



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Análisis De Expresión Del Gen CYP2E1 En
Semen De Hombres Infértiles Infectados Con
VPH

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA
Shalom Ruth Martell Cid

Asesora Interna / Dra. Maritere Domínguez Rojas
Asesora Externa / Dra. Virginia Sánchez Monroy

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A la Dra. Maritere Domínguez Rojas por ofrecerme la oportunidad de realizar este trabajo de investigación y por sus maravillosas clases de genética molecular que guiaron mis conocimientos a este proyecto.

A la Dra. Virginia Sánchez Monroy por recibirme cálidamente en su laboratorio, por permitirme ser participe en uno de sus proyectos, por confiar en mí y ser paciente para explicarme aquellos detalles que ayudaron a culminar esta tesis.

A Joshua Licona Gómez por ser mi pareja, apoyo incondicional, intelectual y emocional.

A mi familia por siempre estar pendientes de mi progreso y por ser los principales motivadores para concluir con éxito este trabajo que inicialmente parecía interminable.

A mis papás, aunque no vieron terminado este proyecto se encargaron de formarme desde joven con los valores y aptitudes necesarias para enfrentar cualquier adversidad que se me presentase.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme las puertas y darme las bases para formarme profesionalmente y permitirme ser una científica más en México.

El corazón del hombre propone su camino, pero Jehová dirige sus pasos.
Proverbios 16:9





UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de tesis y examen profesional.**

Análisis de expresión del gen CYP2E1 en semen de hombres infértiles infectados con VPH

Que presenta la pasante: **Shalom Ruth Martell Cid**

Con número de cuenta: **313263668** para obtener el título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 07 de Abril de 2022.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. María Guadalupe Avilés Robles	
VOCAL	QFB. Nydia Berenice González Angeles	
SECRETARIO	Dra. Maritere Domínguez Rojas	
1er. SUPLENTE	M. en C. María Llasbeth Hernández Calderón	
2do. SUPLENTE	LBD. Larisa Andrea González Salcedo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

MCVB/cga*

Tabla de contenido

Introducción	4
Marco Teórico	6
Virus del Papiloma Humano	6
Clasificación	7
Estructura	8
Ciclo de Replicación	11
Epidemiología del VPH	17
Infección por VPH	18
Infección Simple y Múltiple	20
Infección con Virus de Alto y Bajo Riesgo	20
Manifestaciones clínicas	21
Diagnóstico	25
Tratamiento	30
Estrés Oxidativo.....	32
Definición	32
Especies Reactivas de Oxígeno.....	32
Causas de Estrés Oxidativo en los Espermatozoides.....	33
Infertilidad	36
Definición	36
Epidemiología	36
Causas de Infertilidad	36
Gen CYP2E1	37
Función del gen CYP2E1.....	38
Relación con Estrés Oxidativo	39
Objetivo	40
Objetivos Específicos	40
Hipótesis	41
Metodología de Investigación.....	41
Resultados.....	47
Discusión de Resultados.....	50
Conclusiones.....	54
Bibliografía	55



Introducción

Los virus del papiloma humano (VPH) son miembros de la familia *Papillomaviridae*. Las partículas virales son pequeñas y contienen una cadena de ADN de doble hebra. Existen más de 200 genotipos descritos, de los que cerca de una tercera parte tienen como objetivo infectar las mucosas del hospedero. Los genotipos del VPH que afectan las mucosas, por lo regular se transmiten por vía sexual y se pueden subdividir entre bajo y alto riesgo. Los de alto riesgo se asocian con cáncer cervicouterino, vulvar, vaginal, penial, anal y con otros tumores orofaríngeos, mientras que los de bajo riesgo no conducen al cáncer (Ochoa-Carrillo, 2014).

Siendo así el VPH es la enfermedad de transmisión sexual (ETS) mas común en México. Se estima que 7 de cada 10 Mexicanos sexualmente activos son portadores de esta enfermedad (IMVPH, 2018).

En México, entre 4 y 5 millones de parejas sufren problemas de fertilidad y cada año se suman más, de acuerdo con información del Instituto Nacional de Estadística y Geografía.

Desde el punto de vista etiológico, la infertilidad se considera de origen multifactorial, por trastornos genéticos, hormonales, estilo de vida inadecuados, por causas ambientales, infecciones de transmisión sexual (ITS), bacterianas, micóticas o virales, en donde se incluye al Virus del Papiloma Humano (VPH), (Pérez Soto, Sánchez Monroy, Domingo Vázquez, & Oros Pantoja, 2019). De hecho, el estrés oxidativo en espermatozoides es uno de los mayores causantes de infertilidad masculina de origen desconocido (AMMR, 2018).

Tomando esto en cuenta resulta incuestionable la participación del estrés oxidativo en la patogenia de la infertilidad masculina. Puesto que gran parte de estos pacientes presentan



niveles elevados de especies reactivas del oxígeno (ERO), cuya presencia en el semen constituye un reflejo del desbalance entre su producción por los elementos celulares y su degradación por los sistemas antioxidantes (Alba Zayas, Monzón Benítez, Peláez Yáñez, & Quintero Pérez, 2000).

Las ERO afectan la fertilidad masculina por las alteraciones que se producen en la permeabilidad de la membrana espermática que origina alteraciones en la movilidad y morfología del espermatozoide; el H_2O_2 difunde a través de las membranas, entra a la célula e inhibe la actividad de algunas enzimas, como glucosa 6 fosfatodeshidrogenasa (G6PDH) que origina una disminución en la producción de NADPH y una concomitante acumulación de la forma oxidada del glutatión (GSSG), (Mallok, Flores-Sanchez, Alonso-Rodriguez, & Martínez-Sánchez, 2011).

El gen CYP2E1 codifica un miembro de la superfamilia de enzimas del citocromo P450. Las proteínas del citocromo P450 son monooxigenasas que catalizan reacciones implicadas en el metabolismo de fármacos y la síntesis de colesterol, esteroides y otros lípidos. Esta proteína se localiza en el retículo endoplásmico y es inducida por el etanol, el estado diabético y la inanición (GeneCards, 2008).

La enzima CYP2E1 es una de las enzimas CYP más estudiadas tanto en animales como en humanos, debido a su papel en el metabolismo del etanol y por su participación en la activación metabólica de una serie de procarcinógenos, además es importante en patología puesto que se ha descrito como una de las enzimas que produce mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno (anión superóxido y H_2O_2) (Orellana B & Guajardo T, 2004).



De igual manera el aumento de la actividad de CYP2E1 se ha asociado con un mayor riesgo de cáncer a través de una mayor producción de ERO y una mayor activación de una variedad de procarcinógenos (Caro & Cederbaum, 2004).

Siendo así una enzima importante para evaluar los efectos tóxicos producidos por la infección de patógenos como lo es el VPH; ya que la infección persistente por VPH promueve la inflamación crónica, que también puede inducir un desequilibrio entre prooxidantes (ERO, NOS) y antioxidantes (CAT, SOD), causando daño oxidativo a los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos de la membrana de los espermatozoides, induciendo procesos degenerativos tanto agudos como crónicos, incluida la carcinogénesis y el cáncer e infertilidad masculina (Pérez Soto, y otros, 2020).

Por lo tanto es importante estudiar si hay una correlación entre la expresión de CYP2E1 y los efectos tóxicos que puede producir el VPH sobre los espermatozoides, pues dilucidar dicho vínculo facilitaría el diagnóstico y profilaxis en parejas con problemas de infertilidad.

Marco Teórico

Virus del Papiloma Humano

El VPH (virus del papiloma humano) es un virus de transmisión sexual y es la infección de transmisión sexual más frecuente en el mundo, transmitido por contacto genital (como el contacto sexual vaginal y anal). También se transmite por contacto cutáneo (piel) (Food and Drug Administration, 2019). Es resistente a la desecación y al calor, siendo así la infección mediante vías no sexuales posible, por ejemplo a través de intercambio de ropas o por transmisión vertical, durante el parto. Además se encuentra en toda la zona genital



incluyendo escroto, labios mayores, cuerpo del pene, glande etc.; por ende, el uso de condón no es un método totalmente preventivo de la infección por VPH (Silva, y otros, 2013).

La infección por VPH afecta a hombres y mujeres por igual; sin embargo, en hombres se asocia principalmente a lesiones como verrugas ano-genitales (condilomas) y neoplasias intraepiteliales de pene y ano. La infección de VPH en el hombre es considerada de escasa relevancia ya que este se considera como vector silencioso, a pesar de jugar un papel importante en la transmisión, sólo 1% de los hombres llega a experimentar algún signo o síntoma clínico (Silva, y otros, 2013).

Clasificación

Los virus del papiloma humano (VPH) son miembros de la familia *Papillomaviridae* y del género *Papillomavirus*, los cuales tienen tropismo por los epitelios; infectan principalmente la piel y membranas mucosas.

Se clasifican taxonómicamente en cinco géneros:

- *Alpha-Papillomaviruses*: Infectan el epitelio cutáneo y mucoso del tracto anogenital, provocando desde verrugas comunes a lesiones neoplásicas.
- *Beta-Papillomaviruses*: Producen lesiones subclínicas o infecciones latentes que pueden ser de importancia clínica en individuos inmunodeprimidos o pacientes con epidermodisplasia verruciforme.
- *Gamma-Papillomaviruses*: Causan papilomas y verrugas cutáneas.
- *Mu-Papillomaviruses*: Generan papilomas y verrugas cutáneas.



- *Nu-Papillomaviruses*: Generan papilomas y verrugas cutáneas (Elsevier Connect, 2019)

De los cuales sólo *Alpha-Papillomavirus*, *Beta-Papillomavirus* y *Gamma-Papillomavirus* llegan a infectar a humanos.

Se han descrito más de 200 tipos de VPH, los transmitidos por vía sexual son aproximadamente 40 y éstos se pueden agrupar en VPH de bajo riesgo (VPH-BR) en donde se incluyen más frecuentemente los tipos 6, 11, 42, 43 y 44 o VPH de alto riesgo u oncogénico (VPH-AR) siendo de este grupo los tipos 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 70 (Silva, y otros, 2013).

Estructura

Las partículas del VPH son icosaédricas, sin envoltura y miden entre 52-55 nm de diámetro.

La cápside está constituida por 72 capsómeros pentaméricos de la proteína más abundante L1. Otra proteína de la cápside denominada L2 se asocia internamente a un subgrupo de capsómeros formados por L1. En los viriones no se han encontrado componentes de naturaleza lipídica ni glicosídica. Dentro de la cápside se ubica el genoma viral, que está constituido por ADN de doble cadena covalentemente circularizado, que se encuentra con histonas formando un complejo similar a la cromatina (**figura 1**) (Santos-López, Márquez-Domínguez, Reyes-Leyva, & Vallejo-Ruiz, 2015).



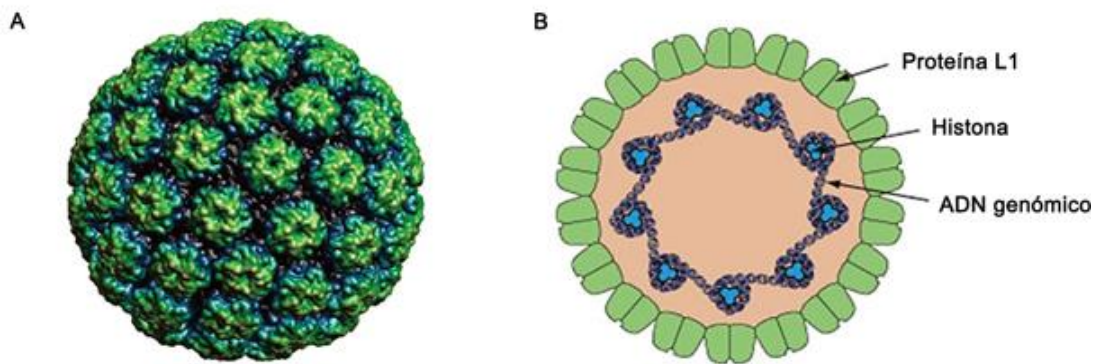


Figura 1. Estructura del VPH. A) Modelo atómico de la cápside reconstruido con criomicroscopía electrónica. Obtenido de: http://viperdb.scripps.edu/Info_Page.php?VDB=110t#illustrations. B) Diagrama de la cápside donde se observa el genoma viral empaquetado en histonas y la proteína principal de la cápside L1. Obtenido de: <https://viralzone.expasy.org/5>

Su genoma mide entre 6800-8400 pares de bases, contiene un promedio de ocho marcos abiertos de lectura (ORF, del inglés open reading frame) y se divide en tres regiones principales: la primera una región reguladora no codificante denominada región larga de control (LCR, del inglés long control region) la cual tiene la función reguladora de la transcripción de los genes virales E6 y E7; la segunda es una región que presenta genes de expresión temprana (E del inglés early) las cuales dan origen a proteínas no estructurales E1, E2, E4, E5, E6 y E7 y la tercera región contiene genes de expresión tardía (L de late), que originan dos proteínas estructurales L1 y L2 (**figura 2**) (Santos-López, Márquez-Domínguez, Reyes-Leyva, & Vallejo-Ruiz, 2015), (Beltrán-Lissabet J. F., 2014).



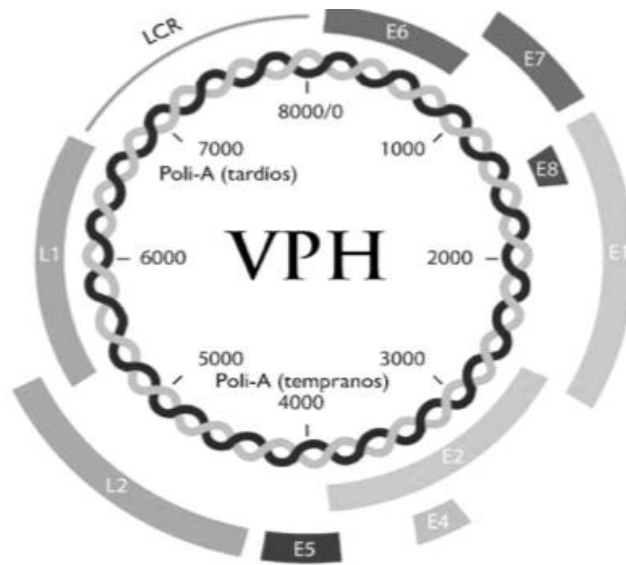


Figura 2. Genoma del VPH dividido entre regiones: LCR, E y L. Obtenido de (Beltrán-Lissabet J. F., 2014).

La regulación de la expresión de los genes virales está controlada por factores de transcripción celulares y virales. Donde sólo una hebra de la doble cadena de ADN actúa como molde para la expresión de los genes virales, que codifican un número de transcritos de ARNm policistrónicos. Los genes E6 y E7 mantienen la replicación; E1, E2, E3, E4, E5 y E8 están implicados en el control transcripcional y la replicación del ADN viral, además de otras funciones, mientras que los genes L1 y L2 codifican las proteínas encargadas del ensamblaje de las partículas virales (Beltrán-Lissabet J. F., 2014).

Las funciones de las proteínas codificadas por el genoma del VPH se resumen en la tabla 1.



Tipo de proteína	Nombre	Funciones o actividades asociadas
No estructurales	E1	Tiene funciones de helicasa. Es esencial para la replicación y la transcripción
	E2	Esencial para replicación y transcripción viral, segregación genómica y encapsidación
	E4	Regula la expresión de genes tardíos, controla la maduración viral y la salida de los viriones
	E5	Estimula la actividad transformante de E6 y E7, promueve la fusión celular generando aneuploidía e inestabilidad cromosómica, contribuye a la invasión de la respuesta inmunitaria
	E6	Se une e induce la degradación de la proteína supresora de tumores p53, inhibiendo la apoptosis; interactúa con proteínas del sistema inmunitario innato, contribuye a la evasión de la respuesta inmunitaria y a la persistencia del virus; activa la expresión de la telomerasa
	E7	Se une e induce la degradación de la proteína supresora de tumores pRB; incrementa la actividad de cinasas dependientes de ciclinas; afecta la expresión de genes de fase S por interacción directa con factores de transcripción E2F y con histona desacetilasa; contribuye a la evasión de la respuesta inmunitaria
	Estructurales	L1
L2		Proteína secundaria de la cápside. Participa en la unión del virión a la célula, en su entrada a la célula y su transporte al núcleo, la liberación del genoma y el ensamble de los viriones

Tabla 1. Proteínas del VPH y sus funciones asociadas. Obtenido de (Santos-López, Márquez-Domínguez, Reyes-Leyva, & Vallejo-Ruiz, 2015).

Ciclo de Replicación

El VPH tiene una alta especificidad por células epiteliales escamosas, en las cuales se lleva a cabo la síntesis de nuevas partículas virales. El virus para establecerse en el tejido requiere de la infección de los queratinocitos basales, habitualmente a través de lesiones o abrasiones en el tejido, lo cual sugiere que es necesaria la presencia de células con actividad mitótica (Santos-López, Márquez-Domínguez, Reyes-Leyva, & Vallejo-Ruiz, 2015).

La introducción de los viriones inicia mediante la interacción de la proteína L1 viral, no obstante aún no se ha identificado el receptor celular que permite la entrada de los viriones a las células epiteliales. Sin embargo, entre las propuestas está la integrina alfa-6, beta-4 la cual se expresa en el proceso de restauración de un tejido dañado, lo que la hace muy apropiada para esta función. Así mismo, se ha visto que los viriones se unen al heparán sulfato de la superficie celular, lo cual podría proveer un anclaje inicial, seguido de la



formación de un complejo que permita su entrada a través de un endosoma (De la Cruz Hernández, Mohar Betancourt, & Lizano Soberón, 2004).

Otra propuesta de receptor celular es el sindecano-1 que es altamente expresado durante la migración y proliferación de queratinocitos así como folículos pilosos, por ende, cuando los queratinocitos basales y suprabasales son expuestos a un trauma menor o abrasión se sobreexpresa el sindecano-1, regulando fuertemente la adhesión e internalización del VPH *in vivo* (Beltrán-Lissabet J. , 2014).

La fase inicial en una infección de VPH es la adhesión de viriones intactos a células de un epitelio escamoso en donde pueden ocurrir dos tipos de infecciones: productivas o latentes.

Las infecciones latentes ocurren predominantemente en células inmaduras (células basales o metaplásicas) del epitelio escamoso. El ADN viral permanece dentro de la célula en forma circular libre (forma episomal) sin replicarse y no hay cambios morfológicos citológicos, por lo que la detección viral sólo puede hacerse por métodos moleculares (De la Fuente-Villarreal, Guzmán-López, Barboza-Quintana, & González-Ramírez, 2010).

Después de dividirse la célula infectada, una de las células hijas reside en la membrana basal, mientras que la otra célula inicia la diferenciación en la parte superior del epitelio. El virus requiere la maquinaria de replicación celular para la síntesis del ADN vírico, siendo esta poco eficiente en células ya diferenciadas. A pesar de ello el virus estimula la progresión de las fases G1-S en células diferenciadas y así mismo produce un ambiente adecuado para la replicación del ADN (De la Cruz Hernández, Mohar Betancourt, & Lizano Soberón, 2004).



En las infecciones productivas o activas, la replicación viral se realiza principalmente en células escamosas ya diferenciadas (capas intermedia y superficial) del epitelio escamoso, en donde se lleva a cabo una alta actividad de replicación del ADN viral, con producción de proteínas de la cápside y ensamblaje de nuevos viriones, siendo estos los que producen cambios celulares distintivos sobre las células infectadas. Ya sea acantosis, vacuolización citoplásmica prominente, atipia nuclear y binucleación (De la Fuente-Villarreal, Guzmán-López, Barboza-Quintana, & González-Ramírez, 2010).

Aunque la infección por VPH se puede dar en células indiferenciadas que están en división, la replicación viral solo ocurre en células que puedan diferenciarse. Ya que las células programadas para diferenciarse generan factores específicos de diferenciación los cuales utiliza el VPH para aumentar su transcripción. Un ejemplo es la ADN polimerasa, puesto que, el genoma viral del VPH no la codifica ni otras enzimas que controlan la síntesis del ADN viral; por lo tanto, el VPH utiliza la maquinaria genética de la célula para así garantizar su replicación (**figura 3**) (Hernández, 2017).



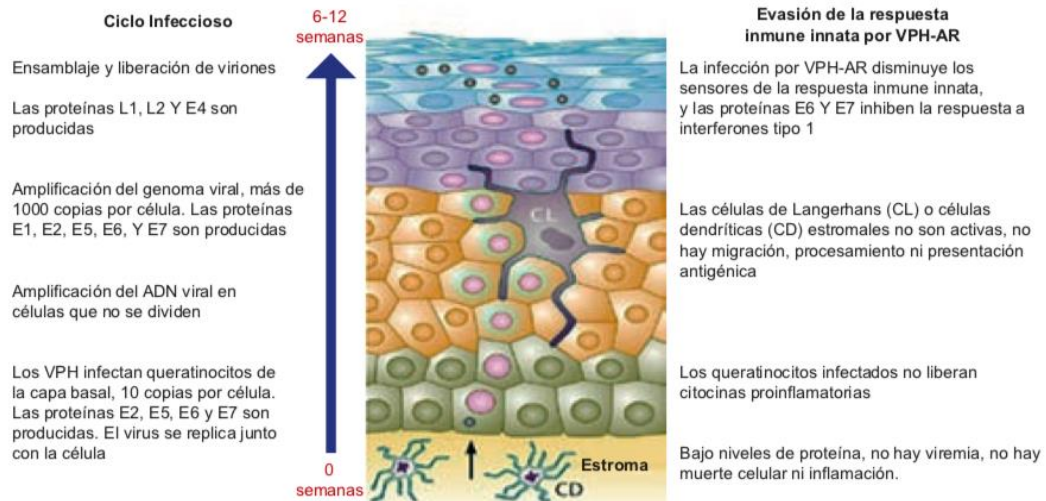


Figura 3. Ciclo infeccioso y evasión de la respuesta inmune innata por VPH-AR. Obtenido de (Mora-García & Monroy-García, 2015).

El ADN viral comienza a replicarse con la interacción de los factores de transcripción de la célula con la región LCR del virus y los genes virales (E6 y E7) son los primeros en transcribirse y su sobreexpresión es el principal factor para el desarrollo de lesiones. La proteína E6 se une con la proteína asociada a E6 (E6AP) la cual es una proteína celular que funge de ubiquitina ligasa. E6 aumenta la afinidad de E6AP por p53 favoreciendo la rápida degradación de p53 mediante ubiquitinización lo que lleva a inactivar las funciones de p53, entre ellas: regulación del ciclo celular mediante arresto en G1, moderar procesos de apoptosis e intervenir en la reparación del ADN, regular la expresión de ErbB2 y estimular genes supresores de tumores como Notch. Por otro lado, la proteína viral E7 se puede unir a la forma hipofosforilada de pRB. Esta unión rompe el complejo entre pRB y el factor de transcripción E2F-1, quedando libre E2F-1 y así este se une a promotores de genes necesarios para que la célula entre en fase S del ciclo celular y así comience su transcripción (Silva, y otros, 2013).



Después de la acción de E6 y E7 se da la transcripción de E5 que induce un aumento en la actividad de proteínas quinasas, principalmente receptores; consiguiendo un incremento de la respuesta celular para los factores de crecimiento y de diferenciación, lo que resulta en una proliferación continua y diferenciación retardada de la célula receptora. El siguiente acontecimiento es la transcripción de E1 y E2. Donde E1 actúa como helicasa separando las hebras de ADN y permitiendo la unión del complejo de replicación y E2 bloquea la transcripción de E6 y E7, dejando que E1 se una al origen de la replicación del virus. Todo esto inicia la replicación del ADN viral en forma extra-cromosomal, junto con la fase S del ciclo celular. Cuando se frena la transcripción de E6 y E7 por la acción de E2 las proteínas p53 y pRB pueden funcionar normal. Posteriormente las proteínas L1 y L2 de la cápside viral aparecen y forman el virión completo con la ayuda de la proteína E4, así mismo, E4 es capaz de inducir el colapso de la red de queratina de los queratinocitos, lo que favorecería la liberación de los viriones (Silva, y otros, 2013).

Ya que el VPH no presenta una fase lítica, por lo tanto, es liberado cuando las células terminales del estrato córneo sufren un proceso de descamación (Sanabria Negrín, 2009).

El proceso infeccioso y la replicación del ADN viral pueden suceder entre seis y doce semanas, en cambio, el desarrollo de lesiones malignas se puede dar en dos o más años (Mora-García & Monroy-García, 2015). En la figura 4 se resume el proceso de replicación del VPH en las células infectadas.



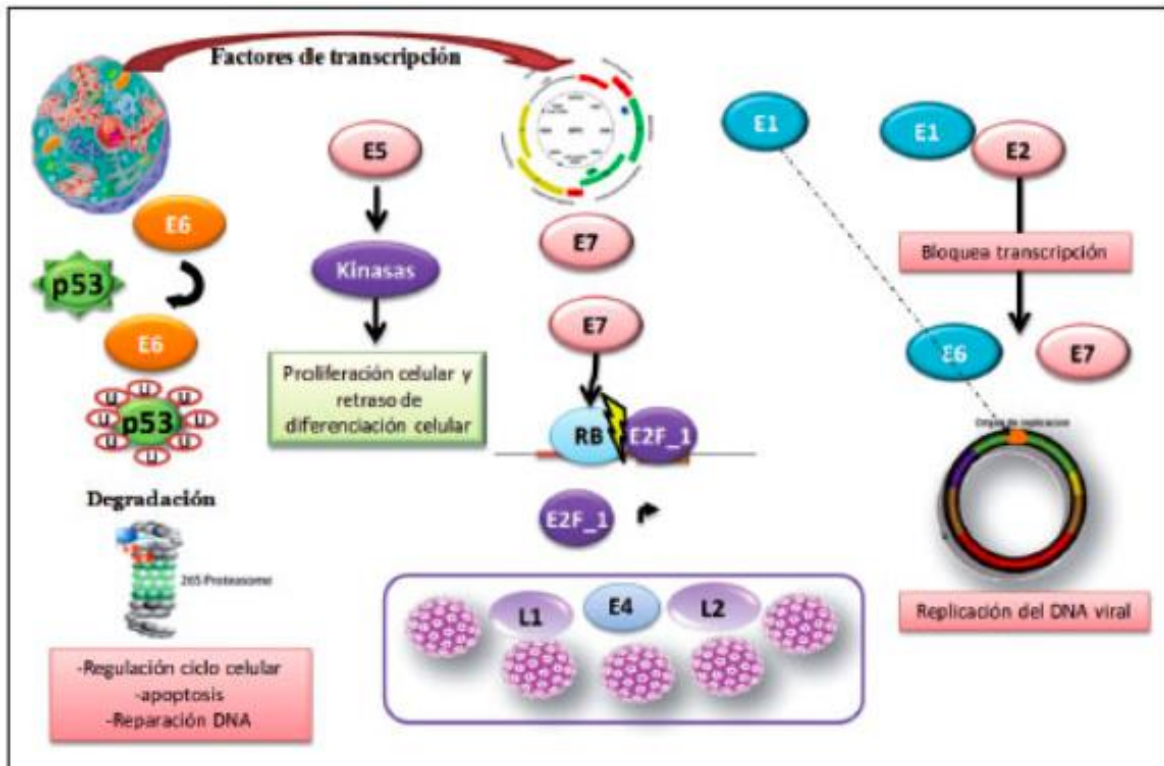


Figura 4. Función de las distintas proteínas virales del VPH al inicio de la replicación dentro de las células infectadas. E7 se une a la proteína del retinoblastoma dejando libre al factor de transcripción E2F-1, promoviendo la activación de genes que aumentan la proliferación celular. La oncoproteína E6 induce la ubiquinización y degradación de p53, disminuyendo la apoptosis mediada por p53. E2 regula la transcripción de las oncoproteínas E6 y E7. La proteína E5 aumenta la acción de las quinasas celulares promoviendo la proliferación y disminuyendo la diferenciación celular. E4 ayuda al ensamblaje de las proteínas de la cápside viral L1 y L2 para el empaquetamiento de los viriones de VPH. Obtenido de (Silva, y otros, 2013).

Otra característica crucial, asociada frecuentemente a los virus de alto riesgo (VPH-AR), es la integración del genoma viral al genoma celular, mientras que en los virus de bajo riesgo (VPH-BR) el genoma permanece episomal (Santos-López, Márquez-Domínguez, Reyes-Leyva, & Vallejo-Ruiz, 2015).

Los VPH-AR rompen el habitual estado circular, específicamente en la región que codifica a E2 e integrar su genoma a la célula hospedera. Al romper la secuencia que codifica para E2



se detiene la retroalimentación negativa que tiene sobre la transcripción de E6 y E7, favoreciendo su producción sin un elemento regulatorio, dando como resultado la inmortalización de la célula. De tal manera que la alta proliferación celular y ausencia de apoptosis comienzan a generar inestabilidad genómica de la célula lo que conlleva al desarrollo de cáncer (Silva, y otros, 2013).

El paso de una lesión de alto grado a cáncer invasivo se ha asociado a este tipo de integración. En más de la mitad de los casos de cáncer con infección VPH 16 y la mayoría con infección por VPH 18 se ha reportado que tienen integrado el genoma viral (Santos-López, Márquez-Domínguez, Reyes-Leyva, & Vallejo-Ruiz, 2015).

Además de la alta afinidad de las proteínas E6 y E7 por las proteínas p53 y pRB de la célula, ya que en los VPH-BR la tasa de integración de ADN es menor y la afinidad por las proteínas p53 y RB es baja. Tal es el caso de la proteína E7, donde un solo aminoácido marca la diferencia de afinidad de ésta con la proteína pRB (VPH-AR posee un ácido aspártico y VPH-BR una glicina) (Silva, y otros, 2013).

Epidemiología del VPH

El VPH es considerado como la enfermedad de transmisión sexual mas común en México.

Se estima que 7 de cada 10 mexicanos sexualmente activos son portadores de esta enfermedad, es tan común que casi todos los hombres y mujeres sexualmente activos lo contraerán a lo largo de su vida, donde 8 de cada 10 hombres y mujeres son portadores de la infección (IMVPH, 2018).



Se cree que 25% de las personas sexualmente activas se infectan por VPH genital a los 21 años de edad (Ochoa-Carrillo, 2014).

La OMS en 2017 estimó la prevalencia a nivel mundial de VPH en mujeres y fue de 11.7%, aunado a esto América Latina y Caribe presentaron 16.1% de prevalencia, la segunda más alta del mundo después de África Sub-Sahariana (24%). En hombres la prevalencia es alta alrededor de todo el mundo (21%) y el pico suele ocurrir un poco más tarde que en las mujeres. La prevalencia de cualquier tipo de VPH en el pene es del 18.7%; en el escroto del 13.1%; y del 7.9% en la región del perineo. Los hombres que hayan tenido mínimo tres parejas sexuales en la vida tienen 4.5 veces más probabilidad de infectarse por cualquier tipo de VPH que aquellos que han tenido menos parejas sexuales (OPS, 2020).

Infección por VPH

La probabilidad de infección aumenta al comienzo de la vida sexual, donde la más alta prevalencia se observa en mujeres menores de 25 años, luego esta decrece rápidamente.

Las infecciones por VPH son transitorias, pero diversos factores incrementan su persistencia: ya sean genéticos, o adquiridos como la edad, la inmunodepresión, anticonceptivos orales, el tabaquismo, y factores virales (genotipo, variantes, carga viral, integración), (Sanabria Negrín, 2009).

Las infecciones por VPH son muy frecuentes, siendo principalmente asintomáticas, y sólo un pequeño grupo de estas infecciones llega a presentar una manifestación clínica. Tras un periodo de tiempo prolongado la mayoría de la infecciones se solucionan de forma natural, pero algunas llegan a persistir, y sólo un grupo pequeño, después de 12 meses, logra



progresar a lesiones clínicas. Por ende, las infecciones que persisten 12 o más meses pueden evolucionar hacia una presentación clínica y las que presentan persistencia de infección con virus de alto riesgo están en mayor riesgo de desarrollar cáncer (Ojeda F, 2010).

Sin embargo, la infección por VPH en el hombre por muchos años ha sido considerada como un problema menor y de escasa relevancia catalogándolo como el vector silencioso por lo que la prevalencia de la infección en el hombre puede variar de un estudio a otro, dependiendo de las técnicas de detección realizada, la zona anatómica de toma de muestra, tipo de muestra y población estudiada (**tabla 2**) (Silva, y otros, 2013).

Pais	Población de estudio	Tipo de muestra	Método detección de VPH	Frecuencia
Chile	Estudiantes universitarios	Células exfoliativas del cuerpo del pene y surco coronal	RPC, reverse line blot	84%
México	Estudiantes universitarios	Orina	RPC	50%
México	Jóvenes militares	Células exfoliativas del cuerpo del pene, surco coronal, glande y escroto	RPC	48-61,9%
Brasil	Estudiantes universitarios y población general	Células exfoliativas del surco coronal, glande y escroto	RPC	72,3%
Estados Unidos de América	Estudiantes universitarios	Células exfoliativas del cuerpo del pene, glande, escroto y orina	RPC	26%
Estados Unidos de América	Jóvenes militares	Células exfoliativas del surco coronal, glande y escroto	RPC	61,3%
Finlandia	Jóvenes militares	Células exfoliativas del pene	RPC	9,1%
Suecia	Jóvenes militares	Orina	RPC	12%

Tabla 2. Frecuencias de infección por VPH en hombres en diversos estudios de acuerdo al país, población, tipo de muestra utilizada y metodología de detección de VPH. Obtenido de (Silva, y otros, 2013).

Sin embargo, la mayoría de los estudios en hombres encontraron prevalencias tan altas como las reportadas en estudios en mujeres. En un estudio se muestra una prevalencia del VPH en los hombres tan alta como 72.9% y generalmente alrededor del 20%, según la población de estudio y el tipo y número de sitios anatómicos evaluados (Dunne, Nielson, Stone, Markowitz, & Giuliano, 2006).



Infección Simple y Múltiple

Las infecciones múltiples son aquellas en las que un mismo individuo cuenta con varios genotipos de VPH simultáneamente, se ha observado con más frecuencia entre mujeres jóvenes y entre aquellas con anomalías citológicas o una respuesta inmune deteriorada (Pista, Oliveira, Verdasca, & Ribeiro, 2011). En cambio, las infecciones simples presentan un solo genotipo de VPH infectando al individuo.

Infección con Virus de Alto y Bajo Riesgo

Los genotipos del VPH que afectan las mucosas, por lo regular se transmiten por vía sexual y se pueden subdividir en infecciones con VPH de alto y bajo riesgo. Las infecciones con VPH-AR se conocen por ser oncógenos y se asocian con cáncer cervicouterino, vulvar, vaginal, pene, ano y con otros tumores orofaríngeos (Ochoa-Carrillo, 2014), pueden producir cambios celulares llamados precánceres cuando permanece e infecta las células de la vulva, la vagina, el pene o el ano. Estos cambios podrán derivar en cáncer si no se detectan y eliminan en forma oportuna (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, 2020).

Las infecciones con VPH-BR son no oncogénicas y se asocian con el condiloma acuminado, la neoplasia intraepitelial de bajo grado y las infecciones asintomáticas.

La mayoría de las personas infectadas por el VPH no son conscientes de la infección, puesto que el sistema inmune elimina de forma natural la infección en un periodo de dos años.

Esto ocurre tanto con los tipos de virus oncogénico como no oncogénico (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, 2020).



Manifestaciones clínicas

La forma clínica de la infección genital por el VPH es variable y puede ir desde estados asintomáticos con resolución espontánea hasta la presentación de procesos cancerígenos.

Entre las manifestaciones clínicas comunes destacan los condilomas acuminados, (verrugas genitales o anogenitales), las cuales son lesiones proliferativas benignas, generalmente múltiples, de color rosado o blanco-grisáceo, a veces pigmentadas, en cuya superficie se aprecian proyecciones filiformes o papilomatosas. Generalmente son lesiones exofíticas, sésiles o pediculadas, pero pueden ser aplanadas. Habitualmente se localizan en la región anogenital, en zonas de mayor traumatismo durante el acto sexual. Pueden aparecer también en pubis, regiones inguinales, perineales y perianales e incluso en el canal anal, meato uretral, vagina, cérvix y cavidad oral.

Los condilomas perianales son especialmente comunes en hombres que tienen sexo con hombres, y cerca de dos tercios de los pacientes con verrugas perianales tienen también verrugas intraanales. Habitualmente estas lesiones son asintomáticas, aunque si son de gran tamaño y numerosas pueden causar prurito, exudación y ocasionalmente sangrado. (Sendagorta-Cudós, Burgos-Cibrián, & Rodríguez-Iglesias, 2019).

Este tipo de lesiones afectan principalmente a adultos jóvenes (de 20 a 40 años), teniendo un mayor riesgo los pacientes inmunodeprimidos y las personas con múltiples contactos sexuales **(figura 5)**.





Figura 5. Condilomas acuminados en el cuerpo del pene. Obtenido de: Kasper D, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson J, Loscalzo J. Harrison. (2016) *Principios de Medicina Interna*, 19e.

Una de las manifestaciones más importantes por el VPH son las lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (LEIAG) (**figura 6**). Estas son lesiones proliferativas malignas, consideradas precursores directos de gran cantidad de carcinomas escamosos. Ubicadas principalmente en cuello de útero y ano, aunque también se pueden encontrar en vulva, pene, periné y cavidad oral. Estas lesiones requieren el uso de microscopios y tinciones específicas (aplicación de ácido acético y lugol) para su correcto diagnóstico. Son totalmente asintomáticas y afectan principalmente a adultos de mediana edad (30-50 años), teniendo un riesgo mucho mayor pacientes con infección por VIH u otros pacientes inmunodeprimidos. La adquisición es también por contacto sexual. Estas lesiones están producidas principalmente por los genotipos VPH oncogénicos como el 16, 18, 31, 33 y 35 (Sendagorta-Cudós, Burgos-Cibrián, & Rodríguez-Iglesias, 2019).



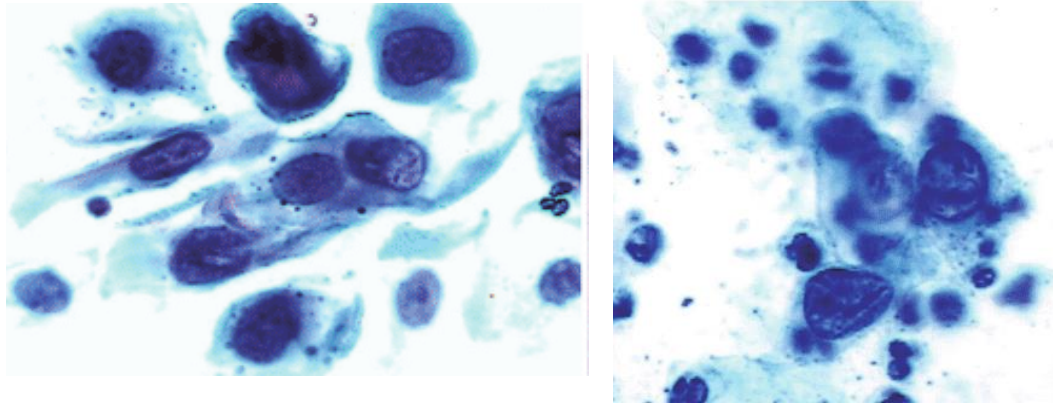


Figura 6. Lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado a 40x. Obtenido de: Moya Salazar, Jeel & Rojas-Zumaran, Víctor. (2016). *Patología Revista Latinoamericana*. 54. 66-75.

Existen otras manifestaciones que son extragenitales y cuya adquisición no es por contacto sexual. Las verrugas cutáneas, entre ellas las verrugas vulgares, plantares y planas, son unas de las lesiones más frecuentes. Son lesiones epiteliales benignas, circunscritas, pequeñas, que pueden asentar en cualquier parte de la superficie cutánea, aunque predominan en las manos, en las plantas de los pies o en la cara y cuello. Con mayor frecuencia afectan a niños pequeños y adultos jóvenes, y se transmiten por contacto. Generalmente son lesiones asintomáticas y los genotipos de implicados son principalmente el 1, 2, 3 y 4 (**figura 7**).



Figura 7. Verrugas vulgares múltiples. Obtenido de: Revenga Arranz, F., Patricio Rubio, J.F. (2001). *Las verrugas. Medicina Integral*. 37(9), 395-403.



Otra manifestación más infrecuente y no relacionada con el contacto sexual es la papilomatosis respiratoria recurrente. Entidad propia de niños pequeños consistente en lesiones exofíticas en la tráquea y vía respiratoria, que pueden originar alteración del llanto y estridor (**figura 8**). La transmisión es horizontal en el momento del parto, los genotipos más implicados son el 6 y 11 (Sendagorta-Cudós, Burgos-Cibrián, & Rodríguez-Iglesias, 2019).



Figura 8. Imagen endoscópica de lesiones papilomatosas laríngeas de aspecto verrugosas, blanco-rosadas, semejantes a “frambuesas”. Obtenido de: Cuestas G, Rodríguez V, Doormann F, et al. (2018). Papilomatosis laríngea: una causa poco frecuente de disfonía en el niño. Serie de casos. *Arch Argent Pediatr.* 116(3), 471-475.

Finalmente, la epidermodisplasia verruciforme es una genodermatosis autosómica recesiva, causada por la infección crónica por el VPH, reconocida por la aparición de múltiples lesiones verrugosas, constantemente en torso y brazos, y de aspecto similar a la pitiriasis versicolor, en la primera década de vida, en un tercio de los casos degenera a carcinomas escamosos invasivos (**figura 9**). Los genotipos con mayor riesgo de malignización son el 5 y el 8 (Sendagorta-Cudós, Burgos-Cibrián, & Rodríguez-Iglesias, 2019).





Figura 9. Epidermodisplasia verruciforme: lesiones tipo pitiriasis versicolor. Obtenido de: Castillo J, Vargas F, Arenas R, et al.(2009) Epidermodisplasia verruciforme. Caso asociado con virus de bajo potencial oncogénico (VPH-11). *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica.* 7(4), 253-257.

Diagnóstico

La detección de la infección por VPH puede realizarse mediante distintos métodos:

1. Diagnóstico morfológico. Identificación morfológica de las alteraciones citopáticas producidas por el virus VPH en las células escamosas, las cuales son observables tanto en el examen citológico como histológico.
2. Detección de proteínas del VPH (método inmunohistoquímico).
3. Detección de secuencias genómicas del VPH (técnicas de biología molecular) (Castaño Ignacio & Hurtado Estrada, 2012).

El VPH no se pueden cultivar *in vitro*; por lo tanto su detección depende estrictamente de análisis moleculares de la secuencia de ADN del virus. Esencialmente hay tres tipos de métodos de hibridación de ácidos nucleicos para detectar el VPH: las sondas directas de ácidos nucleicos (Southern Blot), métodos de amplificación de blanco (PCR) y la



amplificación de la señal de hibridación (Captura de híbridos) (De la Fuente-Villarreal, Guzmán-López, Barboza-Quintana, & González-Ramírez, 2010).

En la hibridación *in situ* se aplican sondas complementarias marcadas con sustancias radiactivas o con colorantes que permitan la visualización sobre un corte del tejido problema o sobre una extensión citológica, la diferencia con las demás técnicas es la detección del VPH en células sin necesidad de extraer el ADN (Castaño Ignacio & Hurtado Estrada, 2012).

Southern blot consiste en tratar el ADN con enzimas de restricción, seguido de la separación de los fragmentos mediante electroforesis en un gel de agarosa quedando separados según su tamaño. Después el gel se trata para desnaturalizar el ADN que se transfiere a un filtro de nitrocelulosa o nylon mediante un sistema de vacío, sobre el que se fija con luz ultravioleta ("crosslinker" o calor, una vez tratado el ADN tiene cargas negativas) y por último se expone la membrana a sondas complementarias (hibridación) de la cadena que se está buscando marcadas radioactivamente o con digoxigenina-biotina, quedando así las sondas fijadas al fragmento de ADN del que son complementarias lo que confirma que el ADN de la banda correspondiente es efectivamente el que se busca (García Rojo & Morillo Castro, 1999).

Las técnicas moleculares como PCR, permite detectar la presencia del VPH en células infectadas aún antes del inicio de síntomas, con la ventaja de detectar a partir de pocas copias del virus (alrededor de 10-30 copias) en comparación de otras metodologías y es útil en el diagnóstico de casos reportados como indeterminados por métodos citológicos/



histopatológicos. Esta técnica permite manejar diversas muestras tales como raspado endocervical, orina o raspado uretral en individuos masculinos (Castillo Díaz & García, 2004).

En la captura de híbridos se utilizan sondas de ARN capaces de detectar varios tipos de VPH. Cuando la muestra presenta infección vírica se produce un híbrido ARN-ADN que es capturado por un anticuerpo específico contra híbridos y detectado mediante una reacción tipo ELISA que utiliza un compuesto quimioluminiscente para revelar la reacción y que proporciona incluso información sobre la cantidad de ADN viral presente en la muestra, que parece tener relación con la presencia de lesiones de alto grado (Castaño Ignacio & Hurtado Estrada, 2012).

La captura de híbridos es un método altamente específico para el diagnóstico de infección por VPH antes de que genere lesiones, tanto de alto como de bajo riesgo, además se utiliza como método de control en estudios de vacunas contra la infección del VPH (De la Fuente-Villarreal, Guzmán-López, Barboza-Quintana, & González-Ramírez, 2010) (**figura 10**).



Figura 10. Representación de la captura de híbridos. Obtenido de: Cavazza M, Correnti M. (2004) *Pruebas moleculares para la detección del virus papiloma humano. Desafíos y posibilidades. Dermatología Venezolana. 42(3), 6-10.*

En la tabla 3 se resumen algunos ensayos comerciales utilizados para identificar al VPH.

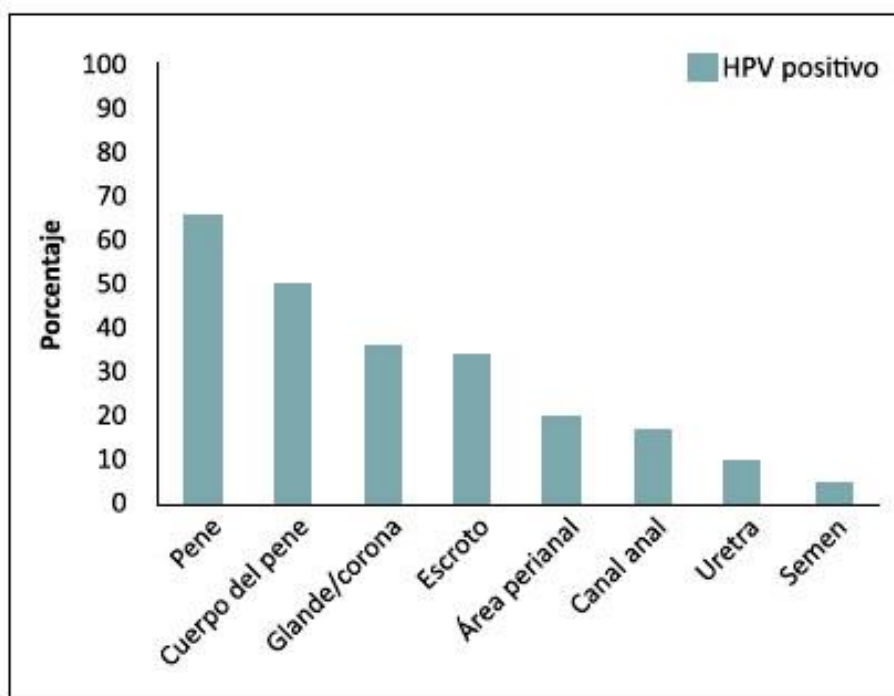


Nombre del ensayo	Diana y gen de VPH detectado	Resultado genérico o específico	Método	Control interno	Tipo de ensayo
Abbot RealTime (Abbott Molecular)	ADN (L1)	Específico 16 y 18 y genérico, otros 12 genotipos de alto riesgo	PCR en tiempo real	β globina	Amplificación directa de la diana y detección semicuantificada
Anyplex II HPV HR (Seegene)	ADN (L1)	Específico (14 genotipos de alto riesgo)	PCR en tiempo real multiplex	β globina	Amplificación directa de la diana y detección semicuantificada
Anyplex II HPV 28 (Seegene)	ADN (L1)	Específico (28 genotipos de alto y bajo riesgo)	PCR en tiempo real multiplex	β globina	Amplificación directa de la diana y detección semicuantificada
Aptima HPV (Hologic)	ARN (E6/E7)	Genérico (14 tipos)	Amplificación mediada por ARN polimerasa (TMA)	No	Amplificación directa de la diana
BD Onclarity HPV (BD)	ADN (E6/E7)	Específico 6, 18, 31, 45, 51 y 52 y genérico otros 8 genotipos de alto riesgo	PCR en tiempo real	β globina	Amplificación directa de la diana
Cervista HPV HR (Hologic)	ADN (L1/E6/E7)	Genérico (14 tipos)	Amplificación de señal por sondas Invader	Histona-2	Amplificación de la señal
CLART-4S (Genomica)	ADN (L1)	Específico (14 genotipos de alto riesgo y 2 de bajo riesgo)	PCR convencional + microarray	CFTR	Amplificación directa de la diana + hibridación en microarray
Cobas HPV (Roche)	ADN (L1)	Específico 16 y 18 y genérico otros 12 genotipos de alto riesgo	PCR en tiempo real	β globina	Amplificación directa de la diana
Digene HC2 (Qiagen)	ADN (L1)	Genérico (13 tipos)	Hibridación con sondas AN y señal basada en anticuerpos antihíbrido	No	Amplificación de la señal
Linear Array HPV (Roche)	ADN (L1)	Específico (37 genotipos de alto riesgo)	PCR + hibridación reversa en tira de nitrocelulosa	β globina	Amplificación directa de la diana + hibridación en tira

Tabla 3. Descripción de algunos ensayos comercializados para la detección de VPH. Obtenido de (Sendagorta-Cudós, Burgos-Cibrián, & Rodríguez-Iglesias, 2019).



Cabe destacar que es muy importante el sitio anatómico para la obtención de la muestra en la detección de VPH en el hombre, puesto que existe una gran variabilidad en la incidencia dependiendo del sitio anatómico de obtención de la muestra, tal como se muestra en la siguiente gráfica.



Gráfica 1. Prevalencia de infección por VPH en varios tipos de muestras del aparato reproductor masculino. Obtenido de (Silva, y otros, 2013).

Las muestras que presentan menor positividad para la detección de VPH son de uretra y semen. Las muestras más frecuentes se obtienen mediante la frotación y rotación de torundas humedecidas en el glande, corona y surco coronal, prepucio (zona interna y externa), eje del pene, uretra, escroto y ano.

De igual manera, han sido ampliamente estudiadas las muestras en orina por sus ventajas como método de muestreo no invasivo y el mismo paciente puede tomar la muestra; sin



embargo, los resultados no han sido totalmente satisfactorios ya que que las concentraciones de ADN no siempre son constantes durante la micción. Además, se han realizado estudios de VPH en semen, por las repercusiones que este podría tener sobre la funcionalidad, la concentración, movilidad y viabilidad de los espermatozoides (Silva, y otros, 2013).

Tratamiento

El tratamiento de la infección por VPH en hombres puede encaminarse desde el punto de vista médico y/o quirúrgico como se describe en la tabla 4.

In situ	Sistémico	Quirúrgico
Alfa interferón	Alfa interferón	Convencional
Podofilino/p.pilotoxina		Crioterapia
Ac. Tricloroacético		B. eléctrico
5-fluoruracilo		Láser CO2
Imiquimod		Láser nd:yag

Tabla 4. Alternativas terapéuticas de la infección de VPH en hombres. Obtenido de (Gómez García, Gómez Mampaso, Conde Someso, Maganto Pavón, & Navío Niño, 2005).

El tratamiento médico se ha realizado con podofilina, ácido tricloroacético, 5-fluouracilo e interferón alfa tanto local como sistémico. La terapia con cremas o soluciones de podofilina (0.15% ó 0.5%) ha sido hasta el momento el tratamiento de elección, sin embargo, se ha llegado a mencionar que es caro, insatisfactorio y doloroso.



Una reciente adición, el imiquimod, es un inmunomodulador que estimula la producción de citocinas, el cual parece ser un fármaco prometedor en el tratamiento de los condilomas, pero no está libre de efectos secundarios, como eritema, ardor y prurito en casi la mitad de los pacientes. En cambio, el tratamiento quirúrgico de los condilomas a través de cirugía convencional, electroterapia, crioterapia o últimamente con exéresis láser proporciona buenos resultados, con mayor eficacia terapéutica que los tratamientos médicos (Gómez García, Gómez Mampaso, Conde Someso, Maganto Pavón, & Navío Niño, 2005).

Así mismo la vacunación profiláctica ayuda al evitar la infección persistente y constituye la mejor estrategia preventiva frente a las neoplasias y verrugas anogenitales.

Actualmente la vacuna Gardasil-9 está aprobada por la FDA para su uso en mujeres y varones. Indicado en niños y hombres de 9 a 45 años para la prevención de las siguientes enfermedades:

- Cánceres de ano, orofaringe y otros cánceres de cabeza y cuello causados por los tipos de VPH 16, 18, 31, 33, 45, 52 y 58.
- Verrugas genitales (condiloma acuminado) causadas por los tipos 6 y 11 del VPH.
- Y las siguientes lesiones precancerosas o displásicas causadas por los tipos de VPH 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 y 58: Neoplasia intraepitelial anal grados 1, 2 y 3 (Food and Drug Administration, 2020).



Estrés Oxidativo

Definición

El estrés oxidativo (EO) es un desequilibrio entre los mecanismos prooxidantes y mecanismos antioxidantes de los organismos, los cuales involucran sistemas enzimáticos y moléculas orgánicas diversas (Mallok, Flores-Sanchez, Alonso-Rodriguez, & Martínez-Sánchez, 2011).

El EO ocurre cuando la generación de especies oxidantes (principalmente especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN), conocidas colectivamente como ERON) exceden las capacidades de neutralización/eliminación celular (De Marco, 2013).

Especies Reactivas de Oxígeno

Las ERO son producidas por el metabolismo de la respiración mitocondrial las cuales son normalmente neutralizadas por mecanismos de defensa antioxidantes, pero cuando la producción de radicales libres predomina sobre la defensa antioxidante enzimática y no enzimática se obtiene como resultado el estrés oxidativo (Hamzyan Olia, Khadem Ansari, Yaghmaei, Ayatollahi, & Reza Khalkhali, 2017).

En las células aeróbicas se generan constantemente las ERO por la reducción incompleta de O₂ molecular a H₂O durante la fosforilación oxidativa mitocondrial, así como durante las oxidaciones microsomales y peroxisómicas. Así mismo, las ERON también se producen a través de procesos como inflamación, infecciones y reacciones inmunes, tensiones mecánicas y químicas (p. Ej., lones metálicos transitorios), biotransformación química, exposición a rayos UV e irradiación ionizante (De Marco, 2013).



Entre las ERO se encuentran los iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos, tanto inorgánicos como orgánicos. Todos los seres vivos que utilizan el oxígeno para obtener energía liberan ERO. Las células poseen mecanismos de defensa denominados genéricamente como antioxidantes (Vicenta Paparella, Pavesi, Feldman, & Bouvet, 2015).

Causas de Estrés Oxidativo en los Espermatozoides

El espermatozoide fue una de las primeras células en la cual se demostró la generación de ERO. Estas cumplen una importante función en la fisiología espermática normal; la actividad redox de los espermatozoides, es mediada por el AMPc y la fosforilación de la tirosina, eventos bioquímicos que están asociados con la capacitación espermática. Pero el desequilibrio entre la producción y degradación de ERO causa efectos negativos sobre el espermatozoide. El EO causado por el H_2O_2 provoca un mal funcionamiento en la mitocondria y conduce a apoptosis a través la degradación enzimática del ADN por acción de las caspasas. La interrupción de la cadena mitocondrial de transporte de electrones, o la inhibición de esta, predispone a la formación de radicales libres (Mallok, Flores-Sanchez, Alonso-Rodriguez, & Martínez-Sánchez, 2011).

En el eyaculado, las principales fuentes de ERO son los leucocitos y las células espermáticas anormales. Los leucocitos pueden llegar a estar presentes en la muestra seminal y son considerados normales en cantidades debajo de $1 \times 10^6/mL$, un aumento podría indicar un proceso infeccioso. Los leucocitos, principalmente los activados, son capaces de producir por lo menos 100 veces más cantidad de ERO que las células germinales, generando un efecto negativo sobre las espermatogonias. Otra de las fuentes de ERO en el semen son los



espermatozoides, donde las mitocondrias son la principal fuente de energía y son contribuyentes importantes de ERO intracelulares.

Los niveles basales de ERO y el papel de las mitocondrias en el mantenimiento de éstos aún es desconocido en las células germinales masculinas. Así mismo las mutaciones mitocondriales afectan directamente su metabolismo, llegando a producir crisis energética en los espermatozoides, lo que aumenta su deterioro funcional (Mayorga Torres, Camargo, Cadavid, & Cardona Maya, 2015).

En espermatozoides humanos, el H_2O_2 genera una elevada fragmentación del ADN, aparte de reducir tanto su movilidad como capacidad de fusión con los ovocitos. La peroxidación lipídica o lipoperoxidación (PL) es un ejemplo de daño oxidante en membranas celulares, lipoproteínas y otras estructuras que contienen lípidos (Mallok, Flores-Sanchez, Alonso-Rodriguez, & Martínez-Sánchez, 2011). La PL consiste en el daño oxidativo sobre los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), los cuales en su estructura contiene dos dobles enlaces C-C especialmente susceptibles a la sustracción de un electrón por parte de las ERO (Vicenta Paparella, Pavesi, Feldman, & Bouvet, 2015).

Siendo así el espermatozoide vulnerable al daño peroxidativo de los radicales libres porque posee en su membrana plasmática un alto contenido de AGPI indispensables para mantener la fluidez necesaria en la fusión de membrana durante la fertilización (Mallok, Flores-Sanchez, Alonso-Rodriguez, & Martínez-Sánchez, 2011).

De igual manera la PL conduce a un aumento de la permeabilidad de las membranas celulares, y produce alteraciones definitivas en las propiedades funcionales de la célula que



pueden conducir a su lisis total. Por lo que los lipoperóxidos y sus productos de degradación como el malondialdehído (MDA) y los 4-hidroxi-alquenos (4-HA) son altamente tóxicos para las células sexuales masculinas y provocan daños irreversibles en la movilidad (Vicenta Paparella, Pavesi, Feldman, & Bouvet, 2015).

Además los factores ambientales como metales pesados, el humo del cigarro entre otros, inducen EO sistémico que coincide con una disminución de vitaminas antioxidantes en el plasma seminal y la inducción de daño al ADN en el espermatozoide (Mallok, Flores-Sanchez, Alonso-Rodriguez, & Martínez-Sánchez, 2011) (**figura 11**).

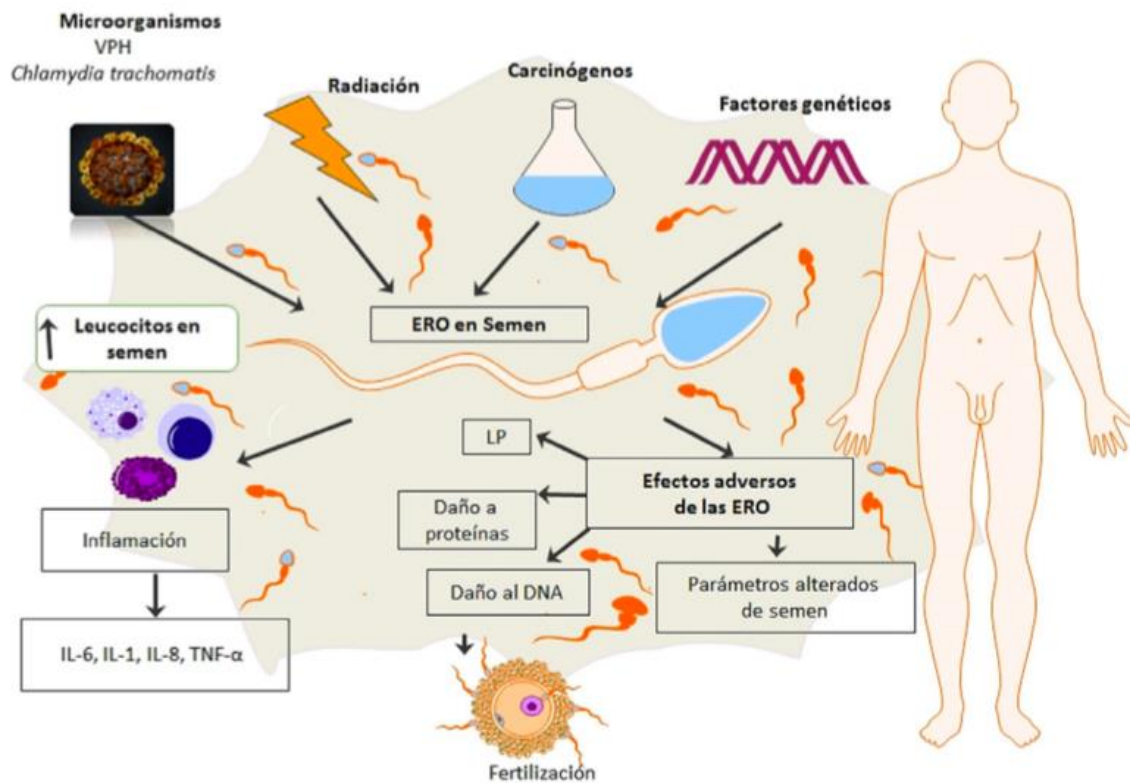


Figura 11. Etiología multifactorial en la infertilidad masculina. Se muestran las causas de la infertilidad como infecciones de transmisión sexual (VPH y Chlamydia trachomatis), causas ambientales (radiación), estilo de vida inadecuados (carcinógenos), factores genéticos, así como las reacciones inflamatorias (citocinas proinflamatorias, como son la IL-6, IL-1 β , IL-8, TNF- α) y las ERO's. Obtenido de: (Pérez Soto, Sánchez Monroy, Domingo Vázquez, & Oros Pantoja, 2019)



Infertilidad

Definición

La infertilidad es una enfermedad del sistema reproductivo masculino o femenino definida por la imposibilidad de lograr un embarazo después de 12 meses o más de relaciones sexuales regulares sin protección (OMS, 2020).

Epidemiología

Según el Instituto Nacional de Estadística y Geografía en México, entre 4 y 5 millones de parejas sufren problemas de fertilidad y cada año se suman más (AMMR, 2018).

Sin embargo se estima que mundialmente entre 48 millones de parejas y 186 millones de personas viven con infertilidad (OMS, 2020).

Causas de Infertilidad

En el sistema reproductor masculino, la infertilidad puede ser causada por:

- Obstrucción del tracto reproductivo provocando disfunciones en la eyección del semen. Tal bloqueo puede ocurrir en los conductos eyaculadores y vesículas seminales (transportan el semen, estos bloqueos se deben comúnmente a lesiones o infecciones del tracto genital).
- Trastornos hormonales que conducen a anomalías en las hormonas producidas por la glándula pituitaria, el hipotálamo y los testículos. Hormonas como la testosterona regulan la producción de esperma. El cáncer de hipófisis o testículos son uno de los ejemplos de trastornos que provocan desequilibrios hormonales.



- La presencia de varicocele o tratamientos médicos que lleguen a deteriorar células productoras de esperma (quimioterapia), conllevan a fallos testiculares para producir espermatozoides
- Las condiciones o situaciones que provocan anomalías en la forma (morfología) y el movimiento (motilidad) de los espermatozoides afectan negativamente a la fertilidad. Como el uso de esteroides anabólicos puede causar parámetros anormales en el semen, como recuento y forma de los espermatozoides.
- Factores ambientales y estilos de vida como el tabaquismo, la ingesta excesiva de alcohol y la obesidad pueden afectar la fertilidad.
- Exposición a contaminantes y toxinas ambientales puede ser directamente tóxica para los gametos (óvulos y espermatozoides), lo que resulta en una disminución de su número y mala calidad, lo que conduce a la infertilidad (OMS, 2020).
- Así mismo, el estrés oxidativo en espermatozoides es uno de los mayores causantes de infertilidad masculina de origen desconocido (AMMR, 2018).

Gen CYP2E1

El gen CYP2E1 codifica un miembro de la superfamilia de enzimas del citocromo P450. Las proteínas del citocromo P450 son monooxigenasas que catalizan reacciones implicadas en el metabolismo de fármacos y la síntesis de colesterol, esteroides y otros lípidos (GeneCards, 2008).

CYP2E1 es el único gen de la subfamilia CYP2E ubicado en el cromosoma 10 y expresado altamente en el hígado y dentro de la mitocondria (así como en el retículo endoplásmico),



con niveles de expresión más bajos en cerebro, mucosa nasal, corteza renal, testículo, ovario, tracto gastrointestinal y en niveles un poco más altos en el tejido cardíaco (Arbitrio, y otros, 2021).

Función del gen CYP2E1

Es una monooxigenasa del citocromo P450 implicada en el metabolismo de los ácidos grasos, mecánicamente, utiliza oxígeno molecular insertando un átomo de oxígeno en un sustrato y reduciendo el segundo en una molécula de agua, con dos electrones proporcionados por NADPH a través de la citocromo P450 reductasa (NADPH - hemoproteína reductasa).

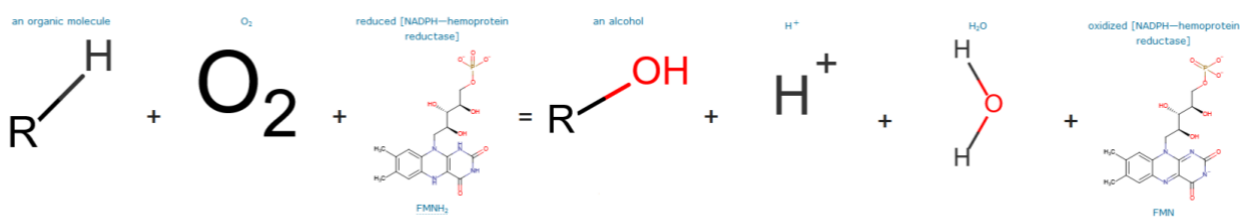


Figura 12. Mecanismo de acción de CYP2E1. Obtenido de: (GeneCards, 2008).

Cataliza la hidroxilación de enlaces carbono-hidrógeno. Hidroxila los ácidos grasos específicamente en la posición omega-1 que muestra la mayor actividad catalítica para los ácidos grasos saturados. (GeneCards, 2008).

La enzima CYP2E1 es inducible por acetona, etanol e isoniazida, así como por varias hormonas mediante mecanismos complejos que implican efectos transcripcionales, traslacionales y postraduccionales, mientras que el clometiazol, el dietilditiocarbamato y el disulfiram son inhibidores. Además, es inducido en la diabetes, la obesidad, el ayuno, el



alcohol y la enfermedad hepática no alcohólica donde se ha reconocido que tiene un papel fisiopatológico. Los sustratos de CYP2E1 son moléculas de bajo peso molecular como etanol, acetona, halotano, clorzoxazona y acetaminofén. Los productos químicos industriales y los tóxicos ocupacionales y ambientales, así como los procarcinógenos, también son sustratos de CYP2E1 (Arbitrio, y otros, 2021).

Los sustratos endógenos de CYP2E1 son el ácido láurico y la acetona, un producto de la oxidación de los ácidos grasos, oxidado adicionalmente a acetol y luego a 1,2-propanodiol durante la gluconeogénesis. Aunque la enzima más importante para la oxidación del etanol a acetaldehído es la alcohol deshidrogenasa (ADH), CYP2E1 a elevadas concentraciones de etanol contribuye con la generación ERO, que conlleva al daño de las células hepáticas. Diversos estudios demostraron que CYP2E1 juega un papel causal en la enfermedad hepática alcohólica, la enfermedad del hígado graso no alcohólico y la esteatohepatitis no alcohólica probablemente a través del incremento de la lipoperoxidación hepática (Arbitrio, y otros, 2021).

Relación con Estrés Oxidativo

La enzima CYP2E1 es una de las enzimas CYP más estudiadas tanto en animales como en humanos, debido a su papel en el metabolismo del etanol y por su participación en la activación metabólica de una serie de procarcinógenos, además es importante en patología puesto que se ha descrito como una de las enzimas que produce mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno (Orellana B & Guajardo T, 2004).



CYP2E1 es capaz de generar especies reactivas de oxígeno, principalmente anión superóxido y peróxido de hidrógeno, en ausencia de un sustrato, y en presencia de catalizadores de hierro, produce potentes oxidantes como el radical hidroxilo, su sobreexpresión puede causar estrés oxidativo y lipoperoxidación en hepatocitos, aunque en algunos casos la inducción del CYP2E1 por sí sola conduce a estrés oxidativo (Valencia Olvera, Morán, Camacho Carranza, Próspero García, & Espinosa Aguirre, 2014).

Una producción sostenida de altos niveles de ERO puede conducir a la oxidación de los lípidos, las proteínas y el ADN, y la inducción de CYP2E1 está implicada en la oxidación de estas biomoléculas (Valencia Olvera, Morán, Camacho Carranza, Próspero García, & Espinosa Aguirre, 2014).

Por lo que el aumento de la capacidad de producir ERO se manifiesta en un aumento de la tasa de lipoperoxidación microsomal, ya sea por microsomas o liposomas enriquecidos en CYP2E1 (Caro & Cederbaum, 2004), conllevando eventualmente a estrés oxidativo.

Objetivo

Evaluar el nivel de expresión del CYP2E1 en muestras de semen de varones infértiles infectados con VPH a través de qPCR para evidenciar los efectos tóxicos generados por la infección.

Objetivos Específicos

- Analizar la expresión de CYP2E1 mediante qPCR con la finalidad de evidenciar el nivel de su expresión dependiendo del tipo de infección de VPH.



- Asociar los niveles de expresión de CYP2E1 producidos por infección simple, múltiple, de alto y bajo riesgo de VPH en comparación con varones no infectados.

Hipótesis

Habrá una mayor expresión de CYP2E1 en pacientes con genotipos de alto riesgo y con infecciones múltiples de VPH a diferencia de los pacientes con infección simple simple y de alto y bajo riesgo, lo que conducirá a mayores efectos tóxicos por VPH dependiente de genotipos.

Metodología de Investigación

Obtención de muestras biológicas

En este estudio se emplearon 31 muestras de semen de pacientes diagnosticados de infertilidad por el Departamento de Patología del Hospital Central Militar de la Ciudad de México.

- **Criterios de inclusión**

Hombres mexicanos con una edad entre 23-49 años, con diagnóstico de infertilidad, con o sin infección de VPH atendidos en el Hospital Central Militar de la Ciudad de México.

- **Criterios de exclusión**

Hombres fértiles

- **Criterios de eliminación**

Datos clínicos incompletos de los pacientes

Muestras de semen incompletas



Extracción de ARN en muestras de semen

Para la extracción de ARN se utilizó la técnica de (Chomczynski & Sacchi, 1987), tomando en cuenta el siguiente protocolo: Por cada 10 μL de muestra se adicionó 1000 μL de TRIzol™ Reagent (Thermo Fisher Scientific, EUA) en un tubo de microcentrifuga (Eppendorf™, Alemania) y se dejó incubar a una temperatura entre 15-30°C por 5 minutos.

Enseguida se agregó 200 μL de cloroformo por cada 1000 μL de TRIzol empleado y se agitó vigorosamente de manera manual por 15 segundos para volver a incubar a 15-30°C por 2-3 minutos. Se centrifugó a 11000 rpm por 15 minutos a una temperatura entre 2-8°C, una vez separada la fase acuosa, se transfirió a otro tubo limpio donde se adicionó 500 μL de isopropanol por cada 1000 μL de TRIzol usado y se incubó a 15-30°C por 10 minutos. Se volvió a centrifugar a 11000 rpm por 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 mL de etanol al 75% por cada 1000 μL de TRIzol, los lavados se hicieron por triplicado tomando en cuenta el siguiente proceso resuspender el pellet, centrifugar a 13000 rpm y eliminar el sobrenadante.

Finalmente se dejó secar el pellet por 5-10 minutos sin dejar secar por completo y se resuspendió en 50 μL de agua libre de ARNsas™ (QIAGEN, Alemania) y se incubó a 55-60°C durante 10 minutos, al término se cuantificó el material obtenido en un espectrofotómetro para microplacas Epoch™ (BioTek Instruments, EUA).

Purificación del ARN

Para evitar la contaminación de las muestras con ADN genómico se trataron con RQ1 RNase-Free DNase™ (Promega, EUA) de acuerdo al siguiente protocolo: Se preparó la mezcla de



reacción 8 μL ARN, 1 μL buffer, 1 μL ADNasa RQ1 para obtener un volumen final de 10 μL . Posteriormente se incubó a 37°C durante 15 minutos, al término se adicionó 1 μL de solución de paro (EDTA 2.5 mM pH=8) para terminar la reacción. Por último se incubó a 65°C por 10 minutos para inactivar la ADNasa RQ1.

Preparación de pools

Se trabajó un total de 31 muestras de ARN ya purificadas las cuales se cuantificaron en un espectrofotómetro para microplacas Epoch™ (BioTek Instruments, EUA) y se ajustaron a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ llevando las muestras a un volumen final de 20 μL con agua. Todas las muestras fueron previamente genotipificadas y se dividieron en 7 diferentes pools (infectados, no infectados, infección múltiple, infección simple, VPH de alto riesgo con genotipos 16, 31, y 52 y VPH de bajo riesgo con genotipo 6).

Síntesis de ADNc por RT-PCR

A partir del ARN de los pools obtenidos se realizó la síntesis de ADNc con el kit de Transcriptasa Inversa Super Script-II™ (Thermo Fisher Scientific, EUA) de acuerdo a las indicaciones del fabricante, se utilizó 1 ng de ARN purificado, 1 μL de primer (Oligo dT), 1 μL de dNTP mix 10mM y agua estéril hasta un volumen final de 12 μL .

La mezcla se colocó en el termociclador a 65°C por 5 minutos y se dejó enfriar en hielo, seguido se adicionó 4 μL de 5x First-Strand Buffer, 2 μL 0.1M DTT, 1 μL ARNsa OUT y 1 μL de Super Script II. Finalmente se incubó a 42°C por 50 minutos y se inactivó la reacción al calentar a 70°C por 15 minutos.



Estandarización del gen CYP2E1

Para la estandarización fue preciso la hidratación de los primers tanto forward como reverse a un volumen de 400 μL como se muestra a continuación:

$$\text{CYP2E1-F Concentración inicial } 24.8 \text{ nmol} \therefore \frac{(24.8 \text{ nmol})(1000)}{(400 \mu\text{L})} = 62 \mu\text{M}$$

$$\text{CYP2E1-R Concentración inicial } 35.5 \text{ nmol} \therefore \frac{(32.5 \text{ nmol})(1000)}{(400 \mu\text{L})} = 81.25 \mu\text{M}$$

Seguido se realizó la preparación de la solución stock a 10 μM , con la que se realizaron diluciones a diferentes concentraciones (0.5, 3 y 9 μM), tanto para el primer reverse como forward.

Se preparó un gradiente de concentraciones de ambos primers para encontrar la concentración que generara el mejor y mayor producto de amplificación (**tabla 5**)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	F 0.5 μM / R 0.5 μM	F 0.5 μM / R 3 μM	F 0.5 μM / R 9 μM	F 3 μM / R 0.5 μM	F 3 μM / R 3 μM	F 3 μM / R 9 μM	F 9 μM / R 0.5 μM	F 9 μM / R 3 μM	F 9 μM / R 9 μM
B	F 0.5 μM / R 0.5 μM	F 0.5 μM / R 3 μM	F 0.5 μM / R 9 μM	F 3 μM / R 0.5 μM	F 3 μM / R 3 μM	F 3 μM / R 9 μM	F 9 μM / R 0.5 μM	F 9 μM / R 3 μM	F 9 μM / R 9 μM

Tabla 5. Gradiente de concentración de primers para amplificación del gen CYP2E1.

En una gradilla de tubos de microcentrífuga (Eppendorf™, Alemania) a cada tubo se le adicionó 6.25 μL de Master Mix SYBR GREEN™ (Thermo Fischer Scientific, USA), 1.25 μL de primer forward, 1.25 μL de primer reverse y 1.75 μL de agua.

Finalmente a toda la hilera de A se agregó 2 μL de muestra (ADNc) y a toda la hilera B se agregó 2 μL de agua para tomarse como blanco.



PCR en tiempo real

El nivel de expresión del gen CYP2E1 se determinó a través de qPCR en el equipo Mx3000P qPCR System™ (Agilent, EUA), mediante el software MxPro qPCR (Agilent, EUA) utilizando como sistema de detección SYBR GREEN y el kit Master Mix SYBR GREEN™ (Thermo Fischer Scientific, USA), así como los primers correspondientes para el gen CYP2E1 el cual fue previamente estandarizado y el gen endógeno (Actina) el cual se usó para demostrar que su expresión no es alterada por la condición de las muestras. Las concentraciones de los primer empleados se muestran a continuación:

Gen	Primer Forward	Primer Reverse
CYP2E1	0.5 µM	3 µM
Actina	3 µM	3 µM

Tabla 6. Concentraciones de los primers estandarizados para q-PCR.

Los primers utilizados en este estudio fueron diseñados usando el programa Primer Express 3.0, las secuencias obtenidas se muestran a continuación:

Gen	Secuencia	Amplicón
CYP2E1	F: GGGAATGACACAGAGTTTGTAAACG R: CTGGCTCGCATGGAGTTGTT	150 pb
Actina	F: AAGATGAGATTGGCATGGCTTT R: CGGCCACATTGTGAACTTTG	150 pb

Tabla 7. Secuencias de primers para los genes CYP2E1 y Actina.

La reacción de amplificación se llevó a cabo por triplicado en placas ópticas y consistió en las condiciones de 95°C por 10 minutos, posteriormente 40 ciclos de 95°C por 15 segundos



para desnaturalizar el ADNc y 60°C por 1 minuto para el alineamiento de los primers y la elongación.

Finalizada la qPCR, las reacciones se sometieron a incrementos de temperatura de 60°C a 95°C para así obtener una curva de disociación de cada gen amplificado y de esta manera monitorear la cinética de disociación de los fragmentos amplificados; mediante esta curva se puede determinar la temperatura en la que el 50% del ADN está desnaturalizado (T_m , del inglés melting temperature) con la cual se puede distinguir entre la fluorescencia correspondiente a un producto de amplificación de PCR y la fluorescencia dada por la formación de dímeros de los oligonucleótidos.

Los cambios de expresión relativa del gen CYP2E1 respecto a la actina fue determinada mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Los cambios de expresión entre los grupos infectados y no infectados se evaluaron con la prueba de t de student para muestras independientes y los cambios de expresión entre grupos se analizaron con una ANOVA, utilizando el programa SPSS versión 23.

La siguiente figura resume la metodología realizada en este trabajo:



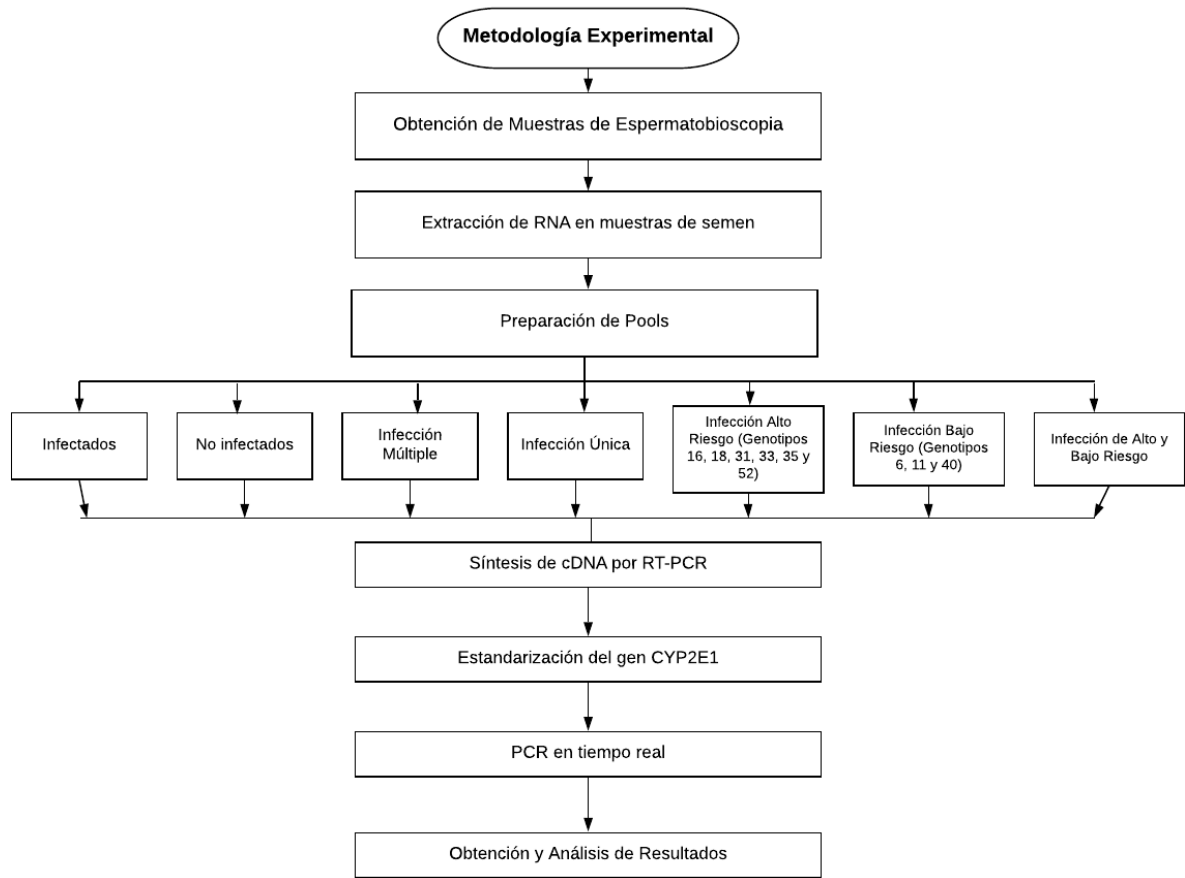


Figura 13. Metodología Experimental realizada en el presente trabajo.

Resultados

De las 31 muestras de varones infértiles empleadas se determinó que el 39% (12/31) dieron positivo para VPH.

Infección de VPH	Pacientes infértiles n=31	
	n	%
VPH +	12	39%
VPH -	19	61%

Tabla 8. Detección de infección de VPH en muestras de semen de varones infértiles.

A las muestras de los pacientes que resultaron positivas a VPH se les realizó genotipificación para conocer la frecuencia de los genotipos presentes en las muestras y se organizaron en



subgrupos dependiendo de su capacidad oncogénica (VPH-AR, VPH-BR, VPH-AR/BR) y de si la infección es simple o múltiple (VPH-IS, VPH-IM).

No. de muestra de paciente infértil VPH+	Genotipos	Clasificación
1	52	IS, AR
2	52	IS, AR
4	52	IS, AR
8	52	IS, AR
13	52,6	AR/BR, IM
20	52,6	AR/BR, IM
21	6	IS, BR
22	52	IS, AR
23	6	IS, BR
24	52,6	AR/BR, IM
30	52,31,16	IM, AR
31	52,31,16	IM, AR

Tabla 9. Genotipos identificados en los pacientes VPH+ y su clasificación.

De los 12 pacientes VPH+ se determinó que 42% (5/12) presentaban el genotipo 6 considerado de bajo riesgo, mientras que 83% (10/12) presentaba el genotipo 52 considerado de alto riesgo. Específicamente, de estas 10 muestras de alto riesgo, 3 presentaban infección múltiple con el genotipo 6 (3/10) y 2 presentaban infección múltiple con los genotipos 31 y 16 también de alto riesgo (2/10). En cambio, únicamente 2 muestras de las 12 totales presentaron infección simple de bajo riesgo con el genotipo 6 (2/12).

La estandarización de la qPCR se logró pudiendo observar un producto del tamaño esperado como lo muestra la **imagen 1**.



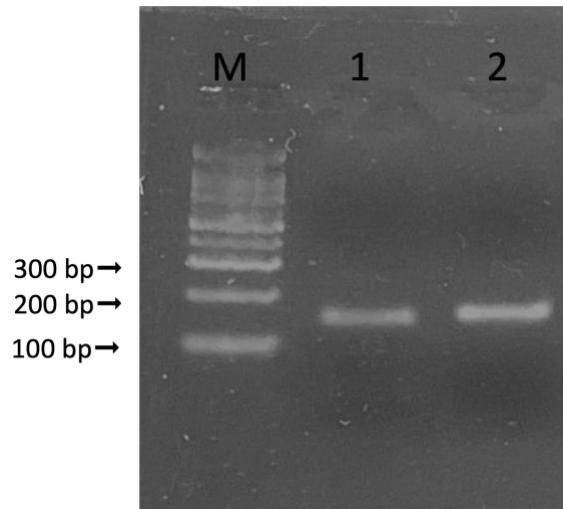
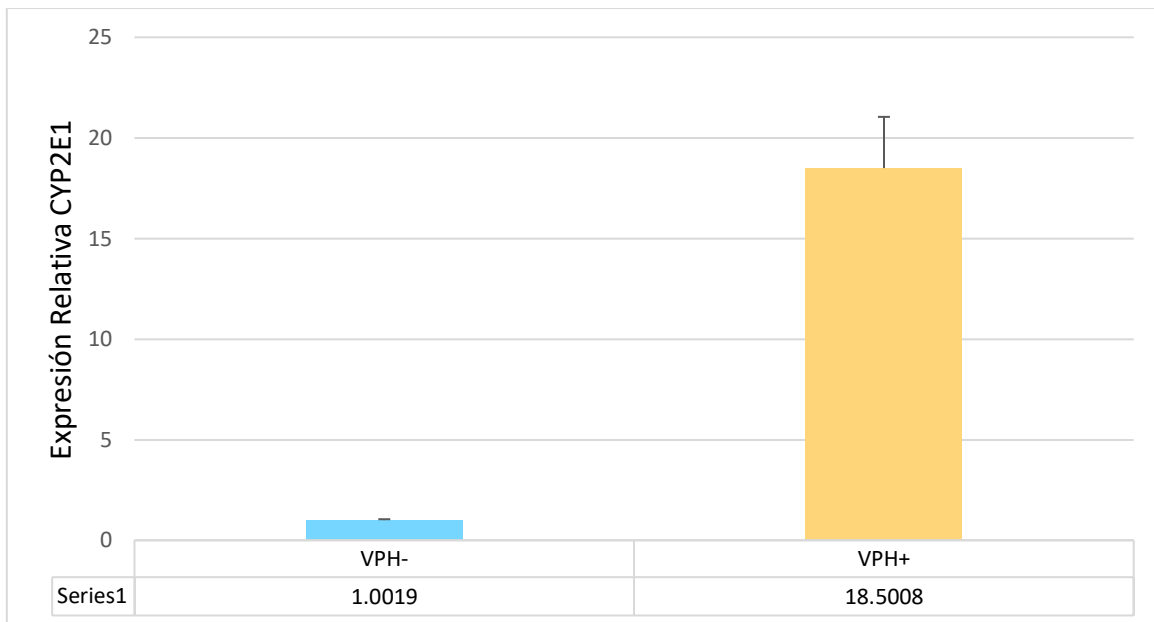


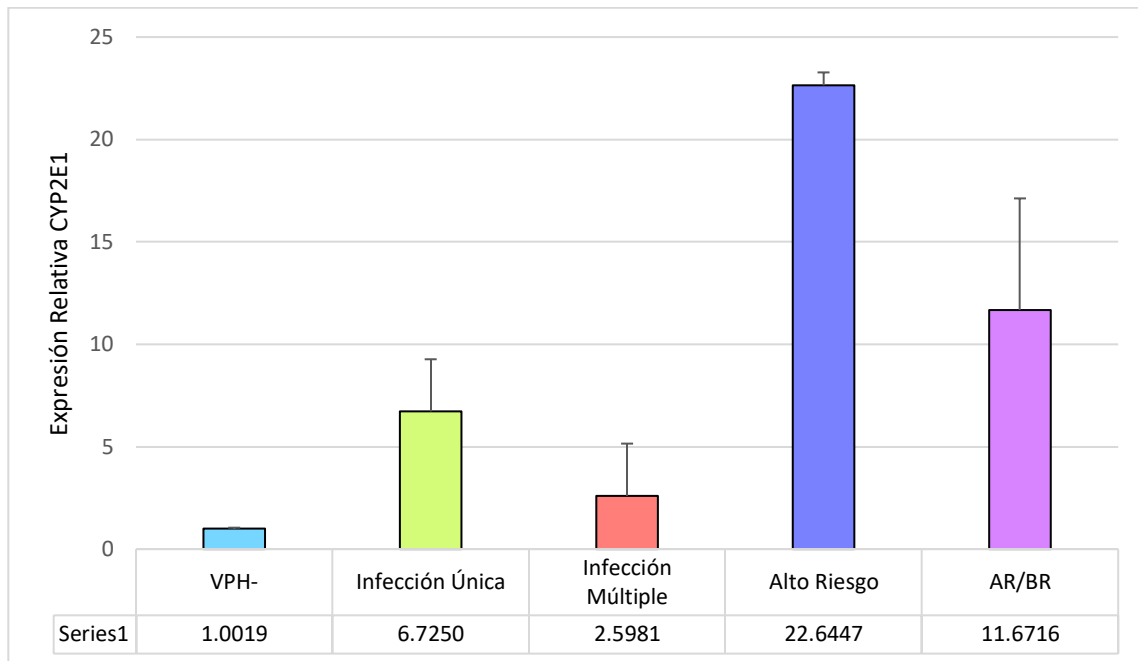
Imagen 1. Electroforesis de amplificación del gen CYP2E1 en gel de agarosa al 3% en TBE 1X (100V por 45 minutos). M: Marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder, 1-2: Muestras por duplicado del gen CYP2E1 de 150 pb.

La expresión relativa del gen entre las muestras positivas y negativas de VPH se muestra en la gráfica 2 y la expresión relativa entre los diferentes genotipos de VPH y tipo de infección se muestra en la gráfica 3.



Gráfica 2. Expresión relativa del gen CYP2E1 en pacientes VPH+ y VPH-, $p=0.002$ con un $\alpha=0.05$.





Gráfica 3. Expresión relativa del gen CYP2E1 en pacientes VPH-, con infección única, infección múltiple, infección de alto riesgo e infección de alto y bajo riesgo, $p=0.001$ con un $\alpha=0.05$.

Discusión de Resultados

Durante muchos años la infección por VPH en hombres fue considerada como un problema menor y de escasa relevancia. Sin embargo, se estima que el VPH es el agente causal de 5% de los cánceres humanos (Silva, y otros, 2013).

En este estudio se buscó evidenciar los efectos tóxicos causados por este virus sobre sujetos masculinos infértiles mediante la evaluación en la expresión de CYP2E1, una proteína productora de ERO.

De las 31 muestras totales la incidencia del VPH fue del 39%, de los genotipos presentes el 52 fue el más frecuente (83%) a diferencia del genotipo 6 (42%). Esto es de gran relevancia ya que el 52 al ser un genotipo de alto riesgo aumenta el riesgo a progresión de cáncer principalmente por su capacidad de integración del genoma viral al genoma celular a



diferencia de los VPH-BR que permanecen de forma episomal; los VPH-AR tienen la capacidad de romper su forma episomal, específicamente en la región que codifica la proteína E2 e integrar su genoma a la célula, de tal manera que al romper la secuencia de E2 ya no se efectúa la retroalimentación negativa que tiene esta sobre la transcripción de E6 y E7 favoreciendo su producción sin un elemento regulatorio, conllevando a la inmortalización de la célula a través de la inhibición de apoptosis y aumento de proliferación celular lo que da como resultado inestabilidad genómica en la célula generando eventualmente cáncer (Santos-López, Márquez-Domínguez, Reyes-Leyva, & Vallejo-Ruiz, 2015), (Silva, y otros, 2013).

Además hay un cambio de aminoácido en la proteína E7 (VPH-AR tienen ácido aspártico y VPH-BR tienen glicina), este cambio de aminoácido aumenta la afinidad de las proteínas E6 y E7 por p53 y pRB induciendo una mayor degradación de estas proteínas por ubiquitinización lo que favorece la velocidad de replicación viral y progreso a cáncer (Silva, y otros, 2013).

Respecto a la expresión relativa de CYP2E1 es importante recalcar que se ha demostrado que CYP2E1 es una de las isoformas CYP450 más activas en la generación de ERO y teniendo en cuenta que la generación de ERO está estrechamente relacionada con el desarrollo del cáncer y la metástasis. Los niveles celulares de CYP2E1 podrían ser uno de los indicadores de la tumorigénesis y la progresión del cáncer (Leung, y otros, 2013).

Por lo que CYP2E1 es una enzima importante para evaluar los efectos tóxicos producidos por la infección de patógenos como lo es el VPH; ya que la infección persistente por VPH



promueve la inflamación crónica, que también puede inducir un desequilibrio entre prooxidantes (ERO, NOS) y antioxidantes (CAT, SOD), causando daño oxidativo a los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos de la membrana de los espermatozoides, induciendo procesos degenerativos tanto agudos como crónicos, incluida la carcinogénesis y el cáncer e infertilidad masculina (Pérez Soto, y otros, 2020).

En la gráfica 2 podemos observar que al determinar la expresión relativa de CYP2E1, ésta aumentó considerablemente (18 veces) en pacientes VPH+ infértiles en comparación de pacientes VPH- infértiles, esto nos indica que al estar más expresado el gen CYP2E1 hay una mayor producción de ERO las cuales propician un ambiente tóxico, aparte del ya producido por la infección del VPH, en un estudio se evaluaron diversos parámetros de inflamación y marcadores de estrés oxidativo en muestras de semen de hombres infértiles, en donde se demostró un incremento de IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-4, lipoperoxidación, y una disminución de las enzimas antioxidantes CAT y SOD, comprobando que la infección por VPH provee de un microambiente oxidativo y proinflamatorio los cuales pueden contribuir a infertilidad (Pérez Soto, y otros, 2020).

Así mismo, un estudio presentó evidencia de que p53 tiene la capacidad de regular la expresión de CYP2E1 en células de cáncer de mama, donde la cantidad de generación de ERO mediada por CYP2E1 podría inducir resultados antioxidantes o prooxidantes de p53 (Leung, y otros, 2013), además en otro estudio se activó específicamente a p53 y demostraron que este suprimió los niveles de CYP2E1 (Sun , y otros, 2018); por lo que en los pacientes VPH+ CYP2E1 se muestra más elevado ya que estas muestras al poseer



principalmente genotipos VPH-AR se favorece la ubiquitinización de p53 de tal manera que ya no regularía la expresión de CYP2E1.

Este mismo caso se observa en la gráfica 3 principalmente en el grupo VPH-AR el cual está 22 veces más expresado y el grupo VPH-IS que está 6 veces más expresado en comparación de los VPH-.

Se esperaría este mismo mecanismo en el grupo VPH-IM, sin embargo, los resultados muestran lo contrario ya que se ve disminuida la expresión de CYP2E1. Puesto que el grupo VPH-IM contiene múltiples genotipos de alto riesgo por muestra, la sobreexpresión de CYP2E1 es tal que ya no hay regulación sobre las ERO y las altas concentraciones de H₂O₂ inducen la lipoperoxidación en los espermatozoides por su alto contenido de AGPI que conlleva a la muerte celular, específicamente autofagia ya que es una de las vías inducidas por niveles elevados de ERO que desencadenan la sobreexpresión de varios genes regulados por la autofagia (Leung, y otros, 2013).

Esta hipótesis se sustenta con un estudio en el cual se demostró que la sobreexpresión de CYP2E1 en líneas celulares de cáncer de mama sobrerreguló los biomarcadores autofágicos LC-3 y Beclin-1, lo que implica que CYP2E1 posiblemente induce la formación del autofagosoma en el cáncer de mama (Leung, y otros, 2013).

Por último, se ha demostrado que los genotipos de bajo riesgo VPH6 y VPH11 actúan de forma antagónica a la infección con el tipo de alto riesgo VPH16, haciendo que el riesgo de cáncer cervical invasivo sea menor de lo esperado, además las mujeres de este grupo que evolucionaron hacia la enfermedad invasiva lo hicieron después de un tiempo



sustancialmente mayor hasta el diagnóstico que las mujeres con infección por el VPH-AR solamente. Por lo tanto, la presencia del VPH-BR interfiere en la tasa de progresión relacionada con el VPH-AR de la enfermedad cervical *in situ* a la invasiva. (Sundström, y otros, 2015), por lo que en el grupo VPH-AR/BR los genotipos de AR y BR compiten por la maquinaria celular, perjudicando sus procesos replicativos mutuamente y por tanto, sus cargas virales serán menores en comparación con infecciones simples en las cuales no interactúen. Así, el VPH de bajo riesgo, al impedir la replicación del VPH de alto riesgo, tendrá efectos benéficos a nivel celular, más no a nivel de organismo.

Conclusiones

La presencia de VPH-AR estimula indirectamente la expresión de CYP2E1 al suprimir la función regulatoria que p53 tiene sobre CYP2E1. Siendo así, las muestras que presentan varios genotipos de VPH-AR tienen una mayor expresión de CYP2E1 lo que resulta en mayor toxicidad por ERO, la cual eventualmente conlleva a muerte celular y por ende infertilidad. Sin embargo, en los casos donde hay co-infección de VPH-AR/BR la presencia del genotipo de bajo riesgo mitiga la producción de ERO y probablemente la progresión a cáncer. De tal manera que el estudio de la expresión de CYP2E1 más que un marcador de infertilidad podría fungir como indicador de progresión a cáncer en pacientes con VPH+.



Bibliografía

- Alba Zayas, L., Monzón Benítez, G., Peláez Yáñez, L., & Quintero Pérez, Y. (Septiembre de 2000). Papel del estrés oxidativo en la infertilidad masculina. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 19(3), 202-205.
- AMMR. (24 de Agosto de 2018). Situación de la infertilidad en México. *Asociación Mexicana de Medicina de la Reproducción*.
- Arbitrio, M., Scionti, F., Di Martino, M. T., Pensabene, L., Tassone, P., & Tagliaferri, P. (Febrero de 2021). Pharmacogenetics/Pharmacogenomics of Drug-Metabolizing Enzymes and Transporters. *Reference Module in Biomedical Sciences*, 1-39.
- Beltrán-Lissabet, J. (Febrero de 2014). Panorámica de los receptores celulares del virus del papiloma humano y su repercusión en la purificación de partículas semejantes a virus. *Vacunas*, 41.
- Beltrán-Lissabet, J. F. (Mayo de 2014). Aspectos generales sobre la estructura y función de las proteínas codificadas por el virus del Papiloma Humano. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 45(2), 108-118.
- Capra, G., Schillaci, R., Bosco, L., Roccheri, M., Perino, A., & Ragusa, M. (Abril de 2019). HPV infection in semen: results from a new molecular approach. *Epidemiology & Infection*, 147.
- Caro, A. A., & Cederbaum, A. I. (2004). OXIDATIVE STRESS, TOXICOLOGY, AND PHARMACOLOGY OF CYP2E1. *Annual Reviews Pharmacology and Toxicology*, 44, 27-42.
- Castaño Ignacio, M., & Hurtado Estrada, G. (2012). Test de VPH (captura de híbridos II) en pacientes tratadas con radiofrecuencia. *Investigación Materno Infantil*, 4(1), 13-21.
- Castillo Díaz, J. A., & García, E. (Marzo de 2004). DETECCIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH) POR EL MÉTODO DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR). *Bioquímica*, 29(1).
- Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. (Septiembre de 2020). *El virus del papiloma humano (VPH) y el cáncer*. Obtenido de CDC: https://www.cdc.gov/spanish/cancer/hpv/basic_info/index.htm
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156-159.
- De la Cruz Hernández, E., Mohar Betancourt, A., & Lizano Soberón, M. (Febrero de 2004). Elementos víricos y celulares que intervienen en el proceso de replicación del virus del papiloma humano. *Revista Oncológica*, 6(5), 263-271.
- De la Fuente-Villarreal, D., Guzmán-López, S., Barboza-Quintana, O., & González-Ramírez, R. (Octubre de 2010). Biología del Virus del Papiloma Humano y técnicas de diagnóstico. *Medicina Universitaria*, 12(49), 231-238.
- De Marco, F. (Febrero de 2013). Oxidative Stress and HPV Carcinogenesis. *Viruses*, 5(2), 708-731.



- Dunne, E. F., Nielson, C. M., Stone, K. M., Markowitz, L. E., & Giuliano, A. R. (Octubre de 2006). Prevalence of HPV Infection among Men: A Systematic Review of the Literature. *The Journal of Infectious Diseases*, 194(8), 1044-1057.
- Elsevier Connect. (Febrero de 2019). Tipos de papilomavirus humanos y sus asociaciones con otras enfermedades. *Elsevier*.
- Food and Drug Administration. (21 de Agosto de 2020). Obtenido de GARDASIL 9: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/gardasil-9>
- Food and Drug Administration. (28 de Junio de 2019). *Virus del papiloma humano (VPH) [Human papillomavirus (HPV)]*. Obtenido de <https://www.fda.gov/consumers/free-publications-women/virus-del-papiloma-humano-vph-human-papillomavirus-hpv>
- García Rojo, M., & Morillo Castro, A. (Diciembre de 1999). TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR EN EL DIAGNÓSTICO EN DERMATOLOGÍA. *Dermatología Peruana*, 9(1).
- Garolla, A., Pizzol, D., & Foresta, C. (2011). The role of human papillomavirus on sperm function. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 23(4), 232-237.
- GeneCards. (2008). *Gene Cards. THE HUMAN GENE DATABASE*. Obtenido de CYP2E1 Gene: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CYP2E1#localization>
- Gómez García, I., Gómez Mampaso, E., Conde Someso, S., Maganto Pavón, E., & Navío Niño, S. (2005). Infección por Papillomavirus en el hombre. Estado actual. *ACTAS UROLÓGICAS ESPAÑOLAS*, 29(4), 365-372.
- Hamzyan Olia, J. B., Khadem Ansari, M. H., Yaghmaei, P., Ayatollahi, H., & Reza Khalkhali, H. (2017). Evaluation of oxidative stress marker in patients with human papillomavirus infection. *Annals of Tropical Medicine and Public Health*, 10(6), 1518-1523.
- Hernández, D. (2017). Biología del Virus del Papiloma Humano y su relación con el cáncer. *Revista Venezolana de Oncología*, 29(4).
- IMVPH. (2018). *Instituto Mexicano del Virus del Papiloma Humano*. Obtenido de <https://virusdelpapilomahumano.com.mx/servicios/>
- Leung, T. (2012). *The regulation of CYP2E1 gene expression and its role in breast cancer [Tesis de doctorado, Facultad de Farmacia y Ciencias Farmacéuticas]* https://www.research.manchester.ac.uk/portal/files/54531322/FULL_TEXT.PDF.
- Leung, T., Rajendran, R., Singh, S., Garva, R., Krstic-Demonacos, M., & Demonacos, C. (2013). Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) regulates the response to oxidative stress and migration of breast cancer cells. *Breast Cancer Research*, 15, 1-12.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Mallok, A., Flores-Sanchez, R. M., Alonso-Rodriguez, C. A., & Martínez-Sánchez, G. (2011). Desbalance redox en la infertilidad masculina. *Revista Cubana de Farmacia*, 45(2), 283-296.
- Mayorga Torres, J. M., Camargo, M., Cadavid, Á., & Cardona Maya, W. (Diciembre de 2015). Estrés oxidativo: ¿un estado celular defectuoso para la función espermática? *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*, 80(6), 486-492.



- Mora-García, M., & Monroy-García, A. (2015). Respuesta inmune en cáncer cervicouterino. Estrategias para el desarrollo de vacunas terapéuticas. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 53.
- Ochoa-Carrillo, F. J. (Septiembre de 2014). Virus del papiloma humano. Desde su descubrimiento hasta el desarrollo de una vacuna. Parte I/III. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 13(5), 308-315.
- Ojeda F, J. M. (Julio de 2010). Virus papiloma humano: de la biología a la clínica. *MEDWAVE*, 10(7).
- OMS. (Septiembre de 2020). *Infertility*. Obtenido de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infertility>
- OPS. (2020). *Acerca del VPH*. Obtenido de Organización Panamericana de la Salud: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=14718:about-hpv-vaccine&Itemid=72405&lang=es
- Orellana B, M., & Guajardo T, V. (Enero de 2004). Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. *Revista médica de Chile*, 132(1), 85-94.
- Pérez Soto, E., Oros Pantoja, R., Fernández Martínez, E., Medel Flores, O., Miranda Covarrubias, J., & Sánchez Monroy, V. (2020). High-risk HPV genotypes promote a pro-inflammatory and oxidative environment in the semen of male partners of infertile couples. *Biology of Reproduction*.
- Pérez Soto, E., Sánchez Monroy, V., Domingo Vázquez, V. I., & Oros Pantoja, R. (Mayo de 2019). Perspectivas Terapéuticas en la Infertilidad Masculina Causada por VPH y Estrés Oxidativo. *Frontera Biotecnológica*(13), 19-26.
- Pista, A., Oliveira, A., Verdasca, N., & Ribeiro, F. (Octubre de 2011). Single and multiple human papillomavirus infections in cervical abnormalities in Portuguese women. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(6), 941-946.
- Sanabria Negrín, J. G. (2009). Virus del Papiloma humano. *Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río*, 13(4), 168-187.
- Santos-López, G., Márquez-Domínguez, L., Reyes-Leyva, J., & Vallejo-Ruiz, V. (2015). Aspectos generales de la estructura, la clasificación y la replicación del virus del papiloma humano. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 53.
- Sendagorta-Cudós, E., Burgos-Cibrián, J., & Rodríguez-Iglesias, M. (2019). Infecciones genitales por el virus del papiloma humano. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 37(5), 324-334.
- Silva, R., León, D., Brebi, P., Ili, C., Roa, J., & Sánchez, R. (2013). Diagnóstico de la infección por virus papiloma humano en el hombre. *Revista chilena de infectología*, 30(2), 186-192.
- Sun, J., Wen, Y., Zhou, Y., Jiang, Y., Chen, Y., Zhang, H., . . . Bi, H. (2018). p53 attenuates acetaminophen-induced hepatotoxicity by regulating drug-metabolizing enzymes and transporter expression. *Cell Death & Disease*, 9(536).
- Sundström, K., Ploner, A., Arnheim-Dahlström, L., Eloranta, S., Palmgren, J., Adami, H.-O., . . . Dillner, J. (Octubre de 2015). Interactions Between High- and Low-Risk HPV Types



Reduce the Risk of Squamous Cervical Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 107(10).

Valencia Olvera, A. C., Morán, J., Camacho Carranza, R., Próspero García, O., & Espinosa Aguirre, J. J. (Octubre de 2014). CYP2E1 induction leads to oxidative stress and cytotoxicity in glutathione-depleted cerebellar granule neurons. *Toxicology in Vitro*, 28(7), 1206-1214.

Vicenta Paparella, C., Pavesi, A. B., Feldman, R. N., & Bouvet, B. R. (Marzo de 2015). Importancia de la evaluación del estrés oxidativo en el semen humano. *Archivos de Medicina Interna*, 37(1), 7-14.

