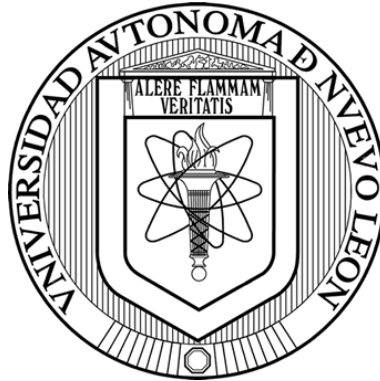


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**INESTABILIDAD CROMOSÓMICA ESPECÍFICA EN SECUENCIAS TELOMÉRICAS  
DE PACIENTES CON DIFERENTES GRADOS DE NEOPLASIA CERVICAL TRAS LA  
INFECCIÓN CON VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (VPH)**

**Por**

**KRISTEL RAMÍREZ MATADAMAS**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN  
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

**2024**

**INESTABILIDAD CROMOSÓMICA ESPECÍFICA EN SECUENCIAS TELOMÉRICAS  
DE PACIENTES CON DIFERENTES GRADOS DE NEOPLASIA CERVICAL TRAS LA  
INFECCIÓN CON VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (VPH)**


*Comité de Tesis*

  
**Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales**  
*Director*

  
**Dr. José Manuel Vázquez Guillén**  
*Secretario*

  
**Dr Juan Francisco Contreras Cordero**  
*Vocal*

  
**Dr Jorge Enrique Castro Garza**  
*Vocal*

  
**Dra Elya Irene Cortés Gutiérrez**  
*Vocal*

  
**Dra. Katushka Arova**  
*Subdirectora de Posgrado*

  
**SUBDIRECCIÓN  
DE POSGRADO**

**INESTABILIDAD CROMOSÓMICA ESPECÍFICA EN SECUENCIAS TELOMÉRICAS  
DE PACIENTES CON DIFERENTES GRADOS DE NEOPLASIA CERVICAL TRAS LA  
INFECCIÓN CON VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (VPH)**

  
**Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales**  
*Directora de tesis*

  
**Dra. Catalina García Vielma**  
*Directora Externa*

## **AVISO DE DERECHOS DE AUTOR**

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

### Financiamiento

Este proyecto fue financiado por el Instituto Mexicano del Seguro Social mediante el Fondo de investigación en Salud FIS/IMSS/PROT/PRIIO/19/100.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la doctora Lydia Guadalupe Rivera Morales por aceptar ser mi directora de tesis y estar siempre al pendiente de la realización del proyecto, apoyándome en todo lo que se necesitara en estos tres años desde que se planteó el proyecto hasta sus etapas finales, así como todo lo relacionado a los trámites posteriores.

A la doctora Catalina García Vielma como directora externa y quien me fue guiando a lo largo de toda la maestría desde las primeras etapas de planeación del proyecto hasta su conclusión logrando un excelente equipo de trabajo.

A los doctores Elva Irene Cortés Gutiérrez, José Manuel Vázquez Guillén, Jorge Enrique Castro Garza y Juan Francisco Contreras Cordero por aceptar formar parte de mi comité de tesis, por su valiosa retroalimentación a lo largo del proyecto y su apoyo durante todos los trámites requeridos.

A la química Sanjuana Guardado por enseñarme con mucha paciencia y ánimo las técnicas que fueron esenciales para llevar a cabo el proyecto.

A CONACYT por otorgarme la beca de posgrado con la cual fue posible sustentar mis estudios de maestría, así como la realización del protocolo aquí presentado.

Al Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS, por permitirme ser estudiante durante toda la duración de mis estudios y brindarme un espacio y recursos materiales para llevar a cabo las técnicas requeridas por el proyecto.

## INDICE DE CONTENIDO

<b>INDICE DE TABLAS</b> .....	i
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	ii
<b>RESUMEN</b> .....	iii
<b>ABSTRACT</b> .....	iv
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>ANTECEDENTES</b> .....	3
<i>Virus del Papiloma Humano (VPH)</i> .....	3
<i>Lesiones Intraepiteliales (LIE)</i> .....	4
<i>CaCU y VPH</i> .....	4
<i>Telómeros</i> .....	6
<i>Inestabilidad cromosómica</i> .....	6
<i>DBD-FISH</i> .....	9
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	10
<b>HIPÓTESIS</b> .....	11
<b>OBJETIVOS</b> .....	12
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	13
<i>Ubicación del estudio</i> .....	13
I. <i>Inestabilidad cromosómica específica en telómeros</i> .....	14

<i>Preparación de las muestras</i> .....	14
<i>DBD-FISH</i> .....	14
<i>Hibridación con sonda telomérica</i> .....	15
<i>Análisis al microscopio de fluorescencia</i> .....	16
<i>Análisis de imagen</i> .....	16
<b>II. Genotipificación del VPH</b> .....	16
<i>Extracción de DNA</i> .....	16
<i>PCR y tipificación del VPH</i> .....	16
<b>III. Análisis estadístico</b> .....	17
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	19
<i>Descripción de población de estudio</i> .....	19
<i>Hibridación en telómeros</i> .....	21
<i>Medición de Densidad Integrada</i> .....	23
<i>Genotipificación de VPH</i> .....	25
<b>CONCLUSIONES</b> .....	28
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	29
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	30
<b>ANEXOS</b> .....	37

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Antecedentes clínico-obstétricos de pacientes Control LIE-BG y LIE-AG.....	20
<b>Tabla 2.</b> Comparación de Densidad Integrada en secuencias teloméricas de epitelio cervical de pacientes con VPH, LIE-BG y LIE-AG.....	24
<b>Tabla 3.</b> Genotipos de VPH detectados en pacientes Control LIE-BG y LIE-AG.....	27
<b>Anexo 1.</b> Encuesta para selección de grupos de estudio (LIE-BG y LIE-AG) y grupo Control .....	37



## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Núcleos tratados con DBD-FISH con hibridación en telómeros (rojo) y tinción de contraste DAPI (azul): A) Vista general, B) Control, C) LIE-BG y D) LIE-AG.....	22
<b>Figura 2.</b> Genotipificación de VPH de muestras A) Control, B) LIE-BG (VPH6, 61, 62) y C) LIE-AG (VPH16). 1. Marcador, 2. Control conjugado, 3. Control hDNA, 4 y 5. Control VPH .....	27
<b>Anexo 2.</b> Núcleos sometidos a DBD (rojo: tinción con yoduro de propidio) mostrando el halo circundante característico de la técnica .....	37

## RESUMEN

Globalmente, el Cáncer Cérvico Uterino (CaCU) es la cuarta causa de muerte en mujeres y, a nivel nacional la segunda causa de muerte por cáncer en la mujer. Previo a esta etapa se desarrollan Lesiones Intraepiteliales (LIE) que se clasifican, de acuerdo con su severidad, en LIE de Bajo Grado (LIE-BG) y Alto Grado (LIE-AG). En el 99.8% de los casos de CaCU se detecta infección con Virus de Papiloma Humano (VPH) de Bajo Riesgo (BR) y/o Alto riesgo (AR); estos últimos asociados con la evolución de LIE en carcinomas. Otro factor clave en el desarrollo de LIE es la Inestabilidad Cromosómica (IC) que acontece como resultado de alteraciones génicas incluyendo regiones de naturaleza repetitiva como los telómeros. Los telómeros son estructuras de DNA repetitivo situadas en los extremos de los cromosomas que mantienen la integridad génica y normalmente, se acortan tras cada ciclo de replicación celular. Sin embargo, en tejido cervical con LIE y en tejido tumoral el elongamiento de los telómeros permite la incidencia de alteraciones genómicas que deviene en inestabilidad genómica que favorece el desarrollo carcinogénico.

El propósito de este estudio fue evaluar el daño en las secuencias teloméricas de pacientes con diferentes grados de neoplasia cervical mediante DBD-FISH y determinar los genotipos virales presentes. Se aislaron células epiteliales de tejido cervical de 10 pacientes con LIE-BG, 10 pacientes con LIE-AG y 10 personas sanas. Se analizaron mediante DBD-FISH (DNA Breakage Detection- Fluorescence *In Situ* Hybridization) empleando una sonda pan-telomérica. Se tomaron fotografías de cada muestra y mediante ImageJ se cuantificó la IC en secuencias teloméricas, expresada como Densidad Integrada (DI). La genotipificación del VPH se realizó por hibridación reversa mediante el kit INNO-LiPA. Se mostró un incremento progresivo de DI de acuerdo con la severidad de LIE, los valores obtenidos fueron de 2304.70 pixeles (Control), 4228.92 pixeles (LIE-BG) y 8585.41 pixeles (LIE-AG). Algunos genotipos detectados fueron 06, 11, 44, 54 y 71 (BR), y 16, 26, 31, 33 y 39 (AR). Se detectaron coinfecciones con hasta trece genotipos, lo cual fue lo esperado para ambos grupos de estudio. La relación observada entre la severidad de LIE producidas por VPH y el nivel de IC en secuencias teloméricas indicaría que esta es una característica de aparición previa al desarrollo de CaCU.

## ABSTRACT

Globally, Cervical Uterine Cancer (CaCU) is the fourth cause of death in women and, at a national level, the second cause of death from cancer in women. Prior to this stage, Intraepithelial Lesions (IEL) develop and are classified, according to their severity, into Low Grade IEL (LIE-BG) and High Grade IEL (LIE-AG). In 99.8% of CaCU cases, infection with Low Risk (BR) and/or High Risk (AR) Human Papillomavirus (HPV) is detected; the latter associated with the evolution of LIE in carcinomas. Another key factor in the development of LIE is Chromosome Instability (CI), which occurs as a result of genetic alterations including repetitive regions such as telomeres. Telomeres are repetitive DNA structures located at the ends of chromosomes that maintain gene integrity and normally shorten after each cycle of cell replication. However, in cervical tissue with LIE and in tumor tissue, telomere elongation allows the incidence of genomic alterations that result in genomic instability that favors carcinogenic development.

Telomeres are structures made up of repetitive DNA sequences located at the ends of chromosomes that protect the integrity of the genome and, under normal conditions, shorten after each cycle of cell replication. However, in cervical tissue affected with LIE and in tumor tissue, telomere elongation occurs as a consequence of the increased expression of telomerase, which allows the incidence of alterations in the genome and, therefore, the genomic instability that favors carcinogenic development.

The purpose of this study was to evaluate damage in telomeric sequences of patients with different degrees of cervical neoplasia using DBD-FISH and determine the viral genotypes present. Epithelial cells were isolated from cervical tissue of 10 patients with LIE-BG, 10 patients with LIE-AG, and 10 healthy people. They were analyzed by DBD-FISH (DNA Breakage Detection- Fluorescence In Situ Hybridization) using a pan-telomeric probe. Photographs were taken of each sample and the IC in telomeric sequences was quantified using ImageJ, expressed as Integrated Density (ID). HPV genotyping was performed by reverse hybridization using the INNO-LiPA kit. A progressive increase in DI was shown according to the severity of LIE, the values obtained were 2304.70 pixels (Control), 4228.92 pixels (LIE-BG) and 8585.41 pixels (LIE-AG). Some genotypes detected were 06, 11, 44, 54 and 71 (BR), and 16, 26, 31, 33 and 39 (AR). Coinfections

with up to thirteen genotypes were detected, which was expected for both study groups. The relationship observed between the severity of LIE caused by HPV and the level of IC in telomeric sequences would indicate that this is a characteristic that appears prior to the development of CaCU.

## INTRODUCCIÓN

A nivel mundial el Cáncer Cervicouterino (CaCU) es el cuarto tipo de cáncer con mayor incidencia en mujeres, mientras que en México ocupa el segundo lugar, la población de 50 a 59 años es donde se presenta la mayor incidencia de casos (aproximadamente 30% del total). El método de detección más común basado en citología es la prueba de Papanicolaou, en la que se realiza el examen e interpretación morfológica de células colectadas del área cervical para identificar el grado de degeneración celular (Chrysostomou y Kostrikis, 2020).

Si bien es el método de detección de CaCU, este presenta ciertas limitaciones como una pobre reproducibilidad, posibilidad de toma de muestra inadecuada, presencia de fluidos como moco o sangre que obstaculizan la visualización, una fijación de muestras inadecuada, entre otras. Estos factores conllevan a que se presente una baja sensibilidad y alta proporción de falsos positivos, así como el requerimiento de personal altamente capacitado para interpretar los resultados (Chrysostomou *et al.*, 2020).

El Virus del Papiloma Humano (VPH) forma parte de la familia Papillomaviridae y tiene una estructura de cápside icosaédrica sin envoltura. Su genoma posee una estructura de DNA circular de doble cadena, con una longitud de alrededor de 8 kb. Dentro del genoma se distinguen tres regiones principales: la región LCR (Long Control Region) que contiene un promotor temprano y elementos regulatorios implicados en la replicación y transcripción viral; la región E (Early) que codifica a E1, E2, E4, E5, E6 y E7, proteínas asociadas con procesos de replicación y expresión viral, supervivencia y oncogénesis; por último, la región L (Late) codifica a L1 y L2, proteínas estructurales de la cápside del virus (Gheit, 2019).

Más de 200 tipos de VPH se relacionan con infecciones en humanos y su potencial oncogénico se encuentra bien establecido en diversos tipos de neoplasias, el cual se ve incrementado por condiciones de inmunosupresión, infecciones de transmisión sexual, alto número de embarazos, entre otras, afectando la calidad de vida o incluso causar la muerte de quien presenta la infección (Sung *et al.*, 2021). A pesar de que las vacunas

profilácticas han demostrado ser altamente eficaces en la prevención de la infección existen limitaciones para su aplicación debido a que en países en desarrollo aún no cuentan con programas masivos de vacunación entre la población vulnerable (Chan *et al.*, 2019). De modo que, la gran prevalencia de infecciones por VPH y su relación directa con el desarrollo de un amplio espectro de patologías deja en claro que se trata de un problema de salud pública considerable (Magalhães *et al.*, 2021).

Asimismo, la infección persistente con VPH (el mismo genotipo detectable en múltiples ocasiones durante un periodo mayor a 5 años) causa la inestabilidad genómica del hospedero mediante la incidencia de rearrreglos cromosómicos a lo largo de todo el genoma (inserciones, deleciones, amplificaciones de genes, inversiones, entre otros) que, en conjunto, facilitan el desarrollo carcinogénico. En los cromosomas 1 y 3 se ha detectado inestabilidad en secuencias repetitivas de 5 pb (Heselmeyer *et al.*, 2005; Olaharski *et al.*, 2006.), así como en secuencias teloméricas, en pacientes con LIE y carcinomas (Cortés Gutiérrez *et al.*, 2013, 2020).

Por ello las secuencias teloméricas son una región de interés para el estudio de la inestabilidad genómica producto de la infección con VPH que permitiría, además, realizar un seguimiento más preciso del paciente a fin de evitar el desarrollo de CaCU.

## ANTECEDENTES

### *Virus del Papiloma Humano (VPH)*

El VPH es un virus con genoma de DNA de doble cadena pequeño, sin envoltura que presenta un tropismo por el epitelio escamoso. Pertenece a la familia Papillomaviridae, el cual contiene 53 géneros, de los cuales 5 son los que infectan a humanos. Existen 222 tipos de VPH identificados hasta el año 2020, que se clasifican en 5 géneros principales: 65 de tipo Alfapapilomavirus, 54 de tipo Betapapilomavirus, 99 del tipo Gamapapilomavirus, 3 de tipo Mupapilomavirus y 1 de tipo Nupapilomavirus (Chan *et al.*, 2019; Cospér *et al.*, 2021). Los VPH causan un amplio rango de manifestaciones clínicas desde infecciones cutáneas y de mucosas hasta diversos tipos de cánceres, incluyendo el cáncer cervicouterino (Magalhães *et al.*, 2021).

Los genotipos de Alfapapilomavirus se clasifican como de Bajo Riesgo (BR) y Alto Riesgo (AR), acorde a la capacidad que poseen de transformar las células y progresar a un estado de cáncer. La infección por VPH BR con genotipos 6 u 11 es de tipo no carcinogénica y suele causar la aparición de verrugas anogenitales (condilomas) y papilomas orales; por su parte, los VPH AR pueden provocar el desarrollo de diferentes tipos de cáncer incluyendo el CaCU. Los principales genotipos de este último grupo son 16, 18, 31, 33, 35, 38, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 66 y 68, y representan el agente causal de alrededor del 5% de cánceres a nivel mundial (Cospér *et al.*, 2021).

Algunos de los factores de riesgo más importantes para la infección por VPH son la edad, un alto número de parejas sexuales, un uso prolongado de anticonceptivos orales, así como factores sociales de marginación, analfabetismo o baja escolaridad (Chelimo *et al.*, 2013).

En la mayoría de las infecciones detectables (~90%) la respuesta inmune innata del paciente es capaz de eliminar la infección al cabo de un par de años tras la detección inicial y el virus no vuelve a ser detectado en los siguientes 5 a 7 años posteriores (Della Fera *et al.*, 2021). Por el contrario, sí la infección es persistente el mismo genotipo de VPH es detectable en múltiples consultas ginecológicas consecutivas, en un periodo de 2 a 24 meses entre cada consulta. En este tipo de infección existe un incremento de riesgo de desarrollar anomalías tisulares en la zona infectada (Schiffman *et al.*, 2016).

### *Lesiones Intraepiteliales (LIE)*

Una de las afecciones más comunes en pacientes infectadas con VPH es el desarrollo de Lesiones Intraepiteliales (LIE) en el área cervical, en las zonas de transformación de epitelio escamoso a glandular. Estas lesiones son detectables con una inspección visual realizada por el especialista, que toma una muestra del área afectada para su observación al microscopio. Las LIE de Bajo Grado (LIE-BG) se caracterizan por la presencia de coilocitos, células que presentan alteraciones morfológicas y de tamaño del núcleo y citoplasma abundante, como consecuencia de la infección activa. Por su parte, las LIE de Alto Grado (LIE-AG) presentan principalmente cambios observables en el núcleo celular, como un tamaño y morfología muy variable en mayor proporción que en el caso de las LIE-BG, escaso citoplasma, irregularidades en membrana nuclear, entre otras anormalidades, que indican una integridad celular altamente comprometida y una evidente inestabilidad genómica (Paintal y Nayar, 2014).

### *CaCU y VPH*

En la década de 1980 se reportó por primera vez la relación entre las infecciones genitales con VPH y el desarrollo de tumores malignos al detectarse DNA de este virus en condilomas, en biopsias de cáncer invasivo y carcinomas *in situ* (Gissman *et al.*, 1983). Desde entonces la relación se ha establecido claramente y se reconoce la infección persistente con genotipos AR como uno de los factores de riesgo principales en el desarrollo de CaCU. Otros factores de riesgo incluyen la edad, el comienzo de vida sexual a temprana edad, coinfecciones con otros virus, susceptibilidad inmunológica o genética y la inaccesibilidad a servicios de salud públicos o privados (Hernández Hernández *et al.*, 2015).

La infección con VPH es el cuarto factor etiológico de cáncer y mortalidad en mujeres, con una incidencia global estimada de 604 127 nuevos casos y 341 831 muertes hasta el año 2020 (Sung *et al.*, 2021). Si bien se han desarrollado distintas pruebas de detección desde la década de 1940, como el Papanicolau, y se ha impulsado la implementación de programas de detección han contribuido a disminuir la incidencia y mortalidad de esta enfermedad, sigue siendo un importante dilema de salud pública (Chrysostomou y Kostrikis, 2020).



En México el CaCU es la segunda causa de muerte por cáncer en la mujer, hasta el año 2020 la incidencia anual estimada es de 38 casos por cada 100 000 mujeres. Ese mismo año se contabilizaron 9439 casos de tumores malignos de cuello uterino, que representaron el 4.8% del total de nuevos casos de cáncer en el país (Sung *et al.*, 2021). A partir de los 35 años hay un incremento en la distribución de casos, siendo el grupo de 50 a 59 años el de mayor proporción (30% del total de casos). La edad promedio de detección inicial de casos es de 49.2 años (Mendoza González, 2017).

La detección de LIE en etapas tempranas y el tratamiento expedito del VPH pueden evitar en gran medida la progresión a CaCU, por esta razón, en nuestro país desde 1974 se implementó el Programa Nacional de Detección de Cáncer Cervicouterino. A partir de 1992 se reportó una reducción en la tasa de mortalidad de aproximadamente 30% (Mendoza González, 2017; Sánchez Mercader, 2021). El método de detección más utilizado es la citología de tejido cervical anómalo con tinción de Papanicolaou, representa una técnica simple y económica de realizar a gran escala con la desventaja de que posee una baja sensibilidad. Aproximadamente el 40% de los casos, mayormente en etapas iniciales, no logra detectarse; otro factor que dificulta el diagnóstico la necesidad de personal capacitado y equipo especializado para garantizar una toma de muestra adecuada; igualmente la interpretación de los resultados depende de la capacidad del técnico de laboratorio. Desafortunadamente los esfuerzos de ampliar la cobertura de este programa de tamizaje han tenido poco éxito debido a cuestiones geográficas y situaciones socioculturales (Gutiérrez Delgado *et al.*, 2008; Secretaría de Salud, 2015).

A pesar de las limitaciones este método prevalece como el más sencillo y menos invasivo para diagnosticar anomalías en células epiteliales, permitiendo priorizar pacientes y establecer el tratamiento más pertinente para evitar el desarrollo de CaCU (Paintal y Nayar, 2014).

Las metodologías diagnósticas basadas en citología que se aplican en la actualidad no permiten definir si las lesiones observadas progresarán a una etapa de cáncer, permanecerán sin cambio o si se experimentará una regresión, sumado a los problemas técnicos que dificultan la reproducibilidad y la interpretación de resultados (Chrysostomou y Kostrikis, 2020).

### *Telómeros*

Los telómeros son secuencias de DNA repetitivo (TTAGGG) situados en los extremos terminales de los cromosomas, con una extensión de entre 5 y 15 kb, que se asocian con el complejo proteico shelterina para facilitar la formación de estructuras en lazo para proteger a los cromosomas de la degradación. Los telómeros se acortan en cada división celular debido a que la replicación del DNA en la cadena rezagada se realiza de manera incompleta. Como resultado, eventualmente se produce el arresto celular y la senescencia; se considera que esto ocurre como una medida para evitar la proliferación de tumores en el organismo (Shay y Wright, 2019).

La telomerasa es la enzima responsable de elongar los telómeros durante la división celular, en condiciones normales tiene una expresión baja o nula, sin embargo, su activación es indicativa de que ha dado inicio la transformación celular (Pańczyszyn *et al.*, 2018). Diversos estudios han demostrado que tanto en tejido cervical de pacientes con LIE así como en tejido tumoral la telomerasa tiene una expresión significativamente mayor en comparación con tejidos sanos, incrementando conforme a la etapa clínica (Reddy *et al.*, 2001; Widschwendter *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2007). Esto conlleva una elongación anormal de los telómeros que permite una replicación celular continua y desregulada que promueve la inmortalización, la cual es una de las características principales del cáncer. Asimismo, esta alteración en los telómeros facilita la incidencia de rearrreglos cromosómicos que se van acumulando progresivamente, causando así una inestabilidad drástica en el genoma (Porter y Marra, 2022).

### *Inestabilidad cromosómica*

La infección por VPH impide la correcta maduración y diferenciación celular debido a la desregulación de los mecanismos de replicación celular, lo que promueve la inestabilidad cromosómica y por consiguiente, facilita la progresión a un estado cancerígeno. Esta puede ser de tipo numérica, involucrando pérdida o ganancia de cromosomas completos (aneusomía), o bien, de tipo estructural cuando se produce la pérdida o ganancia de fragmentos cromosómicos en diferentes partes del genoma (Vargas-Rondón *et al.*, 2017). A nivel de funcionalidad esta inestabilidad se refleja como una activación de oncogenes,

aparición de proteínas de fusión y/o pérdida de genes supresores de tumores, que en conjunto actúan para promover el desarrollo y progreso del cáncer (Rode *et al.*, 2016).

Mediante la secuenciación de genoma completo de líneas celulares de diversos tipos de cáncer, incluyendo CaCU, se ha reportado una fuerte asociación entre la integración del VPH y la incidencia de amplificaciones y rearrreglos génicos, entre los que se incluyen deleciones, translocaciones e inversiones (Akagi *et al.*, 2014).

En la década de 1950 se reportaron los primeros estudios citogenéticos de carcinomas de cuello uterino, encontrándose en todos los casos un estado de aneuploidía, en su mayoría de tipo diploide y tetraploide (Manna, 1957; Tonomura, 1959).

Más adelante se reportó aneuploidía tanto en biopsias de cuello uterino de carcinomas *in situ* como de epitelio cervical anómalo en todos los casos analizados, sugiriendo así que las anomalías cromosómicas surgen previamente al desarrollo de carcinomas invasivos (Spriggs *et al.*, 1962).

La asociación entre CaCU y anormalidades en el cromosoma 1 se estableció tras analizar muestras de tejido tumoral tanto de carcinomas invasivos como *in situ*, reportándose rearrreglos cromosómicos (deleciones, translocaciones e isocromosomas) en el 95% de los pacientes estudiados; sugiriendo que estas anormalidades surgen como un evento citogenético de aparición temprana y no como consecuencia del progreso del CaCU (Sreekantaiah *et al.*, 1988).

En estudios adicionales con carcinomas de cuello uterino se han reportado anormalidades estructurales en los cromosomas 1, 17, 11, 3, 2, 6 y 9, siendo los cambios más frecuentes translocaciones e isocromosomas. (Atkin, 1990).

La inestabilidad cromosómica ocurre por la disrupción de sitios frágiles en las cadenas del DNA, denominados sitios alcalinos lábiles, que individualmente o en conjunto pueden facilitar el desarrollo de tumores (Cortés Gutiérrez *et al.*, 2011).

Mediante hibridación *in situ* (ISH) dirigida a la región centromérica del cromosoma 1 se ha establecido la relación entre VPH AR y alteraciones numéricas en este cromosoma,

tanto en tejidos con LIE de distintos grados y carcinomas; encontrándose una mayor prevalencia de los genotipos 16 y 18 en LIE-AG y carcinomas, donde también se presentaron tetrasomías (Bulten *et al.*, 2002).

Una fuerte asociación entre la frecuencia de aneusomías del cromosoma 1 y la infección con VPH AR se demostró también mediante Hibridación *in situ* Fluorescente (FISH), mostrando un incremento progresivo conforme a la severidad de las LIE analizadas (Cortés Gutiérrez *et al.*, 2005).

Estudios acerca del cromosoma 3 han demostrado que más del 85% de los carcinomas cervicales invasivos presentan un aumento en el número de copias de la región 3q26 que contiene el gen para el componente de RNA de la telomerasa humana, y que la detección de ganancia de copias o amplificación de este gen puede funcionar como un indicador de alto riesgo de transformación maligna en pacientes con LIE-BG (Heselmeyer *et al.*, 2005).

En un estudio con 143 pacientes con diferentes grados de LIE y sin LIE se reportó un incremento gradual en las frecuencias de tetrasomías y aneusomías de los cromosomas 3 y 17, que se relacionaron directamente con el grado de severidad del diagnóstico. Se detectó tetrasomía en un 23.8% del total de células cervicales analizadas, mientras que el 4.2% de las células mostró aneusomía (Olaharski *et al.*, 2006).

En grupos de estudio con distintos grados de LIE se ha evidenciado inestabilidad específica en secuencias satelitales de 5 pb del cromosoma 1, por medio de Detección de Rupturas del DNA e Hibridación *in situ* Fluorescente (DBD-FISH); sugiriendo que un incremento en la inestabilidad en dichas secuencias es un indicio del progreso a un estado de transformación maligna (Cortés Gutiérrez *et al.*, 2013, 2020).

La inestabilidad cromosómica varía de acuerdo con el grado de la LIE, en el caso de LIE-AG se reporta un 27% de ganancia de genes en 3q y 34% en 1q, 15% de pérdida de genes en 11q y 21% en 4q; en el caso de LIE-BG la ganancia de genes en 3q fue del 2% sin ninguna otra alteración significativa. En el caso de carcinomas se encontró un 55% de ganancia génica en 3q y un 33% de pérdida en 3p (Thomas *et al.*, 2014).

En estudios comparativos con pacientes con LIE-AG y carcinomas se han reportado alteraciones cromosómicas de diferentes tipos, encontrándose en el primer grupo pérdidas de genes en un 10% de las muestras y ganancia de genes en un 25% de las muestras, contra un 40% y 50%, respectivamente, en muestras del segundo grupo. Estas alteraciones se detectaron en el cromosoma 3 en regiones asociadas a genes supresores de tumores, oncogenes, adhesión y motilidad celular (Bodelon *et al.*, 2016).

### *DBD-FISH*

Esta técnica se centra en detectar y cuantificar los rompimientos en las cadenas de DNA tras inmovilizar muestras de raspado de células epiteliales (o de otros tipos) en una matriz de agarosa y someterlas a una serie de lavados con soluciones alcalinas para exponer los segmentos de DNA dañado. La aplicación de una sonda dirigida a una región de DNA, marcada con fluorescencia, posibilita cuantificar el nivel de daño genómico en núcleos celulares de manera individual. Posteriormente, esto permite obtener un promedio global de daño para cada muestra y a la vez, la comparación de muestras en distintos grupos de estudio (Fernández y Gosálvez, 2002).

## JUSTIFICACIÓN

El CaCU representa, desde el 2006, la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres mexicanas. Tan solo el 10% de los casos se detectan como carcinomas *in situ*, 20% se detectan en una etapa temprana mientras que el resto de casos se detectan en etapas intermedias y avanzadas. La infección con VPH AR se relaciona con el desarrollo de LIE cervicales y progresión al desarrollo de CaCU, así mismo es un causante de inestabilidad cromosómica en secuencias repetitivas de los cromosomas 1 y 3, evaluadas mediante DBD-FISH y secuenciación génica. Debido a que las secuencias teloméricas son de naturaleza repetitiva se decidió analizar si también se presenta inestabilidad cromosómica en estas. Los resultados derivados de este estudio nos permitirían no solo detectar sino también cuantificar el daño en estas regiones y en base a ello, proponer nuevos blancos de estudio de la inestabilidad cromosómica que permitan pronosticar el desarrollo de las LIE y discernir la prioridad de tratamiento entre pacientes afectados. Esto también con la finalidad de ofrecer al paciente diferentes opciones de tratamiento menos agresivas pero que demuestren efectividad para eliminar las lesiones presentes. Hasta donde se tiene registro no existe información publicada de la asociación de inestabilidad cromosómica específica, telómeros, VPH y CaCU, por lo cual representaría una aportación nueva al conocimiento del desarrollo de esta enfermedad. Los resultados también servirán como datos estadísticos de los genotipos de VPH más comunes, asociados con inestabilidad cromosómica, entre la población local. De igual manera, con dicha información se puede proponer el desarrollo de vacunas nuevas dirigidas específicamente contra los genotipos más frecuentes entre la población mexicana.

## **HIPÓTESIS**

### **Hipótesis alterna**

Se encontrará un incremento de daño en las regiones teloméricas del DNA asociado al grado de neoplasia cervical producto de la infección por VPH

### **Hipótesis nula**

No se encontrará un incremento de daño en las regiones teloméricas del DNA asociado al grado de neoplasia cervical producto de la infección por VPH.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Analizar la inestabilidad cromosómica en secuencias teloméricas de células epiteliales aisladas de tejido cervical de mujeres con neoplasia cervical con distintos grados mediante DBD-FISH y determinar los genotipos virales presentes.

### **Objetivos específicos**

Analizar y cuantificar la inestabilidad cromosómica en secuencias teloméricas de mujeres con neoplasia cervical con distintos grados y comparar los resultados con un grupo control mediante DBD-FISH.

Detectar y comparar los genotipos de VPH presentes en mujeres con neoplasia cervical con distintos grados y pacientes control.



## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Ubicación del estudio*

Se obtuvieron muestras de raspado cervical de mujeres con diagnóstico histopatológico de Lesión Intraepitelial (LIE) con Bajo Grado (LIE-BG) (n = 10) y Alto Grado (LIE-AG) (n = 10), así como Controles sin daño cervical (n = 10) provenientes de la Unidad Médica de Alta Especialidad No. 23 Hospital de Ginecología y Obstétrica del Instituto Mexicano del Seguro Social, previo consentimiento informado por escrito. Cada muestra fue colectada individualmente por el médico titular usando cepillos citológicos y depositados en tubos estériles con 1 mL de buffer PBS. Se trasladaron inmediatamente al Laboratorio de Citogenética Molecular perteneciente al Centro de Investigación Biomédica del Noreste (Instituto Mexicano del Seguro Social) para su procesamiento.

A las mujeres se les aplicó una encuesta acerca de sus datos generales, antecedentes ginecobstétricos y datos sobre su estilo de vida, así como sus diagnósticos iniciales al momento de la revisión por el ginecólogo y su diagnóstico final hecho por biopsia y revisado por el anatómo-patólogo colaborador en el estudio. Estos datos nos ayudaron a seleccionarlas como pacientes (dentro de los dos grupos diferentes) o controles (Anexo 1).

Los criterios de inclusión para este estudio son: pacientes de entre 20 y 65 años que acudieron a consulta ginecológica por primera vez, no fumadoras, no tabaquismo, sin antecedentes de infecciones recurrentes, sin infecciones vaginales, sin tratamiento de anticonceptivos sin radioterapias ni quimioterapias. Para el grupo Control se seleccionaron pacientes sin daño cervical que acudieron para estudios de Papanicolau.

Así mismo se les informaron los motivos de la investigación y el riesgo de obtener sus muestras para este estudio. Todo esto debidamente manifestado en la hoja de consentimiento informado por escrito, la cual se les leyó y se les aclararon sus dudas, otorgando además su firma como autorización.

El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Nacional de Ética e Investigación Científica del IMSS (Registro R-2019-785-004) y se realizó de acuerdo con los estándares

éticos internacionales de la Declaración de Helsinki para estudios de investigación con sujetos humanos.

A las muestras se les realizaron las siguientes pruebas: DBD-FISH (DNA Breakage Detection-Fluorescence *In Situ* Hibridización), extracción de DNA y tipificación de VPH.

DBD-FISH parte de la aplicación de la técnica FISH para detectar secuencias específicas tanto a nivel cromosómico como celular. Para ello se utiliza una sonda, marcada fluorescentemente, que se une a la región de interés por complementariedad de bases nitrogenadas del DNA de la muestra. La fluorescencia emitida tras la hibridación se puede observar en un microscopio de fluorescencia con los filtros adecuados para el rango de longitud de onda de la sonda. Se toman fotografías y se cuantifica la Densidad Integrada, en píxeles, que es la relación entre la señal fluorescente producida por la sonda y el área total del núcleo celular. Los valores se obtienen individualmente para cada núcleo y, a partir de estos, se obtiene un valor global para cada muestra y para cada grupo, que se interpreta como el nivel de daño en DNA.

## **I. Inestabilidad cromosómica específica en telómeros**

### *Preparación de las muestras*

Las muestras colectadas se centrifugaron los tubos con el cepillo durante 10 min a 4000 rpm, posteriormente se retiró el cepillo y se repitió el proceso. Se descartó el sobrenadante y se goteó cada muestra en portaobjetos para observar su concentración celular, aquellas con menos de 6 células por campo no se procesaron.

### *DBD-FISH*

Con una micropipeta se tomaron 30  $\mu$ L de cada muestra de células de raspado de epitelio cervical (pacientes y controles) y se colocaron en tubos Eppendorf previamente preparados con 50  $\mu$ L de agarosa al 1%. Para asegurar que ésta pudiera mezclarse con las muestras, previamente se colocaron los tubos en plancha de calor por 5 min a 80°C para posteriormente mantenerlos en baño de agua a 37°C hasta su uso. La mezcla se colocó sobre portaobjetos de vidrio (previamente embebidos en agarosa) en dos sectores diferentes, inmediatamente se cubrieron con cubreobjetos de vidrio (22 x 22 mm); este

proceso se hizo por duplicado para cada muestra. A continuación, las laminillas se depositaron sobre una charola de aluminio previamente enfriada y se mantuvieron en refrigeración a 4°C por 5 min. Se removieron con cuidado los cubreobjetos y se colocaron las laminillas en posición horizontal dentro de cajas de vidrio con soluciones en el siguiente orden: solución de lisis suave (Tris-HCl 2M, NaCl 5M, SDS 10%, EDTA 0.5M) por 30 min, buffer TBE 1X por 10 min, NaCl 0.9% por 2 min, solución alcalina fuerte (NaOH 0.03M, NaCl 1M) por 2.5 min, solución neutralizante (Tris-HCl 0.4M) por 5 min, buffer TBE 1X, etanol 70 % por 2 min, etanol 90% por 2 min y etanol 100% por 2 min. Cada paso se realizó a temperatura ambiente, después del último paso se dejaron secar las laminillas cubriéndolas para evitar su degradación.

Al día siguiente se tiñó una de las dos regiones de cada laminilla con 7 µL de yoduro de propidio 1:100 y se cubrieron con cubreobjetos de 18 x 18 mm, se dejaron incubar en oscuridad por 15 min. Posteriormente se visualizaron con microscopio de fluorescencia con filtro Texas Red, esperando ver los núcleos de las células con una estructura en forma de halo alrededor de estos (Anexo 2), lo cual indicó que la técnica de DBD se realizó correctamente. Se seleccionaron aquellas laminillas con la mayor concentración de núcleos para la hibridación FISH.

#### *Hibridación con sonda telomérica*

Para la hibridación de telómeros se utilizó la sonda PNA pantelomérica humana que marca los telómeros de todos los cromosomas humanos (Dako®, México). La hibridación se realizó en células de raspado cervical de los grupos de estudio y grupo control, previo tratamiento con DBD. Se colocaron 7 µL de la sonda marcada en un tubo Eppendorf esterilizado de 200 µL y se llevó a 80°C por 5 min sobre una plancha de calor, transcurrido el tiempo la sonda desnaturalizada se colocó en un área diana de la laminilla, se cubrió con cubreobjetos de plástico y se incubó en oscuridad a 37°C por 30 min. Transcurrido el tiempo de hibridación se removió el cubreobjetos y se realizó una serie de lavados post hibridación de la siguiente forma: formamida al 50% en 2X SSC por 10 min por triplicado, 2X SSC por 10 min, 2X SSC/0.1% NP-40 por 5 min; cada uno a temperatura ambiente. Sin dejar secar las laminillas, se agregaron 7 µL de colorante DAPI (4', 6-diamidino-2-

fenilindol) y se cubrió con cubreobjetos de 18 x 18 mm. Se incubaron a 4°C en oscuridad por 15 min para posteriormente observar cada una al microscopio.

#### *Análisis al microscopio de fluorescencia*

Las laminillas procesadas se analizaron en un microscopio de fluorescencia Axiophot, Zeiss® (Carl Zeiss, Alemania) equipado con filtros para emisión de fluorescencia roja (Texas red) y azul (DAPI). Se obtuvieron fotografías a color, en formato JPEG, de 30 núcleos con señales de hibridación por cada muestra, para ambos grupos de estudio y grupo control utilizando una cámara CCD AxioCam, Zeiss ® (Carl Zeiss, Alemania) de 16 bits.

#### *Análisis de imagen*

Se analizaron las fotografías mediante el software Image J versión 1.4.3.6.7 (National Institutes of Health, Bethesda, USA, 2012) (Rasband 1997). Para cada núcleo se delimitó manualmente la extensión del halo producido por el DBD y se ajustó el umbral (Threshold) de medida de las señales fluorescentes producidas por la hibridación. El software expresa la Densidad Integrada (DI) como la relación entre el área total y la intensidad fluorescente producida para cada núcleo celular, transformando las mediciones de DI en valores numéricos (píxeles).

## **II. Genotipificación del VPH**

#### *Extracción de DNA*

Se realizó la extracción de DNA de las muestras de epitelio cervical de los grupos de estudio y grupo control con el kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega Corporation, Estados Unidos) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El DNA obtenido de cada muestra se cuantificó en un Nanodrop® MultiGene (Labnet International, Estados Unidos) y se almacenó a -20°C hasta su utilización.

#### *PCR y tipificación del VPH*

La tipificación viral de las muestras se realizó con el kit INNO-LiPA ® HPV Genotyping Extra (Fujirebio, Japón) que, mediante hibridación reversa, distingue hasta 28 diferentes

genotipos de VPH por detección de secuencias de la región génica L1. Se detectan los genotipos de Bajo Riesgo: 06, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, y 71. Por su parte, los genotipos de Alto Riesgo que se detectan son: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 68, 69, 70 y 82. Primero, se amplificó por PCR el DNA de cada muestra con primers GP5 y GP6 (Snijders *et al.*, 1990), GoTaq Green Master Mix (Promega Corporation, Estados Unidos) y H<sub>2</sub>O libre de nucleasas.

El protocolo de amplificación fue el siguiente: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, desnaturalización a 95°C por 30 s (40 ciclos), alineamiento a 44°C por 1 min, extensión a 72°C por 1.5 min y extensión final a 72°C durante 10 min. Se produjeron amplicones biotinilados que se sometieron a desnaturalización a temperatura ambiente por 5 min y se aplicaron sobre tirillas con sondas dirigidas a L1 previamente colocadas al interior de una charola con canales, se incubaron en baño de agua a 49°C con agitación a 80 rpm, por 1 h. Después de la hibridación se lavaron las tirillas dos veces con solución astringente (previamente calentada a 37°C) y dos agitaciones suaves por 10-20 s a temperatura ambiente. Se depositó fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina en cada canal de la charola y se incubaron en agitación, a temperatura ambiente por 30 min, a continuación, se incubaron nuevamente a 49°C por 1 h tras añadir el cromógeno. Se almacenaron las tirillas en oscuridad durante toda la noche para el revelado de color. Tras el procesamiento se produjeron líneas de tonalidad azul-púrpura a lo largo de las tirillas, correspondientes a los genotipos detectados en cada muestra. Para la interpretación visual de los resultados se consultó la guía proporcionada por el fabricante.

### **III. Análisis estadístico**

Para cada grupo de estudio se obtuvieron los promedios de edad, número de parejas sexuales, gestas, edad de la primera gesta y número de hijos.

Las mediciones obtenidas con ImageJ se analizaron mediante Análisis de Varianza de un factor (ANOVA One Way) para encontrar diferencias significativas entre las medias de todas las poblaciones, con un 95% de confianza. Posteriormente se aplicó la prueba Student-Newman-Keuls para encontrar diferencias en Densidad Integrada (DI) entre cada grupo de estudio y grupo control, considerando como significativo un valor de  $p < 0.05$ .

Para todas las pruebas se utilizó el software IBM SPSS 20.0 (IBM Corporation, Estados Unidos, 2011) para el sistema operativo Windows 11®.

A partir de un estudio previo de 3 personas por grupo se delimitó el tamaño de muestra con el software MINITAB V12.0. Se aplicó un ANOVA One Way con un  $\alpha = 1\%$ , con poder estadístico del 99% y medias (transformación logarítmica base 10) de 7.82 (Control), 8.85 (LIE-BG) y 10.48 (LIE-AG).

A partir de los datos de genotipificación se determinaron las frecuencias para cada genotipo en cada grupo de estudio, así como los porcentajes globales correspondientes a cada genotipo. Asimismo, se obtuvo el porcentaje de infección, coinfección y genotipos BR y AR para cada grupo de estudio.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Descripción de población de estudio*

De acuerdo con los datos de la encuesta aplicada a pacientes (Tabla 1), en el grupo Control el promedio de edad fue de 43.38 años, el número de parejas sexuales fue de 2.25, 2.63 gestas, la edad promedio de la primera gesta fue de 19.75 años, 1 parto en promedio y 2 hijos en promedio. En el grupo LIE-BG la edad promedio fue de 36.4 años, En el grupo LIE-AG la edad promedio fue de 34.3 años, 3.2 parejas sexuales, una edad promedio de 14 años para la primera gesta, 2.2 partos y 2.4 hijos en promedio.

Se observó un decremento constante en la edad promedio para cada grupo, que fue acompañada de un incremento en el número de parejas sexuales entre el grupo LIE-BG y LIE-AG y el número de partos registrados para cada grupo. La edad promedio de la primera gesta fue en decremento considerable entre los tres grupos indicando un inicio de vida sexual a una menor edad en el grupo LIE-AG comparado a los otros dos grupos. Lo que explicaría también que en este grupo se haya registrado el mayor número de gestas y partos en promedio.

Estos resultados concuerdan con reportes que indican que un alto número de parejas sexuales (>2) y el inicio de la actividad sexual antes de la edad adulta son factores de riesgo que aumentan significativamente el riesgo de infección por VPH y el desarrollo de LIE debido a cambios celulares en el tejido cervical durante la adolescencia, así como la probabilidad de infección con más de un genotipo durante un periodo de tiempo más prolongado en comparación con mujeres que comienzan su vida sexual a mayor edad (Ribeiro *et al.*, 2015, Yang *et al.*, 2022).

De acuerdo con reportes previos un alto número de nacimientos (>3) se puede considerar también un factor de riesgo importante debido al daño prolongado en el tejido cervical que lo haría más susceptible a infecciones (Yang *et al.*, 2020). Dado que los grupos LIE-BG y LIE-AG presentaron un promedio cercano a este valor, 2.6 y 2.4 respectivamente, es posible que este factor influenciara la presencia de VPH en pacientes de dichos grupos.

<b>Tabla 1. Antecedentes clínico-obstétricos de pacientes Control LIE-BG y LIE-AG</b>					
<b>Diagnóstico</b>	<b>Edad</b>	<b>No. parejas sexuales</b>	<b>Gestas</b>	<b>Edad primera gesta</b>	<b>No. hijos</b>
Control	36	5	3	21	3
	45	1	4	27	3
	54	3	3	23	3
	62	3	4	20	1
	24	2	2	20	2
	28	1	0	0	0
	53	2	3	25	2
	45	1	2	22	2
<b><math>\bar{x}</math></b>	<b>43.38</b>	<b>2.25</b>	<b>2.63</b>	<b>19.75</b>	<b>2.00</b>
LIE-BG	55	0	0	0	0
	28	1	3	17	3
	24	3	4	15	4
	45	1	2	17	2
	23	4	2	19	2
	52	2	5	19	5
	38	1	3	17	3
	25	3	3	14	4
	27	4	1	19	1
	47	3	2	23	2
<b><math>\bar{x}</math></b>	<b>36.40</b>	<b>2.20</b>	<b>2.50</b>	<b>16.00</b>	<b>2.60</b>
LIE-AG	40	3	5	17	3
	27	3	3	15	3
	36	3	3	21	3
	37	3	3	14	3
	24	2	0	0	0
	65	4	3	19	3
	37	4	6	17	6
	26	4	3	17	1
	23	4	0	0	0
	28	2	2	20	2
<b><math>\bar{x}</math></b>	<b>34.30</b>	<b>3.20</b>	<b>2.80</b>	<b>14.00</b>	<b>2.40</b>



### *Hibridación en telómeros*

Tras el procesamiento con DBD-FISH se tomaron las fotografías correspondientes (Figura 1 A), los núcleos del grupo Control (Figura 1 B) mostraron una baja cantidad de señales de hibridación, así como un halo circundante poco notable, evidenciando un nivel de daño telomérico mínimo producto del daño basal esperado en ausencia de infección por VPH.

En los núcleos procesados del grupo LIE-BG se produjeron halos circundantes de mayor tamaño que en el grupo Control (Figura 1 C), que corresponden a material genético dañado que ha salido del núcleo. Asimismo, se detectó una mayor proporción de señales de hibridación no solo al interior del núcleo sino por fuera de este en las áreas correspondientes a los halos. En conjunto, esto indicó un incremento en el nivel de daño telomérico notable respecto al grupo Control, lo cual va en concordancia con el grado de las lesiones de las pacientes en este grupo.

En los núcleos de LIE-AG (Figura 1 D) la extensión de los halos fue más pronunciada, de igual forma se detectó la mayor cantidad de señales fluorescentes tanto dentro como fuera del núcleo. Es en este último donde grupo se concentra el mayor daño telomérico detectable en correspondencia con la severidad de las lesiones producto de la infección, concordando así con estudios previos donde se demostró una relación similar entre el nivel de señales fluorescentes y el área del halo generado con el nivel de daño genómico (Cortés Gutiérrez *et al.*, 2011, 2013). Dicho daño conllevaría un nivel considerablemente alto de inestabilidad cromosómica, lo que favorecería el desarrollo de CaCU producto de la incidencia de rearrreglos cromosómicos, así como aneuploidías en el cromosoma 11, duplicación de centrosomas y la aparición de células con metafases anormales (Duensing y Münger, 2002).

La aplicación de DBD-FISH (en conjunto con la cuantificación de DI) resulta una metodología idónea para identificar diferencias reales en el daño cromosómico en regiones específicas del genoma, que son imposibles de determinar solamente con una observación visual de las LIE y que está sujeta a errores por parte del personal que la efectúa. Otra ventaja de este enfoque es la facilidad de la técnica, de modo que no es necesario personal especializado para realizarla y la rápida obtención de resultados, permitiendo un análisis de daño genómico preciso (al hacer uso de sondas específicas) a

nivel de núcleos individuales, lo que además evidencia la flexibilidad de la técnica para analizar diferentes tipos de células y su potencial para aplicarse en un contexto clínico (Fernández y Gosálvez, 2002).

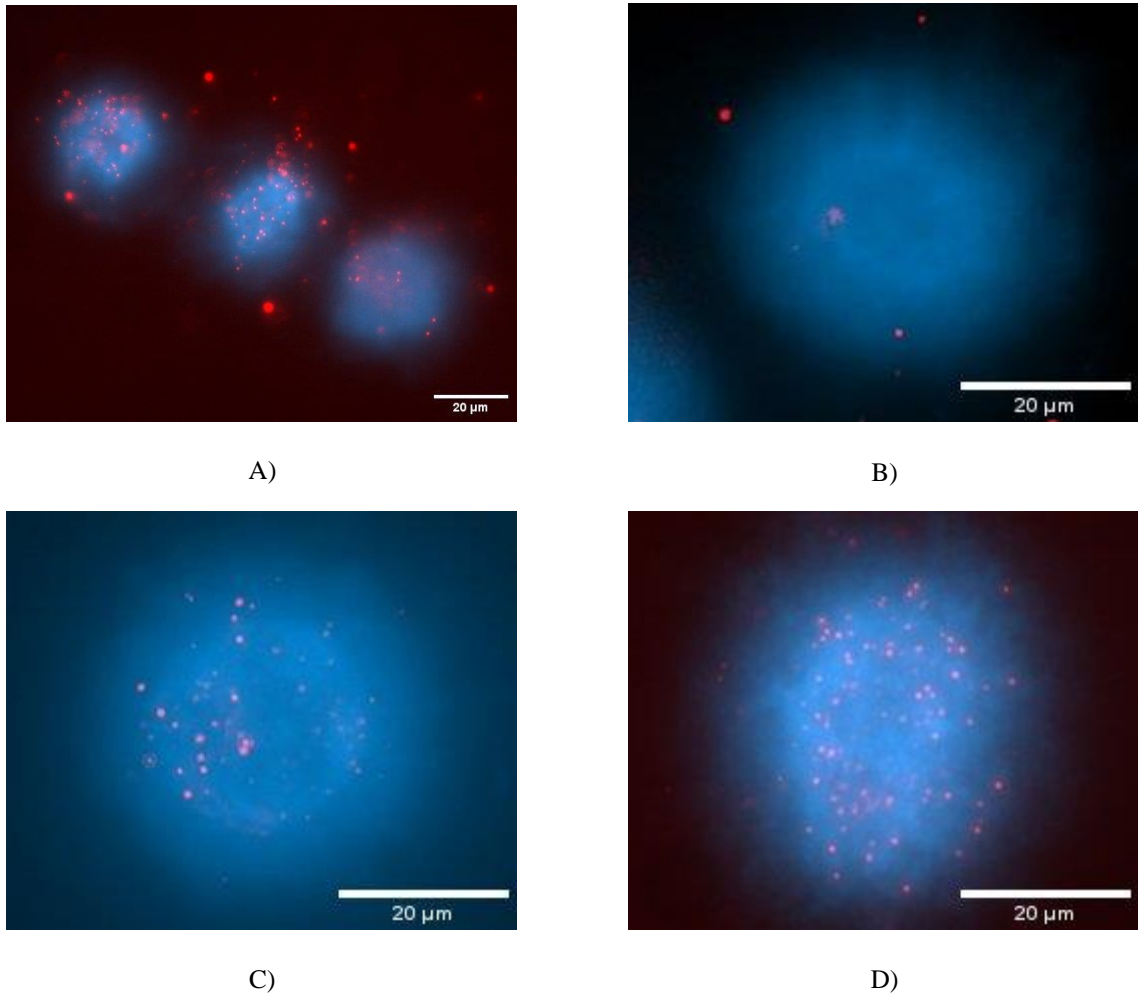


Figura 1. Núcleos tratados con DBD-FISH con hibridación en telómeros (rojo) y tinción de contraste DAPI (azul): A) Vista general, B) Control, C) LIE-BG y D) LIE-AG

### *Medición de Densidad Integrada*

Se mostraron diferencias significativas en la DI cuantificada para cada grupo (Tabla 2), incrementando de manera directamente proporcional al grado de severidad de la lesión y concordando con los resultados visuales de hibridación previamente obtenidos. Se partió de un valor de 2304.70 píxeles obtenido para el grupo Control (con una significancia de  $p < 0.05$ ), mostrando un incremento de casi el doble para LIE-BG (4228.92 píxeles) y, respecto a este, más del doble en LIE-AG (8585.41 píxeles). El área promedio de núcleo mostró una ligera diferencia entre los grupos Control y LIE-BG, la diferencia más pronunciada se mostró entre el grupo LIE-BG y el grupo LIE-AG apoyando los resultados de DBD-FISH anteriores.

Estos resultados concuerdan con antecedentes en secuencias satelitales de 5 pb en el cromosoma 1, donde se comprobó un incremento gradual de DI con relación al grado de LIE en pacientes, indicando una mayor inestabilidad genómica en el grupo de mayor severidad. A partir de estos resultados se postula que la progresión al desarrollo de CaCU involucra una inestabilidad genómica incrementada en dicho cromosoma (Cortés Gutiérrez *et al.*, 2013). De igual manera, se ha identificado que la secuencia 1p36 del cromosoma 1 es un sitio donde la inestabilidad cromosómica aumenta proporcionalmente al grado de LIE, por lo que podría tratarse de una característica de la progresión a CaCU (Cortés Gutiérrez *et al.*, 2020).

Se ha comprobado que la infección con VPH AR está relacionada con una incidencia de aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales como aneuploidías, deleciones o inversiones de genes supresores tumorales y/o amplificación de oncogenes, causando la inestabilidad genómica del huésped y facilitando así el desarrollo de CaCU (Bodelon *et al.*, 2016).

Estos antecedentes sugieren que las secuencias repetitivas, como son los telómeros, podrían ser “puntos calientes” de inestabilidad cromosómica en comparación con otras regiones del genoma, sin embargo, es necesario analizar otro tipo de secuencias de esta naturaleza para comprobar si esta relación también se observa.

<b>Tabla 2. Comparación de DI (pixeles) en secuencias teloméricas de epitelio cervical de pacientes Control, LIE-BG y LIE-AG</b>				
<b>Diagnóstico</b>	<b>Área</b>	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>DI</b>
Control	7640.80	143.14	1.75	1844.06
	7002.20	138.76	1.74	2651.35
	450.10	161.76	5.01	2542.46
	458.62	163.17	5.92	2983.10
	1443.20	142.22	2.65	1067.39
	2697.33	148.24	3.01	2250.76
	1364.60	147.23	6.57	2310.56
	6701.57	186.83	1.54	2787.89
<b><math>\bar{x}</math></b>	<b>3469.80</b>	<b>153.92</b>	<b>3.52</b>	<b>2304.70</b>
LIE-BG	2679.40	146.59	2.06	4844.93
	5517.26	179.29	0.97	4877.89
	4974.43	149.20	1.03	4635.74
	2482.45	150.05	1.66	3732.54
	1570.20	149.30	4.65	3811.58
	2565.03	129.16	6.69	4248.07
	6184.64	136.02	4.28	3772.80
	4496.38	133.04	6.06	4417.98
	5525.00	162.69	1.02	3930.51
	2446.57	143.40	4.68	4017.15
<b><math>\bar{x}</math></b>	<b>3844.14</b>	<b>147.87</b>	<b>3.31</b>	<b>4228.92</b>
LIE-AG	2842.03	137.79	6.61	6467.98
	4999.44	153.14	3.75	7566.04
	3171.90	126.60	5.83	5980.08
	4232.09	173.95	0.94	8119.93
	5081.03	124.34	7.00	6040.69
	7126.33	139.19	4.86	18699.40
	3075.64	147.30	8.36	7801.24
	5888.00	149.56	5.54	10063.40
	4217.64	155.60	1.50	6956.53
	9135.25	151.63	1.44	8158.85
<b><math>\bar{x}</math></b>	<b>4976.94</b>	<b>145.91</b>	<b>4.58</b>	<b>8585.41</b>

SD = Desviación Estándar

DI = Densidad Integrada

### *Genotipificación de VPH*

Las tirillas de genotipificación (Figura 2) para el grupo Control solo mostraron las bandas correspondientes a los controles internos del kit INNO-LiPA (Figura 2 A, todas las muestras analizadas mostraron un resultado negativo para VPH tal como se esperaba; se detectó infección en el 100% de las muestras de LIE-BG y LIE-AG. En el caso del grupo LIE-BG (Figura 2 B, coinfección con VPH6, 61 y 62) el 30.9% de los genotipos detectados fueron VPH BR mientras que un 69.1% fueron VPH AR. Para el grupo LIE-AG la proporción de genotipos detectados fue de un 21.1% de VPH BR y 78.9% de VPH AR (Figura 2 C, infección con VPH16).

Los genotipos de VPH (Tabla 3) más comunes para el grupo LIE-BG fueron 16, 31 y 44, todos de tipo AR mientras que tipos BR como 6, 61 y 62 fueron los menos detectados. El 90% de casos en este grupo fueron coinfecciones en tanto que solo el 10% correspondió a monoinfecciones. En el grupo LIE-AG los genotipos de mayor frecuencia fueron 16 y 31, ambos AR, el 60% de casos fueron infecciones mientras que el 40% fueron coinfecciones. De manera global, la proporción fue de 65% de coinfecciones y 35% fueron monoinfecciones. Estos hallazgos coinciden con estudios previos donde se han reportado hasta un 70.83% de coinfecciones contra 29.17% de monoinfecciones en muestras de pacientes mexicanas con LIE-BG, LIE-AG y carcinomas (Padilla-Mendoza *et al.*, 2020). En contraste, también se reportan relaciones inversas en donde las coinfecciones representaron apenas entre un 26 y 28% mientras que las monoinfecciones entre 72 y 73% de casos positivos en poblaciones de China y Francia. (Zhong *et al.*, 2022; Auvray *et al.*, 2023). Una relación similar se reportó con un 24.7% de coinfección contra 75.3% de monoinfecciones detectadas, en donde la proporción de coinfecciones fue en decremento conforme a la severidad de la lesión cervical (Tang *et al.*, 2023). Las diferencias en la proporción infección/coinfección, observadas entre LIE-BG y LIE-AG de este estudio, coinciden con esta última tendencia sin embargo no parece haber una correlación entre la presencia de múltiples genotipos y el riesgo de desarrollar lesiones de mayor severidad.

En LIE-AG VPH16 fue el genotipo que mostró la mayor prevalencia seguido de VPH31, mientras que el resto mostraron una frecuencia muy similar. Por el contrario, en LIE-BG VPH16, VPH31 y VPH52 fueron detectados con exactamente la misma prevalencia. Estos

resultados concuerdan parcialmente con antecedentes que reportaron a VPH16 (27.4%) y VPH33 (12.1%) como los más prevalentes en pacientes con LIE-AG, mientras que VPH31 fue el tercero más frecuente (9.9%). En pacientes con LIE-BG la proporción de VPH33 (13.4%) y VPH16 (10.6%) fue inversa en tanto que VPH52 tuvo una prevalencia marcadamente inferior (0.6%) (Illades-Aguilar *et al.*, 2010).

De manera general, VPH16 fue el genotipo más frecuente con el 16.2% del total de detecciones, seguido de VPH31 representando el 10.8%, esto coincide con reportes previos donde estos mismos fueron los más prevalentes con 52.08% y 22.91%, respectivamente, de entre trece genotipos detectados en pacientes con lesiones cervicales (Padilla-Mendoza *et al.*, 2020). Asimismo, en otros reportes VPH16 presentó la mayor prevalencia del 53.2%, si bien se mostró una diferencia más pronunciada respecto a la prevalencia de VPH31, la cual representó el 14% del total (Auvray *et al.*, 2023).

En la población mexicana la distribución de genotipos es muy variable dependiendo de la zona del país, en el centro VPH16 es más común mientras que en la región sur hay mayor prevalencia de VPH58 y VPH33 (Illades-Aguilar *et al.*, 2010). A nivel mundial VPH16, seguido de VPH18 son los más prevalentes (Cospér *et al.*, 2021). Por tanto, cabe dentro de lo esperado que se detectaran genotipos distintos a los ya mencionados, posiblemente debido a las condiciones geográficas heterogéneas del país que facilitan el contagio de ciertos genotipos en particular.

De acuerdo con antecedentes, se sugiere que en casos de coinfección (que representaron el 26.3% del total de casos analizados) la presencia de otros genotipos ayuda a mitigar la patogenicidad que VPH16 ejerce por sí solo y que la severidad de lesiones cervicales depende principalmente de la proporción en la que este se encuentre presente (Zhong *et al.*, 2022). De igual manera no se ha encontrado que una coinfección aumente significativamente el riesgo de desarrollar lesiones de mayor severidad, pero sí es dependiente del tipo de VPH presente y su carga viral (Adcock *et al.*, 2019). Dado que se detectó, en su mayoría, VPH AR en ambos grupos resultaría factible priorizar el seguimiento a pacientes en base al o los genotipos detectados, así como comenzar a contemplar otros parámetros (como la ya mencionada carga viral) que permitan un monitoreo más completo y preciso.

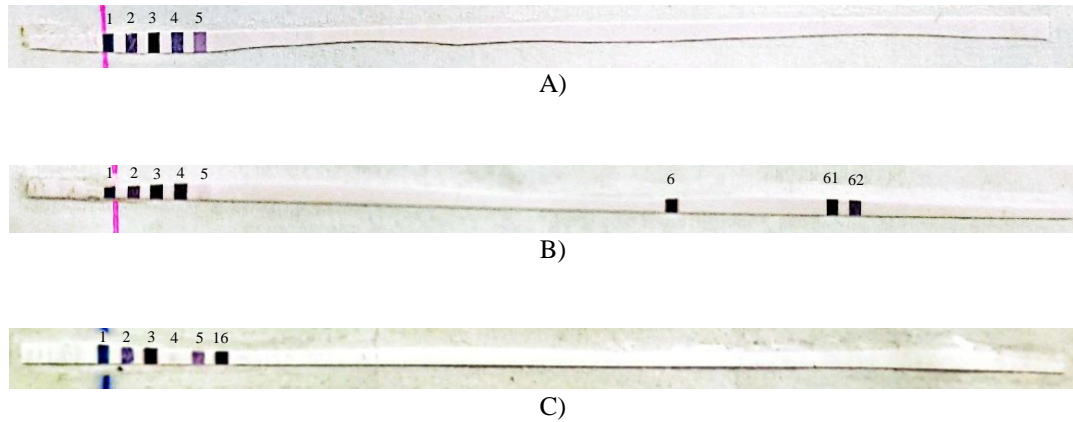


Figura 2. Genotipificación de VPH de muestras A) Control, B) LIE-BG (VPH6, 61, 62) y C) LIE-AG (VPH16). 1. Marcador, 2. Control conjugado, 3. Control hDNA, 4 y 5. Control VPH

Tabla 3. Genotipos de VPH detectados en pacientes Control, LIE-BG y LIE-AG																				
Grupo	VPH																			
	Bajo Riesgo							Alto Riesgo												
	06	11	44	54	61	62	71	16	26	31	33	39	51	52	56	58	68	69	70	82
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LIE-BG	1	1	6	6	1	1	1	7	1	7	6	0	4	7	0	1	1	1	1	2
LIE-AG	2	0	1	0	0	1	0	5	0	1	0	1	1	0	1	3	1	0	2	0
<b>Total</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>12</b>	<b>1</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>2</b>
<b>%</b>	<b>4.0</b>	<b>1.4</b>	<b>9.5</b>	<b>8.1</b>	<b>1.4</b>	<b>2.7</b>	<b>1.4</b>	<b>16.2</b>	<b>1.4</b>	<b>10.8</b>	<b>8.1</b>	<b>1.4</b>	<b>6.8</b>	<b>9.5</b>	<b>1.4</b>	<b>5.4</b>	<b>2.7</b>	<b>1.4</b>	<b>4.0</b>	<b>2.7</b>

## CONCLUSIONES

Se observó la asociación entre el grado de inestabilidad cromosómica (medida como Densidad Integrada) en secuencias teloméricas y la gravedad de lesiones intraepiteliales producidas por VPH, indicando que dicha inestabilidad es un evento de aparición temprana que facilita el desarrollo de CaCU debido a las múltiples regiones en donde se presentaron rompimientos en DNA, especialmente en pacientes con LIE-AG en comparación a los otros grupos; estos hallazgos fueron los esperados considerando la naturaleza repetitiva de las secuencias teloméricas. De igual manera, los genotipos detectados (todos del grupo de alto riesgo) así como la presencia de coinfecciones fueron lo esperado para ambos grupos. Es posible que suceda esta misma relación en otras regiones del genoma de manera simultánea, contribuyendo en conjunto a una mayor desestabilización genómica como un efecto ejercido por el virus y que, posiblemente se vea acentuado en casos de coinfección.



## **PERSPECTIVAS**

La cuantificación de inestabilidad cromosómica, expresada como Densidad Integrada, y su relación con el grado de severidad de neoplasias cervicales permite obtener un mejor panorama de los efectos ejercidos por el VPH en el genoma en etapas previas al desarrollo carcinogénico, así como una identificación precisa de los genotipos que pueden estar ejerciendo dichos efectos, que con otros enfoques sería más complejo de analizar. Dada la facilidad y rapidez con la que esta metodología produce resultados es idónea para analizar otras regiones del genoma en donde también pudiera presentarse esta relación entre inestabilidad y gravedad de lesiones intraepiteliales, de ser posible escalarse a un uso clínico masificado y en base a ello, elegir el curso de acción más adecuado a seguir con los pacientes a fin de evitar el desarrollo de CaCU.

## BIBLIOGRAFÍA

Adcock R, Cuzick J, Hunt WC, McDonald RM & Wheeler CM. 2019. Role of HPV genotype, multiple infections, and viral load on the risk of high-grade cervical neoplasia. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 28(11), 1816-1824

Akagi K, Li J, Broutian TR, Padilla-Nash H, Xiao W, Jiang B & Gillison ML. 2014. Genome-wide analysis of HPV integration in human cancers reveals recurrent, focal genomic instability. *Genome research*, 24(2), 185-199.

Atkin NB, Baker MC & Fox MF. 1990. Chromosome changes in 43 carcinomas of the cervix uteri. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 44(2), 229-241.

Atkin NB. 1997. Cytogenetics of carcinoma of the cervix uteri: a review. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 95(1): 33-39.

Auvray C, Douvier S, Caritey O, Bour JB & Manoha C. 2023. Relative distribution of HPV genotypes in histological cervical samples and associated grade lesion in a women population over the last 16 years in Burgundy, France. *Frontiers in Medicine*, 10.

Bodelon C, Vinokurova S, Sampson JN, den Boon JA, Walker JL, Horswill MA, Korthauer K, Schiffman M, Sherman ME, Zuna RE, Mitchell J, Zhang X, Boland JF, Chaturvedi AK, Dunn ST, Newton MA, Ahlquist P, Wang SS & Wentzensen, N. 2016. Chromosomal copy number alterations and HPV integration in cervical precancer and invasive cancer. *Carcinogenesis*, 37(2), 188-196.

Bulten J, Melchers WJ, Kooy-Smits MM, de Wilde PC, Poddighe PJ, Robben JC & Hanselaar AG. 2002. Numerical aberrations of chromosome 1 in cervical intraepithelial neoplasia are strongly associated with infection with high-risk human papillomavirus types. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 198(3): 300-309.

Chan CK, Aimagambetova G, Ukybassova T, Kongrtay K, & Azizan A. 2019. Human papillomavirus infection and cervical cancer: epidemiology, screening, and vaccination—review of current perspectives. *J Oncol.*, 11.

Chelimo C, Wouldes TA, Cameron LD & Elwood JM. 2013. Risk factors for and prevention of human papillomaviruses (HPV), genital warts and cervical cancer. *Journal of Infection*, 66(3), 207-217.

Chrysostomou AC & Kostrikis LG. 2020. Methodologies of primary HPV testing currently applied for cervical cancer screening. *Life*, 10(11): 290.

Cortés Gutiérrez EI, Dávila Rodríguez MI, Muraira Rodríguez M, Said Fernández S & Cerda Flores RM. 2005. Association between the stages of cervical cancer and chromosome 1 aneusomy. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 159(1): 44-47.

Cortés Gutiérrez EI, Dávila Rodríguez MI, Fernández JL, López Fernández C & Gosálvez J. 2011. DNA damage in women with cervical neoplasia evaluated by DNA breakage detection-fluorescence in situ hybridization. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*, 33(3): 175-181.

Cortés Gutiérrez EI, Ortiz Hernández BL, Dávila Rodríguez MI, Cerda Flores RM, Fernández JL, López Fernández C & Gosálvez J. 2013. 5-bp classical satellite DNA loci from chromosome-1 instability in cervical neoplasia detected by DNA breakage detection/fluorescence in situ hybridization (DBD-FISH). *International Journal of Molecular Sciences*, 14(2): 4135-4147.

Cortés Gutiérrez EI, García-Vielma C, Dávila Rodríguez MI, Sánchez Dávila H, Fernández JL & Gosálvez J. 2020. 1p36 is a chromosomal site of genomic instability in cervical intraepithelial neoplasia. *Biotechnic & Histochemistry*, 95(2), 137-144.

Cosper PF, Bradley S, Luo Q & Kimple RJ. 2021. Biology of HPV Mediated Carcinogenesis and Tumor Progression. *Seminars in Radiation Oncology*. 31(4): 265-273.

Della Fera AN, Warburton A, Coursey TL, Khurana S & McBride AA. 2021. Persistent human papillomavirus infection. *Viruses*, 13(2), 321.

Duensing S & Münger K. 2002. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. *Cancer research*, 62(23), 7075-7082.

Else EA, Swoyer R, Zhang Y, Taddeo FJ, Bryan JT, Lawson J & Roberts CC. 2011. Comparison of real-time multiplex human papillomavirus (HPV) PCR assays with INNO-LiPA HPV genotyping extra assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(5), 1907-1912.

Fernández JL & Gosálvez J. 2002. Application of FISH to detect DNA damage: DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH). In *situ* Detection of DNA Damage: Methods and Protocols, 203-216.

Gheit T. 2019. Mucosal and cutaneous human papillomavirus infections and cancer biology. *Frontiers in Oncology*, 9, 355.

Gissmann L, Wolnik L, Ikenberg H, Koldovsky U, Schnürch HG & Zur Hausen H. 1983. Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(2), 560-563.

Gutiérrez Delgado C, Báez Mendoza C, González Pier E, Prieto de la Rosa A, Witlen R. 2008. Relación costo-efectividad de las intervenciones preventivas contra el cáncer cervical en mujeres mexicanas. *Salud Pública de México*. 50(2):107-11.

Heselmeyer Haddad K, Sommerfeld K, White NM, Chaudhri N, Morrison LE, Palanisamy N & Ried T. 2005. Genomic amplification of the human telomerase gene (TERC) in pap smears predicts the development of cervical cancer. *The American Journal of Pathology*, 166(4): 1229-1238.

Hernández Hernández DM, Apresa García T & Patlán Pérez RM. 2015. Panorama epidemiológico del cáncer cervicouterino. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 53(2): 154-161.

Illades-Aguilar B, del Carmen Alarcón-Romero L, Antonio-Véjar V, Zamudio-López N, Sales-Linares N, Flores-Alfaro E, Fernández-Tilapa G, Vences-Velázquez A, Muñoz-Valle JF & Leyva-Vázquez MA. 2010. Prevalence and distribution of human papillomavirus types in cervical cancer, squamous intraepithelial lesions, and with no

intraepithelial lesions in women from Southern Mexico. *Gynecologic oncology*, 117(2), 291-296.

Magalhães GM, Vieira ÉC, Garcia LC, Carvalho Leite D, de Lourdes Ribeiro M, Guedes ACM & Araújo MG. 2021. Update on human papilloma virus-part I: epidemiology, pathogenesis, and clinical spectrum. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 96: 1-16.

Manna GK. 1957. A study on the chromosome number of human neoplastic uterine cervix tissue. *Proc. Zool. Soc. Calcutta*, 1, 95-112.

Mendoza González Z. 2017. Programa de detección del cáncer cervicouterino: políticas públicas y experiencias de los actores que implementan el programa en el estado de Veracruz, México. *Salud colectiva*, 13: 521-535.

Nilyanimit P, Chansaenroj J, Poomipak W, Praianantathavorn K, Payungporn S, & Poovorawan Y. 2018. Comparison of four human papillomavirus genotyping methods: next-generation sequencing, INNO-LiPA, electrochemical DNA Chip, and nested-PCR. *Annals of laboratory medicine*, 38(2), 139-146.

Olaharski AJ, Sotelo R, Solorza-Luna G, Gonsebatt ME, Guzman P, Mohar A & Eastmond DA. 2006. Tetraploidy and chromosomal instability are early events during cervical carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 27(2), 337-343.

Padilla-Mendoza JR, Gómez-López LA, López-Casamichana M, Azuara-Liceaga EI, Cortés-Malagón EM, López-Cánovas L, Reyes-Hernández OD, Rodríguez MA, Bonilla-Delgado J, & López-Reyes I. 2020. Human papillomavirus coinfection in the cervical intraepithelial lesions and cancer of Mexican patients. *BioMed Research International*, 2020.

Pańczyszyn A, Boniewska-Bernacka E & Głąb G. 2018. Telomeres and telomerase during human papillomavirus-induced carcinogenesis. *Molecular diagnosis & therapy*, 22, 421-430.

Paintal AS & Nayar R. 2014. Cervical Cytology (The Pap Test). In Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms. Elsevier Inc. Estados Unidos. pp. 3345-3358.

Porter VL & Marra MA. 2022. The drivers, mechanisms, and consequences of genome instability in HPV-driven cancers. *Cancers*, 14(19), 4623.

Reddy VG, Khanna N, Jain SK, Das BC & Singh N. 2001. Telomerase-A molecular marker for cervical cancer screening. *International Journal of Gynecologic Cancer*, 11(2).

Ribeiro AA, Costa MC, Alves RF, Villa LL, Saddi VA, Carneiro MA, Zeferino LC & Rabelo-Santos SH. 2015. HPV infection and cervical neoplasia: associated risk factors. *Infectious Agents and Cancer*, 10, 1-7.

Rode A, Maass KK, Willmund KV, Lichter P & Ernst A. 2016. Chromothripsis in cancer cells: An update. *International Journal of Cancer*, 138(10), 2322-2333.

Sánchez Mercader A, Cámara Salazar A, Traconis Díaz V & Sánchez Buenfil G. 2021. Análisis de la mortalidad por cáncer cervicouterino en México y el estado de Yucatán. *Ginecología y Obstetricia de México*, 89(09), 671-677.

Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, De Sanjosé S, Fakhr C, Monk BJ, Stanley MA & Franceschi S. 2016. Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nature reviews Disease Primers*, 2(1), 1-20.

Secretaría de Salud. 2015. Lineamientos para la semana de sensibilización del cáncer de cuello uterino. México. Dirección Cáncer de la Mujer.

Shah UJ, Nasiruddin M, Dar SA, Khan MKA, Akhter MR, Singh N & Haque S. 2020. Emerging biomarkers and clinical significance of HPV genotyping in prevention and management of cervical cancer. *Microbial pathogenesis*, 143, 104131.

Sharma A, Rajappa M, Saxena A & Sharma M. 2007. Telomerase activity as a tumor marker in Indian women with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *Molecular diagnosis & therapy*, 11, 193-201.

Shay JW & Wright WE. 2019. Telomeres and telomerase: three decades of progress. *Nature Reviews Genetics*, 20(5), 299-309.

Snijders PJ, van den Brule AJ, Schrijnemakers HF, Snow G, Meijer CJ & Walboomers JM. 1990. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *Journal of General Virology*, 71(1), 173-181.

Spriggs AI, Boddington MM & Clarke CM. 1962. Carcinoma-in-situ of the cervix uteri: some cytogenetic observations. *The Lancet*, 279(7244), 1383-1384.

Sreekantaiah C, Bhargava MK & Shetty NJ. 1988. Chromosome 1 abnormalities in cervical carcinoma. *Cancer*, 62(7): 1317-1324.

Sung H, Ferla, J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A & Bray F. 2021. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249.

Tang X, Zhang H, Wang T, Jiang W, Jones TE, He Y, Li L, Tong L, Wang C, Wang W, Yang K, Yin R & Zhao C. 2023. Single and Multiple High-Risk Human Papillomavirus Infections in Histopathologically Confirmed Cervical Squamous Lesions: Incidences, Distribution, and Associated Detection Rates for Precancerous and Cancerous Lesions. *Laboratory Investigation*, 103(11), 100234.

Thomas LK, Bermejo JL, Vinokurova S, Jensen K, Bierkens M, Steenbergen R, Bergmann M, von Knebel Doeberitz M & Reuschenbach M. 2014. Chromosomal gains and losses in human papillomavirus-associated neoplasia of the lower genital tract—A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Cancer*, 50(1), 85-98.

Tonomura A. 1959. A chromosome survey in six cases of human uterine cervix carcinomas. *Jap. J. Genet.*, 34, 401-406.

Vargas-Rondón N, Villegas VE & Rondón-Lagos M. 2017. The role of chromosomal instability in cancer and therapeutic responses. *Cancers*, 10(1), 4.

Widschwendter A, Müller HM, Hubalek MM, Wiedemai, A, Fiegl H, Goebel G, Mueller-Holzner E, Marth C & Widschwendter M. 2004. Methylation status and expression of human telomerase reverse transcriptase in ovarian and cervical cancer. *Gynecologic Oncology*, 93(2), 407-416.

Yang D, Zhang J, Cui X, Ma J, Wang C & Piao H. 2022. Risk factors associated with human papillomavirus infection, cervical cancer, and precancerous lesions in large-scale population screening. *Frontiers in Microbiology*, 13, 914516.

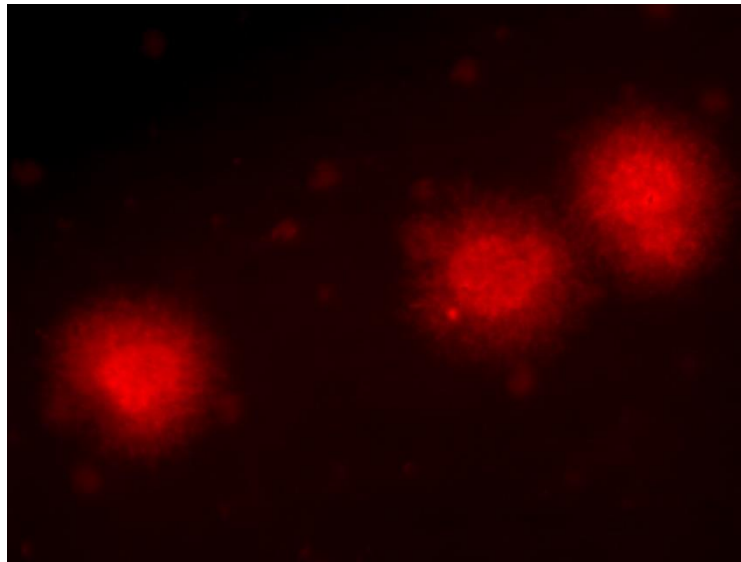
Yang J, Wang W, Wang Z, Wang Z, Wang Y, Wang J, Zhao W, Li D, Liu H & Hao M. 2020. Prevalence, genotype distribution and risk factors of cervical HPV infection in Yangqu, China: a population-based survey of 10086 women. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 16(7), 1645-1652.

Zhong F, Yu T, Ma X, Wang S, Cong Q & Tao X. 2022. Extensive HPV Genotyping Reveals High Association between Multiple Infections and Cervical Lesions in Chinese Women. *Disease Markers*, 2022.



## ANEXOS

<b>Anexo 1. Encuesta para selección de grupos de estudio (LIE-BG y LIE-AG) y grupo Control</b>		
<i>Datos generales</i>		
Nombre	No. Seguridad Social	Domicilio
Edad	Teléfono	Escolaridad
<i>Antecedentes clínico-obstétricos</i>		
Menarquia	Gestas	Edad primera gesta
Cesáreas	Partos	No. hijos
Abortos	Embarazos ectópicos	Fecha ultima menstruación
Leucorrea	No. de parejas sexuales	Método planificación familiar
Sangrado post coito	Infección cérvico vaginal	Fecha primer Papanicolau
<i>Antecedentes patológicos</i>		
Diabetes	Hipertensión arterial	Obesidad
Osteoporosis	Hipercolesterolemia	Cirugías
<i>Antecedentes generales</i>		
Hábitos alimenticios	Consumo de alcohol	Tabaquismo
Radiaciones	Medicación	
<i>Diagnóstico</i>		
Inicial	Fecha de biopsia	Fecha de resultado



Anexo 2. Núcleos sometidos a DBD (rojo: tinción con yoduro de propidio) mostrando el halo circundante característico de la técnica