

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ GENERALĂ**

TEZĂ DE DOCTORAT

**Conducător de doctorat:
PROF. UNIV. DR. MIRCEA IOAN POPA**

**Student-doctorand:
CRISTINA IULIA MITRAN**

ANUL 2020

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ GENERALĂ**

***ROLUL STRESULUI OXIDATIV ÎN PATOGENEZA
LEZIUNILOR DERMATO-VENEROLOGICE CAUZATE
DE VIRUSUL PAPILOMA UMAN
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT***

**Conducător de doctorat:
PROF. UNIV. DR. MIRCEA IOAN POPA**

**Student-doctorand:
CRISTINA IULIA MITRAN**

ANUL 2020

Cuprins

Introducere	1
PARTEA GENERALĂ	
1. Stresul oxidativ – un proces complex	6
1.1. Generarea stresului oxidativ	6
1.1.1. Radicalii liberi de oxigen	6
1.1.2. Rolul mitocondriei	7
1.1.3. Rolul reticulului endoplasmic.....	8
1.1.4. Alte surse de stres oxidativ	9
1.2. Sisteme antioxidante	9
1.2.1 Antioxidanți endogeni	10
1.2.1.1. Antioxidanți enzimatici	10
1.2.1.2. Antioxidanți non-enzimatici	11
1.2.2. Antioxidanți exogeni.....	13
1.3. Efectele stresului oxidativ	14
1.3.1. Efecte asupra acizilor nucleici	14
1.3.2. Efecte asupra proteinelor	15
1.3.3. Efecte asupra lipidelor	16
1.3.4. Efecte asupra glucidelor	18
2. Inter-relația dintre inflamație și stresul oxidativ	20
3. Infecția cu HPV	23
3.1. Ciclul de replicare al HPV	23
3.2. Istoria naturală a infecției cu HPV	26
3.3. Verucile cutanate - date generale	27
3.3.1. Date epidemiologice	27
3.3.2. Aspecte clinice și tipuri de HPV implicate	27
3.3.3. Elemente de diagnostic	29
3.3.4. Opțiuni terapeutice	30

3.4. Veruci genitale (condiloame acuminate) - date generale	31
3.4.1. Date epidemiologice	31
3.4.2. Aspecte clinice și tipuri de HPV implicate	31
3.4.3. Elemente de diagnostic	32
3.4.4. Opțiuni terapeutice	33
3.5. Alte leziuni cauzate de HPV	34
3.5.1. Epidermodisplazia veruciformă	34
3.5.2. Papuloza bowenoidă	34
3.5.3. Condilomatoza gigantă Buschke Lowenstein	35
3.5.4. Boala Bowen	36
3.5.5. Carcinomul spinocelular cutanat	36
3.6. HPV și carcinogeneza.....	36
3.6.1. Neoplazia intraepitelială cervicală	38
3.6.2. Cancerul de col uterin	38
3.6.1. Importanța screeningului	38
3.6.2. Aspecte histopatologice	39
3.6.3. Evoluție și tratament	40
3.7. Vaccinarea anti-HPV	40
4. Principalii factori implicați în patogeneza infecției cu HPV	42
4.1. Inflamația în infecția cu HPV	42
4.1.1. Rolul citokinelor	42
4.1.2. Rolul keratinocitelor	43
4.1.3. Rolul celulelor dendritice	44
4.1.4. Rolul limfocitelor T reglatoare și NK	44
4.1.5. Rolul anti-inflamatoarelor	45
4.2. Stresul oxidativ în patogeneza infecției cu HPV.....	46
4.2.1. Stresul oxidativ la pacienți cu veruci	46
4.2.2. Stresul oxidativ cofactor al carcinogenezei	47
4.2.3. Rolul oncoproteinelor virale în generarea stresului oxidativ.....	48
4.4.4. Terapia antioxidantă	49

CONTRIBUȚII PERSONALE

5. Material și metodă	51
5.1. Premisele cercetării	51
5.2. Scopul și obiectivele studiului	51
5.3. Selectarea pacienților	52
5.4. Recoltarea și prelucrarea probelor	53
5.5. Markerii determinați	54
5.6. Metode de lucru	55
5.7. Analiza statistică	63
6. Rezultate	65
6.1. Date generale	65
6.2. Studiul markerilor generali de stres oxidativ	72
6.3. Studiul markerilor specifici de stres oxidativ.....	79
6.4. Studiul markerilor inflamației	98
6.5. Studiul rolului sRAGE ca factor de protecție	104
6.6. Corelații între markeri generali de stres oxidativ și numărul de leziuni	112
6.7. Corelații între markeri generali de stres oxidativ și durata leziunilor	118
6.8. Relația dintre stresul oxidativ și inflamație	121
7. Discuții	127
7.1. Date epidemiologice	131
7.2. Markeri generali de stres oxidativ	133
7.3. Markeri specifici de stres oxidativ	134
7.3.1. 4-HNE	134
7.3.2. 8-OHdG	136
7.3.3. AGEs și pentozidina	138
7.3.4. sRAGE	140
7.3.5. Homeostazia tioli-disulfuri	142
7.4. Markerii ai inflamației	145
7.5. Stresul oxidativ și elemente clinice	149
8. Concluzii	150

9. Originalitatea studiului	153
9.1. Noi direcții de cercetare	153
9.2. Limitele studiului	154
Bibliografie	155
Anexe	184

PARTEA GENERALĂ

1. Virusul papiloma uman și principalele afecțiuni produse

Virusul papiloma uman (HPV) este un virus ubicuitar, având tropism pentru piele și mucoase. HPV aparține familiei *Papillomaviridae*, până în prezent fiind descrise peste 200 de tipuri, grupate în cinci genuri (alfa-, beta-, gamma-, mu- și nu- papilomavirusuri). Majoritatea tipurilor de HPV aparțin genurilor alfa, beta și gamma (1,2).

Genul alfa cuprinde tipuri cu tropism cutanat și la nivelul mucoaselor. Astfel spre exemplu grupul HPV alfa 4 care cuprinde tipurile HPV 2, 27 și 57 produce veruci cutanate. În schimb grupul HPV alfa 6, cu tipurile 6 și 11 are tropism atât cutanat cât și pe mucosae și conduce la apariția condiloamelor cutanate. Cele mai importante tipuri din genul alfa sunt tipurile oncogene 16, 31, 33, 35, etc., implicate în dezvoltarea cancerului de col uterin. De fapt, marea majoritate a tipurilor alfa au tropism mucos. În genul beta se regăsesc tipurile 5 și 8, asociate cu epidermodisplazia veruciformă. Toate tipurile din genul beta au tropism cutanat. Studii recente aduc în atenție rolul tipurilor beta în patogeneza carcinomului spinocelular (SCC) (3). Genurile gamma, mu și nu, cele mai rar întâlnite, se asociază cu veruci cutanate, neavând tropism pentru mucoase (4–6).

Verucile vulgare sunt foarte frecvente în populația generală, cei mai afectați fiind copiii, procentul ajungând până la 33%. Ulterior incidența scade cu vârsta. Având în vedere că imunitatea are un rol important, procentul crește în rândul celor imunosupresați până la 45% (1). Mai mult decât atât, tipuri din genurile HPV beta și gamma au fost puse în evidență la copii cu vârste de până la 4 ani, într-un procent de 70%. Unele studii au emis ideea că aceste virusuri ar trebui privite drept comensali ai tegumentului uman. Un studiu a pus în evidență că la 90% dintre indivizi a fost detectat HPV la nivelul firelor de păr, care ar reprezenta un rezervor al virusului (7).

În multe cazuri leziunile pot regresa spontan, astfel după doi ani până la 78% pot fi rezolvate complet. Pe lângă răspunsul imun un rol în regresie îl are și tipul viral și extensia bolii (8). În cazul adulților, rezoluția leziunilor are loc mai lent, uneori acestea pot persista chiar și 10 ani (9). Transmiterea infecției are loc prin contact direct în contextul existenței unor

microleziuni la nivel cutanat sau mai rar indirect prin obiecte contaminate, spre exemplu prin ustensilele folosite în saloanele de manichiură (10).

Infecția cu HPV este considerată una dintre cele mai frecvente infecții cu transmitere sexuală (ITS). În literatura medicală sunt listați mai mulți factori de risc pentru dobândirea infecției cu HPV pe cale sexuală. Dovezile cele mai clare sunt legate de numărul crescut de parteneri sexuali. Alți factori de risc, de care sunt legate anumite controverse, sunt fumatul și consumul de contraceptive orale (11). Statisticile arată că până la 70% dintre femeile active sexual devin infectate cu HPV de-a lungul vieții (8). Afectează în special adulții tineri. În majoritatea cazurilor infecția este subclinică și sistemul imun al gazdei reușește să elimine virusul (12).

2. Inflamația în infecția cu HPV

În infecția cu HPV pe lângă răspunsul imun de tip umoral se dezvoltă și un răspuns imun de tip celular, astfel la nivelul leziunilor au fost puse în evidență infiltrate cu limfocite T. În plus, în cazul regresiei verucilor genitale s-a observat un infiltrat format din mai multe tipuri celulare cu predominanța celulelor mononucleate (13). Procesul inflamator joacă un rol important în regresia verucilor. Astfel în studiul realizat de Iwatsuki și colab. pe țesut recoltat de la nivelul verucilor s-au identificat numeroase celule dendritice, limfocite T CD8 și keratinocite apoptotice, localizate la nivelul joncțiunii dermo-epidermice. Au fost identificate și leziuni fără semne de inflamație. În plus, s-a observat că celulele infectate sunt înconjurată de molecule virale anti-apoptotice (14). De asemenea, Nakayama și colab. au observat că în verucile neinflamatorii numărul celulelor Langerhans este scăzut, ceea ce protejează celulele infectate de răspunsul imun. Aceeași observație a fost făcută și pentru boala Bowen (15).

Se pare că în stadiile inițiale infecția cu HPV nu conduce la o reacție inflamatorie, dar persistența virusului declanșează diferite căi, care în cele din urmă conduc la inițierea și perpetuarea unui proces inflamator cronic (13).

2.1. Rolul citokinelor

Inflamația cronică implică creșterea nivelului stresului oxidativ care va avea ca efect scăderea răspunsului imun de tip celular cu rol important în prevenția infecțiilor virale. Astfel inflamația cronică induce trecerea răspunsului imun de la unul de tip 1 la un răspuns imun de

tip 2 (16). Factorul de creștere transformator (TGF) beta, factorul de necroză tumorală (TNF) alfa, interferon (IFN) gamma și interleukina (IL)-1 sunt implicate în reglarea proliferării celulelor infectate cu HPV. Dar, prin diferite mecanisme, HPV reușește să își continue replicarea, având loc extinderea și persistența infecției (17). Rolul răspunsului imun de tip 1 în apărarea împotriva virusului a fost dovedită de Tsukui care a inclus în studiu femei cu leziuni de neoplazie intraepitelială cervicală cu grad înalt, cu grad scăzut și cu aspect clinic-patologic normal. Eliberarea de IL-2 a fost crescută în cazul femeilor sănătoase și s-a observat o scădere cu creșterea gravității (18). Într-un alt studiu niveluri crescute de IFN gamma și IL-10 s-au asociat cu un risc mai scăzut de a avea o leziune cervicală cu grad înalt (19).

Profilul citokinelor eliberate este influențat de tipul de HPV, astfel infecția evoluează în direcții diferite, spre vindecare sau cronicizare (20,21). HPV prin inhibarea eliberării de IFN și creșterea nivelului de IL-10 conduce la efect imunosupresor local, ceea ce permite persistența virală. Se pare că prin oncoproteinele E5, E6 și E7 virusul poate conduce la activarea unor gene la nivel celular ceea ce va stimula sinteza de IL-10 și TGF beta la nivelul celulelor transformate malign (22).

2.2. Rolul keratinocitelor

În infecția cu HPV, keratinocitele dețin un rol important. Au capacitatea de a secreta o varietate de citokine atunci când vin în contact cu virusul, iar ulterior citokinele eliberate vor modula diferențierea și proliferarea celulară. TNF alfa este una dintre cele mai importante citokine implicate în procesul inflamator. Prin legarea de receptori specifici are loc activarea unor căi de semnalizare care influențează procesele de proliferare și apoptoză celulară în funcție de tipul celulei implicate și expresia receptorilor de TNF la nivelul acestora (23). IL-1 alfa inhibă proliferarea celulelor HPV pozitive (23).

2.3. Rolul celulelor dendritice

Celulele dendritice fiind celule prezentatoare de antigen sunt importante în apărarea anti-infecțioasă. HPV de tip alfa, gamma și mu conduc la scăderea numărului celulelor dendritice de până la 175 de ori. Nu s-a observat o corelație pozitivă între puterea oncogenă a virusului și scăderea numărului celulelor dendritice, fiind identificat un număr redus inclusiv în condiloame

acuminate. Infecțiile persistente se asociază cu un număr diminuat de celule dendritice și prezența celulelor T reglatoare la nivelul dermului (24).

Tipurile virale 5, 11, 18, 31 și 45 inhibă activarea celulelor Langerhans, reducând expresia moleculelor de adeziune și eliberarea de citokine, astfel este diminuat răspunsul imun care să permită *clearance*-ul viral. Atât tipurile cu risc oncogen înalt cât și cele cu risc oncogen scăzut pot inhiba maturarea celulelor Langerhans ceea ce permite persistența virală, care în cazul HPV 6 și 11 este de aproximativ 6 luni, iar în cazul virusurilor oncogene de mai lungă durată (25).

2.4. Rolul limfocitelor T reglatoare și NK

Cao și colab. au pus în evidență la nivelul condiloamelor acuminate de dimensiuni mari un infiltrat bogat în limfocite T reglatoare Foxp3 pozitive. În plus, așa cum a fost demonstrat și în alte studii, IL-10 și TGF beta au fost detectate în concentrații crescute, iar IL-2 și IFN în concentrații scăzute. O explicație a acumulării limfocitelor T reglatoare în veruci este dată de eliberarea de liganzi endogeni pentru TLR, rezultați din lezarea celulară (26).

HPV are capacitatea de a interfera cu activitatea celulelor prezentatoare de antigen. Astfel oncoproteinele E6 și E7 scad expresia E caderinei care împiedică adeziunea dintre keratinocite și celulele dendritice. HPV posedă mecanisme prin care celulele infectate sunt apărute de activitatea citotoxică a celulelor NK. Receptorul NKG2D este important pentru activitatea citotoxică a celulelor NK. Se pare ca HPV poate conduce la scăderea expresiei acestuia (27).

3. Stresul oxidativ în infecția cu HPV

3.1. Stresul oxidativ la pacienți cu veruci

Sunt câteva studii care au demonstrat prezența stresului oxidativ la pacienții cu veruci palmo-plantare sau genitale. Arican și colab. au realizat un studiu care a inclus 36 de pacienți și a analizat statusul stresului oxidativ utilizând drept *markeri* superoxid dismutaza (SOD), catalaza (CAT) și malondialdehida (MDA). Determinările pe țesut obținut prin grataj au pus în evidență un nivel crescut de MDA și scăderea activității SOD în comparație cu zona neafectată. Nu s-au obținut diferențe în ceea ce privește activitatea CAT. Activitatea scăzută a SOD a fost

interpretată în contextul unei cantități crescute de radicali liberi de oxigen, cu efect inhibitor asupra enzimei. Studiul evidențiază că în patogeneza verucilor ar putea fi implicat un dezechilibru între oxidanți și antioxidanți și că stresul oxidativ este rezultatul lezării tisulare și a procesului inflamator declanșat (28). Sasmaz și colab au analizat parametri similari, dar în serul unor pacienți cu veruci cutanate, non-genitale. Rezultatele au fost similare în ceea ce privește MDA, în schimb activitatea SOD și CAT au fost crescute, probabil ca mecanism de apărare. În plus a fost ridicată ipoteza că stresul oxidativ poate avea efect supresiv asupra limfocitelor T, ceea ce contribuie la un prognostic negativ (29).

Cokluk și colab. au evaluat parametri de stres oxidativ la pacienți cu veruci genitale. Similar studiului anterior menționat au evaluat nivelul de MDA și activitatea unor enzime cu activitate antioxidantă, glutatión peroxidaza (GPx) eritrocitară, CAT și paroxonaza. Nivelul de MDA a fost crescut în comparație cu grupul control. Activitatea SOD și a GPx eritrocitare au fost mai crescute în comparație cu grupul control. Nu s-au observat diferențe cu privire la activitatea paroxonazei. Studiul sugerează că deși activitatea enzimatică antioxidantă a fost crescută stresul oxidativ poate persista și să conducă la alterarea apărării antioxidante (30). Studiul condus de Hiraku și colab. a pus în evidență prin analiză imunohistochimică exprimarea mai crescută a 8-nitroguaninei la nivelul leziunilor de neoplazie intraepitelială cervicală (CIN) 2 și CIN 3 în comparație cu condiloamele acuminate (31).

3.2. Stresul oxidativ cofactor al carcinogenezei

Fumatul sau inflamația cronică sunt factori care conduc la un dezechilibru între oxidanți și antioxidanți (32). Acești factori sunt considerați cofactori ai infecției cu HPV în procesul de carcinogeneză. Dezechilibrul între oxidanți și antioxidanți poate afecta istoria naturală a bolii. Speciile reactive de oxigen (SRO) exercită un efect important asupra căilor de semnalizare influențând mecanismele de proliferare celulară și apoptoză (33). Studiile arată că antioxidanții pot juca un rol esențial, modulând replicarea virală și exprimarea oncogenelor E6 și E7 (16). Un studiu *in vitro* a arătat că adăugarea de antioxidanți conduce la inhibarea activării factorului transcripțional AP-1, responsabil de expresia genelor E6 și E7 (34).

Studiul lui Conway aduce în atenție o ipoteză interesantă și anume faptul că etape importante din ciclul HPV precum asamblarea și maturarea sunt redox-dependente. Studiile de microscopie electronică au arătat că virionii de 10 zile sunt localizați în special la nivelul

nucleilor suprabazali, în schimb cei de 20 de zile la nivelul părții superioare a anvelopei cornificate, localizarea corespunzând gradientului redox din țesutul uman, virionii de 10 zile fiind expuși unui mediu reducător, iar cei de 20 zile unui mediu oxidant (35). Prezența stresului oxidativ este necesară în faza de asamblare a capsomerelor în vederea formării capsidei, etapă în care rolul esențial este deținut de proteinele L1 și L2. Condițiile de stres oxidativ sunt prielnice formării legăturile disulfurice necesare stabilității capsidei (35).

Studiile actuale atribuie un rol important stresului oxidativ în procesul de carcinogeneză (36). În procesul de carcinogeneză indus de HPV, se pare că principalii cofactori sunt stresul oxidativ și inflamația cronică. Există un cerc vicios, astfel procesul inflamator conduce la eliberarea SRO care la rândul lor vor stimula eliberarea suplimentară de mediatori ai inflamației (13).

Studiul lui Siegel și colab. care a inclus 444 de femei HPV pozitive, concluzionează că nivelul seric de MDA ar putea fi privit ca un *marker* al infecției active și poate exprima răspunsul gazdei la infecție și aduce în atenție faptul că eliminarea activă a virusului prin intermediul răspunsului imun înăscut și a imunității celulare poate conduce la stres oxidativ (37).

3.3. Rolul oncoproteinelor virale în generarea stresului oxidativ

HPV posedă oncogene care permit celulelor pe care le infectează să supraviețuiască condițiilor de stres oxidativ crescut prin intermediul mai multor mijloace, incluzând modularea activității enzimelor antioxidante, inhibarea apoptozei induse de stresul oxidativ și modularea expresiei unor gene implicate în apărarea antioxidantă (38).

Proteina E1 singură nu produce stres oxidativ. Creșterea activității CAT poate fi indusă de E1, dar nu modulează expresia SOD. Modularea stresului oxidativ în fazele precoce ale replicării virale la care participă în special proteinele E1 și E2 poate influența persistența infecției cu HPV (39). Proteina virală E2 aparținând tipului HPV 18 se asociază cu membrana mitocondrială internă și induce stres oxidativ. În plus s-a observat că producerea SRO este însoțită de scăderea nivelului de glutatation și a unor enzime cu rol antioxidant precum SOD. Această acțiune a proteinei E2 nu a fost pusă în evidență în cadrul tipurilor non-oncogene (40).

Proteina virală E5 nu modulează în mod direct statusul redox. E5 modulează nivelul de prooxidanți prin efectul exercitat asupra ciclooxygenazei (COX)-2. Scăderea nivelului COX-2 se asociază cu creșterea expresiei CAT și SOD (39). COX-2 este supraexprimată în cancerle

regiunii cervicale produse de HPV. 4-hidroxinonenal (4-HNE), produs al peroxidării lipidice, stimulează expresia COX-2, care la rândul său va stimula stresul oxidativ (41).

Cercetări recente arată că prezența E6 se asociază cu producerea de SRO și scăderea nivelului de glutatation; în schimb oncoproteina E7 a tipurilor HPV 16 și HPV 18 conduce la scăderea producerii de SRO (39). Shim și colab. au studiat keratinocite care exprimă oncogena E7 și au demonstrat că prezența oncogenei E7 conduce la o rezistență crescută la leziunile produse de acțiunea SRO la nivel celular. Unul dintre mecanismele implicate se pare că este creșterea activității CAT (42).

CONTRIBUȚII PERSONALE

4. Material și metodă

4.1. Premisele cercetării

Stresul oxidativ apare atunci când agenții oxidanți depășesc sistemele antioxidante și conduc la alterarea a diverse molecule biologice, inclusiv leziuni la nivelul ADN (43). De-a lungul timpului, studiile au pus în evidență că SRO sunt implicate în numeroase boli cutanate (44-46).

Infecția cu HPV reprezintă o importantă problemă de sănătate publică, producând afecțiuni benigne sau maligne (47). Studiile din ultimii ani au pus în evidență valori modificate ale markerilor de stres oxidativ la pacienții cu leziuni dermato-venerologice cauzate de HPV și anume veruci palmo-plantare și genitale. Astfel s-a emis ipoteza că stresul oxidativ ar putea juca un rol în patogeniza infecției (28,29,48). Dar majoritatea studiilor analizează un număr redus de markeri, astfel fiind subliniată ideea că sunt necesare studii suplimentare.

4.2. Scopul și obiectivele studiului

Scopul studiului

Investigarea unor markeri de stres oxidativ și ai inflamației și identificarea unor noi biomarkeri cu semnificație în patogeniza infecției cu HPV, în cazul pacienților cu veruci palmo-plantare și genitale

Obiectivele studiului

1. Investigarea markerilor generali de stres oxidativ la pacienți cu veruci palmo-plantare și genitale;
2. Investigarea markerilor specifici de stres oxidativ la pacienți cu veruci palmo-plantare și genitale;
3. Investigarea răspunsului inflamator la pacienți cu veruci palmo-plantare și genitale
4. Observarea diferențelor cu privire la parametri de stres oxidativ între pacienți cu veruci palmo-plantare și genitale;
5. Observarea diferențelor cu privire la parametri ai inflamației între pacienți cu veruci palmo-plantare și genitale;
6. Screening pentru alte infecții cu transmitere sexuală (în cazul celor cu leziuni genitale);
7. Identificarea factorilor de risc pentru infecția cu HPV.

4.3. Selectarea pacienților

Am efectuat un studiu observațional, caz-control, în perioada 2017-2019. Au fost incluși în studiu pacienți cu veruci palmo-plantare și genitale care s-au prezentat în Clinica de Dermatologie a Spitalului Clinic “Dr. Victor Babeș”, București. Selecția pacienților s-a realizat dintr-un număr de 121 de pacienți (68 cu veruci palmo-plantare și 53 cu veruci genitale). Diagnosticul a fost realizat în baza aspectelor clinice; verucile palmo-plantare și genitale au aspecte caracteristice. În cazul în care aspectul clinic nu a fost concludent, s-a efectuat examen histopatologic.

Pacienții au fost împărțiți în 2 grupuri: a. cu veruci palmo-plantare și b. cu veruci genitale. Am selectat pacienți cu vârste apropiate. Am selectat și un grup control, alcătuit din subiecți sănătoși, cu vârste apropiate celor 2 grupuri de pacienți.

Toți subiecții incluși în studiu au primit toate informațiile necesare referitoare la desfășurarea studiului și au semnat un consimțământ prin care și-au dat acordul de a furniza informații referitoare la starea lor de sănătate și de a li se recolta probe biologice. Studiul a fost aprobat de către Comisia de Etică a Universității de Medicină și Farmacie „Carol Davila”, București (nr. 150/2017).

Pentru includerea participanților în studiu au fost urmărite următoarele criterii de includere și excludere:

Criterii de includere:

- vârsta mai mare de 18 ani
- fără afecțiuni sistemice
- status nutrițional corespunzător
- fără tratament al verucilor (palmo-plantare sau genitale).

Criterii de excludere:

- fumători
- consumatori de alcool sau droguri
- femei gravide
- tratament cu corticosteroizi, antiinflamatoare
- administrarea de vitamine sau suplimente nutritive.

În funcție de criteriile urmărite pe parcursul studiului am inclus:

- 41 de pacienți cu veruci dintre care
 - 26 pacienți cu veruci palmo-plantare
 - 15 pacienți cu veruci genitale
- 28 de indivizi sănătoși (grupul control)

Am realizat screening-ul pentru infecții cu transmitere sexuală pentru 53 de pacienți cu infecție cu HPV (dintre aceștia doar 15 fiind incluși în studiu). Testele pentru screening au inclus anticorpi anti virus hepatitic C, antigen HBs, anticorpi anti-HIV, VDRL și TPHA, detectare antigene *Chlamydia trachomatis*.

4.4. Recoltarea și prelucrarea probelor

Recoltarea probelor s-a realizat dimineața a jeun, în condiții bazale. Ulterior probele au fost centrifugate timp de 10 minute la 6.000 g. S-a prelevat o cantitate de 7 ml de sânge. Probele de sânge s-au recoltat cu sistemul *holder-vacutainer*, înaintea oricărei proceduri diagnostice sau terapeutice. Sângele venos recoltat pe anticoagulant (K3EDTA) s-a folosit pentru determinări hematologice (hemogramă, etc). Serul sanguin obținut din sângele venos

prelevat în *vacutainer* fără anticoagulant a fost folosit pentru determinări biochimice, serologice, imunologice. Probele s-au prelucrat imediat sau s-au congelat la -80 grade Celsius. S-au respins probele hemolizate, lactescente sau icterice.

4.5. Markerii determinați

Au fost determinați în rândul pacienților cu leziuni asociate infecției cu HPV următorii markeri:

A. Markeri de stres oxidativ

1. Markeri generali

- Statusul antioxidant total (TAS)
- Statusul oxidant total (TOS)
- Indicele de stres oxidativ (OSI)

2. Markeri specifici

- 4-hidroxinonenal (4-HNE)
- 8-hidroxi-deoxiguanozina (8-OHdG)
- Produși finali de glicare avansată (AGEs)
- Pentozidina
- Receptorul solubil pentru produșii finali de glicare avansată (sRAGE)
- Markerii ai homeostaziei tiol-disulfuri (tiol total (TT), tiol nativ (TN), disulfuri (DS))

B. Markerii ai inflamației

- Proteina C reactivă hipersensibilă (hsCRP)
- Viteza de sedimentare a eritrocitelor (VSH)
- Fibrinogenul
- Interleukina-6 (IL-6)

4.6. Metode de lucru

A. Tehnica ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

- a. ELISA *sandwich*: sRAGE, IL-6, pentozidina
- b. ELISA competitivă: AGEs, 4-HNE, 8-OHdG

B. Metoda spectrofotometrică: TAS, TOS, TN, TT, DS

- C. Metoda coagulometrică: fibrinogenul
- D. Metoda latex imunoturbidimetrică: hsCRP
- E. Metoda automată de citire: VSH

Toate determinările s-a realizat în duplicat. Am respectat protocoalele de lucru puse la dispoziție de către producătorii kit-urilor folosite.

5. Rezultate și discuții

Generarea stresului oxidativ reprezintă unul dintre mecanismele implicate în apărarea anti-infecțioasă. Pătrunderea unui virus în organism conduce la activarea fagocitelor care pe de o parte vor elibera SRO, iar pe de altă parte vor sintetiza citokine prooxidante precum TNF alfa sau IL-1, care vor întreține stresul oxidativ. TNF alfa ulterior va fi implicat în eliberarea factorului de transcripție NF-kB, care ajuns la nivel nuclear se va lega de ADN și va promova procesul de sinteză a componentelor virale. Expresia NF-kB poate fi inhibată de prezența antioxidantilor, precum glutationul. IL-1 este eliberată de monocite, și va induce eliberarea de lactoferină de la nivelul neutrofilelor. Lactoferina va lega fierul, dar în anumite condiții capacitatea de legare este depășită, fierul rămâne liber și poate participa la reacția Fenton prin care se generează SRO (49).

SRO joacă un dublu rol, pe de o parte participă la procesul de apărare împotriva patogenului, dar în același timp au efecte nocive asupra celulelor gazdei, conducând la diferite leziuni tisulare (49). De asemenea, trebuie avut în vedere că SRO au un efect genotoxic. Astfel, în urma expunerii prelungite la SRO și în contextul unui proces inflamator cronic se poate dezvolta un proces malign. SRO acționează ca mesageri secunzi, conducând la activarea a numeroase căi de semnalizare (13,50). Pentru a măsura nivelul stresului oxidativ se pot măsura markeri ai principalelor procese asociate stresului oxidativ precum peroxidarea lipidelor, oxidarea proteinelor, acizilor nucleici, etc. O altă metodă este punerea în evidență a nivelului antioxidantilor, care va fi scăzut în cazul stresului oxidativ accentuat (51).

Datele din literatură referitoare la markeri de stres oxidativ la pacienți cu veruci genitale și/sau palmo-plantare sunt puține. Numărul de studii este limitat și de asemenea numărul markerilor studiați este redus. În plus cercetările cu privire la stresul oxidativ în alte afecțiuni asociate HPV, sunt într-un număr limitat

În studiul nostru am analizat un panel larg de markeri ai stresului oxidativ și markeri ai inflamației și am analizat inter-relația dintre cele două procese, în două grupuri de pacienți cu veruci palmo-plantare și genitale, comparativ cu un grup control și de asemenea am comparat cele două grupuri de pacienți între ele.

5.1. Date generale

Verucile palmo-plantare au o incidență crescută în rândul copiilor și adulților tineri. În cazul adulților tineri prevalența este de 3,5% (52). Noi nu am inclus în studiu copii, astfel, vârsta medie a fost de 31,57 ani. După aplicarea criteriilor de excludere, numărul femeilor și bărbaților a fost asemănător (14 vs. 12). Factorii de risc identificați au fost frecventarea sălilor de sport și a piscinelor. Dar pentru mulți dintre pacienți (16 din 25) nu am identificat un factor de risc.

Cu privire la leziunile ano-genitale incidența variază între 160 și 289 de cazuri la 100.000 de locuitori. Referitor la vârstă, conform unui *review* sistematic recent, la femei au fost diagnosticate cel mai frecvent în jurul vârstei de 24 de ani, iar la bărbați între 25 și 29 de ani (53,54). În studiul nostru vârsta medie a fost de 29 de ani. Au fost incluși în studiu 10 bărbați și 5 femei. Unul dintre principalii factorii de risc este lipsa utilizării prezervativului, cu toate că, chiar și în cazul utilizării acestuia protecția nu este de 100%. În studiul nostru, doar 2 dintre cei 10 bărbați participanți la studiu au utilizat prezervativul întotdeauna, majoritatea afirmând că îl utilizează uneori.

Având în vedere că prezența unei infecții cu transmitere sexuală reprezintă un semnal de alarmă pentru prezența și altor astfel de infecții, am realizat *screening*-ul tuturor pacienților. Înainte de aplicarea criteriilor de excludere au fost analizați 53 de pacienți, dintre aceștia 1 era infectat cu *Neisseria gonorrhoeae*, 2 cu *Chlamydia trachomatis*, 1 cu *Treponema pallidum* și 1 cu virusul imunodeficienței umane (HIV).

5.2. Markeri generali de stres oxidativ

În prima secțiune a studiului nostru am analizat markeri generali de stres oxidativ (TAS, TOS și OSI). Cu privire la TAS și TOS, am obținut valori medii semnificativ statistic mai mari în grupurile de pacienți cu veruci palmo-plantare și genitale comparativ cu grupul control în cazul TOS, respectiv mai mici în cazul TAS. Dar valorile medii dintre cele două grupuri de pacienți nu au fost diferite din punct de vedere statistic. De asemenea OSI a fost semnificativ

statistic mai crescut în grupurile de pacienți comparativ cu grupul control. Aceste rezultate indică faptul că există un dezechilibru între oxidanți și antioxidanți în cazul pacienților cu veruci, dezechilibru care pare să nu fie influențat de localizarea leziunilor. Corelația negativă dintre TAS și TOS obținută în grupurile de pacienți cu veruci reprezintă un argument suplimentar. Rezultatele noastre sunt în concordanță cu cele obținute de către Erturan și colab. (48).

Trebuie avut în vedere că la nivel cutanat există un sistem antioxidant foarte bine reprezentat. Astfel, antioxidanții par să aibă un rol important în patogeniza mai multor boli cutanate precum vitiligo, alopecia areata, eczemă, etc. În acest context administrarea antioxidantilor, topică sau sistemică, ar putea fi benefică (45). Spre exemplu, polifenolii au capacitate antioxidantă, pot perturba apoptoza, inhibă creșterea celulară și sinteza de ADN. Pot modula căi de transducție și limita progresia celulelor infectate cu HPV și dezvoltarea fenotipului malign, activarea /reprimarea unor factori de transcripție redox sensibili (55).

5.3. Markeri specifici de stres oxidativ

5.3.1. 4-HNE

Nivelul seric de 4-HNE, marker al peroxidării lipidice, a fost semnificativ mai crescut în grupurile de pacienți cu veruci, comparativ cu grupul control ($p < 0,01$). Nu s-au observat diferențe semnificative între cele două grupuri de pacienți cu veruci. Peroxidarea lipidică este un proces foarte important la nivel cutanat, aici aflându-se o cantitate crescută de lipide. Majoritatea cercetătorilor au determinat markerii peroxidării lipidice în ser, determinările la nivelul pielii fiind dificile. Studiile arată că profilul lipidelor de la nivelul pielii este aparte, neregăsindu-se și în alte țesuturi (44). 4-HNE, o aldehydă nesaturată cu reactivitate crescută, este unul dintre cei mai importanți markeri ai peroxidării lipidice, care participă în procese de inflamație și răspuns imun. Are capacitatea de a interacționa cu grupările tiol din structura proteinelor sau a glutathionului (56). Interacțiunea dintre 4-HNE și proteine conduce la modificarea funcției acestora din urmă și translocarea lor la nivelul membranei celulare (56). Are loc afectarea sintezei proteinelor, funcției ADN sau ARN, blocarea ciclului celular și apoptoză (57).

În alte studii vizând pacienții cu leziuni asociate infecției cu HPV, nivelul peroxidării lipidice a fost determinat utilizând drept marker MDA. Astfel, Cokluk și colab. au determinat

la pacienți cu veruci genitale nivelul peroxidării lipidice, prin măsurarea MDA în probe de sânge. În plus au determinat GPx eritrocitară, CAT și paroxonaza și au comparat rezultatele cu cele obținute la un grup control. Nivelul peroxidării lipidice exprimat prin MDA a fost crescut la cei cu veruci genitale comparativ cu lotul control. De asemenea, activitățile enzimelor CAT și GPx au fost crescute la acești pacienți, ceea ce sugerează activarea sistemelor antioxidante împotriva mediatorilor stresului oxidativ (30).

Nu sunt disponibile alte studii care au determinat nivelul 4-HNE la pacienți cu veruci, sau în alt tip de infecție cu HPV, pentru investigarea peroxidării lipidice fiind folosiți alți markeri. Astfel studiul nostru, aduce în atenție utilitatea acestui *marker* în evaluarea peroxidării lipidice în rândul acestor pacienți (58).

5.3.2. 8-OHdG

Un alt marker pe care l-am determinat a fost 8-OHdG, *marker* al oxidării ADN (59). În studiul nostru, comparativ cu grupul control, valorile medii ale 8-OHdG au fost semnificativ mai crescute în rândul pacienților cu veruci, fără a fi diferențe între grupurile de pacienți. Astfel, deși nu sunt implicate tipuri oncogene, are loc un proces care asociază leziuni la nivelul ADN, care probabil sunt reparate de mecanisme de protecție.

Din ce în ce mai multe cercetări arată că 8-OHdG este un *marker* de stres oxidativ, nivelurile crescute se corelează cu un risc mai mare de neoplazie, dar este și un *marker* al fenomenului de îmbătrânire, în afecțiunile degenerative (60). Cantități crescute de 8-OHdG acumulate în ADN nuclear și mitocondrial în urma stresului oxidativ cronic, întreținut în cele mai multe cazuri de un proces inflamator cronic au fost puse în evidență în leziuni preneoplazice și neoplazice (61). În plus, nivelul său se pare că este influențat de stilul de viață și de dietă (60).

Dintre speciile de oxigen cel mai frecvent interacționează cu ADN, radicalul hidroxil, ceea ce va conduce la alterarea structurii acestuia, cu precădere a bazelor purinice și pirimidinice. Cea mai oxidată bază este guanina, astfel 8-OHdG este cel mai reprezentativ marker (62). Oxidarea ADN poate fi măsurată prin determinarea 8-OHdG în ser sau prin extracția de ADN de la nivel celular. A doua metodă este dificilă având în vedere că extracția în sine se asociază cu un grad de stres oxidativ care va influența rezultatul final (63).

8-OHdG la pacienți cu veruci a mai fost determinat doar de Erturan și colab. care au obținut rezultate asemănătoare cu ale noastre (48). În schimb, 8-OHdG a fost determinat în

afecțiuni premaligne și maligne provocate de infecția cu HPV. Hiraku și colab. au analizat probe de țesut de la 9 pacienți cu CIN 1, 10 cu CIN 2, 6 cu CIN 3 și 5 cu condiloame acuminat din punct de vedere al leziunilor oxidative ale ADN, utilizând metode imunohistochimice pentru a determina 8-nitroguanina și 8-OHdG. S-a pus în evidență o relație directă între expresia 8-nitroguaninei și 8-OHdG și gradul CIN. Atunci când s-au comparat leziunile de CIN 3 și condiloamele acuminat din punct de vedere al leziunilor oxidative ale ADN, acestea au fost semnificativ mai importante în cazul CIN 3 (31).

Astfel, în verucile genitale sau non-genitale, 8-OHdG nu trebuie privit ca un *marker* de risc oncogen ci un *marker* de stres oxidativ ca urmare a persistenței infecției. Aceste rezultate arată că și în cazul leziunilor benigne asociate infecției cu HPV are loc lezarea ADN. Totuși, considerăm că ar fi interesant de realizat o corelație între nivelul 8-OHdG și tipul de HPV implicat în veruci.

5.3.3. AGEs și pentoizidina

Atunci când am analizat rezultatele privind determinarea AGEs în cele 3 grupuri, am observat că diferențele nu au fost semnificative statistic între grupuri ($p > 0,05$). Totuși nivelul AGEs a fost ușor mai crescut în grupurile de pacienți comparativ cu grupul control. În schimb, atunci când am determinat nivelul seric al pentoizidinei, valorile au fost semnificativ mai crescute în rândul pacienților cu veruci comparativ cu subiecții sănătoși ($p < 0,01$). Astfel considerăm că global procesul de glicare nu a fost semnificativ mai accentuat în cazul pacienților cu HPV, dar când am analizat un marker specific, pentoizidina, diferențele au fost importante ceea ce denotă activarea unor căi ce conduc la sinteza crescută a acestui compus. Este primul studiu care determină AGEs și pentoizidina la pacienți cu veruci.

AGEs sunt implicați în oxidarea glucidelor, lipidelor și aminoacizilor rezultând aldehide care se vor lega prin legături covalente de proteine (64). Acumularea AGEs la nivelul țesuturilor conduce la inflamație, la apariția unui dezechilibru între oxidanți și antioxidanți în favoarea primilor, alterarea răspunsului imun și creșterea riscului dezvoltării unei infecții (108). Acumularea AGEs a fost observată în mai multe afecțiuni (65,66). Sinteza endogenă de AGEs apare în condiții de hiperglicemie sau atunci când se produce un dezechilibru al statusului redox, în boli cronice (boală renală cronică) sau în cadrul procesului de îmbătrânire. Există un ciclu vicios, formarea AGEs conduce la generarea SRO prin activarea RAGE, care ulterior conduce

la producerea unor niveluri și mai mari de AGEs (67). Cele mai susceptibile componente la efectele dăunătoare ale AGEs sunt colagenul de tip IV din structura membranei bazale, mielina, tubulina și fibrinogenul, care suferă glicare avansată. Sunt susceptibile cu precădere elementele cu un *turnover* scăzut, procesul de glicare avansată având loc pe o perioadă mai lungă de timp (68).

Compuși din clasa AGEs precum pentozidina, piralina, N-carboximetil-lizina dacă se acumulează la nivel cutanat conduc la procese degenerative, la modificări ale elastinei și colagenului, interferează cu acțiunea matrix metaloproteinazelor și regenerarea dermului (69). Pentozidina este generată prin glicozilarea non-enzimatică a grupărilor amino din structura proteinelor. Poate interacționa cu RAGE conducând la stres oxidativ și activarea expresiei NF- κ B. La pacienții cu diabet zaharat s-a pus în evidență un nivel crescut al pentozidinei, care s-a normalizat după tratamentul cu metformin (70). S-a observat că pentozidina este implicată și în inflamație. Astfel nivelul pentozidinei a fost mai crescut la cei cu sindrom inflamator (71).

AGEs și pentozidina nu au mai fost determinați la pacienți cu leziuni asociate infecției cu HPV, astfel rezultatele noastre deschid noi căi în studierea patogenzei acestui virus, în care glicooxidarea pare să fie implicată.

5.3.4. sRAGE

În studiul nostru, în ceea ce privește nivelul seric al sRAGE, cel mai important receptor pentru AGEs, valorile au fost mai scăzute în rândul pacienților comparativ cu grupul control, dar cu semnificație statistică doar în cazul pacienților cu veruci palmo-plantare. Între pacienții cu veruci palmo-plantare și genitale diferențele nu au fost semnificative.

Acumularea AGEs în țesuturi conduce la activarea RAGE membranal care este localizat pe suprafața celulelor inflamatorii și epiteliale. În condiții bazale, RAGE este exprimat la un nivel scăzut de numeroase celule printre care celule endoteliale, inflamatorii, celule de la nivel cardiac, renal, sistem nervos, etc (72). Nivelul RAGE crește în diferite condiții patologice precum diabet zaharat, boală cardiovasculară, cancere, etc (73). RAGE are numeroși liganzi, iar legarea acestor liganzi conduce la activarea a numeroase căi (74). sRAGE, forma solubilă a receptorului este considerat un marker de protecție, având rolul de a lega liganzii RAGE, împiedicând activarea acestuia. Totuși se pare că rolul său este limitat având în vedere că nivelul

sRAGE este mai mic decât nivelul liganzilor (75). Mai multe studii au încercat utilizarea sRAGE pentru a bloca efectele nocive ale RAGE (76).

Bazat pe aceste observații, am analizat corelația dintre sRAGE și markeri de stres oxidativ. S-a observat o corelație negativă între sRAGE și AGEs în cele 2 grupuri de pacienți, cu semnificație statistică în cazul grupului cu veruci palmo-plantare. De asemenea, s-a observat o corelație importantă între sRAGE și pentozidină în grupul cu veruci palmo-plantare, semnificativă statistic. În grupul celor cu veruci genitale, nivelul corelației a fost mai slab, fără semnificație statistică. Aceste rezultate atrag atenția asupra importanței axei AGEs-RAGE în patogeniza infecției cu HPV. Interacțiunea dintre AGE și RAGE, localizat pe macrofage declanșează stres oxidativ și activarea căii de semnalizare p21/MAPK și activarea NF-kB, ce are ca rezultat exprimarea endotelinei 1, proteina de adeziune celulară vasculară (VCAM)-1 și trombospondulinei. De asemenea, cercetările indică o reducere a mecanismelor antioxidante cu reducerea glutathionului și a vitaminei C, în urma activării axei AGEs-sRAGE (77).

Corelațiile dintre sRAGE și TOS, în ambele grupuri au fost negative, semnificative statistic și pozitive când corelația s-a realizat cu TAS, ceea ce demonstrează rolul pe care îl joacă sRAGE ca factor de protecție în rândul acestor pacienți. Atunci când am realizat corelații între sRAGE și markerii inflamației, nu s-au obținut corelații semnificative statistic (excepție fiind corelația negativă cu IL-6, în cazul pacienților cu veruci palmo-plantare). Aceste rezultate trebuie interpretate și în contextul selectării pacienților fără sindrom inflamator evident, markerii inflamației studiați neavând valori semnificativ mai crescute comparativ cu grupul control.

Se pare că există o legătură între RAGE și inflamație, fiind exprimat la nivelul neutrofilelor, macrofagelor și limfocitelor. Mai mult, receptorul este implicat în recrutarea leucocitelor și este exprimat de celulele endoteliale în condiții de inflamație sau leziune tisulară (78). AGEs induce activarea RAGE iar ulterior va fi declanșat un proces inflamator și generarea stresului oxidativ (64). Într-o cercetare recentă, s-a pus în evidență că expresia crescută de RAGE la nivel celular conduce la niveluri crescute de TNF- α , IL-1 β , IL-6, molecula de adeziune intercelulară (ICAM)-1 și COX-2. Administrarea de antagoniști de RAGE a condus la scăderea IL-6 și a inhibat activarea NF-kB (79).

Rezultatele noastre arată că cel mai probabil a avut loc consumul sRAGE în contextul stresului oxidativ, astfel am putea considera că sRAGE joacă un rol protector, de contracarare a

efectelor stresului oxidativ, în rândul acestor pacienți. Un argument suplimentar este corelația negativă cu TOS. Astfel administrarea sRAGE ar putea avea un rol în terapie (80). Legarea a diferiți liganzi la nivelul RAGE conduce la activarea a diverse căi de semnalizare ce presupun generarea SRO, fapt ce poate fi blocat prin administrarea de sRAGE (81) (102).

Este primul studiu care analizează rolul axei AGEs-sRAGE în patogeneza verucilor genitale și aduce suplimentar în atenție pentozidina, unul dintre cei mai importanți membri din clasa AGEs. Modularea acestei axe ar putea fi implicată în contracararea efectelor stresului oxidativ și în înțelegerea și a altor mecanisme implicate în infecția cu HPV, neelucidate până acum.

De remarcat că între valorile markerilor specifici de stres oxidativ nu au fost diferențe semnificative statistic în ceea ce privește grupul de pacienți cu veruci palmo-plantare și veruci genitale. Astfel, pare că tipul de HPV nu influențează în mare măsură nivelul stresului oxidativ, în cazul leziunilor benigne asociate cu tipuri de HPV cu risc scăzut. Pentru clarificare sunt necesare studii suplimentare.

5.3.5. Homeostazia tioli-disulfuri

În studiul nostru, analiza markerilor homeostaziei tioli-disulfuri a condus la următoarele rezultate. Nivelul tiolului total a fost mai crescut în grupurile de pacienți comparativ cu grupul control, dar fără semnificație statistică în cazul grupului cu veruci genitale. Cu privire la tiolul nativ de asemenea valorile au fost ușor mai crescute în grupurile de pacienți comparativ cu grupul control. Acest fapt denotă că în cazul pacienților cu veruci tiolii reprezintă compuși cu rol în apărarea antioxidantă, nivelul lor crescând ca răspuns împotriva stresului oxidativ.

Transformarea tiolilor în disulfuri reprezintă un marker al oxidării proteinelor. În ultimii ani, homeostazia tiol-disulfuri a fost studiată în diverse afecțiuni dermatologice. Au fost obținute diferite rezultate, dar toate atestă rolul tiolilor și disulfurilor în echilibrul oxidanți-antioxidanți și implicarea în patogenează. Tiolii sunt parte importantă a sistemului antioxidant jucând un rol esențial în mecanisme precum apoptoza, activarea unor căi de semnalizare, detoxifiere, etc (82). Oxidarea grupărilor tiol din structura a diferiți compuși conduce la formarea acidului cistein sulfenic un compus cu o reactivitate crescută, care va interacționa și cu alte grupări tiol formându-se legături disulfurice (83). Tiolii reprezintă parte importantă a sistemului antioxidant (84).

Nivelul seric al disulfurilor a fost mai crescut la pacienții cu veruci comparativ cu grupul control, dar fără semnificație statistică. Aceste rezultate sugerează un posibil dezechilibru în homeostazia tiol-disulfuri, subliniind din nou un potențial rol al antioxidanților în tratamentul verucilor. Acest fapt este susținut și de valorile mai crescute ale rapoartelor DS/TT și DS/TN în rândul pacienților cu veruci comparativ cu grupul control ($p < 0,01$). Aceste rezultate denotă capacitatea depășită a tiolilor ca elemente antioxidante. Rezultatele noastre sunt în concordanță cu cele obținute de Erturan și colab. cu mențiunea că aceștia atunci când au calculat nivelul disulfurilor nu au împărțit la doi, conform formulei propusă de Erel (85).

Trebuie avut în vedere că la nivelul proteinei L1 a capsidei se află reziduuri de cisteină. S-a observat că dacă pseudovirioni de HPV16 sunt puși în contact cu agenți care reacționează cu tiolii, aceștia își pierd infectivitatea. Astfel nivelul crescut de tioli ar putea reprezenta un mecanism prin care este blocată acțiunea HPV (86).

Giuliano și colab. au urmărit 433 de paciente infectate cu HPV timp de un an din punct de vedere al infecției cu HPV. În lunile 0, 4, 8 și 12 s-a realizat analiză PCR pentru detecția HPV. S-a observat că 248 au avut o infecție tranzitorie și 185 persistentă. Suplimentar pacientele au completat un chestionar referitor la dieta lor. Astfel s-a pus în evidență că cele cu infecție persistentă au avut o dietă mai scăzută în antioxidanți decât celelalte. Consumul de papaya pare să aibă un rol important (87).

Rezultatele obținute din studiul markerilor homeostaziei tioli-disulfuri vin în completarea celor obținute în urma studiului sRAGE și subliniază ipoteza utilității terapiilor antioxidante în tratamentul leziunilor asociate infecției cu HPV. Până acum acești markeri nu au mai fost studiați în veruci, există disponibile doar rezultatele obținute de Erturan și colab., cercetarea lor desfășurându-se concomitent cu cercetarea noastră.

5.4. Markerii ai inflamației

Stresul oxidativ și inflamația sunt două procese interconectate. Inflamația face parte din răspunsul imun înăscut, jucând un rol important în apărarea împotriva a diverși patogeni. Stresul oxidativ este implicat în dezvoltarea și promovarea unui răspuns inflamator cronic. În același timp producerea în exces de SRO conduce la un dezechilibru al răspunsului imun. Există un cerc vicios, spre exemplu SRO conduc la oxidarea proteinelor, iar proteinele oxidate

activează diferite căi ale inflamației (88). În consecință am analizat o serie de markeri ai inflamației în studiul nostru.

Principalul *marker* al răspunsului inflamator a fost hsCRP, în grupurile de pacienți cu veruci nivelul seric fiind mai crescut decât în grupul control. CRP nu trebuie privită doar ca un marker al inflamației, trebuie avut în vedere că joacă un rol activ în acest proces. Se poate lega de fragmentul Fc al IgG conducând la activarea unor căi de semnalizare și eliberarea de citokine proinflamatorii și poate recunoaște molecule non-self (89). De asemenea, CRP poate interacționa cu NO, care este implicat în procese de inflamație, vasodilatație și neurotransmisie. Mai mult, se pare că CRP poate influența expresia genelor implicate în formarea NO sintetazei (90).

Pentru a detecta valori scăzute ale CRP, este necesară măsurarea hsCRP. Sinikumpu și colab. au efectuat un studiu pe un grup mare de indivizi, 1.930 la care au detectat nivelul hsCRP cu scopul de a pune în evidență o legătură între un nivel scăzut de inflamație și bolile cutanate. Studiul a concluzionat că niveluri crescute ale hsCRP se asociază cu dermatită atopică, rozacee și onicomicoză (91).

Nivelul hsCRP nu a mai fost determinat în cazul pacienților cu veruci până acum, dar CRP a fost determinat în mai multe cazuri de neoplazii asociate infecției cu HPV. Obaseki și colab. au determinat CRP la pacienți cu carcinom orofaringian, pozitiv sau negativ pentru HPV. Nivelul CRP a fost mai crescut la cei HPV pozitivi. Mai mult, în grupul celor HPV negativi, dar cu valori mai crescute s-a observat o rată de supraviețuire mai scăzută (92).

În studiul nostru, analiza corelației între markerii de stres oxidativ și inflamație, luând ca marker reprezentativ hsCRP, a pus în evidență că nu există o corelație între TAS și hsCRP, dar există o corelație pozitivă între TOS și hsCRP, ceea ce demonstrează conexiunea dintre stresul oxidativ și inflamație în cazul pacienților cu veruci. Atunci când ne-am raportat la markerii specifici de stres oxidativ, s-a obținut o corelație importantă doar între 4-HNE și hsCRP în grupul de pacienți cu veruci genitale. Mai multe studii au demonstrat că există o interrelație între stresul oxidativ și inflamație în infecția cu HPV, în special în cancerul de col uterin. Astfel inflamația și stresul oxidativ reprezintă cei mai importanți cofactori în declanșarea carcinogenezei, HPV singur nefiind capabil să inducă un proces malign (13).

Astfel atât rezultatele noastre cât și rezultatele altor cercetători prezentate arată că prezența HPV induce un anumit grad de inflamație. Inițial virusul nu induce un proces inflamator

dar persistând treptat se dezvoltă un astfel de proces (13). Wortsman și colab. au evaluat verucile plantare prin ecografie Doppler și au observat semne de inflamație la nivelul țesutului înconjurător, creșterea fluxului sanguin și în unele cazuri bursită sau edem la nivelul țesutului subcutanat (93).

În studiul nostru, nivelul IL-6 a fost mai crescut în rândul pacienților cu veruci, dar fără semnificație statistică. Este pentru prima dată când acest marker este determinat la pacienți cu veruci și poate sta la baza înțelegerii mecanismelor implicate în persistența virusului la nivelul acestor leziuni.

IL-6 s-a dovedit a fi implicată în procese precum inflamația, controlul răspunsului imun, hematopoieza și oncogeneza (94,95). Este implicată în imunitatea înăscută prin activarea leucocitelor și generarea proteinelor de fază acută la nivel hepatic (96). Eliberată la nivel cutanat cu precădere de keratinocite, joacă un rol important în creșterea și diferențierea celulară. IL-6 se poate asocia cu receptorul său solubil IL6-R și activa celule care nu exprimă pe suprafața lor receptori pt IL-6 și altfel ar fi non-responsive la acțiunea IL-6 (97).

În studiul nostru, nivelul fibrinogenului a fost în limite normale, pacienții cu sindrom inflamator fiind excluși din studiu, dar valorile au fost mai mari în rândul pacienților decât în grupul control. De asemenea valoarea VSH a fost mai crescută în cazul pacienților cu veruci, comparativ cu grupul control.

Fibrinogenul este o glicoproteină care are în structura sa 3 perechi de lanțuri polipeptidice unite prin 29 de punți disulfurice. Este implicat în angiogeneză, coagulare, vindecarea plăgilor și inflamație. Prin acțiunea trombinei se transformă în fibrină, o moleculă esențială în procesul de trombogeneză (98). Fibrinogenul are un rol important în procesul inflamator, fiind implicat în diferite căi de semnalizare. Interacționează cu celulele endoteliale, plachete, leucocite circulante. etc. Fibrinogenul are capacitatea de a se lega de celulele imune și conduce la activarea acestora prin interacțiuni de tip ligand-receptor (99).

Aceste rezultate arată că pacienții cu veruci au un proces inflamator mai accentuat decât cei fără veruci, dar fără să fie depășită valoarea prag a sindromului inflamator, proces care este accentuat în contextul stresului oxidativ, pe care l-am pus în evidență în rândul acestor pacienți. Legătura dintre cele două procese a fost pusă în evidență și de corelația dintre hsCRP și TOS, discutată mai sus. Acest fapt este confirmat și de către Sulliman si colab. care au pus în evidență o corelație pozitivă între nivelul pentozidinei, marker de stres oxidativ și hsCRP, fibrinogen și

IL-6 (71). În plus, trebuie avut în vedere că pentru a pune în evidență procesul inflamator în cazul acestor pacienți este necesară studierea unor markeri foarte sensibili ai inflamației care să vizeze căile implicate în patogeniza HPV. Astfel considerăm că ar fi utilă identificarea și a altor markeri ai inflamației care se modifică în cazul pacienților cu veruci. Acest fapt ar putea face lumină în rolul inflamației în cazul acestor pacienți.

5.5. Stresul oxidativ și elemente clinice

Am investigat dacă există o corelație între markeri de stres oxidativ și elemente clinice. Am luat în calcul numărul leziunilor și durata acestora. Am analizat dacă există o corelație între numărul leziunilor și markerii generali de stres oxidativ în cele două grupuri de pacienți și am observat că valorile markerilor TAS, TOS și OSI nu sunt influențate de numărul leziunilor. Sasmaz și colab. de asemenea au stratificat pacienții cu veruci în funcție de numărul, localizarea și tipul leziunilor dar nu au găsit o legătură între acești parametri și markerii de stres oxidativ studiați (29).

Stratificarea pacienților în funcție de durata bolii s-a putut realiza doar în cazul celor cu leziuni palmo-plantare, numărul celor cu leziuni genitale fiind prea mic. Au fost analizați markerii generali de stres oxidativ și s-a observat că valorile TAS sunt mai scăzute la cei cu leziuni cu durată mai lungă, iar valorile TOS mai crescute, dar fără semnificație statistică. Aceste rezultate sunt în concordanță cu cele obținute de Erturan și colab. care au identificat valori ale TOS și OSI mai mari, semnificative statistic la cei cu evoluție mai lungă a verucilor și valori mai mici ale TAS ne semnificative statistic (48).

De asemenea, într-un studiu recent s-au pus în evidență niveluri mai crescute ale SOD la pacienți cu veruci comparativ cu grupul control. S-au observat niveluri mai mari la cei cu mai multe leziuni, în cazul în care leziunile evoluau de mai mult de 6 luni și în cazul celor cu un istoric pozitiv pentru veruci vulgare, dar fără semnificație statistică (100).

Pe baza acestor rezultate putem considera că numărul leziunilor influențează într-o mai mică măsură stresul oxidativ decât durata acestora. Astfel un nivel crescut al stresului oxidativ poate fi un marker al leziunilor persistente și recalcitrante la tratament. Așadar în persistența virusului un rol îl poate avea dezechilibrul dintre oxidanți și antioxidanți, care cel mai probabil interferează cu mecanismele de apărare ale gazdei.

6. Concluzii

1. În cele mai multe cazuri pacienții cu veruci palmo-plantare nu au un factor de risc identificat. Principalii factori de risc identificați au fost activități la sala de sport sau piscină.

2. *Screening*-ul pentru infecții cu transmitere sexuală a pus în evidență că un procent important (9,4%/5 pacienți din 53) dintre cei cu veruci genitale erau co-infecțați, ceea ce demonstrează importanța screening-ului în rândul acestor pacienți.

3. Majoritatea pacienților cu veruci genitale prezentau factori de risc pentru dobândirea unei infecții cu transmitere sexuală, precum lipsa utilizării constante a prezervativului și un număr crescut de parteneri.

4. În rândul pacienților cu veruci genitale și palmo-plantare există un dezechilibru între antioxidanți (exprimat prin statusul antioxidant total - TAS) și oxidanți (exprimat prin statusul antioxidant total - TOS), demonstrat de valorile scăzute ale TAS și valorile crescute ale TOS în rândul acestor pacienți comparativ cu grupul control și de corelația negativă dintre cei doi parametri.

5. Nivelurile markerilor specifici de stres oxidativ 4-hidroxinonenal (4-HNE), 8-hidroxi-2-deoxiguanozina (8-OHdG) și pentozidina au avut valori semnificativ modificate în rândul pacienților cu veruci comparativ cu grupul control. Modificările au fost mai mici în cazul produșilor finali de glicare avansată (AGEs) și receptorului solubil pentru produșii finali de glicare avansată (sRAGE). Astfel 4-HNE, 8-OHdG și pentozidina par să fie markeri specifici reprezentativi pentru a pune în evidență stresul oxidativ în rândul pacienților cu veruci.

6. Rezultatele au arătat că 4-HNE poate fi util în evaluarea peroxidării lipidice în rândul pacienților cu veruci, până în prezent peroxidarea lipidică fiind evaluată prin alți markeri.

7. În rândul pacienților cu veruci este alterată homeostazia tioli-disulfuri, demonstrată de modificarea rapoartelor disulfuri/tiol total (DS/TT) și disulfuri/tiol nativ (DS/TN), în favoarea disulfurilor care participă la generarea stresului oxidativ. Aceste rezultate sugerează utilitatea terapiilor antioxidante în cazul acestor pacienți.

8. În rândul pacienților cu veruci nivelul crescut al inflamației a fost exprimat doar prin proteina C reactivă hipersensibilă (hsCRP), ceilalți markeri neavând modificări semnificative pentru ambele grupuri, ceea ce denotă că pentru a evidenția procesul inflamator sunt necesari markeri cu sensibilitate crescută și care vizează anumite căi ale inflamației.

9. Corelația negativă dintre sRAGE și TOS și pozitivă dintre sRAGE și TAS demonstrează că sRAGE acționează ca un factor de protecție în cazul pacienților cu veruci, nivelul său scăzut fiind consecința legării de liganzii RAGE astfel fiind împiedicată activarea RAGE.

10. Corelația negativă între sRAGE și AGEs și sRAGE și pentozidină în rândul pacienților cu veruci, cu semnificație statistică în cazul pacienților cu veruci palmo-plantare, demonstrează posibilul rol al axei AGEs-RAGE în patogeniza infecției cu HPV. Modularea acestei axe ar putea avea rol în terapie.

11. Deși nu s-au observat modificări importante ale AGEs la pacienții cu veruci comparativ cu grupul control, când a fost determinat nivelul pentozidinei modificările au fost semnificative, astfel rezultatele noastre deschid noi căi în studierea patogenizei acestui virus, în care glicooxidarea pare să fie implicată.

12. Există o corelație slabă între nivelul sRAGE și statusul inflamator în rândul pacienților cu veruci.

13. În niciunul dintre grupuri, stresul oxidativ nu a fost influențat de numărul leziunilor.

14. Deși fără semnificație statistică, durata leziunilor, dacă este lungă, peste 6 luni pare să influențeze nivelul stresului oxidativ. Observațiile au putut fi realizate doar în cazul pacienților cu veruci palmo-plantare, în cazul pacienților cu veruci genitale nu s-a putut realiza stratificarea, numărul pacienților fiind prea mic. Sunt necesare studii ulterioare în acest sens, stresul oxidativ ar putea fi implicat în persistența infecției cu HPV.

15. Investigarea interrelației dintre inflamație și stresul oxidativ, două procese interconectate, a pus în evidență o corelație pozitivă între hsCRP și TOS în cele două grupuri de pacienți, semnificativă statistic doar în cazul pacienților cu veruci palmo-plantare, ceea ce demonstrează că procesul inflamator chiar și redus în cazul acestor pacienți poate potența stresul oxidativ.

16. Nu s-au observat diferențe între pacienții cu veruci palmo-plantare și genitale nici în cazul markerilor de stres oxidativ nici în cazul markerilor inflamației, ceea ce sugerează că localizarea leziunilor nu influențează markerii studiați.

17. Datele privind aspectele studiate nu sunt suficient de bine reprezentate în literatura de specialitate românească și internațională. Sunt necesare studii suplimentare în echipe

multidisciplinare care să includă cel puțin medici dermatologi, imunologi, microbiologi, epidemiologi și de sănătate publică.

18. Este primul studiu din literatura românească medicală care analizează stresul oxidativ la pacienți cu veruci printr-un număr mare de markeri. Rezultatele noastre au demonstrat că în cazul pacienților cu veruci, indiferent de localizarea leziunilor, există un nivel mai crescut de stres oxidativ comparativ cu subiecți sănătoși. Continuarea în acest sens a unor studii multicentrice ar putea aduce beneficii în înțelegerea în profunzime a rolului stresului oxidativ în patogeniza leziunilor dermatologice asociate infecției cu HPV.

7. Originalitatea studiului

1. Originalitatea studiului constă în numărul mare de markeri de stres oxidativ analizați la pacienți cu veruci. În literatura medicală, sunt disponibile și alte studii care au analizat markeri de stres oxidativ la pacienți cu veruci, dar în niciunul nu a fost analizat un panel extins ca în studiul nostru.

2. Markerii de stres oxidativ 4-HNE, sRAGE și AGEs nu au mai fost analizați în alte studii care au inclus pacienți cu veruci palmo-plantare sau genitale. De asemenea, markerii homeostaziei tioli-disulfuri nu au mai fost analizați la pacienți cu veruci exceptând Erturan și colab., studiu desfășurat concomitent cu studiul nostru.

3. Studiul nostru atrage atenția asupra rolului axei AGEs-RAGE în patogeniza infecției cu HPV. Mai mult, aduce în atenție rolul sRAGE, ca factor de protecție în rândul acestor pacienți, fapt ce poate sta la baza a noi terapii.

4. Este primul studiu care analizează statusul inflamator la pacienți cu veruci genitale și palmo-plantare, utilizând ca markeri hsCRP, interleukina 6 (IL-6) și fibrinogen.

5. Este primul studiu care evaluează relația dintre stresul oxidativ și inflamație la pacienți cu veruci palmo-plantare și genitale.

6. Este primul studiu care analizează dacă există diferențe cu privire la stresul oxidativ și statusul inflamator între pacienții cu veruci palmo-plantare și genitale.

8. Limitele studiului

1. Numărul redus de pacienți. Unul dintre motivele pentru care am avut un număr redus de pacienți a fost faptul reprezentat de strictetea criteriilor ceea ce a condus la eliminarea unui număr mare de subiecți potențiali. Un alt motiv a fost refuzul unor pacienți eligibili de a participa la studiu. Am inclus în cercetarea doctorală doar pacienți în faza preterapeutică ceea ce a limitat suplimentar numărul de participanți la studiu. A trebuit să avem în vedere că unii pacienți în momentul în care se adresau clinicii de dermatologie deja urmaseră diferite tratamente recomandate de medicul de familie, farmacist sau automedicație. În plus, determinarea markerilor de stres oxidativ și inflamație este costisitoare. Astfel, cu toate că am depus toate eforturile posibile pentru a avea un număr cât mai mare de pacienți, am reușit să atingem numărul prezentat și discutat în teza de doctorat.

2. Studiul a fost unicentric. Extinderea studiului ar putea aduce date suplimentare care să completeze rezultatele obținute.

Bibliografie

1. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association: Human papillomavirus. *Rev Med Virol.* 2015;25:2–23.
2. Accardi R, Gheit T. Cutaneous HPV and skin cancer. *Presse Médicale.* 2014;43(12):e435–43.
3. Tampa M, Mitran CI, Mitran MI, Nicolae I, Dumitru A, Matei C, et al. The Role of Beta HPV Types and HPV-Associated Inflammatory Processes in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *J Immunol Res.* 2020;2020:5701639.
4. Harden ME, Munger K. Human papillomavirus molecular biology. *Mutat Res Rev.* 2017;772:3–12.
5. Graham SV. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. *Clin Sci.* 2017;131(17):2201–21.
6. Venuti A, Lohse S, Tommasino M, Smola S. Cross-talk of cutaneous beta human papillomaviruses and the immune system: determinants of disease penetrance. *Phil Trans R Soc B.* 2019;374(1773):20180287.
7. Nunes E, Talpe-Nunes V, Sichero L. Epidemiology and biology of cutaneous human papillomavirus. *Clinics (Sao Paulo).* 2018;73(suppl 1):e489s.
8. Lipke MM. An Armamentarium of Wart Treatments. *Clin Med Res.* 2006;4(4):273–93.
9. Sterling JC, Gibbs S, Haque Hussain SS, Mohd Mustapa MF, Handfield-Jones SE. British Association of Dermatologists' guidelines for the management of cutaneous warts 2014. *Br J Dermatol.* 2014;171(4):696–712.

10. Cubie HA. Diseases associated with human papillomavirus infection. *Virology*. 2013;445(1–2):21–34.
11. Ahmed AM, Madkan V, Tying SK. Human Papillomaviruses and Genital Disease. *Dermatol Clin*. 2006;24(2):157–65.
12. Bansal A, Singh MP, Rai B. Human papillomavirus-associated cancers: A growing global problem. *Int J Appl Basic Med Res*. 2016;6(2):84–9.
13. Georgescu SR, Mitran CI, Mitran MI, Caruntu C, Sarbu MI, Matei C, et al. New Insights in the Pathogenesis of HPV Infection and the Associated Carcinogenic Processes: The Role of Chronic Inflammation and Oxidative Stress. *J Immunol Res*. 2018;2018:5315816.
14. Iwatsuki K, Nakayama Y, Hamada T, Nakanishi G, Shirafuji Y, Morizane S. Immunological and structural remodeling in human papillomavirus-induced warts and Bowen disease. *Eur J Dermatol*. 2013; doi: 10.1684/ejd.2013.1971
15. Nakayama Y, Asagoe K, Yamauchi A, Yamamoto T, Shirafuji Y, Morizane S, et al. Dendritic cell subsets and immunological milieu in inflammatory human papilloma virus-related skin lesions. *J Dermatol Sci*. 2011;63(3):173–83.
16. Castle PE, Giuliano AR. Chapter 4: Genital Tract Infections, Cervical Inflammation, and Antioxidant Nutrients--Assessing Their Roles as Human Papillomavirus Cofactors. *JNCI Monographs*. 2003;2003(31):29–34.
17. Scott M, Nakagawa M, Moscicki A-B. Cell-Mediated Immune Response to Human Papillomavirus Infection. *Clin Vaccine Immunol*. 2001;8(2):209–20.
18. Schiffman H. Interleukin 2 Production in Vitro by Peripheral Lymphocytes in Response to Human Papillomavirus-derived Peptides: Correlation with Cervical Pathology. *Cancer Res*. 1996;56(17):3967-74.
19. Scott ME, Ma Y, Kuzmich L, Moscicki A-B. Diminished IFN- γ and IL-10 and elevated Foxp3 mRNA expression in the cervix are associated with CIN 2 or 3. *Int J Cancer*. 2009;124(6):1379–83.
20. Barros MR, de Melo CML, Barros MLCMG, de Cássia Pereira de Lima R, de Freitas AC, Venuti A. Activities of stromal and immune cells in HPV-related cancers. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018;37(1):137.
21. Barros MR, de Oliveira THA, de Melo CML, Venuti A, de Freitas AC. Viral Modulation of TLRs and Cytokines and the Related Immunotherapies for HPV-Associated Cancers. *J Immunol Res*. 2018;2018:1–17.
22. Torres-Poveda K. Role of IL-10 and TGF- β 1 in local immunosuppression in HPV-associated cervical neoplasia. *WJCO*. 2014;5(4):753.
23. Boccardo E, Lepique AP, Villa LL. The role of inflammation in HPV carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2010;31(11):1905–12.
24. Leong CM, Doorbar J, Nindl I, Yoon H-S, Hibma MH. Loss of Epidermal Langerhans Cells Occurs in Human Papillomavirus α , γ , and μ but Not β Genus Infections. *J Investigat Dermatol*. 2010;130(2):472–80.

25. Da Silva DM, Movius CA, Raff AB, Brand HE, Skeate JG, Wong MK, et al. Suppression of Langerhans cell activation is conserved amongst human papillomavirus α and β genotypes, but not a μ genotype. *Virology*. 2014;452–453:279–86.
26. Cao Y, Zhao J, Lei Z, Shen S, Liu C, Li D, et al. Local Accumulation of FOXP3⁺ Regulatory T Cells: Evidence for an Immune Evasion Mechanism in Patients with Large Condylomata Acuminata. *J Immunol*. 2008;180(11):7681–6.
27. Amador-Molina A, Hernández-Valencia J, Lamoyi E, Contreras-Paredes A, Lizano M. Role of Innate Immunity against Human Papillomavirus (HPV) Infections and Effect of Adjuvants in Promoting Specific Immune Response. *Viruses*. 2013;5(11):2624–42.
28. Arican O, Ozturk P, Kurutas EB, Unsal V. Status of oxidative stress on lesional skin surface of plantar warts: Cutaneous oxidative stress in plantar warts. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2013;27(3):365–9.
29. Sasmaz S, Arican O, Kurutas EB. Oxidative Stress in Patients With Nongenital Warts. *Mediators Inflamm*. 2005;2005(4):233–6.
30. Cokluk E, Sekeroglu MR, Aslan M, Balahoroglu R, Bilgili SG, Huyut Z. Determining oxidant and antioxidant status in patients with genital warts. *Redox Rep*. 2015;20(5):210–4.
31. Hiraku Y, Tabata T, Ma N, Murata M, Ding X, Kawanishi S. Nitrate and oxidative DNA damage in cervical intraepithelial neoplasia associated with human papilloma virus infection. *Cancer Sci*. 2007;98(7):964–72.
32. Sharebiani H, Fazeli B, Maniscalco R, Ligi D, Mannello F. The Imbalance among Oxidative Biomarkers and Antioxidant Defense Systems in Thromboangiitis Obliterans (Winiwarter-Buerger Disease). *J Clin Med*. 2020;9(4). pii: E1036.
33. Benhar M. Oxidants, Antioxidants and Thiol Redox Switches in the Control of Regulated Cell Death Pathways. *Antioxid Basel Switz*. 2020;9(4). pii: E309.
34. Cripe TP, Alderborn A, Anderson RD, Parkkinen S, Bergman P, Haugen TH, et al. Transcriptional activation of the human papillomavirus-16 P97 promoter by an 88-nucleotide enhancer containing distinct cell-dependent and AP-1-responsive modules. *New Biol*. 1990;2(5):450–63.
35. Conway MJ, Alam S, Ryndock EJ, Cruz L, Christensen ND, Roden RBS, et al. Tissue-Spanning Redox Gradient-Dependent Assembly of Native Human Papillomavirus Type 16 Virions. *J Virol*. 2009;83(20):10515–26.
36. Akatsuka S, Li GH, Kawaguchi S, Takahashi T, Yoshihara M, Suyama M, et al. Augmented oxidative stress increases 8-oxoguanine preferentially in the transcriptionally active genomic regions. *Free Radic Res*. 2020;1–11.
37. Siegel EM, Patel N, Lu B, Lee J-H, Nyitray AG, Craft NE, et al. Biomarkers of oxidant load and type-specific clearance of prevalent oncogenic human papillomavirus infection: Markers of immune response? *Int J Cancer*. 2012;131(1):219–28.
38. Foppoli C, De Marco F, Cini C, Perluigi M. Redox control of viral carcinogenesis: The human papillomavirus paradigm. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2015;1850(8):1622–32.
39. Cruz-Gregorio A, Manzo-Merino J, González-García MC, Pedraza-Chaverri J, Medina-Campos ON, Valverde M, et al. Human Papillomavirus Types 16 and 18 Early-expressed

- Proteins Differentially Modulate the Cellular Redox State and DNA Damage. *Int J Biol Sci.* 2018;14(1):21–35.
40. Cruz-Gregorio A, Manzo-Merino J, Lizano M. Cellular redox, cancer and human papillomavirus. *Virus Res.* 2018;246:35–45.
 41. Williams VM, Filippova M, Soto U, Duerksen-Hughes PJ. HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. *Future Viro.* 2011;6(1):45–57.
 42. Shim J-H, Kim K-H, Cho Y-S, Choi H-S, Song EY, Myung P-K, et al. Protective effect of oxidative stress in HaCaT keratinocytes expressing E7 oncogene. *Amino Acids.* 2008;34(1):135–41.
 43. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem.* 2015;97:55–74.
 44. Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;338(1):668–76.
 45. Baek J, Lee M-G. Oxidative stress and antioxidant strategies in dermatology. *Redox Rep.* 2016;21(4):164–9.
 46. Tsukahara H, Shibata R, Ohta N, Sato S, Hiraoka M, Ito S, et al. High levels of urinary pentosidine, an advanced glycation end product, in children with acute exacerbation of atopic dermatitis: relationship with oxidative stress. *Metab Clin Exp.* 2003;52(12):1601–5.
 47. Braaten KP, Laufer MR. Human Papillomavirus (HPV), HPV-Related Disease, and the HPV Vaccine. *Rev Obstet Gynecol.* 2008;1(1):2–10.
 48. Erturan I, Kumbul Doğuç D, Korkmaz S, Büyükbayram HI, Yıldırım M, Kocabey Uzun S. Evaluation of oxidative stress in patients with recalcitrant warts. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2019;33(10):1952–7.
 49. Schwarz KB. Oxidative stress during viral infection: a review. *Free Radic Biol Med.* 1996;21(5):641–9.
 50. Peterhans E. Reactive oxygen species and nitric oxide in viral diseases. *Biol Trace Elem Res.* 1997;56(1):107–16.
 51. Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metab Clin Exp.* 2000;49(2 Suppl 1):3–8.
 52. Liu J, Li H, Yang F, Ren Y, Xia T, Zhao Z, et al. Epidemiology and Clinical Profile of Cutaneous Warts in Chinese College Students: A Cross-Sectional and Follow-Up Study. *Sci Rep.* 2018; 8:15450.
 53. Patel H, Wagner M, Singhal P, Kothari S. Systematic review of the incidence and prevalence of genital warts. *BMC Infect Dis.* 2013;13:39.
 54. Park IU, Introcaso C, Dunne EF. Human Papillomavirus and Genital Warts: A Review of the Evidence for the 2015 Centers for Disease Control and Prevention Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines. *Clin Infect Dis.* 2015;61(suppl 8):S849–55.
 55. Di Domenico F, Foppoli C, Coccia R, Perluigi M. Antioxidants in cervical cancer: Chemopreventive and chemotherapeutic effects of polyphenols. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1822(5):737–47.

56. Wójcik P, Biernacki M, Wroński A, Łuczaj W, Waeg G, Žarković N, et al. Altered Lipid Metabolism in Blood Mononuclear Cells of Psoriatic Patients Indicates Differential Changes in Psoriasis Vulgaris and Psoriatic Arthritis. *Int J Mol Sci.* 2019;20(17):4249.
57. Jørgensen P, Milkovic L, Zarkovic N, Waeg G, Rattan SIS. Lipid peroxidation-derived 4-hydroxynonenal-modified proteins accumulate in human facial skin fibroblasts during ageing in vitro. *Biogerontology.* 2014;15(1):105–10.
58. Mitran CI, Mitran MI, Tampa M, Nicolae I, Sarbu MI, Matei C, Georgescu SR, Popa MI. Increased lipid peroxidation in patients with skin lesions associated with human papillomavirus infection. 49th Annual ESDR meeting, Bordeaux, France, 18-21 September, 2019, published in *J Investig Dermatol.* 2019;139:144.
59. Mitran CI, Mitran MI, Tampa M, Nicolae I, Sarbu MI, Matei C, Georgescu SR, Popa MI. 8-OHdG as a marker of oxidative stress in patients with palmoplantar warts. 28th EADV Congress, Madrid Spain, 9-13 October, 2019, published in book of abstracts ISBN 978-88-942552-9-4.
60. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis. *J Environ Sci Health, Part C.* 2009;27(2):120–39.
61. Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta.* 2004;339(1–2):1–9.
62. Visalli G, Riso R, Facciola A, Mondello P, Caruso C, Picerno I, et al. Higher levels of oxidative DNA damage in cervical cells are correlated with the grade of dysplasia and HPV infection. *J Med Virol.* 2016;88(2):336–44.
63. Kvam E, Tyrrell RM. Artificial background and induced levels of oxidative base damage in DNA from human cells. *Carcinogenesis.* 1999;18(11):2281–3.
64. Papagrigroraki A, Del Giglio M, Cosma C, Maurelli M, Girolomoni G, Lapolla A. Advanced Glycation End Products are Increased in the Skin and Blood of Patients with Severe Psoriasis. *Acta Derm Venereol.* 2017;97(7):782–7.
65. Fishman SL, Sonmez H, Basman C, Singh V, Poretsky L. The role of advanced glycation end-products in the development of coronary artery disease in patients with and without diabetes mellitus: a review. *Mol Med.* 2018;24(1):59.
66. Yamagishi S-I, Matsui T, Ishibashi Y, Isami F, Abe Y, Sakaguchi T, et al. Phytochemicals Against Advanced Glycation End Products (AGEs) and the Receptor System. *Curr Pharm Des.* 2017;23(8):1135–41.
67. Byun K, Yoo Y, Son M, Lee J, Jeong G-B, Park YM, et al. Advanced glycation end-products produced systemically and by macrophages: A common contributor to inflammation and degenerative diseases. *Pharmacol Ther.* 2017;177:44–55.
68. Goh S-Y, Cooper ME. The Role of Advanced Glycation End Products in Progression and Complications of Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(4):1143–52.

69. Lee EJ, Park JH. Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE), Its Ligands, and Soluble RAGE: Potential Biomarkers for Diagnosis and Therapeutic Targets for Human Renal Diseases. *Genomics Inform.* 2013;11(4):224.
70. Haddad M, Knani I, Bouzidi H, Berriche O, Hammami M, Kerkeni M. Plasma Levels of Pentosidine, Carboxymethyl-Lysine, Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products, and Metabolic Syndrome: The Metformin Effect. *Dis Markers.* 2016;2016:6248264.
71. Suliman ME, Heimbürger O, Bárány P, Anderstam B, Pecoits-Filho R, Rodríguez Ayala E, et al. Plasma pentosidine is associated with inflammation and malnutrition in end-stage renal disease patients starting on dialysis therapy. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(6):1614–22.
72. Mitran CI, Nicolae I, Mitran MI, Tampa M, Caruntu C, Sarbu MI, Ene CD, Matei C, Ionescu AC, Georgescu SR, Popa MI. The Relationship between the Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products and Oxidative Stress in Patients with Palmoplantar Warts. *Medicina.* 2019;55(10):706. doi: 10.3390/medicina55100706.
73. Daffu G, del Pozo C, O'Shea K, Ananthakrishnan R, Ramasamy R, Schmidt A. Radical Roles for RAGE in the Pathogenesis of Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases and Beyond. *IJMS.* 2013;14(10):19891–910.
74. Davies CA, Herrick AL, Cordingley L, Freemont AJ, Jeziorska M. Expression of advanced glycation end products and their receptor in skin from patients with systemic sclerosis with and without calcinosis. *Rheumatology (Oxford).* 2009;48(8):876–82.
75. Skřha J, Soupal J, Loni Ekali G, Prázný M, Kalousova M, Kvasnička J, et al. Skin autofluorescence relates to soluble receptor for advanced glycation end-products and albuminuria in diabetes mellitus. *J Diabetes Res.* 2013;2013:650694.
76. Lee EJ, Kim JY, Oh SH. Advanced glycation end products (AGEs) promote melanogenesis through receptor for AGEs. *Sci Rep.* 2016;6:27848.
77. Uchida K. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Progress in Lipid Research.* 2003;42(4):318–43.
78. Riuzzi F, Sorci G, Sagheddu R, Chiappalupi S, Salvadori L, Donato R. RAGE in the pathophysiology of skeletal muscle: RAGE in skeletal muscle. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle.* 2018;9(7):1213–34.
79. Chen X-F, Tang W, Lin W-D, Liu Z-Y, Lu X-X, Zhang B, et al. Receptor for advanced glycation end as drug targets in diabetes-induced skin lesion. *Am J Transl Res.* 2017;9(2):330–42.
80. Tampa M, Mitran CI, Mitran MI, Nicolae I, Matei C, Mihaila D, Ionescu CA, Popa MI, Georgescu SR. The balance between oxidants and antioxidants in patients with genital warts. 49th Annual ESDR meeting, Bordeaux, France, 18-21 September, 2019, published in *J Invest Dermatol.* 2019;139:375.
81. Bongarzone S, Savickas V, Luzi F, Gee AD. Targeting the Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE): A Medicinal Chemistry Perspective. *J Med Chem.* 2017;60(17):7213–32.
82. Yüksel M, Ülfer G. Evaluation of thiol/disulfide homeostasis in patients with pityriasis rosea. *Cutan Ocul Toxicol.* 2019;38(4):338–43.

83. Ulrich K, Jakob U. The role of thiols in antioxidant systems. *Free Radic Biol Med*. 2019;140:14–27.
84. Mitran MI, Nicolae I, Tampa M, Mitran CI, Caruntu C, Sarbu MI, et al. Reactive Carbonyl Species as Potential Pro-Oxidant Factors Involved in Lichen Planus Pathogenesis. *Metabolites*. 2019;9(10):213.
85. Erel O, Neselioglu S. A novel and automated assay for thiol/disulphide homeostasis. *Clin Biochem*. 2014;47(18):326–32.
86. Ishii Y, Kondo K, Matsumoto T, Tanaka K, Shinkai-Ouchi F, Hagiwara K, et al. Thiol-reactive reagents inhibits intracellular trafficking of human papillomavirus type 16 pseudovirions by binding to cysteine residues of major capsid protein L1. *Virol J*. 2007;4:110.
87. Giuliano AR, Siegel EM, Roe DJ, Ferreira S, Baggio ML, Galan L, et al. Dietary intake and risk of persistent human papillomavirus (HPV) infection: the Ludwig-McGill HPV Natural History Study. *J Infect Dis*. 2003;188(10):1508–16.
88. Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou MCB, Rahu N. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:1–9.
89. Sproston NR, Ashworth JJ. Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Front Immunol*. 2018;9:754.
90. Sproston NR, El Mohtadi M, Slevin M, Gilmore W, Ashworth JJ. The Effect of C-Reactive Protein Isoforms on Nitric Oxide Production by U937 Monocytes/Macrophages. *Front Immunol*. 2018;9:1500.
91. Sinikumpu S-P, Huilaja L, Auvinen J, Jokelainen J, Puukka K, Ruokonen A, et al. The Association Between Low Grade Systemic Inflammation and Skin Diseases: A Cross-sectional Survey in the Northern Finland Birth Cohort 1966. *Acta Derm Venereol*. 2018;98(1):65–9.
92. Johnson-Obaseki S, Caulley L, Corsten M, Liu G, Dimitroulakos J, Goldstein D, et al. C-reactive Protein in HPV-Positive and HPV-Negative Oropharyngeal Cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2019;160(3):494–501.
93. Wortsman X, Jemec GBE, Sazunic I. Anatomical detection of inflammatory changes associated with plantar warts by ultrasound. *Dermatology (Basel)*. 2010;220(3):213–7.
94. Chen Z, Malhotra PS, Thomas GR, Ondrey FG, Duffey DC, Smith CW, et al. Expression of Proinflammatory and Proangiogenic Cytokines in Patients with Head and Neck Cancer. *Clin Cancer Res*. 1999;5(6):1369-79.
95. Choudhary MM, France TJ, Teknos TN, Kumar P. Interleukin-6 role in head and neck squamous cell carcinoma progression. *World J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg*. 2016;2(2):90–7.
96. Akdis M, Burgler S, Cramer R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E, et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : Receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(3):701-721.
97. Wang X-P, Schunck M, Kallen K-J, Neumann C, Trautwein C, Rose-John S, et al. The interleukin-6 cytokine system regulates epidermal permeability barrier homeostasis. *J Invest Dermatol*. 2004;123(1):124–31.

98. Weisel JW. Fibrinogen and fibrin. *Adv Protein Chem.* 2005;70:247-99.
347. Salini V, Saggini A, Maccauro G, Caraffa A, Shaik-Dasthagirisahab YB, Conti P. Inflammatory Markers: Serum Amyloid A, Fibrinogen and C-Reactive Protein - A Revisited Study. *Eur J Inflamm.* 2011;9(2):95–102.
99. Davalos D, Akassoglou K. Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease. *Semin Immunopathol.* 2012;34(1):43–62.
100. Fachri FA, Jusuf NK, Putra IB. Correlation between verruca vulgaris and superoxide dismutase. *Bali Med J.* 2019;8(2):414-417.

Lista cu lucrările științifice publicate

Articole

1. Articole publicate în reviste cotate Clarivate Analytics

1.1. Georgescu SR, **Mitran CI**, Mitran MI, Caruntu C, Sarbu MI, Matei C, Nicolae I, Tocut SM, Popa MI, Tampa M. New Insights in the Pathogenesis of HPV Infection and the Associated Carcinogenic Processes: The Role of Chronic Inflammation and Oxidative Stress. Journal of Immunology Research. 2018; 2018: 5315816. doi: 10.1155/2018/5315816. (FI: 3.404). (**autor corespondent**) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6129847/>

1.2. **Mitran CI**, Nicolae I, Mitran MI, Tampa M, Caruntu C, Sarbu MI, Ene CD, Matei C, Ionescu AC, Georgescu SR, Popa MI. The Relationship between the Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products and Oxidative Stress in Patients with Palmoplantar Warts. Medicina. 2019 Oct;55(10):706. doi: 10.3390/medicina55100706. (FI: 1.467). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6843152/>

1.3. Tampa M, **Mitran CI**, Mitran MI, Nicolae I, Dumitru A, Matei C, Manolescu L, Popa GL, Caruntu C, Georgescu SR. The Role of Beta HPV Types and HPV-Associated Inflammatory Processes in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. Journal of Immunology Research. 2020 Apr 6;2020:5701639. (FI: 3.404). (**contribuții egale**) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32322596>

2. Articole publicate în reviste indexate în baze de date internaționale

2.1. **Mitran CI**, Mitran MI, Tampa M, Nicolae I, Sârbu MI, Georgescu SR. Popa MI Old and new therapies for cutaneous and anogenital warts. Infectio.ro. 2017;51(3):10-14. <https://www.medichub.ro/reviste/infectio-ro/terapii-clasice-si-moderne-ale-verucilor-cutanate-si-anogenitale-id-1196-cmsid-67>

Rezumate

1. Rezumate publicate în volumele conferințelor naționale

1.1. **Mitran CI**, Mitran MI, Tampa M, Nicolae I, Popa GL, Dragomirescu CC, Ionescu AC, Georgescu SR, Popa MI. Markers of inflammation in patients with benign HPV-associated lesions. 7th Congress of the University of Medicine and Pharmacy Carol Davila, Bucharest, 10-12 October, 2019, published in Maedica – a Journal of Clinical Medicine. 2019;14(17):86. ISSN:2501-6903

1.2. **Mitran CI**, Nicolae I, Tampa M, Mitran MI, Sârbu MI, Georgescu SR, Popa MI. Rolul receptorilor solubili pentru produși de glicare avansată în dezvoltarea leziunilor cauzate de virusul papiloma uman. Al 17-lea Congres Național de Dermatologie. Brașov, 03-06 Octombrie 2018, publicat într-un supliment al revistei Dermatovenerologie. 2018;63:113 ISSN 1220-3734.

2. Rezumatele publicate în volumele conferințelor internaționale

2.1. **Mitran CI**, Mitran MI, Tampa M, Nicolae I, Sarbu MI, Matei C, Georgescu SR, Popa MI. 8-OHdG as a marker of oxidative stress in patients with palmoplantar warts. 28th EADV Congress, Madrid Spain, 9-13 October, 2019, published in book of abstracts ISBN 978-88-942552-9-4.

3. Rezumate publicate în reviste naționale și internaționale cotate Clarivate Analytics

3.1. **Mitran CI**, Mitran MI, Tampa M, Nicolae I, Sarbu MI, Matei C, Georgescu SR, Popa MI. Increased lipid peroxidation in patients with skin lesions associated with human papillomavirus infection. 49th Annual ESDR meeting, Bordeaux, France, 18-21 September, 2019, published in J Investig Dermatol. 2019;139:144. (FI:6.29).

3.2. Tampa M, **Mitran CI**, Mitran MI, Nicolae I, Matei C, Mihaila D, Ionescu CA, Popa MI, Georgescu SR. The balance between oxidants and antioxidants in patients with genital warts. 49th Annual ESDR meeting, Bordeaux, France, 18-21 September, 2019, published in J Investig Dermatol. 2019;139:375. (FI:6.29).