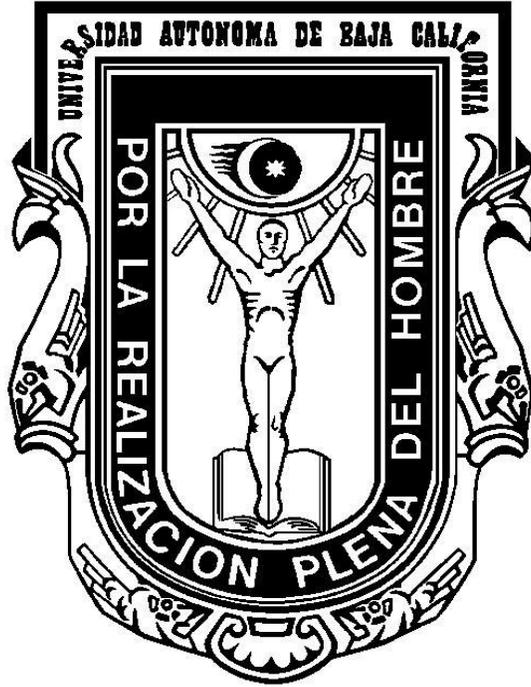


Universidad Autónoma de Baja California

FACULTAD DE MEDICINA MEXICALI



Tesis para obtener el grado de

Doctor en Ciencias de la Salud

“Asociación de la capacidad antioxidante total con el grado de lesión intraepitelial escamosa en pacientes infectadas y no infectadas con el virus del papiloma humano”

Presenta: Aura Arce Rivas

Director de tesis: D.C. Octavio Manuel Robinson Navarro

Co-Director: D.C. Raúl Díaz Molina

Mexicali, B.C. 30 de Julio del 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA MEXICALI

CARTA DE DICTAMEN DE LA EVALUACION DEL DOCUMENTO DE TESIS
PARA SUSTENTAR EL EXAMEN DE GRADO

Mexicali, B. C. ___30___ de ___Julio___ de 2014

Los abajo firmantes, miembros del Jurado Dictaminador del documento escrito denominado:

“Asociación de la capacidad antioxidante total con el grado de lesión intraepitelial escamosa en pacientes infectadas y no infectadas con el virus del papiloma humano.

Que para obtener el GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS DE LA SALUD
Presenta: Aura Arce Rivas

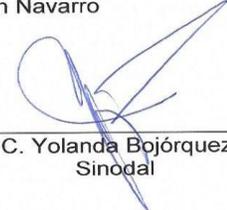
Realizada la evaluación resolvimos: Aprobarla



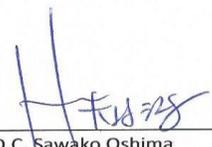
D.C. Octavio Manuel Robinson Navarro
Presidente



D.C. Josefina Ruiz Esparza Cisneros
Sinodal



D.C. Yolanda Bojórquez Anaya
Sinodal



D.C. Sawako Oshima
Sinodal



D.C. Raúl Bráz Molina
Secretario

Universidad Autónoma de Baja California
FACULTAD DE MEDICINA MEXICALI

~~DRA. JULIA DOLORES ESTRADA GUZMÁN~~
~~DIRECTORA DE LA FACULTAD DE MEDICINA MEXICALI, UABC~~
~~PRESENTE.~~

En mi carácter de director de tesis de Aura Arce Rivas, alumna del programa de Doctorado en Ciencias de la Salud, me permito informar a usted que después de dar seguimiento a las observaciones que los sinodales realizaron, he revisado la versión final de su tesis y no tengo inconveniente alguno en que continúen los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular, le envío un cordial saludo.

Mexicali, Baja California, a 7 de agosto del 2014.

ATENTAMENTE



Dr. Octavio M. Robinson Navarro
Profesor-investigador del Programa de
Maestría y Doctorado en Ciencias de la Salud

C.c.p. M.C. Carmen Gorety Soria Rodríguez, Coordinadora de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Mexicali, UABC.

~~C.c.p. Aura Arce Rivas.~~

C.c.p. Archivo.



ÍNDICE

	Página
Índice de tablas y figuras	VIII
Abreviaturas	X
Glosario	XIII
RESUMEN	XV
1.-ANTECEDENTES	1
1.1. Marco teórico	5
1.1.1. Radical libre	5
1.1.2. Clasificación de los radicales libres	6
1.1.3. Estrés oxidativo	9
1.1.4. Mecanismos de defensa de la célula contra el estrés oxidativo	9
1.1.5. Datos anatómico-histológicos del cérvix normal	11
1.1.6. Ectocérvix	12
1.1.7. Endocérvix	12
1.1.8. Clasificación de las lesiones intraepiteliales escamosas	13
1.1.9. El virus del papiloma humano	13
1.1.10. Ciclo del virus del papiloma humano	16
1.1.10.1. Infección por el virus	16
1.1.10.2. Mantenimiento del ciclo viral	17
1.1.10.3. Amplificación del ADN viral	17
1.1.11.1. Integración del VPH	18
2.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20

3.-JUSTIFICACIÓN	21
4.-OBJETIVOS	22
5.-HIPÓTESIS	23
6.-METODOLOGÍA (MATERIAL Y MÉTODOS)	24
6.1. Diseño	24
6.2. Población y muestra	24
6.3. Tipos de muestreo	24
6.4. Criterios de inclusión	25
6.5. Criterios de exclusión	25
6.6. Criterios de eliminación	25
6.7. Definición de variables	25
6.8. Materiales y métodos	26
6.9. Cuantificación de la capacidad antioxidante	27
6.10. Biopsia	27
7.-PLAN DE ANÁLISIS	28
8.-ASPECTOS ÉTICOS, NORMATIVOS Y DE SEGURIDAD	29
9.-RESULTADOS	30
10.-DISCUSIÓN	47
11.-CONCLUSIONES	52
12.-BIBLIOGRAFÍA	53
13.-ANEXOS	66
13.1. Anexo 1.- Carta de consentimiento informado	66
13.2. Anexo 2.- Hoja de datos clínicos	68
13.3. Anexo 3.-Cuantificación de la Capacidad antioxidante total	70
13.4. Anexo 4.-Procesamiento de la biopsia	72

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Fig. 1.-Imagen de corte histológico del ectocérvix normal	12
Tabla 1.-Incidencia y tasa de muerte por cáncer cervicouterino	1
Tabla 2.-Muertes por CaCu en México y Baja California	2
Tabla 3.-Radicales de oxígeno	7
Tabla 4.-Derivados de oxígeno no radicales	7
Tabla 5.-Características antropométricas	30
Tabla 6.-Características sociodemográficas	31
Tabla 7.-Datos ginecológicos	32
Tabla 8.-Características antropométricas de las pacientes con LIEBG y LIEAG	33
Tabla 9.-Distribución de las pacientes con LIEBG y LIEAG en función del IMC	33
Tabla 10.-Número de pacientes por grupos de edad y por grados de LIE	34
Tabla 11.-Estado civil de las pacientes con LIEBG y LIEAG	35
Tabla 12.- Escolaridad de las pacientes con LIEBG y LIEAG	35
Tabla 13.-Variables sociodemográficas de las pacientes con LIEBG y LIEAG	36
Tabla 14.-Ocupación de las pacientes con LIEBG y LIEAG	37
Tabla 15.- Uso de tabaco en las pacientes con LIEBG y LIEAG	38
Tabla 16.-Consumo de alcohol en las pacientes con LIEBG y LIEAG	39
Tabla 17.-Características sexuales y reproductivas de las pacientes con LIEBG y LIEAG	40
Tabla 18.-Edad de inicio de relaciones sexuales, número de parejas y uso de anticonceptivos en las pacientes con LIEBG y LIEAG	41
Tabla 19.-Detección de VPH en pacientes con LIEBG y LIEAG	41

Tabla 20.-Capacidad antioxidante total en grupos con LIEBG y LIEAG	42
Tabla 21.-Capacidad antioxidante total en el suero de pacientes infectadas y no infectadas con el VPH	42
Tabla 22.-Regresión logística de LIE y CAT	42
Tabla 23.-Regresión logística de LIE con CAT y la infección por VPH	43
Tabla 24.-Modelo 1 de Rlog en los grupos con LIEBG y LIEAG y variables sexuales y reproductivas	43
Tabla 25.-Modelo 2 de Rlog de los grupos con LIEBG y LIEAG, variables ginecológicas, uso de tabaco y consumo de alcohol	44
Tabla 26.-Modelo 3 de Rlog de los grupos de pacientes con LIEBG y LIEAG, con medidas antropométricas, actividad física y consumo de alcohol	45
Tabla 27.-Modelo 4 de Rlog de los grupos de pacientes con LIEBG y LIEAG y las variables CAT, medidas antropométricas, actividad física, consumo de alcohol e infección con VPH	46

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
B	Coefficiente de regresión
CaCu	Cáncer cervicouterino
CAT	Capacidad antioxidante total
Cat	Catalasa
CITV	Comité internacional de taxonomía de virus
cm	Centímetros
DE	Desviación estándar
E	Región del genoma viral de expresión temprana
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
EROs	Especies reactivas de oxígeno
ERNs	Especies reactivas de nitrógeno
GPX	Glutación peroxidasa
GRd	Glutación reductasa
GT	Glutación transferasa
GSH	Glutación reducido
HClO	Ácido hipocloroso
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
IC	Intervalo de confianza
ICC	Índice cintura cadera
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible

IMC	Índice de masa corporal
Kg	Kilogramos
Kg/m ²	Relación entre el peso corporal en Kg entre la estatura al cuadrado
L	Región del genoma viral de expresión tardía
LCR	Región larga de control
LIE	Lesión intraepitelial escamosa
LIEBG	Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado
LIEAG	Lesión intraepitelial escamosa de alto grado
m	Metros
Md	Mediana
mM	Milimolar
mm	Milímetros
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
nm	Nanómetros
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
NO	Óxido nítrico
NO ₂	Dióxido de nitrógeno
O ₂ ^{•-}	Anión superóxido
¹ O ₂	Oxígeno singlete
OH•	Radical hidroxilo
OMS	Organización mundial de la salud
ONOOH	Peroxinitrito
OR	Odds ratio

ORFs	Marcos de lectura abiertos
p25	Percentil veinte y cinco
p75	Percentil setenta y cinco
pb	Pares de bases
redox	Óxido reducción
RL	Radical libre
Rlog	Regresión logística
RO [•]	Alcoxilo
ROO [•]	Radical peroxilo
rpm	Revoluciones por minuto
SH	Grupo sulfhidrilo
SOD	Superóxido dismutasa
TRX	Tiorredoxina
VPH	Virus del papiloma humano
XO	Xantina oxidasa

GLOSARIO.-

Ácido Úrico.-Es un compuesto originado de la degradación de las purinas.

Apoptosis.-Es un proceso de autocontrol de la célula que la lleva a muerte.

Autooxidación.-Reacción química no inducida que consiste en la fijación, más o menos rápida, de oxígeno molecular sobre una sustancia química orgánica o inorgánica.

ATPasa.-Es un conjunto de enzimas capaces de producir hidrólisis de ATP a ADP y un ion de fósforo libre.

Bilirrubina.-Es un pigmento de color amarillo que se encuentra en la bilis producto de la destrucción de los glóbulos rojos.

Ceruloplasmina.-Es una proteína encargada de transportar el cobre a través de la sangre.

Ciclina E/CDK2.- El complejo ciclina E/CDK2 fosforila p27Kip1 (un inhibidor de la ciclina D), el etiquetado para la degradación, favoreciendo así la expresión de la ciclina A, lo que permite la progresión de la fase S del ciclo celular.

Citostático.-Sustancias capaces de inhibir la multiplicación y el desarrollo celular.

Citotóxico.-Se refiere a la capacidad de destruir las células.

Clatrina.-Es una proteína que participa en los procesos de endocitosis mediada por receptores.

Coilocitos.-Es el nombre que reciben las células encontradas en lesiones precancerosas cervicales, manifestación clásica de la infección por virus del papiloma humano (VPH) en la célula.

Dismutación.-Es toda reacción redox donde un elemento es al mismo tiempo oxidado y reducido.

Displasia.-Se refiere a cambios anormales de las células del cuello uterino.

Episoma.-Unidad extracromosómica replicante que funciona autónomamente.

Factor de transcripción E2F1.-Es una proteína que forma parte de una familia de factores de transcripción, tiene un dominio de unión a ciclina, se une a la proteína pRB y regula la proliferación del ciclo celular.

Glutati6n.-Es un tripéptido formado por ácido glutámico, cisteína y glicina, con funci6n redox.

Helicasa.-Enzima que rompe los puentes de hidrógeno que unen a las bases nitrogenadas.

Integrina.-Son proteínas de membrana que se agrupan en los complejos de adhesi6n celular donde se puede asociar con proteínas de la matriz celular.

Mieloperoxidasa.-Es una enzima que cataliza la formaci6n de ácido hipocloroso.

Necrosis.-Es la degeneraci6n de un tejido por causa de muerte no programada de las células.

p21/WAF.-Es una proteína supresora del ciclo celular durante la interfase G1/S.

Peroxidaci6n de lípidos.-Es la degradaci6n de los lípidos de las membranas de la célula producidos por un proceso de oxidaci6n.

Peroxisomas.-Son organelos de las células con forma de vesícula que contienen oxidasas y catalasas.

Proteína p53.-Es un factor de transcripci6n, que detiene el ciclo celular en caso de mutaci6n y activa la apoptosis.

Proteína pRB.-Es una proteína supresora de tumor, e impide la proliferaci6n celular inhibiendo la progresi6n del ciclo celular.

Sulfhidrilo.-Es un grupo funcional formado por un átomo de azufre y uno de H.

RESUMEN

Introducción.-Las lesiones intraepiteliales escamosas (LIEs), son un problema de salud pública en el mundo, principalmente en países en desarrollo, su prevalencia es alta en mujeres en edad productiva y reproductiva. El virus del papiloma humano (VPH) como agente causal del cáncer cervical, parece insuficiente por sí solo para desencadenar las lesiones del cuello uterino, si no se detecta a tiempo puede terminar en un cáncer cervicouterino. Existen cofactores como el estado nutricional, inicio de la vida sexual activa y en los últimos años se ha hecho énfasis en el estrés oxidativo que pueden debilitar el estado inmunológico y propiciar el desarrollo de lesiones cervicales posterior a infecciones virales. **Objetivo.**- Establecer la asociación entre la capacidad antioxidante total con el grado de lesión intraepitelial escamosa en pacientes infectadas y no infectadas con el virus del papiloma humano. **Metodología.**-Estudio observacional, transversal, analítico. La biopsia de cérvix evaluó el diagnóstico de LIE, y se cuantificó la capacidad antioxidante total (CAT) en suero. **Resultados.**-La media de la CAT de las pacientes con Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LIEBG) fue 1.0244 mM y con lesión intraepitelial escamosa de alto grado (LIEAG) 0.9269 mM, t de Student con $p= 0.09$. La Regresión logística multivariada mostró asociación inversa de LIE con CAT y una $p=0.042$; así como una asociación positiva estadísticamente significativa con la infección por VPH y el IMC. **Conclusiones.**-Esta investigación mostró evidencia de asociación inversa entre la CAT y la LIE, mientras que el IMC parece ser otro cofactor que puede estar contribuyendo sinérgicamente al progreso de las lesiones. **Palabras claves.**- Lesión intraepitelial escamosa, Virus del papiloma humano, Capacidad antioxidante total

ABSTRACT

Introduction.-The squamous intraepithelial lesions (SIL) are a public health issue mainly in developing world, mainly in developing countries, its prevalence is higher in women in productive and reproductive age. The human papillomavirus (HPV) as the cause of cervical cancer; alone seems insufficient to trigger cervical lesions, but if not detected on time can result in cervical cancer. Some cofactors such as nutritional status, onset of sexual activity and in recent years has emphasized that oxidative stress can weaken the immune status and promote the development of posterior cervical lesions to viral infections. **Objective.**- Establish the association between total antioxidant capacity in grade squamous intraepithelial lesions in patients infected and not infected with human papillomavirus.

Methodology.- Observational, transversal, analytical study. The cervical biopsy evaluated the diagnosis of SIL and the total antioxidant capacity (TAC) in serum was quantified.

Results. The mean TAC in patients with squamous intraepithelial lesion of low grade (SIL-L) was 1.0244 mM and squamous intraepithelial high grade lesion (SIL-H) 0.9269 mM, t test with $p = 0.09$. The multivariate logistic regression showed inverse association with TAC, LIE and $p = 0.042$ and statistically significant with HPV infection and BMI positive association. **Conclusions.**-The research showed evidence of inverse association between TAC and SIL, and BMI seems to be another cofactor that can be synergistically contributing to the progress of the lesions.

Keywords.-Squamous intraepithelial lesion, Human papillomavirus, total antioxidant capacity.

I.-ANTECEDENTES

El cáncer cervicouterino (CaCu) es uno de los tumores de mayor incidencia a nivel mundial, ocupa el cuarto lugar como causa más común de cáncer en mujeres; en el año 2012 se presentaron 527,624 nuevos casos y 265,653 muertes, con una tasa de 14.0 y 6.8 por 100,000 respectivamente¹. El número de muertes por causa de esta patología está relacionada con el grado de desarrollo de los países alrededor del mundo, de tal manera que mientras en las regiones más desarrolladas se tuvieron 35,495 muertes con una tasa de 2.8, en los países con menos desarrollo fueron 230,158 con tasa de 8.3 por 100,000 habitantes¹.

El CaCu continúa como un problema de salud pública, es la causa más común de cáncer en mujeres en las regiones del Este y Central de África y Melanesia con una tasa en el 2012 de 27.6, 22.1 y 20.6 respectivamente; en América latina y el Caribe, ese mismo año hubo 28,565 muertes con una tasa de 8.7¹ (Tabla 1).

Tabla 1.-Incidencia y tasa de muertes por Cá Cu en el año 2012 ¹

	Incidencia	Tasa ajustada a 100 000 habitantes	Número de muertes	Tasa ajustada a 100 000 habitantes
En el mundo	527,624	14.0	265,653	6.8
Regiones más desarrolladas	83,078	9.9	35,495	2.8
Regiones menos desarrolladas	444,546	15.7	230,158	8.3
Este de África	45,707	42.7	28,197	27.6
Centro de África	11,540	30.6	7,917	22.2
Melanesia	1,198	33.3	684	20.6
América Latina y el Caribe	68,818	21.2	28,565	8.7
México	4,769	8.1	4,765	9.7

En México fue la primera causa de muerte, aunque desde los años 2000 a 2008 las tasas de muerte fueron disminuyendo de 13.3 a 8.6². Actualmente el CaCu ocupa el segundo lugar a nivel nacional; el número de muertes en los años de 2009, 2010, 2011 y 2012 fueron de 4 107, 3 959, 3 917 y 4 769 respectivamente^{1, 3}, mientras en el Estado de Baja California en los años 2009 y 2010 se tuvieron 107 y 112 defunciones por esa causa (Tabla 2).

Tabla 2.-Muertes por CaCu en México y Baja California³

	No. defunciones México	No. defunciones Baja California
2012	4 769	No disponible
2011	3 927	No disponible
2010	3 959	112
2009	4 107	107
2008	4 036	96
2007	4 046	95
2006	4 046	89
2005	4 273	89
2004	4 248	83
2003	4 326	85
2002	4 330	114
2001	4 512	114
2000	4 620	110

La historia natural del CaCu implica la progresión de anomalías epiteliales llamadas displasias o neoplasias intraepiteliales cervicales clasificadas como leves (NIC I), moderadas (NIC II) y graves (NIC III)⁴.

Por otro lado, para fines de tratamiento, el sistema Bethesda las clasifica en 2 grupos, lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LIEBG) que corresponde a NIC 1 y lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (LIEAG) que incluyen a NIC

II y NIC III⁵. Algunas de las lesiones LIEBG pueden pasar desapercibidas y sanar espontáneamente en un periodo de aproximadamente 2 años^{6, 7}, mientras en otras mujeres con edades entre 25 y 35 progresan a lesiones pre-malignas LIEAG y pueden desarrollar cáncer cervical *in situ* dentro de un período de 5 a 10 años, progresando a cáncer invasor entre los 35 a 55 años de edad aproximadamente⁸. Actualmente existen evidencias que asocian la presencia del virus del papiloma humano (VPH) con el desarrollo de CaCu^{9, 10, 11, 12, 13}.

El VPH pertenece al grupo de virus sin envoltura, que contiene como material genético el ácido desoxirribonucleico (ADN), infecta epitelios y mucosas e induce el desarrollo de verrugas y papilomas en una gran variedad de vertebrados incluyendo al hombre. En la actualidad se conocen alrededor de 160 tipos^{14, 15}. La mayoría de ellos no causan ningún signo ni síntoma y pueden desaparecer espontáneamente¹⁶. Algunos VPH desarrollan verrugas e infecciones de manos y pies, y alrededor de un tercio infectan el aparato genital¹⁷, como el 16 y 18 que inducen diferentes grados de LIEs¹⁸. Al parecer la presencia del VPH es necesaria pero insuficiente por sí sola para ocasionar CaCu¹⁹ y actualmente se sabe que otros cofactores como paridad, estado nutricional, inflamación, tabaquismo, anticonceptivos hormonales, entre otros, desempeñan un papel importante²⁰ y en los últimos años, apareció información que asocia el estrés oxidativo como un cofactor en algunas infecciones virales^{21, 22}.

El estrés oxidativo se define como el desbalance entre la producción de especies oxidantes y su neutralización con antioxidantes, con predominio de las especies oxidantes. Los pro-oxidantes o especies reactivas de oxígeno (EROs) normalmente desempeñan un papel importante en los eventos fisiológicos de la célula²³.

El cuerpo humano tiene sistemas antioxidantes clasificados como enzimáticos y no enzimáticos, que participan en la remoción de pro-oxidantes, para proteger al organismo del daño de los radicales libres²⁴.

La Catalasa (Cat), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPX), son las enzimas antioxidantes más importantes de la célula. La SOD cataliza la transformación de los radicales superóxido a H_2O_2 y la Cat lo transforma en H_2O y O_2 , mientras que la GPX elimina el H_2O_2 mediante el glutatión reducido convirtiéndolo en glutatión oxidado y H_2O ²⁵.

El grupo de antioxidantes no enzimáticos está compuesto por moléculas como la albumina, ceruloplasmina, transferrina y moléculas pequeñas como el ácido ascórbico, β caroteno, glutatión reducido, ácido úrico y bilirrubina²⁶. La interacción de los antioxidantes endógenos con los antioxidantes de la dieta, representan la actividad antioxidante denominada capacidad antioxidante total (CAT) y proporcionan protección contra el ataque de radicales reactivos de oxígeno y nitrógeno²³.

Existen dos mecanismos que contribuyen al aumento de la carga oxidante: el primero consiste en la generación excesiva de especies reactivas de oxígeno y el segundo, es el resultado de una defensa antioxidante debilitada.

En el año 2005 Sasmaz y col. estudiaron el efecto que tiene el estrés oxidativo en los pacientes con verrugas no genitales y encontraron un aumento en la peroxidación de lípidos y por consiguiente estrés oxidativo²⁷.

Algunos trabajos sugieren la probable participación del estrés oxidativo y nitrosativo en la patogénesis del CaCu, que se evidencia por un aumento en la

peroxidación de lípidos y en los niveles de óxido nítrico (NO) con una disminución de la actividad de la SOD^{28, 29,30}.

Existen algunos estudios que asocian la displasia cervical con los niveles de algunos antioxidantes en plasma, como el α -tocoferol y la vitamina C que pueden jugar un papel protector en el desarrollo de LIEs³¹.

Lee GJ y col. en el año 2005 compararon un grupo con LIE y un grupo control, y encontraron una probable asociación entre LIE y el sistema antioxidante del plasma³².

1.1. MARCO TEÓRICO

Todos los organismos aeróbicos durante el uso del oxígeno para producir energía favorecen la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y especies reactivas de nitrógeno (ERNs), que en condiciones fisiológicas realizan procesos con funciones positivas y negativas que son dependientes de su concentración. El efecto positivo se observa en el crecimiento y proliferación celular a través de regular la transducción de señales y el efecto negativo se efectúa al estimular la apoptosis y necrosis³³.

Las EROs y ERNs son moléculas reactivas que involucran O ó N, agrupándose en iones de oxígeno, peróxidos y radicales libres.

1.1.1. **Radical libre.**-Se entiende por radical libre (RL) cualquier átomo, molécula o ion, que puede existir en forma independiente, que contenga uno o más electrones desapareados girando en su órbita más externa³⁴. Los electrones no apareados producen inestabilidad y un aumento en la reactividad, tienen una vida media corta y menor capacidad de difusión en el medio ambiente celular^{24, 26}.

Los RL se forman en el cuerpo durante el metabolismo normal de las células a través de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria, donde la mayor parte

del O_2 es reducido a H_2O y una pequeña porción es reducido a $O_2^{\bullet-}$ ³⁵, así mismo se producen durante la fagocitosis, la autooxidación, o como consecuencia de la interacción de metales de transición como el hierro o el cobre²⁴.

Los RL para completar su par electrónico, por medio de reacciones de óxido-reducción (redox), interaccionan a través de procesos beneficiosos como la regulación de la respuesta inmunológica, o tóxicos como el daño a las proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos, dependiendo de su concentración^{24,36}. La molécula de O_2 es un ejemplo de RL debido a que posee 2 electrones que están desapareados, sin embargo es menos reactivo en comparación con otros radicales ya que sus dos electrones no apareados se encuentran en orbitales distintos. El proceso en que una molécula pierde electrones se oxida, mientras que la molécula que recibe electrones se reduce³⁷.

1.1.2. Clasificación de los radicales libres.-Los RL se clasifican de acuerdo con su grupo funcional. Los más comunes están relacionados con el oxígeno e incluyen al anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxilo (OH^{\bullet}), peroxilo (ROO^{\bullet}) y alcoxilo (RO^{\bullet}) (Tabla 3). Otros derivados del oxígeno que no son radicales, agrupan al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HClO$), oxígeno singlete (1O_2) y peroxinitrito ($ONOOH$) (Tabla 4).

Tabla 3.-Radicales de oxígeno

Nombre	Símbolo	Características
Anión Superóxido	$O_2^{\bullet-}$	Se origina en la cadena de transporte de electrones o por la xantina oxidasa (degradación de purinas), así mismo incrementa la producción de EROs, como OH^{\bullet} , H_2O_2 .
Hidroxil	OH^{\bullet}	Es el oxidante más poderoso en sistemas biológicos, generado a partir de la reacción de Fenton and Haber-Weiss.
Peroxil	ROO^{\bullet}	Se produce como resultado de la adición de dos oxígenos a un radical libre de un lípido.
Alcoxil	RO^{\bullet}	Es un grupo alquilo unido a un oxígeno.
Óxido nítrico	NO^{\bullet}	Es un gas incoloro, poco soluble en el agua y altamente inestable en el aire.

Tabla 4.-Derivados del oxígeno que no son radicales libres.

Nombre	Símbolo	Características
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	Se origina a partir de $O_2^{\bullet-}$ por dismutación Catalizada por la SOD. También produce radicales libres muy reactivos cuando reacciona con metales de transición y difunde a través de las membranas.
Ácido Hipocloroso	HClO	Se forma por la reacción de cloruro con H_2O_2 . Catalizada por la mieloperoxidasa, presente en los neutrófilos.
Oxígeno singlete	1O_2	Es el estado excitado de menor energía, posee dos electrones apareados, con espines contrarios y se origina por fotosensibilización.
Peroxinitrito	ONOOH	Reacciona relativamente lento con la mayoría de las moléculas biológicas

En conjunto los radicales y no radicales se denominan prooxidantes o EROs. Algunos de ellos son extremadamente reactivos como el OH^\bullet , otros son menos reactivos como el $\text{O}_2^{\bullet-}$ ³⁸.

El radical superóxido se origina principalmente en la cadena de transporte de electrones de la mitocondria y también puede ser producido por la xantina oxidasa (XO) al degradar las purinas³⁸, tiene baja solubilidad por lo que no difunde muy lejos de donde se produce. La reacción de dos $\text{O}_2^{\bullet-}$ ocurre en forma espontánea o a través de la reacción catalizada por la SOD para producir H_2O_2 que es menos reactiva³⁹.

El radical hidroxilo tiene una vida media corta (10^{-9} seg) y es el que daña más frecuentemente a las biomoléculas²⁶. Las principales reacciones del OH^\bullet son la eliminación o la captación de átomos de hidrógeno y la transferencia de electrones²⁴. Tiene especial importancia el daño a proteínas, ADN y en el inicio de la peroxidación de lípidos, al agregar un electrón más al OH^\bullet , y dar lugar a un radical ácido graso y agua^{26, 40}.

El peróxido de hidrógeno es el resultado de la reacción de dismutación de dos radicales superóxido⁴¹. Se disuelve en solución acuosa y puede penetrar las membranas celulares. El H_2O_2 puede causar daño a las células en forma directa por sus propiedades oxidantes o bien servir de fuente para originar otras especies reactivas como el HClO. Entre las actividades directas del H_2O_2 se encuentran la liberación de hierro, inactivación de enzimas, así como la oxidación del ADN, lípidos y grupos sulfhidrilos ($-\text{SH}$)²⁶.

El óxido nítrico (NO^\bullet) o monóxido de nitrógeno es un radical gaseoso inorgánico producido endógenamente; se oxida rápidamente en presencia de oxígeno y se convierte

en dióxido de nitrógeno (NO₂). La enzima óxido nítrico sintasa (NOS) actúa sobre la L-arginina para producir NO• y L-citrulina en células epiteliales, nerviosas, endoteliales e inflamatorias⁴². Existen 3 tipos de NOS, la neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) y la inducible (iNOS), expresada en diversos tejidos especialmente en macrófagos^{43, 44}.

El NO• puede actuar indirectamente como pro-oxidante cuando reacciona con el anión superóxido produciendo peroxinitrito⁴⁵. Esta reacción ayuda a mantener el balance del O₂^{•-} y otras especies reactivas de oxígeno. Además el NO• parece ser un modulador de la respuesta del huésped frente a infecciones virales⁴³.

El peroxinitrito no es un radical libre, pero es un oxidante selectivo⁴⁴. Es más estable que el resto de las especies oxidantes, lo cual le permite penetrar a través de las membranas de la célula hasta que reacciona con un blanco molecular^{45, 46}.

1.1.3. Estrés oxidativo.-Se produce durante el desbalance entre oxidantes y antioxidantes en favor de los primeros. Este desequilibrio se debe al aumento de RL o disminución de la respuesta antioxidante produciendo daño a las moléculas biológicas⁴⁷.
⁴⁸.

El ataque a los grupos funcionales de las proteínas, provoca oxidación de aminoácidos y modificación de las proteínas como fragmentación o plegamiento anormal. Los RL pueden atacar membranas, ADN y/o ácido ribonucleico (ARN). También se asocian a carcinogénesis, enfermedad aterosclerosa, disfunción cognitiva y envejecimiento entre otras⁴⁶.

1.1.4. Mecanismos de defensa de la célula contra el estrés oxidativo.-La continua exposición al estrés oxidativo desde numerosas fuentes lleva a la célula y al organismo a desarrollar mecanismos de defensa, los cuales se agrupan como

antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Entre el grupo de enzimas están la NADPH oxidasa, SOD, Cat, GPX y XO. Los otros mecanismos antioxidantes son la quelación de metales y los atrapadores de RL, a través de procesos de óxido-reducción^{26, 36, 47}.

La SOD se presenta en 3 formas moleculares, dos asociadas con Cu-Zn y otra con Mn para catalizar la remoción de los radicales superóxido⁴⁸. La Cu-Zn SOD constituida por 2 subunidades, cada una de ellas contiene un sitio activo, se encuentra a nivel citoplasmático y extracelular. La Mn-SOD se encuentra en los procariotas y en la mitocondria de las células eucariotas²⁶.

La Cat está presente en los peroxisomas, y remueve el peróxido de hidrógeno, compartiendo esta función junto con la GPX, que es una selenoproteína y además elimina los hidroperóxidos lipídicos²³. Otras enzimas como la glutatión reductasa (GRd), glutatión transferasa(GT) y tioredoxina (TRX), también participan en los mecanismos de defensa contra los RL⁴⁷.

Por otro lado, los mecanismos no enzimáticos incluyen moléculas como la vitamina E, C, carotenoides, compuestos polifenólicos y otros más⁴⁹.

En la naturaleza existen 8 estructuras químicas con actividad de vitamina E, cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles. El alfa tocoferol es el principal antioxidante en las membranas celulares, protegiendo de la oxidación a los ácidos grasos poli-insaturados presentes en los fosfolípidos de membrana y en las lipoproteínas²⁴. La porción hidrofóbica del alfa tocoferol posee un grupo OH[•], cuyo H puede removerse fácilmente y funcionar como donador de electrones a un lípido o a un radical peroxilo lipídico, que lo convierte en un alfa tocoferol radical⁴⁷.

El radical tocoferol resultante es poco reactivo por lo que detiene la reacción en cadena, migrando hacia la superficie de la membrana y regenerándose por una reacción con el ácido ascórbico⁴⁸.

La vitamina C es una sustancia hidrosoluble y un compuesto redox que puede actuar como prooxidante y antioxidante, protegiendo a los tejidos de la peroxidación lipídica, además de la regeneración del alfa tocoferol^{50, 51}. Así mismo es un potente reductor en la forma de ascorbato, transformándose por oxidación a dehidro-ascorbato, el cual se reduce nuevamente por el glutatión reducido (GSH)⁴⁷.

Los carotenoides incluyen al β - caroteno precursor de la vitamina A, además del alfa-caroteno, licopeno, luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, todos con actividad antioxidante⁵².

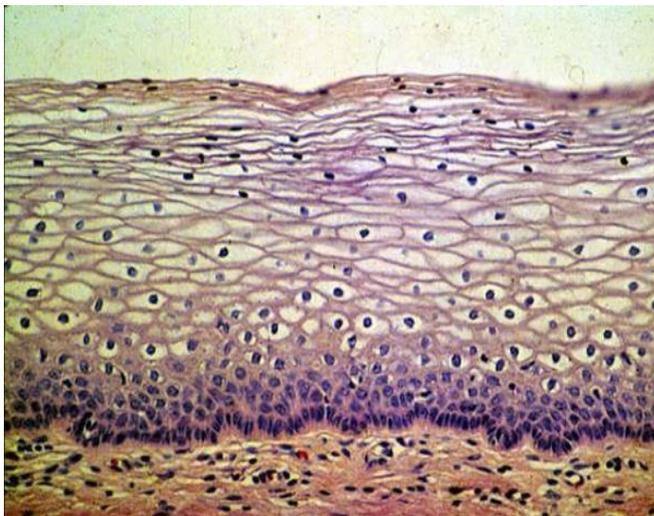
Los compuestos polifenólicos tienen estructura diversa y poseen un anillo de benceno con varios grupos hidroxilo⁵³. Se clasifican en varios subgrupos de acuerdo con su origen, función biológica y estructura química. Estos incluyen ácidos fenólicos, flavonoides, flavonas, isoflavonas, flavonoles, derivados de la cumarina, derivados de fitoalexano, ácido cinámico, antocianinas y se encuentran en pequeñas cantidades en frutas, vegetales y granos, todos con propiedades reductoras⁵⁴.

1.1.5. Datos anatomo-histológicos del cérvix normal.-El cérvix es la parte más inferior del útero, la cual protruye en la vagina, con una longitud de 2.5 a 5 cm, representa 1/3 del tamaño del útero, se continua hacia arriba con el cuerpo del útero y hacia abajo con la vagina. El canal cervical se extiende desde el orificio externo hasta el orificio interno el cual se conecta con la cavidad uterina. El cérvix es cilíndrico,

simétrico, el estroma cervical está compuesto principalmente por tejido de fibras colágenas y algunas células de músculo liso, con numerosos vasos sanguíneos⁵⁵.

1.1.6. Ectocérvix.-Está constituido por epitelio escamoso estratificado no queratinizado, el cual se continúa con el de la vagina. Este epitelio es rico en glucógeno y tiene cambios cíclicos durante el ciclo menstrual debido a la influencia de los estrógenos y la progesterona⁵⁶. Este epitelio es renovado por procesos de proliferación, maduración y descamación, y está formado por 3 capas:

- 1.-La capa basal o germinal se encarga de renovar todo el epitelio.
- 2.- El estrato espinoso toma parte en el proceso de glucogenización.
- 3.-El epitelio superficial constituido por células maduras y cornificadas, próximas a eliminarse, (Figura 1).



Células superficiales

Estrato espinoso o células parabasales

Células basales

Figura 1.- Imagen de corte histológica del epitelio del ectocérvix normal⁵⁷

1.1.7. Endocérvix.-La mucosa del cuello uterino o endocérvix mide de 3 a 4 mm de espesor. Está constituido por una sola capa de células cilíndricas. Los estudios tridimensionales muestran invaginaciones de la superficie del epitelio que se extienden

hacia la parte profunda de la mucosa (criptas) que son unidades productoras de moco formadas por células columnares ciliadas y las secretoras de moco. La unión escamo-columnar del cérvix es la línea donde el epitelio columnar del canal endocervical se reúne con el epitelio escamoso del ectocérvix⁵⁸.

1.1.8. Clasificación de las lesiones intraepiteliales escamosas.-La clasificación de las LIEs en bajo o alto grado, se basa en el espesor del epitelio con células inmaduras respecto a la capa basal normal.

La LIEBG se caracteriza por presentar células displásicas en el tercio basal del epitelio, mientras que en las capas superficiales se observa maduración y mitosis anormal, además de coilocitos, los cuales son células del epitelio exocervical que muestran cambios, propios de la infección por VPH, caracterizándose por alteraciones nucleares, núcleos hipercromáticos con halos transparentes que los rodean.

El epitelio en las LIEAG muestra escasa maduración y núcleo atípicos desde la mitad a todo el espesor del epitelio⁵.

1.1.9. El virus del papiloma humano.-El VPH pertenece a la familia de los papillomaviridae, según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (CITV)^{59, 60}. Mide aproximadamente 55 nm de diámetro y su estructura consiste de ácido nucleico y la cápside; es clasificado dentro de los virus desnudos porque no posee ninguna envoltura externa y así permanece infeccioso en un ambiente húmedo por meses⁶¹.

Contiene una sola molécula circular de ADN de doble cadena, de aproximadamente 8 000 pares de bases (pb), rodeada por una cápside conformada en un 95% por proteína L1 y 5% por proteína L2 que se ensamblan para formar capsómeros icosaédricos⁶².

El ADN está formado por tres regiones: temprana (E), tardía (L) y una no codificante, llamada región larga de control (LCR) que no contiene marcos de lectura abiertos (ORFs), pero sí contiene el origen de replicación y numerosos elementos de respuesta en *cis* que regulan la expresión génica de los genes tempranos y tardíos⁶³.

La región E, contiene seis ORFs de expresión para los genes: E1, E2, E4, E5, E6 y E7 que codifican proteínas con funciones reguladoras a nivel del ciclo celular, así mismo en la replicación y regulación viral⁹. Estas proteínas interactúan con el genoma de las células del epitelio del cérvix no diferenciado, programándolos para producir ADN viral.

La proteína E1 es la única de origen viral con actividad enzimática de ATPasa y helicasa, que participan en la replicación del ADN viral⁶⁴.

La proteína E2 tiene 3 dominios funcionales: el primero o extremo amino terminal es el responsable de regular la transcripción y replicación del ADN viral, el segundo es el de bisagra, de longitud y secuencias variables entre los VPH, el tercero es el extremo carboxilo terminal formado por 100 aminoácidos, con funciones de dimerización y de unión al ADN⁶⁵.

Además E2 tiene función antiproliferativa, deteniendo el ciclo celular en la fase G1 por medio de la activación de p21/WAF, inhibidor del complejo ciclina E/CDK2. Esta interrupción induce a la célula hacia la senescencia o a la vía apoptótica, a través de p53 que reprime la transcripción de E6 y E7⁶⁶.

La secuencia codificante de la proteína E4 está contenida dentro del marco de lectura de E2 y se expresa en la etapa tardía del ciclo viral. La expresión precede la síntesis de las proteínas estructurales del virus y el ensamblaje de las partículas virales.

Así mismo E4 se localiza en los filamentos intermedios de queratina del citoplasma durante las LIEBG y en las regiones perinucleares y citoplasmáticas, ocasionando el colapso de las queratinas, con la consecuente liberación de los viriones. También E4 regula los niveles de la proteína nuclear E2 que facilita la amplificación del genoma viral y la expresión de proteínas tempranas⁶⁷.

La proteína E5 participa en las fases tempranas de la infección, se ubica en el retículo endoplásmico, aparato de Golgi y membrana citoplasmática, promueve la proliferación de células diferenciadas y replicación productiva viral, disminuye la regulación de la expresión de las moléculas de superficie de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad, evadiendo así el virus al sistema inmune⁶⁸.

La oncoproteína E6 retiene a la p53 en el citoplasma bloqueando su translocación al núcleo e inhibiendo su capacidad de activar o reprimir la transcripción de genes blanco, además incrementa la vida media de los queratinocitos por sobreactivación de la telomerasa⁵⁶. Asimismo E6 se une a la p53 estimulando su degradación⁶⁹.

La proteína E7 mediante la unión a la proteína pRB conduce a la liberación de los factores de transcripción E2F, lo que promueve el progreso de la fase S del ciclo celular y por consiguiente a la replicación⁷⁰.

La región tardía L contiene los genes L1 y L2 que codifican a las proteínas estructurales de la cápside, que son activados después de la replicación viral⁶³.

La región LCR contiene de 400 a 1,000 pb, está situada corriente arriba de los ORFs de la región E y contiene el centro promotor p97 que regula la replicación del ADN viral⁷¹.

La región L1 es la más conservada dentro de los genomas de los VPH y se utiliza para su clasificación. Si los VPH muestran una homología del 90% en la región L1 comparada con otros tipos conocidos se trata de un nuevo tipo, mientras que cuando la homología está entre 90 a 98% se trata de un subtipo y cuando la homología es mayor a 98% es una variante^{72, 73}.

Los tipos de VPH se clasifican de acuerdo con su orden de importancia en 3 grupos: aquellos cuya probabilidad de producir cáncer es baja se les denomina de bajo riesgo o no oncogénicos (6,11, 26, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 55, 62, 66) y los de alto riesgo (16, 18 y 31,33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) son aquellos que con mayor frecuencia se encuentran asociados con alrededor del 100%, de los cánceres del cuello uterino. El VPH 16 por sí solo es el responsable del desarrollo del 58.6% de los carcinomas cervicales¹⁷. Existe otro tercer grupo identificado como de riesgo intermedio debido a que con menor frecuencia se observan presentes en cánceres y son los VPH (9, 10, 15, 38, 65, 67, 68, 69, 70, 71, 71, 76, 79, 80, 82, 90, 91,105, 122)^{74,75}.

1.1.10. Ciclo del Virus del papiloma humano.- El ciclo del VPH está ligado al programa de diferenciación de los queratinocitos. En un epitelio normal sólo las células de la capa basal están mitóticamente activas y después de la división celular una de ellas es empujada hacia las capas diferenciadas²⁰. Este ciclo comprende varias fases:

1.1.10.1-Infección por el Virus.-La infección se inicia cuando los VPH acceden a las células basales en división, presumiblemente el virus alcanza a los queratinocitos a través de micro-lesiones o heridas de la superficie del epitelio y ellos penetran a las células basales en división⁷⁶, sin embargo la expresión de altos niveles de proteínas virales y el ensamblaje viral solo ocurre en las capas superiores.

El ingreso del VPH a la célula se inicia por la unión a la membrana basal, lo que dispara cambios conformacionales del virus que afectan a las proteínas L1 y L2 como un prerrequisito para el contacto con el receptor. La mayoría de los VPH entran por un mecanismo de endocitosis de vesículas cubiertas de clatrina y el complejo α -6-integrina propuesto como un receptor secundario⁷⁷.

1.1.10.2.-Mantenimiento del genoma viral.-La capa basal consiste en células troncales que están en división continua y que proveen a las regiones suprabasales, (Figura 1). La infección de estas células por el VPH conduce a la expresión de las proteínas E1 y E2 asociadas a la replicación y transcripción del ADN viral, el cual puede ser mantenido como un episoma, usando la maquinaria de replicación del ADN de la célula huésped el cual se replica sincrónicamente, manteniendo un bajo número de copias que pueden ser de 20 a 100 dentro de las células basales indiferenciadas a través del curso de la infección⁷⁸. Como el ADN viral no interfiere con la división celular del huésped, las células infectadas en forma latente son morfológicamente normales y sólo expresan marcos de lectura abiertos tempranos. Bajo ciertas circunstancias como los estados inmunosuprimidos se reactivan los VPH en estado latente, progresando a infección productora de viriones infectantes⁷⁹.

1.1.10.3.-Amplificación del ADN viral.-Al dividirse la célula infectada, una de ellas permanece en la capa basal mientras la otra inicia un proceso de diferenciación en la que el virus estimula la progresión de la fase G1/S propiciando la replicación del ADN viral con la producción de un número grande de copias virales, y la expresión de los genes tardíos L1 y L2⁷⁴. Los promotores de estos genes sólo se expresan en las

células del epitelio superficial diferenciado y dentro del programa de diferenciación celular.

Durante esta etapa de la infección se observan cambios morfológicos en las células del epitelio escamoso. Con la replicación aumentada del ADN viral, la actividad mitótica de las células del huésped produce como resultado un engrosamiento del epitelio. La replicación viral aumentada también interfiere con el huso mitótico y las citocinas de las células del huésped, llevándolas a una multinucleación y atipia celular. Los halos perinucleares característicos de los coilocitos se atribuyen en parte a la proteína E4 con el posible papel de rompimiento de la citoqueratina⁸⁰. Por lo que se sugiere que E4 contribuye al egreso del virus de las capas superiores del epitelio. Las infecciones con producción incrementada de viriones son comúnmente observadas en las ocasionadas por VPH de bajo riesgo resultando en la formación de papilomas escamosos (verrugas) o lesiones displásicas de bajo grado.

1.1.11. Integración del VPH.-Para que la infección por VPH progrese a un estado neoplásico es necesario que ocurra la integración del ADN viral dentro del genoma de la célula huésped, esto se observa en infecciones por VPH de alto riesgo. Este evento ocurre cuando el ADN viral circular episomal se linealiza previo a la inserción dentro del ADN lineal de la célula huésped, lo que produce daño en el ADN de ambos. La excesiva producción de EROs observada en la inflamación crónica favorece el rompimiento del ADN viral y del huésped, facilitando la integración del genoma viral al ADN de la célula huésped⁶³.

Existen varios sitios de integración dentro del genoma del huésped, los cuales están directamente involucrados con genes relacionados con el cáncer, mientras que el

rompimiento del ADN del VPH ocurre en el ORF de E1 y E2, que participan en la integración del ADN viral. La proteína E2 completa reprime los promotores de la transcripción de E6 y E7 localizados dentro LCR en la forma episomal del virus⁸¹. En la forma integrada del VPH se observa un rompimiento en el marco de lectura de E1 y E2, con pérdida del control de E2 que favorece sobreexpresión de las proteínas E6 y E7.

La proteína E6 impide la translocación de p53 al núcleo de la célula además de propiciar su degradación. La proteína p53 normalmente regula la replicación celular al detectar daños sufridos por el ADN y permite su reparación. Por otro lado, la proteína E7 actúa mediante la unión a la pRB celular activa, lo que conduce a la liberación de factores de transcripción E2F¹⁶. Los eventos anteriores resultan en una desenfrenada proliferación con pérdida en la capacidad de reparar el ADN dañado y eventual transformación maligna⁷⁴.

2.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El CaCu es un problema de salud pública. El VPH está presente en el 74-77 % de los cánceres cuando se combinan los tipos 16 y 18⁸². Aunque se reconoce como el agente causal del CaCu, este no es suficiente por sí solo para el desarrollo de la LIE, ya que existen infecciones por VPH que sanan espontáneamente, sin progreso de las lesiones. Lo anterior evidencia otros cofactores como el estrés oxidativo, también observado en los casos de CaCu.

Si el estrés oxidativo es el resultado del desbalance entre oxidantes y antioxidantes, este desequilibrio produce daño a las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. La manera de evitar el daño a las biomoléculas es teniendo una CAT óptima la cual es el resultado de la interacción de antioxidantes endógenos y exógenos²³.

Lee GJ y col. 2005³² encontraron una disminución de la CAT en pacientes con LIE al compararla con la de un control normal, aunque no consideraron la participación del VPH. Se consideró que es importante evaluar la CAT de las pacientes con diferentes grados de lesiones del cérvix razón por la cual se planteó la siguiente pregunta de investigación:

¿Existe asociación entre la capacidad antioxidante total y el grado de lesión intraepitelial escamosa en pacientes infectadas y no infectadas con el virus del papiloma humano?

3.- JUSTIFICACIÓN

El VPH se considera la causa necesaria pero insuficiente para el progreso de la LIEBG a una LIEAG y posteriormente al cáncer. Existen cofactores asociados a las lesiones intraepiteliales como el tabaquismo, anticonceptivos orales, número de parejas sexuales, estrés oxidativo etc. Este último es resultado del desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes, por lo que una buena capacidad antioxidante pudiera prevenir el progreso de la lesión. El conocer si existe o no asociación de la CAT con los diversos grados de lesión cervical podría facilitar la comprensión que ésta tiene en el desarrollo del cáncer cervical. Por lo tanto, la propuesta de esta investigación fue estudiar la asociación entre los grados de las LIEs en pacientes infectadas y no infectadas con el VPH y la capacidad antioxidante total.

4.-OBJETIVOS: GENERAL Y ESPECIFICOS

Objetivo general.-

Establecer la asociación entre la capacidad antioxidante total de las pacientes con lesión intraepitelial escamosa infectadas y no infectadas con el virus del papiloma humano.

Objetivos Específicos:

- 1.-Identificar a las pacientes con lesión intraepitelial escamosa.
- 2.-Evaluar el grado de lesión intraepitelial escamosa.
- 3.-Identificar la presencia de VPH en las pacientes con lesión intraepitelial escamosa.
- 4.-Cuantificar la capacidad antioxidante total en el suero de las pacientes con lesión intraepitelial escamosa.
- 5.-Asociar la capacidad antioxidante total con el grado de lesión intraepitelial escamosa.
- 6.-Asociar la capacidad antioxidante total con la infección del virus del papiloma humano.
- 7.- Asociar las características generales de las pacientes con la lesión intraepitelial escamosa.

5.-HIPÓTESIS

Ho: No existe asociación entre la capacidad antioxidante total y el grado de lesión intraepitelial escamosa en pacientes infectadas y no infectadas con el virus del papiloma humano.

H1: Existe asociación entre la capacidad antioxidante total y el grado de lesión intraepitelial escamosa en pacientes infectadas y no infectadas con el virus del papiloma humano.

6.-METODOLOGIA

6.1. Diseño.-Estudio observacional, transversal, analítico.

6.2. Población y muestra.- Previo a la realización de la investigación, el protocolo fue autorizado por el Comité de Investigación del Hospital de Gineco-Pediatría/Medicina Familiar No 31 del IMSS en Mexicali, B.C. Se tomó una muestra de la población de pacientes que acudieron a la consulta en la clínica de displasia del hospital mencionado que cumplieron con los criterios de inclusión, en el periodo comprendido del 31 de Mayo de 2010 al 30 de Enero de 2011.

6.3. Tipo de muestreo: Por conveniencia.

Para calcular el tamaño de muestra se usó la fórmula para comparar dos medias, con base en la concentración de CAT reportada por Lee GJ y col 2005³².

La hipótesis propuesta fue de dos colas por lo que el valor:

$$K = (Z\alpha + Z\beta)^2$$

$$K = (1.96 + 0.84)^2 = 7.9$$

Grupo con LIE = 1.15 ± 0.17 mM/L

Grupo control = 1.25 ± 0.15 mM/L

$$\alpha = 0.05$$

$$\beta = 0.20$$

$$n = \frac{K (\sigma_1^2 + \sigma_2^2)}{(\mu_1 - \mu_2)^2} = \frac{7.9 (0.17^2 + 0.15^2)}{(1.25 - 1.15)^2}$$

$$\frac{7.9 (0.0289 + 0.0225)}{0.01} = \frac{7.9 (0.0514)}{0.01} = \frac{0.40606}{0.01} = 40.60 \text{ por grupo}$$

Más 10% de pérdidas con un total de 88⁸³

6.4.Criterios de inclusión:

- Pacientes con edad entre 15 y 65 años.
- Con diagnóstico de lesión intraepitelial escamosa.
- Sin comorbilidades como diabetes mellitus o artritis reumatoide.
- Aceptación de participar en el estudio a través de la firma de una carta de consentimiento informado (Anexo 2).
- No estar embarazadas al momento de tomar las muestras de sangre y de células del cérvix.

6.5.Criterios de exclusión:

- No aceptación de participar en este protocolo de investigación.

6.6.Criterios de eliminación:

Muestra insuficiente para el diagnóstico de LIE o falta de suero para cuantificación de la CAT.

6.7. Definición de variables.-

Variable independiente: Capacidad antioxidante total.

- **Tipo de variable:** Cuantitativa.
- **Definición conceptual:** Es la suma de los antioxidantes endógenos y derivados de los alimentos.
- **Definición operacional:** Es la cantidad de antioxidantes que se obtiene como resultado de la reacción de óxido-reducción realizada y leída con el espectrofotómetro a 660 nm.
- **Unidad de medición:** mM.

- **Instrumento de medición:** Espectrofotómetro.

Variable dependiente: Lesión intraepitelial escamosa.

- **Definición conceptual:** Es una alteración de las células del cuello uterino que se caracteriza por cambios en el núcleo y en el citoplasma.
- **Definición operacional:** Lesión del cuello uterino diagnosticada por el patólogo como LIE con sus grados, con la presencia o ausencia del VPH.
- **Escala de medición:** Nominal dicotómica.
- **Unidad de medición:** Grados de LIE de acuerdo a la NOM-014-SSA2-1994.
- **Instrumento de medición:** Microscopio óptico para clasificar el grado de lesión y presencia o ausencia de datos de infección por VPH..

Otras variables:

- Factores de riesgo que pudieron ser confusores para la CAT: anticonceptivos orales e inyectables, inicio de vida sexual activa temprana y número de parejas sexuales.

6.8. Materiales y Métodos.-Se estudiaron 157 mujeres que acudieron a la clínica de displasia del Hospital de Gineco-Pediatría/Medicina Familiar No. 31 del IMSS en Mexicali, B.C. por tener un resultado del estudio de Papanicolaou anormal. Las pacientes seleccionadas cumplieron con los criterios de inclusión.

Después de obtener la firma de la carta de consentimiento informado (Anexo 1), se elaboró su historia clínica (Anexo 2). Posteriormente se realizó un examen macroscópico del cuello uterino, con ayuda del colposcopio y aplicación de ácido acético al 2%. El epitelio displásico tiene una densidad celular y proteica elevada por lo que el ácido acético lo vuelve acidófilo, originando zonas de color blanquecino en el sitio de la lesión. De la misma manera, se usó el test de Schiller que consiste en la

aplicación de Lugol (solución de yoduro de potasio), que tiñe al epitelio cervical de color oscuro por la abundancia de glucógeno, mientras que los sitios con lesión no se tiñen. Estas zonas blanquecinas (hipocaptantes) con ambas pruebas fueron de utilidad para tomar la biopsia.

El grado de LIE y la infección con VPH se evaluó por medio del estudio histopatológico. Lo anterior corresponde al procedimiento que normalmente se lleva a cabo en todas las pacientes que acuden al servicio de displasia del hospital de Gineco-Pediatría/Medicina Familiar No. 31 del IMSS y para cumplir con el objetivo de esta investigación además se tomó una muestra de sangre venosa de 3 ml para la cuantificación de la CAT.

La muestra de sangre extraída se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó durante 15 minutos a 2000 rpm en una centrifuga Beckman Coulter Allegra X-12 R a 4°C, se transfirió el suero a un tubo de microcentrífuga de 1.7 ml y se guardó a -80°C para su posterior procesamiento.

6.9. Cuantificación de la Capacidad Antioxidante Total.-La CAT se cuantificó en las muestras de suero, de acuerdo a las indicaciones del Kit de Total Antioxidant Status de Rel Assay Diagnostics, Gaziantep/Turquía, basado en la medida del cambio de absorbancia en la muestra con el equipo Biotek Elx50 microplate ELISA (USA) a 660 nm resultado de la reducción del radical ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico). El ensayo se calibró usando una solución estándar de trólox (10.0 mM) que es un análogo de la vitamina E (Anexo 3).

6.10. Biopsia.-Se tomó una biopsia de 2-5 mm de diámetro y se colocó en formol

al 10% amortiguado a pH 7.0 para su procesamiento posterior. Después del paso por diferentes soluciones de alcohol y xilol, la muestra del tejido del cérvix se incluyó en parafina y se obtuvieron cortes de 5 μm , se tiñeron con hematoxilina y eosina (Anexo 4) y se visualizaron al microscopio para su análisis.

El resultado histopatológico se reportó de acuerdo a lo establecido en la NOM 0014-SSA2-1994.

7.-PLAN DE ANÁLISIS

Para describir la población y los grupos de LIEBG y LIEAG se usó estadística descriptiva. El índice de masa corporal (IMC) se calculó dividiendo el peso expresado en kg entre la estatura en metros al cuadrado (kg/m^2). Para interpretar el IMC se consideró el reporte de la Organización mundial de la Salud (OMS)⁸⁴ que considera como normal un $\text{IMC} \leq 25$, Sobrepeso >25 y Obesidad >30 . Así mismo, el perímetro de cintura normal en la mujer ≤ 88 cm, y el índice cintura/cadera (ICC) que resulta de dividir el perímetro de la cintura por el perímetro de su cadera ≤ 0.80 ⁸⁵.

Las variables que mostraron una distribución normal con las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk, se compararon con la t de Student. El resto de las variables que se distribuyeron asimétricamente se usó la mediana (Md), los percentiles 25 (p25) y 75 (p75), y se analizaron con la prueba U de Mann Whitney. Las variables dicotomizadas se compararon con la χ^2 .

Se realizó regresión logística (RLog) univariada de la variable LIE con CAT y posteriormente se hicieron varios modelos de RLog multivariada.

Modelo 1: LIE con las características ginecológicas.

Modelo 2: LIE con la combinación de características sociodemográficas, ginecológicas, CAT y la infección con VPH.

Modelo 3: LIE, con CAT, circunferencia de cintura, circunferencia de cadera, IMC, actividad física y consumo de alcohol.

Modelo 4: Variable LIE con CAT, ICC, IMC, edad, actividad física, consumo de alcohol e infección por VPH.

En todas las pruebas aplicadas los valores de p menor a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos. Todos los datos se analizaron con el programa SPSS versión 17.

8.-ASPECTOS ETICOS, NORMATIVOS Y DE SEGURIDAD

Se vigiló el cumplimiento de los principios básicos citados en la investigación médica y clínica. Todas las pacientes fueron informadas ampliamente acerca de los riesgos y beneficios de participar en esta investigación. Las pacientes que estuvieron de acuerdo en participar firmaron la carta de consentimiento informado (Anexo 1).

Los resultados de los análisis de cada paciente se le dieron a conocer como un apoyo diagnóstico a su problema, aplicando también el derecho a la confidencialidad de las pacientes.

Se acató la **NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-014-SSA2-1994** en la clasificación de las lesiones intraepiteliales escamosas.

Por otro lado nos sujetamos a los aspectos normativos de bioseguridad según la **NOM-087 ECOL-SSA1 2002**.

9.-RESULTADOS

De las 157 mujeres que ingresaron al estudio, se eliminaron 41 porque no se obtuvo el resultado de la biopsia o por hemólisis de la muestra de suero, conservándose 116 pacientes en las que se confirmó el diagnóstico de LIE por una técnica histopatológica.

La edad mínima de la muestra estudiada fue de 17 años y máxima de 61 años, con una media de 36.56 ± 10.20 años de edad.

La media y desviación estándar (DE) de las medidas antropométricas fueron: estatura de 1.58 ± 0.063 m, peso de 71.42 ± 12.76 kg, IMC= 29.09 ± 7.09 kg/m², Circunferencia de cintura= 91.59 ± 11.52 cm, la circunferencia de cadera= 104.58 ± 10.09 cm y el ICC= 0.87 ± 0.06 cm (Tabla 5).

Tabla 5.-Características antropométricas

	Media \pm DE.
	n=116
Edad de las pacientes (años)	36.56 ± 10.20
Estatura (m)	1.58 ± 0.063
Peso (kg)	71.42 ± 12.76
Índice de masa corporal (Kg/m²)	29.09 ± 7.09
Circunferencia de cintura (cm)	91.59 ± 11.52
Circunferencia de cadera (cm)	104.58 ± 10.09
Índice de: cintura(cm)/cadera(cm)	0.87 ± 0.06

En relación a las características sociodemográficas de las pacientes incluidas en la muestra, el 57.76% fueron casadas, el 66.40% tuvo como máximo grado de escolaridad secundaria, el 71.55% se desempeñó en distintas actividades, el 81.04% nunca fumaron, el 52.58% consumieron alcohol y 71.55% manifestaron sedentarismo (Tabla 6).

Tabla 6.-Características sociodemográficas.

Características	n=116
Estado civil	
Soltera	49(42.24%)
Casada	67(75.76%)
Escolaridad	
Secundaria	77(66.4%)
Preparatoria	39(33.6%)
Ocupación	
Hogar	33(28.4%)
Trabajadora	83(71.6%)
Tabaquismo	
Negativo	94(81.0%)
Positivo	22(19.0%)
Consumo de alcohol	
Positivo	61(52.6%)
Negativo	55(47.4%)
Actividad física	
Sedentarismo	83(71.6%)
Con actividad	33(28,4%)

La edad media y DE del inicio de las relaciones sexuales, del primer embarazo y del número de gestaciones fueron 18.78 ± 3.66 , 19.98 ± 4.8 años y 2.78 ± 1.69 respectivamente; la mediana del número de partos y de parejas sexuales fueron de 1.5 y 2.0 respectivamente y 67.24% fueron positivas para la infección por VPH (Tabla 7).

Tabla 7.-Datos ginecológicos.

Datos	n=116
Edad de inicio de la relaciones sexuales(años)	18.78± 3.66*
Edad del primer embarazo (años)	19.98 ± 4.8*
Número de embarazos	2.78 ±1.69*
Número de partos	1.5 (0.0-3.0)**
Número de cesáreas	0.0 (0.0-1.0)**
Número de parejas sexuales	2.0 (1.0-3.0)**
Lesión intraepitelial escamosa (LIE)	
Bajo grado	103 (88.79%)
Alto grado	13 (11.21%)
Infección por VPH	
Positivo	78 (67.24%)
Negativo	38 (32.76%)

*Media ± DE **Mediana y percentil 25, percentil 75

El resultado de la biopsia confirmó la lesión en el cuello del útero y permitió agruparlas como LIEBG y LIEAG. El 88.79% se incluyó en el primer grupo y 11.21% en el segundo. La infección por VPH se detectó en 67.24% de las pacientes, mientras que el 32.76% resultó negativo (Tabla 7).

La cuantificación de la CAT en el suero de las pacientes estudiadas tuvo una media de 1.01 ± 0.20 mM con un rango de 0.56 a 1.49 mM.

El resultado del análisis comparativo de las variables antropométricas entre el grupo de pacientes con LIEBG y pacientes con LIEAG, mediante la U de Mann-Whitney se resume en la tabla 8, en las que se puede observar significancia estadística únicamente en la circunferencia de cadera $p=0.030$.

Tabla 8.-Características antropométricas de las pacientes con LIEBG y LIEAG.

Total:116 pacientes	LIEBG n=103	LIEAG n=13	Valor de p
Edad (años)	36.34±10.0	37.0±11.15	0.825*
Estatura (m)	1.60 (1.55-1.63)	1.58 (1.49-1.63)	0.352
Peso (kg)	70.0 (63.50-80.00)	70.0 (58.00-73.00)	0.133**
IMC (Kg/m²)	28.52(24.44-32.82)	29.15(23.53-30.66)	0.847
Perímetro de cintura (cm)	90.0(83.0-101.0)	88.0(83.0-94.5)	0.331**
Perímetro de cadera (cm)	104.09 (98.0-111.0)	99.5(94.5-103.5)	0.030**
Índice cintura (cm)/cadera (cm)	0.88±0.06	0.87±0.07	0.812*
Recomendación OMS (0.71-0.85 cm)			

*Media ± DE ** Mediana y percentil 25, percentil 75

La interpretación de IMC, perímetro de cintura, perímetro de cadera y el ICC, se realizó de acuerdo con la clasificación y recomendación de la OMS. Con base en el IMC el 37.9% de las mujeres con LIEBG tuvieron obesidad, mientras que en las LIEAG el 38.5% correspondió tanto a sobrepeso y el mismo porcentaje también para obesidad; en la comparación entre los grupos que presentaron LIEBG y LIEAG con la clasificación dependiendo del IMC se observó una p =0.916 (Tabla 9).

Tabla 9.- Distribución de las pacientes con LIEBG y LIEAG en función del IMC.

Índice de Masa corporal (kg/m²)	LIEBG	LIEAG	Valor de p X²
Normal	29(28.2%)	3(23.1%)	0.916
Sobrepeso	35(34.0%)	5(38.5%)	
Obesidad	39(37.9%)	5(38.5%)	

El grupo de edad con mayor número de mujeres con LIEBG estuvo en el rango de 30 a 39 años con 30.2%, mientras que en el alto grado el 3.4% estuvieron en los grupos de 30 a 39 y 40 a 49 años de edad (Tabla 10).

Tabla 10.-Número de pacientes por grupo de edad en años y por grado de LIE

	Años de edad						Total
	15-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	
LIEBG	5 (4.3%)	24 (20.7%)	35 (30.2%)	26 (22.4%)	12 (10.3%)	1 (0.9%)	103 (88.8%)
LIEAG	1 (0.9%)	2 (1.7%)	4 (3.4%)	4 (3.4%)	2 (1.7%)	0 (0.0%)	13 (11.2%)
Total de pacientes	6 (5.17%)	26 (22.41%)	39 (33.62)	30 (25.86%)	14 (12.7%)	1 (0.86%)	116 (100.0%)

El análisis de todas las categorías del estado civil mostró que en ambos grupos predominaron las mujeres casadas con 59.22% para LIEBG y 46.15% en el grupo de LIEAG (Tabla 11). Al hacer 2 categorías solamente la de estar soltera y casada, el 59.2% del grupo LIEBG estuvieron casadas, mientras que 53.8% del LIEAG fueron solteras, la X^2 mostró una $p=0.369$ (Tabla 13).

Tabla 11.- Estado civil de las pacientes con LIEBG y LIEAG

	LIEBG	LIEAG	Total
Unión libre	15 (14.56%)	2 (15.38%)	17
Soltera	18 (17.48%)	3 (23.0%) ⁷	21
Casada	61 (59.22%)	6 (46.15%)	67
Divorciada o separada	9 (8.74%)	1 (7.7%)	10
Viuda	0 (0.0%)	1(7.7%)	1
Total	103 (100%)	13 (100%)	116

El mayor nivel de escolaridad de ambos grupos fue la secundaria con 67.0% para el de bajo grado y 33.0% para el alto grado, la X^2 mostró una p de 0.695 (Tabla 12 y 13).

Tabla 12.- Escolaridad de las pacientes con LIEBG y LIEAG

	LIEBG	LIEAG	Total
Primaria sin terminar	4 (3.88)	1 (7.69%)	5
Primaria	22 (21.35%)	3 (23.07%)	25
Secundaria	43 (47.75%)	4 (30.76%)	47
Preparatoria o técnica	24 (23.3%)	4 (30.76%)	28
Universidad	10 (9.7%)	1 (7.69%)	11
Total	103(100.0%)	13 (100.0%)	116

Tabla 13.- Variables sociodemográficas de las pacientes con LIEBG y LIEAG.

	LIEBG n=103	LIEAG n=13	X² Valor de p
Estado civil			0.369
Soltera	42 (40.8%)	7 (53.8%)	
Casada	61 (59.2%)	6 (46.2%)	
Escolaridad			0.695
Secundaria	69 (67.0%)	8 (61.5%)	
Preparatoria	34 (33.0%)	5 (38.5%)	
Ocupación			0.844
Hogar	30 (28.1%)	4 (30.8%)	
Trabajadora	73 (70.9%)	9 (69.1%)	
Uso de tabaco			0.695
Negativo	83 (80.6%)	11(84.6%)	
Positivo	20 (19.4%)	2(15.4%)	
Consumo de alcohol			0.095
Negativo	46 (44,7%)	9 (69.2%)	
Positivo	57 (55,3%)	4 (30.8%)	
Actividad física			0.268
Negativo	72 (69.9%)	11(84.6%)	
Positivo	31 (30.1%)	2 (15.4%)	

En relación con los diferentes tipos de ocupación el 38.83% de las pacientes con LIEBG y 46.15% con LIEAG fueron obreras (Tabla 14). Al comparar mujeres que estaban en el hogar y las que hicieron un trabajo fuera de él, se observó que el 70.9% de las LIEBG y 69.1% de LIEAG tuvieron un trabajo fuera de su hogar, la X² mostró una p =0.844 (Tabla13).

En relación con el uso de tabaco, se observó que el 80.58% del grupo con LIEBG y el 84.61% del LIEAG nunca fumaron, con una $p=0.695$ (Tabla 13 y 15).

Tabla 14.- Ocupación de las pacientes con LIEBG y LIEAG

	LIEBG	LIEAG	Total
Hogar	30 (29.13%)	4 (36.77%)	34
Obrera	40 (38.83%)	6 (46.15%)	46
Empleada	25 (24.27%)	2 (15.38%)	27
Profesionista	6 (5.83%)	1 (7.70%)	7
Pensionada	1(0.97%)	0 (0.0%)	1
Comerciante	1(0.97%)	0 (0.0%)	1
Total	103 (100.0%)	13 (100.0%)	116

Cuando se analizó el consumo de alcohol y su frecuencia se observó que el 45.63% del grupo LIEBG y 69.23% del LIEAG fueron negativas, al reagruparlos en positivos y negativos para el consumo se observó una tendencia estadística significativa con $p=0.095$ (Tabla 13 y 16).

Tabla 15.- Uso de tabaco en las pacientes con LIEBG y LIEAG

	LIEBG	LIEAG	Total
Nunca ha fumado	83 (80.58%)	11(84.61%)	94
Una vez al año	2 (1.94%)	0 (0.0%)	2
Ocasional	5 (4.85%)	0 (0.0%)	5
Cada semana	1 (0.97%)	1 (7.69%)	2
Diario	9 (8.73%)	1(7.69%)	10
Antecedente de haber fumado	3(2.91%)	0 (0.0)	3
Total	103 (100.0%)	13 (100.0%)	116

La asociación de la edad de inicio de las relaciones sexuales, edad del primer embarazo, número de embarazos, número de partos, número de abortos, número de cesáreas y número de parejas sexuales con la LIE no presentó diferencia significativa (Tabla 17).

Tabla 16.-Consumo de alcohol en las pacientes con LIEBG y LIEAG

	LIEBG n=103	LIEAG n=13	Total n=116
Nunca ha tomado	47 (45.63%)	9 (69.23%)	56
Una o dos veces al año	22 (21.35%)	1 (7.69%)	23
3 a 5 veces al año	8 (7.76%)	2 (15.38%)	10
1 a 3 veces al mes	18 (17.48%)	1 (7.69%)	19
1 a 2 veces a la semana	4 (3.88%)	0 (0.0%)	4
3 a 4 veces a la semana	3 (2.91%)	0 (0.0%)	3
Antecedentes de haber consumido alcohol	1 (0.97%)	0 (0.0%)	1
Total	103 (100.0%)	13 (100.0%)	116

Con base al criterio de la OMS en que la edad de la adolescencia termina a los 19 años, se formaron dos grupos de edades relacionadas con el inicio de las relaciones sexuales, <19 y > 20 años y se encontró que la mayoría inició sus relaciones sexuales a una edad inferior a los 19 años con 68.93% para LIEBG y 76.92 % para LIEAG, $p=0.413$ (Tabla 18).

TABLA 17.- Características sexuales y reproductivas de las pacientes con LIEBG y LIEAG

	LIEBG n=103 (p25-p75)	LIEAG n=13 (p25-p75)	U Mann Whitney Valor de p
Edad de inicio de las relaciones sexuales (años)	18.0 (16.00-21.00)	17.5 (15.75 -19.00)	0.669
Edad del primer embarazo (años)	19.0 (17.00-23.00)	18.0 (17.00-20.75)	0.384
Número de embarazos	3.0 (2.0-4.0)	4.0 (3.0-5.0)	0.485
Número de Partos	2.0 (0.0-3.0)	3.0 (0.75-4.25)	0.719
Número de abortos	0.0 (0.0-0.75)	0.0 (0-1.0)	0.980
Número de cesáreas	0.0 (0.0-1.0)	0.0 (0.0-2.0)	0.766
Número de parejas sexuales	2.0 (1.0-3.0)	2.0 (1,0-3.25)	0.733

*Mediana y percentiles 25 y 75

Se hicieron dos grupos para el número de parejas sexuales, quienes tuvieron 1 o 2 y los que tuvieron más de 3. Se observó que 65.0% en el grupo LIEBG y 61.5 % para el LIEAG tuvieron solamente 1 o 2 parejas, sin observar diferencia significativa (Tabla 18).

Tabla 18.- Edad de inicio de relaciones, número de parejas sexuales, uso de anticonceptivos en las pacientes con LIEBG y LIEAG

	LIEBG n=103	LIEAG n=13	Total n=116	X² Valor de p
Inicio de relaciones sexuales				0.413
≤19	71 (68.93%)	10 (76.92%)	81	
≥20	32 (31.07%)	3 (23.08%)	35	
Número de parejas sexuales				0.803
1-2	67 (65.0%)	8 (61.5%)	75	
3-10	36 (35.0%)	5 (38.5%)	41	
Uso de Anticonceptivos hormonales				0.387
No usó	35 (34.0%)	7 (53.8%)	42	
Si usó	68 (66.0%)	6 (46.2%)	74	

Para analizar el uso de anticonceptivos hormonales también se hicieron 2 grupos, las que nunca tomaron anticonceptivos y las que usaron alguno sin importar el tiempo ni la vía de administración, observando que 66.0% de las pacientes con LIEBG usaron anticonceptivos, mientras que en el grupo con LIEAG el 53.8% nunca usó anticonceptivos la X² mostró una p=0.387 (Tabla 18).

Tabla 19.- Detección de VPH en pacientes con LIEBG y LIEAG

	LIEBG n=103	LIEAG n=13	Total n=116	X² Valor de p
Sin infección	29 (28.2%)	9 (69.2%)	n=38	0.003
Con infección	74 (71.8%)	4 (30.8%)	n=78	

El 71.8% del grupo con LIEBG fueron positivas para la infección por VPH mientras que el 69.2% del grupo con LIEAG fueron negativas, la X^2 mostró diferencia significativa $p=0.003$ (Tabla 19).

Tabla 20.- Capacidad antioxidante total en grupos con LIEBG y LIEAG

	LIEBG n=103	LIEAG n=13	t de student Valor de p
Capacidad Antioxidante total mM	1.02±0.19	0.92±0.22	0.09
Rangos mM	0.59-1.49	0.56-1.31	

La concentración de CAT fue menor en el grupo con LIEAG tanto en la media como en los rangos de mínimo y máximo y la t de Student solo mostró tendencia a la significancia con una $p = 0.09$ (Tabla 20).

Tabla 21. Capacidad antioxidante total en el suero de pacientes infectadas y no infectadas con el VPH.

	Con infección n=78	Sin infección n=38	t de student Valor de p
Capacidad Antioxidante total mM	1.02±0.20	0.99±0.19	0.56
Rangos mM	0.56-1.47	0.59-1.49	

Cuando se comparó la media de la CAT de los grupos de pacientes infectadas y no infectadas con el VPH, no mostró diferencia significativa (Tabla 21).

Tabla 22. Regresión logística de LIE y CAT

	B	Valor de p	O.R.	I.C. 95%
Capacidad antioxidante total	-2.655	0.101	0.070	0.003-1.677

Con la RLog del análisis univariado de las variables LIE y CAT se obtuvo una $p=0.101$ (Tabla 21). Cuando se agregó la variable infección por VPH, la significancia de la variable CAT mostró una $p=0.149$, mientras la infección por VPH fue significativa $p=0.009$ (Tabla 23).

Tabla 23.-Regresión logística de LIE con CAT y la infección por VPH

	B	Valor de p	OR	I.C. 95%
CAT	-2.465	0.149	0.085	0.003-2.427
Infección VPH	-1.696	0.009	0.183	0.052-0.650

El modelo 1 de RLog multivariada de la variable LIE con las variables correspondientes a edad de inicio de relaciones sexuales, edad del primer embarazo, número de embarazos, número de partos, número de cesáreas, número de parejas, uso de anticonceptivos ninguno mostró diferencia significativa (Tabla 24).

Tabla 24.-Modelo 1 de RLog en los grupos con LIEBG y LIEAG y variables sexuales y reproductivas.

	B	Valor de p	OR	I.C. 95%
Edad inicio relaciones Sexuales	-0.051	0.762	0.950	0.682-1.323
Edad Primer embarazo	0.004	0.980	0.996	0.745-1.333
Número embarazos	0.100	0.831	0.905	0.361-2.269
Número de partos	0.549	0.312	1.732	0.597-5.022
Número de cesáreas	0.931	0.188	2.537	0.634-10.144
Número de parejas	-0.017	0.833	0.980	0.750-1.343
Anticonceptivos	-0.979	0.205	0.368	0.079-1.725

El modelo 2 de RLog mostró que solo la infección por VPH, presentó significancia estadística $p= 0.007$ (Tabla 25).

**Tabla 25.-Modelo 2 de RLog en los grupos de pacientes con LIEBG y LIEAG
Variables ginecológicas, uso de tabaco y consumo de alcohol.**

	B	Valor de p	OR	I.C. 95%
Edad de las pacientes	0.005	0.866	1.005	0.040-1.964
Infección por VPH	-1.736	0.007	0.176	0.50-0.616
Número de parejas sexuales	-0.086	0.652	0.918	0.632-1.333
Edad de inicio de Relaciones sexuales	0.034	0.682	0.966	0.820-1.139
Uso de tabaco	-0.282	0.727	0.755	0.155-3.677
Consumo de alcohol	-1.025	0.105	0.359	0.104-1.240

La Tabla 26 muestra el modelo 3 de RLog, se observó que la CAT se alejó todavía más de la significancia con una $p=0.205$ y solamente la circunferencia de cadera y el consumo de alcohol mostraron una relación inversa con una diferencia significativa con $p=0.019$ y $p= 0.036$ respectivamente.

Tabla 26.- Modelo 3 de Rlog en los grupos con LIEBG, LIEAG y variables antropométricas CAT y consumo de alcohol

	B	Valor de p	OR	I.C. 95%
CAT	-2.655	0.205	0.108	0.003-3.365
Circunferencia de cintura	0.073	0.221	1.075	0.957-1.208
IMC	0.076	0.057	1.079	0.998-1.167
Actividad física	-0.605	0.487	0.549	0.099-3.011
Circunferencia de cadera	-0.193	0.019	0.825	0.702-0.969
Consumo de alcohol	-1.597	0.036	0.203	0.045-0.093

En el modelo 4 de R Log se encontró para la CAT un odds ratio (OR) de 0.018, con un intervalo de confianza al 95% (IC) (0.000-0.929). Asimismo el IMC mostró un (OR=1.127, IC 95% 1.012-1.256), el consumo de alcohol (OR=0.123, IC 95% 0.022-0.784) y la infección por VPH con (OR 0.042, IC 95% 0.006-0.280) el resto de las variables no fueron estadísticamente significativas (Tabla 27).

Tabla 27.- Modelo 4 de RLog de los grupos de pacientes con LIEBG y LIEAG y las variables CAT, medidas antropométricas, actividad física, consumo de alcohol e infección por VPH.

	B	Valor de p	OR	I.C95%
CAT	-4.003	0.046	0.018	0.000 -0.929
ICC	-9.867	0.151	0.000	0.000 - 36.197
IMC	0.120	0.028	1.127	1.012-1.256
Actividad física	-1.382	0.135	0.251	0.041-1.541
Edad	-0.056	0.203	0.946	0.867 – 1.031
Consumo de alcohol	-2.093	0.017	0.123	0.022 - 0.684
Infección por VPH	-3.169	0.001	0.042	0.006 - 0.280

10.-DISCUSION

En general, la mayoría de las investigaciones relacionadas con las LIEs y el CaCu se realizan comparando el grupo de LIE con un grupo de control sano y son pocos los estudios en que comparan los grados de LIEs en pacientes infectados y no infectados con VPH.

La media y DE de las edades de las pacientes 36.34 ± 10.0 años de edad para el grupo con LIEBG y 37.0 ± 11.15 para el grupo con LIEAG, fueron inferiores a los encontrados en otras investigaciones como el realizado por Rangel y col⁸⁶ en una población mexicana se observó que las mujeres tuvieron 37.7 ± 11.6 y 41.7 ± 12.2 años de edad para los mismos grados respectivamente Así mismo en relación con la edad de inicio de las relaciones sexuales encontrado en éste estudio fue antes de los 19 años, similar a investigaciones antes realizadas⁸⁷. Sin embargo cuando se contrastaron las medianas de la edad de inicio de las relaciones sexuales se observó que el grupo con LIEAG fue 0.5 años menor que las de bajo grado, por lo que se consideró que además de las variables anteriores pudieran existir otros factores como modificaciones en el estilo de vida que influyan en la transición de una lesión de bajo grado a otra de alto grado, como se muestra en esta investigación.

Existen pocos estudios que asocien la estatura con el riesgo de cáncer y algunos de ellos presentan controversia. Yoo y col⁸⁸ encontraron asociación de la estatura baja con el riesgo de CaCu cuando la estatura fue < 1.54 cm. Es importante resaltar que en la presente investigación la estatura más baja se encontró en el grupo de alto grado y en el percentil 25 la estatura fue de 1.49 cm con una Md=1.58, mientras que para el bajo

grado la $Md=1.60$, con $p=0.352$, por otro lado Lee JK y col⁸⁴ no encontraron asociación entre el CaCu, y la estatura.

Las mujeres que Lee JK y col⁸⁹ estudiaron, tuvieron un IMC normal, aunque fue más alto en el grupo con CaCu que en los grupos con NIC y controles. En contraste Wee C y cols⁹⁰ no encontraron mayor prevalencia de obesidad en las mujeres con cáncer cervical, que las de peso normal. Por otro lado, Maruthur y col⁹¹ en el meta-análisis que realizaron encontraron en 10 de 11 estudios, una asociación inversa entre la obesidad y la detección de CaCu. De los datos anteriores se desprende que no existe un acuerdo sobre el papel de la obesidad en el desarrollo de CaCu. En este estudio el 37.9% del grupo con LIEBG presentó obesidad, mientras que el 38.5% del grupo con LIEAG mostró sobrepeso y otro porcentaje igual obesidad, sin diferencia significativa, las que muy probablemente estén en mayor riesgo de desarrollar CaCu.

En el grupo con LIEBG el 59.2%, estuvieron casadas, mientras que el 46.2% correspondió al grupo con LIEAG, igual que la población estudiada por Labani y col.⁹². De lo anterior se deduce que el mayor número de pacientes con LIEAG eran solteras, que pudieron estar en mayor riesgo de desarrollar CaCu por frecuentes contactos con VPH o múltiples infecciones con el mismo.

El papel del uso de tabaco se correlaciona con las LIEs desde 1980, pero aún permanece controversial⁹³, o como un factor secundario a la infección por VPH para el desarrollo de las LIEAG⁹⁴. Collins S y col⁹⁵, encontraron una asociación de CaCu con el tabaquismo cuando el número de cigarrillos al día fue mayor de 10 y consideraron que los cambios epigenéticos inducidos por el cigarrillo posiblemente podrían explicar el aumento de riesgo observado en mujeres jóvenes, sin embargo en ésta investigación la

mayoría de las pacientes nunca fumaron, aunque presentaron algún grado de lesión intraepitelial escamosa, de tal manera que no coincide con las investigaciones anteriores.

Por otro lado, Min KJ y col⁹⁶ demostraron que el consumo de alcohol estaba asociado positivamente con LIEBG. En éste estudio el 55.3% de las pacientes con lesión de bajo grado, y 39.8% del grupo con LIEAG consumieron alcohol y se encontró una $p=0.095$, que muestra una tendencia hacia la significancia.

Los anticonceptivos hormonales son otro de los cofactores asociados al CaCu, especialmente cuando el uso fue superior a los 5 años como lo reportaron Castellsagué y col en 2003⁹⁷. Se agrupó a las pacientes en dos conjuntos: las que nunca usaron los anticonceptivos orales o inyectables y las que lo usaron. En el grupo con LIEBG el 66.0% no usaron anticonceptivos hormonales, mientras que las de alto grado el 53.8% los usaron. La comparación anterior no arrojó una diferencia significativa.

En relación al número de parejas sexuales Parazzini y col⁹⁸, Rositch y cols⁹⁹ encontraron una fuerte asociación de LIEs con el incremento en el número de parejas a través de su vida (más de 5), mientras que en el presente estudio el número de parejas sexuales se mantuvo en un rango entre 1 y 2 en ambos grupos.

Una alta paridad de más de 7 hijos se considera un factor de riesgo para el desarrollo de CaCu⁹⁴. Por otro lado Vaccarella y col en 2006¹⁰⁰ encontraron que una paridad de más de 10 y largo tiempo del uso de anticonceptivos orales mostraron una asociación entre la infección por VPH y la transición hacia lesiones neoplásicas. En éste estudio la Md del número de hijos fue 2 y 3 para el bajo y alto grado respectivamente y no se observó ninguna asociación.

De los resultados mostrados anteriormente es evidente que hay una diferencia de las medias de la capacidad antioxidante total entre los grupos de LIEBG y LIEAG 1.02 ± 0.19 , 0.92 ± 0.22 mM respectivamente, aunque solo hubo una tendencia a la significancia ($p=0.09$); aun así una concentración menor de CAT en el grupo con LIEAG, permite hipotetizar que muy probablemente éstas últimas pacientes pudieran estar progresando hacia estrés oxidativo, por aumento en las especies reactivas de oxígeno y/o disminución de las enzimas antioxidantes observado en pacientes con cáncer²⁴, lo que propiciaría el progreso de la lesión.

En el análisis multivariado CAT mostró una $\beta=-4.003$, $p=0.046$, OR =0.018, (IC 95% 0.00-0.929), la β negativa y con significancia, permite interpretar que CAT es protectora¹⁰¹ y que cuando se tiene una mayor concentración de la CAT hay menor probabilidad de tener LIEAG, que confirma el análisis inicial.

Las observaciones anteriores se explican por el comportamiento de las EROs, la CAT y el VPH en procesos inflamatorios crónicos donde probablemente otras coinfecciones estén participando en éste desbalance^{64, 102}.

El trabajo de Lee JK y col., reportó una asociación positiva entre el IMC y el CaCu, la presente investigación también mostró una asociación positiva entre el IMC y LIE, con un OR de 1.127, interpretándose como el riesgo de progreso hacia una LIEAG es de 1.127 veces mayor cuando el IMC es alto⁸⁹.

El consumo de alcohol y la presencia de VPH mostraron resultados contradictorios en el sentido de que parecieran ser protectores con una $\beta=-2.093$, $p=0.017$, OR=0.123 (IC 95% 0.022-0.684) y $\beta=-3.169$, $p=0.001$, OR= 0.042 (IC 95% 0.006-0.280) respectivamente, lo que no coincide por lo reportado previamente por Min

KJ y col⁹⁶, que dicen que el consumo de alcohol se asocia al LIEBG entre las pacientes positivas al VPH, considerando al alcohol como un factor independiente y combinado para LIEBG. Sin embargo la explicación al resultado que se obtuvo, puede ser debido a esos efectos beneficiosos que se han observado en algunas patologías entre ellas algunos cánceres con la ingesta moderada de alcohol¹⁰³.

La infección de transmisión sexual más frecuente es la producida por el VPH. La frecuencia está relacionada con la edad de las mujeres, la prevalencia en adolescentes se ha encontrado en un 81.7%¹⁰⁴ y es menos frecuente en etapas más avanzadas de la vida^{9,61,79}.

La infección por VPH pasa por diferentes etapas de transición, el 90% puede curar espontáneamente⁷⁹, aparecer negativa durante su detección por influencia de aspectos inmunológicos, o bien puede reactivarse, agregarse una nueva infección⁶ y puede además persistir, Wang y col observaron que el 45.6% de las infecciones por VPH de alto riesgo fueron persistentes¹⁰⁵; estos aspectos aunado al grado de LIE, se ha detectado en el 62% de las lesiones de alto grado^{106, 107} todo lo anterior puede influir en los resultados de su detección al igual que el método usado para ello. Cualquiera de estos factores puede ser una explicación a lo que se observó, en relación a que fue detectado el VPH en un porcentaje mayor de pacientes con LIEBG que en LIEAG; otro factor importante es la debilidad de éste estudio, que está relacionado con el tamaño de muestra.

Finalmente en el modelo 4 de Rlog se observó que la CAT, VPH, consumo de alcohol e IMC mostraron significancia estadística $p = (0.046, 0.001, 0.017, 0.028)$

respectivamente lo que sugiere que múltiples factores pueden estar actuando sinérgicamente en el progreso de las LIEBG a una LIEAG.

11.- CONCLUSIONES.-

La regresión logística multivariada mostró a la CAT como una variable con significancia estadística ($p=0.046$) por lo cual se rechaza la hipótesis nula.

Esta investigación mostró evidencia que la CAT tiene asociación con las LIEs, que el VPH es la causa necesaria en la mayoría de los casos de LIEs y que la CAT parece ser otro cofactor que junto con algunos otros como el IMC es probable que se lleve a cabo una sinergia para el progreso de la lesión intraepitelial escamosa de bajo a la de alto grado.

Dado los IMC tan altos en la población femenina del mundo y en particular de México, un mayor número de investigaciones son necesarias para conocer mejor la participación que el IMC pueda tener en relación con el desarrollo de las LIEs y evaluar la posibilidad de que los programas de detección oportuna para el CaCu sean reforzados con programas de control de peso y alimentación que incluya abundantes verduras y frutas, fuentes de aporte de antioxidantes al organismo con el consecuente efecto protector demostrado en esta investigación.

A la luz de estos resultados también se considera que es importante llevar a cabo investigaciones que comparen grupos de mujeres con estilos de vida con o sin los factores previamente descritos en esta investigación, para esclarecer su participación en el desarrollo de las LIEs.

12.- BIBLIOGRAFIA

- 1.-http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancers.aspx
- 2.-**Sánchez- Barriga J.** Tendencias de mortalidad por cáncer cervicouterino en las siete regiones socioeconómicas y en las 32 entidades federativas de México en los años 2000-2008. *Gac Med Mex.* 2012; 148: 42-51
- 3.-www.inegi.org.mx/est/contenido/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ consulta.
- 4.-**Diario oficial de México** (Primera sección) 2007 Modificación NOM 014 - SSA2-1994 para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer cervicouterino.
- 5.-**Kumar V, Abbas A, Fausto N, Robbins y Cotran** Patología estructural y funcional. Elsevier: 2010: p 1019-1020.
- 6.-**Gravitt PE.** The known unknown of HPV natural history. *J Clin Invest.* 2011; 121(12): 4593-99.
- 7.-**Castle PE, Schiffman M, Wheeler CM, Solomon D.** Evidence for frequent regression of cervical intraepithelial neoplasia grade-2. *Obstet Gynecol.* 2009; 113: 18-25.
- 8.-**Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S.** Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet.* 2007; 370:890-907.
- 9.-**Burd EM.** Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev.* 2003; 16(1):1-17.

- 10.-**Bosch FX, de Sanjosé S, Tafur L, Izarzugaza I, Gili M, Viladiu P, Navarro C, Martos C, Ascunce N.**The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population-based case-control study in Colombia and Spain. *Int J Cancer*. 1992; 52(5):743-9.
- 11.-**Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Muñoz N, Franceschi S.** Human Papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis *Epidemiology British Journal of cancer* 2003; 88(1): 63-73.
- 12.-**Ho G, Bierman R, Beardsley L, Chang Ch, Burk R.** Natural history of cervico vaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998; 338: 423-428.
- 13.- **Muñoz N, F. Bosch X, De Sanjose S, Herrero R, Castellsagué X, Keerti VS, Snijders PJ, Meijer CJ.** Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348:518-27.
- 14.-**Burk RD, Harari A. Chen Z.** Human papillomavirus genome variants. *Virology*. 2013;445 (1-2):232-43.
- 15.-<http://www.hpvcenter.se/html/refclones.html>>
- 16.-**Hinchliffe SA, Van Velzen D, Korporaal H, Kok PL, Boon ME.** Transience of cervical HPV infection in sexually active, young women with normal cervicovaginal cytology. *Br J Cancer*. 1995; 72: 943-5.
- 17.-**Bodily J, Laimins. LA.** Persistence of human papillomavirus infections: keys to malignant progression. *Trends Microbiol*. 2011; 19 (1): 33-9.

- 18.-**Pirog EC, Kleter B, Olgac S, Bobkiewicz P, Lindeman J, Quint WG, Richart RM, Isacson C.** Prevalence of human papillomavirus DNA in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma. *Am J Pathol.* 2000; 157 (4) 1055-62.
- 19.-**Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV.** The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2002; 55 (4):244-65.
- 20.-**Castellsagué X, Díaz M, de Sanjosé S, Muñoz N, Herrero R, Franceschi S, Peeling RW, Ashley R, Smith JS, Snijders PJ, Meijer CJ, Bosch FX, ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group.** Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *J Natl Cancer Inst.* 2006; 98: 303-15.
- 21.-**Beck MA, Handy J, Levander OA.** The role of oxidative stress in viral infections. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 917: 906-12.
- 22.-**Choi J, Ou JH.** Mechanism of liver injury III oxidative stress in the pathogenesis of hepatitis C virus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006; 290: G847-51.
- 23.-**Chihuailaf RH, Contreras PA, Wittwer F.** Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal. *Vet. Mex.* 2002; 33(3): 266-83.
- 24.-**Rahman K.** Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Inter Aging.* 2007; 2(2): 219-36.
- 25.-**Berg Jeremy M, Tymoczko John L, Stryer Lubert.** *Bioquímica.6ª.* Ed. México: Reverté 2008, p 701.

- 26.-**Kohen R, Nyska A.** Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 2002; 30 (6):620-50.
- 27.-**Sasmaz S, Arican O, Kurutas EB.** Oxidative stress in patients with nongenital warts. *Mediators inflamm.* 2005; 4: 233-36.
- 28.-**Beevi SS, Rasheed MH, Geetha A.** Evidence of oxidative and nitrosactive stress in patients with cervical squamous cell carcinoma. *Clin Chim Acta.* 2007; 375 (1-2):119-23.
- 29.-**De Marco F.** Oxidative stress and HPV carcinogenesis. *Viruses.* 2013; 5 (2): 708-31.
- 30.-**Naidu MS, Suryakar AN, Swami SC, Katkam RV, Kumbar KM.** Oxidative stress and antioxidant status in cervical cancer patients. *Indian J Clin Biochem.* 2007; 22 (2): 140-4.
- 31.-**Ho GY, Palan PR, Basu J, Romney SL, Kadish AS, Mikhail M, Wassertheil-Smoller S, Runowicz C, Burk RD.** Viral characteristics of human papillomavirus infections and antioxidant levels as risk factors for cervical dysplasia. *Int J Cancer.* 1998; 23 78 (5): 594-9.
- 32.-**Lee GJ, Chung HW, Lee KH, Ahn HS.** Antioxidant vitamins and lipid peroxidation in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *J Korean Med Sci.* 2005; 20 (2): 267-72.
- 33.-**Ďuračková Z.** Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res.* 2010; 59: 459-69.

- 34.-**Sainz RM, Lombo F, Mayo JC.** Radical decisions in cancer: redox control of cell growth and death. *Cancers (Basel)*. 2012; 4: 442-73.
- 35.-**Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA.** Harper Bioquímica Ilustrada. 28ª. México: Mc Graw Hill; 2009, p. 482.
- 36.-**Villanueva C, Kross RD.** Antioxidant induced stress. *Int J Mol Sci*. 2012; 13: 2091-109.
- 37.-**McCord JM.** The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med*. 2000; 108(8): 652-9.
- 38.-**Torrens JF.** Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. 2003; 552(2): 335-44.
- 39.-**Buettner GR.** Superóxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide. *Anticancer Agents Med Chem*. 2011; 11(4): 341-6.
- 40.-**LoboV, Patil A, Phatak A, Chandra N.** Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Pharmacogn Rev*. 2010; 4(8): 118-126.
- 41.-**Cadenas E, Davies KJ.** Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Radic Biol Med*. 2000; 207(3-4): 222-30.
- 42.-**Mathews CH, Holde KE.** Bioquímica. 2a Ed. España: Mc Graw Hill Interamericana; 1998, p 818.
- 43.-**Akaika T, Maeda H.** Nitric oxide and virus infection. *Immunology*. 2000; 101 (3): 300-8.
- 44.-**Rubbo H, Radi R, Truyillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, Kirk M, Freeman BA.** Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid

peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem.* 1994 21; 269 (42): 26066-75.

45.-**Beckman JS, Koppenol WH.** Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and ugly. *Am J. Physiol.* 1996;271(5 Pt1):C1424-37.

46.-**Lipinski B.** Hidroxyl radical and its scavengers in health and disease. *Oxid med cell longev.* 2011, Article ID: 809696. doi: 10.1155/2011/809696.

47.-**Lü JM, Lin PH, Yao Q, Chen C.** Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med.* 2010; 14 (4): 840-60. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00897.

48.-**Sies H.** Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 1997; 82 (2):291-95.

49.-**Frankenfeld CL, Lampe JW, Shannon J, Gao DL, Li W, Ray RM, Chen Ch, King IB, Thomas DB.** Fruit and vegetable intakes in relation to plasma nutrient concentrations in women in Shanghai, China. *Public Health Nutr.* 2012; 15: 167-75.

50.-**Lu X, Nan M, Zang H, Liu X, Yuan H, Yang J.** Investigation of the antioxidant property of ascorbic acid. *J Phys Chem.* 2007; 111: 14998-15002.

51.-**Mandl J, Szarka A, Bánhegyi.** Vitamin C update on physiology and pharmacology *Br J Pharmacol.* 2009;157 (7): 1097-110. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00282

52.-**Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA.** *Harper Bioquímica Ilustrada.* 28^a. México: Mc Graw Hill; 2009, p. 468.

53.-**Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G.** Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science.* 1997; 12 (4):152-9.

- 54.-**Rong Tsao**. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. 2010; 2 (12): 1231-46.
- 55.-**Krause WJ, Cutts JH**. *Histología*. 1ª. Ed. España, Médica Panamericana; 1983, p. 390.
- 56.-**Stevens A, Steven JL** **Texto y Atlas de histología**. 2ª. Ed. España: Mosby/Doyma; 1997, p. 326.
- 57.-<http://icpwiki.wikispaces.com>
- 58.-**Geneser F**. *Histología* 3ª. Ed. México: Panamericana; 2007 p. 633-34.
- 59.-<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>
- 60.-**De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur Hausen H**. Classification of papillomavirus. *Virology*. 2004; 324: 7-27.
- 61.-**López-Saavedra A, Lizano-Soberón M**. Cáncer cervicouterino y el virus del papiloma humano: la historia que no termina. *Cancerología*. 2006; 1: 31-55.
- 62.-**Baker TS, Newcomb WW, Olson NH, Cowser LM, Olson C, Brown JC**. Structures of bovine and human papillomaviruses Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys. J*. 1991; 60: 1445-56.
- 63.-**Williams VM, Filippova M, Soto U, Duerksen-Hughes P**. HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. *Future Virol*. 2011; 6 (1):45-57.
- 64 -**Sedman J, Stenlund A**. The initiator protein E1 binds to the bovine papillomavirus origin of replication as a trimeric ring-like structure. *EMBO JI*. 1996; 15(18): 5085-92.

- 65 -**Giri I, Yaniv M.** Structural and mutational analysis of E2 trans-activating proteins of papillomaviruses reveals three distinct functional domains. *The EMBO J.* 1988; 7 (9): 2823-29.
- 66.-**Brown C, Kowalczyk AM, Taylor ER, Morgan IM, Gaston K.** p53 represses human papillomavirus type 16 DNA replication via the viral E2 protein. *Virology.* 2008; 5:5. doi:10.1186/1743-422X-5-5.
- 67.-**Davy C, McIntosh P, Jackson DJ, Sorathia R, Miell M, Wang Q, Khan J, Soneji Y, Doorbar J.** A novel interaction between the human papillomavirus type 16 E2 and E1^{E4} proteins leads to stabilization of E2. *Virology.* 2009; 394 (2):266-75.
- 68-**Venuti A, Paolini F, Nasir L, Corteggio A, Roperto S, Campo MS, Borzacchiello G.** Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Mol Cancer.* 2011; 10: 140.
- 69.-**Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM.** The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell.* 1990; 63: 1129-1136.
- 70.-**Zheng ZM, Baker CC.** Papillomavirus genoma structure, expression and post transcriptional regulation. *Front Biosci.* 2006; 11: 2286-302.
- 71.-**Alvarez-Salas LM, López-Bayghen E.** Regulación genética de los papilomavirus humanos genitales *Salud Publica Mex.* 1995; 37(3):240-7.
- 72.-**Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM.** Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology.* 2010; 401 (1):70-9.

- 73.-**Burk RD, Chen Z, Doorslaer KV.** Human papillomaviruses: genetic basis of carcinogenicity. *Public Health Genomics.* 2009; 12(5-6): 281-290.
- 74.-**Doorbar J.** The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol.* 2005; 32 Suppl 1: S7-15.
- 75.-**Phaik-Leng C, Lai-Meng L.** Biology and pathological association of the human papillomaviruses a review. *Malaysian J Pathol.* 1998; 20(1): 1 - 10.
- 76.-**Rivera RZ, Delgado JD, Painel VP, Barrero PR, Larraín A.** Mecanismo de infección y transformación neoplásica producido por virus papiloma humano en el epitelio cervical. *Revista Chil Obstet Ginecol.* 2006; 71 (2): 135-140.
- 77.-**Horvath C, Boulet GA, Renoux VM, Delvenne PO, Bogers JP.** Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virol J.* 2010; 7 (11): 1-7.
- 78.-**Pyeon D, Pearce SM, Lank SM, Ahlquist P, Lambert PF.** Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS Pathog.* 2009; 5 (2): e1000318. doi: 10.1371/journal.ppat.1000318.
- 79.-**Lizano-Soberón M, Carrillo-García A, Contreras-Paredes A.** Infección por virus del papiloma humano: epidemiología, historia natural y carcinogénesis. *Cancerología.* 2009; 4: 205-216.
- 80.-**Cortés-Gutiérrez EI, Dávila-Rodríguez MI, Fernández JL, López-Fernández C, Gosálvez J.** Koilocytes are enriched for alkaline-labile sites. *Eur J Histochem.* 2010; 54 (4):e32.
- 81.-**Schmitz M, Driesch C, Jansen L, Runnebaum IB, Durst M.** Non-random integration of the HPV genome in cervical cancer. [PLoS One.](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039632) 2012;7(6):e39632. doi: 10.1371/journal.pone.0039632.

- 82.-**Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, Clifford GM.** Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer.* 2007; 121: 621-632.
- 83.-**Velasco R, Martínez VM, Roiz A, Huazano GF, Nieves RA.** Muestreo y Tamaño de muestra una guía práctica para personal de salud que realiza investigación. 2003. p 62-64.
- 84.-<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/es/index.html>
- 85.-**Dalton M¹, Cameron AJ, Zimmet PZ, Shaw JE, Jolley D, Dunstan DW, Welborn TA, AusDiab.** Waist circumference, waist-hip ratio and body mass index and their correlation with cardiovascular disease risk factors in Australian adults. *J Intern Med.* 2003; 254 (6):555-63.
- 86.-**Rangel JI., Rendón M, Rivera L, Velasco HE, Hernández CH.** Frecuencia de displasias y cáncer cervical en mujeres del estado de Querétaro. *Rev Oncol.* 2003; 5 (7):471-5.
- 87.-**Louie KS, de Sanjose S, Diaz M, Castellsagué X, Herrero R CJ Meijer CJ, Shah K, Franceschi S, Muñoz N, Bosch FX. for the International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study group.** Early age at first sexual intercourse and early pregnancy are risk factors for cervical cancer in developing countries. *Br J Cancer.* 2009; 100: 1191-1197.
- 88.-**Yoo KY, Kang D, Koo HW, Park SK, Kim DH, Park NH, Song YS, Kang SB, Lee HP.** Risk factors associated with uterine cervical cancer in Korea: a case-control study with special reference to sexual behavior. *J Epidemiol.* 1997;7: 117-123.

- 89.-**Lee JK, So KA, Piyathilake CJ, Kim MK.** Mild obesity, physical activity, calorie intake, and the risks of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *PLoS One* 2013; 8(6): e66555. doi: 10.1371/journal.pone.0066555.
- 90.-**Wee CC, Huang A, Huskey KW, McCarthy EP.** Obesity and the likelihood of sexual behavioral risk factors for HPV and cervical cancer. *Obesity (Silver Spring)*. 2008; 16(11):2552-2555. doi:10.1038/oby.2008.394.
- 91.-**Maruthur NM, Bolen S, BranCati FL, Clark JM.** The association of obesity and cervical cancer screening: a systematic review and meta-analysis. *Obesity (Silver Spring)*. 2009; 17(2): 375-381. doi:10.1038/oby.2008.480.
- 92.-**Labani L, Andallu B, Meera M, Asthana S, Satyanarayana L.** Food consumption pattern in cervical carcinoma patients and controls. *Indian J Med Paediatr Oncol*. 2009; 30: (2):71-5.
- 93.-**Burger MP, Hollema H, Gouw AS, Pieters WJ, Quint WG.** Cigarette smoking and human papillomavirus in patients with reported cervical cytological abnormality. *BMJ*. 1993; 306: 749-52.
- 94.-**McIntyre-Seltman K, Castle PH, Guido R, Schiffman M, Wheeler CM.** Smoking is a risk factor for cervical intraepithelial neoplasia grade 3 among oncogenic human papillomavirus DNA-positive women with equivocal or mildly abnormal cytology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005; 14 (5):1165-1170.
- 95.-**Collins S, Rollason TP, Young LS, Woodman C.** Cigarette smoking is an independent risk factor for cervical intraepithelial neoplasia in young women: a longitudinal study. *Eur J Cancer*. 2010; 46(2): 405-411. doi: 10.1016/j.ejca.2009.09.015.

- 96.-**Min KJ, Lee JK, Lee S, Kim MK.** Alcohol consumption and viral load are synergistically associated with CIN1. *PLoS One.* 2013; 8(8): e72142. doi: 10.1371/journal.pone.0072142 eCollection 2013.
- 97.-**Castellsagué X, Muñoz N.** Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis-role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003; (31):20-8.
- 98.-**Parazzini F, La Vecchia C, Negri E, Fedele L, Franceschi S, Gallotta L.** Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer.* 1992; 69 (9):2276-2282.
- 99.-**Rositch AF, Burke AE, Viscidi RP, Silver MI, Chang K, Gravitt PE.** Contributions of recent and past sexual partnerships on incident human papillomavirus detection: acquisition and reactivation in older women. *Cancer Res.* 2012; 72(23): 6183-90.
- 100.-**Vaccarella S, Herrero R, Dai M, Snijders PJ, Meijer CJ, Thomas JO, Anh PT, Ferreccio C, Matos E, Posso H, de Sanjose S, Shin HR, Sukvirach S, Lazcano-Ponce E, Ronco G, Rajkumar RJ, Qiao YL, Muñoz N, Franceschi S, and IARC HPV.** Prevalence surveys study group reproductive factors, oral contraceptive use, and human papillomavirus infection: pooled analysis of the IARC HPV prevalence surveys. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006; 15: 2148-53.
- 101.- **Tong SY, Lee JM, Song ES, Lee KB, Kim MK, Lee JK, Son SK, Lee JP, Kim JH, Kwon YI** Functional polymorphism in manganese superoxide dismutase and antioxidant status: their interactions on the risk of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2009;115 (2):272-6. doi: 10.1016/j.ygyno.2009.07.032.

- 102.-**Disilvestro R.** Influence of copper intake and inflammation on rat serum superoxide dismutase activity levels. *J Nutr.* 1988; 118 (4): 474-79.
- 103.-**Nova E, Bacchan GC, Veses A, Zapatera B, Marcos A.** Potential health benefits of moderate alcohol consumption: current perspectives in research. *Proc Nutr Soc.* 2012; 71(2):307-15. doi: 10.1017/S0029665112000171
- 104.-**Darron DR, Shew ML, Qadadri B, Neptune N, Vargas M, Tu W, Juliar BE, Breen TE, Fortenberry D.** A Longitudinal study of genital human papillomavirus infection in a cohort of closely followed adolescent women. *J Infect Dis.* 2005; 191 (2): 182-92.
- 105.-**Wang S, Wei H, Wang N, Zhang S, Zhang Y, Ruan Q, Jiang W, Xiao Q, Luan X, Qian X, Zhang L, Gao X, Sun X.** The prevalence and role of human papillomavirus genotypes in primary cervical screening in the northeast of China. *BMC Cancer.* 2012; 12:160. doi: 10.1186/1471-2407-12-160.
- 106.-**Heard I, Tondeur L, Arowas L, Falguières M, Demazoin MC, Favre M.** Human papillomavirus types distribution in organised cervical cancer screening in France. *PLoS ONE.* 2013; 8(11): e79372. doi:10.1371/journal.pone.0079372.
- 107.-**Guerrero E, Daniel RW, Bosch FX, Castellsague X, Muñoz N, Gili M, Viladiu P, Navarro C, ZubirI ML, Ascunce N, González LC, Tafur L, Izarzugaza I, Shah KV.** Comparison of virapap, southern hybridization, and polymerase chain reaction methods for human papillomavirus identification in an epidemiological investigation of cervical cancer. *J Clin Microbiol.* 1992; 30 (11): 2951-59.

13.- ANEXOS

13.1. ANEXO 1

Universidad Autónoma de Baja California

FACULTAD DE MEDICINA-MEXICALI

Carta de consentimiento Informado para participar en protocolos de investigación

Mexicali, B. C. _____ de _____ de _____

Por medio de la presente acepto participar en el protocolo de investigación titulado **“Asociación de la capacidad antioxidante total con el grado de Lesión Intraepitelial escamosa cervical en mujeres infectadas y no infectadas con el virus del papiloma humano”** Registrado ante el comité local de Investigación con la clave del proyecto número 106/2/C/33/14. El objetivo del estudio es comparar los niveles de la capacidad antioxidante total en mujeres con displasias infectadas con y sin VPH.

Me han explicado que mi participación consistirá en los procedimientos de rutina de la clínica de displasia, durante los cuales se elabora una historia clínica, obtención de muestras de células del cuello de la matriz, que será tomada por el médico tratante de la clínica de displasia para detectar la presencia de VPH y en este proyecto además de lo anterior se aplicará una encuesta de frecuencia de consumo de alimentos y se me tomará una muestra de sangre por punción venosa para medir la capacidad antioxidante.

Declaro que se me ha informado sobre los posibles riesgos, inconvenientes y beneficios de los propios de rutina derivados de mi tratamiento y los derivados de mi participación en esta investigación posiblemente sería la producción de una equimosis (moretón) derivado de la punción de la vena.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo normalmente en el instituto.

El investigador responsable me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera cambiar mi parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

Nombre y firma del paciente

Nombre y firma del investigador responsable.

Testigo:

.....

Testigo:

13.2. ANEXO 2

HOJA DE DATOS CLINICOS

Fecha _____

Nombre de la paciente: _____ Edad _____

Dirección: _____

Colonia _____

Teléfono: ____ _ _ _ _ _ _ _ _

Estado civil:

unión libre (0) soltera (1) casada (2) divorciada o separada (3) viuda (4)

Escolaridad:

Ninguna (0) 3°.primaria (1) Primaria terminada (2) secundaria (3) Preparatoria

(4) universidad (5) Posgrado (6)

Ocupación de la paciente:

Hogar (1) Obrera (2) empleada (3) profesionista (4) otros

Edad de inicio de relaciones sexuales: (____) años

Edad del primer embarazo: (_____)

Frecuencia de Papanicoloau:

Se ignora (0) 6 meses (1) 1 año (2) 2 años (3) menor a 5 años (4) mayor a 5 años (5)

Fecha de último Papanicoloau: _____

No. de embarazos: (____) No. Partos (____) No cesáreas (____) No. abortos (____)

Anticonceptivos inyectables:

Nunca usó (0) 3 meses (1) 6 meses (2) 1 año (3) 3 años (4) más de 5 años (5).

Anticonceptivos orales:

nunca uso (0) 3 meses (1) 6 meses (2) 1 año (3) 2 años (4) menos de 5 años (5)

mas de 5 años (6)

Anticonceptivo actual:

no anticonceptivo (0) TB (1) menopausia (2) preservativo (3) coito interrumpido (4)
vasectomía (5)

Vitamínicos:

No usos (0) poli-vitaminas (1) complejo B (2) vitamina A y D (3)

Infección por VPH diagnosticada: Si No

Enfermedad del sistema inmune: Si No Antecedentes de tumoración Si No

Padece alguna enfermedad: Si No Cual _____

Toma medicamentos anti-inflamatorios: Si No otros

medicamentos_____ **Ocupación del esposo:**

trabajador del campo (1) obrero fabrica (2) empleado (3) chofer camiones (5)

profesional (4) técnico (5)

Alcoholismo esposo:

negativo (0) positivo (1) se ignora (2)

Otro tipo de relaciones: ninguna (0) orales (1) anales (2) orales y rectales (3)

Uso drogas de la paciente: nunca ha usado (0) marihuana(1) cocaína (2) cristal (3)

combinación (4)

otras (5) se ignora (6)

Uso drogas del esposo: nunca ha usado (0) marihuana(1) cocaína (2) cristal (3)

combinación (4)

otras (5) se ignora (6)

13.3. ANEXO 3

CUANTIFICACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL

La capacidad antioxidante total se obtuvo de las muestras de suero con el kit de Total Antioxidant Status de Rel Assay Diagnostics, Turquía, basado en que los antioxidantes presentes en la muestra que reducen el radical ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) a una forma reducida (menos color); el cambio de absorbancia a 660 nm está relacionado con el nivel de antioxidantes de la muestra. El ensayo fue calibrado con una solución estándar de antioxidante (trólox 1.0 mM/L),

Se realizó de la siguiente manera:

- 1.- se colocaron 200 µl del reactivo 1 en un pozo de una microplaca de Elisa
- 2.- se agregaron 12 µl de estándar o muestra de suero según correspondió;
- 3.- se realizó una lectura de la absorbancia con el Biotek Elx50 microplate Elisa a 660 nm para el primer punto de absorbancia.

- 4.- Posteriormente se agregaron 30 µl del reactivo 2 a cada uno de los pozos de la microplaca.

- 5.- se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente

- 6.- Se realizó una segunda lectura de absorbancia a 660 mm

- 7.- se calcularon los resultados de la siguiente manera:

$$\text{Resultado} = \frac{\{(\Delta\text{Abs Std1}) - (\Delta\text{Abs muestra})\}}{\{(\Delta\text{Abs Std 1}) - (\Delta\text{Abs Std2})\}}$$

Δ Absorbancia del Estándar 1 = Segunda absorbancia de Std 1- Primera Absorbancia del Estandar 1)

Δ Absorbancia del Estándar 2 = Segunda absorbancia del Std 2 - Primera absorbancia del Estándar 2)

Δ Absorbancia de la muestra = Segunda absorbancia de la muestra - Primera absorbancia de la muestra.

13.4. ANEXO 4

Procedimiento de obtención de la muestra y procesamiento de la biopsia

1.-**Obtención de la muestra.** Se obtuvo la muestra de lesiones de cérvix (exo y endocérvix) de 2-5 mm, con pinza sacabocado.

2.-**Fijación.** Colocación de la biopsia en formol amortiguado al 10% (50 veces el tamaño de la muestra) para su fijación. El tiempo mínimo para las dimensiones y tipo de la biopsia fue de 18 horas.

3.-A continuación se colocó la biopsia en una cassette debidamente etiquetado, por ejemplo B.09-01 Biopsia + año + número de registro, para ser sometido al procesador automático de tejidos (histoquinette). Se mantuvo la muestra en formol buferizado al 10% hasta el inicio del proceso, el cual consistió en los siguientes pasos:

a) Deshidratación:

- En alcohol al 60% por una hora
- En alcohol al 70% por una hora
- En alcohol al 80% por una hora
- Primera deshidratación en alcohol al 96% por una hora
- Segunda deshidratación en alcohol al 96% por una hora
- Y la deshidratación final en alcohol al 100% por una hora (en este paso el tejido queda libre de agua)

b) Aclaramiento:

- En acetona o cloroformo una hora
- En xilol una hora
- En xilol una hora (en este paso el tejido está libre de alcohol)

c) Impregnación:

- Inicial, en parafina a 58° C por una hora. La impregnación en parafina es con la finalidad de que ésta, ocupe todos los espacios vacíos, incluso intracelulares, antes ocupados por agua, desplazada por el uso de solventes como los alcoholes y la acetona o el xilol.

4.-Formación de bloque. Se llevó la muestra al centro de inclusión, este aparato tiene un dispensador de parafina líquida que se encuentra a una temperatura de 59°C. La biopsia se colocada en un recipiente metálico de 3x4 cm y se llena con parafina para obtener el bloque, el cual se introdujo al congelador y cuando solidificó, se llevó al micrótopo para su corte.

5.-Corte. El bloque se colocó en el micrótopo de tipo vertical manual, cuya manivela al dar un giro hace avanzar la muestra hacia adelante 5 µm. Este aparato está dotado de una cuchilla de acero o cuchilla desechable. El grosor recomendado para el corte del tejido de cérvix es de 5 µm aproximadamente.

6.-Montaje en el portaobjetos. Los cortes obtenidos fueron puestos en el agua del baño de flotación, la cual se mantuvo a 50°C y se le agregó 0.375 gr por litro de grenetina (para hacer que el tejido se adosara al portaobjetos). El agua caliente se utilizó con la finalidad de que el tejido que estaba congelado se extienda en el agua y una vez extendido pudiera ser recogido con un porta objetos y colocarlo inclinado para que escurriera el agua y después colocarlo en una parrilla para derretir el exceso de parafina.

7.-Tinción.-Las laminillas se colocaron en una canastilla para someterlas a la tinción de hematoxilina y eosina la cual inicia con los siguientes pasos:

- a) Se inició con 2 recipientes con xilol por 5 minutos en cada uno de ellos con la finalidad de retirar la parafina.
- b) Posteriormente se pasó a 2 alcoholes de 96 por 5 minutos en cada uno y luego al alcohol absoluto (100%).
- c) Del alcohol absoluto llevar al agua con la finalidad de quitarle el alcohol (hidratarlo) y de ahí pasarlo a la hematoxilina, el tiempo que se le da a este colorante depende de su maduración.
- d) Se enjuagó con agua corriente y de ahí al ácido clorhídrico para retirar los excesos del colorante, se recomienda un baño rápido, enjuagar en agua corriente, de allí pasar al siguiente paso
- e) Hidróxido de amonio se recomienda dejarlo 20 segundos para que tome un color azulado, enjuagar en agua corriente y de ahí pasarlo a alcohol de 96% durante cinco minutos.

- f) Posteriormente pasar a la eosina, el tiempo depende de la maduración del colorante.
- g) Posteriormente pasar a dos alcoholes de 96⁰ por 5 minutos en cada uno, luego a un alcohol absoluto también 5 minutos y se finaliza colocándolo en xilol en dos ocasiones, manteniéndolo cinco minutos en cada uno.
- h) Dejar secar los cortes y montar colocando una gota de resina sintética y proteger con un cubreobjetos.

8.-Diagnóstico Histopatológico. Finalmente se pasó al patólogo las muestras para su diagnóstico.