

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**ESTUDIO DE LA INESTABILIDAD CROMOSOMICA Y
DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL (18S Y 28S)
EN PACIENTES CON DISTINTOS GRADOS DE
AVANCE DE NEOPLASIA CERVICOUTERINA Y SU
RELACION CON LA INFECCION CON EL VIRUS
DEL PAPILOMA HUMANO**

TESIS

**QUE EN OPCION AL TITULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN GENETICA**

PRESENTA:

Q.C.B. ELISAMARIA LEAL ELIZONDO

MONTERREY, N. L.

ENERO DE 1999

TM

RC280

.U8

L4

c.1

TM

RC280

.U8

L4

c.1

TM

RC280

.U8

L4

c.1

TM

RC280

.U8

L4

c.1

TM

RC280

.U8

L4

c.1

TM

RC280

.U8

L4

c.1



1080087101

9519

1-16-99
V. C. 521

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



ESTUDIO DE LA INESTABILIDAD CROMOSOMICA Y DE LA
ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL (18S Y 28S) EN PACIENTES
CON DISTINTOS GRADOS DE AVANCE DE NEOPLASIA
CERVICOUTERINA Y SU RELACION CON LA INFECCION CON EL

ESTUDIO DE LA INESTABILIDAD CROMOSOMICA Y
DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL (18S Y 28S)
EN PACIENTES CON DISTINTOS GRADOS DE
AVANCE DE NEOPLASIA CERVICOUTERINA Y SU
RELACION CON LA INFECCION CON EL VIRUS
DEL PAPILOMA HUMANO

QUE EN OPCION AL TITULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN GENETICA
QUE EN OPCION AL TITULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN GENETICA

PRESENTA

PRESENTA:

Q.C.B. ELISAMARIA LEAL ELIZONDO

MONTERREY, N. L.
MONTERREY, N.L.

ENERO DE 1999
ENERO DE 1999

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**ESTUDIO DE LA INESTABILIDAD CROMOSOMICA Y DE LA
ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL (18S Y 28S) EN PACIENTES
CON DISTINTOS GRADOS DE AVANCE DE NEOPLASIA
CERVICOUTERINA Y SU RELACION CON LA INFECCION CON EL
VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO**

TESIS

**QUE EN OPCION AL TITULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN GENETICA**

PRESENTA

Q.C.B. ELISAMARIA LEAL ELIZONDO

MONTERREY, N.L.

ENERO DE 1999



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

**ESTUDIO DE LA INESTABILIDAD CROMOSOMICA Y DE LA
ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL (18S Y 28S) EN PACIENTES
CON DISTINTOS GRADOS DE AVANCE DE NEOPLASIA
CERVICOUTERINA Y SU RELACION CON LA INFECCION CON
EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO**

TESIS

QUE EN OPCION AL TITULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN GENETICA

PRESENTA

Q.C.B. ELISAMARIA LEAL ELIZONDO

COMISION DE TESIS:

PRESIDENTE :


M.C. CARLOS H. LEAL GARZA

SECRETARIO :


M.C. ELVA IRENE CORTES GUTIERREZ

VOCAL :


M.C. JOSE ANTONIO HEREDIA ROJAS

A Gerardo

AGRADECIMIENTOS

A mis maestros asesores: **MC Carlos Leal Garza, MC Elva Irene Cortés Gutiérrez y MC José Antonio Heredia Rojas**, gracias por haber supervisado este trabajo, por sus valiosos consejos y por haberme guiado durante la maestría.

A la Facultad de Ciencias Biológicas: a la **Dra. Ma. Julia Verde Star**, subdirectora de la División de Postgrado, por haberme permitido ingresar al programa de maestría, y a todos los maestros que participaron en mi formación académica.

Al Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS: agradezco al director, **Dr. Salvador Said Fernández**, el haberme permitido ser becario y realizar mi tesis, así mismo agradezco a todo el personal que me apoyó en el desarrollo de la misma, incluyendo nuevamente a la **MC Elva Irene Cortés Gutiérrez** por su colaboración en el muestreo y la detección molecular del virus del papiloma humano, así como por todas las facilidades que me brindó, al **MC Ricardo Cerda Flores** por su asesoría en la parte estadística, al **Dr. Antonio Luna de la Rosa** por su apoyo con el material fotográfico y diapositivas, al **QBP Guillermo González Quiroga** por permitirme utilizar equipo y reactivos, y a todos mis demás compañeros y amigos, por su apoyo moral.

Al Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 23 del IMSS: al departamento de Anatomía Patológica por su colaboración en el diagnóstico citológico e histopatológico de las mujeres que participaron en el estudio, y a la consulta de Ginecología Oncológica, en especial al **Dr. Fernando Hernández Garza** por su colaboración en la obtención de las muestras de epitelio cervical y por asesorarme en la parte clínica.

A mis grandes amigas: **MC Martha Imelda Dávila Rodríguez, MC Julie Belle Silva Cudish y Quím. Yolanda Aznar Luebert**, porque junto con Elva no sólo formamos un buen equipo de trabajo, sino que además nos une una amistad que perdurará por siempre.

A mis padres: **Sr. Jesús Mario Leal Flores y Sra. Ma. De Jesús Elizondo de Leal**, porque me dieron un hogar con amor, cuidándome y velando por mi educación desde pequeña, y porque siempre me han apoyado en todo. Y a mis hermanos: **Jesús Mario Leal Elizondo y CP Nancy Alejandra Leal Elizondo**, porque han estado a mi lado, aguantádome a veces, pero queriéndome siempre.

A mi esposo: **Dr. Gerardo Enrique Ornelas Cortinas**, porque siguiendo su ejemplo es que decidí continuar estudiando y buscar superarme como profesionista, porque me apoya y me ayuda a salir adelante, pero sobre todo, porque me ama.

Finalmente, al más importante, doy gracias a Dios, porque todo lo que soy, y todo lo que puedo llegar a ser, es sólo por su voluntad.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag	Plata
AgNO ₃	Nitrato de plata
ANOVA	Análisis de varianza
Atíp	Atípico
BrdU	Bromodeoxiuridina
°C	Grados centígrados
ca	Cáncer
CaCU	Cáncer cervicouterino
cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
c/u	Cada uno
DNA	Acido desoxirribonucleico
epi	Epitelio
H ₂ O	Agua
hr	Hora
ICH	Intercambio de cromátides hermanas
IR	Indice replicativo
KCl	Cloruro de potasio
M	Concentración molar
M1	Metafases en primera división mitótica
M2	Metafases en segunda división mitótica
M3	Metafases en tercera división mitótica
mg/ml	miligramos por mililitro
µg/ml	microgramos por mililitro
min	Minuto
MN	Micronúcleos
n	Tamaño de la población
N	Concentación normal
Na ₂ HPO ₄	Fosfato dibásico de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio

n.d.	No determinado
neg	Negativo
NIC I	Neoplasia intracervical grado 1
NIC II	Neoplasia intracervical grado 2
NIC III	Neoplasia intracervical grado 3
NOR's	Regiones organizadoras del nucléolo
OMS	Organización mundial de la salud
p	Probabilidad
PBS	Buffer de fosfatos en solución salina
pH	Potencial de hidrógeno
RCP	Reacción en cadena de la polimerasa
Red	Redondo
RNA	Acido ribonucléico
RNAr	Acido ribonucléico ribosomal
rpm	Revoluciones por minuto
S	Síntesis de DNA
SD	Desviación estándar
sp	Sangre periférica
t	Tiempo
TPG	Tiempo promedio generacional
U/ml	Unidades por mililitro
VPH	Virus del papiloma humano
X ²	Chi cuadrada
X	Media

INDICE

AGRADECIMIENTOS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
ANTECEDENTES	5
Generalidades del CaCU y su asociación con el VPH	5
Intercambio de Cromátides Hermanas (ICH)	7
Micronúcleos (MN)	9
Regiones Organizadoras del Nucléolo (NOR's)	10
HIPOTESIS	13
OBJETIVOS GENERALES	13
OBJETIVOS ESPECIFICOS	14
MATERIAL Y METODOS	15
Población estudiada	15
Metodología	17
Cultivo de sangre periférica	17
Cosecha celular	18
Epitelio cervical	19
Prueba de intercambio de cromátides hermanas	19
Tiempo promedio generacional	20
Prueba de micronúcleos en linfocitos cultivados	21
Prueba de micronúcleos en epitelio	22
Regiones organizadoras del nucléolo en metafases de linfocitos ...	22
Regiones organizadoras del nucléolo en epitelio	23
Análisis estadístico	24
RESULTADOS Y DISCUSIONES	25
Intercambio de cromátides hermanas	25
Tiempo promedio generacional	26
Micronúcleos en linfocitos de sangre periférica	27
Micronúcleos en epitelio cervical	28
Regiones organizadoras del nucléolo en metafases de linfocitos	29
Regiones organizadoras del nucléolo en epitelio cervical	29
Frecuencias de acuerdo a la presencia del virus del papiloma humano	31
CONCLUSIONES	33
Intercambio de cromátides hermanas	33

Tiempo promedio generacional	34
Micronúcleos	34
Regiones organizadoras del nucléolo	34
Virus del papiloma humano	35
PERSPECTIVAS	36
ANEXOS	37
Tabla 1 Resultados generales de las frecuencias de las pruebas evaluadas en el grupo control	38
Tabla 2 Resultados generales de las frecuencias de las pruebas evaluadas en el grupo displasia	39
Tabla 3 Resultados generales de las frecuencias de las pruebas evaluadas en el grupo cáncer <i>in situ</i>	40
Tabla 4 Resultados generales de las frecuencias de las pruebas evaluadas en el grupo cáncer invasor	41
Gráfica 1 Frecuencias de ICH y TPG en metafases de linfocitos de sangre periférica	42
Figura 1 Fotografía de ICH en metafase de linfocito de sangre periférica	42
Gráfica 2 Frecuencias de MN en linfocitos de sangre periférica y en células epiteliales de cérvix	43
Figura 2 Fotografía de MN en linfocito de sangre periférica	43
Gráfica 3 Frecuencias de NOR's en metafases de linfocitos de sangre periférica y en células epiteliales de cérvix	44
Figura 3 Fotografía de NOR's en metafase de linfocito de sangre periférica	44
Figura 4 Fotografía de NOR's en células epiteliales de cérvix de mujeres control	45
Figura 5 Fotografía de NOR's en células epiteliales de cérvix de mujeres con cáncer invasor	45
Gráfica 4 Porcentajes de polimorfismo de NOR's en células epiteliales de cérvix	46
Figura 6 Esquema de polimorfismo de NOR's en células epiteliales de cérvix	46
Figura 7 Fotografía de diferentes morfologías de NOR's en célula epitelial de cérvix	47
Figura 8 Fotografía de NOR's de forma granular en células epiteliales de cérvix	47
Gráfica 5 Frecuencias de ICH en metafases de linfocitos de sangre periférica con relación a la infección con VPH	48
Gráfica 6 TPG de linfocitos de sangre periférica con relación a la infección con VPH	48
Gráfica 7 Frecuencias de MN en linfocitos de sangre periférica con relación a la infección con VPH	49
Gráfica 8 Frecuencias de MN en células epiteliales de cérvix con relación a la infección con VPH	49

Gráfica 9	Frecuencias de NOR's en metafases de linfocitos de sangre periférica con relación a la infección con VPH	50
Gráfica 10	Frecuencias de NOR's en células epiteliales de cérvix con relación a la infección con VPH	50
LITERATURA CITADA		51

RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCU) ocupa el primer lugar en México como causa de muerte por tumores malignos en la mujer, y el Virus del Papiloma Humano (VPH) ha sido descrito como un factor importante de riesgo en su etiología. Algunos estudios citogenéticos sugieren que pruebas de mutagenicidad podrían ser de utilidad como marcadores de lesiones neoplásicas. La hipótesis del presente trabajo es que debido a su estrecha relación con eventos mutagénicos, la inestabilidad cromosómica y la actividad transcripcional 18S y 28S serán mayores en pacientes con neoplasia cervicouterina con respecto a mujeres control, con un incremento gradual de acuerdo al avance de la lesión, así como con respecto a la infección con el VPH. Los objetivos del presente estudio son evaluar la inestabilidad cromosómica y la actividad transcripcional mediante pruebas citogenéticas en mujeres con distintos grados de avance de lesión neoplásica cervicouterina y comparar las frecuencias observadas en cada prueba con respecto a la presencia del VPH y al estadio de la neoplasia. Para cada prueba a realizar se obtuvieron muestras de sangre periférica y de frotis de epitelio cervical de 45 mujeres derechohabientes en la consulta de ginecología oncológica del Hospital No. 23 del IMSS, las cuales se clasificaron según el diagnóstico clínico, citológico e histopatológico en 4 grupos de estudio: a) control negativo (sin lesión neoplásica), b) lesión premaligna (neoplasia intracervical leve y moderada), c) cáncer *in situ*, y d) cáncer invasor. La inestabilidad cromosómica se evaluó mediante las pruebas de intercambio de cromátides hermanas (ICH) y micronúcleos (MN) en linfocitos cultivados de sangre periférica y en epitelio cervical. La actividad transcripcional 18S y 28S se evaluó mediante la prueba de regiones organizadoras del nucléolo (NOR's) en metafases de linfocitos cultivados de sangre periférica y en epitelio cervical. Los resultados obtenidos en las 5 pruebas citogenéticas evaluadas mostraron un incremento significativo (ANOVA $p < 0.05$) en el grupo de cáncer invasor con respecto al control. Además, las frecuencias observadas en las pruebas de MN tanto en epitelio como en sangre, mostraron un incremento significativo de acuerdo al grado de la lesión neoplásica. La frecuencia de NOR's en epitelio no mostró incremento significativo según el grado de la lesión, sin embargo al analizar el polimorfismo se observó un incremento gradual significativo de las formas atípicas de acuerdo al avance del desarrollo neoplásico. Con respecto a la presencia del VPH, no se observó aumento significativo de las frecuencias en ninguna de las pruebas realizadas. En conclusión, nuestros resultados muestran una inestabilidad cromosómica y aumento de la actividad transcripcional 18 S y 28S en pacientes con lesiones neoplásicas cervicouterinas, y sugieren que las pruebas de MN y NOR's podrían ser de utilidad como complemento de las pruebas citológicas convencionales para la detección oportuna del cáncer cervicouterino y seguimiento de la evolución de este padecimiento.

INTRODUCCION

El cáncer ocupa a nivel mundial una de las principales causas de enfermedad y mortalidad, ya que cada año se presentan más de seis millones de muertes por algún tipo de neoplasia maligna, es por ello que su estudio es de gran interés en el ámbito científico biomédico. México no es la excepción, el cáncer constituye la segunda causa de mortalidad, después de las enfermedades cardiovasculares, con una tasa cercana a 51.6 por 100,000 habitantes (1).

El cáncer cervicouterino (CaCU) es uno de los principales problemas de salud pública en México y gran parte de América Latina. De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud, cada año, una de cada 1,000 mujeres del grupo de treinta a cincuenta y cuatro años que vive en América Latina o el Caribe, desarrolla CaCU. En México, en el período comprendido entre 1938 y 1993, la mortalidad por CaCU se incrementó de 20 a 51.8 por 100,000 habitantes, y de un 24avo. lugar como causa de muerte general ascendió en 1993 al 2do. lugar después del cáncer de pulmón, y el primer lugar como causa de muerte por tumores malignos en mujeres (2).

Estadísticas recientes muestran que en México, al igual que la tendencia mundial, la primera causa de muerte en general son las enfermedades del corazón y la segunda son los tumores malignos. Dentro de los tumores malignos, el primer lugar como causa de muerte en la población en general en México es el cáncer de tráquea, bronquios y pulmón, el segundo lugar lo ocupa el cáncer de estómago, y el tercer lugar es para el cáncer cervicouterino, con una tasa de 4.9 por 100,000 habitantes en 1996, sin embargo, en la

población femenina el cáncer cervicouterino sigue siendo el primer lugar de muerte por tumores malignos (3-6).

En la etiología del CaCU se ha asociado el Virus del Papiloma Humano (VPH), cuyo estudio ha despertado gran interés ya que algunos tipos de éste se han asociado con el desarrollo del 95% de las lesiones premalignas y malignas del cérvix (7-9).

Diversas técnicas citogenéticas que evalúan el daño cromosómico han sido desarrolladas y utilizadas ampliamente en el campo de la toxicología, pero cada vez más se han empleado como marcadores de mutagenicidad en los procesos neoplásicos por su gran sensibilidad (10-12). La inestabilidad cromosómica es evaluada mediante pruebas como la de intercambio de cromátides hermanas y la de micronúcleos (13,14), dichas pruebas han permitido estudiar efectos mutagénicos en células humanas, fenómeno que guarda una estrecha relación con infecciones virales y con predisposición a cáncer (15,16). Además, dentro del campo de la citogenética existe una prueba que puede ser empleada en el estudio citológico del cáncer, la cual se basa en la tinción argentofílica de las regiones organizadoras del nucléolo (NOR's), y que permite evaluar la actividad transcripcional de genes ribosomales en pacientes con distintas lesiones neoplásicas (17,18). El CaCU es precedido por estadios precancerosos bien definidos llamados lesiones displásicas, y a la fecha no se han realizado estudios a fondo sobre los niveles de micronúcleos, ICH y NOR's en los diferentes estadios precancerosos y cancerosos del CaCU asociados cada uno de ellos con la presencia del VPH.

El presente estudio adquiere importancia y originalidad debido a que se conoce muy poco acerca del daño cromosómico y de la actividad transcripcional asociados con la infección del VPH y con el desarrollo del CaCU, y a que de hecho, no se ha encontrado en la literatura ningún reporte integral que relacione todos estos parámetros, lo cual sería de gran importancia en la búsqueda de marcadores útiles para detectar mujeres con alto riesgo de desarrollar CaCU.

A pesar de los grandes avances en el diagnóstico y tratamiento de las pacientes con CaCU, la calidad del programa de detección oportuna de cáncer sigue siendo insuficiente, y ya que los beneficios de una mejoría en este servicio superarían a los costos, se justifica la búsqueda y establecimiento de metodologías complementarias que permitan un diagnóstico más oportuno y ayuden a identificar mujeres con alto riesgo de desarrollar esta patología (19,20).

ANTECEDENTES

Generalidades del CaCU y su asociación con el VPH

El cáncer es una enfermedad crónico-degenerativa conocida como neoplasia maligna ya que involucra la proliferación y transformación celular con características morfológicas y metabólicas completamente diferentes a las originales, su desarrollo es generalmente lento y se lleva a cabo a través de cambios biológicos en secuencias de eventos variados, lo que condiciona alteraciones genéticas múltiples que involucran la activación de oncogenes y la pérdida de genes supresores del crecimiento, con la consecuente pérdida de los puntos de control del ciclo celular y las funciones de reparación o ambas (21,22).

La enfermedad neoplásica más frecuente en la población femenina de los países subdesarrollados es el cáncer cervicouterino (CaCU). Se considera que la lesión precursora del CaCU es la neoplasia intraepitelial cervical (NIC), término que agrupa la displasia y el cáncer *in situ* (Ca *in situ*). La displasia, término que significa crecimiento anormal, implica una alteración de las características de malignizarse (hiperplasia atípica). El cáncer *in situ*, designa una lesión maligna confinada en el epitelio. La neoplasia cervicouterina es un padecimiento en varios estadios que incluyen a las lesiones preinvasoras e invasoras del cuello uterino, de hecho el término neoplasia intraepitelial cervical (NIC) fué introducido para destacar que la displasia y el cáncer *in situ* representan diversos estadios de un espectro continuo y no de dos entidades independientes. De tal manera que la neoplasia cervicouterina comienza con una lesión bien diferenciada (NIC I o displasia leve), continúa con una fase menos diferenciada (NIC II o displasia moderada), luego una lesión

intraepitelial indiferenciada (NIC III, la clásica displasia severa o cáncer *in situ*), y finalmente termina en carcinoma invasor (en diversos estadios) cuando las células neoplásicas del epitelio cervical han atravesado la membrana basal e invadido el tejido subyacente (23,24).

Las lesiones NIC I y NIC II se consideran neoplasias benignas, las cuales pueden revertir espontáneamente a la condición normal en un 35% de las pacientes, un 20% pueden permanecer inalterables durante toda la vida, y un 45% evolucionan a neoplasia maligna o cáncer (2). El tiempo de evolución de las lesiones que progresan de NIC I a III, y de éste a carcinoma invasor es muy variable, de 10 a 20 años. Debido a que la evolución de este proceso neoplásico es por lo general lento, la edad promedio de las mujeres con NIC I es de 25 años y de 50 años para las mujeres que ya presentan cáncer invasor (24).

Diversos estudios epidemiológicos sugieren que en el desarrollo del CaCU está involucrado un factor viral de transmisión sexual, siendo detectados en lesiones de CaCU diferentes tipos de papilomavirus humano (VPH). El VPH es un virus de DNA de doble cadena circular de aproximadamente 8,000 pares de bases, y entre otros, posee genes llamados E6 y E7 los cuales codifican para proteínas relacionadas con la transformación celular, por lo cual se les llama oncogenes, siendo expresados selectivamente en tumores genitales. Al infectar las mucosas genitales, los VPH inducen frecuentemente "coilocitos", células caracterizadas por una gran zona clara perinuclear y a menudo binucleada (24).

Se sabe que los tipos de VPH 6 y 11 se encuentran en estado episomal y en forma productiva en las lesiones benignas o precancerosas, y los VPH 16 y 18 se encuentran en

forma no productiva e integrados al genoma celular en las células cancerosas. Esto parece indicar que la integración de los tipos 16 y 18 está relacionada con el proceso de malignización de las células normales o la progresión tumoral (24).

Si el cáncer genital resulta de la falla de los mecanismos celulares que controlan la expresión de los genes virales persistentes, aparte de la infección por VPH se requieren de otros agentes que lesionen el DNA celular así como los factores del huésped como el estado inmunológico y hormonal. Esto pudiera explicar la asociación de otros factores carcinogénicos (herpes virus, metabolitos mutagénicos del cigarro, inflamaciones genitales crónicas, etc.), además podría explicar también los grandes períodos de latencia entre la infección primaria por el VPH y el desarrollo del cáncer, y el porqué éste se desarrolla sólo en un porcentaje relativamente pequeño de los individuos afectados (9,24,25).

Intercambio de Cromátides Hermanas (ICH)

Los ICH son intercambios recíprocos entre cromátides de un mismo cromosoma, no provocan cambio en la morfología del cromosoma y se producen en loci homólogos, involucrando rompimiento y reunión durante la replicación del DNA (26). Durante la replicación del DNA se genera tensión de las cadenas, la cual es resuelta por un mecanismo complejo que involucra rompimiento de DNA por las moléculas topoisomerasas, mismas que están implicadas en el proceso de reparación del DNA (21). Cuando existe daño en este sistema de reparación, los ICH aumentan, aunque el mecanismo molecular exacto aún no ha sido descrito (26).

El número promedio de intercambios por metafase de células humanas en condiciones normales se estima entre seis y nueve, sin embargo, cuando las células son sometidas a algunos agentes clastogénicos, la frecuencia de ICH se incrementa (27). Los ICH son el primer evento visible que posiblemente refleje el efecto de la mutagénesis a largo plazo, lo que la hace una prueba altamente sensible para la detección de daño cromosómico (13).

Los ICH son puestos de manifiesto mediante una tinción diferencial de cada cromátide en cromosomas mitóticos, lo cual se logra al incorporar un análogo de base, la bromodeoxiuridina (BrdU) al DNA en replicación por dos ciclos celulares consecutivos y subsecuentemente sometiéndose a fotodegradación y posterior tinción, donde la cromátide que tiene ambas cadenas de DNA con BrdU se tiñe más pálida con colorante de Wright que la cromátide que conserva la cadena original de DNA sin sustituír (28).

Se han encontrado frecuencias elevadas de ICH en ciertas enfermedades virales como herpes, hepatitis e influenza y en síndromes de inestabilidad cromosómica como son la ataxia telangiectasia, el síndrome de Bloom, etc, en los que el sistema de reparación del DNA es defectuoso, lo cual predispone a procesos malignos como el cáncer de piel (29-31). De hecho, frecuencias altas de ICH han sido observadas en distintos tipos de cáncer como son el cáncer oral, nasofaríngeo, de mama, de ovario y de prostata, sugiriendo a los ICH como un marcador del riesgo de progresión del tumor en estas patologías (32-36). En cuanto al cáncer cervicouterino, algunos estudios informan un número elevado de ICH en pacientes con cáncer invasor con respecto a controles (37-39).

Micronúcleos (MN)

Los micronúcleos son pequeños cuerpos redondos de origen nuclear encontrados en el citoplasma, fuera del núcleo principal. Se asemejan al núcleo en forma, estructura y propiedades de tinción, y pueden variar ampliamente en tamaño. Se originan de fragmentos cromosómicos acéntricos, los cuales han sido excluidos del núcleo hijo durante la división celular. Pueden ser también formados por cromosomas enteros que se rezagaron durante la mitosis debido a falla en el huso acromático (16).

Los micronúcleos han sido conocidos por mucho tiempo por los hematólogos como los cuerpos de Howell-Jolly, los cuales son gránulos observados en los eritrocitos policromáticos que quedan después de la expulsión del núcleo principal. Esta observación dió origen en 1970 a la llamada prueba de micronúcleos, al observar estos como la alteración numérica principal en médula ósea de hamsters sometidos a un agente mutagénico (40).

La simplicidad de la técnica, su fácil determinación y sensibilidad la hicieron una herramienta muy valiosa en las pruebas de mutagenicidad habiendo sido primero establecida en médula ósea de roedores y posteriormente se ha ampliado a linfocitos humanos (16).

Se han observado frecuencias elevadas de micronúcleos en muchos procesos cancerosos como los del tracto superior aereodigestivo, incluyendo en estos el cáncer oral, de cabeza y cuello, pulmón y esófago, encontrándose como un marcador de estadios premalignos, y se

le ha asociado a factores de riesgo de cáncer (41-43). Solo en un trabajo se encontró un incremento de la frecuencia de micronúcleos en epitelio cervical de mujeres con displasia al compararlo con un grupo de mujeres control, esto sugiere la presencia de alteraciones en la expresión de oncogenes y la producción y liberación de alguna sustancia mutagénica que se relacione con el desarrollo de lesiones neoplásicas cervicouterinas (44).

Regiones Organizadoras del Nucléolo (NOR's)

Los cromosomas acrocéntricos, los cuales se clasifican dentro de los grupos D y G, poseen unas estructuras llamadas "satélites", éstos son generalmente dos elementos redondos colocados cada uno en el extremo de los brazos cortos de dichos cromosomas y están unidos a ellos por un delgado segmento cromatínico llamado "tallo del satélite", ó constricciones secundarias. El nucléolo, el cual es un subcompartimento altamente organizado del núcleo, es el resultado de las asociaciones de los cromosomas acrocéntricos a través de sus satélites, fusionándose varios de ellos para formar un solo nucléolo en la interfase. El punto de unión son los tallos de los satélites. A estas regiones cromosómicas se les denominó regiones organizadoras del nucléolo (NOR's) y son de naturaleza acromática, están compuestos de DNA repetitivo y son localizados generalmente en la banda p12 de los cromosomas acrocéntricos (45).

El nucléolo es la estructura donde se lleva a cabo la producción ribosomal, la cual es indispensable posteriormente para la síntesis de proteínas. El tamaño del nucléolo refleja su actividad, y por ende la actividad metabólica celular, por lo tanto el tamaño del nucléolo varía grandemente en diferentes tipos celulares y en diferentes estados del metabolismo,

pudiendo ocupar hasta el 25% del núcleo en células que están produciendo cantidades inusualmente grandes de proteínas. Además, la apariencia del nucleólo cambia durante el ciclo celular, así que al aproximarse a mitosis el nucleólo comienza a disgregarse hasta desaparecer, y hacia el final de la mitosis (telofase) en que se restablece la síntesis de RNAr se vuelve a formar gradualmente. El estudio de la cromatina mediante microscopía electrónica muestra que tanto la fracción de los genes ribosomales activos como la proporción a la que cada gen es transcrito pueden variar de acuerdo a las diferentes condiciones celulares (21).

En años recientes se han desarrollado técnicas de hibridización in situ de DNA-RNA con las cuales se ha establecido que en el humano son los tallos de los satélites las estructuras que contienen el DNA ribosomal 18S y 28S. Se ha logrado visualizar a los NOR's por medio de la tinción con plata. El material que reacciona con la plata son proteínas ribonucléicas ácidas no histónicas (C23 y B23) altamente fosforiladas que se encuentran alrededor de los NOR's que estuvieron transcripcionalmente activos en la interfase precedente y permanecen unidas a éstos en la metafase, es decir, que se van a teñir con plata aquellos NOR's que son activos en la transcripción de RNAr (NOR's-Ag⁺) (45).

En general, el número promedio de cromosomas acrocéntricos con NOR's-Ag⁺ varía de cuatro a diez, siendo constante en un mismo individuo y se mantiene estable en diferentes tejidos, perdurando por largo tiempo. El número de NOR's-Ag⁺ puede variar en diferentes condiciones fisiológicas y del desarrollo, así como durante la diferenciación y la proliferación celular (45). Estudios sobre la frecuencia de NOR's han permitido relacionarlos con el desarrollo neoplásico (46-48). Desde hace varios años se han realizado

estudios en diferentes patologías neoplásicas como el cáncer de colon, pulmón, mama, piel y del sistema genitourinario, incluyendo el CaCU, donde se informa de frecuencias elevadas de NOR's (17,49,50). Estudios más recientes que incluyen el análisis de NOR's en metafases de linfocitos (51), en biopsias de epitelio cervical (52-55), y en frotis de epitelio cervical (56), han encontrado un incremento de las frecuencias de NOR's en pacientes con CaCU con respecto a mujeres controles.

Un estudio realizado por Yokoyama y col. en el que se investigó la correlación ultraestructural de los NOR's mediante microscopía electrónica menciona que el número de NOR's activos es atribuible no sólo al número de nucleólos y cuerpos nucleares, sino también a la distribución de los depósitos de partículas de plata en el nucleolo, lo cual indica que la cuenta de NOR's argentofílicos es un indicador definitivo del estado hiperactivo de las células (57). Algunos de los cambios nucleares observados en células tumorales durante el desarrollo de distintos tipos de cáncer son en la forma y tamaño además del número de NOR's (58,59).

HIPOTESIS

Debido a su estrecha relación con eventos mutagénicos, la inestabilidad cromosómica y la actividad transcripcional 18S y 28S (evaluadas mediante las frecuencias de intercambios de cromátides hermanas, micronúcleos y regiones organizadoras del nucléolo en linfocitos de sangre periférica y en células epiteliales de cérvix), serán mayores en pacientes con neoplasia cervicouterina con respecto a mujeres control; con un incremento gradual de las frecuencias de acuerdo al grado de la lesión neoplásica. Además, dichas frecuencias serán más elevadas en las muestras de mujeres infectadas con papilomavirus que las que no presentan la infección.

OBJETIVOS GENERALES

Con el presente trabajo se espera:

1. Contribuir al conocimiento que se tiene de la inestabilidad cromosómica y de la actividad transcripcional de genes ribosomales y su relación con distintas lesiones neoplásicas cervicouterinas y/o las producidas por papilomavirus.
2. Determinar la utilidad de pruebas citogenéticas que evalúan inestabilidad cromosómica y actividad transcripcional de genes ribosomales como posibles marcadores de daño neoplásico en el CaCU y tal vez poder tener un diagnóstico más oportuno.
3. Detectar mujeres con alto riesgo de desarrollar cáncer.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar en mujeres con diferentes estadios de neoplasia cervicouterina y en mujeres control la frecuencia de intercambios de cromátides hermanas en preparaciones de metafases obtenidas del cultivo de linfocitos de sangre periférica.
2. Determinar en mujeres con diferentes estadios de neoplasia cervicouterina y en mujeres control la frecuencia de micronúcleos en preparaciones de linfocitos interfásicos obtenidos del cultivo de sangre periférica y en células epiteliales de cérvix.
3. Determinar en mujeres con diferentes estadios de neoplasia cervicouterina y en mujeres control la actividad de genes ribosomales mediante la frecuencia de las regiones organizadoras del nucléolo en preparaciones de metafases de linfocitos obtenidos del cultivo de sangre periférica y en células epiteliales de cérvix.
4. Conocer la significancia estadística de las frecuencias determinadas en los objetivos 1 al 3 con respecto al estado de avance de la lesión cervicouterina y a la presencia del papilomavirus.

MATERIAL Y METODOS

Población estudiada

La población a estudiar constó de un total de 86 mujeres que acudieron a la consulta de ginecología oncológica del Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 23 del IMSS, en el período comprendido de febrero de 1996 a febrero de 1998. El diagnóstico clínico fue realizado mediante la observación con colposcopio, el cual permite la visualización del cuello cervical y realizar la toma de muestra directa de la lesión (60), y por el departamento de anatomía patológica de dicho Hospital, mediante la revisión citológica de frotis cervicales con la tinción de Papanicolau (61) y en caso necesario por la revisión de preparaciones obtenidas por biopsia para un diagnóstico preciso, con la búsqueda intencionada de coilocitos, los cuales evidencian la presencia del VPH (62), todos los diagnósticos se efectuaron siguiendo los criterios establecidos por la OMS (63). Además se contó con la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) realizada en el Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS, como prueba concluyente de la presencia o ausencia del VPH en muestras de exudado cervical (64), sin embargo, en los casos en los que se obtuvo un resultado no satisfactorio en esta prueba, el criterio para considerar la presencia de VPH fue el resultado positivo de coilocitos en citología o en biopsia; de tal manera que un resultado negativo para coilocitos acompañado de resultado no satisfactorio de RCP se consideró como VPH no determinado (n.d.).

Los criterios de inclusión de las mujeres que participaron en el presente estudio fueron los siguientes:

- * Contar con un diagnóstico preciso
- * No haber sido sometida a ningún tratamiento con fármacos, quimioterapia o radioterapia
- * No presentar datos de tabaquismo crónico ni alcoholismo.

Para cada una de las pruebas citogenéticas se incluyeron 45 mujeres, las cuales se clasificaron en cuatro grupos de estudio de acuerdo al diagnóstico:

- * Grupo control negativo (mujeres sin lesión neoplásica del cérvix), n = 15.
- * Grupo displasia (pacientes con NIC I y II), n = 10.
- * Grupo cáncer *in situ*, n = 10.
- * Grupo cáncer invasor, n = 10.

El material biológico consistió en muestra de cada paciente de 3 ml de sangre venosa heparinizada y 2 laminillas de raspado de epitelio cervical.

Las pruebas citogenéticas realizadas fueron las siguientes:

<u>Sangre:</u>	<u>Epitelio:</u>
ICH	MN
MN	NOR's
NOR's	

Metodología

Para las muestras de sangre periférica, a cada paciente se le realizaron tres cultivos, uno por cada prueba, todos siguiendo el mismo protocolo básico de cultivo y cosecha (28), y posteriormente a cada uno se le realizaron las modificaciones para cada prueba; se descartaron las laminillas de cultivos que presentaron contaminación o escaso crecimiento celular. Para las muestras de epitelio cervical, de cada paciente se obtuvieron dos laminillas, una para cada prueba, las cuales se fijaron con spray para citologías y posteriormente se procesaron; fueron descartadas las laminillas que presentaron exceso de bacterias, de leucocitos polimorfonucleares o de moco cervical.

Cultivo de sangre periférica

El protocolo básico de cultivo de sangre completa heparinizada para el crecimiento selectivo de linfocitos es el siguiente:

1.- Adicionar a frascos de cultivo en condiciones estériles:

- * 4 ml de medio Mc Coy 5 A modificado o RPMI 1640 suplementado con L-glutamina
- * 1 ml de suero bovino fetal descomplementado
- * 30.3 ml de fitohemaglutinina
- * 0.05 ml de mezcla de penicilina + estreptomicina
(10000 U/ml + 20 mg/ml)
- * 0.05ml de heparina de sodio

*** 10 a 12 gotas de sangre heparinizada**

2.- Mezclar suavemente e incubar a 37°C con 5% CO₂ por 96 hr.

Cosecha celular

Después de 96 hr de incubación, los cultivos se procesan con el siguiente protocolo básico de cosecha celular para la obtención de metafases de linfocitos:

- 1.- Agregar a cada cultivo 0.2 ml de colchicina 10 µg/ml
- 2.- Mezclar e incubar a 37°C por 30 min
- 3.- Transferir el medio de cultivo a tubos cónicos, centrifugar por 10 min a 1,500 rpm y descartar el sobrenadante
- 4.- Agregar 5 ml de KCl a una concentración de 0.075 M a 37°C
- 5.- Resuspender suavemente con pipeta pasteur e incubar a 37°C por 60 min
- 6.- Agregar lentamente por las paredes del tubo 1 ml de solución fijadora Carnoy (ácido acético glacial + metanol en proporción 1:3)
- 7.- Mezclar, centrifugar por 10 min a 1,500 rpm centrifugar y descartar el sobrenadante
- 8.- Realizar 3 lavados sucesivos con 3 ml de solución fijadora c/u
- 9.- El botón celular se resuspende en 0.5 ml de solución fijadora
- 10.- Sobre laminillas limpias y desengrasadas, en un ángulo de 45° se dejan caer 2 a 3 gotas del botón celular resuspendido desde una altura aproximada de 30 cm
- 11.- Las preparaciones se dejan secar al aire para su posterior tinción según la prueba a realizar.

Epitelio cervical

La muestra de raspado cervical se extiende en forma circular sobre laminillas limpias y se fijan con spray especial para citologías para su traslado, posteriormente se sumergen en solución fijadora Carnoy fría. Las preparaciones se dejan secar al aire para su posterior tinción según la prueba a realizar.

Prueba de intercambio de cromátides hermanas

Se cultivan los linfocitos de sangre periférica de la manera anteriormente descrita y a las 24 hr se agrega 0.5 ml de bromodeoxiuridina (BrdU) a una concentración de 100 µg/ml. A las 96 hr de cultivo se cosecha de la manera descrita y se tiñe según la técnica propuesta por Perry-Wolff (65):

- 1.- Las laminillas se incuban sumergidas en solución Hoechst 33258 a una concentración de 150 µg/ml a temperatura ambiente y en oscuridad durante 1 hr
- 2.- Enjuagar con H₂O, secar, agregar 5 gotas de buffer Mc. Ilvine a un pH de 8.0 (9.7ml Na₂HPO₄ 0.2M + 0.3 ml ácido cítrico 0.1M) y colocar un cubreobjetos
- 3.- Exponer a la laminilla a luz negra o ultravioleta, a una temperatura de 60°C y en la oscuridad por 30 min
- 4.- Enjuagar con H₂O, secar y proteger de la luz
- 5.- Teñir con Wright por 2 min (0.5 ml de Wright 0.28% + 1.5 ml de H₂O destilada)

6.- Aclarar en xilol, montar con resina y proteger de la luz

El conteo de los intercambios de cromátides hermanas fué realizado al microscopio en objetivo de 100x , en al menos 30 metafases en segunda división por paciente, sólo se escogieron metafases en donde hubiera una clara diferenciación de las cromátides (Figura 1). Los ICH localizados en la porción terminal del cromosoma se consideraron como uno, mientras que los intersticiales se consideraron dos debido a que el criterio a seguir es el número de rupturas cromosómicas involucradas.

Tiempo promedio generacional

Paralelamente al análisis de ICH se analizó el tiempo promedio generacional (TPG) debido a que la técnica descrita por Perry-Wolff permite la identificación de metafases en primera división (metafases con todos sus cromosomas con ambas cromátides oscuras), en segunda división (metafases con todos sus cromosomas con una cromátide pálida y una oscura) y en tercera división o más (metafases con el 50% o más de sus cromosomas con ambas cromátides pálidas y el resto de los cromosomas con una cromátide pálida y otra oscura). Se analizan 100 metafases al microscopio y se calcula el TPG mediante el empleo de la siguiente fórmula descrita por Ivett (66):

$$\text{TPG} = t / \text{IR}$$

donde: t = tiempo de exposición del cultivo a la BrdU en horas

IR = índice replicativo, el cual se calcula:

$$\text{IR} = 1 \times \text{M1} + 2 \times \text{M2} + 3 \times \text{M3} / 100$$

donde: M1 = porcentaje de metafases en primera división

M2 = porcentaje de metafases en segunda división

M3 = porcentaje de metafases en tercera división o más

Se descartaron las laminillas en las que no había una clara diferenciación entre las metafases en primera, segunda o tercera división celular.

Prueba de micronúcleos en linfocitos cultivados de sangre periférica

Se cultivan los linfocitos de la manera descrita en el protocolo básico. Posteriormente se cosecha según la técnica descrita por Hogstedt (67):

- 1.- A las 96 hr de incubación se transfiere el cultivo a un tubo cónico (sin adición de colchicina), centrifugar por 10 min a 1,500 rpm y descartar el sobrenadante
- 2.- Agregar 5 ml de solución PBS (buffer de fosfatos en solución salina, pH 7.0), resuspender suavemente con pipeta pasteur
- 3.- Centrifugar 10 min a 1,500 rpm y descartar el sobrenadante
- 4.- Agregar 5 ml de KCl a una concentración de 0.075 M, resuspender ligeramente con pipeta pasteur
- 5.- Inmediatamente agregar 2 ml de solución fijadora Carnoy,
- 6.- Centrifugar por 10 min a 1,500 rpm y descartar el sobrenadante
- 7.- Hacer un lavado más con 3 ml de solución fijadora
- 8.- El botón celular se resuspende y gotea sobre laminillas de la manera descrita en el protocolo básico de cosecha celular

- 9.- Tefir con Wright por 1 min (0.5 ml de Wright 0.28% + 1.5 ml de solución buffer de fosfatos pH 7.0)
- 10.- Aclarar en xilol y montar con resina

Las frecuencias de micronúcleos se analizaron al microscopio en objetivo de 40x y 100x en 1,000 células interterfásicas por paciente (Figura 2).

Prueba de micronúcleos en epitelio cervical

Las laminillas de frotis cervical ya fijadas y secas se tiñen con Wright por 1 min (0.5 ml de Wright 0.28% + 1.5 ml de solución buffer de fosfatos pH 7.0) y se montan con resina. Las frecuencias de micronúcleos son analizadas al microscopio en objetivo de 40x y 100x en 1,000 células epiteliales por paciente.

Regiones organizadoras del nucléolo en metafases de linfocitos de sangre periférica

Las metafases de linfocitos de sangre periférica se obtienen mediante el protocolo básico de cultivo y cosecha celular. Las laminillas obtenidas se tiñen con la técnica de plata coloidal descrita por Platon y con modificaciones por McLemore (68,69):

- 1.- Preparar una solución de AgNO₃ al 50% y filtrar.
- 2.- Preparar la solución reveladora de gelatina al 2% en ácido fórmico 1%, disuelta por temperatura de 37°C en baño maría por 30 min, y ajustar el pH a 3.0 con NaOH 1N.

- 3.- Posteriormente preparar la mezcla de plata coloidal:
solución de AgNO_3 + solución de gelatina en proporción 2:1
(4 gotas de AgNO_3 + 2 gotas de gelatina para cada laminilla)
- 4.- Inmediatamente después de mezclar, colocar sobre la laminilla y cubrir con un cubreobjetos
- 5.- Colocar en cámara húmeda por 30 min a temperatura ambiente en oscuridad
- 6.- Enjuagar 3 veces con agua destilada
- 7.- Sumergir la laminilla por 5 min en una solución de tiosulfato de sodio al 5%
- 8.- Enjuagar 3 veces en agua destilada y secar
- 9.- Aclarar en xilol, montar con resina y proteger de la luz

Las frecuencias de cromosomas con NOR's activos fueron analizadas al microscopio con objetivo de 100x en 30 metafases por paciente. Se cuantificaron los cromosomas acrocéntricos que presentaban NOR's teñidos con plata (Figura 3), no se tomó en cuenta el tamaño, la forma ni si estaban asociados o fusionados entre dos o más cromosomas.

Regiones organizadoras del nucléolo en epitelio cervical

Las laminillas de frotis cervical ya fijadas y secas se tiñen de la misma manera con la técnica de plata coloidal descrita por Platon y con modificaciones por McLemore (68,69), sólo varía el tiempo de incubación a 45 min. La frecuencia y el polimorfismo de NOR's son analizados al microscopio en objetivo de 100x en 100 células epiteliales por paciente (Figuras 4 y 5). Los polimorfismos considerados se representan en la Figura 6. Los NOR's

redondos se consideraron como "típicos", mientras que todas las demás formas observadas se consideraron como NOR's "atípicos" (Figuras 7 y 8).

Análisis estadístico

La significancia de los valores promedio de las frecuencias observadas entre los diferentes grupos de estudio para cada prueba realizada fue evaluada por la prueba de ANOVA ($p < 0.05$). La significancia de los porcentajes del polimorfismo de los NOR's en epitelio se evaluó mediante la prueba X^2 ($p < 0.05$) (70).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los resultados generales obtenidos en el presente trabajo se muestran en las Tablas 1 a 4, en donde se pueden observar las frecuencias obtenidas de cada prueba citogenética (ICH, TPG, MN y NOR's en linfocitos de sangre periférica y en células del epitelio cervical), además del resultado de la determinación del VPH, para cada paciente en los diferentes grupos de estudio de acuerdo al diagnóstico (grupo control, displasia, cáncer *in situ*, y cáncer invasor).

Intercambio de cromátides hermanas

En la Gráfica 1 podemos observar un aumento significativo ($p < 0.05$) de las frecuencias de ICH en los grupos de pacientes con respecto al grupo control, excepto en el grupo de cáncer *in situ*. Estos resultados están de acuerdo con un informe previo (71), en donde sólo se encontró un aumento significativo de las frecuencias de ICH en el grupo de cáncer invasor (no en los grupos displasia y cáncer *in situ*), concordando también con lo informado por Xu, Capalash, Dhillon y Lukovic (37-39,72), quienes encuentran daño cromosómico evaluado mediante las frecuencias de ICH en mujeres con cáncer invasor comparado con mujeres sanas. Las diferencias observadas en el presente trabajo (grupo cáncer *in situ*) pueden ser debidas al número de pacientes analizadas, a diferencias en los medios de cultivo y a las condiciones de laboratorio utilizadas en los diferentes trabajos.

Por otra parte, no se encontró un incremento gradual de las frecuencias de acuerdo al avance de la lesión (misma Gráfica 1), ya que al comparar entre sí a los tres grupos de

pacientes no se encontró diferencia significativa, lo cual concuerda con el reporte de Lukovic (72), sin embargo estos resultados se oponen a lo informado por Yokota y col. (73) quienes afirman una correlación entre el nivel de ICH y el grado de avance de la neoplasia; lo cual nuevamente nos hace pensar en que deben de uniformizarse el tamaño de la muestra y las condiciones del cultivo para la obtención de cromosomas.

Tiempo promedio generacional

No se observó diferencia significativa en los TPG de los linfocitos de sangre periférica cultivados para cada grupo de pacientes con respecto al grupo control ni tampoco de acuerdo al grado de avance de la lesión neoplásica (Gráfica 1). Aunque parece haber una ligera disminución del TPG en los grupos de pacientes con respecto al control, lo cual podría indicar que el ciclo celular tiende a acortarse en la neoplasia cervicouterina, sin embargo estos hallazgos no fueron estadísticamente significativos. Este comportamiento también fue informado en un trabajo previo (71), lo cual nos podría indicar que ciertas células neoplásicas *in vivo* expresen factores estimulantes del ciclo celular, no siendo esto lo suficiente para acelerar de manera significativa el ciclo de otros tejidos como son los linfocitos; por lo cual sería de utilidad medir el ciclo celular mediante otro método en el que se puedan utilizar las células del tejido afectado, en este caso el epitelio cervicouterino. Lo anterior es apoyado por un estudio realizado en epitelio esofágico con diferentes estadios de cáncer y precáncer en el cual se midió la cantidad de DNA en fase S mediante citometría de flujo, informando que la fracción de DNA en fase S se incrementa en dicho padecimiento, y además en correlación al grado de avance de la lesión(74), indicando que el ciclo celular es

más rápido en las células afectadas, lo cual podría ser factible también en otros tipos de cáncer, no sólo el esofágico.

Existen muy pocos informes en los que se utilice el TPG para medir la cinética del ciclo celular con respecto al cáncer; un estudio realizado en cáncer de colon menciona, en contraste a lo esperado, un alargamiento del ciclo celular expresado en valores aumentados de TPG en pacientes, en comparación con controles sanos (75), la posible explicación pudiera ser que en este tipo de cáncer en particular, los linfocitos tuvieran una respuesta menor al estímulo por la fitohemaglutinina *in vitro*, o que la respuesta inmune celular se encuentre alterada. Capalash informa también una prolongación del ciclo celular en mujeres con cáncer cervicouterino (38), no obstante, este estudio es objetable ya que se basa sólo en los promedios de células en primera, segunda y tercera división, y no toma en cuenta el tiempo de exposición a BrdU y por ende no analiza el ciclo celular en función del TPG.

Micronúcleos en linfocitos de sangre periférica

Se encontró un aumento significativo (ver Gráfica 2) de las frecuencias de MN en linfocitos de sangre periférica cultivados *in vitro* de los tres grupos de pacientes con respecto al grupo control. Sin embargo, no se encontró incremento gradual de las frecuencias según el grado de avance de la enfermedad.

La mayoría de los estudios de micronúcleos en linfocitos cultivados de sangre periférica encontrados en la literatura se enfocan hacia la evaluación de factores carcinogénicos, y no con relación al cáncer *per se*; en este respecto, un estudio realizado por Duffaud (12)

demuestra que este parámetro se encuentra elevado significativamente en pacientes con cáncer en general, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el presente trabajo, siendo éste además una contribución importante al ser específico para la neoplasia cervicouterina, además de tomar en cuenta los diferentes estadios de la enfermedad.

Micronúcleos en epitelio cervical

Las frecuencias de MN en células del epitelio cervicouterino de los grupos de pacientes fueron significativamente mayores que las encontradas en el grupo control. En cuanto al grado de avance de la enfermedad, no se encontró diferencia entre el grupo displasia y cáncer *in situ*, pero sí entre éste último y el cáncer invasor, observándose exactamente el mismo comportamiento en la prueba en epitelio y en sangre periférica, tanto al comparar cada grupo con respecto al control como con respecto al grado de avance de la lesión neoplásica (ver Gráfica 2).

Varios autores han estudiado las frecuencias de MN en células neoplásicas en estadios premalignos y malignos, dichos estudios conciernen principalmente al cáncer del tracto aereodigestivo superior (41,43), encontrando frecuencias mayores en pacientes que en controles sanos, sin embargo, sólo se encontró un reporte en la literatura con relación al cáncer cervicouterino, concordando nuestros resultados con los del autor (44).

Regiones organizadoras del nucléolo en metafases de linfocitos de sangre periférica

Se encontró un aumento significativo de las frecuencias de NOR's en los gupos de pacientes comparados con el grupo control. Sin embargo, no se encontró un incremento significativo de acuerdo al avance de la lesión (ver Gráfica 3).

Nuestros resultados concuerdan con un estudio realizado por Cortés (51) al encontrar en ambos trabajos un incremento significativo de las frecuencias de NOR's en metafases de linfocitos cultivados de sangre periférica en pacientes con cáncer cervicouterino invasor comparado con el grupo control, sin embargo, difieren en cuanto a que en el estudio mencionado se informa un ligero incremento pero no significativo en los estadios premaligno e *in situ*, esto podría deberse al método de tinción utilizado, siendo probable que los NOR's sean mas sensibles a la plata coloidal que a la plata amoniacal.

Regiones organizadoras del nucleolo en epitelio cervical

Al comparar cada grupo de pacientes con respecto al grupo control sólo se observó un incremento significativo de las frecuencias de NOR's en epitelio cervical en el grupo de cáncer invasor (ver Gráfica 3, Figuras 4 y 5). Así mismo, tampoco se encontró incremento gradual de las frecuencias según el grado de avance de la enfermedad. Sin embargo, al cuantificar los NOR's de acuerdo a su morfología en "típicos" para la clásica forma redonda, bien delimitada y homogéneamente teñida, y en "atípicos" para las formas irregulares que van desde alargadas, vesiculares y granulares (ver Figuras 6, 7 y 8), se encontró que el porcentaje de las formas "atípicas" se incrementa significativamente de

acuerdo al grado de la lesión, excepto en el último estadio (ver Gráfica 4). Este polimorfismo puede deberse a que a medida que aumenta la actividad transcripcional de los genes ribosomales, aumenta la cantidad de proteínas asociadas en el complejo ribonucleico adoptando diversas formas puestas de manifiesto mediante la captación argentofílica, también puede deberse a que muchas células estén cercanas al período de mitosis, en el cual existen cambios en la forma del nucleólo, y esto se reflejaría en un aumento de la tasa de replicación celular.

Tomando en cuenta las frecuencias observadas, el presente estudio concuerda con el trabajo de Cardillo, quien trabajó también con muestras de citología cervical (76), pero difiere con otros autores que mencionan un incremento significativo de las frecuencias de acuerdo al grado de la lesión (53-55), lo cual se explica debido a que en dichos reportes la muestra de epitelio proviene de biopsias, centrándose el conteo de NOR's en el estrato basal del epitelio cervicouterino. Calore informa también de un incremento gradual de las frecuencias de NOR's de acuerdo al grado de la lesión, utilizando muestra de frotis de citología cervical (56), sin embargo, selecciona los campos con células anormales al microscopio, a diferencia del presente estudio en donde el conteo es realizado en 100 células epiteliales de manera aleatoria.

En cuanto al polimorfismo de los NOR's, algunos autores han señalado que además del incremento de las frecuencias, existe un cambio en el tamaño y morfología de los NOR's en diferentes patologías oncológicas (58,77), sin embargo, se enfocan principalmente en el análisis de imagen midiendo el área de los NOR's y su relación con el área nuclear y celular. Concerniente al análisis de la morfología de los NOR's en epitelio cervicouterino

no se han encontrado reportes en la literatura, razón por la cual este trabajo adquiere mayor relevancia.

Frecuencias de ICH, MN y NOR's con respecto a la presencia del VPH

Los resultados de la detección del virus del papiloma humano (VPH) en el total de las mujeres que participaron en el estudio, fueron los siguientes:

- * 27 mujeres sin lesión neoplásica del cérvix, de las cuales 11 fueron VPH positivo, 13 negativo y 3 no determinado.
- * 17 mujeres con diagnóstico de displasia (NIC I y II), de las cuales 11 fueron VPH positivo, 5 negativo y 1 no determinado.
- * 22 mujeres con cáncer *in situ* (NIC III), de las cuales 7 fueron VPH positivo, 11 negativo y 4 no determinado.
- * 20 mujeres con cáncer invasor, de las cuales 4 fueron VPH positivo, 7 negativo y 9 no determinado.

Para analizar la inestabilidad cromosómica y la actividad transcripcional de los genes ribosomales de acuerdo a la infección por el VPH, para cada prueba citogenética evaluada, se dividió a la población estudiada en en dos grupos: controles y pacientes (incluyendo displasia, cáncer *in situ* y cáncer invasor), debido a que el comparar las frecuencias de las pruebas según la presencia de VPH para cada uno de los cuatro grupos de estudio originales disminuiría considerablemente las n.

No se encontró diferencia significativa de acuerdo a la presencia del VPH tanto en el grupo control como en el de pacientes en ninguna de las pruebas citogenéticas realizadas

(Gráficas 5 a 10), con excepción sólo del grupo control para ICH (Gráfica 5) y el grupo de pacientes para MN en sangre (Gráfica 7), en los cuales, sin embargo, la diferencia no se debió a un incremento de las frecuencias, sino por el contrario, a una disminución de éstas con respecto a presencia del VPH. Estos resultados pueden indicar que el aumento de las frecuencias no es debido al VPH, sino al cáncer *per se*, sin embargo, para asegurar tal cosa debe aumentarse el tamaño de la muestra; debe también tomarse en cuenta que no se está considerando el tipo de papilomavirus presente, y que además en las pruebas citogenéticas se evalúa el daño a nivel cromosómico (celular) y no génico (molecular).

La asociación del VPH con parámetros citogenéticos en mujeres con lesiones cervicouterinas informada en la literatura hace referencia a la fragilidad cromosómica (78,79), la cual es un índice de inestabilidad cromosomal, encontrando que los tipos virales 16 y 18, los cuales se sabe que tienen capacidad de integración al genoma, se asocian con valores elevados de sitios frágiles y a su vez con estadios avanzados de neoplasia cervicouterina. Lo cual sugiere que otros parámetros citogenéticos pudieran presentar el mismo comportamiento, no obstante, no se encontraron reportes en los que se emplee ninguna de las pruebas utilizadas en el presente trabajo (ICH, MN, NOR's) con relación a la presencia del VPH, siendo nuevamente una contribución aportada que puede dar lugar a posteriores investigaciones.

CONCLUSIONES

La mayoría de los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con los encontrados en la literatura, sin embargo una contribución importante es que casi no existen reportes de las pruebas citogenéticas que se emplearon en el estudio relacionadas con la presencia del virus del papiloma humano, así como tampoco casi existen trabajos donde se utilice como muestra el frotis de epitelio cervical, la cual presenta la ventaja de ser mas accesible que la muestra de biopsia.

Los resultados muestran que tal como se planteó en la hipótesis, existe inestabilidad cromosómica y aumento en la actividad de los genes ribosomales en las pacientes con neoplasia cervicouterina, sin embargo de acuerdo al grado de avance de la neoplasia, la evidencia más palpable la dió la actividad transcripcional ribosomal analizada mediante el polimorfismo de las regiones organizadoras del nucleólo en células epiteliales; contribución también aportada por este trabajo.

Intercambio de cromátides hermanas

El análisis de los ICH demostró inestabilidad cromosomal en pacientes con cáncer cervicouterino, sin embargo, dado que muchos factores pueden influir sobre este parámetro, y a las implicaciones técnicas y económicas, esta prueba puede ser poco práctica con fines de complemento diagnóstico.

Tiempo promedio generacional

El TPG no probó en ningún caso tener utilidad con fines clínicos. Considerando además que éste parámetro también se ve fácilmente afectado por factores externos, ésta prueba no es recomendable para la evaluación del ciclo celular, por lo cual, en vista de los resultados obtenidos, sería de mayor utilidad para éste fin la prueba de NOR's en epitelio cervicouterino, aunado, en base a lo mencionado en la literatura, a la medición del DNA en fase S .

Micronúcleos

Los resultados de micronúcleos en epitelio y en sangre, los cuales mostraron el mismo comportamiento, sugieren que no sólo en el tejido involucrado hay inestabilidad cromosómica, sino que las células neoplásicas podrían liberar sustancias que difundan hacia la circulación sanguínea y afectar a otros tipos de células. La utilidad de la prueba de MN en frotis de epitelio como apoyo diagnóstico tiene la ventaja de ser de bajo costo y de material biológico de fácil acceso en comparación con la biopsia; la desventaja es que no se observó diferencia entre los estadios de displasia y cáncer *in situ*, y que el análisis microscópico de 1000 células por paciente podría hacer a esta prueba poco práctica con fines de rutina en la clínica.

Regiones organizadoras del nucléolo

Aunque la prueba de NOR's en metafases de linfocitos cultivados de sangre periférica

mostró incremento de las frecuencias en las pacientes con neoplasia comparadas con mujeres control, el hecho de no mostrar incremento gradual conforme al avance de la lesión no la convierte en una prueba suficientemente útil para el seguimiento de la evolución del padecimiento, además de las implicaciones técnicas que conlleva el cultivo de la muestra que la hacen impráctica con fines de rutina clínica.

Puesto que el análisis combinado de la frecuencia y polimorfismo de las regiones organizadoras del nucléolo en epitelio cervical mostró diferencias significativas entre los cuatro grupos del presente estudio, además de lo accesible de la toma de la muestra, y su relativamente bajo costo comparada con pruebas moleculares o histoquímicas, todas estas ventajas la hacen una herramienta de gran utilidad como complemento de las pruebas citológicas convencionales, pudiendo proporcionar apoyo en el diagnóstico oportuno de las neoplasias cervicouterinas y en el seguimiento de la evolución del padecimiento.

Virus del papiloma humano

La presencia del virus del papiloma humano no probó tener efecto sobre las frecuencias obtenidas en las pruebas citogenéticas indicadoras de mutagenicidad evaluadas (ICH y MN), ni sobre la frecuencia de NOR's, así que aunque está comprobada la participación del VPH en la etiología del CaCU, tal vez ésta se ve reflejada a nivel molecular y no cromosómico; sin embargo habría que aumentar el tamaño de la muestra para cada grupo diagnóstico y también tomar en cuenta la tipificación del VPH.

PERSPECTIVAS

No obstante que la inestabilidad cromosómica evaluada por las frecuencias de ICH y de MN, tiene gran utilidad práctica en el campo de la farmacología y toxicología, también podría ser una herramienta útil en el estudio del cáncer cervicouterino, puesto que se podría investigar este parámetro en relación con el pronóstico de recuperación de las pacientes una vez que se han sometido a cirugía (histerectomía), o después de los tratamientos de radioterapia y/o quimioterapia. Por lo tanto, se sugieren estudios a largo plazo en los cuales el tamaño de la muestra sea mayor, los criterios del procedimiento puedan uniformizarse para ser mejor controlados, e incluso se podrían utilizar diferentes tipos de células en cultivo.

Por otra parte, de acuerdo a los resultados observados en la prueba de NOR's en epitelio, se sugiere que ésta podría ser de utilidad clínica en apoyo al diagnóstico y seguimiento de las pacientes con neoplasia cervicouterina. El siguiente paso podría ser un estudio prospectivo a nivel poblacional que sirva como programa piloto, donde se le de seguimiento a todas las pacientes en estadios tempranos del desarrollo neoplásico, analizando frecuencia y polimorfismo de las regiones organizadoras del nucléolo en muestras de frotis de epitelio cervical, además de la implementación de equipos de análisis de imagen para la medición del tamaño y la relación de proporción del espacio nuclear ocupado. Un estudio de este tipo daría la fuerza contundente para la implementación formal dentro del programa de detección oportuna del cáncer cervicouterino.

ANEXOS

Tabla 1 Resultados generales de las frecuencias de las pruebas evaluadas

GRUPO CONTROL

clave	ICH	TPG	MN sp	MN epi	NOR's sp	NOR's epi	Red - Atíp	HPV
c 01	-	-	9	4	4.33	193	145 - 48	neg
c 02	-	-	-	-	3.07	-	-	n.d.
c 03	-	-	-	2	-	252	207 - 45	+
c 04	-	-	8	1	-	231	185 - 46	neg
c 05	-	-	10	1	3.13	233	204 - 29	neg
c 06	-	-	-	4	-	-	-	neg
c 07	-	-	5	-	-	244	233 - 11	+
c 08	5.67	46.2	-	6	-	198	174 - 24	+
c 09	4.15	61.5	7	5	3.83	202	162 - 40	+
c 10	4.53	59.0	6	2	3.77	-	-	+
c 11	-	-	-	6	-	-	-	neg
c 12	-	-	-	6	3.17	266	256 - 10	neg
c 13	6.27	36.2	-	-	2.60	-	-	+
c 14	7.33	-	10	5	3.43	283	223 - 60	neg
c 15	-	-	9	-	4.33	251	213 - 38	neg
c 16	-	-	-	-	3.13	-	-	neg
c 17	6.93	32.1	8	4	3.70	244	180 - 64	neg
c 18	5.90	30.6	6	3	4.57	236	167 - 69	+
c 19	6.07	28.2	-	-	5.67	-	-	+
c 20	5.70	-	-	6	5.57	242	206 - 36	+
c 21	7.17	34.3	5	4	-	255	221 - 34	n.d.
c 22	7.13	19.8	3	-	-	-	-	neg
c 23	6.57	22.5	-	-	-	-	-	neg
c 24	6.90	18.3	7	-	-	-	-	+
c 25	7.27	22.2	3	-	-	-	-	n.d.
c 26	5.07	32.2	6	-	3.53	-	-	+
c 27	-	-	-	-	-	251	241 - 10	neg
X	6.18	34.08	6.80	3.93	3.86	2.39	2.01-0.38	
SD ±	1.01	13.86	2.24	1.79	0.89	0.25	(84%-16%)	
n	15	13	15	15	15	15	15	

ICH = Intercambio de cromátidas hermanas

TPG = Tiempo promedio generacional

MN sp = Micronúcleos en sangre periférica

MN epi = Micronúcleos en epitelio

NOR's sp = Regiones organizadoras del nucléolo en sangre periférica

NOR's epi = Regiones organizadoras del nucléolo en epitelio

Red = NOR's de forma redonda

Atíp = NOR's atípicos

X = Media

SD = Desviación estándar

n = Tamaño de la población

+ = Positivo

neg = Negativo

n.d. = No determinado

Tabla 2 Resultados generales de las frecuencias de las pruebas evaluadas

GRUPO DISPLASIA

clave	ICH	TPG	MN sp	MN epi	NOR's sp	NOR's epi	Red - Atíp	HPV
d 01	-	-	12	3	4.53	236	211 - 25	neg
d 02	7.08	49.7	-	-	-	206	146 - 60	neg
d 03	-	-	6	-	7.63	212	105 - 107	+
d 04	7.00	48.6	11	3	5.07	206	126 - 80	+
d 05	8.43	47.1	13	12	5.17	223	99 - 124	neg
d 06	-	-	10	6	4.20	272	231 - 41	neg
d 07	-	-	-	-	-	204	103 - 101	+
d 08	6.58	25.7	10	-	-	270	232 - 38	+
d 09	7.37	25.9	9	12	5.10	226	139 - 87	+
d 10	6.43	24.5	-	-	-	-	-	neg
d 11	-	-	-	-	4.90	-	-	+
d 12	-	-	-	6	-	-	-	+
d 13	6.76	23.0	-	10	-	-	-	n.d.
d 14	7.37	23.4	-	6	4.67	-	-	+
d 15	7.37	21.6	7	5	-	244	215 - 29	+
d 16	6.90	23.0	8	8	4.67	-	-	+
d 17	-	-	9	-	5.17	-	-	+
X	7.13	31.25	9.50	7.10	5.11	2.30	1.61-0.69	
SD ±	0.56	11.96	2.17	3.31	0.94	0.25	(70%-30%)	
n	10	10	10	10	10	10	10	

ICH = Intercambio de cromátides hermanas
 TPG = Tiempo promedio generacional
 MN sp = Micronúcleos en sangre periférica
 MN epi = Micronúcleos en epitelio
 NOR's sp = Regiones organizadoras del nucléolo en sangre periférica
 NOR's epi = Regiones organizadoras del nucléolo en epitelio
 Red = NOR's de forma redonda
 Atíp = NOR's atípicos

X = Media
 SD = Desviación estándar
 n = Tamaño de la población
 + = Positivo
 neg = Negativo
 n.d. = No determinado

Tabla 3 Resultados generales de las frecuencias de las pruebas evaluadas

GRUPO CANCER *IN SITU*

clave	ICH	TPG	MN sp	MN epi	NOR's sp	NOR's epi	Red - Atíp	HPV
is 01	-	-	-	-	4.77	-	-	neg
is 02	-	-	-	12	5.37	294	135 - 159	neg
is 03	-	-	13	9	5.17	-	-	neg
is 04	-	-	-	7	-	253	122 - 131	neg
is 05	-	-	9	10	-	264	177 - 87	neg
is 06	-	-	-	-	5.20	275	45 - 230	+
is 07	6.50	57.1	-	-	-	244	105 - 139	neg
is 08	-	-	9	-	-	282	131 - 151	neg
is 09	-	-	9	-	5.80	-	-	+
is 10	9.70	53.7	7	-	6.26	210	75 - 135	neg
is 11	5.57	45.3	-	10	-	207	114 - 93	+
is 12	-	-	9	8	4.70	-	-	neg
is 13	-	-	6	12	5.47	-	-	n.d.
is 14	-	-	8	-	5.33	259	184 - 75	+
is 15	5.67	27.3	10	6	-	-	-	n.d.
is 16	6.40	20.7	8	11	-	261	120 - 141	+
is 17	5.70	25.0	-	12	-	-	-	neg
is 18	6.43	22.8	-	-	-	-	-	n.d.
is 19	6.83	31.5	-	-	-	-	-	neg
is 20	5.87	28.2	-	-	-	-	-	+
is 21	6.30	22.5	-	-	-	-	-	+
is 22	-	-	-	-	5.93	-	-	n.d.
X	0.50	33.41	8.80	9.70	5.40	2.55	1.21-1.34	
SD ±	1.20	13.52	1.87	2.16	0.49	0.28	(47%-53%)	
n	10	10	10	10	10	10	10	

ICH = Intercambio de cromátides hermanas
 TPG = Tiempo promedio generacional
 MN sp = Micronúcleos en sangre periférica
 MN epi = Micronúcleos en epitelio
 NOR's sp = Regiones organizadoras del nucléolo en sangre periférica
 NOR's epi = Regiones organizadoras del nucléolo en epitelio
 Red = NOR's de forma redonda
 Atip = NOR's atípicos

X = Media
 SD = Desviación estándar
 n = Tamaño de la población
 + = Positivo
 neg = Negativo
 n.d. = No determinado

Tabla 4 Resultados generales de las frecuencias de las pruebas evaluadas

GRUPO CANCER INVASOR

clave	ICH	TPG	MN sp	MN epi	NOR's sp	NOR's epi	Red - Atip	HPV
inv 01	-	-	13	-	5.37	385	209 - 176	+
inv 02	-	-	-	10	-	329	88 - 241	neg
inv 03	-	-	10	-	-	326	77 - 249	+
inv 04	-	-	8	-	-	296	154 - 142	+
inv 05	-	-	10	14	5.30	-	-	+
inv 06	7.23	34.4	-	15	5.03	248	118 - 130	neg
inv 07	7.90	-	15	15	-	312	102 - 210	neg
inv 08	7.63	24.9	13	10	5.83	370	174 - 196	neg
inv 09	-	-	-	21	-	-	-	n.d.
inv 10	6.50	25.3	15	12	-	-	-	n.d.
inv 11	-	-	16	14	5.70	-	-	n.d.
inv 12	7.50	20.7	16	14	5.17	-	-	n.d.
inv 13	7.33	28.2	-	15	5.60	-	-	neg
inv 14	6.27	16.9	14	-	5.60	-	-	neg
inv 15	5.40	33.8	-	-	6.97	-	-	neg
inv 16	7.40	37.1	-	-	6.70	-	-	n.d.
inv 17	6.50	34.1	-	-	-	-	-	n.d.
inv 18	-	-	-	-	-	339	136 - 203	n.d.
inv 19	-	-	-	-	-	363	153 - 210	n.d.
inv 20	-	-	-	-	-	340	128 - 212	n.d.
X	6.97	28.38	13.00	14.00	5.72	3.31	1.34-1.97	
SD ±	0.77	6.95	2.78	3.12	0.64	0.40	(40%-60%)	
n	10	9	10	10	10	10	10	

ICH = Intercambio de cromátidas hermanas

TPG = Tiempo promedio generacional

MN sp = Micronúcleos en sangre periférica

MN epi = Micronúcleos en epitelio

NOR's sp = Regiones organizadoras del nucléolo en sangre periférica

NOR's epi = Regiones organizadoras del nucléolo en epitelio

Red = NOR's de forma redonda

Atip = NOR's atípicos

X = Media

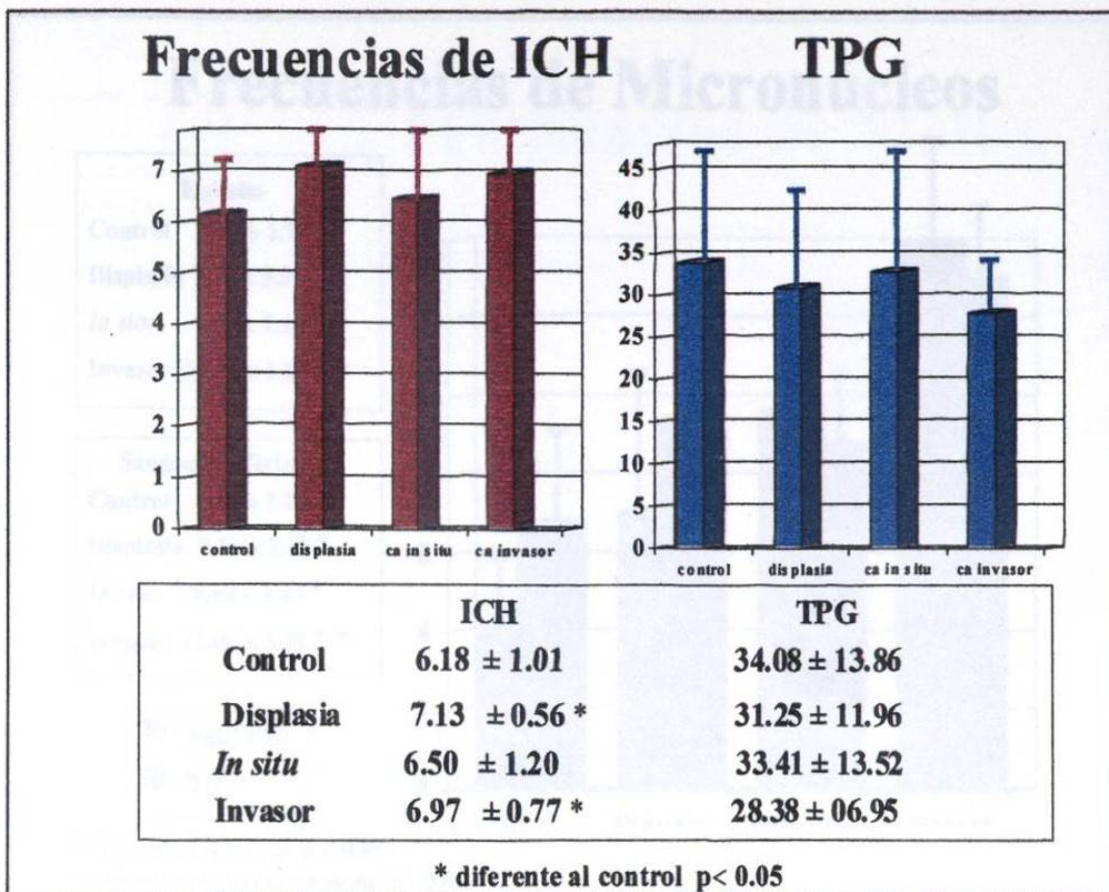
SD = Desviación estándar

n = Tamaño de la población

+ = Positivo

neg = Negativo

n.d. = No determinado



Gráfica 1. Frecuencia de intercambios de cromátides hermanas (ICH) y tiempo promedio generacional (TPG) en metafases de linfocitos de sangre periférica de pacientes con distintos grados de avance de neoplasia cervicouterina y de mujeres control.

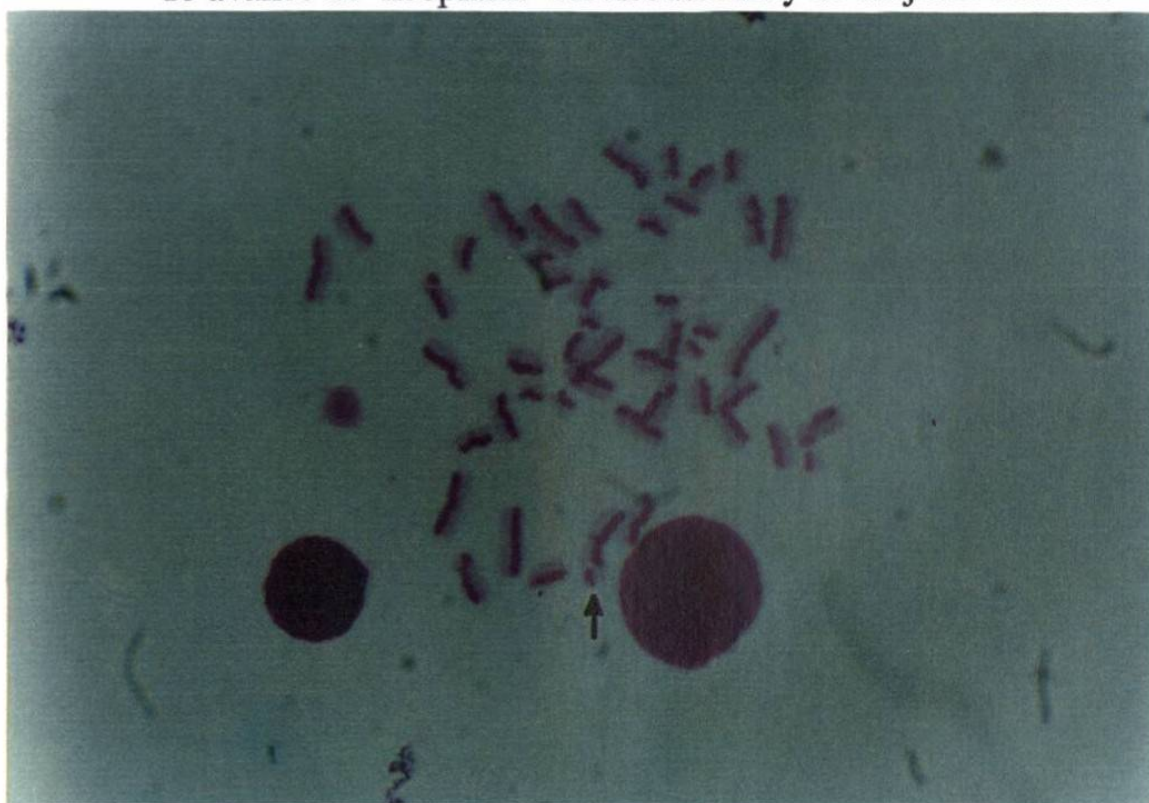
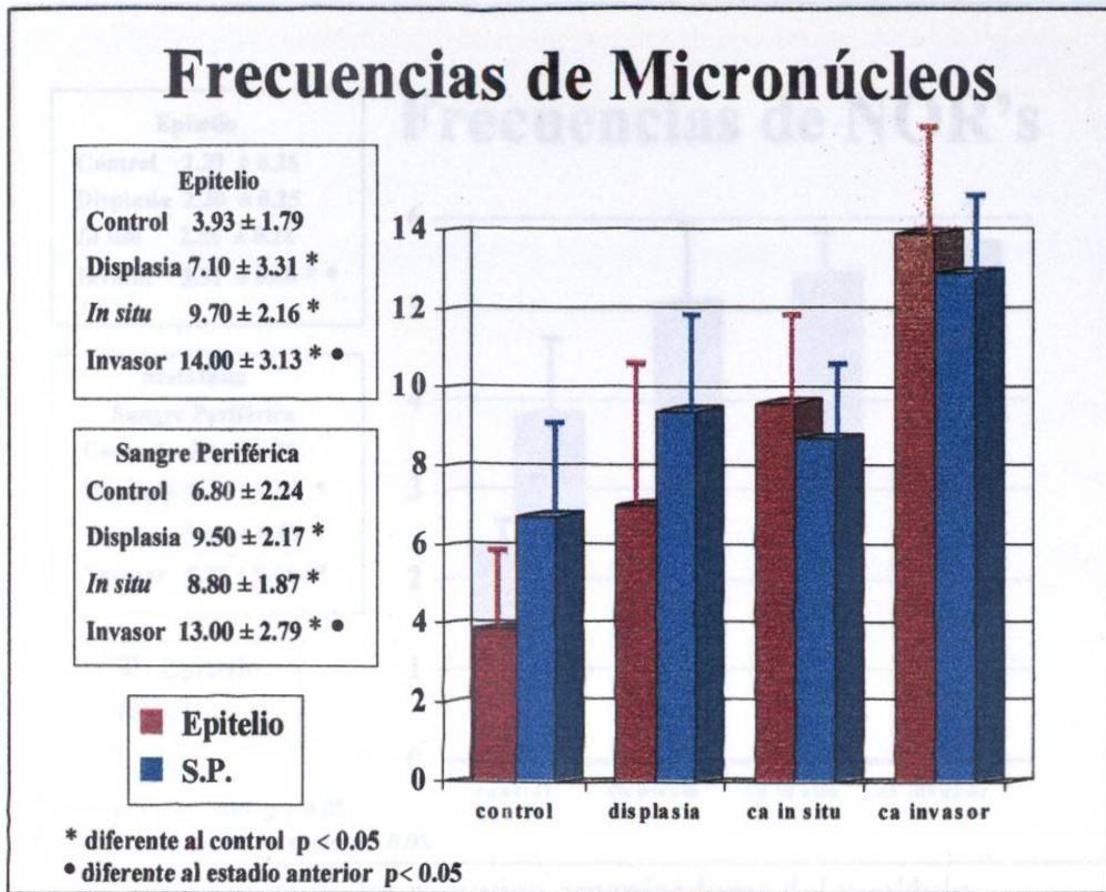


Figura 1. Fotografía de ICH en metafase de linfocito de sangre periférica.

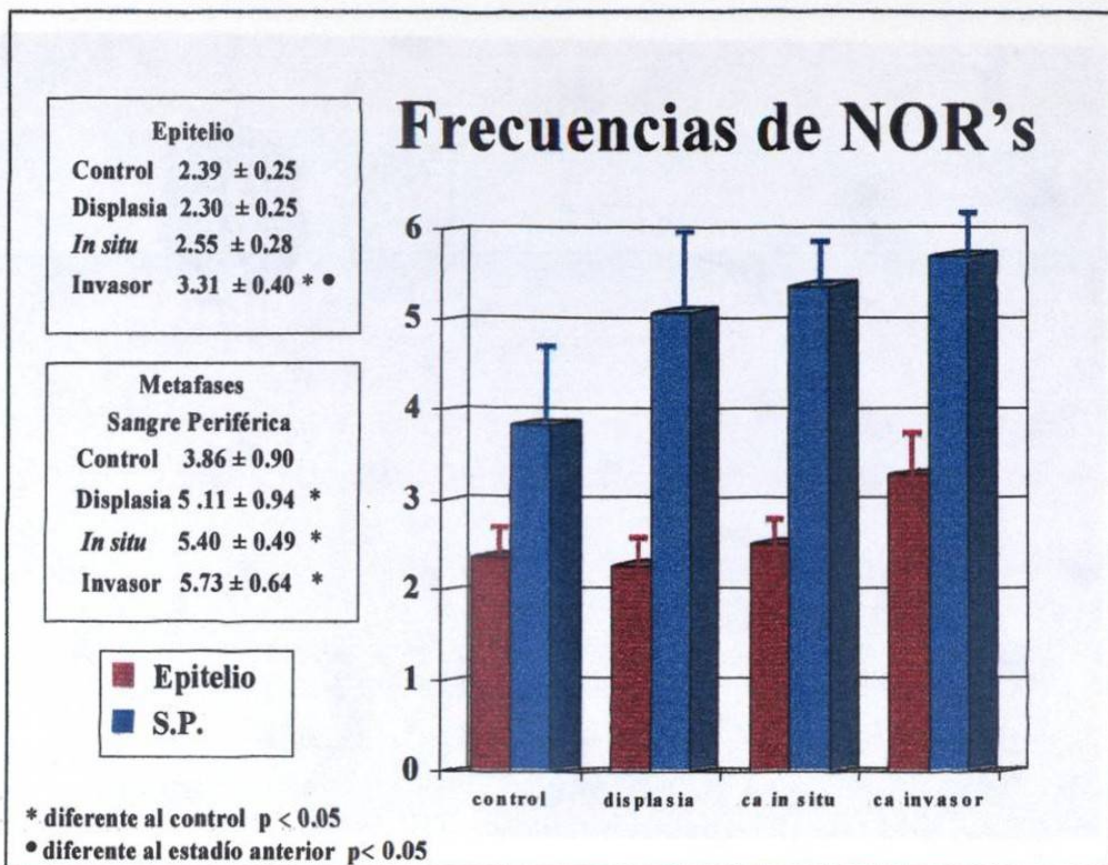
Frecuencias de Micronúcleos



Gráfica 2. Frecuencias de micronúcleos (MN) en linfocitos de sangre periférica y en epitelio de cérvix de pacientes con distintos grados de avance de neoplasia cervicouterina y de mujeres control.



Figura 2. Fotografía de MN en linfocito de sangre periférica.



Grafica 3. Frecuencia de las regiones organizadoras del nucléolo (NOR's) en metafases de linfocitos de sangre periférica y en epitelio de cérvix de pacientes con distintos grados de neoplasia cervicouterina y mujeres control.



Figura 3. Fotografía de NOR's en metafase de linfocito de sangre periférica.

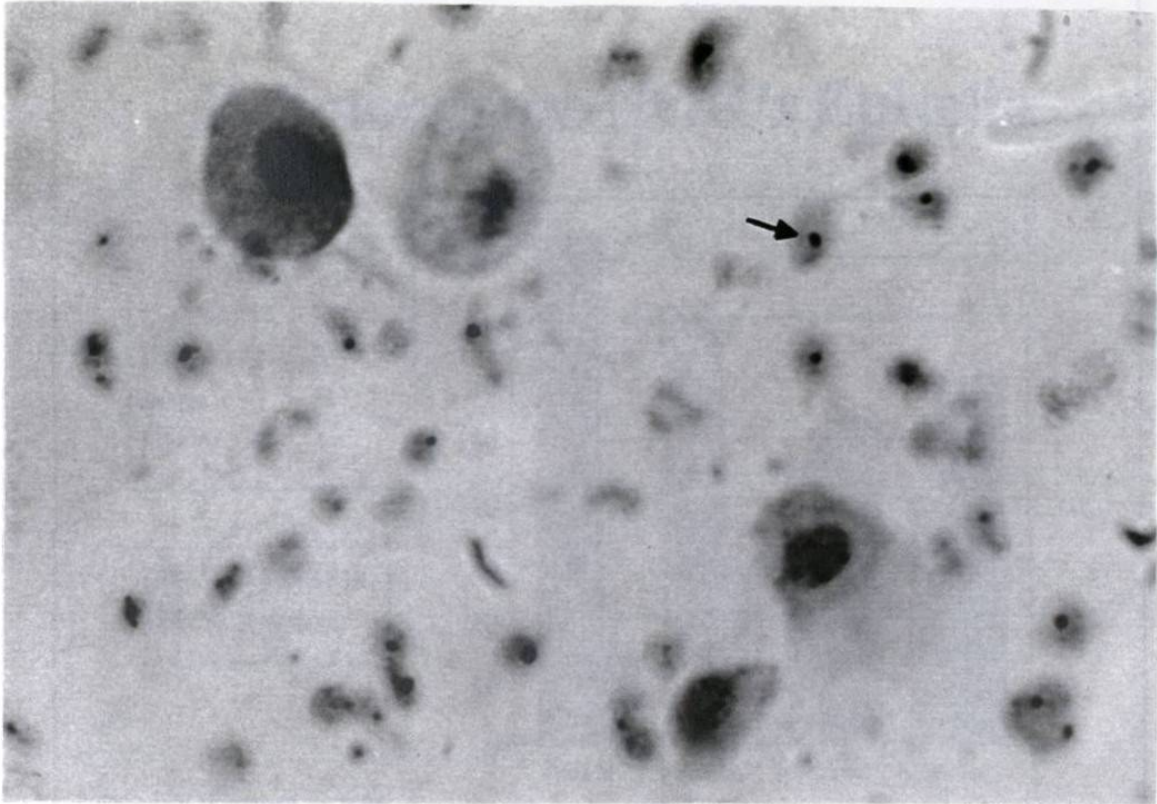
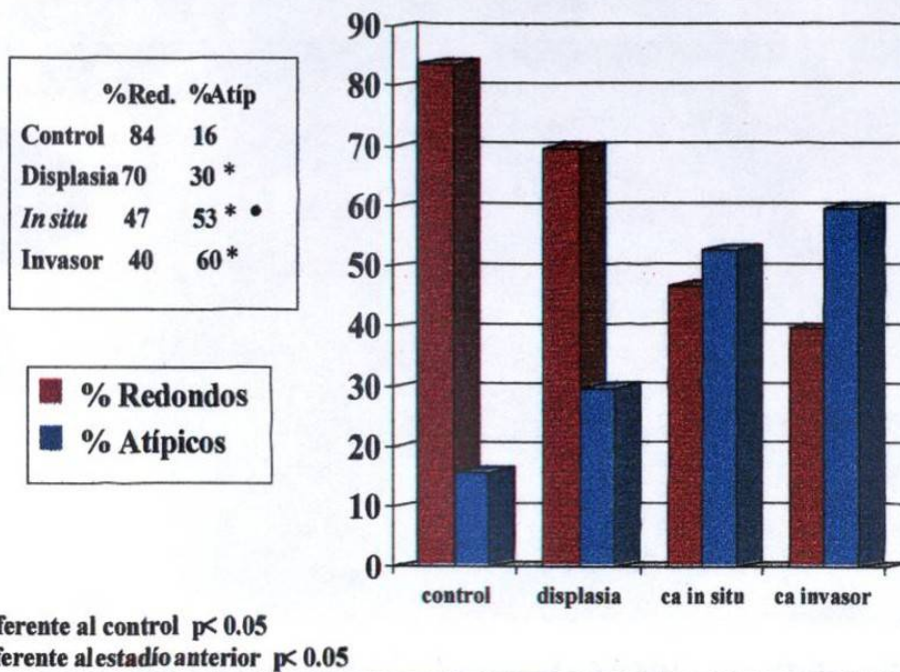


Figura 4. Fotografía de NOR's en células epiteliales de cérvix de mujer del grupo control.



Figura 5. Fotografía de NOR's en células epiteliales de cérvix de paciente con cáncer invasor, donde se observa mayor número de NOR's por célula comparado con el epitelio sano.

Polimorfismo NOR's Epitelio



Gráfica 4. Porcentajes de polimorfismos de NOR's en células epiteliales de cérvix de pacientes con distintos grados de neoplasia cervicouterina y de mujeres control.

Polimorfismos de NOR's

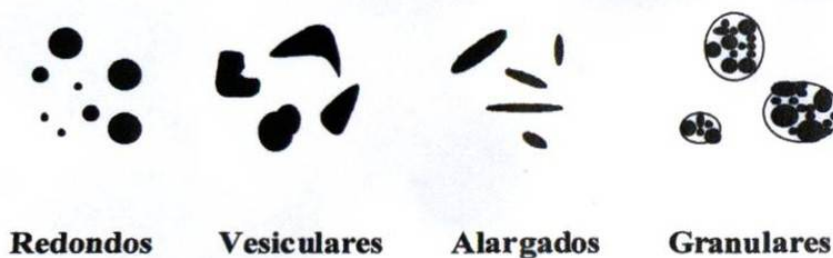


Figura 6. Esquema de los polimorfismos de NOR's en células epiteliales de cérvix.

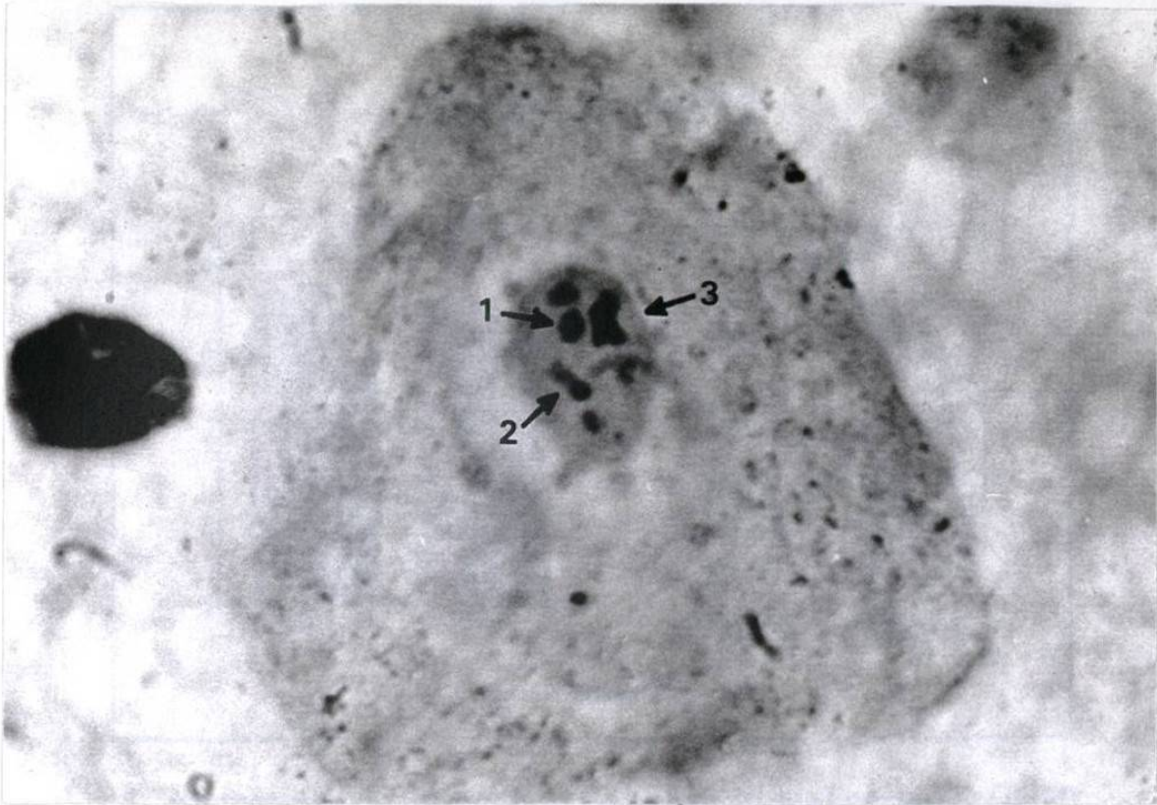


Figura 7. Fotografía de diferentes formas de NOR's en célula epitelial de cérvix: 1) redondo 2) alargado 3) vesicular.

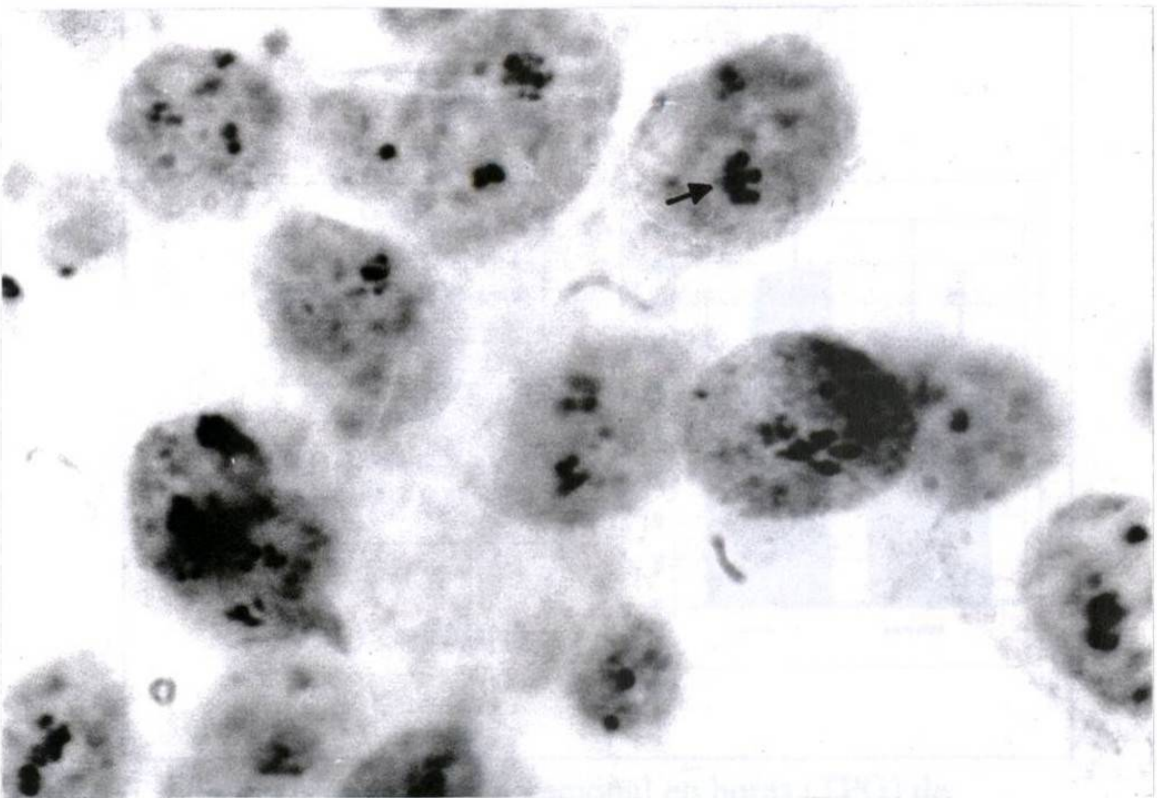
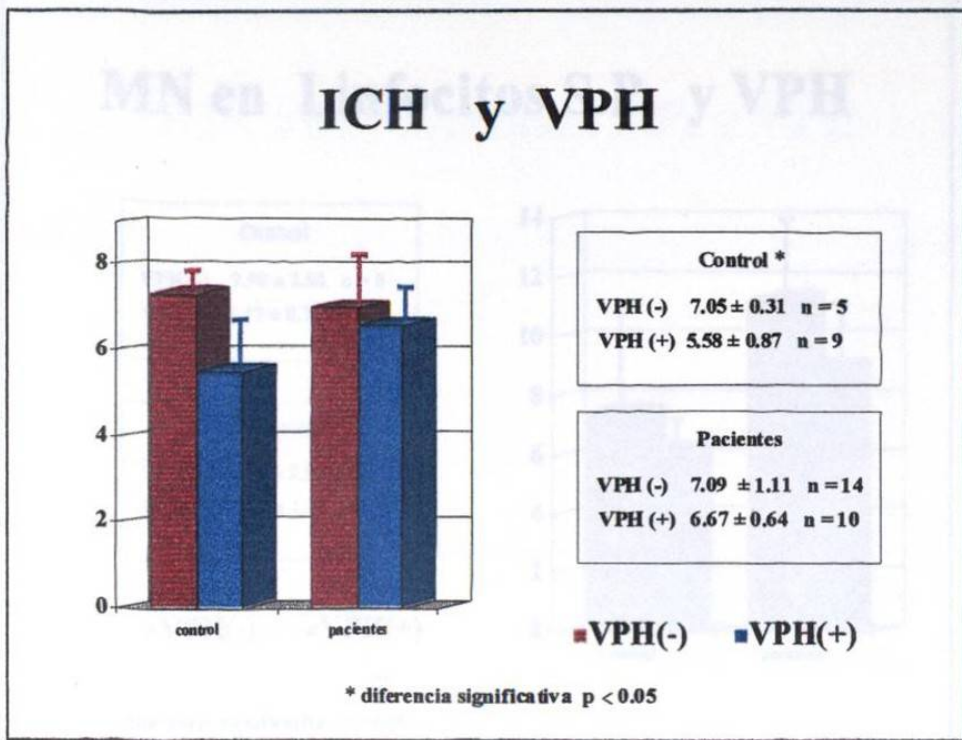
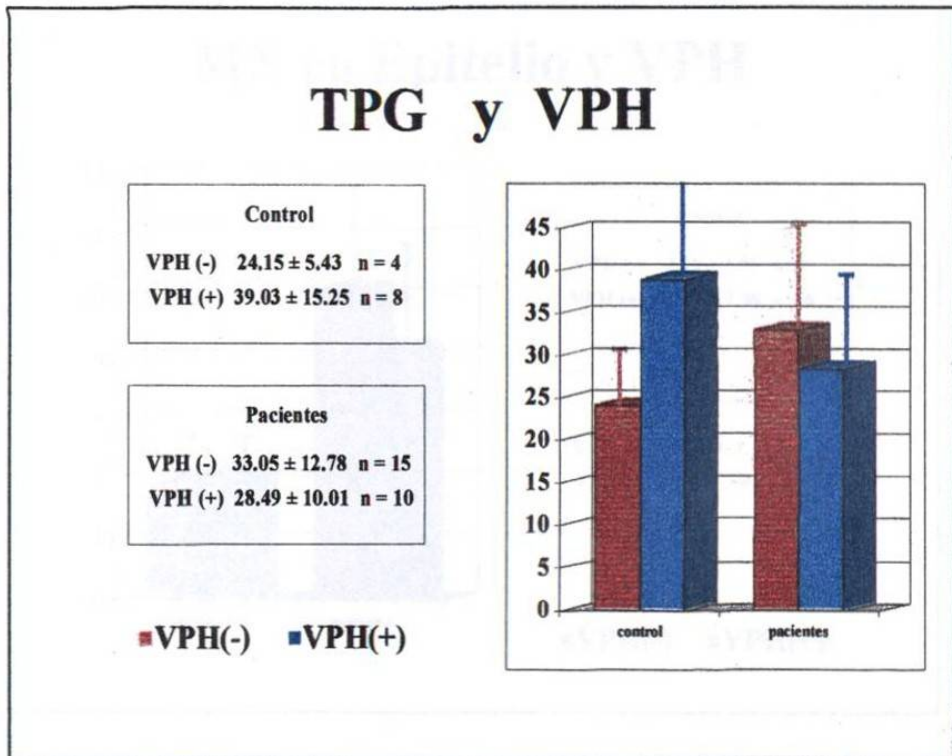


Figura 8. Fotografía de NOR's de forma granular en células epiteliales de cérvix.

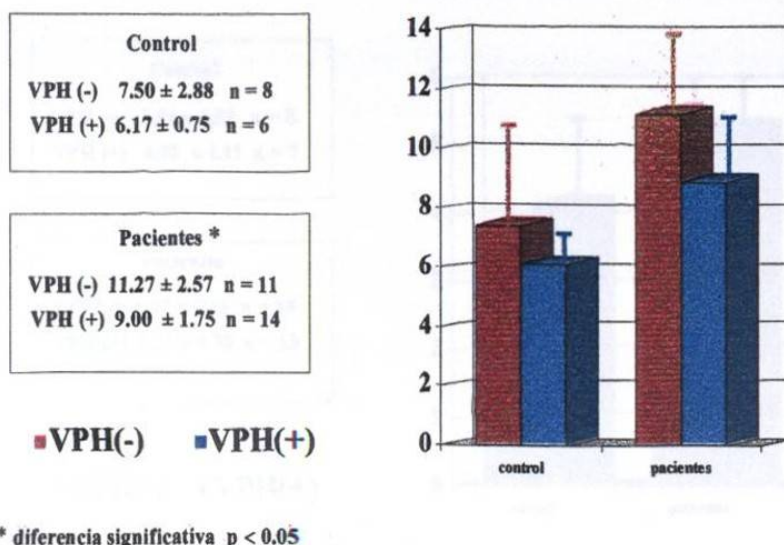


Gráfica 5. Frecuencias de intercambio de cromátides hermanas (ICH) en metafases de linfocitos de sangre periférica de pacientes con neoplasia cervicouterina y de mujeres control con relación a la infección con el virus del papiloma humano (VPH).



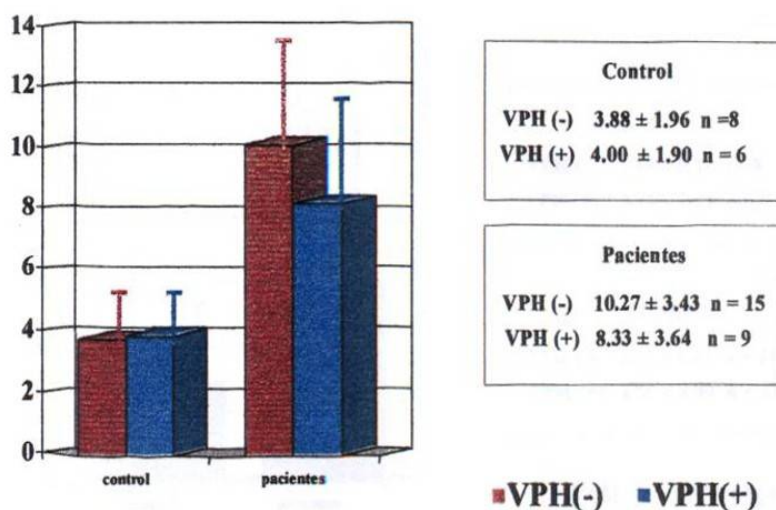
Gráfica 6. Tiempo promedio generacional en horas (TPG) de linfocitos de sangre periférica de pacientes con neoplasia cervicouterina y de mujeres control con relación a la infección con el virus del papiloma humano (VPH).

MN en Linfocitos S.P. y VPH

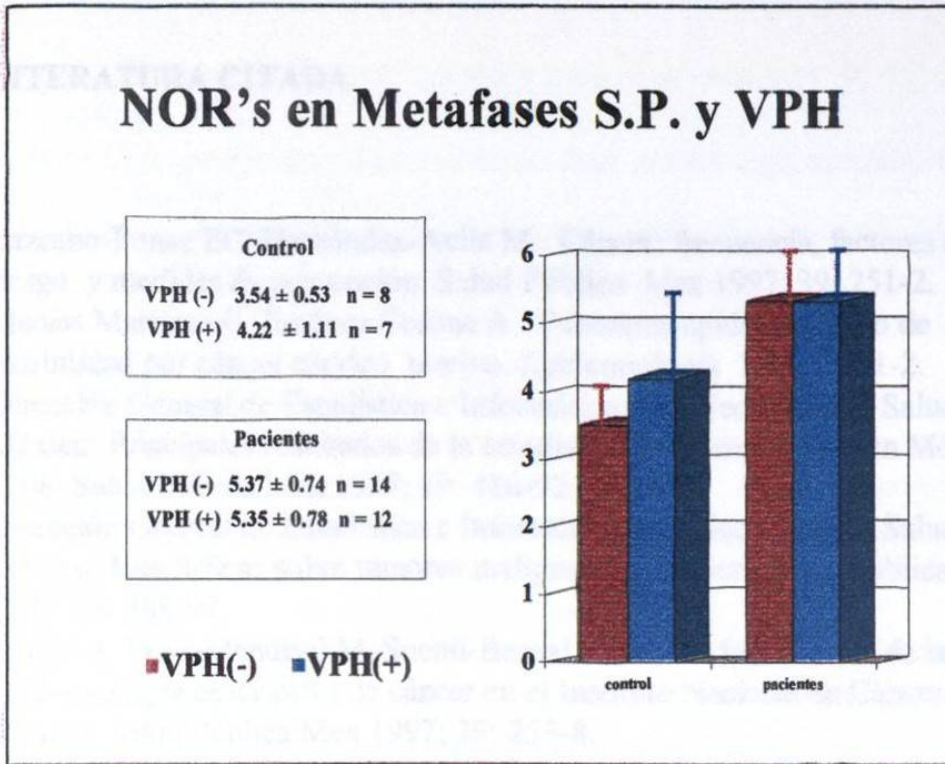


Gráfica 7. Frecuencias de micronúcleos (MN) en linfocitos de sangre periférica de pacientes con neoplasia cervicouterina y de mujeres control con relación a la infección con el virus del papiloma humano (VPH).

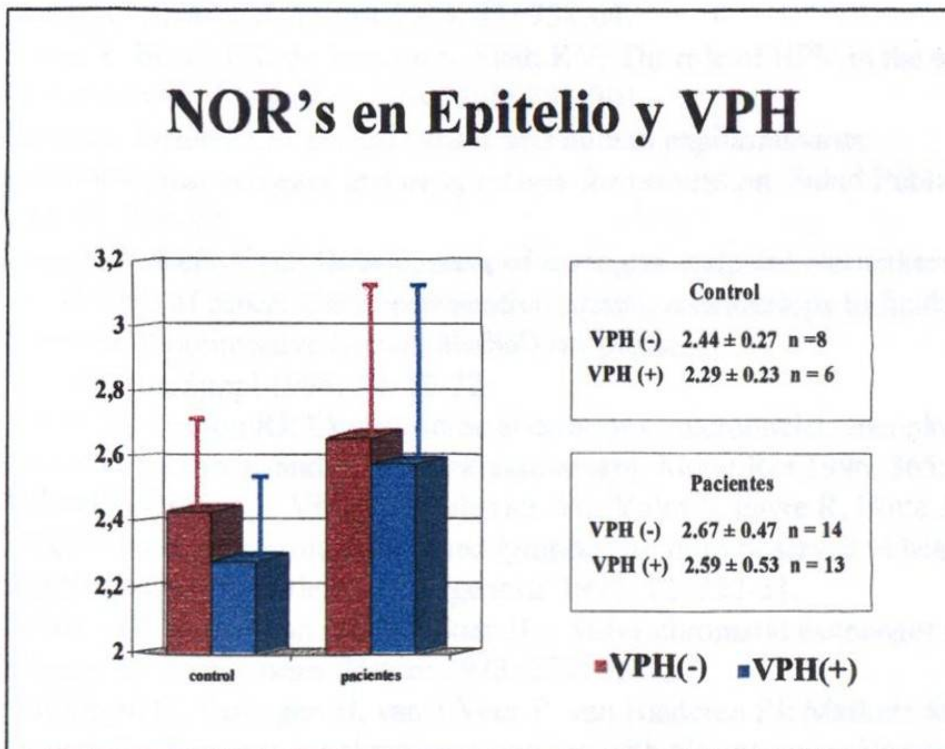
MN en Epitelio y VPH



Gráfica 8. Frecuencias de micronúcleos (MN) en células epiteliales de cervix de pacientes con neoplasia cervicouterina y de mujeres control con relación a la infección con el virus del papiloma humano (VPH).



Gráfica 9. Frecuencias de NOR's en metafases de linfocitos de sangre periférica de pacientes con neoplasia cervicouterina y de mujeres control con relación a la infección con el virus del papiloma humano (VPH).



Gráfica 10. Frecuencias de NOR's en células epiteliales de cervix de pacientes con neoplasia cervicouterina y de mujeres control con relación a la infección con el virus del papiloma humano (VPH).

LITERATURA CITADA

- 1.- Lazcano-Ponce EC, Hernández-Avila M : Cáncer: frecuencia, factores de riesgo y medidas de prevención. *Salud Pública Mex* 1997; 39: 251-2.
- 2.- Macías Martínez C, Jiménez Corona A : Panorama epidemiológico de morbilidad por cáncer cérvico uterino. *Epidemiología* 1996; 13: 1-2.
- 3.- Dirección General de Estadística e Informática de la Secretaría de Salud, México: Principales resultados de la estadística sobre mortalidad en México, 1996. *Salud Pública Mex* 1997; 39: 486-92.
- 4.- Dirección General de Estadística e Informática de la Secretaría de Salud, México: Estadísticas sobre tumores malignos en México. *Salud Pública Mex* 1997; 39: 388-99.
- 5.- Mohar A, Frías-Mendivil M, Suchil-Bernal L, Mora-Macías T, G. de la Garza J: Epidemiología descriptiva de cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología de México. *Salud Pública Mex* 1997; 39: 253-8.
- 6.- Salmerón-Castro J, Franco-Marina F, Salazar-Martínez E, Lazcano-Ponce EC: Panorama epidemiológico de la mortalidad por cáncer en el Instituto Mexicano del Seguro Social: 1991-1995. *Salud Pública Mex* 1997; 39: 266-73.
- 7.- Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ, Wacholder S: Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 958-64.
- 8.- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Shah KV: The role of HPV in the etiology of cervical cancer. *Mutat Res* 1994; 305: 293-301.
- 9.- Muñoz N, Bosch FX: Cervical cancer and human papillomavirus: Epidemiological evidence and perspectives for prevention. *Salud Pública Mex* 1997; 39: 274-82.
- 10.- Boone CW, Kelloff GJ: Development of surrogate endpoint biomarkers for clinical trials of cancer chemopreventive agents; relationships to fundamental properties of preinvasive (intraepithelial) neoplasia. *Cell Biochem Suppl* 1994; 19: 10-22.
- 11.- Tucker JD, Preston RJ: Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchange, and cancer risk assessment. *Mutat Res* 1996; 365: 147-59.
- 12.- Duffaud F, Orsiere T, Villani P, Pelissier AL, Volot F, Favre R, Botta A: Comparison between micronucleated lymphocyte rates observed in healthy subjects and cancer patients. *Mutagenesis* 1997; 12: 227-31.
- 13.- Carrano AV, Thompson LM, Minkler JL: Sister chromatid exchanges as an indicator of mutagenesis. *Nature* 1978; 271: 551-3.
- 14.- Van Poppel G, Verhagen H, van 't Veer P, van Bladeren PJ: Markers for cytogenetic damage in smokers: associations with plasma antioxidants and glutathione S-transferase mu. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1993; 2: 441-7.
- 15.- Usmani BA: Genomic instability and metastatic progression. *Pathobiology* 1993; 61: 109-16.
- 16.- Rooney DE, Czepulkowski BH. *Human Cytogenetics. A Practical Approach* . Vol II. Oxford University Press. New York, USA. 1992.

- 17.- Egan MJ, Crocker J: Nucleolar organiser regions in pathology. *Br J Cancer* 1992; 65: 1-7.
- 18.- Costero C: Regiones organizadoras nucleolares en patología oncológica. *Rev Méd Fac Med UASLP* 1993; 1: 41-9.
- 19.- Salinas-Martínez AM, Villarreal-Ríos E, Garza-Elizondo ME, Fraire-Gloria JM, López-Franco JJ, Barboza-Quintana O: Calidad del Programa de Detección Oportuna de Cáncer Cervicouterino en el estado de Nuevo León. *Salud Pública Mex* 1997; 39: 187-94.
- 20.- Hernández-Peña P, Lazcano-Ponce EC, Alonso-de Ruiz P, Cruz-Valdez A, Meneses-González F, Hernández-Avila M: Análisis costo beneficio del Programa de Detección Oportuna del Cáncer Cervicouterino. *Salud Pública Mex* 1997; 39: 379-87.
- 21.- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Robert K, Watson J. *The Molecular Biology of the Cell*. 3rd. Ed. Garland Publishing, Inc. USA. 1994.
- 22.- Peralta-Zaragoza O, Bahena-Román M, Díaz-Benítez CE, Madrid-Marina V: Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapéuticas. *Salud Pública Mex* 1997; 39: 451-62.
- 23.- Rubin E, Farber L. *Patología*. Editorial Médica Panamericana. 1990.
- 24.- García-Carranca A, Gariglio P: Aspectos moleculares de los papilomavirus humanos y su relación con el cáncer cérvico-uterino. *Rev Inv Clín* 1993; 45: 85-92.
- 25.- Wang SS, Samet JM: Tobacco smoking and cancer: The promise of molecular epidemiology. *Salud Pública Mex* 1997; 39: 331-45.
- 26.- Latt SA, Shreck RR: Sister exchanges analysis. *Hum Genet* 1980; 32: 297-313.
- 27.- Salamanca F. *Citogenética Humana*. 1ª Ed. Editorial Médica Panamericana. México, 1990.
- 28.- Verma R, Babu A. *Human Chromosomes. Principles and Techniques*. 2nd. Ed. McGraw-Hill. USA. 1995.
- 29.- Spitz MR, Bondy ML: Genetic susceptibility to cancer. *Cancer* 1993; 72: 991-5.
- 30.- Kusunoki Y, Hayashi T, Hirai Y, Kushiro J, Tatsumi K, Kurihara T, Zghal M, Kamoun MR, Takebe H, Jeffreys A: Increased rate of spontaneous mitotic recombination in T lymphocytes from a Bloom's syndrome patient using a flow-cytometric assay at HLA-A locus. *Jpn J Cancer Res* 1994; 85: 610-8.
- 31.- Latt SA: Sister chromatid exchanges formation. *Ann Rev Sci* 1981; 15: 11-55.
- 32.- Poop W, Wolf R, Vahrenholz C, Radtke J, Schell C, Kraus R, Brauksiepe A, Norporth K: Sister chromatid exchange frequencies in lymphocytes of oral cancer patients seem to be influenced by drinking habits. *Carcinogenesis* 1994; 15: 1603-7.
- 33.- Wang LY, Lai MS, Huang SJ, Hsieh CY, Hsu MM, Chen CJ: Increased sister chromatid exchange frequency in peripheral lymphocytes of nasopharyngeal carcinoma and cervical cancer patients. *Anticancer Res* 1994; 14: 105-7.
- 34.- Dhillon VS, Bhasker R, Kler RS, Husain SA: Sister chromatid exchange (SCE) studies in breast cancer patients: a follow-up study. *Cancer Genet Cytogenet* 1995; 80: 115-7.
- 35.- Dhar PK, Devi S, Rao TR, Kumari U, Joseph A, Kumar MR, Nayak S, Shreemati Y, Bhat SM, Bhat KR: Significance of lymphocytic sister chromatid exchange frequencies in ovarian cancer patients. *Cancer Genet Cytogenet*

- 1996; 89: 105-8.
- 36.- Dhillon VS, Dhillon IK: Chromosome aberrations and sister chromatid exchange studies in patients with prostate cancer: possible evidence of chromosome instability. *Cancer Genet Cytogenet* 1998; 100: 143-7.
 - 37.- Xu CF: The frequencies of sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations in the peripheral lymphocytes in patients with cervical carcinoma. *Chung Hua Fu Chan Ko Tsa Chih* 1993; 28: 496-7, 508.
 - 38.- Capalash N, Sobti RC: Spontaneous genomic fragility and cell cycle progression in lymphocytes with cervical carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1996; 88: 30-4.
 - 39.- Dhillon VS, Kler RS, Dhillon IK: Chromosome instability and sister chromatid exchange (SCE) studies in patients with carcinoma of cervix uteri. *Cancer Genet Cytogenet* 1996; 86: 54-7
 - 40.- Schmid W: The micronucleus test. *Mutation Res* 1975; 31: 9-15.
 - 41.- Garewal HS, Ramsey L, Kaugars G, Boyle J: Clinical experience with the micronucleus assay. *J Cell Biochem Suppl* 1993; 17: 206-12.
 - 42.- Shin DM, Hittelman WN, Hong WK: Biomarkers in upper aerodigestive tract tumorigenesis: a review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; 3: 697-709.
 - 43.- Benner SE, Lippman SM, Wargovich MJ, Lee JJ, Velasco M, Martin JW, Toth BB, Hong WK: Micronuclei, a biomarker for chemoprevention trials: results of a randomized study in oral premalignancy. *Int J Cancer* 1994; 59:457-9.
 - 44.- Chakrabarti RN, Duttak K: Micronuclei test in routine smears from uterine cervix. *Eur Gynaec Oncol* 1988; 5: 370-2.
 - 45.- Babu KA, Verma RS: Structural and functional aspects of nucleolar organizer regions (NOR's) of human chromosomes. *International Review of Cytology* 1995; 94: 151-77.
 - 46.- Makinen K, Eskelinen M, Lipponen P, Nuutinen P, Marin S, Alhava E: Ag-NORs related to flow cytometry, morphometry and prognosis in patients with pancreatic cancer. *Anticancer Res* 1993; 13: 157-60.
 - 47.- Aimoto T, Onda M, Uchida E, Asano G: Study on proliferating potential by ag-NORs staining in human pancreatic carcinoma. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 1993; 94: 78-85.
 - 48.- Roussel P, Sirri V, Hernandez-Verdun D: Quantification of Ag-NOR proteins using Ag-NOR staining on Western Blots. *J Histochem Cytochem* 1994; 42: 1513-7.
 - 49.- Egan M, Freeth M, Crocker J: Intraepithelial neoplasia, human papillomavirus and argyrophilic nucleoprotein in cervical epithelium. *Histopathology* 1988; 13: 561-7.
 - 50.- Lahshmi S, Nair SA, Jayasree K, Jayaprakash PG, Rajalekshmy TN, Kannan S, Pillai R: Argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) in inflammatory pre-malignant and malignant lesions of the uterine cervix. *Cancer Lett* 1993; 71: 197-201.
 - 51.- Cortés-Gutiérrez EI, Reyna-Hinojosa R, Silva-Cudish J, Rojas-Alvarado MA, Leal Garza CH: Activity satellite association and polymorphism of Ag stained nucleolus organizer regions (Ag+ NORs) in lymphocytes from women with cervical uterine cancer. *Arch Med Res* 1997; 28: 19-23.

- 52.- Prathiba D, Kuruvilla S: Value of AgNORS in premalignant lesions of the cervix. *Indian J Pathol Microbiol* 1995; 38: 11-6.
- 53.- Crisan D, Olinici CD, Rasinariu A, Basaraba AM: Nucleolar organizer regions (AgNORs) in intraepithelial neoplasia of the uterine cervix. *Rom J Morphol Embryol* 1996; 42: 213-8.
- 54.- Calore EE, Maeda MY, Cavaliere MJ, Pereira SM, Shih LW, Pereira GM, de-Melo JR: Study of organizer nucleolar regions by the argyrophil technique in cervical intraepithelial neoplasias. *Minerva Ginecol* 1997; 49: 59-62.
- 55.- Agarwal J, Gupta JK: Nucleolar organizer regions in neoplastic epithelium of the cervix. *Indian J Pathol Microbiol* 1997; 40: 125-7.
- 56.- Calore EE, Shirata NK, Shih LW, Cavaliere MJ, de-Siqueira M: Silver staining method for nucleolar organizer regions in cervical smears. *Diagn Cytopathol* 1997; 16: 497-9.
- 57.- Yokoyama Y, Takahashi Y, Serda D, Morishita S, Hashimoto M, Shimokawa K, Tamaya T: Silver stained nucleolar organizer regions in adenocarcinoma of the cervix--a light and electron microscopic study. *Pathol Res Pract* 1997; 193: 275-81.
- 58.- Lim S, Duggan M, Ruff M, Rahim S, McGregor SE, Green F: Morphometric analysis of nucleolar organizer regions in benign and malignant peritoneal effusions using backscattered electron microscopy. *J Pathol* 1992; 166: 53-60.
- 59.- Nikicicz EP, Norback DH: Argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) staining in normal bone marrow cells. *J Clin Pathol* 1990; 43: 723-7.
- 60.- Bajwa R, Khan SA, Qureshi GR, Chaudhry NA: Colposcopy in the diagnosis of human papillomavirus infection, cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. *J PMA J Pak Med Assoc* 1993; 43: 257-8.
- 61.- Widra EA, Dookhan D, Jordan A, McCue P, Bibbo M, Dunton CJ: Evaluation of the atypical cytologic smear. Validity of the 1991 Bethesda System. *J Reprod Med* 1994; 39: 682-4.
- 62.- Winkler B, Christopher P, Crum P: Koilocytotic lesions of the cervix. The relationship of mitotic abnormalities to the presence of papillomavirus antigens and nuclear DNA content. *Cancer* 1984; 53: 1081-7.
- 63.- WHO: Infecciones genitales por papilomavirus humanos y cáncer: Memorandum de una reunión de la 1a. OMS Bol Sanit Panam 1987; 65: 120-37.
- 64.- Leal-Garza CH, Cortés-Gutiérrez EI: Detección molecular del virus del papiloma humano en mujeres con cáncer cervico-uterino. *Gac Med Mex* 1996; 132: 296-300.
- 65.- Perry P, Wolff S: New giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 1974; 251: 156-8.
- 66.- Ivett JL, Tice RR: Average generation time: A new method of analysis and quantitation of cellular proliferation kinetics. *Environ Mutagen* 1982; 4: 358.
- 67.- Hogstedt B: Micronuclei in lymphocytes with preserved cytoplasm. A method for assesment of cytogenetic damage in man. *Mutation Res* 1984; 130: 63-72.
- 68.- Platon D, Menager M, Jeannesson P, Himber G, Pigeon F, Adnet JJ: Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer regions at the optical level. *Histochem J* 1986; 18: 5-14.
- 69.- McLemore D, Lord B: Argyrophilic nucleolar organizer regions: an improved technique for visualization. *J Histotechnol* 1991; 14: 187-9.

- 70.- Zar J. Biostatistical Analysis. Prentice Hall Int. USA. 1984.
- 71.- Cortés-Gutiérrez EI: Estudios de las regiones organizadoras del nucleólo (NOR's), intercambio de cromátides hermanas (ICH) y cinética del ciclo celular (CCC) en pacientes con cáncer cervicouterino. Tesis Maestría. U.A.N.L. Fac Ciencias Biol . 1991.
- 72.- Lukovic L, Milasin J: Sister chromatid exchanges in patients with carcinoma in situ of cervix uteri. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; 59: 84-5.
- 73.- Yokota K, Ueda K, Ohama K, Fujiwara A: Increased spontaneous and mitomycin C-induced sister chromatid exchanges in patients with cancer of the cervix uteri, with special reference to stage of cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 1989; 43: 79-87.
- 74.- Chanvitan A, Puttawibul P, Casson AG: Flow cytometry in squamous cell esophageal cancer and precancerous lesions. *Dis Esophagus* 1997; 10: 206-10.
- 75.- Slavutzky I, Mudry MD, Ladel de Vinuesa M, Meiss R, Chopita N, Larripa I: L' échange des chromatides soeurs (SCE) et la cinétique cellulaire dans les lymphocytes de patients porteurs d' adenomes et de cancers coliques. *Gastroenterol Clin Biol* 1988; 12: 935-40.
- 76.- Cardillo MR: AgNOR counts are useful in cervical smears. *Diagn Cytopathol* 1992; 8: 208-10.
- 77.- Derenzini M, Betts CM: Diagnostic value of silver-stained inrephasic nucleolar organizer regions in breast tumors. *Ultrastructural Pathol* 1990; 14: 233-45.
- 78.- De Braekeleer M, Sreekantiah C, Hass O: Herpes simplex virus and human papillomavirus sites correlate with chromosomal breakpoints in human cervical carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; 59: 135-7.
- 79.- Paz-y-Miño C, Ocampo L, Narváez R, Narváez L: Chromosome fragility in lymphocytes of women with cervical uterine lesions produced by human papillomavirus. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; 59: 173-6.

