



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO  
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS  
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA  
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**“Estado físico, carga viral del VPH-16 y su relación  
con el estrés oxidativo en las lesiones tempranas  
del cérvix uterino”**

# **T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA

**MARÍA CONCEPCIÓN RIVERA ALVARADO**

DIRECTORA DE TESIS

DRA. LUZ DEL CARMEN ALARCÓN ROMERO

CODIRECTORA

DRA. YANETH CASTRO CORONEL

CHILPANCINGO, GRO.

FEBRERO 2015

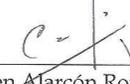


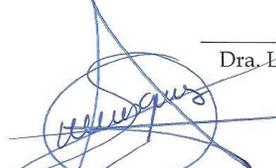
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO  
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS  
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA  
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

APROBACIÓN DE TESIS

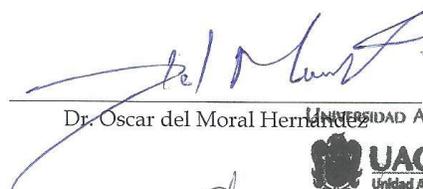
En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 30 días del mes de junio de dos mil catorce, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Estado físico, carga viral del VPH-16 y su relación con el estrés oxidativo en las lesiones tempranas del cérvix uterino", presentada por la alumna María Concepción Rivera Alvarado, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

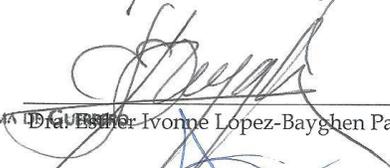
El Comité Tutorial

  
Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero  
Dirección de tesis

  
Dra. Amalia Vences Velázquez

  
Dra. Berenice Illades Aguiar

  
Dr. Oscar del Moral Hernández

  
Dra. Ivonne Lopez-Bayghen Patiño

Vo. Bo



Dra. Isela Parra Rojas  
Coordinadora del Posgrado en Ciencias Biomédicas

  
Dra. Amalia Vences Velázquez  
Directora de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas



Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación en Citopatología e Histoquímica de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero, en Chilpancingo de los Bravo, Gro.

**Bajo la dirección de**

Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero

**Y la codirección de**

Dra. Yaneth Castro Coronel

**La asesoría de**

Dra. Berenice Illades Aguiar

Dr. Oscar del Moral Hernández

Dra. Amalia Vences Velázquez

Dra. Esther Ivonne López-Bayghen Patiño

Durante el periodo que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas (2012-2014) la C. María Concepción Rivera Alvarado recibió beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), a quien agradece el otorgamiento de dicha beca.

Esta investigación agradece el financiamiento otorgado por el CONACYT en el 2014, a través del proyecto denominado "Fortalecimiento de los cuerpos académicos del área biomédica para contribuir a la mejora de la docencia, investigación, posgrado y vinculación en la Universidad Autónoma de Guerrero".

## **AGRADECIMIENTOS**

A la **Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero.**

Por ser una excelente directora de tesis, por apoyarme y formarme como Químico Biólogo Parasitólogo y ahora como Maestra en Ciencias Biomédicas. Gracias a su experiencia, entrega, dedicación y a su valioso tiempo fue posible la culminación de este proyecto.

Gracias por haberme dado la oportunidad de estar bajo su dirección, ya que he adquirido y forjado conocimientos que son indispensables en mi formación profesional, mi admiración y cariño, muchas gracias.

A la **Dra. Yaneth Castro Coronel.**

Por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia en un marco de confianza y afecto, los cuales fueron fundamentales para concretar satisfactoriamente este proyecto.

Gracias por haberme inculcado que con esfuerzo y dedicación se pueden cumplir los objetivos que uno se proponga, por su valiosa asesoría y consejos, muchas gracias.

A la **Dra. Amalia Vences Velázquez.**

Por su compañía como tutora, por sus consejos, su tiempo y por su calidad humana que me ayudaron a seguir con ánimo esta etapa, muchas gracias.

A la **Dra. Berenice Illades Aguiar, Dr. Oscar del Moral Hernández y la Dra. Esther Ivonne López-Bayghen Patiño.**

Por sus valiosas aportaciones en la elaboración de este proyecto, fundamentales para el enriquecimiento del mismo, muchas gracias doctores.

## DEDICATORIAS

En memoria de mi padre, **Mario Rivera Meraza**, por la guía y el amor que siempre me acompaña, por tu deseo de que fuera una mujer exitosa, sé que donde estés, esto te hará muy feliz, te amo y extraño.

A mi madre, **Francisca Alvarado Gómez**, por su amor incondicional, por ser una madre excepcional, porque la mejor educación es la que se da en el hogar, muchas gracias madre.

A mis hermanas, **Laura Rebeca** y **Violeta Olimpia**, por el apoyo y cuando estamos juntas recreamos el tiempo de infancia, siguen siendo las mismas aun con los años.

A mi amigo del alma, a mi médico personal, a mi maestro en Ciencias y en corto tiempo doctor, **José Alfredo Villanueva Duque**, por lo mucho que hemos compartido y por lo mucho que no falta por vivir. Muchas gracias guapo.

A los amigos y compañeros que iniciamos juntos esta etapa, les deseo el mejor plan de vida, en especial a mi amiga **Narayana Pineda**, por todos los momentos que reímos y bailamos sin parar, te quiero mucho.

A todo el grupo de trabajo del **Lab. de Investigación en Citopatología e Histoquímica**, a las compañeras que realizaron Servicio Social **Dulce** y **Gloria** por su apoyo y por qué al enseñarles yo aprendía más. A la maestra **Isabel Zubillaga**, por su compañía y apoyo en todos estos años en mi estancia. A mi amiga, la maestra **Magali Lagunas** y a la química **Ilse**, por su apoyo y consejos, por los momentos que pasamos juntas, muchas gracias.

A la química **Natividad** por su disposición y apoyo en mi larga etapa experimental. Muchas gracias.

A mi pareja, por vivir y sufrir todas las transiciones que implica realizar un proyecto, por darme momentos inmensamente felices que me hacían valorarme cuando todo salía mal, por estar en las buenas y en las malas, en los episodios de derrota y de éxito, muchas gracias.

“La cosa más valiosa que puedes hacer es cometer un error, nada aprendes tratando de ser perfecto”

**“Estado físico, carga viral del VPH-16 y su relación con el estrés oxidativo en las lesiones tempranas del cérvix uterino”**

## **ÍNDICE**

<b>I. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>II. ABSTRACT</b>	<b>2</b>
<b>III. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>IV. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>7</b>
<b>V. RESULTADOS</b>	<b>11</b>
<b>VI. DISCUSIÓN</b>	<b>25</b>
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	<b>36</b>
<b>VIII. ANEXOS</b>	<b>38</b>
<b>IX. REFERENCIAS</b>	<b>42</b>

## I.RESUMEN

**INTRODUCCIÓN.** La integración de los VPH-AR se considera un evento clave en la progresión de las lesiones escamosas intraepiteliales (LEIs), este proceso se lleva a cabo en regiones de ADN. También la carga viral se ha relacionado con la infección persistente de los VPH-AR. La integración viral puede ser inducida por el estrés oxidativo al generar productos oxidantes en el ADN. **OBJETIVO.** Determinar el estado físico, la carga viral del VPH-16 y coinfección con otros tipos virales y su relación con el estrés oxidativo en las LEIBG y en muestras sin LEI. **METODOLOGÍA.** Se realizó un estudio transversal en el que se incluyeron 72 muestras de citología en base líquida. Se realizó Hibridación *in Situ* con amplificación con tiramida (HIS) para determinar el estado físico del VPH. Para la determinación de las especies reactivas del oxígeno (ROS) se utilizó Kit CellRox Green Reagent. Se realizó PCR en tiempo real para la expresión de las enzimas antioxidantes y para la determinación de la carga y estado físico del VPH-16. **RESULTADOS.** Se diagnosticaron 17 citologías sin LEI y sin VPH, 20 citologías sin LEI con VPH y 35 con LEIBG. Por HIS se encontró el estado mixto del VPH en un 75% y el estado integrado en un 10% en las citologías sin LEI. En las LEIBG un 62.9% y 20% en el estado mixto e integrado respectivamente. Las LEIBG con VPH-16 en coinfección con VPH-AR y con el estado mixto, mostraron un aumento en la carga viral. Se encontró un aumento de las ROS en las LEIBG versus las citologías sin LEI ( $p=0.02$ ). La infección por VPH-16, la presencia de cervicitis crónica y la coinfección por agentes patógenos mostraron los niveles de ROS más altos. La integración del VPH mostró mayor producción de ROS y un aumento de la SOD-1 y GPX. **CONCLUSIONES.** La integración del VPH-AR se presentó desde la infección latente del virus. Pero los caso de LEIBG mostraron más el estado integrado, aunado a un mayor número de copias del VPH-16 en coinfección con VPH-AR, un aumento en la producción de ROS y una mayor expresión de SOD-1 y GPX.

**PALABRAS CLAVE.** Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado, carga viral, integración viral, ROS.

## II. ABSTRACT

**INTRODUCTION.** Integration of HR-HPV is considered a key event in the progression of squamous lesions intraepitheliales (LEIs), this process takes place in regions of DNA. Viral load has been proposed as an additional parameter in conjunction with the integration, as has been associated with persistent infection of HR-HPV. Viral integration can be induced by oxidative stress to generate DNA oxidizers. **OBJECTIVE.** Determine the physical state, viral load and HPV-16 coinfection with other HPV types and their relationship with oxidative stress in LSIL and samples without LEI. **METHODOLOGY.** A cross-sectional study in which 72 samples were included cytology was performed in liquid foundation. In Situ Hybridization was performed with tyramide amplification (ISH) to determine the physical state of HPV. For determination of reactive oxygen specie (ROS) CellRox Green Reagent Kit was used. For the expression of antioxidant enzymes and for determining the physical condition of the cargo and HPV-16 and co-infection with HR-HPV was performed by real time PCR. **RESULTS.** 17 were diagnosed NSIL without HPV, 20 NSIL HPV and 35 with LSIL. By HIS mixed HPV status was found in 75% and the state 10% integrated in smears NSIL. In LSIL 62.9% and 20% in the mixed state and integrated respectively. The LSIL with HPV-16 coinfection with HR-HPV with mixed HPV status showed an increase in viral load. Significant increase ROS in LSIL versus NSIL. The HPV-16 infection, the presence of chronic cervicitis and pathogens coinfection showed higher levels of ROS. HPV integration showed increased production of ROS and increased SOD-1 and GPX. **CONCLUSIONS.** HPV integration is introduced from the latent virus infection. But most cases LSIL integration showed coupled to a larger number of copies of HPV-16 in coinfection, increased ROS production and increased expression of SOD-1 and GPX. **KEYWORDS.** Squamous intraepithelial lesion of low grade, viral load, viral integration, ROS.

### III. INTRODUCCIÓN

El virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo (VPH-AR) es una causa necesaria, pero no suficiente en el desarrollo del carcinoma cervical invasor (CCI). El VPH-AR se transmite sexualmente e infecta epitelios mucosos donde se pueden desarrollarse las lesiones escamosas intraepiteliales (LEIs) (Alba *et al.*, 2009), y carcinomas de células escamosas y adenocarcinomas (Kim *et al.*, 2012). Existen más de 100 tipos de VPH, los cuales se designan de bajo o alto riesgo en función del desarrollo de lesiones benignas o cancerosas. La infección persistente de los tipos de VPH-AR como el VPH-16, 18, 45, 31, 33, 51 y 52 es un factor de riesgo importante para el desarrollo de CCI (Pett y Coleman, 2012). Además, es importante mencionar que la coinfección viral con más de un tipo de VPH es muy frecuente, especialmente en las mujeres jóvenes y se ha asociado con un mayor riesgo de las LEIs (Chaturvedi *et al.*, 2011).

El sistema de Bethesda clasifica a las lesiones tempranas como LEI de bajo grado (LEIBG) también conocidas como displasia leve o la neoplasia intraepitelial cervical 1 (NIC 1), mientras que las LEI de alto grado (LEIAG) incluyen la displasia moderada o NIC 2 y la displasia severa y carcinoma *in situ* o NIC III (Miraval y Morón, 2005). Es importante mencionar que los cambios citológicos pueden ocurrir después de 3 meses de la infección por el VPH y aunque se plantea que en 2 a 3 años podría haber regresión (alrededor del 90%), se ha demostrado que las LEIBG a través de factores virales como la persistencia, carga e integración viral y recientemente se ha propuesto que el estrés oxidativo, podrían progresar a una LEIAG en un plazo de un año (Trotier *et al.*, 2009).

El ADN viral puede encontrarse en la célula infectada de forma integrado al genoma hospedero y se ha relacionado frecuentemente con los casos de LEIAG y CCI y actualmente se ha señalado que está presente en el 19.6% de las LEIBG (Jiménez-Tagle *et al.*, 2014). También se puede encontrar libre en el núcleo en forma episomal y compartiendo las formas integradas y episomales (forma mixta) en las LEIs (Das *et al.*, 2012). Al respecto Zubillaga-Guerrero *et al.*, (2013) evaluó el estado físico del VPH-AR en LEIBG, encontrando el estado mixto en un 90% y el estado integrado en un 10%. Por lo que la integración puede ser un evento temprano en el desarrollo de CCI.

La integración de los VPH-AR se considera un evento necesario en la progresión de las lesiones cervicales, este proceso se lleva a cabo en regiones de ADN llamados Sitios Frágiles Cromosómicos (SFC). La región E2 ha sido identificada como el sitio de integración preferencial, su ausencia da como resultado la expresión desregulada de los oncogenes virales E6 y E7, lo que origina la degradación de proteínas supresoras de tumores como pRb y p53 (Raybold *et al.*, 2011). Diversos estudios han reportado un aumento en la frecuencia de integración de los VPH-AR.

Estudios han propuesto la evaluación de la integración del VPH-AR en conjunto con parámetros adicionales como la carga viral, lo que se ha relacionado con la infección persistente de los VPH AR como el VPH-16 y la progresión de las LEIs (Raybouldo *et al.*, 2011). En este sentido, Wanram *et al.*, (2009) evaluaron la carga viral del VPH-16 encontrando un aumento en relación al grado de la lesión, mientras que Xi *et al.*, 2009 determinaron la carga viral en mujeres con infección múltiple encontrando un incremento en la carga viral en comparación con las que tenían un solo tipo viral ( $p < 0.001$ ).

Actualmente se considera que el proceso por el cual el VPH-AR integra el ADN al genoma del huésped no ha sido completamente dilucidado. Un posible mecanismo es el daño al ADN mediado por la inflamación, debido a la producción de cantidades excesivas de especies reactiva del oxígeno (ROS) (William *et al.*, 2011), tales como el anión superóxido ( $O_2^-$ ) y el peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) son producto del metabolismo celular aeróbico normal y juegan un papel relevante actuando como segundos mensajeros en numerosas vías de señalización relacionadas con la homeostasis celular (Reuter *et al.*, 2010). Sin embargo, existen diversos factores que aumentan las concentraciones de estos metabolitos por encima de las condiciones fisiológicas normales, dentro de los cuales se encuentran el humo del tabaco, la obesidad y la infección persistente por microorganismos patógenos caracterizada por la infiltración de leucocitos polimorfonucleares (PMN) provocando en el huésped una respuesta inflamatoria crónica (Lonkar *et al.*, 2011; Sethi *et al.*, 2012).

La inflamación ha sido implicada en la progresión de una gran variedad de canceres, en el caso de CCI asociado a los VPH-AR se ha propuesto como un posible promotor

de progresión de las lesiones del cérvix uterino (William *et al.*, 2011). Por lo que algunos estudios han evaluado las ROS en las diferentes etapas de las lesiones cervicales, al respecto Carrero *et al.*, (2009) evaluaron la expresión de O<sub>2</sub> en muestras con NIC 1, NIC 2 y NIC 3 encontrando un incremento en la producción de O<sub>2</sub> en relación a la progresión de las NIC.

Los niveles de las ROS se equilibran con diversos mecanismos de defensa antioxidante, que consisten en componentes enzimáticos como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, y los componente no enzimáticos como las vitaminas E, C, entre otras (Nirmala y Narendhirakannan, 2011). La función de los mecanismos antioxidantes consiste en la donación de electrones neutralizando la alta reactividad de las ROS convirtiéndolo en metabolitos no radicales (Durackova, 2010). Sin embargo, en un proceso inflamatorio crónico se ha reportado una disminución de los niveles enzimático antioxidante y en consecuencia estrés oxidativo (William *et al.*, 2011), lo que permite que las ROS reaccionen con diversas moléculas de importancia biológica, que principalmente conducen daño al ADN (Kaushal y Kudva, 2013).

El daño oxidativo al ADN inducido por las ROS le confiere susceptibilidad e inestabilidad genética. Los productos oxidantes más reportados son 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua), 8-oxo-7, 5,6-dihidroxi-5,6-dihidrotimina (timina glicol, Tg), lo que puede causar detección de la transcripción, errores en la replicación e inestabilidad genómica (Marco, 2013). Se ha propuesto que el daño al ADN inducido por las ROS puede facilitar la integración del VPH-AR y así contribuir en la progresión de las LEIs (Murata *et al.*, 2012).

Por otro lado, diversos estudios han analizado la integración viral en mujeres con CCI y en sus lesiones precursoras, sin embargo no se ha esclarecido por completo los factores que se encuentran asociados (Pett y Coleman, 2007). La carga viral ha sido el principal factor al que se le ha relacionado con la persistencia viral, pero este tema por las diferencias de resultados que se han reportado sigue siendo objeto de debate, además de que también existen pocos estudios que han evaluado la carga viral en las coinfecciones con VPH-AR por lo que sería importante su análisis en estas condiciones (Kim *et al.*, 2012; Chaturvedi *et al.*, 2011). Por lo que este estudio permitirá

evaluar la integración de los VPH-AR en las lesiones tempranas del cérvix uterino y así tener una mayor comprensión de los factores virales asociados y del microambiente cervical.

#### **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

**POBLACIÓN DE ESTUDIO.** En este estudio participaron 72 mujeres residentes del estado de Guerrero, México durante el periodo de 2012-2014 que asistieron al Servicio de Diagnóstico Integral en la detección oportuna del Cáncer Cérvicouterino y VPH de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas (UACQB) de la Universidad Autónoma de Guerrero (UAG). Cada una de las participantes firmó un consentimiento informado (Anexo 1) y respondieron a una encuesta (Anexo 2) con el objetivo de obtener información clínica y obstétrica y variables de riesgo.

**TOMA DE MUESTRA.** A todas las mujeres que refirieron no haber consumido antioxidantes en un tiempo menor de seis meses se incluyeron en el estudio y se les realizó una toma de muestra de la zona exo-endocervical utilizando una espátula de Ayre de madera para el exocérvix y cepillo endocervical para el endocérvix, asegurando así la toma de muestra de la zona de transformación. Los extendidos de citología convencional y en base líquida (Liqui PREP) fueron teñidos con Papanicolaou y fueron clasificados en base a la clasificación de Bethesda por una citopatóloga con 22 años de experiencia certificada por el Consejo Mexicano. Los casos de cervicitis aguda se determinaron por la presencia de polimorfonucleares (PMN), mientras que la presencia de histiocitos clasificó los casos de cervicitis crónica. También en las citologías se realizó la búsqueda de la presencia de pseudomicelios y levaduras morfológicamente compatibles con *Cándida sp* y cambios en la flora por la presencia de células clave indicadoras de *Gardnerella vaginalis*.

**TIPIFICACIÓN DEL VPH.** La segunda toma se utilizó para la genotipificación del VPH, utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) acoplada a hibridación de INNO-LiPA genotyping Extra (Innogenetics) procedimiento que se realizó en colaboración con el Laboratorio de Biomedicina Molecular de la UACQB de la UAG.

**CITOLOGÍA EN BASE LIQUIDA.** El material citológico se depositó la muestra en un frasco de solución de conservación del Kit Liqui PREP, se agitó la muestra en vortex y

posteriormente se centrifugó a 3,500 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante se decantó y se homogenizó el sedimento, a partir del cual se preparó una dilución de 1:5 para la realización de extendidos en laminillas silanizadas para la determinación del estado físico del ADN del VPH por Hibridación *in Situ* (HIS) con amplificación con tiramida (DAKO).

**DETECCIÓN DEL ADN DEL VPH EN CITOLOGÍA EN BASE LIQUIDA POR HIBRIDACIÓN *IN SITU* (HIS).** La detección del genoma viral por la HIS se realizó con el sistema de amplificación de señal de tiramida (GenPoint Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA). Los extendidos citológicos en monocapa se sometieron a digestión durante 1 minuto con proteinasa K (1:1000). Posteriormente se aplicó 0.5 µl del reactivo prueba (ADN viral biotinado) que contiene para 13 genotipos de VPH-AR (VPH-16, 18, 31, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) y sondas individuales dirigidas a los tipos de VPH-BR 6 y 11. Los extendidos fueron desnaturalizados por 10 minutos a 95°C y posteriormente a hibridación por 20 horas a 37°C (Hibridizador Dako, Carpinteria, CA, USA). Posteriormente las muestras se colocaron en una solución astringente y se les agregó el anticuerpo primario estreptavidina peroxidasa, después biotil-tiramida y el anticuerpo secundario estreptavidina. Se agregó el cromógeno DAB y finalmente Hematoxilina de Mayer (Merck). La reacción positiva se visualizó con un color marrón en el interior del núcleo y en relación al tipo de señal se clasificó como difusa (Estado episomal), puntiforme (Estado integrado) o mixta (Estado episomal e integrado). Las líneas celulares SiHa (VPH-16) se utilizaron como control positivo mostrando el estado integrado, la misma línea celular sin la sonda se utilizó como control negativo.

**MEDICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LAS ROS.** Se utilizó una técnica fluorométrica utilizando el Kit *CellRox Green Reagent* (Invitrogen, Oregón, USA) como sonda para la detección de las ROS totales. Después de la incubación por 30 minutos a 37°C con la sonda a una concentración de 2.5 µM se realizaron lavados con PBS a 1x. La intensidad de fluorescencia de excitación se midió a una longitud de onda de 485 nm y la de emisión a 520 nm utilizando el equipo de citometría de flujo Guava easyCyte

HT (Millipore) (Anexo 3). La fluorescencia obtenida se reportó como unidad de fluorescencia relativa (UFR) en base a la lectura de 5,000 células.

**EXPRESIÓN GÉNICA DE SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD-1) Y GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPX).** La expresión de las enzimas antioxidantes fue realizada mediante el Kit KAPA SYBR FAST One-Step qRT-PCR (Biosystems, Foster City, California). El ARN fue extraído a partir de las citologías en base líquida por el método del Trizol (Anexo 4) Reagent Life Technologies (Invitrogen, Carlsbad, California) Se verificó la integridad del ARN en geles de agarosa al 1%. Los ensayos se realizaron en el PCR en tiempo real 7500 (Applied Biosystem, Foster City, USA). El volumen de la mezcla de reacción fue de 10  $\mu$ L preparada como sigue: 5.8  $\mu$ L de la mix de PCR, 0.25  $\mu$ L a una concentración de 10 pM cada primer [Superóxido dismutasa (**SOD-1**) FW 5'-UUGGAGAUAAUACAGCAGGC-3' y RV 5'CCAUCUUUGUCAGCAGUCAC-3'; Glutation peroxidasa (**GPX**), FW 5'-GTACTACTTATCGAGAATGTGGCG-3' y RV 5'-CAAAGTGGTTGCACGGGAAG-3'] y 1  $\mu$ L de ARN (200 ng). Para la reacción de PCR se llevó a cabo ciclos preliminares de 30 s a 37°C, 5 min a 42°C y 5 min a 95°C. Seguido por 40 ciclos de 20 s a 95°C, la Tm de alineamiento de los primers fue de 30s a 60°C y para la curva de disociación fue de 15 s a 95°C, 1 min a 60°C y 15 s a 60°C. La expresión de SOD-1y GPX fue normalizada con el gen GADPH. El método de cuantificación relativa  $\Delta \Delta Ct$  se utilizó para determinar la expresión de SOD-1 y GPX de acuerdo con la fórmula  $2^{-\Delta \Delta Ct}$ .

**CARGA VIRAL Y ESTADO FÍSICO DEL VPH 16 POR PCR EN TIEMPO REAL.** Para la determinación del estado físico y la carga viral del VPH 16, se realizó la amplificación de los genes **E6** [FW 5'-ACCGTTGTGTGATTTGTTAATTAGGTGTA-3' y RV 5'-CGTTTTTGTCCAGATGTCTTTGCTT-3', sonda 5'-CAGGACACAGTGGCTTT-3']; **E2** [FW 5'-TGGATATACAGTGGAAAGTGCAGTTTG3' y RV 5'-CCACAGTTACTGATGCTTCTTCACA-3', SONDA 5'-FAM-CACCCCGCCGCGACCCATA-BHQ-1-3-3']; **RNAseP** [FW 5'-TGCATTTGACTCCTGAGGAGAG-3' y RV 5'-GGGCCTCACCACCAACTTC-3', sonda 5'-VIC-CTGCCGTTACGTCCCT-BHQ-1-3-3'] por PCR en tiempo real utilizando

el equipo 7500 (Applied Biosystems), usando el kit Taqman Universal Master Mix II. Para el estado físico se interpretó como estado episomal puro cuando no se observó disminución ni ausencia del gen E2 en relación a E6, el estado integrado puro se determinó cuando la expresión de E2 fue indetectable, mientras que la forma mixta fue determinada mediante la disminución del número de copias de E2 en relación a E6 (Cheung *et al.*, 2006).

**CONSIDERACIONES ÉTICAS Y DE BIOSEGURIDAD.** La presente investigación se basó a lo establecido por los ordenamientos y principios nacionales e internacionales para la investigación en seres humanos en el Reglamento de Investigación de la Ley Federal de Salud, Organización Mundial de la Salud (OMS). El manejo y eliminación de residuos peligrosos biológicos infecciosos se realizó de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA-2002 y la declaración de Helsinki para investigación médica en seres humanos, incluida la investigación del material humano y de información identificable (Mazzanti-Di Ruggiero, 2011).

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO.** Los resultados fueron expresados en frecuencias y se utilizó la prueba exacta de Fisher para el análisis del estado físico del VPH. La carga viral, la determinación de las ROS y la expresión de las enzimas antioxidantes fueron expresadas en media  $\pm$  DE y se utilizó la prueba t-Student. El valor de  $p < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

## V. RESULTADOS

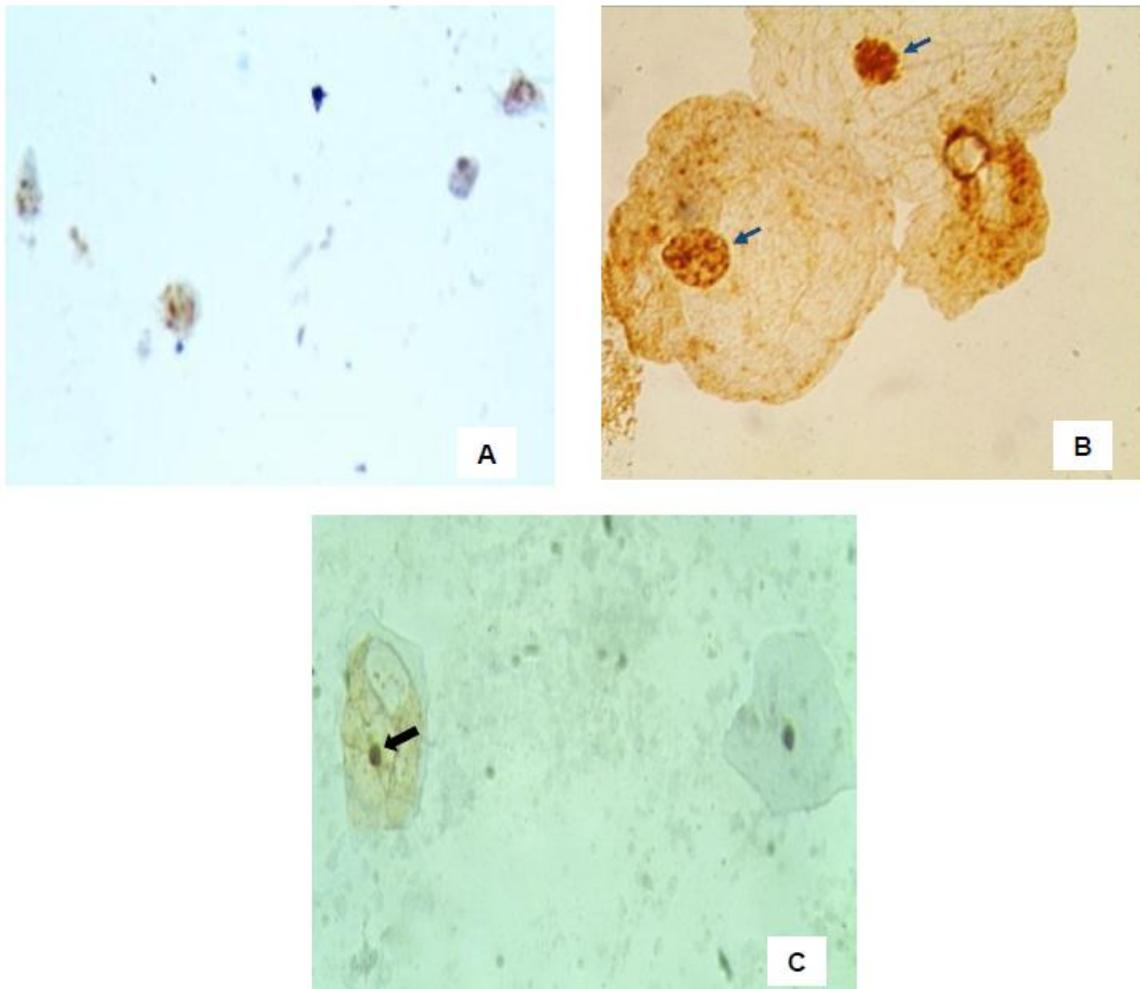
**Población de estudio.** Los grupos de estudio fueron 17 mujeres con diagnóstico de citología sin LEI y sin VPH comprobado por INNO-LiPA, 20 con citología sin LEI con la infección por el VPH y 35 con LEIBG. Las mujeres mayores de 25 años fueron las más frecuentes en los tres grupos de estudio. El total de la población cursaba por procesos inflamatorios asociados a cervicitis y el 100% de las LEIBG presentó la infección por el VPH ( $p=<0.05$ ) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Características generales de los grupos de estudio

	SIN LEI SIN VPH n=17 (%)	SIN LEI CON VPH n=20 (%)	LEIBG n=35 (%)	*P
<b>EDAD</b>				
<18	2 (11.8)	0 (0)	0 (0)	0.057
18-25	2 (11.8)	8 (40.0)	8 (22.9)	
>25	13 (76.5)	12 (60.0)	27 (77.1)	
<b>HÁBITO DE FUMAR</b>				
SI	0 (0)	1 (5.0)	5 (14.3)	0.256
NO	17 (100.0)	19 (95.0)	30 (85.7)	
<b>CONSUMO DE ALCOHOL</b>				
SI	3 (17.7)	2 (25.0)	8 (22.9)	0.934
NO	14 (82.4)	15 (75.0)	27 (77.1)	
<b>CERVICITIS</b>				
NO	1 (5.9)	0 (0)	0 (0)	0.383
AGUDA	16 (94.1)	18 (100.0)	32 (91.4)	
CRÓNICA	0 (0)	0 (0)	3 (8.6)	
<b>MICROORGANISMOS</b>				
NO	15 (88.3)	16 (80.0)	28 (80.0)	0.851
<i>Gardnerella vaginalis</i> Y/O <i>Cándida sp.</i>	2 (11.8)	4 (20.0)	7 (20.0)	
<b>INFECCIÓN POR EL VPH</b>				
NEGATIVO	17 (100.0)	0 (0)	0 (0)	<0.05
VPH-BR	0 (0)	2 (10.0)	6 (17.1)	
<sup>a</sup> VPH-AR	0 (0)	4 (20.0)	9 (25.7)	
VPH-16	0 (0)	4 (20.0)	5 (17.1)	
VPH-16 EN	0 (0)	6 (30.0)	5 (14.3)	
COINFECCIÓN				
<sup>b</sup> IM	0 (0)	4 (20.0)	9 (25.7)	

VPH Virus del Papiloma Humano, LEI Lesión Escamosa Intraepitelial, LEIBG Lesión Escamosa de Bajo Grado, VPH-BR Virus del Papiloma Humano de Bajo Riesgo, VPH-AR Virus del Papiloma Humano de Alto riesgo, <sup>a</sup>Tipos de VPH-AR diferente al VPH-16 (51, 52, 39, 45 y 59). <sup>b</sup>IM Más de un tipo viral. El valor de  $p$  fue calculado usando la prueba exacta de Fisher.

**Estado físico del VPH por HIS.** Interesantemente, los resultados muestran (Tabla 2), que las citologías sin LEI con VPH-16 en coinfección con VPH-AR, presentaron el estado mixto en un 33.3% y un caso presentó el estado integrado. En las LEIBG con infección múltiple el 36.4% presentó el estado mixto, en el caso de las mujeres con el VPH-16 en coinfección con otros tipos virales, el 22.7% presentó el estado mixto y sólo en un caso se observó el estado integrado ( $p=<0.05$ ) (Figura 1A). El 100% de las infecciones con VPH-BR presentaron el estado episomal (Figura 1B).



**Figura 1. Estado físico del VPH en las LEIBG.** A. Grupo de núcleos desnudos con cariomegalia y que presentaron el patrón de señal puntiforme, que corresponde al estado integrado del VPH-16. B. Células del epitelio plano con caromegalia que presentan el patrón de señal puntiforme (flecha azul) que corresponde al estado integrado. C. Células intermedias normales con el patrón de señal difuso que cubre el núcleo y que corresponde al estado episomal del VPH-6 (flecha negra). Método: Citología en base líquida. Técnica: Hibridación *in Situ* con amplificación con tiramida (HIS). 40X

**Tabla 2.** Estado físico del ADN de los grupos de VPH

DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO	DIAGNÓSTICO MOLECULAR	EPISOMAL n= (%)	INTEGRADO n= (%)	MIXTO n= (%)	*P
SIN LEI	VPH-BR	2 (66.7)	0 (0)	0 (0)	0.056
	*VPH-AR	0 (0)	0 (0)	4 (26.7)	
	VPH-16	0 (0)	1 (50.0)	3 (20.0)	
	VPH-16 EN COINFECCIÓN	0 (0)	1 (50.0)	5 (33.3)	
	*IM	1 (33.3)	0 (0)	3 (20.0)	
LEIBG	VPH-BR	5 (83.3)	0 (0)	0 (0)	<0.05
	<sup>a</sup> VPH-AR	0 (0)	5 (71.4)	5 (22.7)	
	VPH-16	0 (0)	1 (14.3)	4 (18.8)	
	VPH-16 EN COINFECCIÓN	0 (0)	1 (14.3)	5 (22.7)	
	<sup>b</sup> IM	1 (16.7)	0 (0)	8 (36.4)	

VPH Virus del Papiloma Humano, VPH-BR VPH de Bajo Riesgo; VPH-AR VPH de Alto Riesgo; <sup>a</sup>Tipos de VPH-AR diferente al VPH-16 (51, 52, 39, 45 y 59). <sup>b</sup>IM Más de un tipo viral.; LEI Lesión Escamosa Intraepitelial, LEIBG Lesión Escamosa de Bajo Grado. El valor de *p* fue calculado usando la prueba exacta de Fisher.

**Carga viral del VPH-16 y su relación con el estado físico del VPH por HIS.** La determinación de la carga viral se realizó a 18 de 20 muestras, debido a la baja concentración de ADN que presentaron dos de ellas. Al evaluar este parámetro encontramos que no existen diferencias significativas entre el número de copias en relación al diagnóstico citológico, solo se observó una tendencia al aumentar la media en las LEIBG. También se encontró un claro aumento en la media del número de copias en los grupos que presentaron el VPH-16 en coinfección en comparación con las que solo tenían el VPH-16, sin embargo estas diferencias no fueron significativas (Tabla 3A). Además al relacionar la carga viral y el estado físico del VPH-AR, se encontró que el estado mixto tanto en las LEIBG y sin LEI se reportó un aumento en la media del número de copias en comparación con las que presentaron el estado integrado (tabla 3B).

**Tabla 3 A.** Carga viral del VPH-16

		MEDIA± DE	CARGA VIRAL BAJA n (%)	CARGA VIRAL ALTA n (%)
SIN LEI VPH	<b>VPH-16</b> n=3	0.2062±0.1529	3 (100.0)	0 (0)
MEDIA± DE 4.8256±4.2341	<b>VPH-16 EN COINFECCIÓN</b> n=6	7.1352±6.3103	5 (83.3)	1(16.7)
LEIBG	<b>VPH-16</b> n=4	0.6810±0.3936	4 (100)	0 (0)
MEDIA± DE 5.2054±4.5469	<b>VPH-16 EN COINFECCIÓN</b> n=5	8.8249±8.1833	4 (80.0)	1 (20.0)

VPH Virus del Papiloma Humano, LEI Lesión Escamosa Intraepitelial, LEIBG Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado, Media± DE. Prueba t-Student.

**Tabla 3B.** Carga viral del VPH-16 en relación con el estado físico viral

	ESTADO FISICO POR HIS	MEDIA± DE	CARGA VIRAL BAJA n (%)	CARGA VIRAL ALTA n (%)
SIN LEI VPH	<b>INTEGRADO</b> n=1	0.0898±0	1 (100.0)	0 (0)
	<b>MIXTO</b> n=7	6.0554±5.4396	6 (85.7)	1 (14.3)
LEIBG	<b>INTEGRADO</b> n=3	0.8918±0.4458	2 (100.0)	0 (0)
	<b>MIXTO</b> n=6	7.3622±6.8402	5 (83.3)	1(16.6)

VPH Virus del Papiloma Humano, LEI Lesión Escamosa Intraepitelial, LEIBG Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado, Media± DE. Prueba t-Student.

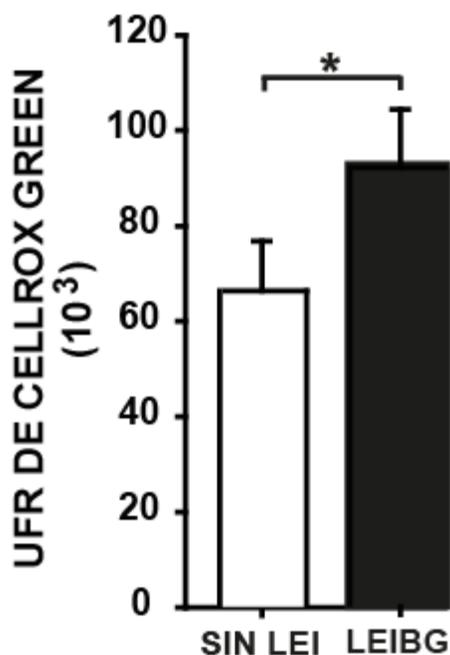
**Concordancia del estado físico del ADN del VPH entre la HIS y la PCR en tiempo real.** La PCR en tiempo real además de determinar el número de copias, permite determinar el estado físico del VPH, en este caso el VPH-16 al igual que en la HIS, esto nos permitió determinar la concordancia entre ambas metodologías. En la tabla 4 se observa que la HIS y la PCR coincidieron en 14 de las 18 determinaciones que se realizaron obteniendo una concordancia moderada.

**Tabla 4.** Concordancia del estado físico del VPH-AR entre la HIS y la PCR en tiempo real

		PCR		
		INTEGRADO	MIXTO	TOTAL
HIS	INTEGRADO	3 (16.7)	1 (5.6)	4 (22.2)
	n (%)			
	MIXTO	3 (16.7)	11 (61.1)	14 (77.8)
	n (%)			
TOTAL	6 (33.3)	12 (66.7)	18 (100.0)	
n (%)				

Kappa 0.045 (Moderada concordancia). HIS Hibridación *in Situ*

**Producción de las ROS y el diagnóstico citológico.** La media del grupo de las citologías sin LEI y las LEIBG fue de 66.4 y 91.7, respectivamente, mostrando diferencias significativas (Figura 2).

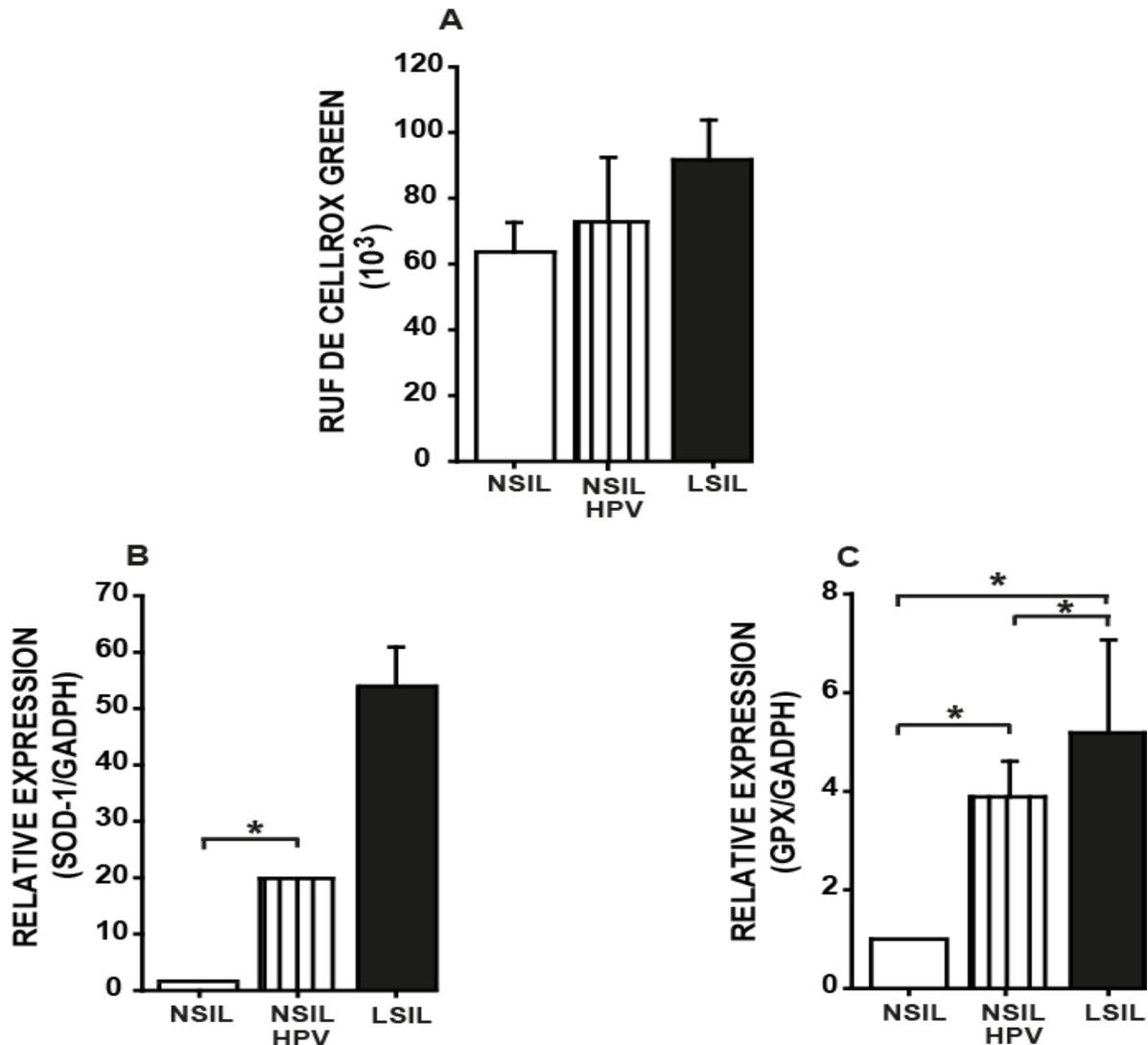


**Figura 2.** Análisis de las ROS en mujeres con citología sin LEI y LEIBG (Media± D.E). Prueba t-Student. Sin LEI versus LEIBG  $p=0.02$ .

LEI Lesión Escamosa Intraepitelial; LEIBG Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado; UFR Unidad Relativa de Fluorescencia.

**ROS y estado antioxidante en los grupos de estudio.** En la figura 3 se observa un aumento lineal en relación al grado de la lesión, sin embargo no se encontraron diferencias significativas aparentemente entre las citologías sin LEI y LEIBG. Además, hemos encontrando una mayor expresión de SOD-1 y GPX en las LEIBG *versus*

citologías sin LEI. En el caso de GPX, se observaron diferencias significativas entre los tres grupos, al observarse un aumento lineal de la expresión en relación al grado de lesión. Este incremento en la actividad enzimática puede atribuirse como una respuesta al aumento de las ROS en la etapa productiva del VPH, es decir, en las LEIBG.



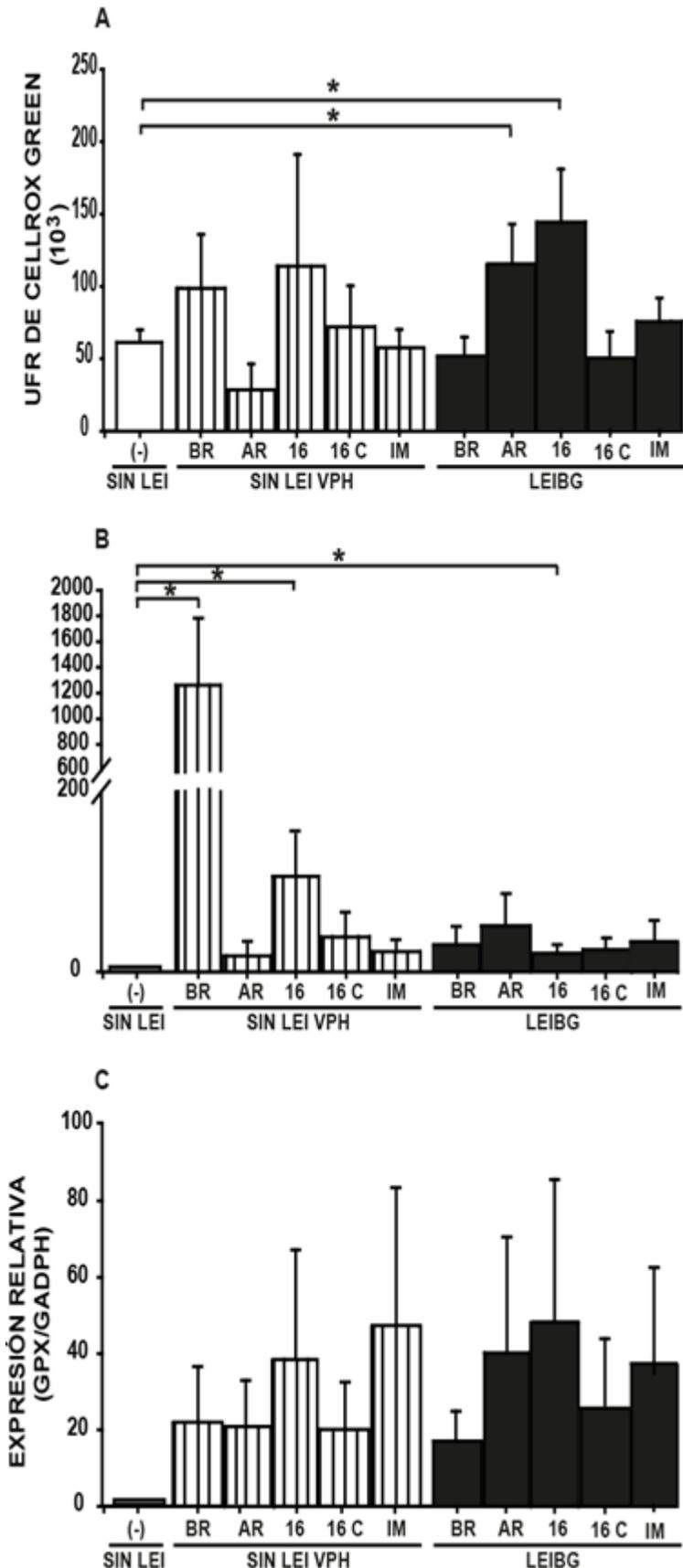
**Figure 3.** ROS and antioxidant status in the study groups (Mean  $\pm$  S. E) **A.** Analysis of ROS. **B.** Gene expression of SOD-1. NSIL versus NSIL HPV  $p= 0.001$ . **C.** Gene expression of GPX. NSIL versus NSIL HPV  $p<0.0005$ , NSIL versus NSIL HPV  $p=0.03$ , NSIL HPV versus LSIL  $p=0.04$ . Test t-Student.

HPV Human papilloma virus; NSIL No sign of intraepithelial lesion; LSIL Low grade squamous intraepithelial lesion; RUF Relative Unit Fluorescencia.

**ROS y estado antioxidante en relación a la infección por VPH por riesgo oncogénico.** Nosotros hemos encontrado un aumento de las ROS en todas las mujeres que presentaron la infección por el VPH-16. Sin embargo, solo las LEIBG que presentaron VPH-16 y aquellas que presentaron la infección por VPH-AR con una media de 144.3 y 115.5 respectivamente se encontraron diferencias significativas en comparación con el grupo de sin LEI y sin VPH (Figura 4A).

En relación a la parte antioxidante, se encontró un marcado incremento en la expresión de la SOD-1 en las citologías sin LEI y LEIBG con VPH-16 ( $p=0.003$ ,  $p=0.01$ ) (Figura 4B).

La expresión de GPX se encontró aumentada en los casos de LEIBG con VPH-16 y en la citologías sin LEI asociadas con infecciones múltiples, sin embargo no mostraron diferencias significativas (Figura 4C).

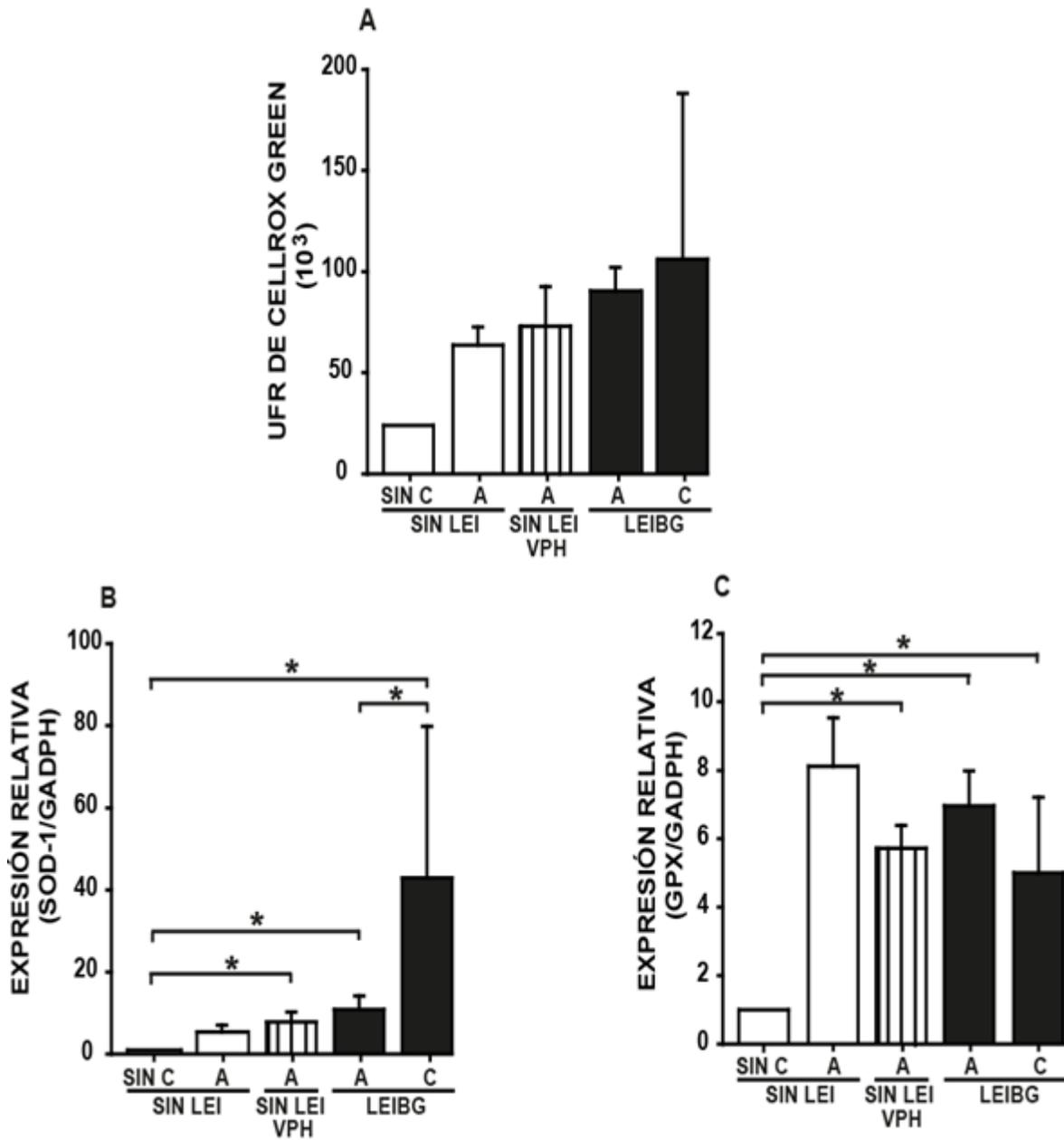


**Figura 4. ROS y estado antioxidante en relación a la infección por el VPH por riesgo oncogénico (Media± E.S). Prueba t-Student. A) Análisis de las ROS. Sin LEI VPH (-) versus LEIBG VPH-AR  $p=0.03$ . Sin LEI (-) versus LEIBG VPH-16  $p=0.003$ . B) SOD-1. Sin LEI (-) versus Sin LEI VPH-BR  $p= <0.0005$ . Sin LEI (-) versus Sin LEI versus VPH 16  $p=0.003$ . Sin LEI (-) versus LEIBG VPH-16  $p=0.01$ . C) GPX.**

LEI Lesión Escamosa Intraepitelial; VPH Virus del Papiloma Humano; (-) VPH negativo; BR VPH de Bajo Riesgo; AR VPH de Alto Riesgo; 16 VPH 16; 16 C VPH 16 en coinfección con otros VPH; IM Más de un tipo viral; LEIBG Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado; UFR Unidad Fluorescencia Relativa.

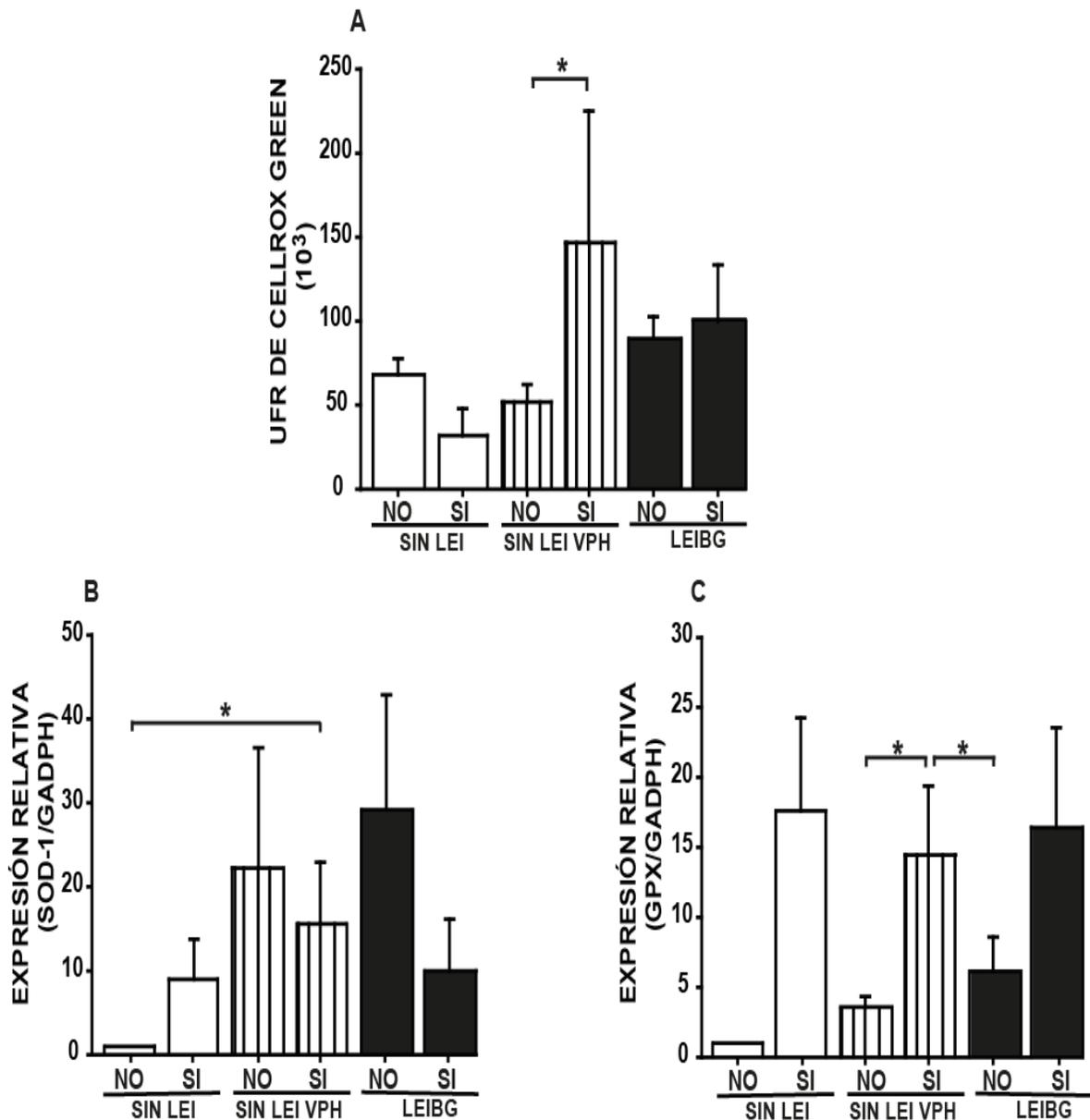
**Producción de las ROS y estado antioxidante asociado a la cervicitis y a la coinfección con agentes infecciosos.** Al analizar las ROS en las mujeres con y sin patrón inflamatorio cervical (cervicitis) donde observamos un aumento gradual en relación al grado de la inflamación cervical con respecto al grado de la lesión, pero no se encontraron diferencias significativas (figura 5A). En la figura 5 B encontramos un aumento significativo en la expresión de SOD-1 en las LEIBG con cervicitis crónica en comparación con las que presentaron cervicitis aguda en el mismo grupo. En el caso de la GPX, se encontraron diferencias significativas entre las citologías sin LEI con VPH y en las LEIBG tanto con cervicitis aguda y crónica en comparación con las citologías sin LEI y sin cervicitis, pero no entre los mismo grupos (Figura 5C).

En la figura 6 A encontramos un aumento estadísticamente significativo de las ROS en las mujeres con citología sin LEI con VPH en presencia de agentes infecciosos en comparación con aquellas mujeres que solo tenían la infección por VPH en el mismo grupo de estudio. En la figura 6 B se observó una respuesta estadísticamente significativa en la expresión de SOD-1 al aumento de las ROS, al encontrarse aumentada en las citologías sin LEI con VPH en coinfección con agentes infecciosos. En el caso de la GPX, su expresión fue diferencial, al observarse un aumento estadísticamente significativo en las citologías sin LEI con VPH en coinfección con agentes infecciosos en comparación con las que solo presentaban la infección por VPH en el mismo grupo (Figura 6C).



**Figura 5. ROS y estado antioxidante en los grupos de estudio asociados a cervicitis (Media± E.S). Prueba t-Student. A) Análisis de las ROS. B) SOD-1.** Sin LEI sin cervicitis versus sin LEI VPH aguda  $p=0.02$ . Sin LEI sin cervicitis versus LEIBG aguda  $p=0.002$ . Sin LEI sin cervicitis versus LEIBG crónica  $p<0.0005$ . LEIBG aguda versus LEIBG crónica  $p=0.03$ . **C) GPX.** Sin LEI sin cervicitis versus sin LEI VPH aguda  $p<0.0005$ . Sin LEI sin cervicitis versus LEIBG aguda  $p<0.0005$ . Sin LEI sin cervicitis versus LEIBG crónica  $p<0.0005$ .

LEI Lesión Escamosa Intraepitelial; VPH Virus del Papiloma Humano; LEIBG Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado; Sin C Sin cervicitis; A Aguda; C Crónica; UFR Unidad Relativa de Fluorescencia.



**Figura 6. ROS y estado antioxidante en la coinfección con otros agentes infecciosos** (Media± E.S). Prueba t-Student. **A) Análisis de las ROS.** Sin LEI VPH ausencia de agentes infecciosos versus Sin LEI en presencia  $p=0.03$  **B) SOD-1.** Sin LEI ausencia de agentes infecciosos versus Sin LEI VPH en presencia  $p<0.005$  **C) GPX.** Sin LEI VPH ausencia versus Sin LEI VPH presencia de agentes infecciosos

LEI Lesión Escamosa Intraepitelial; VPH Virus del Papiloma Humano; LEIBG Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado; Si Presencia de agentes infecciosos; No Ausencia de agentes infecciosos; UFR Unidad Relativa de Fluorescencia.

**ROS y estado antioxidante en relación a algunas covariables.** Con respecto al hábito de fumar observamos un aumento de las ROS estadísticamente significativo en las mujeres con LEIBG que refirieron tener este hábito en comparación con el grupo de sin LEI que refirieron no tenerlo. Además en el grupo de las LEIBG se observó un comportamiento diferencial, al aumentar significativamente los niveles de las ROS solo en las mujeres que fuman. Este comportamiento de las ROS pareciera activar los sistemas antioxidantes tanto de la SOD-1 como de la GPX, ya que se observó un aumento significativo de las mujeres con LEIBG que fuman en comparación con el grupo de sin LEI y que no presentan este hábito (Tabla 5).

**Tabla 5.** ROS y estado antioxidante con respecto al hábito de fumar

	HÁBITO DE FUMAR	ROS (UFR)	SOD-1 (EXPRESIÓN RELATIVA SOD-1/GADPH)	GPX (EXPRESIÓN RELATIVA GPX/GADPH)
SIN LEI	NO	61.3±8.7	1.0±0	1.0±0
	SI	0	0	0
SIN LEI VPH	NO	72.9±18.8	6.3±1.0	3.9±0.7
	SI	31.0±1.0	5.3±1.6	8.3±2.6
LEIBG	NO	80.3±10.8	20.7±8.2	5.0±2.0
	SI	160.0±47.8 <sup>a,b</sup>	25.9±14.8 <sup>c</sup>	17.0±8.1 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> LEIBG Si versus Sin LEI No  $p=0.003$ , <sup>b</sup> LEIBG Si versus LEIBG No  $p=0.019$ , <sup>c</sup> LEIBG Si versus Sin LEI No  $p=0.02$ , <sup>d</sup> LEIBG Si versus Sin LEI No  $p=0.009$ . LEI Lesión Escamosa Intraepitelial; VPH Virus del Papiloma Humano; LEIBG Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado; UFR Unidad Relativa de Fluorescencia. Media± DE. Prueba t-Student.

Al realizar el análisis en cuanto al hábito del alcohol, no se encontraron diferencias en los niveles de las ROS en los grupos de estudio, sin embargo las mujeres con LEIBG que refirieron tener este hábito reportaron los niveles de ROS más altos y que además presentaron un aumento significativo en la expresión de SOD-1 y GPX en comparación con el grupo de sin LEI que refirieron no tener este hábito (Tabla 6).

**Tabla 6.** ROS y estado antioxidante con respecto al hábito del alcohol.

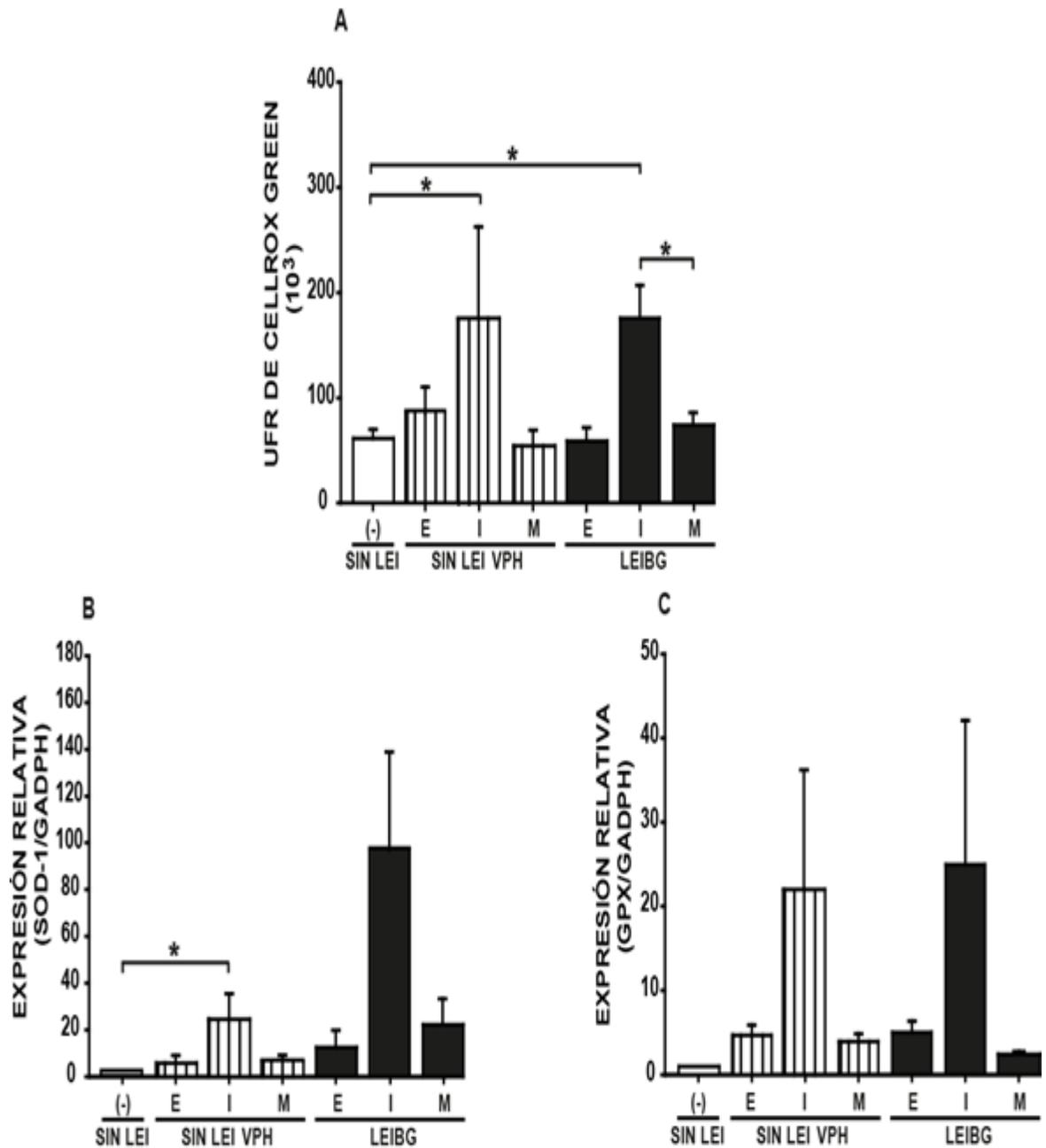
	HÁBITO DE ALCOHOL	ROS (UFR)	SOD-1 (EXPRESIÓN RELATIVA SOD-1/GADPH)	GPX (EXPRESIÓN RELATIVA GPX/GADPH)
SIN LEI	NO	63.1±9.7	1.0±0	1.0±0
	SI	52.7±22.6	8.8±3.9	11.2±4.1
SIN LEI VPH	NO	46.1±35.7	22.4±7.5	3.9±1.2
	SI	35.7±10.0	19.9±8.2	12.8±8.1
LEIBG	NO	86.3±11.4	31.2±10.5	4.4±1.7
	SI	109.9±37.6	41.1±26.2 <sup>a</sup>	8.9±3.1 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> LEIBG Si versus Sin LEI No  $p=0.02$ , <sup>b</sup> LEIBG Si versus Sin LEI No  $p=0.0005$ . LEI Lesión Escamosa Intraepitelial; VPH Virus del Papiloma Humano; LEIBG Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado; UFR Unidad Relativa de Fluorescencia. Media± DE. Prueba t-Student.

**ROS y estado antioxidante en relación al estado físico del VPH por HIS.** En esta investigación encontramos un aumento significativo de las ROS en los casos que presentaron el estado integrado del VPH-AR, tanto en las citologías sin LEI como en las LEIBG. Sin embargo, se observó un aumento diferencial de las ROS solo en las LEIBG con el estado integrado del VPH en comparación con las que presentaron el estado mixto, del mismo grupo (Figura 7A).

La expresión de SOD-1 se encontró aumentada en los casos que presentaron el estado integrado del VPH en comparación con el estado episomal o mixto tanto en las citologías sin LEI como en las LEIBG, sin embargo no encontraron diferencias significativas entre estos. Solo en el caso de las citologías sin LEI con el estado integrado versus citología sin LEI sin VPH, se encontró un aumento significativo correspondiente al aumento de las ROS que presentó este mismo grupo (Figura 7B).

El mismo comportamiento de expresión se observó con la GPX, la cual se incrementó en los casos de LEIBG y en las citologías sin LEI que presentaron el estado integrado del VPH-AR (Figura 7C).



**Figura 7. ROS y estado antioxidante en relación al estado físico del ADN del VPH por HIS (Media± E.S). Prueba t-Student. A) Análisis de las ROS.** Sin LEI VPH (-) versus Sin LEI integrado  $p=0.03$ . Sin LEI VPH (-) versus LEIBG integrado  $p<0.0005$ . LEIBG integrado versus LEIBG mixto  $p=0.02$ . **B) SOD-1.** Sin LEI VPH (-) versus Sin LEI integrado  $p=0.01$ . **C) GPX.**

LEI Lesión Escamosa Intraepitelial; VPH Virus del Papiloma Humano; LEIBG Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado; (-) VPH negativo; E Episomal; I Integrado; M Mixto; UFR Unidad Relativa de Fluorescencia.

## VI. DISCUSIÓN

La infección por VPH-AR es una causa necesaria en el desarrollo de las LEIs y el CCI. Aproximadamente el 80% de las mujeres sexualmente activas adquieren una infección por el VPH durante su vida (Schemeik *et al.*, 2011). Existen factores que se han asociado con en el desarrollo de las LEIs, como el estado integrado del VPH considerado como un paso crítico en la carcinogénesis cervical; durante este evento los VPH-AR promueven la transcripción de las oncoproteínas E6 y E7 (Guo *et al.*, 2007), incluso autores han reportado que la carga viral podría participar en este mecanismo, ya que se ha observado un aumento en el número de copias de E6 y E7, lo que podría influir en la transformación y mantenimiento del fenotipo maligno (Manawapatt *et al.*, 2011; Ho *et al.*, 2011). La progresión de las LEIs también puede ser modulada en un ambiente de estrés oxidativo originado por el desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes, donde las ROS pueden causar daño al ADN participando así en el inicio y promoción de la carcinogénesis (Williams *et al.*, 2011; Ziech *et al.*, 2011).

Para tratar de explicar lo anterior, primero se caracterizó a los grupos de estudios en relación con algunos factores que podrían ser determinantes en el grado de las LEIs. No se encontraron diferencias significativas en cuanto a la edad, el fumar, el ingerir alcohol ni la presencia de cervicitis y/o algunos microorganismos. Sin embargo, se observa que en el grupo de las LEIBG, el 100% presentó cervicitis, encontrándose solo tres casos de cervicitis crónica, además, se encontró la presencia de microorganismos en 7 de estos casos; mientras que en las muestras de citologías sin LEI sin y con VPH-AR no presentan casos de cervicitis crónica, y los casos de infección por microorganismos fueron menores. Al respecto, se conoce que la infección por *Gardnerella vaginalis* altera la flora vaginal protegida por los *Lactobacillus sp*, al existir un crecimiento excesivo de esta bacteria anaerobia, se considera que hay mayor susceptibilidad de adquirir otras infecciones entre ellas la infección por VPH-AR, lo que aumenta el riesgo de desarrollar una LEI (Guillet *et al.*, 2012) esto podría explicar el mayor número de hallazgos de las patologías benignas asociadas a las LEIBG. No se ha reportado si la cervicitis es una causa o consecuencia de la infección por VPH, pero autores como Caste *et al.*, 2001 sugiere que la inflamación cervical puede ser un

cofactor en el desarrollo de las LEIs, ellos en un estudio de casos y controles encontraron un aumento estadísticamente significativo de casos de cervicitis en mujeres con NIC I ( $p=0.003$ ) y con 1.9 veces de riesgo de tener una lesión mayor. Aunque se sabe que los cofactores como la edad, el inicio de vida sexual activa, el número de compañeros sexuales y la paridad son determinantes en la persistencia del VPH (Tota *et al.*, 2011; Illades-Aguilar *et al.*, 2008), pocos estudios se han dirigido a resaltar la importancia de los procesos que están coexistiendo con el VPH. Por lo que este trabajo es importante para implementar nuevas estrategias de pronóstico y diagnóstico.

El estudio citológico y molecular se realizó en conjunto para un diagnóstico más integral. En este estudio el VPH-16 en coinfección se encontró como el más prevalente en un 30% en el grupo de las citologías sin LEI y en el caso de las LEIBG el más frecuente fueron las infecciones múltiples (25.7%) seguido de la infección por tipos de VPH-AR (17.1%). Es importante destacar que las mujeres que presentaron VPH-16 solo o en coinfección no se incluyeron en el grupo de los VPH-AR en el análisis, ya que diversos estudios han demostrado que el VPH-16 desarrolla infecciones persistentes (Mirabello *et al.*, 2013; Carcopino *et al.*, 2012; García-Tamayo *et al.*, 2009) y además tiene una alta prevalencia en las LEIs debido al tropismo que presenta por los filamentos intermedios de las células escamosas del cérvix uterino (Cambruzi *et al.*, 2005).

Además, está bien establecido que los VPH-AR tienen la capacidad de integrarse al ADN del huésped (Pett y Coleman, 2012; Raybould *et al.*, 2011) pero poco se ha indagado en las lesiones tempranas y más aún en las citologías sin LEI. Partiendo de este conocimiento, en este estudio se determinó el estado físico del ADN del VPH-AR para conocer su patrón de expresión, encontrando el estado integrado y mixto en las LEIBG con VPH-AR en un 71.4% y 22.7%, respectivamente. En el caso de las citologías sin LEI con VPH AR solo se encontró el estado mixto en un 26.7%. En cuanto a la infección por VPH-16, las citologías sin LEI presentaron el estado mixto en un 20% y las LEIBG en un 18.8%. Todos los VPH-AR, VPH-16, VPH-16 en coinfección y las infecciones múltiples presentaron tanto el estado integrado como el mixto, excepto solo un caso de infección múltiple que presentó el estado episomal. Estos resultados fueron

mayores a los obtenidos por Chih-Ming *et al.*, 2011 donde analizaron 46 muestras con NIC I con VPH-AR, encontrando el estado mixto en un 47.8% y el estado integrado en un 4.3%. Y fueron similares a los reportados por Zubillaga-Guerrero *et al.*, 2013 donde en citologías en base líquida reportaron el estado integrado en un 10% y 20% en las LEIBG y en las citologías sin LEI. Esto nos indica que la ubicación geográfica influye en el patrón de expresión del VPH, ya que existen diferentes variantes de VPH con diferente potencial oncogénico (Jang *et al.*, 2011), y puntualiza que el haber encontrado en nuestro estudio el estado integrado del VPH-AR en las LEIBG y aún más en las citologías sin LEI nos podría indicar que de manera temprana se esté llevando a cabo cierta inestabilidad a nivel celular, por lo tanto podrían aumentar las probabilidades de progresión de ambos grupos, por lo que se requiere control y seguimiento estricto en estos casos (Raybould *et al.*, 2011).

Aunado a esto, diversos estudios han reportado la asociación de una alta carga viral con el riesgo de desarrollar CCI y las lesiones precursoras (Shukla *et al.*, 2014; Marks *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2007). En este estudio se observó un ligero aumento en la media del número de copias en las LEIBG en comparación con las citologías sin LEI. Aunque estos resultados no pueden ser concluyentes por el tamaño de la muestra, esto concuerda biológicamente con el ciclo del VPH, ya que las lesiones tempranas se caracterizan por desencadenar infecciones productivas dando origen a múltiples copias virales por la presencia de coilocitosis (Briolat *et al.*, 2007), mientras que en las citologías sin LEI la infección se mantiene latente a un bajo número de copias (Lizano *et al.*, 2009), y a su vez se puede explicar por el hecho de que las células anormales expresan menos moléculas de adhesión intracelular que las células normales y por lo tanto son exfoliadas con mayor facilidad. Estos hallazgos fueron similares a los de Briolat *et al.*, al reportar una media de número de copias en las NIC I de 113,160 mientras que las mujeres con histología normal presentaron una media de 2,114. Además se observó un aumento en el número de copias en las infecciones con VPH-16 en coinfección en comparación con las que presentaron solo el VPH-16. En contraste, con lo reportado con Xi *et al.*, 2009 al reportar un número de copias mayor en las infecciones individuales de VPH-AR en comparación con las que presentaron más de un tipo viral, ellos concluyen que es debido a la competencia entre más de un

tipo viral por replicarse, ya que utilizan la misma maquinaria celular, por lo tanto la disponibilidad de factores de transcripción y traducción se hacen insuficientes. La alta variabilidad de los resultados de la carga viral puede deberse por la falta de homogenización en los análisis de medición y de análisis, así como también de la diferencia del número de células infectadas a pesar de que tenga el mismo diagnóstico, o también puede deberse a que se necesite diferentes niveles de replicación para interrumpir la homeostasis celular e inducir cambios biológicos que conducen el desarrollo de una LEI. Los resultados encontrados son relevantes ya que diferentes estudios han determinado la carga viral sin analizar el estado físico del VPH (Mark *et al.*, 2011; Xi *et al.*, 2009). Además algunos han utilizado la carga viral total de una mezcla de diferentes tipos de VPH (Schlecht *et al.*, 2003). A pesar de que la literatura señala una relación importante entre la carga viral, la integración y el grado de las LEIs con los diferentes tipos de VPH (Saunier *et al.*, 2008; Ho *et al.*, 2006). Nuestro estudio relaciona la carga viral del VPH-16 con su estado físico de este virus, encontrando un aumento en el número de copias en el estado mixto de los grupos de estudio en comparación con el estado integrado. Yoshida *et al.*, 2008 también reportaron un aumento de la carga viral del VPH-16 en el estado mixto de las NIC I en comparación con las que presentaron el estado integrado y para complementar esta información Cheung *et al.*, 2008 reportaron un aumento en la carga viral en el estado episomal en comparación con el estado mixto e integrado. Estas observaciones concuerdan con el hecho de que en los episomas se lleva a cabo la replicación viral por lo tanto existe un aumento en la carga viral, este aumento podría aumentar la probabilidad de integración de las células, mediante una selección de clones, al estar integrado el virus ya no se replica y por lo tanto disminuye su carga viral. Esto es coherente con la carga relativamente baja encontrada en las líneas cervicales de carcinoma como SiHa (1-2 copias del VPH-16 integrado). Sin embargo, la baja carga viral con un genoma integrado puede ser suficiente para promover la carcinogénesis, esto lo demuestra la alta frecuencia de integración viral en los casos de CCI (Zhang *et al.*, 2010). Existe cierta discrepancia sobre el estado físico del VPH de las LEIBG, específicamente el estado integrado por el uso de diferentes metodologías. En nuestro estudio al utilizar la HIS mostró una moderada concordancia con los ensayos de PCR.

Esto representa una mejora importante en la sensibilidad de la HIS al coincidir en 14/18 casos. En este sentido Takuma *et al.*, 2005 reportó una menor tasa de concordancia entre estas metodologías al coincidir en 37 de 43 casos. En relación a los casos donde hubo discrepancia, se pudiera deber que en los 3 casos donde la HIS detecto el estado mixto y la PCR el estado integrado a que la sonda de la HIS al ser de amplio espectro, es decir al identificar la señal de 13 tipos de VPH-AR, pudiera detectar la señal episomal de otro tipo viral diferente al VPH-16 y por ello al tener ambas señales, las muestras fueron asignadas con el estado mixto. Sin embargo, este fue un problema técnico, ya que en la HIS existen sondas individuales para el VPH-16. Aunque también pudiera deberse a la distribución heterogénea de la infección por VPH en las LEIBG, lo que pudiera repercutir en el comportamiento del estado físico. Ambas técnicas pueden ser complementarias y su uso puede ser importante, ya que la PCR posee una alta sensibilidad y la HIS tiene la ventaja de preservar el material citológico y a la vez hacer la detección de la señal de una copia integrada del VPH-16 en la línea SiHa (Guo *et al.*, 2007; Raybould *et al.*, 2007), por lo que la combinación de ambos métodos puede ser un medio más fiable al evaluar el estado físico.

Aunado a esto, existen otros factores que pueden actuar de manera dependiente o independiente en relación a la infección por el VPH, ya sea como consecuencia de una respuesta inflamatoria, alterando el estado redox y por lo tanto promoviendo la carcinogénesis (Giuliano, 2003). Por lo que este estudio, es uno de los pocos o si no es que el primero en evaluar el estrés oxidativo en el microambiente cervical. Nuestros resultados mostraron un aumento significativo de las ROS en las mujeres que presentaron la imagen patognómica del VPH, que es la presencia del coilocito que se diagnostica como una LEIBG en comparación con las que no presentaron ninguna alteración a nivel citológico (Sin LEI). Los autores plantean que la producción de las ROS en las lesiones tempranas está relacionado con las etapas de infección que presenta el virus. Por ejemplo, Williams *et al.*, 2011 describe que cuando la infección por el VPH se encuentra en un estado productivo en las LEIBG, el aumento del número de copias podría activar una respuesta inmune activa, desencadenando una respuesta inflamatoria, provocando por esta vía un aumento en las ROS, mientras que en las citologías sin LEI no se activan los presentadores de antígeno por permanecer la

infección aún bajo número de copias. En este sentido, se ha reportado una importante relación de la respuesta inmune con el grado de las LEIs, como Hammes *et al.*, 2007 al reportar una asociación significativa entre el número de macrófagos y la intensidad de la respuesta inflamatoria con el grado de la lesión, desde una citología sin LEI hasta carcinoma de células escamosas, ellos explican que algunos de los factores quimiotácticos de los macrófagos son derivados de células cervicales, los cuales pueden promover su proliferación, además al encontrar el aumento en los macrófagos en paralelo con la inflamación argumentan que no solo el ambiente inflamatoria atrae a los macrófagos, sino que la lesión en si también participa en este aumento.

También evaluamos si la infección por VPH *per se* modula el estado redox, donde encontramos un aumento gradual de las ROS en relación al grado de la lesión y a la infección por VPH, este aumento fue directamente proporcional para el estado antioxidante de ambas enzimas. Datos que en conjunto muestran una respuesta efectiva de los sistemas antioxidantes ante las ROS. Los altos niveles de ROS no necesariamente dan lugar a estrés oxidativo, ya que dependiendo de la dosis y el tiempo de producción de las ROS va a ser la magnitud del daño celular (Monaghan y Torres, 2009). Por lo que al ser una lesión temprana probablemente los niveles de ROS sean bajos, pudiendo así ser equilibrados por una regulación positiva de las enzimas antioxidantes. También se puede especular que el aumento en la expresión antioxidante en las células oncogénicas sea una forma de adaptación (Termini *et al.*, 2011) porque recordemos que en nuestro estudio el estado mixto e integrado del VPH se encontró en una mayor frecuencia en las LEIBG. Por lo que aún quedan algunos planteamientos sin resolver, ya que no se evaluó el daño oxidativo en los grupos de estudio.

También realizamos el análisis en relación a los grupos de VPH, e interesantemente encontramos un claro aumento de las ROS solo en los casos que presentaron VPH-16, estas diferencias solo fueron significativas en las LEIBG. A su vez, observamos que también la expresión antioxidante particularmente en estos casos se encontró aumentada, encontrando diferencias significativas en la expresión de SOD-1 en las LEIBG con VPH-16. El aumento de las ROS relacionado con la infección por VPH-16 podría explicarse por las investigaciones recientes que han demostrado *in vitro* que la

isoforma de E6\* del VPH-16 incrementa significativamente los niveles de ROS (Williams *et al.*, 2014). En nuestros resultados se desconoce si está presente esta variante en estos casos, pero se sabe que este patrón de empalme solo es característico de los VPH-AR (Her *et al.*, 2011), por lo que se podría explicar el aumento de las ROS significativo solo en estos tipos virales. Sin embargo, los estudios que han evaluado el estado antioxidante asociado al VPH-16 han sido *in vitro*, y en contraste a nuestro estudio han encontrado una disminución antioxidantes (Marco *et al.*, 2013). Estas diferencias se pueden deber a que se ha reportado que los modelos *in vitro* generan inconsistencias para la evaluación de estrés oxidativo. Una de las principales es que en un cultivo celular se lleva a cabo en un 95% de oxígeno y que además estos carecen de antioxidantes (Halliwell, 2003) por lo que existe una sobreestimación de los niveles de las ROS y por consiguiente del estado antioxidante, por lo que antes estas condiciones las células podrían realizar cambios en la expresión génica y actividad metabólica. Además que nuestra población son lesiones tempranas y las líneas celulares son células cancerígenas.

Además de los factores virales, la susceptibilidad genética, factores epigenéticos y de estilo de vida, así como los procesos inflamatorios y la coinfección con agentes patógenos se ha demostrado que aumentan el riesgo de progresión en mujeres con VPH (Williams *et al.*, 2011). Nosotros encontramos un aumento en las ROS en las mujeres con LEIBG con cervicitis crónica en comparación con todas las mujeres que presentaron cervicitis aguda. En paralelo se observó un aumento significativo de SOD-1 en este grupo. Estos resultados se deben tomar con cautela por el tamaño de la muestra que presentaron cervicitis crónica. El aumento de las ROS en los casos de cervicitis crónica podrían deberse a la expresión de enzimas constitutivas o inducibles que ante un ambiente oxidativo presentan un alto rendimiento al reaccionar con las ROS y dar origen a metabolitos más agresivos. En este sentido, Hiraku *et al.*, 2007 reportó un aumento en la expresión de iNOS, una enzima que durante procesos inflamatorios reacciona con el anión superóxido para formar peroxinitritos, un radical altamente reactivo en pacientes con NIC mas cervicitis, además encontraron una asociación significativa entre la expresión de la iNOS y la formación de 8-oxodG, un marcador de daño al ADN. Por lo que sus resultados apuntan a que los procesos

inflamatorios están relacionados con el grado de la neoplasia (al encontrar la expresión de iNOS correlacionarse con el grado de las NIC) y que podrían iniciar un proceso carcinógeno en un ambiente oxidativo mediante el daño al ADN. Hasta el momento no existen reportes sobre la actividad de las enzimas antioxidantes en casos con cervicitis, sin embargo se ha reportado un aumento en su expresión en enfermedades inflamatorias como gastritis crónica, asma, diabetes, entre otras (Comhair y Erzurum, 2001). Por lo que el aumento en la expresión antioxidante pudiera deberse a la participación de factores de transcripción sensibles a reacciones redox, como Nrf2 y AP-1, estos se traslocan al núcleo mediante señales oxidación dando lugar a la expresión de genes protectores como un sistema de adaptación. En este punto, se ha observado que AP-1 y Nrf2 al activarse aumentan la expresión génica antioxidante (Domenico et al., 2011; Kensler *et al.*, 2006).

Además, observamos un aumento significativo en las ROS, en la expresión de SOD-1 y GPX en las citologías sin LEI con VPH en coinfección con agentes patógenos en comparación con las que solo presentaban la infección por VPH en el mismo grupo. *Helicobacter Pilory*, VIH y *Chlamydia trachomatis* son algunos de los patógenos que se ha reportado que aumentan las ROS (Awodele *et al.*, 2011; Baum *et al.*, 2011). Muy poco se ha indagado sobre los efecto que representaría tener más de una infección ya sea viral, bacteriana o micótica. Al encontrar un aumento de las ROS en presencia de una coinfección podría deberse al acumulo de efectos que podrían ejercer ambos patógenos en las células, como un aumento en las actividad enzimática de NADPH oxidasa encargada del proceso denominado “estallido respiratorio” dando lugar a un aumento en las ROS. En este sentido, Boncompain *et al.*, 2010 reportó un aumento de las ROS en células epiteliales infectadas por *Chlamydia trachomatis*, sin embargo también observaron que después los niveles de ROS disminuían, esto es debido a que la bacteria reprimió componentes de la NADH oxidasa inhibiendo su función, confiriéndole persistencia microbiana. Por lo que el aumento antioxidante encontrado en nuestro estudio podría favorecer la prolongación de la infección considerando que *G. vaginalis* y *Cándida sp* podrían presentar el mismo comportamiento. La infección por microorganismos como *G. vaginalis* se ha implicado como un factor de riesgo para la adquisición de infección por VPH (incluyendo a los alto riesgo oncogénico) para el

desarrollo de las LEIs, ya que también se ha asociado en estudios prospectivos con un mayor riesgo de transmisión del VIH, debido a los cambios que genera en el medio vaginal lo que podría promover la supervivencia de estos agentes infecciosos (Watss *et al.*, 2005).

En cuanto a los factores conductuales, el grupo de las LEIBG que refirieron fumar mostró los niveles más altos de ROS, y se observaron diferencias significativas en comparación con las que refirieron no tener este hábito. Sin embargo, el fumar en este estudio pareciera no ser determinante, ya que las citologías sin LEI que refirieron fumar mostraron niveles de ROS inferiores con las que refirieron no tener este hábito en el mismo grupo de estudio. Lo que pareciera que la presencia de la lesión sigue siendo un factor importante en el aumento de las ROS. También pudiera deberse a que las citologías sin LEI que refirieron fumar hayan tenido poco tiempo con este hábito, y por ello no se ve reflejado en los niveles de ROS. Está bien establecido que el humo del cigarro presenta dos fases de gases, una es característica de la presencia de los radicales libres de corta vida como el anión superóxido y peróxido de hidrogeno, y en la otra está presente la semiquinona un radical más estable y capaz de reducir al oxígeno en anión superóxido (Moktar *et al.*, 2009). En este sentido, Russo *et al.*, 2011 en cultivo celulares demostró que el aumento en la concentración de exposición al humo de cigarro y el tiempo es proporcional con la producción de ROS. Lo que nos indica que la cronicidad de este hábito coadyuva al aumento de ROS. Además Stringer *et al.*, 2004 en un modelo *in vivo* reportó un aumento de la SOD al inducir la exposición de alquitrán en un periodo prolongado de tiempo, mientras que en una exposición aguda observo que la actividad de la SOD disminuía. Lo que podría explicar en nuestro estudio el aumento en la expresión antioxidante en los caso de LEIBG.

Los niveles de ROS y el estado antioxidante en relación al hábito del consumo de alcohol no mostraron diferencias importantes, aunque no se encontró correlación se ha reportado que sistemas enzimáticos como el citocromo P450, monooxigenasas, xantina oxidasa y oxidasas de aldehído se han implicado como fuentes de ROS durante la intoxicación de alcohol (Albano, 2006).

En un ambiente de estrés oxidativo existe daño al ADN, mediante cambio de nucleótidos, rompimiento de cadena sencilla o doble (Ziech *et al.*, 2010). Por lo anterior

se ha planteado la hipótesis de que el daño oxidativo al ADN puede facilitar la integración del VPH (Murata *et al.*, 2012), sin embargo no existen evidencias donde hayan evaluado directamente esta relación. Por lo que en este trabajo, encontramos un aumento significativo en la producción de las ROS en el estado integrado del VPH en las citologías sin LEI y en las LEIBG. Y en respuesta a las ROS encontramos los niveles de expresión de SOD-1 y GPX aumentados. Cabe resaltar que los casos de integración presentaron los factores que mostraron mayores niveles de ROS en este estudio como la infección por VPH-AR y VPH-16, así como 3/4 casos de cervicitis crónica, lo que pudiera deberse el aumento de ROS solo en el estado integrado en comparación con el estado mixto y episomal. La actividad de las enzimas antioxidante se ha reportado disminuida (Nirmala y Narendhirakannan, 2011) y en otros estudios aumentada (Termini *et al.*, 2011) en relación al grado de la lesión. Estas diferencias se han atribuido por el ambiente celular y los factores que pueden estar asociado en cada población. Cabe destacar que estos estudios no tomaron en cuenta el estado físico del VPH, por lo que estos cambios le son atribuidos solo a la lesión. El aumento en la expresión de las enzimas antioxidantes encontrado en los casos de integración puede explicarse a lo reportado por Pani *et al.*, 2000 donde en cultivos celulares observaron que la inhibición de p53 regula positivamente la expresión de SOD. Se sabe que durante la integración p53 es degradado por la proteína E6 del VPH (Raybould *et al.*, 2011), por lo que al encontrar estos hallazgos podríamos sugerir que cuando ocurre este proceso las células podrían ser menos susceptibles a estrés oxidativo, lo que podría repercutir en la resistencia a algunos tratamientos como la cauterización que mediante la utilización de sustancias químicas o laser conlleva la producción de ROS. El haber identificado los factores que pudieran coadyuvar la producción de ROS, es importante ya que al estarse generando continuamente estos radicales, en un tiempo determinado la expresión antioxidante no serán suficiente, lo que pudiera favorecer el aumento de los casos de integración.

Sin embargo, se recomienda seguir explorando estos hallazgos en poblaciones más grandes y darles seguimiento para tener un contexto más amplio del comportamiento de la carga viral. También mediante estudios *in vitro* o evaluando el daño oxidativo en

los casos de integración, para demostrar una asociación directa entre los efectos del estrés oxidativo y la integración del VPH.

## VII. CONCLUSIONES

Finalmente los resultados muestran que la integración es un evento que se da desde la infección latente del VPH-AR, evento que comprobamos en las citologías sin LEI mas la infección viral. Aunado a esto las LEIBG mostraron mayor frecuencia de integración que los estudios reportados, indicando que este proceso temprano y es multifactorial ya que requiere de otros factores como la susceptibilidad genética, el sistema inmune del huésped para que se lleve a cabo.

Las LEIBG que presentaron el VPH-16 en coinfección con otros tipos virales y que además presentaron el estado mixto, mostraron un aumento en el número de copias del VPH-16 en comparación con las citologías sin LEI con VPH-16 y con el estado integrado. Sin embargo, para validar estos resultados se debe realizar un estudio a mayor escala donde también se evalué este parámetro en las LEIAG y en cáncer cervical para conocer una asociación más real entre la carga viral, el grado de la lesión y el estado físico del VPH.

Además, al determinar el estado físico del VPH por dos metodologías, nos permitió observar que la HIS mostró una concordancia moderada con la PCR en tiempo real, lo que representa una mejora importante en la sensibilidad de las HIS.

La producción de ROS en las LEIBG mostró un aumento significativo con respecto a las citologías sin LEI a nivel citológico, y en cuanto al diagnóstico citomolecular se observó un aumento lineal de ROS.

Los factores que mostraron mayores niveles de ROS fueron la infección por VPH-16, la presencia de cervicitis crónica, la coinfección por agentes patógenos y el hábito de fumar. La expresión de SOD-1 y GPX en estas condiciones se observó aumentada.

El estado integrado del VPH mostró mayor producción de ROS, así como un aumento en la expresión de SOD-1 y GPX, confirmando un efecto protector ante posibles daño oxidativo. Sin embargo, los casos de integración se relacionaron con los factores antes mencionados, lo que podría generar más ROS y en un tiempo determinado exceder la capacidad de las enzimas antioxidantes lo que podría conferir más riesgo de

progresión a los caso que presenten el virus integrado, por lo que se sugiere un control y seguimiento de las mujeres en estas condiciones.

## VII. ANEXOS.

### Anexo 1. Consentimiento informado.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**  
**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN CITOPATOLOGÍA  
Av. Lázaro Cárdenas, S/N. Ciudad Universitaria. Chilpancingo, Gro. 39090. Tel/Fax (747)4710901  
Responsable: Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero.  
Citotecnóloga del área ginecológica acreditada y recertificada por el Consejo Mexicano de Médicos  
Anatomopatólogos A.C., y Técnicos en Patobiología A.C. No. de Registro: 0152.  
*Servicio de Diagnóstico de Cáncer Cérvico Uterino*



Nº de control \_\_\_\_\_

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

Chilpancingo, Guerrero, a \_\_\_\_\_

A quien corresponda.

Por medio del presente hago constar que he sido informada acerca del estudio que se pretende conducir en el laboratorio de Investigación en Citopatología que está bajo la dirección de la Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero que incluye: citología convencional de Papanicolaou y citología en base líquida. Se ha pedido mi autorización para participar en este estudio y acceder a las encuestas necesarias, me aseguran no se provocara daño físico, mental o social, además de que se tendrá ética profesional y confidencialidad en los resultados y se me entregará un resultado por escrito y debidamente avalado por la responsable del proyecto.

Doy autorización para que me incluyan en este estudio.

**Atentamente**

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del paciente

**Atentamente responsable del proyecto:**

\_\_\_\_\_  
Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero

## Anexo 2. Encuesta.

No. DE CONTROL: \_\_\_\_\_ FECHA DE TOMA: \_\_\_\_\_  
 Nombre de la paciente: \_\_\_\_\_  
 Edad: \_\_\_\_\_ Años. Fecha de nacimiento: \_\_\_\_\_ Originaria de: \_\_\_\_\_  
 Dirección: \_\_\_\_\_  
 Teléfono: \_\_\_\_\_ Correo electrónico: \_\_\_\_\_  
 Grado de escolaridad: \_\_\_\_\_ Institución donde estudia: \_\_\_\_\_  
 Ocupación: \_\_\_\_\_

### ANTECEDENTES GINECO-OBSTÉTRICOS

1.- ¿A qué edad empezó a reglar? \_\_\_\_\_ años. FUR: \_\_\_\_\_ X \_\_\_\_\_ días de sangrado menstrual \_\_\_\_\_  
 2.- Edad de inicio de vida sexual: años. \_\_\_\_\_  
 3.- N° de compañeros sexuales que ha tenido o tiene: N° de compañeros sexuales que ha tenido su pareja: \_\_\_\_\_  
 4.- ¿Utiliza condón en sus relaciones sexuales? (Sí) (No) ¿Desde cuándo? \_\_\_\_\_  
 5.- ¿Qué método de planificación usa? HO: \_\_\_\_\_ HI: \_\_\_\_\_ Ritmo: \_\_\_\_\_  
 Otros: \_\_\_\_\_ ¿Desde cuándo? \_\_\_\_\_  
 6.- N° de embarazos que ha tenido: \_\_\_\_\_ Partos: \_\_\_\_\_ Abortos: \_\_\_\_\_ Cesáreas: \_\_\_\_\_  
 7.- ¿Ha tenido alguna infección vaginal? (Sí) (No) ¿Cuál fue esta? \_\_\_\_\_ ¿Hace cuánto tiempo la tuvo? \_\_\_\_\_ ¿Recibió tratamiento? \_\_\_\_\_  
 8.- ¿Tiene el hábito de fumar? (Sí) (No) ¿Desde cuándo? \_\_\_\_\_ Frecuencia \_\_\_\_\_  
 9.- ¿Tiene el hábito de consumir alcohol? (Sí) (No) ¿Desde cuándo? \_\_\_\_\_ Frecuencia \_\_\_\_\_  
 10.- ANTECEDENTES DE RESULTADOS PREVIOS: Estudios de Papanicolaou: (Sí) (No) Primera vez \_\_\_\_\_  
 Resultado \_\_\_\_\_ Fecha de última toma \_\_\_\_\_  
 Estudio de PCR: (Sí) (No). Resultado \_\_\_\_\_ Fecha de última toma \_\_\_\_\_ Estudio  
 Colposcópico: (Sí) (No). Resultado \_\_\_\_\_ Fecha de última toma \_\_\_\_\_  
 11.- Tratamientos previos: Cauterización: \_\_\_\_\_ Criocirugía: \_\_\_\_\_ Conización: \_\_\_\_\_ Radioterapia: \_\_\_\_\_  
 Quimioterapia: \_\_\_\_\_ Otros: \_\_\_\_\_  
 12.- ¿Conoce sobre la vacuna contra el VPH? (Sí) (No) ¿Se le ha aplicado? (Sí) (No)  
 ¿Qué tipo conoce? \_\_\_\_\_  
 13.- Síntomas que actualmente presenta:  
 Comezón: (Sí) (No) Ardor: (Sí) (No) Flujo vaginal: (Sí) (No) Aspecto: \_\_\_\_\_  
 Sangrado anormal: \_\_\_\_\_ Dolor al coito: (Sí) (No) Sangrado al coito: (Sí) (No). Otros: \_\_\_\_\_

### ASPECTOS DEL CÉRVIX:

Aparentemente normal: Ectropión: \_\_\_\_\_ Erosión: \_\_\_\_\_ Úlcera: \_\_\_\_\_ Pólipo: \_\_\_\_\_ Condiloma: \_\_\_\_\_  
 Neoplasia: \_\_\_\_\_ Flujo vaginal: \_\_\_\_\_

FECHA DE ENTREGA DE RESULTADOS: \_\_\_\_\_

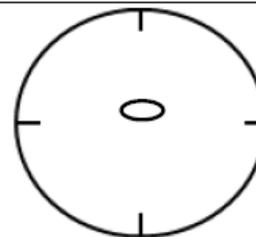
NOTA IMPORTANTE: Los datos proporcionados son de carácter confidencial.

### ESPECIFICAR MATERIAL ENVIADO

\_\_\_ VAGINAL  
 \_\_\_ EXO/ENDOCERVICAL  
 \_\_\_ FONDO DE SACO LATERAL

pH vaginal \_\_\_\_\_  
 Prueba de KOH: (+)(-)  
 No. de laminillas: \_\_\_\_\_  
 Sangrado a la toma endo: (Sí) (No)  
 Cantidad: (+) (++) (+++)

Indicar la localización de la lesión presente



Si hay lesión tomar la muestra de esa zona

**Anexo 3. Determinación de las especies reactivas de oxígeno (ROS)** (Trends Biochem Sci, 2010).

- 1.- A las muestras cervicales en citología en base líquida se les da Vortex de 1 a 3 minutos, posteriormente se le quita el Citobrush para inactivarlo en cloro.
- 2.- Se toman 500µL de la muestra y se coloca en un tubo Eppendorf para la determinación de las ROS.
- 3.- De los 400 µL se separan 200 µL a un tubo Eppendorf, para tener dos tubos con la misma cantidad de muestra, se les da Vortex y se etiquetan los tubos con y sin CellRox.
- 4.- El tubo sin CellRox se conserva en hielo, al tubo con CellRox se le agregara 2 µL del reactivo CellRox a una concentración de 5 µM (dar Vortex por 1 minuto).
- 5.- Ambos tubos (con y sin CellRox) previamente cubiertos con papel aluminio se incuban por 30 minutos a 37°C.
- 6.- Se realizan tres lavados con 500 µL de PBS (entre cada lavado dar Vortex y se centrifuga a 10,000 r.p.m. por 5 minutos).
- 7.- Se resuspende el pellet en 200 µL de PBS y se le da Vortex.
- 8.- Finalmente se procede a leer en el Citómetro de flujo Guava easyCyte HT a 485/520 nm.

#### **Anexo 4. Extracción de ARN por el método del trizol (Hummon *et al.*, 2007)**

- 1.- Centrifugar la muestra (1mL) a 4°C durante 10 minutos a 12 000 r.p.m.
- 2.- Decantar el sobrenadante y dejar la pastilla en el fondo del tubo.
- 3.- Realizar un lavado con 500µl PBS estéril, exclusivo para la extracción de ARN.
- 4.- Centrifugar a 4°C durante 5 minutos a 12 000 r.p.m.
- 5.- Agregar 350µl de trizol y homogenizar con ayuda de una pipeta automática o dar vortex por 3 segundos.
- 6.- Incubar a temperatura ambiente 5 minutos.
- 7.- Agregar 70µl de Cloroformo.
- 8.- Agitar por inversión 15 segundos.
- 9.- Incubar durante 3 minutos a temperatura ambiente.
- 10.- Centrifugar a 4°C durante 10 minutos a 12 000 r.p.m.
- 11.- Separar la fase acuosa a un tubo nuevo y estéril.
- 12.- Agregar 500 µl de Isopropanol frío y homogenizar por inversión.
- 13.- Incuba de 12 minutos a temperatura ambiente.
- 14.- Homogenizar por inversión 3 veces.
- 15.- Centrifugar a 4°C durante 12 minutos a 12 000 r.p.m.
- 16.- Decantar por inversión o puede ser con la ayuda de una pipeta automática.
- 17.- Agregar 200µl de etanol al 70%
- 18.- Centrifugar a 4°C durante 5 minutos a 12 000 r.p.m.
- 19.- Decantar por inversión o con la ayuda de una pipeta automática.
- 20.- Secar la pastilla colocando el tubo boca abajo por unos 10 segundos en un pedaso de papel.
- 21.- Secar la pastilla en hielo frío durante 12 minutos con la tapa abierta.
- 22.- Agregar 15 µl de agua miliQ tratada con DEPEC a 4°C y homogenizar con la pipeta en repetidas ocasiones.
- 23.- Cuantificación de ARN en el nanodrop.

## VIII. REFERENCIAS

- Alba A.**, Cararach C. A., Rodríguez-Cerdeira (2009). The Human Papillomavirus (HPV) in Human Pathology: Description, Pathogenesis, Oncogenic Role, Epidemiology and Detection Techniques. *The Open Dermatology Journal*, (3), 90-102.
- Albano E.** (2006) Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Proceeding of the nutrition society*. 65 (3), 278-290.
- Awodele O.**, Olayemi S. O., Nwite J.A., Adeyemo T.A. (2011) Investigation of the levels of oxidative stress parameters in HIV and HIV-TB co-infected patient. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 6(1), 79-85.
- Baum M. K.**, Sales S., Jayaweera DT., Lai S., Bradwin G. *et al.*, (2011) Coinfection with hepatitis C virus, oxidative stress and antioxidant status in HIV-positive drug users in Miami. *HIV Medicine*. 12 (2), 78–86.
- Briolat J.**, Dalstein D., Saunier M., Joseph K., Caudroy S., *et al.*, (2007) HPV prevalence, viral load and physical state of HPV-16 in cervical smears of patients with different grades of CIN. *International Journal of Cancer*. 121 (3), 2198–2204.
- Boncompain G.**, Schneider B., Delevoye C., Kellermann O., Dautry-Varsat A., *et al.*, (2010) Production of Reactive Oxygen Species Is Turned On and Rapidly Shut Down in Epithelial Cells Infected with *Chlamydia trachomatis*. *Infection and immunity*, 15 (78), 80-87.
- Burk R. D.** y Doorslaer K. (2009) Human papillomaviruses; genetics basis of carcinogenicity. *Public Health Genomics*. 12 (2), 281-290.
- Carcopino X.**, Henry M., Mancini J., Giusiano S., Boubli L. (2012) Significance of HPV 16 and 18 Viral Load Quantitation in Women Referred for Colposcopy. *Journal of Medical Virology*. 84 (3), 306–313.
- Carrero Y.**, Callejas D., Freddy A., Chiquinquira S., Mindiola R., MSc1; Mosquera J. (2009) Increased Vascular Endothelial Growth Factor Expression, CD3-Positive Cell Infiltration, and Oxidative Stress in Premalignant Lesions of the Cervix. *Cáncer*. 12 (2), 3681-3688.
- Castle P. E.**, Hillier S. L., Rabe L. K., *et al.* An Association of Cervical Inflammation with High-Grade Cervical Neoplasia in Women Infected with Oncogenic Human Papillomavirus (HPV) (2001). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 10 (2), 1021-102.
- Chaturvedi A. K.**, Katki H. A., Hildesheim A., Rodriguez A. C., Quint W., *et al.*, (2011) Human Papillomavirus Infection with Multiple Types: Pattern of Coinfection and Risk of Cervical Disease. *The Journal of Infectious Diseases*. 203 (3), 910–920.
- Cheung J. L.**, Lo K. W., Cheung T. H., Tang J. W., Chan P. K. (2006) Viral Load, E2 Gene Disruption Status, and Lineage of Human Papillomavirus Type 16 Infection in Cervical Neoplasia. *The Journal of Infectious Diseases*. 194 (2), 1706–12.
- Cheung J. L.**, Cheung T. K., Candy W. Y., Mei Y. *et al.*, (2008) Analysis of Human Papillomavirus Type 18 Load and Integration Status from Low-Grade Cervical Lesion to Invasive cervical cancer. *Journal Clinic Microbiology*. 47 (2), 287-293.
- Chih-Ming H.**, Bor-Heng L., Shwu-Fen C., Tsai-Yen C., Shih-Hung H., *et al.*, (2011). Integration of human papillomavirus correlates with high levels of viral oncogene transcripts in cervical carcinogenesis. *Virus Research*. 161 (2), 124– 130.
- Conmhair S. A.** y Erzurum S. C. (2001) Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Lung Cellular and Molecular Physiology*. 283 (3), L246- L255.
- Das P.**, Thomas A., Mahantshetty U., Shrivastava S. K., Deodhar K., Mulherkar R. (2012) HPV Genotyping and Site of Viral Integration in Cervical Cancers in Indian Women. *PLoS ONE*. 7 (2), 1-9.
- De Marco F.** (2013). Oxidative Stress and HPV Carcinogenesis. *Viruses*. 5 (2), 708-731.

- Domenico F.D.**, Foppoli C., Coccia R., Perluigi M. (2011) Antioxidants in cervical cancer: Chemopreventive and chemotherapeutic effects of polyphenols. *Biochimica et Biophysica Acta*. 15 (2), 737–747.
- Duracková Z.** (2010) Some Current Insights into Oxidative. Stress *Physiology*. 59 (3), 459-469.
- Fujii T.**, Masumoto N., Saito M., Hirao N., Niimi S. *et al.*, (2005) Comparison Between In Situ Hybridization and Real-time PCR Technique as a Means of Detecting the Integrated Form of Human Papillomavirus 16 in Cervical Neoplasia. *Diagnosis Molec Pathology*. 14 (2), 103–108.
- Garcia-Tamayo J.**, Molina J., Blasco-Olaetxea E. (2009) Importance of immunohistochemical studies in the diagnosis and the prognostic evaluation of cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Investigation Clinic*. 50 (1), 241-250.
- Giuliano A.** (2003) Cervical carcinogenesis: The role of co-factors and generation of reactive oxygen species. *Salud pública de México*. 45 (2), 355-360.
- Guo M.**, Gong Y., Deavers M., Elvio G. S., Jan J. *et al.*, (2007) Evaluation of a Commercialized In Situ Papillomavirus DNA in Tissue Specimens Hybridization Assay for Detecting Human from Patients with Cervical Intraepithelial Neoplasia and Cervical Carcinoma. *Journal Clinic Microbiology*. 46 (1), 274-280.
- Hammes L. S.**, Tekmal R. R., Naud P., Edelweiss M. I., Kirma N. *et al.*, (2007) Macrophages, inflammation and risk of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) progression Clinicopathological correlation. *Gynecologic Oncology* .105 (2), 157–165.
- Halliwell B.** (2003) Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem?. *FEBS Letters*. 12 (2), 3-6.
- Hiraku Y.**, Tsutomu T., Ning M., Murata M., Ding X. *et al.*, (2007) Nitrate and oxidative DNA damage in cervical intraepithelial neoplasia associated with human papilloma virus infection. *Cancer Science*. 98 (7), 964– 972.
- Ho C. M.**, Chien T. Y., Huang S. H., Lee B. H., Chang S. F. (2006) Integrated human papillomavirus types 52 and 58 are infrequently found in cervical cancer, and high viral loads predict risk of cervical cancer. *Gynecologic Oncology*. 102 (1), 54-60.
- Ho C.H.**, Lee B.H., Chang S.F., Chien T.Y., Huang S.H. *et al.*, (2011) Integration of human papillomavirus correlates with high levels of viral oncogene transcripts in cervical carcinogenesis. *Virus Research*. 11 (2), 124-130.
- Hummon A. B.**, Lim S. R., Difilippantonio M. J., Ried T. (2007) Isolation and solubilization of proteins after TRIZOL® extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage. *BioTechniques*. 42 (3),467-472
- Illades-Aguilar B.**, Cortes-Malagon E. M., Antoni-Vejar V.,Zamudio-López N., Alarcón-Romero LDEL C. *et al* (2008) Cervical carcinoma in Southern Mexico: Human papillomavirus and cofactors. *Cancer Detect Prevention*. 32 (2), 300-307.
- Jang M.**, Rhee J. E., Jang D. y Kim S.S. (2011) Gene Expression Profiles are Altered in Human Papillomavirus-16 E6 D25E-Expressing Cell Lines. *Virology Journal*. 8 (453), 2-6.
- Jiménez-Tagle D.K.**, Hernández-Sotelo D., Illades-Aguilar., Leyva-Vazquez M. A., Flores-Alfaro E. *et al.*, (2014) Expression of E6, p53 and p21 proteins and physical state of HPV16 in cervical cytologies with and without low grade lesions. *International Journal Clinic Experimental Medic*. 7(1), 186-193.
- Kaushal N.**, Kudva A. K. (2013). Oxidative stress and inflammation: "The lesser of two evils" in carcinogenesis. *Journal Journal of Postdoctoral Research*. 1(2), 90-100.
- Kensler T. W.**, Wakabayashi N. y Biswal S. (2007) Cell Survival Responses to Environmental Stresses Via the Keap1-Nrf2-ARE Pathway. *Annu. Revision Pharmacology*. 47 (2), 89–116.
- Kim J.**, Song S., Jin C., Lee J., Lee N. *et al.*, (2012) Factors Affecting the Clearance of High-Risk Human Papillomavirus Infection and the Progression of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Journal of International Medical Research*. 40 (2), 486-496.

**Marks M.**, Gravitt P. E., U. Utaipatb, S.B. Gupta, Liaw K. (2011) Kinetics of DNA load predict HPV 16 viral clearance. *Journal of Clinical Virology*. 51 (3), 44-49.

**Mazzanti-Di Ruggiero M.D.A** (2011) Declaración de Helsinki, principios y valores bioéticos en juego en la investigación médica con seres humanos. *Revista Colombiana de Bioética*. 6 (1), 125-144.

**Mirabello L.**, Schiffman M., Ghosh A., Rodriguez A. C., Vasiljevic N. et al., (2013) Elevated methylation of HPV16 DNA is associated with the development of high grade cervical intraepithelial neoplasia. *International Journal of Cancer*. 132 (2), 1412–1422.

**Miraval M.** y Moron C. (2005). Manual de procedimientos diagnósticos en citología cervical uterina. *Instituto Nacional de Salud*. 1 (2), 37-41.

**Monaghan P.**, Metcalfe N. B. y Torres R. (2009) Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology Letters*. 12 (2), 75–92.

**Moktar A.**, Ravoori S., Vadhanam M.V., Gairola C.G. y Gupta R. C. (2009) Cigarette smoke-induced DNA damage and repair detected by the comet assay in HPV-transformed cervical cells. *International Journal Oncology*. 35 (6), 1297–1304.

**Murata M.** Thanan R.,1, Ma N., Kawanishi S. (2012) Role of Nitrate and Oxidative DNA Damage in Inflammation-Related Carcinogenesis. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 13 (2), 1-11.

**Nirmala J.**, Narendhirakannan R. (2011) Detection and Genotyping of High-Risk HPV and Evaluation of Anti-Oxidant Status in Cervical Carcinoma Patients in Tamil Nadu State, India - a Case Control Study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 12 (4), 1-7.

**Lizano-Soberón M.**, Carrillo-García A. y Contreras-Paredes A. (2009) Infección por virus del Papiloma Humano: Epidemiología, Historia Natural y Carcinogénesis. *Cancerología*. 4 (2), 205-216.

**Lee G. J.**, Chung H. W., Lee K. H., Ahn H. S. (2005) Antioxidant Vitamins and Lipid Peroxidation in Patients with Cervical Intraepithelial Neoplasia. *J Korean Med Sci*. 20, 267-72.

**Lonkar P.** y Dedon P. C (2011) Reactive species and DNA damage in chronic inflammation: reconciling chemical mechanisms and biological fates. *International Journal of Cancer*. 128 (4), 1999–2009.

**Pani G.**, Bedogni B., Anzevino R., et al., (2000) Deregulated Manganese Superoxide Dismutase Expression and Resistance to Oxidative Injury in p53-deficient Cells. *Cancer Research*. 60 (5), 4654-4660

**Pett M.** y Coleman N. (2007) Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis?. *Journal Pathology*. 212 (5), 356–367.

**Rahkola P.**, Mikkola T. S., Nieminen P., Ylikorkala O., Vaisanen-Tommiska M. (2009) Abnormal cervical cytology is associated with increased nitric oxide release in the uterine cervix. *Acta Obstetric Gynecology Scand*. 88 (4), 417-421.

**Raybould R.**, Fiander A., Hibbitts S. (2011) Human Papillomavirus Integration and its Role in Cervical Malignant Progression. *The Open Clinic Cancer J*. 5 (2), 1-7.

**Reuter S.**, Gupta S. C., Chaturvedi M. M., Aggarwal B. B. (2010) Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?. *Free Radical Biology & Medicine*. 49 (5), 1603–1616.

**Russo M.**, Cocco S., Secondo A., Adornetto A., Bassi A. et al., (2011) Cigarette Smoke Condensate Causes a Decrease of the Gene Expression of Cu–Zn Superoxide Dismutase, Mn Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase, Catalase, and Free Radical-Induced Cell Injury in SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells. *Neurotox Research*. 19 (3), 49–54.

**Saunier M.**, Monnier-Benoit S., Mauny F., Dalstein V., Briolat J. et al., (2008) Analysis of Human Papillomavirus Type 16 (HPV16) DNA Load and Physical State for with High-Grade Lesions or Cervical Identification of HPV16-Infected Women Carcinoma. *Journal Clin Microbiology*. 46 (11), 3678-3685.

- Schmeink C. E.**, Melchers J., Siebers A. G., Quint W., Leon F. A. (2011) Human Papillomavirus Persistence in Young Unscreened Women, a Prospective Cohort Study. *Plos one*. 6 (11), 2-8.
- Sethi G.**, Shanmugam M. K., Ramachandran L., Prem A., Tergaonkar V. (2012) Multifaceted link between cancer and inflammation. *Bioscience report*. 32 (5), 1–15.
- Shukla S.**, Mahata S., Shishodia G., Pande S., Verma G. (2014) Physical state & copy number of high risk human papillomavirus type 16 DNA in progression of cervical cancer. *Indian Journal Medic Research*. 139 (7). 531-543.
- Termini L.**, Filho A. L., Maciagd P. C., Etlingerc D., Ferreira V.A. *et al.*, (2011) Deregulated expression of superoxide dismutase-2 correlates with different stages of cervical neoplasia. *Disease Markers*. 30 (5), 275–281.
- Trottier H.**, Mahmud S., Lindsay L., *et al.* (2009) Persistence of an Incident Human Papillomavirus Infection and Timing of Cervical Lesions in Previously Unexposed Young Women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 18 (4), 854-862.
- Tota J. E.**, Chevaries-Davies M., Richarsond L. A., Devries M., Franco E. L. (2001) Epidemiology and burden of HPV infection and related diseases: implications for prevention strategies. *Prevention Medic*. 53 (1), 1-25.
- Valavanidis A.**, Vlachogiannit T. y Fiotakis C. (2009) 8-hydroxy-2' deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis. *Journal of Environmental Science and Health*. 2 (1), 120-139.
- Wanram S.**, Limpaboon T., Leelayuwat C., Yuenyao P., Guiney D. G. *et al.*, (2009) The use of viral load as a surrogate marker in predicting disease progression for patients with early invasive cervical cancer with integrated human papillomavirus type 16. *Journal Obstetricia Gynecology*. 20 (2), 1-7.
- Watts H.**, Fazarri M., Minkoff H., Hillier S. L., Sha B. *et al.*, (2005) Effects of Bacterial Vaginosis and Other Genital Infections on the Natural History of Human Papillomavirus Infection in HIV-1–Infected and High-Risk HIV-1–Uninfected Women. *Journal infection disease*. 191 (7), 1129-1139.
- Williams V. M.**, Filippova M., Soto U., Duerksen-Hughes P. J. (2011) HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress *Future Virology*, 12 (1), 45–57.
- Williams V. M.**, Filippova M., 1, Filippova V., Kimberly J. P. Duerksen-Hughes P. (2014) HPV16 E6\* induces oxidative stress and DNA damage. *Journal Virology*. 12 (2), 1-24.
- Xi L. F.**, Edelstein Z. R., Meyers C., *et al.* (2009) Human Papillomavirus Types 16 and 18 DNA Load in Relation to Coexistence of Other Types, Particularly Those in the Same Species. *Cancer Epidemiology Biomarkers*. 18 (3), 2507-2512.
- Yoshida T.**, Sanoy T., Kanumaz T., Owada N. Z., Sakuraiy S. *et al.*, (2008) Quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of the type distribution, viral load, and physical status of human papillomavirus in liquid-based cytology samples from cervical lesions. *International Journal Gynecology Cancer*. 18 (2), 121–127.
- Zhang D.**, Zhang Q., Zhou L., Huo L., Zhang Y. *et al.*, (2010) Comparison of prevalence, viral load, physical status and expression of human papillomavirus-16, -18 and -58 in esophageal and cervical cancer: a case-control study. *BMC Cancer*. 11 (4), 10, 2-8.
- Ziech D.**, Francob R., Pappac A., Panayiotidis M. (2011) Reactive Oxygen Species (ROS)–Induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. *Mutation Research*. 7 (11), 167–173.
- Zubillaga-Guerrero M. C.**, Illades-Aguiar B., Leyva-Vazquez M. A., Flores-Alfaro E., Castañeda-Saucedo E., *et al.*, (2013) The integration of HR-HPV increased the expression of Cyclins A and E in cytologies cytologies with and without low-grade lesions. *Journal of Cytology*. 30(1), 1-7.