

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

COMPOSICION DE SECRECION VAGINAL
EN LOS ESTADOS NORMAL Y PATOLOGICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLÓGICO

P R E S E N T A :

Grizelda Luna Enriquez

MEXICO, D. F.,

1973

M-172413



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PRESIDENTE Prof. FERNANDO VELEZ OROZCO

VOCAL Prof. RAMON GUEVARA ESTRADA

Jurado asignado originalmente SECRETARIO Prof. DEA CORONADO PERDOMO

Según el tema

1er. SUPLENTE Prof. ISABEL RESANO

2o. SUPLENTE Prof. MARIO MIRANDA CASTRO

Sitio donde se desarrolló en tema Sec.Bioquímica de la Reproducción
Departamento de Investigación Científica, C. M.N. I.M.S.S.

Nombre completo del sustentante GRISELDA LUNA ENRIQUEZ

Nombre completo del asesor del tema Q.F.B.DEA CORONADO PERDOMO

Nombre completo del supervisor técnico DR. ADOLFO ROSADO GARCIA

A mis padres

Sra. Zenaida E. de Luna

Sr. Adolfo Luna Rodríguez

A mis hermanos

Yolanda y

Alejandro

Con agradecimiento y admiración
al Dr. Adolfo Rosado García por
su acertada dirección para la
realización de esta tesis.

Con gratitud al Q.F.B. Anselmo Velázquez
C. por sus conocimientos y ayuda para
llevar a cabo esta tesis

A. Dr. Gustavo Gallegos V.
Diagnóstico Oportuno del Cáncer
Cérvico Uterino, C.M.N. por su
valiosa colaboración

Mi agradecimiento a las autoridades
del Departamento de Investigación
Científica del I.M.S.S. por permiti-
rme llevar a cabo esta tesis

A mis familiares y amigos

A F. Javier Espinoza Díaz
Martha Bonilla González
Margarita Robles Vidal

C O N T E N I D O

INTRODUCCION

MATERIAL Y METODOS

RESULTADOS

DISCUSION Y CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

INTRODUCCION

Una de las enfermedades neoplásicas más frecuentes en México es el carcinoma del cervix. En la campaña de Diagnóstico Temprano del Cáncer Cérvico Uterino, que se realiza en el Instituto Mexicano del Seguro Social, se ha encontrado que el porcentaje es de 0.7% en la población femenina, aparentemente sana. Es fácil comprender que un padecimiento neoplásico tan frecuente, que afecta preferentemente a mujeres jóvenes y que es prácticamente curable en el 100% de los casos cuando su diagnóstico se hace en el estadio intraepitelial, debe ser estudiado mediante cualquier método clínico o de laboratorio que sea capaz de despertar sospechas de su presencia.

Los métodos rutinariamente usados hasta la fecha, prueba de Schiller (1) citología exfoliativa periódica y biopsia de todas las lesiones sospechosas del cervix han sido repetidas y frecuentemente valuadas. Young y col (2), concluyen que la prueba de Schiller excluye los casos de anaplasia y carcinoma in situ con casi la misma efectividad que la biopsia y la citología.

La opinión general sobre la citología vaginal seriada, es la de que es un procedimiento útil para encontrar o para descartar sospechas en casi todos los casos de lesiones pre-malignas o malignas, pre-invasoras o invasoras del cervix, pero que por sí misma no es totalmente diagnóstica y que la sospecha encontrada debe ser siempre confirmada por biopsia adecuada.

Recientemente, la enzimología ha adquirido una importancia creciente como coadyuvante de los métodos habituales en el diagnóstico de las neoplasias (3, 4).

Los métodos bioquímicos por su sensibilidad y especificidad, deben seguramente ser importantes tanto en el diagnóstico como en el estudio biológico y de la relación huesped-tumor en los casos de cáncer cérvico-uterino.

El Instituto Mexicano del Seguro Social, lleva a cabo desde el año de 1962 una campaña para el diagnóstico del cáncer cérvico-uterino en la cual toma parte muy activa el Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional (5).

Los estudios realizados comprenden el siguiente procedimiento:

- 1.- Toma de muestra para el estudio de papanicolau de toda la población derechohabiente femenina que ha iniciado relaciones sexuales y que se realiza en todas las clínicas de adscripción del Instituto Mexicano del Seguro Social.
- 2.- El estudio citológico del material señalado se lleva a cabo en el laboratorio de Citología Exfoliativa de cada clínica.
- 3.- Todas aquellas personas cuya citología haya resultado sospechosa, es decir, que pertenezcan a la clase III, IV o V de papanicolau, son localizadas en su domicilio y enviadas a la consulta externa del Hospital de Oncología
- 4.- Durante esta consulta, se realiza una toma nueva de moco cervical para Papanicolau y se realizan biopsias de todas las lesiones sospechosas presentes en el cuello del útero.
- 5.- Las personas cuya citología se ha encontrado nuevamente sospechosa, III, IV o V, pero sin

que se encuentren datos de carcinoma cérvico-uterino en las biopsias realizadas, son mantenidas en observación por un período de tiempo más o menos largo, hasta que la citología vuelva a la normalidad, o hasta que se llega al diagnóstico de cáncer cérvico-uterino.

- 6.- Aquellas pacientes a las cuales se les hace el diagnóstico de cáncer cérvico-uterino, por medio de la biopsia realizada, son tratadas por los métodos más modernos y en seguida observadas por el tiempo que sea necesario para concluir su curación definitiva, o bien, para ser tratadas nuevamente si se encuentra una recidiva del proceso neoplásico.

En el presente estudio se ha tratado de encontrar una correlación entre las concentraciones de los aminoácidos libres presentes en moco cervical o secreción vaginal en mujeres con presencia o ausencia de cáncer cérvico-uterino. Así como también, las concentraciones de ácido siálico y vitamina A en el mismo tipo de pacientes.

Estudios anteriores han demostrado que cambios displásicos en el epitelio del cervix uterino estan asocia-

dos con un incremento en lactato, succinato, y en la actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (22, 23, 24, 25) y disminución en contenido de glicógeno (24, 26, 27, 28, 29, 30).

Ha sido aceptado, generalmente, que los procesos neoplásicos afectan los patrones presentes en la célula normal, a través de cambios exudativos, inflamatorios y necróticos que se manifiestan en el tumor mismo y en el ambiente que lo rodea.

El presente estudio se llevó a cabo con objeto de obtener información acerca de la composición de las secreciones producidas tanto por las células malignas como por las células que rodean el tumor.

Rudman (39) estudió el patrón de aminoácidos presente en pacientes con leucemia aguda, y encontró que el contenido de aminoácidos en los pacientes con leucemia era menor que el de las personas sanas.

La determinación de aminoácidos libres en secreciones vaginales de pacientes con carcinoma in situ y pacientes con lesiones que en algunos de los casos degeneran en cáncer la llevamos a cabo con objeto de cono-

cer las diferencias que pudieran presentarse entre los grupos estudiados. Esto ayudaría a explicarnos las alteraciones ocurridas en el metabolismo de las células neoplásicas.

Pederson (34), ha estudiado los aminoácidos presentes en moco cervical de mujeres normales; hasta donde nos ha permitido la revisión de la literatura, es esta la primera vez que se determinan aminoácidos en secreción vaginal de mujeres con sospechas de cáncer cérvico-uterino.

Se ha visto que la deficiencia de vitamina A está asociada con metaplasia escamosa y cornificación de varios epitelios (Wolbach (20), Sally (19), Hicks (12) y con la cornificación prolongada en la vagina de la rata (Evans (10), De Luca (45)).

El exceso de vitamina A inhibe la queratinización y produce metaplasia mucosa in vivo e in vitro (Fell (11), Lastnizki (15), Bern (9), Rothberg (18), Polliack (16)).

Sobre el epitelio vaginal de las ratas adultas, la vitamina A aplicada tópicamente, (Kahn (14)), o administrada oralmente (Howlewg, 1951), parece ejercer un efecto

antagonista a aquel de los estrógenos. Un efecto similar ha sido notado en el epitelio vaginal de ratón in vitro (Lasnitzki, 46).

Es de interés mencionar los experimentos de Reiter (17) sobre el desarrollo de metaplasia queratinizante escamosa en el útero de ratas tratadas con estrógenos. El encontró que la administración simultánea de vitamina A en dosis elevadas no previnieron el desarrollo de tales lesiones.

Goldblatt (47) reportó que una dieta deficiente en vitamina A es capaz de inducir metaplasia escamosa queratinizante.

Puesto que el cáncer cérvico uterino se inicia como una modificación del epitelio cervical y es probablemente precedido por cambios estructurales como la metaplasia y la displasia, es interesante cuantificar la cantidad de vitamina A en secreción vaginal y correlacionar esta concentración con las alteraciones citológicas e histopatológicas encontradas en cada caso.

El ácido siálico se encuentra, frecuentemente, formando parte de glicoproteínas, cuando se encuentra en concentración apreciable, imparte a la molécula propiedades

físicas y químicas características.

Las glicoproteínas son componentes esenciales de todas las secreciones mucosas y proporcionan a estas secreciones sus propiedades fisicoquímicas características. Las funciones de la secreción mucosa pueden ser tomadas como reflejo de las funciones de las glicoproteínas.

De todos los azúcares componentes de glicoproteínas el ácido siálico es el más característico por varias razones:

- 1.- Siempre ocupa una posición terminal en los heterosacáridos.
- 2.- Es un ácido fuerte ($pK_a=2.6$).

Debido a su grupo carboxilo, el ácido siálico localizado periféricamente imparte propiedades ácidas a las glicoproteínas. Se ha visto que el bajo punto isoeléctrico de muchas glicoproteínas es debido a su presencia

Glick (41), estudió el contenido de carbohidratos de fibroblastos de ratón y examinó sus membranas superficiales. Encontró que la cantidad de ácido siálico en las células intactas variaba. Una parte de esa variación pudo ser relacionada estadísticamente a cambios en el

contenido de proteínas de la célula. En relación al crecimiento de los cultivos, se vió que los cultivos que crecían más lentamente contenían cantidades más elevadas de ácido siálico.

Rajalakshmi (42), encontró que el ácido siálico es un parámetro sensible a los estrógenos. Coppola (43), reportó que la concentración de ácido siálico en útero de rata es directamente proporcional al nivel de estrógenos e inversamente proporcional al de progesterona.

Puesto que una de las hipótesis más firmemente apoyada en la actualidad en relación al origen de las neoplasias malignas implica una alteración en la estructura y composición de la membrana plasmática y como el ácido siálico participa de manera importante en la determinación de estas propiedades membranales, nos pareció importante el estudio de la concentración de siálico en secreción vaginal y su correlación con los diagnósticos clínicos establecidos.

Dado el carácter de la población comprendida en el presente trabajo casi todas las mujeres estudiadas para el descubrimiento temprano del cáncer, fueron aquellas con actividad sexual, en la población de derechohabientes, el

número de mujeres postmenopáusicas fué muy pequeño y no se ha hecho ningún intento de separarlas del grupo total.

Hasta el momento, no parece existir o no se ha encontrado, ninguna diferencia cualitativa entre las células normales y las neoplásicas. Las diferencias en el mejor de los casos son cuantitativamente perceptibles, de aquí que Kasdom y col (35) hallan dicho que cualquier fenómeno que este relacionado con el cáncer y sea susceptible de cuantificación merece la más cuidadosa de las consideraciones y el más minucioso de los estudios. De aquí, que las técnicas puramente bioquímicas aplicadas por nosotros sean de gran valor.

En relación a esto debe recordarse que Young (38) sostiene que es poco factible que el exámen citológico de la población femenina llegue a eliminar el cáncer cérvico uterino como causa de muerte a menos que se encuentre alguna manera de ampliar nuestro conocimiento sobre los factores esenciales que inician la aparición de este tipo de cáncer.

La pesimista opinión de este autor que indica que cerca del 40% de todas las mujeres que desarrollen un cáncer cérvico uterino, de cualquier tipo, moriran de

cáncer cérvico uterino, nos sirve para recalcar la necesidad de estudiar con ahinco este problema, utilizando cuantos medios tengamos a nuestro alcance.

MATERIAL Y METODOS

El material humano fué proporcionado por el Servicio de Consulta Externa del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional.

Todas las pacientes fueron enviadas al Hospital por uno de los servicios de Diagnóstico Oportuno del Cáncer, que laboran en las diferentes clínicas de la ciudad por haber mostrado una citología sospechosa de la presencia de cáncer cérvico uterino intraepitelial o invasor.

El procedimiento habitual fué:

- a) Observación ginecológica
- b) Toma de frotis para citología vaginal
- c) Toma de una muestra de secreción vaginal de fondo de saco para la determinación de aminoácidos libres, vitamina A, ácido siálico, DNA y proteínas
- d) Prueba de Schiller (1)
- e) Toma de biopsia de las áreas yodonegativas.

La secreción vaginal se recogió por succión con pipetas de Papanicolau. El material así obtenido fué depositado en un tubo de ensaye que contenía 0.5 ml de agua bidestilada y rodeado de hielo.

Extracciones

I.- Fundamento.- La solubilidad de los aminoácidos, la vitamina A, el DNA y las proteínas en los solventes usados.

II.- Aparatos.-

1. Homogenizador Potter Elbehjem
2. Centrífuga Sorval SS-3 Automática
3. Baño de agua
4. Horno

III.- Reactivos.-

1. Acido perclórico 1 M
2. Acido sulfosalisílico 20%
3. NaOH 1 N
4. Acido perclórico 6 M
5. Cloroformo-etanol-eter 1:2:2 .

IV.- Material biológico.- Secreción vaginal.

V.- Método.-

- 1o. Homogeneizar la secreción vaginal con un volú-
igual de ácido sulfosalisílico al 20%.

- 2o. Centrifugar a 3,500 rpm durante 15 min
- 3o. Determinar aminoácidos en el sobrenadante
- 4o. Efectuar las siguientes extracciones en el precipitado:

Extracción de DNA.-

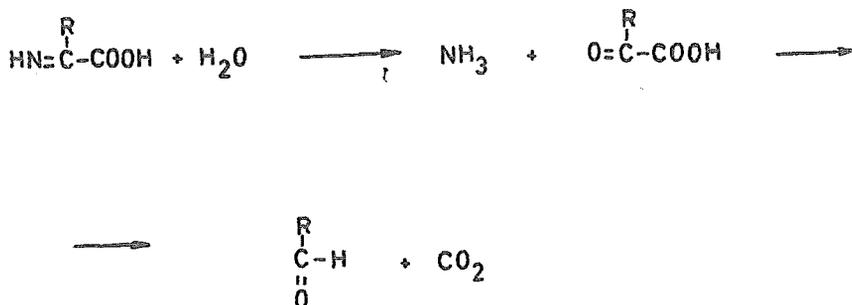
1. Suspender el precipitado en 1 ml de ácido perclórico 0.1 M
2. Someter a temperatura de 70°C durante 20 min
3. Enfriar en hielo
4. Centrifugar a 3,000 rpm durante 5 min
5. Separar el sobrenadante y repetir los cuatro pasos anteriores
6. Mezclar los dos sobrenadantes obtenidos.

Extracción de grasa.-

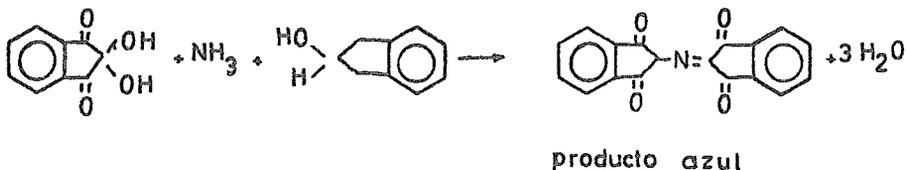
A partir del precipitado obtenido de la centrifugación anterior

1. Suspender en 1 ml de NaOH 1 N
2. Incubar a 37°C durante 15 min
3. Adicionar 200 µl de ácido perclórico al 60%
4. Someter a la temperatura de 93°C durante 15 min

El iminoácido es hidrolizado para formar un ce-
toácido, el cual se descarboxila bajo las condiciones
de la reacción:



Finalmente, el amoníaco producido, reacciona con
cantidades equimoleculares de ninhidrina reducida y
oxidada, para producir un compuesto azul-púrpura, el
cual es proporcional a la cantidad del aminoácido
presente.



II. Reactivos.-

1. Amortiguador concentrado

105.07 g de ácido cítrico H₂O (Baker)

72.0 g LiOH anhidro (Merck)

Disolver en 800.0 ml de agua destilada

Enfriar a temperatura ambiente

Diluir a 1,000 ml.

2. Amortiguadores para eluir los aminoácidos ácidos y neutros:

a) pH 2.85 + 3.0% de metil celosolve

100.0 ml de amortiguador concentrado

750.0 ml de agua destilada

30.0 ml de metil celosolve al 100% (Merck)

1.0 ml de tiodiglicol (Technicon)

0.2 ml de pentaclorofenol

Llevar a pH 2.85 con HCl 6 N

Adicionar 10.0 ml de Brij - 35 (Pierce Chem. Co.)

Diluir a 1,000.0 ml

Ajustar el pH

b) pH 2.75, 3.70, 5.25

100.0 ml de amortiguador concentrado

750.0 ml de agua destilada

1.0 ml de tiodiglicol

0.2 ml de pentaclorofenol

Llevar al pH adecuado

Adicionar 10.0 ml de Brij - 35

Diluir a 100.0 ml

Ajustar el pH

3. Amortiguadores para eluir los aminoácidos alcalinos:

a) pH 3.90, 5.25

100.0 ml de amortiguador concentrado

750.0 ml de agua destilada

9.5 g de LiOH anhidro (Merck)

1.0 ml de tiodiglicol

Llevar al pH adecuado con HCl 6.N

Adicionar 10.0 ml de Brij -35

0.2 ml de pentaclorofenol

Diluir a 1,000.0 ml

Ajustar el pH

b) pH 9.70

100.0 ml de amortiguador concentrado

750.0 ml de agua destilada

9.5 g LiOH anhidro (Merck)

1.0 ml de tiodiglicol

Llevar a pH 7.0 con HCl 6 N

Llevar a pH 9.70 con carbonato de litio en polvo

Adicionar 10.0 ml de Brij - 35

0.2 ml de pentaclorofenol

Diluir a 1,000.0 ml

Ajustar el pH a 9.70

4. Reactivo de ninhidrina

10.0 g de ninhidrina en polvo (Merck)

Disolver en 500.0 ml de metil celosolve al 100%
(Merck)

200.0 ml de acetato de sodio 4.0 N, pH 5.5 (Baker)

50.0 ml de ácido acético glacial (Merck)

Diluir a 1,000.0 ml con agua destilada

La sensibilidad de este reactivo varía durante las primeras hrs después de su preparación. Por tanto, es

recomendado que se prepare un día antes de su uso.

5. Sulfato de hidrazina

Se disuelven 262 mg de sulfato de hidrazina en
1,000.0 ml de agua destilada (Baker)

Añadir una gota de ácido sulfúrico concen-
trado (Merck)

6. Acido 5-sulfosalicílico al 20%

Pesar 20.0 g de ácido 5-sulfosalicílico (Merck)

Disolver en 80.0 ml de agua destilada

7. Solución estándar de 21 aminoácidos, pH 2.75, que

contiene 2.5 μ M de cada uno de los siguientes
aminoácidos:

Aspártico	Alanina	Tirosina
Treonina	Cistina	Fenil alanina
Serina	Cisteico	Lisina
Asparagina	Valina	Histidina
Glutámico	Metionina	γ -amino butírico
Glutamina	Isoleucina	Ornitina
Prolina	Leucina	Arginina
Glicina		

8. Nitrógeno gaseoso
9. Solución de norleucina 2.5 μ M, pH 2.75 en
HCl 0.1 N (Sigma)

III.- Aparatos.-

1. Autoanalizador de aminoácidos Technikon
Mod TM-1
2. Integrador de áreas Gelman Instrument Co.
3. Espectrofotómetro Coleman Mod 6/20

IV.- Método.-

Antes de pasar el sobrenadante por el autoanalizador de aminoácidos, obtenido como se indicó anteriormente, se llevó a cabo una prueba preliminar en tubos de ensaye para conocer la concentración de aminoácidos presente en la secreción vaginal, y de esta manera poder determinar la alícuota que debía colocarse en el aparato. Era necesario tener de 100 a 200 μ g de aminoácidos libres en cada secreción vaginal. Esta prueba se realizó de la siguiente manera:

En un tubo de ensaye se midieron:

50 μ l de sobrenadante

1.0 ml de sulfato de hidrazina

1.0 ml de ninhidrina

Someter a la temperatura de 93°C durante

15 min

Enfriar en hielo

Leer en espectrofotómetro de 540 nm.

La determinación de aminoácidos libres presentes en la secreción vaginal se llevó a cabo en un Autoanализador de aminoácidos Technicon Mod TM-1. Con este aparato se obtienen análisis cualitativos y cuantitativos por medio de cromatografía en columna, automáticamente. Este aparato consta de:

1. Dos columnas cromatográficas formadas por resinas de intercambio iónico (amberlita tipo A Technicon Co.). En una de estas columnas se eluyen los aminoácidos ácidos y los neutros; en la otra columna se eluyen los aminoácidos básicos.

Condiciones de operación de las columnas:

- A. Columna de los aminoácidos ácidos y neutros.

- a) Columna de 75 x 0.63 cm
- b) Cama de resina de intercambio iónico de 69 cm
- c) Temperatura de 42°C
- d) Velocidad de flujo de 0.80 ml/min
- e) Presión de operación de 700 - 800 lb/pulg²
- f) Secuencia de aminoácidos y amortiguadores que los eluyen.

Amortiguador	Aminoácidos
pH 2.85 + 3.0% de metil celosolve	Cisteico
	Aspártico
	Treonina
	Serina
pH 2.85	Asparagina
	Glutámico
	Glutamina
	Prolina
pH 3.70	Glicina
	Alanina
	Cistina
	Valina

pH 5.25

Metionina

Isoleucina

Leucina

Norleucina

Tirosina

Fenil alanina

γ -amino butírico

B. Columna de los aminoácidos básicos

- a) Columna de 35 x 0.63 cm
- b) Cama de resina de intercambio iónico de 21 cm
- c) Temperatura de 60°C
- d) Velocidad de flujo 0.80 ml/min
- e) Presión de operación 100 - 150 lb/pulg²
- f) Secuencia de aminoácidos y amortiguadores que los eluyen.

Amortiguador

pH 3.90

pH 5.25

Aminoácidos

Triptofano

Ornitina

Lisina

Histidina

pH 9.70

Arginina

A continuación, los amortiguadores conteniendo los aminoácidos que han eluido, reaccionan con el reactivo de ninhidrina en presencia de sulfato de hidrazina (actúa como reductor de la ninhidrina). Para favorecer el transporte de las sustancias a través de los tubos del aparato, se usa nitrógeno gaseoso. Posteriormente esta mezcla es calentada a 93°C en un baño de aceite. Como resultado de la reacción antes descrita se produce un compuesto colorido que pasa a un fotocolorímetro y después a un depósito de deshechos. La señal captada por el fotocolorímetro es enviada a un registrador; la señal recibida por el registrador es graficada en forma de picos. El área de cada pico es proporcional a la intensidad de color producida en la reacción y por tanto a la concentración del aminoácido.

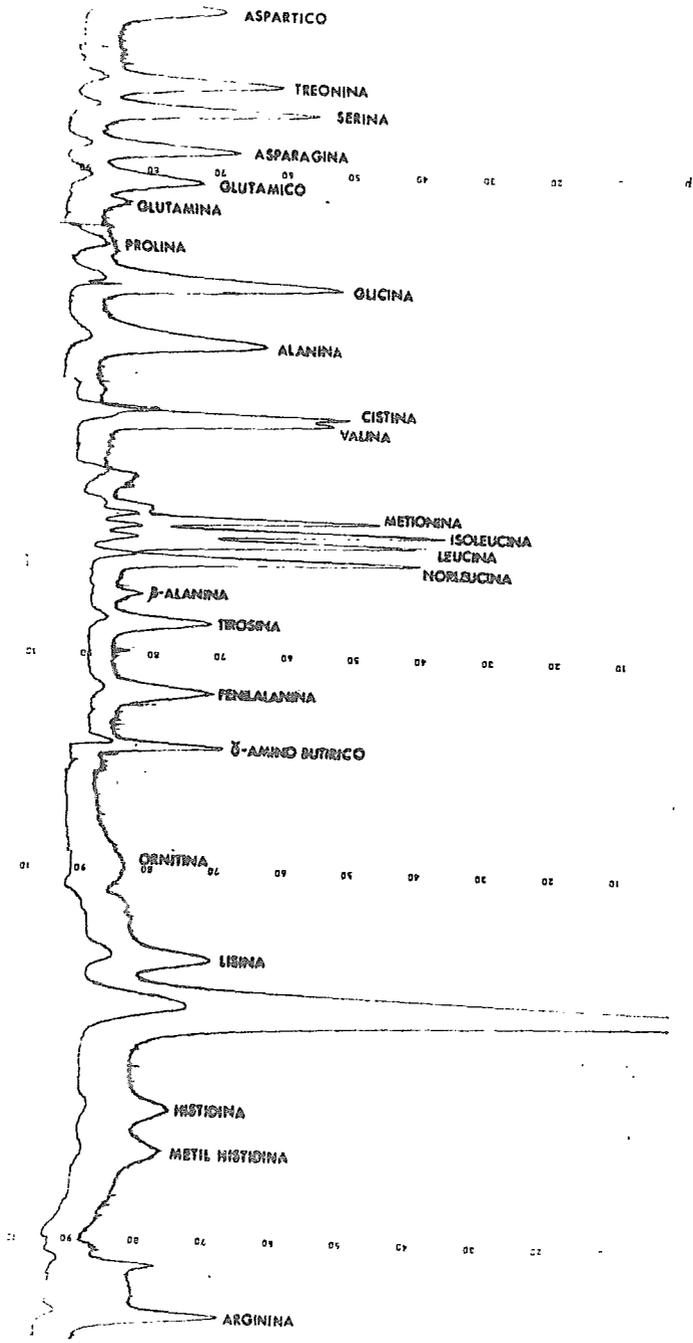
El fotocolorímetro está capacitado para hacer lecturas a dos diferentes longitudes de onda, a 440 y a 570 nanometros. A 440 nm capta las señales enviadas por los aminoácidos que forman un complejo de color ama-

rillo al reaccionar con la ninhidrina y a 570 nm los que producen color violeta. La siguiente figura representa un ejemplo de lo proporcionado por el Auto-analizador de aminoácidos.

Cada pico corresponde a un aminoácido, y el área bajo la curva es proporcional a su concentración. El área de cada pico fué calculada con un integrador de áreas de Gelman Instrument Co. Las áreas así conocidas se relacionaron con el área de un estandar interno; en este trabajo se usó el aminoácido norleucina. Para calcular la concentración de aminoácidos presente en las secreciones vaginales, fué necesario calcular las áreas producidas por un estandar formado por concentraciones conocidas de cada aminoácido. Junto con el estandar de 23 aminoácidos se corrió el estandar interno de norleucina. La concentración de cada aminoácido se obtuvo de la siguiente manera:

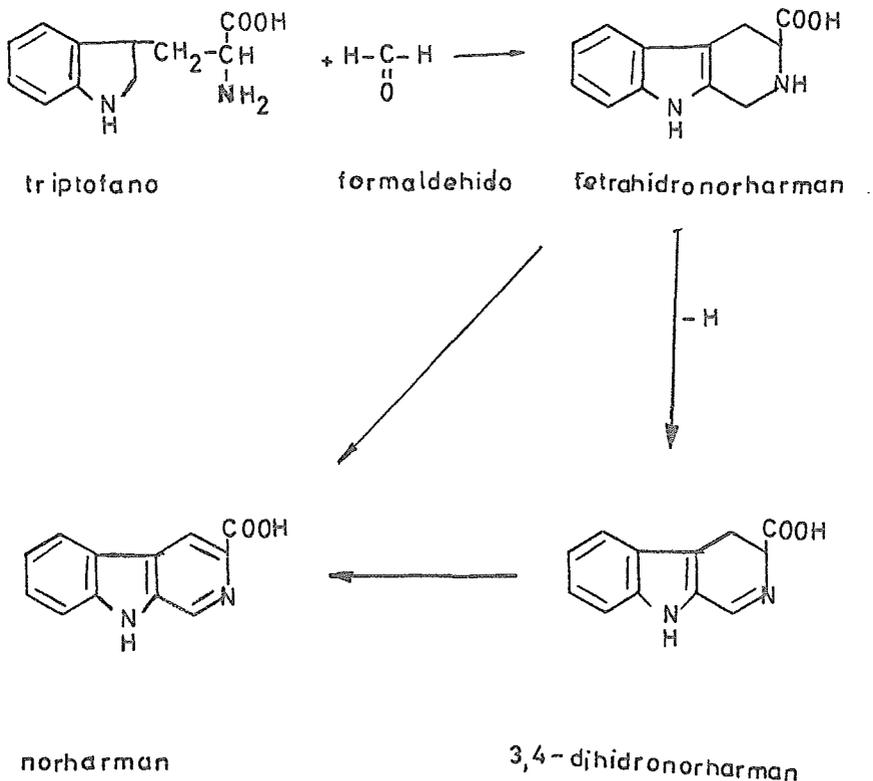
$$\frac{\text{área norleucina en el estandar}}{\text{área de cada aa en el estandar}} \times \frac{\text{área de cada aa en el problema}}{\text{área de norleucina en el problema}} \times \text{concentración de norleucina}$$

concentración de cada aminoácido en la muestra colocada en el cartucho



Determinación de triptofano.- Hess y Udenfriend (49).

I.- Fundamento.- Este aminoácido fué determinado fluorométricamente con el objeto de obtener resultados más aproximados que los proporcionados por el auto-analizador de aminoácidos. La reacción que se efectúa es la siguiente:



II.- Reactivos.-

1. Formaldehido al 18% (Baker)
2. Peróxido de hidrógeno al 3% (Allien Chemical)
3. Solución patrón de triptofano con 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de agua destilada

III.- Aparatos.-

1. Espectrofotómetro de fluorescencia Perkin-Elmer Mod MPF-2A.

IV.- Método.-

Este método es el usado por Hess y Udenfriend.

Su fundamento es la conversión del triptofano a un fluoroforo norharman en dos pasos:

1. Ciclización del triptofano a un derivado tetrahidro norharman con formaldehido al 18% por calentamiento a 100°C durante 20 min
2. Subsecuente oxidación a norharman con peróxido de hidrógeno al 3% por otro período de calentamiento durante 20 min.

La determinación se llevó a cabo de la siguiente manera:

A 100 μ l de sobrenadante:

1. Adicionar 200 μ l de formaldehído al 18%
2. Someter a la temperatura de 100°C durante 20 min
3. Enfriar en hielo
4. Adicionar 40 μ l de peróxido de hidrógeno al 3%
5. Someter a temperatura de 100°C durante 20 min
6. Enfriar en hielo
7. Adicionar 3 μ l de agua destilada

Para leer las muestras el fluorómetro se ajustó a las siguientes condiciones:

Longitud de onda de excitación 365 nm

Longitud de onda de fluorescencia 440 nm

Sensibilidad = 3.

Las lecturas así obtenidas se interpolaron con las producidas por una gráfica tipo, preparada simultáneamente y con los mismos reactivos. Para esta gráfica se pesaron 4 mg de triptofano (Sigma Chemical Co.) y se llevaron a 100 ml con agua destilada; así se obtuvo una solución con 40 μ g/ml. Se hizo una dilución 1:20 obteniéndose una solución con 2 μ g/ml; de esta solución se toma-

ron alícuotas para obtener concentraciones de 0.2 a 1.4 µg de triptofano por sistema.

Determinación de DNA.- Gyles y Myers (7)

I.- De las reacciones de coloración disponibles para la cuantificación e identificación de ácido desoxirribonucleico (DNA) la usada con mayor frecuencia es la que utiliza difenilamina en una mezcla de ácidos acético y sulfúrico (Dische).

En 1956 Burton (6) propuso una modificación para esta reacción, basada fundamentalmente en la adición de acetaldehído y en dejar la solución a 30°C durante 17 hrs para desarrollar color, en vez de producirlo por calentamiento a 100°C durante 20 min. Burton señala que este método es 3.5 veces más sensible que el original de Dische y considerablemente más específico.

Gyles y Myers en 1965 publicaron una modificación al método de Burton que lo hace más sencillo, más sensible y más específico, y el usado por nosotros.

II.- Reactivos.-

1. Acido perclórico al 10% (Merck)
2. Acido perclórico al 20% (Merck)
3. Acetaldehido (Eastman Kodak)

Se prepara una solución de acetaldehido que contenga 16 mg/ml, la cual se debe de conservar congelada; de esta solución se hace una dilución 1:10 en agua destilada en el momento de usarse, quedando una concentración final de 1.6 mg/ml.

4. Difenilamina (Baker)

Se prepara una solución al 4% en ácido acético glacial (Merck) al momento de usarse.

5. Solución patrón de DNA con 1 mg/ml
6. Solución tipo de DNA con 100 µg/ml

III.- Aparatos.-

1. Espectrofotómetro Coleman Jr. Mod 6/20
2. Baño María a 37°C
3. Agitador Mecánico

IV.- Como ya se indicó el DNA fué extraído en 2 ml de PCA al 10%.

1. En un tubo de ensaye se midieron 200 μ l de la solución anterior.
2. Se adicionaron 200 μ l de PCA al 20%
3. Se adicionaron 30 μ l de acetaldehido 1.6 mg/ml
4. Se adicionaron 250 μ l de difenilamina al 4% en ácido acético glacial
5. Se cubrió con parafilm
6. Se mezcló perfectamente
7. Se incubó a 37°C durante 24 hrs
8. Se leyó a 600 nm en un espectrofotómetro

Las lecturas así obtenidas se compararon con las producidas por una gráfica tipo preparada al mismo tiempo y con los mismos reactivos para lo cual se prepararon las siguientes soluciones.

Solución patrón de DNA

Pesar 10 mg en balanza analítica y aforar a 10 ml con solución isotónica. Tenemos así una solución que contiene 1 mg/ml.

Solución tipo

Diluir la solución anterior 1:10 con ácido perclórico

2 M; calentar a 70°C por 15 min; así tenemos una solución que contiene 100 µg/ml y de esta solución tomar alícuota para obtener concentraciones de 10-50 µg por sistema.

Agregar los demás reactivos en el mismo orden que para las muestras y colocarlos en las mismas condiciones.

DETERMINACION DE VITAMINA A. Fujita y Aoyama (8).

I.- Para su determinación usamos el método reportado por Fujita y Aoyama (8) en 1951. Es un procedimiento fluorométrico para el análisis cuantitativo de vitamina A total (libre y esterificada) cuando se encuentra mezclada con otras grasas.

II.- Reactivos.-

1. Hidróxido de potasio (Mallinckrodt) al 5% en etanol absoluto (Gadir)
2. Hidróxido de potasio (Mallinckrodt) al 5% en metanol acuoso al 60% (Merck)
3. Benceno (Merck)
4. Solución patrón de palmitato de vitamina A

III.- Aparatos.-

1. Espectrofotómetro de fluorescencia Perkin-Elmer Mod MPF-2A
2. Centrífuga Sorval SS-1
3. Baño María
4. Horno

IV.- Método.-

La extracción de la vitamina A desde la mezcla de lípidos se llevó a cabo de la siguiente manera: Como se indicó anteriormente, los lípidos fueron extraídos con una mezcla de cloroformo-etanol-éter; esta mezcla se sometió a la temperatura de 60°C durante 15 min para evaporar la mezcla antes citada. El residuo obtenido se trató como sigue:

1. Disolver en 5 ml de KOH al 5% en etanol absoluto
2. Burbujear nitrógeno a través de la mezcla durante 30 seg.
3. Someter a temperatura de 75°C durante 30 min
4. Enfriar rápidamente en hielo

5. Siguiendo a la saponificación adicionar 5 ml de benceno y 5 ml de agua
6. Agitar el tubo enérgicamente en vortex durante un minuto
7. Centrifugar a 1,000 rpm durante 5 min
8. Transferir el benceno a otro tubo
9. Lavar el benceno con 10 ml de KOH al 5% en metanol acuoso al 60%
10. Lavar con 10 ml de agua destilada

Si la mezcla no es clara y transparente a este punto, concluir lavando el benceno con metanol acuoso al 60% y agua destilada

La vitamina extraída se lee en un espectrofotómetro de fluorescencia ajustado a las siguientes condiciones: Excitación 327 nm; fluorescencia 510 nm; sensibilidad=3.

Las lecturas obtenidas se compararon con las producidas por un estandar de vitamina A preparado con palmitato de vitamina A disuelto en benceno.

DETERMINACION DE PROTEINAS. Biuret (64).

I.- Su determinación se basa en el complejo colorido formado por el cobre del reactivo de Biuret con los enlaces peptídicos de las proteínas. La intensidad de color es proporcional al número de enlaces peptídicos presentes.

II.- Reactivos.-

1. Reactivo de Biuret

Sulfato cúprico pentahidratado 1.5 g

Tartrato doble de sodio y potasio 6.0 g

Disolver en 500 ml de agua destilada

Aforar a 1,000 ml con NaOH 0.1 N

2. NaOH 1 N (Merck)

3. Albumina bovina con 10 mg/ml (Hyland)

III.- Aparatos.-

1. Espectrofotómetro Coleman Jr Mod 6/20

IV.- Método.-

Las proteínas extraídas como se indicó anteriormente, se disuelven en 1 ml de hidróxido de sodio

1 N, adicionar 1 ml de reactivo de Biuret; mezclar; leer la coloración producida a 540 nm en un espectrofotómetro. Las lecturas así obtenidas fueron interpoladas en una gráfica tipo preparada simultaneamente y con los mismos reactivos. Como tipo se usó una solución de albumina bovina (Hyland) con 10 mg/ml; se tomaron alícuotas adecuadas para tener concentraciones de 0.2 mg por sistema.

DETERMINACION DE ACIDO SIALICO. Warren (50).

I.- Se destinó un lote de secreciones vaginales en el que sólo se analizó ácido siálico y proteínas. El método usado es útil para determinar el ácido siálico libre así como el ácido siálico que se encuentra unido al resto de la glicoproteína. Las secreciones fueron sometidas a hidrólisis ácida débil para separar el ácido siálico.

II.- Reactivos.-

1. Acido sulfúrico 0.2 N. Medir 0.55 ml de ácido sulfúrico de 96% (Merck) y densidad 1.84 a 100 ml

con agua destilada.

2. Metaperyodato de sodio (Baker) 0.2 M en ácido fosfórico (Monterrey) 9 M.

Medir 59.5 ml de ácido fosfórico, aforar a 100 ml con agua destilada.

Pesar 4.2 g de metaperyodato de sodio (Baker) y aforar a 100 ml con agua destilada.

Pesar 4.2 g de metaperyodato de sodio (Baker) y aforar a 100 ml con ácido fosfórico 9 M.

Guardar en frasco ambar.

3. Acido 2-tiobarbitúrico al 0.6% en una solución de sulfato de sodio 0.5 M (Baker).

Pesar 40.2 g de sulfato de sodio decahidratado y aforar a 250 ml con agua destilada.

Pesar 1.5 g de ácido 2-tiobarbitúrico (Sigma) y aforar a 250 ml con solución de sulfato de sodio 0.5 M.

4. Arsenito de sodio al 10% en una solución de sulfato de sodio 0.5 M + ácido sulfúrico 0.1 N.

Medir 0.67 ml de H_2SO_4 y 40.2 g de sulfato de

sodio decahidratado, aforar a 250 ml con agua destilada.

Pesar 25 g de arsenito de sodio (Baker) y aforar a 250 ml con la solución anterior.

5. Acido N-acetil neuramínico tipo IV (Sigma).

Pesar 3 mg de ácido N-acetil neuramínico y aforar a 25 ml.

III.- Aparatos.-

1. Espectrofotómetro Coleman Jr. Mod.6/20

IV.- Método.-

Este método se basa en el complejo colorido formado al reaccionar el ácido siálico con el ácido 2-tiobarbitúrico.

A 500 μ l de secreción vaginal adicionar un volumen igual de ácido sulfúrico 0.2 N para tener una concentración final 0.1 N. Para hidrolizar someter a temperatura de 80°C durante 1 hora.

1. De la muestra hidrolizada tomar 50 μ l.
2. Adicionar 150 μ l de agua destilada
3. Adicionar 100 μ l de reactivo de metaperyodato

de sodio.

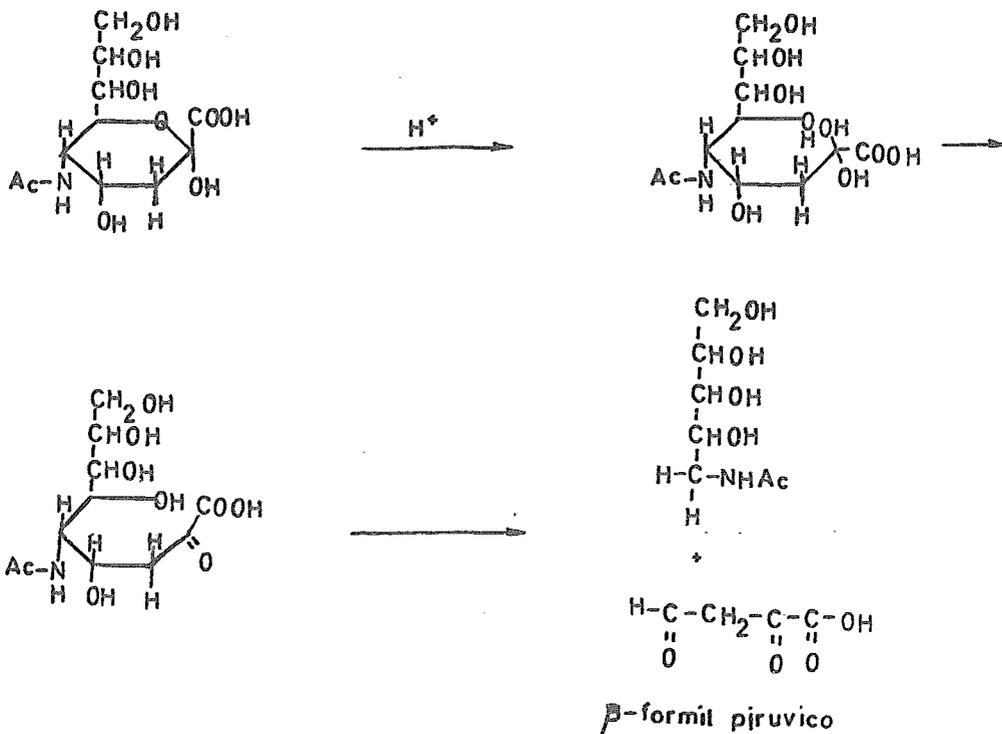
4. Agitar ligeramente y dejar reposar 20 min a temperatura ambiente.
5. Adicionar 1 ml de reactivo de arsenito de sodio.
6. Agitar hasta hasta la desaparición del color amarillo.
7. Adicionar 3 ml de reactivo de ácido 2-tiobarbitúrico.
8. Someter a ebullición en baño maría durante 15 min y enfriar en hielo 5 min
9. Extraer el color con 2 ml de ciclohexanona
10. Agitar vigorosamente durante 2 min
11. Centrifugar a 1,000 rpm durante 5 min
12. Separar el solvente orgánico
13. Leer a longitud de onda de 550 nm en un espectrofotómetro

Las lecturas así obtenidas se compararon con las producidas por una gráfica tipo preparada simultáneamente y con los mismo reactivos.

La solución tipo tenía 3 mg de ácido siálico

por 25 ml de agua destilada. Se tomaron alícuotas adecuadas para tener concentraciones de 3 a 12 μg por sistema.

La reacción que se efectúa no es bien conocida, se sabe que el metaperiodato de sodio en medio ácido oxida el ácido siálico y dá un cromóforo que es el β -formilpirúvico, que al combinarse con el ácido 2-tiobarbitúrico dá una coloración púrpura.



RESULTADOS

Es necesario mencionar que el grupo de pacientes estudiado no era homogéneo, sino que por el contrario incluía algunas variables, es decir, al momento de realizar el estudio, algunas de las pacientes presentaban embarazo, otras tomaban anticonceptivos, y otras más tenían tricomonas en abundancia.

Con objeto de lograr una interpretación adecuada de los resultados, las pacientes se clasificaron en cinco grupos:

1. Normales
2. Pacientes con cáncer cérvico uterino
3. Pacientes embarazadas, sin cáncer
4. Pacientes con tricomoniasis vaginal, sin cáncer
5. Pacientes que tomaban anticonceptivos, sin cáncer.

A continuación se indica el número de pacientes que formaba cada grupo y qué tipo de determinación se les efectuó.

Número de pacientes

Diagnóstico	Total	Aminoácidos	Vitamina A	Acido Siálico
1. Normales	36	15	10	11
2. Cáncer Cérvico- Uterino	23	7	9	7
3. Embarazo	14	3	4	7
4. Tricomoniasis	7	4	3	-
5. Anticonceptivos	18	4	7	7

El diagnóstico considerado para llevar a cabo la clasificación anterior, se tomó de la historia clínica de las pacientes, así como de su estudio citológico y anatómopatológico llevados a cabo el día de la toma de la secreción vaginal estudiada.

Se hizo la determinación de DNA y proteínas para considerarlos como parámetros de referencia; los resultados obtenidos en las determinaciones de aminoácidos libres, vitamina A y ácido siálico se relacionaron a concentración de DNA y proteínas y así aparecen en las gráficas.

Se determinó DNA porque se consideraba como un parámetro de referencia confiable, se ha visto que cada célu-

la contiene 6 picogramos de DNA y en base de esto al referir nuestros resultados a concentración de DNA, obtendremos una mejor comparación de nuestros resultados.

La siguiente figura representa la relación existente entre el contenido de DNA y el contenido de proteínas en las secreciones vaginales.

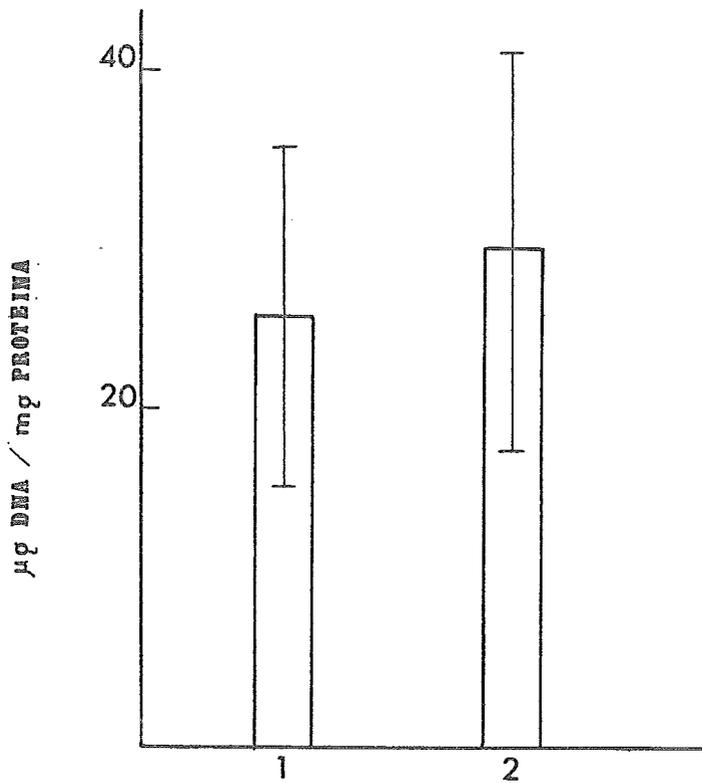
La barra de la izquierda representa los casos normales y la de la derecha los resultados de las pacientes con cáncer cérvico uterino. La altura de las gráficas indica el promedio de la concentración de cada aminoácido, además, se ha indicado en cada una con una línea vertical, la desviación estandar del promedio.

Al iniciar la determinación de aminoácidos fué necesario calibrar el aparato para lo cual se usó una solución tipo de 23 aminoácidos que contenía $2.5 \mu\text{M}$ de cada aminoácido disueltos en HCl 0.1 N pH 2.7.

En este estudio se identificaron 23 aminoácidos de los cuales se cuantificaron 16.

A continuación se indican los aminoácidos que fueron cuantificados.

RELACION DNA / PROTEINA



Aspártico	Isoleucina
Treonina	Leucina
Serina	Tirosina
Glicina	Fenilalanina
Alanina	Lisina
Cistina	Histidina
Valina	Arginina
Metionina	Triptofano

Los aminoácidos solamente identificados fueron:

Asparagina	γ-amino butírico
Glutámico	Ornitina
Glutamina	Cistéico
Prolina	

En las figuras 1 y 2 se han representado los 16 aminoácidos cuantificados; se ha graficado el contenido de aminoácidos por miligramo de DNA presente en la secreción. Aquí, los resultados obtenidos de los casos normales se comparan con los obtenidos de las pacientes con cáncer cérvico uterino.

De los resultados puede verse que el patrón de aminoácidos libres en las secreciones vaginales de pacientes con neoplasias malignas se encuentra en menor concentración que en las secreciones vaginales de mujeres normales.

Encontrándose una diferencia mayor por aspártico, cistina, metionina, isoleucina, leucina, fenilalanina. Diferencias menos considerables fueron presentadas por treonina, serina, glicina, alanina, valina, tirosina, lisina y arginina.

Es importante mencionar que los únicos aminoácidos que se encontraron en concentración más alta en las secreciones vaginales de pacientes con cáncer cérvico uterino, fueron histidina y triptofano.

En las figuras de la 3 a la 10, se han graficado las diferencias presentadas por los 5 grupos estudiados.

De los grupos estudiados, la concentración de aminoácidos más alta correspondió al grupo de pacientes cuyo estudio citológico reportó la presencia de tricomonas vaginales.

Es notable también que las secreciones vaginales de

mujeres embarazadas, contiene menor cantidad de aminoácidos que las secreciones de mujeres normales.

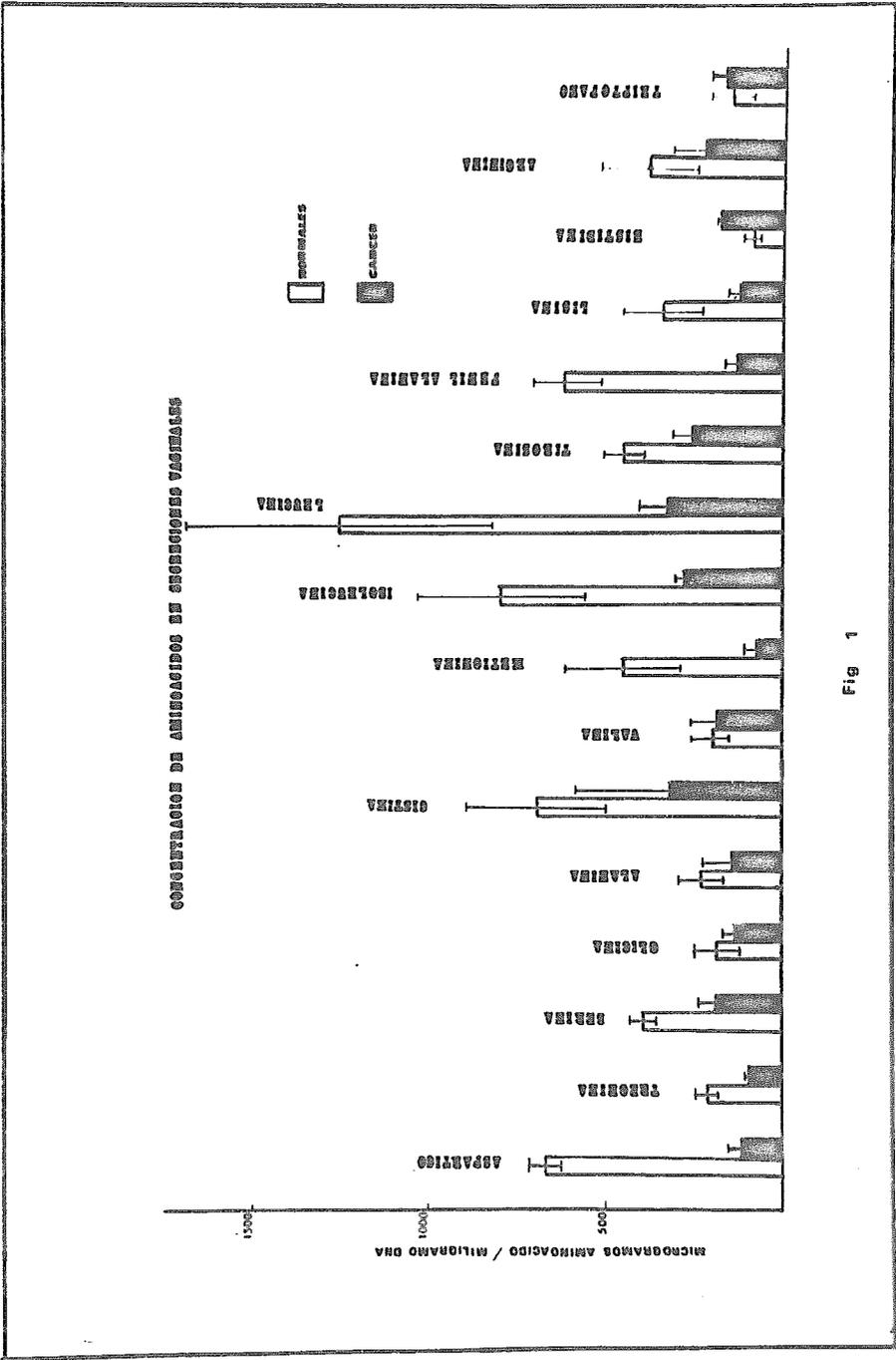


Fig 1

CONCENTRACION DE AMINOACIDOS EN SECRECIONES VAGINALES

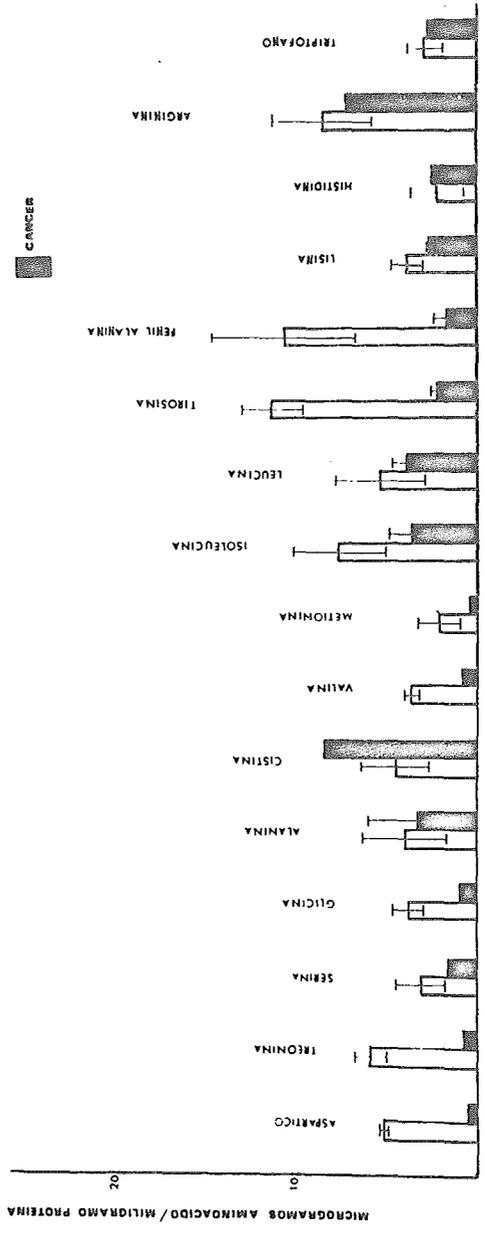


FIG 2

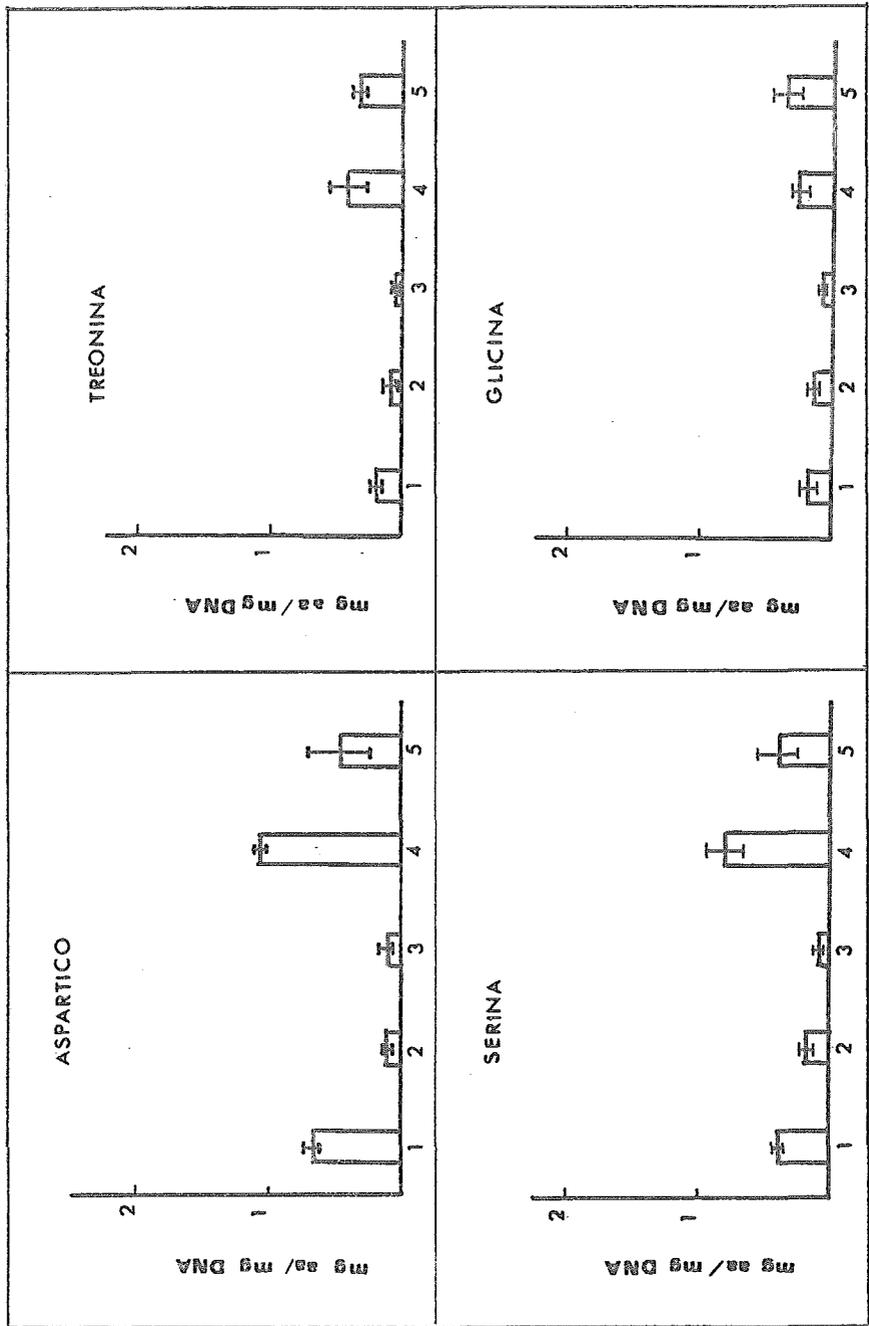


Fig 3

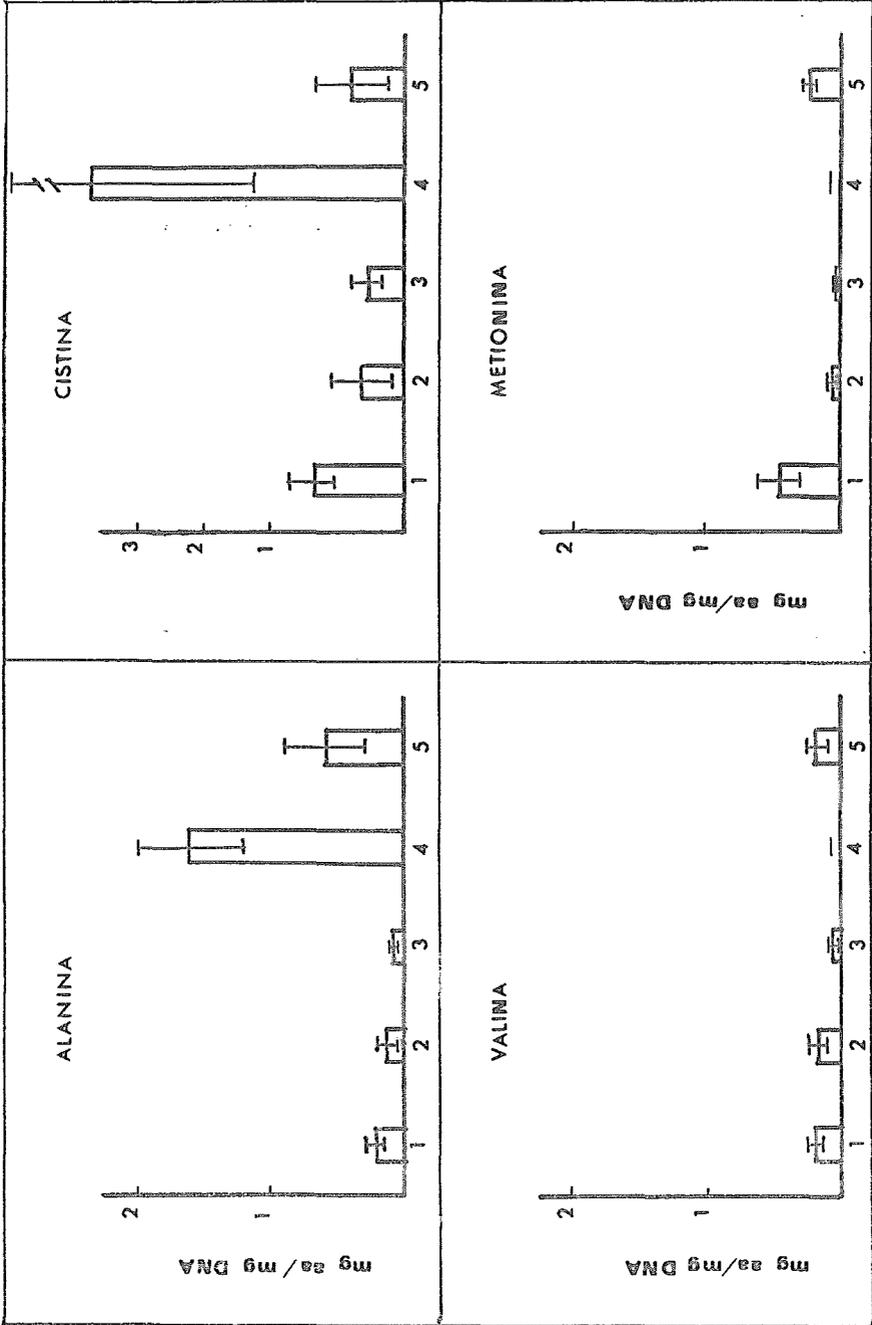


Fig 4

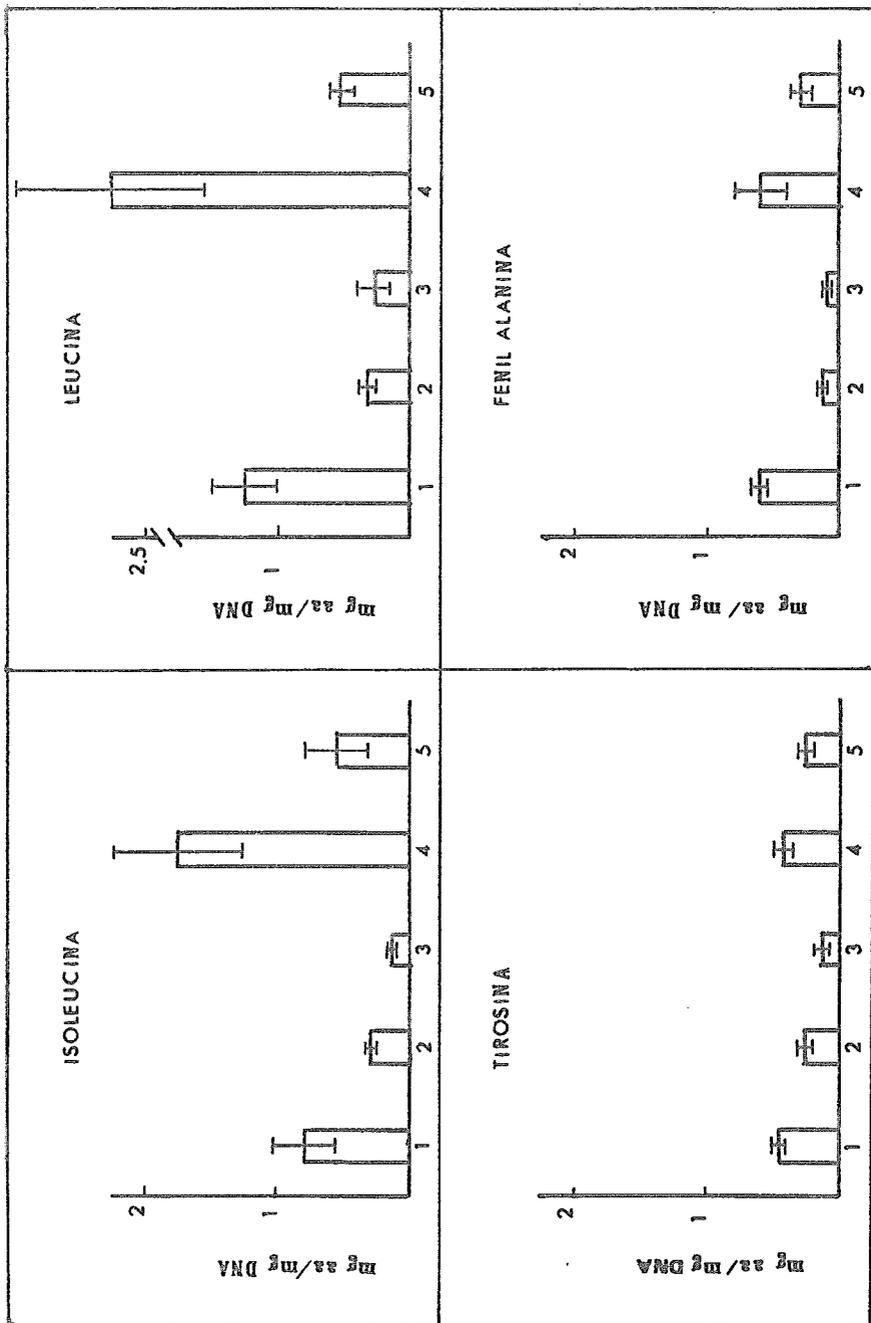


FIG 5

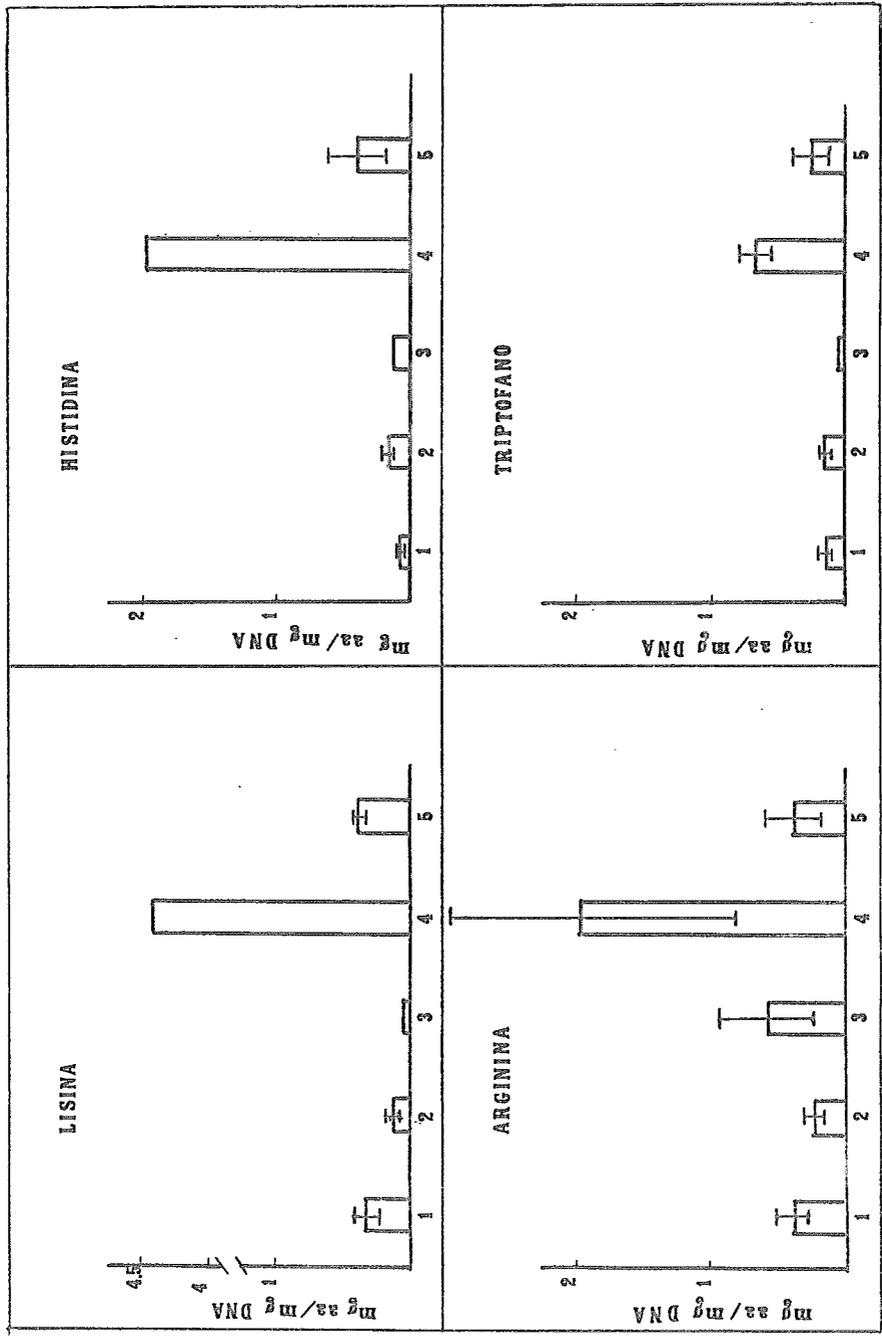


Fig. 6

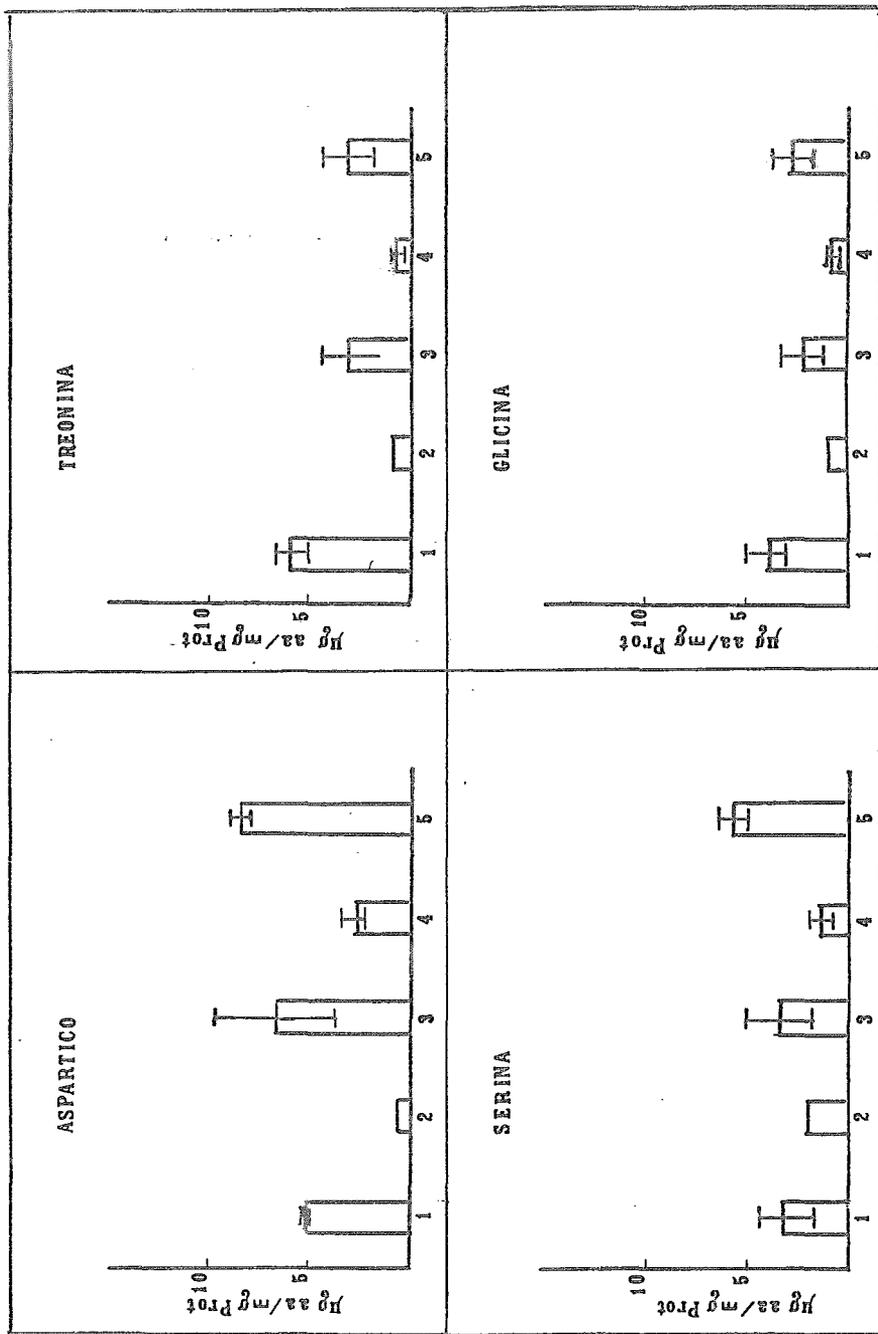


Fig 7

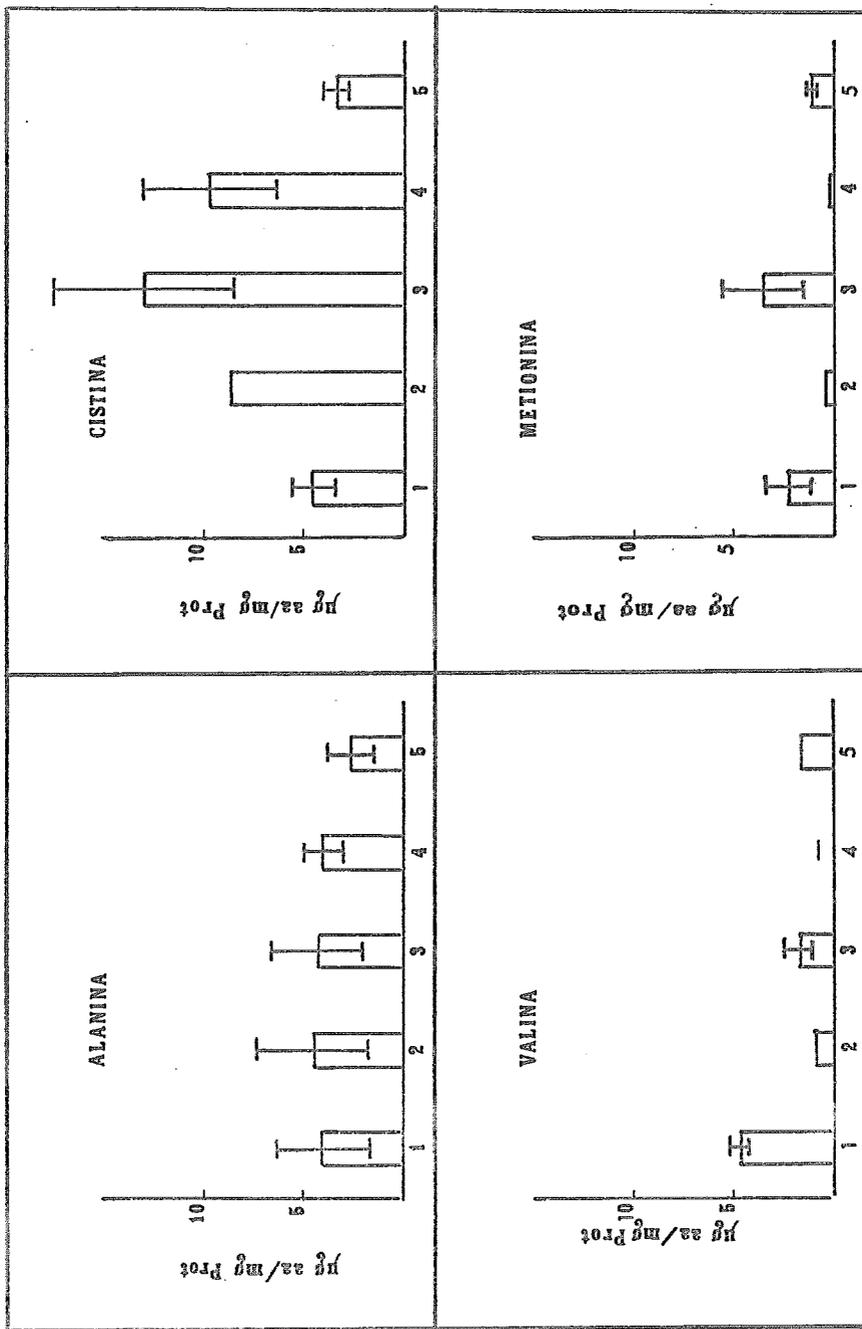


Fig 8

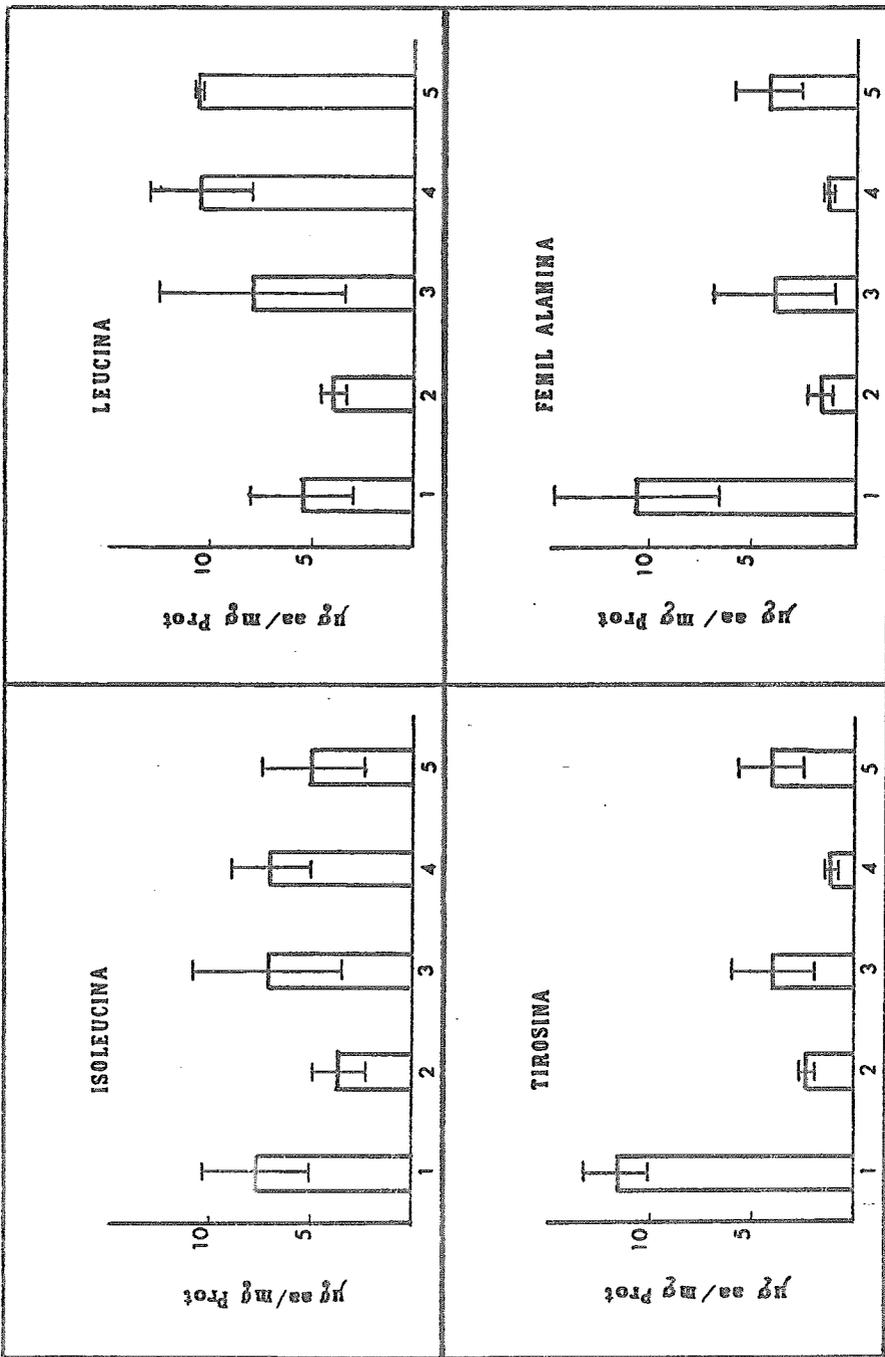


Fig 9

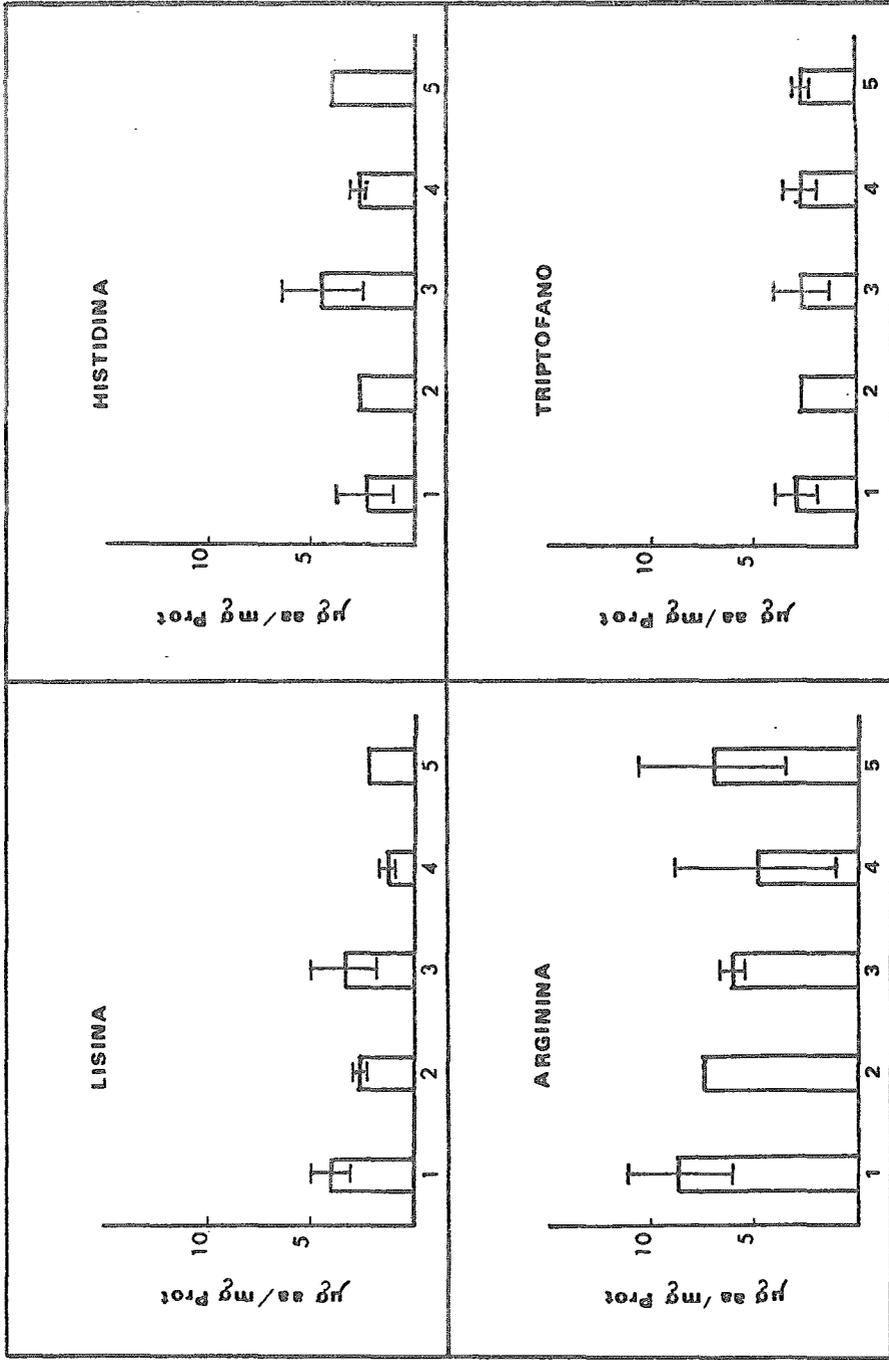


Fig 10

VITAMINA A

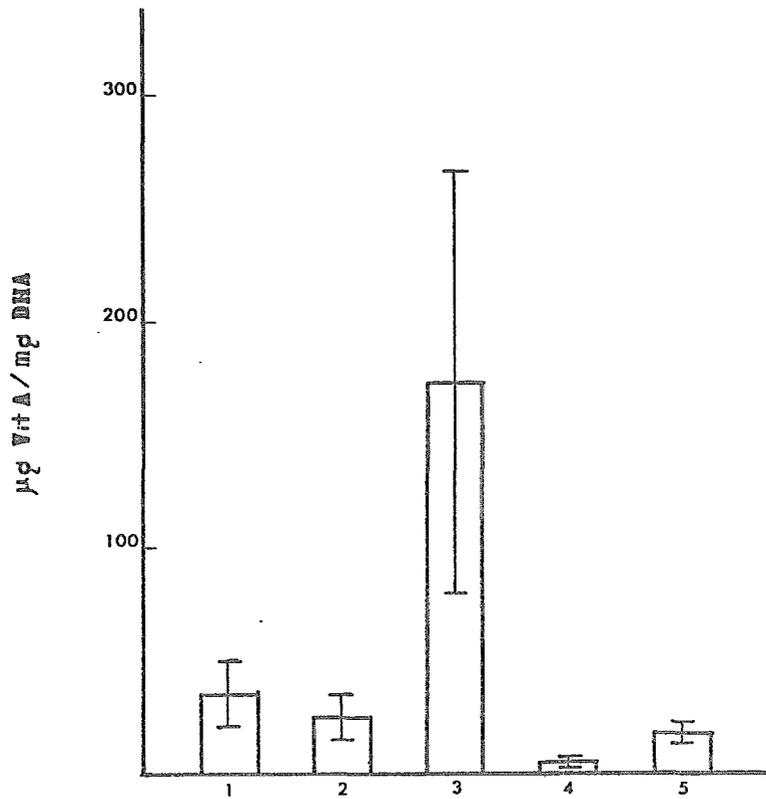


Fig 11

VITAMINA A

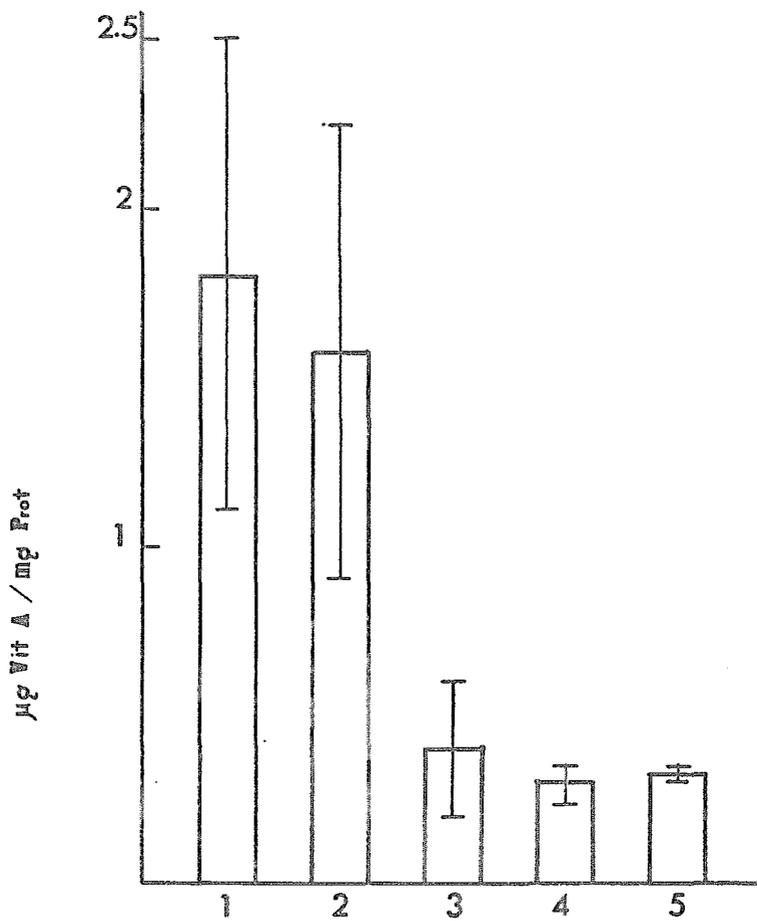


Fig 12

Ac. SIALICO

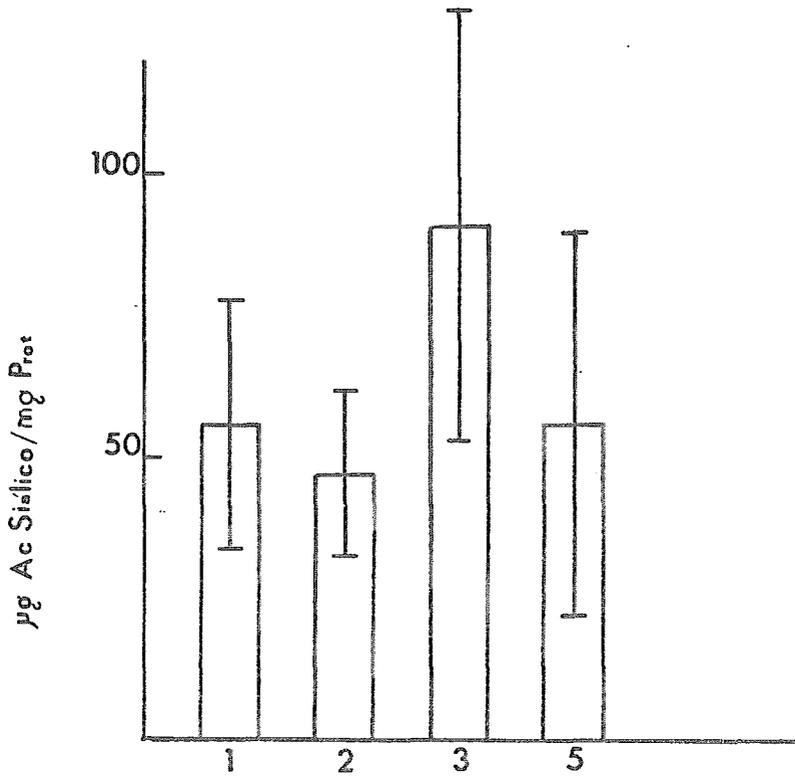


Fig 13

DISCUSION Y CONCLUSIONES

El cáncer del cuello uterino ha ocupado desde hace varios años un lugar prominente tanto en la práctica clínica como en la investigación científica. Siendo una enfermedad que afecta y produce la muerte a un gran número de mujeres, muchas de ellas madres de familia; es de vital interés para la medicina en cualquiera de sus aspectos.

La tendencia actual en relación al estudio de esta enfermedad es la de considerar que el médico tiene la obligación de utilizar todos los medios a su alcance para obtener una clara visión de la conducta biológica del epitelio cervical en su evolución hacia la malignidad, y acrecentar el conocimiento de esta entidad patológica y hacer que su diagnóstico y tratamiento dejen de ser empíricos y convertirse en selectivos.

En el estudio del carcinoma in situ debe considerarse la utilidad de abocar el problema desde varios puntos de vista, tomando en cuenta que los resultados obtenidos deben ser considerados complementarios y no

competitivos.

El presente trabajo esta basado en el estudio de la secreción vaginal en un gran número de pacientes seleccionadas al azar, entre todas aquellas que han sido convocadas al Hospital de Oncología del Instituto Mexicano del Seguro Social por haberseles encontrado una citología sospechosa en el escrutinio que se lleva a cabo en todas las clínicas del mencionado Instituto como parte de la campaña para el descubrimiento temprano del cáncer del cuello de la matriz.

En relación a este estudio debe señalarse que el aspecto bioquímico de la transformación neoplásica del epitelio cervical, aunque no es nuevo, ha sido superficialmente estudiado y por lo tanto debe considerarse que es un campo apto para la investigación.

Cuando se considera que aún el patólogo más experimentado, dotado de una amplia experiencia personal, encuentra, en ocasiones, difícil el hacer un diagnóstico y predecir la evolución de algunos casos particulares de cáncer cérvico uterino, es cuando parece urgente la utilización de algún medio que permita aquilatar la

actividad potencial inherente en algunas anormalidades epiteliales y quizá, como aspecto más importante, algún método de estimar la interacción biológica, entre esta lesión epitelial, su evolución y la reacción del estroma subyacente.

En la búsqueda de tales índices de actividades biológicas es obvio que debe darse un lugar preponderante a los métodos bioquímicos e histoquímicos puesto que permiten el estudio cuantitativo de algunas enzimas, nucleoproteínas y otras sustancias que se sabe desempeñan un papel metabólico fundamental en el mantenimiento y regulación de la fisiología tisular normal. En este campo la cuantificación de compuestos tales como aminoácidos libres, vitamina A, ácido siálico y de la concentración de proteínas y ácidos nucleicos en la secreción vaginal ofrece la doble ventaja de proporcionar, al mismo tiempo, una indicación de la respuesta del organismo a la presencia de un epitelio anormal y de el posible desarrollo de una prueba bioquímica de ayuda para el diagnóstico que podría ser más objetiva y más fácilmente aplicable que cualquiera otra de las

técnicas utilizadas en la actualidad.

La investigación directa, citoquímica e histoquímica del epitelio cervical ha dado origen a una serie de publicaciones, muchas de ellas francamente contradictorias. A pesar de la gran cantidad de datos estudiados no se ha señalado la existencia de ninguna substancia, cuya presencia o ausencia sea característica del epitelio neoplásico, y en la luz de estas investigaciones se hace difícil pensar que tal substancia exista y que lo más que puede esperarse es un cambio en el gradiente cuantitativo de algún constituyente del epitelio normal que nos indique la presencia del epitelio neoplásico.

De las pruebas histoquímicas, la única que compite al presente trabajo es la llamada prueba de Schiller (1) la cual está basada en la creencia de que el epitelio escamoso maligno esta desprovisto de glucógeno. Sora (51) y García (52), han señalado la ausencia de glucógeno en las células del carcinoma invasivo del cervix y Henry y Latour (27) observaron la disminución progresiva del contenido de glucógeno a través de todas las etapas de anaplasia hasta su completa ausencia en el

cáncer intraepitelial. Sin embargo algunos autores como Foraker y Marino (49) y Manglano (53) encuentran una apreciable cantidad de glucógeno en aproximadamente el 60 y 70% de sus casos de cáncer cérvico uterino. Y el último autor citado refiere en algunos casos de cáncer invasor cantidades de glucógeno en cantidades mayores que las habituales. A pesar de que la mayoría de los autores convienen en que el carcinoma intraepitelial realmente contienen poca o nula concentración de glucógeno, es cierto que esta consideración puede encontrarse en muchas otras alteraciones no neoplásicas del cuello y que los casos de cáncer invasor frecuentemente contienen cantidades supranormales de glucógeno. En suma, puede considerarse que siendo la prueba de Schiller tan fácil de realizar y tomando solo 30 a 60 segundos del tiempo del médico, debería practicarse en todas las exploraciones ginecológicas, siempre y cuando no se confíe demasiado en los resultados proporcionados. En nuestra serie de casos la prueba de Schiller fué realizada en todas las

pacientes estudiadas pero siempre después de una cuidadosa exploración simple del cuello y después de tomar la muestra de secreción vaginal para relaizar nuestro estudio, y la prueba de Schiller se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. Colocar a la paciente en posición ginecológica
2. Aplicar el espejo
3. Tomar la secreción cérvico-vaginal para nuestro estudio
4. Quitar las secreciones cérvico-vaginales restantes con una torunda humedecida en solución de ácido acético 1:100 en solución fisiológica
5. Aplicar lugol con una torunda
6. Dejar secar durante 2 a 3 min
7. Observar.

Cuando la inspección simple demostró la presencia de lesiones cervicales se tomaron biopsias tanto de las áreas sospechosas visualmente como de las áreas que aparentemente normales fueron demostradas positivas en la prueba de Schiller.

De gran importancia para la interpretación de

nuestros resultados son los datos señalados anteriormente por Bernal (4), quien midiendo algunos parámetros bioquímicos en secreción vaginal encontró que, entre la cantidad de proteínas y la cantidad de Peso Seco de la secreción vaginal existe una notable relación, aunque la dispersión de los datos es grande, es curioso observar que la correlación entre estos dos parámetros es aparentemente mayor en los casos diagnosticados de cáncer cérvico uterino y además de que, la totalidad de la materia orgánica presente en la secreción vaginal esta formada por proteínas, lo cual se explica en razón de la ausencia de glucógeno en el epitelio malignizado. En cambio no existe una gran correlación entre la cantidad de DNA y la cantidad de Peso Seco y en este caso al contrario de lo que ocurre con las proteínas la correlación es ciertamente menor en los casos de cáncer. A pesar de todo, existe correlación entre estos dos parámetros aunque la variación presente debe quitarle significación estadística.

Otro estudio llevado a cabo en secreción vaginal fué realizado por Velázquez (54) quien utilizando un

método polarográfico encontró que una mayor concentración de grupos SH comparandolos con grupos SS aumenta el número de mitosis lo cual pudiera ser de importancia en el diagnóstico precoz del cáncer cérvico uterino.

De nuestro estudio podemos ver que la relación DNA/proteína en los casos normales presenta un valor inferior al presentado por las pacientes con cáncer cérvico uterino. Esto está de acuerdo con lo reportado por González Merlo y López Barca (55) quienes estudiaron citoquímicamente el contenido de RNA y DNA en 261 muestras del cuello uterino señalando que la riqueza del tejido en ácidos nucleicos aumenta con la presencia de etiopias celulares y alcanza su máximo en los casos de carcinoma in situ, los autores mencionados observaron que el contenido de ácidos nucleicos es casi inversamente proporcional al contenido de glucógeno del tejido.

Los aminoácidos en estado libre se encuentran presentes en todos los fluidos y tejidos del cuerpo; las pozas de aminoácidos de los fluidos y tejidos del cuerpo contienen todos los aminoácidos comunmente encontrados

en las proteínas así como también otros aminoácidos y pequeños péptidos (83, 84). El término "poza" se refiere a los aminoácidos no combinados y a los materiales biológicos que son fácilmente extraídos desde los tejidos. La concentración de los aminoácidos libres en el cuerpo es pequeña comparada con la de los aminoácidos que se encuentran unidos formando proteínas. Los aminoácidos libres se encuentran distribuidos en forma diferente en los fluidos y tejidos. Van Slyke y Meyer (85) mostraron que la concentración del N- amino es más alta en los tejidos que en el plasma sanguíneo. Esta diferencia es debida principalmente a cinco aminoácidos: Glicina, glutámico, glutamina, alanina y aspártico. Herbert (86) analizó el cuerpo entero de la rata para obtener las concentraciones de aminoácidos libres en los tejidos y plasma de glicina, glutámico, glutamina, alanina y aspártico, encontrando que eran de 10 a 58 veces más grandes en los tejidos que en el plasma y que estaban presentes en la mayoría de los tejidos. Determinó además otros 17 aminoácidos y vió que se encontraban presentes en mayor

concentración en intestino, riñón y bazo; la continua digestión de proteínas puede ser considerada causa de la gran cantidad de aminoácidos libres encontrados en intestino; en el caso de riñón los niveles de aminoácidos libres pueden ser asociados con la concentración en la orina.

Considerando los factores que afectan las pozas de aminoácidos libres, debe ser posible proporcionar información acerca de cambios en:

1. Concentración de aminoácidos individuales en tejidos y plasma para estados patológicos y normales.
2. Los mecanismos responsables de dichos cambios.
3. El efecto de los cambios en la distribución de aminoácidos en el metabolismo del tejido.

Niveles más altos de aminoácidos libres han sido encontrados en la sangre de ratas hembras que de machos (Wheeler y Morgan, 69). Sin embargo, no se han encontrado diferencias notables entre hombre y mujer (70). Los niños han mostrado niveles ligeramente más bajos en plasma que los adultos (71). Desde el naci-

miento hasta la vida adulta algunos aminoácidos (glutámico, aspártico y γ -amino-butírico) en cerebro de ratón mostraron incremento en su concentración mientras que otros disminuyeron (72, 73, 74). Poco es sabido acerca de su concentración en otros tejidos.

Muchos constituyentes de la dieta han mostrado tener influencia sobre las concentraciones de aminoácidos libres en los tejidos y fluidos del cuerpo. La dieta afecta no solo el paso de los aminoácidos ingeridos hacia las pozas de aminoácidos, sino también su utilización por los tejidos que es parcialmente dependiente de otros nutrientes. Como resultado, los niveles de aminoácidos libres presentes dentro del cuerpo son influenciados por la ingestión de proteínas, carbohidratos, grasas, vitaminas y minerales.

La determinación de aminoácidos libres en secreciones vaginales de mujeres con cáncer cérvico uterino era de interés para nosotros ya que esto nos daría una idea de cuales eran los aminoácidos que estaban siendo empleados en mayor cantidad para la síntesis de proteínas por las células tumorales y las adyacentes.

En los resultados obtenidos por nosotros los aminoácidos encontrados en mayor concentración en las secreciones vaginales de los casos normales fueron: leucina, isoleucina, cistina, aspártico y fenilalanina que no corresponden con los postulados hasta la fecha, excepción hecha para el aspártico; los aminoácidos presentes en menor concentración fueron valina, glicina, alanina, triptofano e histidina.

En las secreciones vaginales de pacientes con cáncer cérvico uterino, los aminoácidos más concentrados fueron leucina, cistina, isoleucina, tirosina y arginina. Los menos concentrados fueron lisina, glicina, aspártico, treonina y metionina. Como puede verse son distintos de los encontrados en los casos normales, lo cual nos habla de alteraciones en el metabolismo de los aminoácidos en la célula neoplásica. Sin embargo, estas diferencias son difíciles de analizar en este momento puesto que se tiene muy poca información sobre los cambios en las pozas de aminoácidos que acompañan a la carcinogénesis, pero se señala que sería importante este tipo de estudio puesto que ayudaría a comprender el cambio metabólico inicial de la transformación neoplásica.

La vitamina A se conoce como un factor importante en la regulación del crecimiento y la diferenciación del tejido epitelial. Esto también tiene relación directa con el problema del cáncer cérvico uterino puesto que es estudios recientes (68) han mostrado que la administración de cantidades altas de vitamina A son capaces de modificar favorablemente la evolución de tumores epiteliales y aún del cáncer cérvico uterino (56). Es pues de gran interés el observar que nuestros resultados indican la presencia de una disminución significativa en la concentración de vitamina A de las secreciones vaginales obtenidas de pacientes con cáncer cérvico uterino. No obstante es difícil en este momento tratar de establecer una mayor correlación clínica en vista de la considerable dispersión de nuestros resultados y del pequeño número de casos estudiados. Sin embargo, es posible predecir que la continuación de este tipo de determinaciones podrían tal vez aclarar el problema de la patogénesis del cáncer cérvico uterino.

En la actualidad existe gran producción de literatura que sostiene que las glicoproteínas y los glicolípi-

dos son constituyentes de las células animales y que ellos tienen funciones importantes en la superficie celular. Ellas comprenden las sustancias de los grupos sanguíneos (57), los antígenos tisulares (58) y ha sido mostrado que contienen sitios receptores para algunos virus (59). Un glicopéptido (antígeno de Forssman) ha sido demostrado por técnicas inmunológicas en células transformadas por un virus pero no se encontró en la misma línea de células que no habían sido transformadas. Se han encontrado diferencias en el contenido de glicolípidos de las células (61, 62) antes y después de la transformación viral. El contenido de carbohidratos de preparaciones de membranas de fibroblastos de ratón, transformadas por virus ha mostrado encontrarse disminuído del normal (63). Es pues importante el observar que nuestros resultados indican la presencia de una disminución en la concentración de ácido siálico de las secreciones vaginales obtenidas de pacientes con cáncer cérvico uterino.

Se ha visto que las propiedades de la superficie más externa de la célula, afecta la locomoción celular y la invasión tumoral así como también las interac-

ciones celulares, el control del crecimiento y la morfo
génesis. Los estudios llevados a cabo por Ambrose (65),
tratando eritrocitos humanos con la enzima neuraminidasa
removió el 90% de la carga neta superficial. Se vió que
la superficie más externa consistía de una cubierta que
contenía ácido siálico. Esta substancia, se sabe, es la
responsable de la carga superficial de la célula en mu--
chos tipos de tejidos. El estudio de la movilidad electro
forética de tumores tratados con neuraminidasa, indicó
que dicha movilidad disminuye. La carga neta de la super
ficie celular es reducida por esta enzima en proporción
que depende del tipo de célula.

La pérdida de inhibición por contacto es generalmen
te acompañada por un incremento en la carga neta superfi
cial negativa de la célula. En un estudio de una pobla
ción sincronizada de células HeLa ha mostrado que duran
te la mitosis hay un incremento neto en la carga super
ficial negativa (Forrester y Brent, 66). El hígado en re
generación también mostró un incremento en la carga su
perficial (Doljansky y Eisenberg, 67). En términos sim
ples puede ser sugerido que el incremento en la carga dé

lugar a un incremento en las fuerzas repulsivas entre las células y de aquí a una disminución en su adhesividad. Esto conduce a una pérdida de contacto, inhibición de movimiento y pérdida del control de crecimiento. Estudios electroforéticos con células de riñón de Hamster y células tumorales de riñón de la misma especie animal mostraron que las células tumorales tenían mayor movilidad electroforética. Lo anterior ha sido ampliamente confirmado con células de hígado y hepatoma.

Otro estudio llevado a cabo con ácido siálico (Ambrose) en superficie de células de carcinoma de Ehrlich, mostró que dicho ácido forma parte de una sialo mucoproteína o sialo mucopéptido con el ácido siálico unido a N-acetilgalactosamina, y este parece estar unido a los grupos carboxilos del ácido glutámico en el péptido.

Vassar, por medio de electroforesis con células humanas normales y neoplásicas, encontró que las células de tumores mesenquimales tenían densidad de carga superficial más grande que las células de carcinoma al tratar dos tipos de células con sialidasa causó una pérdida más pronunciada de cargas negativas en las células de tumores

mesenquimatozos que en las células de carcinoma; encontró además que, los epitelios normal y maligno no tuvieron diferencia importante en su densidad de carga superficial.

Puesto que según los resultados de los investigado--res mencionados, la transformación neoplásica se acompaña habitualmente de un aumento en la carga negativa de la superficie celular, probablemente debida a un aumento en la cantidad de ácido siálico superficial, es hasta cierto punto desconcertante el que nosotros encontremos que la concentración de ácido siálico en la secreción vaginal de pacientes con cáncer cérvico uterino diagnosticado por histopatología, esté disminuída cuando se compara con los casos de pacientes normales. Cabe mencionar que la disminu--ción de ácido siálico en las secreciones vaginales de las pacientes estudiadas, presenta una desviación estandar importante y que el grupo de pacientes estudiado fue peque--ño.

Puesto que los casos estudiados por nosotros repre--sentan uno de los estadios más iniciales en la evolución de los tumores que es posible estudiar en el hombre, la disminución del ácido siálico en los casos de cáncer cérvico uterino indicaría:

- 1o. que la alteración de la carga superficial no es un fenómeno inicial en la evolución neoplásica
- 2o. que el aumento en la carga negativa superficial presente en las células neoplásicas (65, 66, 67) podría ser debido a otro u otros compuestos además del ácido siálico, o bien,
- 3o. recientemente Grimes (82) ha encontrado que en las células transformadas por virus, la cantidad de ácido siálico en la membrana, disminuye significativamente. Este hecho, en relación con nuestros hallazgos sería una interesante demostración de la posible participación viral en la etiología de los tumores.

Aunque de nuestros resultados no se pueden obtener conclusiones definitivas si son de utilidad para tratar de comprender las modificaciones de la transformación neoplásica.

BIBLIOGRAFIA

1. W. Schiller., Surg. Gyn. & Obstet. 56: 210 (1933)
2. P.A. Young., Obst. & Gynecol. 10: 459 (1957)
3. W.R. Douglas., Brit. J. Cancer. 17: 415 (1963)
4. A. Bernal., Tésis Profesional, Fac. Med. U.N.A.M. (1967).
5. Martínez-Alvarez, G., Gallegos, V., y Ordoñez, R. Boletín Med. I.M.S.S. 6: Supl. 51 (1964)
6. Burton, K. J. Biochem. 62: 315 (1956)
7. Giles, K.W. Nature 206: 93 (1965)
8. Fujita, A., and Aoyama, M. J. Biochem. (Tokyo) 38: 271 (1951)
9. Bern, H.A., and Laurence, D.J. Eds. E.O. Butcher and R.F. Sognaes. Publ. No.70. Am. Assoc. Adv. Sc. (1962)
10. Evans, H.M., and Bishop, K.S. Anat. Rec. 23: 17 (1922)
11. Fell, H.B., and Mellamby, E. J. Physiol. London 119: 470 (1953)
12. Hicks, R.M. J. Ultrastruct. Res. 22: 206 (1968)
13. Hohlweg, W. Klin. Wschr. 29: 193 (1951)
14. Kahn, R.H. Am. J. Anat. 95: 309 (1954)
15. Lasnitzki, F. Int. Rev. Cytol. 7: 79 (1958)
16. Polliack, A., and Levij, I.S. Oncology 22: 129 (1968)
17. Reiter, R.J. Experientia 21: 207 (1965)
18. Rothberg, S. J. Invest. Derm. 49: 35 (1967)
19. Salley, J.J., and Brysan, W.F. J. Dent. Res. 36: 935 (1928)
20. Wolbach, S.B., and Howe, P.P. Archs. Path. 5: 239 (1928)

21. Potter, V.P. Cancer Res. 24 (7): 1085 (1964)
22. Foraker, A.G., and Denham, S.W. Tex. Rep. Biol. Med. 11: 643 (1953)
23. Amer. J. Obst. Gyn. 74: 131 (1957)
24. Foraker, A.G., and Marino, G. Amer. J. Obst. Gyn. 72: 400 (1956)
25. Widy, K., and Kierski, J. Acta Cytol. (Philadelphia) 11: 231 (1957)
26. Bejdl, J.W. Z. Zellforsch. 40: 389 (1954)
27. Henry, J.S., and Latour, J.P.A. Amer. J. Obst. Gyn. 74: 610 (1957)
28. Hopman, B.C. Amer. J. Obst. Gyn. 79: 346 (1960)
29. Nogales-Ortiz, F., and Botella Llusia, J. Arch. Gynaek. 192: 450 (1959)
30. Arch. Gynaek. 192: 644 (1960)
31. Sora, P. Zentralbl. Gynak. 83: 213 (1961)
32. Moschino. Zentralbl Gynak. 83: 213 (1961)
33. Furaker, A.G. Rev. Franc. Gynec. Obstet. 54: 421 (1959)
34. Pederson, N.D., and Pominerenke, W.T. Fertil. Steril. 1: 527 (1950)
35. Kasdon, S.C., Romsey, R., Hamburger, F., and Fishman, H.W. Am. J. Obst. Gynec. 61: 1142 (1951)
36. Lauge, P. Copenhagen. Munksgarsd 1960, pp.40
37. Ashley, D.J.B. J. Obst. Gynecol. (Brit) 73: 372 (1966)
38. Younge, P.A. J. Obstet. Gynecol. (Brit) 72: 9 (1965)
39. Rudman, D., Ralph, V.W. Cancer Res. 31: 1159-1165 August (1971)

40. Hans Nevrath (ed) The Proteins 2nd. Ed. Vol.III and IV Academic Press. New York and London (1965)
41. Glick, M.C. Biochem. Biophys. Acta. 219: 290-300 (1970)
42. Rajalakshin, M., Prasad, M.R.N., and Mohla, S. Steroids 14: 47-54 (1969)
43. Coppola, J.A., and Ball, J.L. Steroids 8: 345 (1966)
44. Carlborg, L. Acta Univ. Upsala 74: 1-16 (1969)
45. DeLuca, L. Cancer Vol.50, No.5 1326-1331 Nov (1970)
46. Lasnitzki, I. Exptl Cell Res 24: 37 (1961)
47. Goldblatt, H. Exptl Med. 46: 699-707 (1927)
48. Mauligit, G. J. Reprod. Fert. 22: 331-333 (1970)
49. Hoss, S., and Udenfriend, S. J. Pharmacol. Exptl Therap. 127: 175 (1959)
50. Warren, L. J. Biol. Chemistry. 234: 1971-1975 (1959)
51. Sora, P. Amer. Obst. Gynec. 77: 1061) (1955)
52. García-Hernández, A. Rev. Esp. Obst. & Gineco. 18: 25 (1959)
53. Mangleno, J.J. Arch. Gynak. 194: 586 (1961)
54. Velázquez, A. Tesis Profesional Esc. Ciencias Químicas Univ. Guanajuato, Gto. (1967)
55. González, M. J. Acta Ginec. (Madrid) 12: 399 (1961)
56. Bollag, W., Schweiz, Med. Wschr. 101:11-17 (1971)
57. Watkins, W.M., Science, 152: 172 (1966)
58. Muramatsu, T., and S.G. Nathenson, Biochem. Biophys. Res. Comm., 38: 1 (1970).

59. Kathan, R.H., Winzler, R.J., J. Exptl. Med. 113: 37 (1961)
60. O'Neill, C.H., J. Cell. Sci. 3: 405 (1968)
61. Hakamori, S., and Murakami, W.T. Proc. Natl Acad. Sci. U.S. 59: 254 (1968)
62. Mora, P.T., Brody, R.O., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 63: 1290 (1969)
63. Wu, W.C., Meezan, E., Biochemistry 8: 2509 (1969)
64. Gornal, A., Bardawill, Ch., J. Biol. Chem. 177: 751-776 (1949)
65. Proceedings of the Seventh Canadian Cancer Research Conference, Honey Harbour, Ontario, 1966 Vol.7 Pergamon Press.
66. Forrester, J.A., and Brent, T.I In Press, (1966)
67. Doljanski, F., and Eisenberg, S. Cell Electrophoresis (Ed E.J. Ambrose) J & A Churchill, London (1965) p.79
68. Bollag, W. Experientia 27: 90-92 (1971)
69. Wheeler, P., and Morgan, A.F. J. Nutr. 64: 137 (1958)
70. Westall, R.G. In Amino Acid Poole (J.T. Holden, ed) Elsevier, New York.
71. Sriver, C.S., and Davies, E. Pediatrics 36: 592 (1965)
72. Berl, S., and Purpura, D.P. J. Neurochem. 10: 237 (1963)
73. Agrawal, H.C., Davis, J.H., J. Neurochem. 13: 607 (1966)
74. Oja, S.J., and Piha, R.S. Life Sci. 5: 865 (1966)
75. Munro, H.N. In mammalian Protein Metabolism Vol.II p.267 (H.N. Munro and J.B. Allison, eds) Academic Press, New York.
76. Malathi, P., Sastry, P.S. J. Nature 189: 660 (1961)
77. Christensen, H.N., and Lynch, E.L. J. Biol. Chem.

78. Ginter, E. Csl. Gastroent. V y 2. II, 329 (1957)
 79. Rangeneker, P.V., and Dugal, L.P. Can. J. Biochem. Physiol. 36: 25 (1958)
 80. Schonheyder, F., and Lyngbye, J. Brit. J. Nutr. 16: 75 (1962)
 81. Betheil, J.J., Freigelson, M. Biochem. Biophys. Acta 104: 92 (1965)
 82. Grimez, W.J. Biochem. Vol.12, No.5, 990-996 (1973)
 83. Stein, W., and Moore, S. J. Biol. Chem. 211: 915 (1954)
 84. Tallan, H.H., Moore, S., and Stein, W. J. Biol. Chem. 211: 927 (1954)
 85. Van Slyke, D.D., and Meyer, G.M. J. Biol. Chem. 16: 197, 213, 231 (1913)
 86. Herbert, J.D., Coulsan, R.A., and Hernández, T. Comp. Biochem. Physiol. 17: 583 (1966)
-