15	NSQLVVSV	127	LPTQPVQEFLL SGHVRVRPYK	300	VDVEYT VQFTPL	270	ISEKYY VLKKG
ABCpred	375	GENASYHL AYDKDRYT	342	AFGIMDYT LTGKVEDN	106	DATITDRN GKVVYFADK	399	YLRYTGT PI PDNPNDK	139	GHVRVRPY KEKPIQNNQ

Pos.: Posición del primer aminoácido del péptido.

La región 373-414 fue reconocida respectivamente por el 39 y el 64 % de los sueros de pacientes antes y después de recibir tratamiento con SK.<sup>8, 17</sup> El epítope G139-Q152, también identificado por ABCpred, fue encontrado en un reporte ya mencionado.<sup>16</sup> El péptido 1 propuesto por Bcepred ya había sido mapeado en otros estudios con sueros de pacientes, anticuerpos monoclonales y bibliotecas de fagos.<sup>18, 19</sup>

La tabla 2 contiene la modelación de la respuesta de células T para antígenos HLA de clase I y II. En el caso de la molécula HLA-A\*0201 se observa una muy buena correspondencia entre los dos algoritmos empleados, con al menos tres péptidos igualmente identificados entre los primeros cinco. La administración de SK es seguida por el rápido aumento de la frecuencia de linfocitos T anti-SK y de la respuesta proliferativa en ensayos *in vitro*. La región 100-150, que contiene el péptido ubicado en el primer lugar por los dos algoritmos empleados en la modelación de la respuesta T, mostró los mayores índices de proliferación y fue la reconocida preferencialmente en la mayoría de los ensayos.<sup>20</sup>

La respuesta mediada por las dos moléculas de clase II seleccionadas comparte dos epítopes, iniciados en los residuos 76/77 y 310, y otra región formada por el solapamiento de dos péptidos, 296 y 310. Existe una asociación reconocida entre el incremento de la población de células T específicas para SK y las concentraciones séricas de anticuerpos anti-SK, responsables estos últimos de la neutralización del fármaco y de las reacciones de tipo alérgico.<sup>18</sup>

La correspondencia de las predicciones hechas por los algoritmos inmunoinformáticos con lo encontrado por diversos autores a través de variados métodos tradicionales de la experimentación biológica habla a favor de un patrón consistente de respuesta focalizada sobre regiones inmunodominantes en la respuesta *in vivo*, que concentran los anticuerpos producidos por los pacientes expuestos a la bacteria o tratado con la SK,<sup>18</sup> y la posibilidad de identificar las regiones antigénicas con mayor capacidad alérgica, con vistas a su modificación para reducir las reacciones adversas al fármaco.<sup>21</sup>

La disponibilidad de métodos *in silico* para predecir los determinantes antigénicos, tanto de anticuerpos como de células T, significa un complemento importante en los procesos de diseño, selección, desarrollo y evaluación de vacunas y productos sintéticos y recombinantes.<sup>22</sup> El reconocimiento y la unión a los epítopes derivados de las moléculas de los patógenos, que conduce a la activación de los linfocitos T y a la producción de anticuerpos, son los elementos claves para una respuesta protectora<sup>23</sup> y constituyen la base para el diseño de las vacunas multiepitópicas para uno o varios agentes. Los algoritmos bioinformáticos pueden identificar más de la mitad de los péptidos con real

capacidad de unirse a los receptores inmunitarios; ello reduce el trabajo del laboratorio tradicional, con un 85 % menos de gastos en materiales, labor y tiempo.<sup>23</sup> La mejor caracterización y modelación de las respuestas inmunes conduce a las posibilidades de refinamiento en términos de potenciar la inmunogenicidad y reducir los posibles efectos adversos, ya sea por autoinmunidad o hipersensibilidad.<sup>24, 25</sup>

Tabla 2. Predicción de epítopes de células T para la estreptocinasa recombinante cubana

Algoritmo	Péptido 1		Péptido 2		Péptido 3		Péptido 4		Péptido 5	
	Pos.	Epítope								
HLA-A*0201										
SYFPEITHI	135	FLLSGHVRV	199	LLAQAQSIL	269	LISEKYYVL	259	GLNEEINNT	268	DLISEKYYV
BIMAS	135	FLLSGHVRV	259	GLNEEINNT	334	KLLYNNLDA	234	ILPMDQEFT	268	DLISEKYYV
HLA-DRB1*0301										
SYFPEITHI	232	RTILPMD QEFTYHVK	310	SEQLLTAS ERNLDFR	273	KYYWLKK GEKPYDPF	76	KADLLKA IQEQLIAN	196	SQELLAQ AQSILNKT
HLA-DRB1*0701										
SYFPEITHI	343	FGIMDYTL TGKVEDN	77	ADLLKAI QEQLIANV	98	FEVIDFAS DATITDR	310	SEQLLTAS ERNLDFR	296	TIKYVDVN TNELLKS

Pos.: Posición del primer aminoácido del péptido.

### Comparación de la inmunogenicidad de proteínas recombinantes entre modelos de laboratorio y humanos

En el caso de la inmunología, los ratones han permitido un profundo discernimiento de la estructura y el funcionamiento del sistema inmune, a pesar de las diferencias entre la biología humana y la murina: proporción de subpoblaciones leucocitarias, subclases de inmunoglobulinas, citocinas y sus receptores, diferenciación Th1/Th2, expresión y función de moléculas coestimuladoras, etc.<sup>26</sup>

La tabla 3 muestra la respuesta T frente a la SK recombinante producida en Cuba en el contexto de dos haplotipos murinos y moléculas HLA. De los cinco primeros epítopes seleccionados entre las dos líneas de ratón, solo hay una coincidencia: la región de la secuencia iniciada entre los residuos 96-101. Al comparar esas posibles respuestas con la humana, particularmente para el HLA-A\*0201, no se observan similitudes con el haplotipo H2-Kd, mientras que aparecen cuatro epítopes en regiones similares para el haplotipo H2-Kk, para las posiciones 133/135, 259/262/268/269. Para las moléculas de clase II humanas, se encontraron tres solapamientos (226/232, 343/346, 98/101) con H2-Kk y solo uno para H2-Kd (296/298).

Para el caso del AgsHB (tabla 4), hubo una coincidencia entre ambos haplotipos murinos, en la región 175/181, y dos epítopes en regiones solapadas entre el HLA-A\*0201 y H2-Kk (191 y 264/272). Para el caso de las moléculas de clase II, aparecieron cinco coincidencias entre el HLA y H2-Kk (45/50, 185/194, 191/194, 199/194, 267/272) frente a dos coincidencias con H2-Kd (172/181, 376/379).

**Tabla 3.** Predicción de epítopes de células T para la estreptocinasa recombinante cubana frente a haplotipos murinos y humanos

Algoritmo	Péptido 1		Péptido 2		Péptido 3		Péptido 4		Péptido 5	
	Pos.	Epítope								
H2-Kd	161	EYTVQFTPL	298	KYVDVNTNE	388	RYTEEEREV	96	DYFEVIDFA	216	IYERDSSIV
H2-Kk	262	EEINNTDLI	133	QEFLLSGHV	226	HDNDIFRTI	346	MDYTLTGKV	101	IDFASDATI
HLA-A*0201	135	FLLSGHVRV	199	LLAQAQSIL	269	LISEKYYVL	259	GLNEEINNT	268	DLISEKYYV
HLA-DRB1*0301	232	RTLPMQD QEFTYHVK	310	SEQLLTAS ERNLDFR	273	KYYVLKK GEKPYDPF	76	KADLLKA IQEQLIAN	196	SQELLAQ AQSILNKT
HLA-DRB1*0701	343	FGIMDYTL TGKVEDN	77	ADLLKAI QEQLIANV	98	FEVIDFAS DATITDR	310	SEQLLTAS ERNLDFR	296	TIKYVDV NTNELLS

Pos.: Posición del primer aminoácido del péptido.

**Tabla 4.** Predicción de epítopes de células T para el antígeno de superficie de la hepatitis B recombinante cubano frente a haplotipos murinos y humano

Algoritmo	Péptido 1		Péptido 2		Péptido 3		Péptido 4		Péptido 5	
	Pos.	Epítope								
H2-Kd	334	KYLWEWASV	139	LYLPAGGSS	181	GFLGPLLVL	205	SLDSWWTSL	379	LYSIVSPFI
H2-Kk	50	DDWPAANQV	272	LDYQGMLPV	83	GILTVSTI	194	FLLTRILTI	175	MENITSGFL
HLA-A*0201	261	LLLCLIFLL	194	FLLTRILTI	257	FLFILLLCL	260	ILLCLIFL	264	CLIFLLVLL
HLA-DRB1*0301	267	FLLVLLDY QGMLPVC	21	PLGFFPD HQLDPAFG	45	FNPVKDDW PAANQVG	258	LFILLC LIFLLVLL	185	PLLVLQA GFFLLTRI
HLA-DRB1*0701	172	VTNMENI TSGFLGPL	355	QWVGLSP TWWLSAI	376	GPSLYSIV SPFIPLL	191	AGFFLLT RILTIPQS	199	ILTIPQSL DSWWTSL

Pos.: Posición del primer aminoácido del péptido.

Las diferencias documentadas entre líneas de ratón son de diversa naturaleza y en ellas subyacen las características propias en cuanto a los mecanismos de defensa. Puede pensarse en resistencia variable a infecciones: A/J, DBA/2 y BALB/c son altamente susceptibles a *Staphylococcus aureus*, mientras que C3H/HeN, CBA y C57BL/10 son medianamente resistentes.<sup>27</sup> Con respecto al parásito *Leishmania amazonensis* se ha descrito tres grupos: susceptibles (C57BL/10 y CBA), relativamente resistentes (DBA/2) y resistentes (C3H.He).<sup>28</sup> Por otro lado, debe tenerse en cuenta la composición de los elementos del sistema inmune: BALB/c tiene un mayor número de células T de memoria y activadas, tanto CD8+ como CD4+, y menos linfocitos vírgenes (*naive*), con relación a otras líneas en determinadas condiciones experimentales.<sup>29</sup> La respuesta ante la infección, tanto en células T como en subclases de IgG, también depende del haplotipo H2.<sup>29-31</sup>

La identificación de los epítopes inmunodominantes, que pueden ser delineados con el uso de los métodos computacionales incluso antes de inocularse un animal de laboratorio, pueden ser la base de modificaciones en la secuencia que reduzcan o incrementen la inmunogenicidad, según se desee y como se ha hecho para la infección por el virus de la hepatitis B.<sup>7, 32, 33</sup> También, para clarificar los procesos patogénicos de la infección por el agente.<sup>25, 34</sup>

En igual sentido, se debe ser cauteloso en la designación de los biomodelos para la selección de epítopes para candidatos vacunales o para la decisión de secuencias a modificar en proteínas recombinantes con potencial autoinmune o alergizante.

Las diferencias en las respuestas entre murinos y el humano, descritas para diferentes moléculas, no deben ser vistas como impedimento sino como oportunidad para la mejor selección de dianas terapéuticas y vacunales, procesos en los cuales los algoritmos bioinformáticos pueden igualmente reducir costos y tiempo.

El uso de la inmunoinformática ha sido limitado en el sistema cubano de salud, a pesar de las numerosas aplicaciones básicas y aplicadas; esa problemática ha sido identificada en otros países.<sup>15</sup> Sus potencialidades, apenas esbozadas en los estudios aquí presentados con dos moléculas de amplio uso en nuestro medio, pueden ampliarse en investigaciones básicas, ensayos preclínicos y clínicos y otras circunstancias.<sup>24</sup> Su alcance supera la inmunología, para extenderse a la microbiología, la farmacología, la vacunología, la epidemiología y la salud pública.

Para la predicción de epítopes es recomendable la combinación de varios de los algoritmos inmunoinformáticos disponibles, sobre todo en el caso de los epítopes de células B. Los resultados de la modelación de la inmunogenicidad pueden servir de base para la selección de los mejores candidatos vacunales y para las modificaciones que se requieran con el objetivo de potenciar las respuestas deseadas y reducir las reacciones adversas a proteínas recombinantes. La selección de los biomodelos animales para los estudios preclínicos debe ser cuidadosa y puede ser apoyada por métodos bioinformáticos.

Se presenta una metodología aplicable al desarrollo de vacunas de subunidades y multiepitópicas, así como para otros fármacos biotecnológicos de naturaleza peptídica, que permite optimizar las etapas preclínicas y clínicas, a muy bajo costo, mínimos requerimientos tecnológicos, utilización óptima de medios, recursos y capital humano disponibles en cualquier institución del sistema nacional de salud.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Bodhade AS, Ganvir SM, Hazarey VK. Oral manifestations of HIV infection and their correlation with CD4 count. *J Oral Sci.* 2011 Jun; 53(2):203-11.
2. Pinzón E, Bravo S, Méndez F, Clavijo G, León M. Prevalencia y factores relacionados con la presencia de manifestaciones orales en pacientes con VIH/SIDA, Cali, Colombia. *Colomb Med.* 2008; 39(4): 346-55.
3. Sharma G, Pai KM, Suhas S, Ramapuram JT, Doshi D, Anup N. Oral manifestations in HIV/AIDS infected patients from India. *Oral Dis.* 2006 Nov; 12(6):537-42.
4. Ranganathan K, Hemalatha R. Oral lesions in HIV infection in developing countries: an overview. *Adv Dent Res.* 2006 Apr 1; 19(1):63-8.
5. Gileva OS, Sazhina MV, Gileva ES, Efimov AV, Scully C. Spectrum of oral manifestationsof manifestations of HIV/AIDS in the Perm region (Russia) and identification of self-induced ulceronecrotic lingual lesions. *Med Oral.* 2004 May; 9(3):212-5.
6. Patton LL, Phelan JA, Ramos-Gomez FJ, Nittayananta W, Shiboski CH, Mbuguye TL. Prevalence and classification of HIV-associated oral lesions. *Oral Dis.* 2002; 8 Suppl 2: 98-109.
7. Coogan M, Greenspan J, Challacombe SJ. Oral lesions in infection with human immunodeficiency virus. *Bull World Health Organ.* 2005; 83(9): 700-6.
8. Reznik DA. Oral manifestations of HIV disease. *Top HIV Med.* 2005 Dec-2006 Jan; 13(5): 143-8.

9. Nokta M. Oral manifestations associated with HIV infection. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2008 Feb; 5(1):5-12.
10. Jané-Salas E, Chimenos-Küstner E, López-López J, Roselló-Llabrés X, Ocaña \_ Rivera I. Efecto de los tratamientos antirretrovirales en las manifestaciones orales de los pacientes VIH+. *Av. Odontoestomatol.* 2006; 22(6): 315-26.
11. Ortega KL, Vale DA, Magalhães MH. Impact of PI and NNRTI HAART-based therapy on oral lesions of Brazilian HIV-infected patients. *J Oral Pathol Med.* 2009 Jul; 38(6): 489-94.
12. Kakabadze T, Rukhadze N, Mshvidobadze K, Lomtadze M, Kandelaki G. Oral lesions in HIV-positive patients in Georgia. *Georgian Med News.* 2008 Dec; (165):60-5.
13. Owotade FJ, Shiboski CH, Poole L, Ramstead CA, Malvin K, Hecht FM, Greenspan JS. Prevalence of oral disease among adults with primary HIV infection. *Oral Dis.* 2008 Sep; 14(6): 497-9.
14. Mellors J, Muñoz A, Giorgi J, Margolick J, Tassoni C, y otros. et al. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med.* 1997 Jun 15; 126(12):946-54.
15. Rodríguez M. Manifestaciones orales asociadas con la infección por VIH-SIDA. *Rev Cub Estomatol.* 2005 Ene 42; (1):1-6.
16. Ranganathan K, Umadevi M, Saraswathi TR, Kumarasamy N, Solomon S, Johnson N. Oral lesions and conditions associated with human immunodeficiency virus infection in 1000 South Indian patients. *Ann Acad Med Singapore.* 2004 Jul; 33(4): 37-42.
17. Lourenço AG, Figueiredo LT. Oral lesions in HIV infected individuals from Ribeirão Preto, Brazil. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2008 May 1; 13(5):281-6.
18. Bravo IM, Correnti M, Escalona L, Perrone M, Brito A, Tovar V, Rivera H. Prevalence of oral lesions in HIV patients related to CD4 cell count and viral load in a Venezuelan population. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006 Jan 1; 11(1):33-9.
19. Ramírez V, Esquivel L, Irigoyen E, Anaya G, González I. Association of oral lesions with HIV serological status. *Salud Publica Mex.* 2002 Mar-Apr; 44(2): 87-91.
20. Benito M, Benito UM, Bernardoni C, Arteaga M, Sotolongo M, Benito M, Pereira S, Morón A. Manifestaciones bucales en pacientes VIH positivos y su relación con valores de Linfocitos CD4. *Acta Odontol. Venez.* 2007 45; (2):229-33.
21. Ceballos-Salobreña A, Gaitaín-Cepeda L, Ceballos-García L, y otros. et al. Prevalence of oral lesions by *Candida* sp: Their varieties and serotypes in a population of patients with AIDS under a highly active antiretroviral therapy. *Rev Iberoam Micol.* 1998 Jul; 15: 141-5.
22. Kamiru HN, Naidoo S. Oral HIV lesions and oral health behaviour of HIV-positive patients attending the Queen Elizabeth II Hospital, Maseru, Lesotho. *SADJ.* 2002 Dec; 57(11): 479-82.
23. Guteta S, Feleke Y, Fekade D, Neway M, Diro E. Prevalence of oral and perioral manifestations in HIV positive adults at Tikur Anbessa Teaching Hospital Addis Ababa, Ethiopia. *Ethiop Med J.* 2008 Oct; 46(4): 349-57.
24. Tappuni AR y Fleming GJ. The effect of antiretroviral therapy on the prevalence of oral manifestations in HIV-infected patients: a UK study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001 Dec; 92(6):623-8.

25. Margiotta V, Campisi G, Mancuso S, Accurso V, Abbadessa V. HIV infection: oral lesions, CD4+ cell count and viral load in an Italian study population. *J Oral Pathol Med.* 1999 Apr; 28(4):173-7.

26. Baqui A, Meiller T, Jabra-Rizk M, Zhang M, Kelley J, Falkler W. Association of HIV viral load with oral diseases. *Oral Dis.* 1999 Oct; 5(4):294-8.

27. Nicolatou-Galitis O, Velegraki A, Paikos S, Economopoulou P, Stefaniotis T, Papanikolaou IS, Kordossis T. Effect of PI-HAART on the prevalence of oral lesions in HIV-1 infected patients. A Greek study. *Oral Dis.* 2004 May; 10(3):145-50.

Recibido: 16 de mayo de 2012.

Aprobado: 21 de junio de 2012.

*MSc. Dr. Orlando R. Serrano Barrera.* Universidad de Ciencias Médicas, Las Tunas, Cuba. Correo electrónico: [orlandosb@infomed.sld.cu](mailto:orlandosb@infomed.sld.cu)