



80  
2ej

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**

VARIACIONES DE LAS ESTRUCTURAS  
RIBONUCLEOPROTEICAS Y DE  
LA CROMATINA EN CELULAS  
EPITELIALES CERVICO-UTERINAS  
CON DIFERENTES GRADOS  
DE CANCERIZACION

**TESIS**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**BIOLOGA**  
PRESENTA  
ANGELICA GONZALEZ OLIVER

DIRECTOR DE TESIS  
OLGA M. ECHEVERRIA

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D.F. 1993.



## **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 está 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.

## INDICE

RESUMEN .....	1
I. INTRODUCCION .....	2
I.1. Cáncer de Cérvix .....	2
I.2. Displasias .....	3
I.3. Carcinoma "in situ" .....	4
I.4. Cáncer invasor .....	5
I.5. Origen histológico del cáncer cérvico-uterino .....	6
I.6. Factores que se relacionan con el cáncer de cérvix .....	7
I.7. Análisis citológicos relacionados con cáncer de cérvix .....	8
I.8. Núcleo interfásico .....	8
I.9. Núcleo canceroso .....	16
II. OBJETIVOS .....	20
III. HIPOTESIS .....	21
IV. MATERIAL Y METODO .....	22
V. RESULTADOS .....	26
VI. DISCUSION .....	35
VII. CONCLUSIONES .....	39
VIII. REFERENCIAS .....	40

## RESUMEN

Se estudió la ultraestructura del núcleo celular interfásico del epitelio cérvico-uterino normal humano y en diferentes grados de malignización (displasia de distintos grados leve, moderada y severa; carcinoma "in situ"; cáncer microinvasor y cáncer invasor).

Se procesaron pequeñas muestras de biopsias obtenidas de pacientes a quienes fué diagnosticado por microscopia óptica cáncer cérvico-uterino en diferentes etapas de malignización las cuales fueron incluidas en resinas epóxicas y acrílicas. Se utilizaron cortes semifinos para determinación de volumen nuclear por métodos morfométricos y cortes ultrafinos contrastados por la técnica convencional para microscopia electrónica (acetato de uranilo-citrato de plomo) y las tinciones preferenciales para 1) ribonucleoproteínas, descrita por Bernhard (1969) y 2) cromatina, descrita por Vázquez-Nin et al. (1973).

Los resultados muestran que los núcleos del epitelio normal son muy semejantes en su organización ultraestructural general al de los núcleos de los distintos estadios pero difieren por presentar:

- 1) invaginaciones de la membrana nuclear ocasionando lobulaciones profundas;
- 2) numerosos cuerpos espiralados y estructuras parecidas a cuerpos nucleares;
- 3) abundantes inclusiones citoplasmáticas.

Se concluye que existe: a) una marcada relación entre volumen nuclear y grado de malignización y b) en el cáncer invasor dos poblaciones celulares: una población indiferenciada caracterizada por núcleos con baja densidad de gránulos pericromatinianos y cromatina compacta y una población diferenciada que presenta núcleos con alta densidad de gránulos pericromatinianos y cromatina compacta.

## I. INTRODUCCION

Las alteraciones celulares que se presentan en las displasias pueden revertir en etapas tempranas espontáneamente y cuando el estímulo inductor es eliminado. En estados avanzados cuando el estímulo cancerígeno sobrepasa cierto umbral, los cambios citológicos representan una verdadera neoplasia (este término significa literalmente neoformación), las neoplasias se originan debido a la pérdida de los controles normales de proliferación, pues las células neoplásicas siguen dividiéndose, olvidando al parecer los mecanismos reguladores que rigen el crecimiento celular normal, se les considera como proliferaciones celulares irreversibles que compiten con las células y los tejidos cercanos normales para obtener sus requerimientos metabólicos (Robbins 1990).

Es muy importante en oncología la diferenciación entre neoplasias benignas y malignas. Se dice que un tumor es benigno cuando los caracteres citológicos y macroscópicos se consideran inocuos, lo cual significa que seguirá localizado, no puede propagarse a otros sitios y en consecuencia, suele ser susceptible de extirpación quirúrgica local y permite la supervivencia del enfermo. Los tumores malignos se denominan en conjunto "cáncer" que proviene de la palabra latina "cancerum"; se llama así porque se adhiere a cualquier sitio al que se ha sujetado de manera obstinada como el cangrejo (Robbins 1990).

### II. CANCER DE CERVIX

El cáncer cérvico uterino (CaCu) es un problema a nivel mundial y la incidencia de esta enfermedad varía en diferentes partes del mundo, siendo mucho mayor en los países socioeconómicamente subdesarrollados (Peto 1986). En estos países es el tumor más frecuente en la población (24 %) (Peto 1986).

En México el CaCu es un problema de salud muy importante, sin embargo, su conocimiento se basa en las estadísticas de mortalidad (Verduzco et al. 1986), es más

frecuente que el cáncer de mama y ocupa el primer lugar en frecuencia de los casos totales de cáncer (Guerra Gómez et al. 1990). Es más importante en algunos estados de la república que en otros; ésta situación se puede explicar porque la disponibilidad de los recursos para tratamiento no es uniforme y por las diferencias en la estructuración de la población (Zalce et al. 1975) En el Distrito Federal es el tumor con mayor incidencia y mortalidad (Guerra Gómez et al. 1990 y Beltrán Ortega 1990).

## I.2. DISPLASIAS

La mayoría de los cánceres invasores tienen estadios precursores identificables morfológicamente como alteraciones en el citoplasma y núcleo, el término médico que se usa para designar este tipo de alteraciones es displasia, la cual se observa principalmente en epitelios en donde las células presentan pleomorfismo consistente en la variación del tamaño y forma celular. A menudo poseen núcleos que se tñen intensamente con las técnicas para microscopía óptica y demasiado voluminosos para el tamaño de la célula, incremento en el número de mitosis y alteraciones en la arquitectura tisular (polaridad) (Scully 1981; Robbins 1990). Las displasias se establecen en grados: leve, moderada y severa (Robbins 1990). Las displasias evolucionan asintóticamente; se presentan comunmente con otros procesos patológicos benignos como cervicitis, ulceraciones de cuello, poliposis, formaciones quísticas etc. los cuales si suelen producir síntomas.

La displasia del cérvix uterino como lesión precursora de transformación neoplásica maligna tiene varios cursos por seguir: puede suceder que estas alteraciones en la diferenciación celular reviertan a la normalidad, persistan o progresen a carcinoma "in situ" y posteriormente a carcinoma invasor.

Fu y colaboradores en 1981 encontraron que las células displásicas con patrón euploide y poliploide en su mayoría (91 %) revierten a la normalidad y raramente persisten, a diferencia de aquellas células con distribución aneuploide del DNA que en un 81 % persisten como neoplasia intraepitelial o carcinoma "in situ" y en un porcentaje 12 % progresan hacia carcinoma invasor (Fu et al. 1981).

**DISPLASIA LEVE.**- Es una lesión bien diferenciada que se caracteriza por la aparición de células atípicas en las capas basales del epitelio escamoso, con conservación de la

diferenciación celular normal en las capas mas superficiales. Las células atípicas muestran aumentos de las imágenes mitóticas, pérdida de la polaridad, núcleos notables y algo de pleomorfismo (Robbins 1990). Figura 1.

**DISPLASIA MODERADA.**- Es considerada una lesión intraepitelial indiferenciada; existe un número mayor de células atípicas y una desorganización estructural del epitelio cada vez más pronunciada (Scautres 1981). Figura 1.

**DISPLASIA SEVERA.**- Se caracteriza por la malignización progresiva de mayor número de las capas del epitelio (Robbins 1990). Figura 1.

### I.3. CARCINOMA "IN SITU"

El carcinoma del cuello uterino surge como un proceso sucesivo en muchas etapas, se ha comprobado transición de displasia a carcinoma "in situ" (Robbins 1990).

El término de carcinoma "in situ" ( Broders 1932) o intraepitelial (Galvin y Te Linde 1949) dió lugar a serias controversias de definición. Existe un acuerdo que cuando todo el grosor del epitelio es substituido por células atípicas y cuando hay pérdida completa de la diferenciación celular ordenada, la lesión se llama carcinoma "in situ" (Robbins 1990). (Ver Figura 1). Hasta esta etapa de la evolución del cáncer cervical, las lesiones precursoras se circunscriben al epitelio y se conserva la integridad de la membrana basal. Las alteraciones citohistológicas propias del carcinoma "in situ", que sirven para su identificación al microscopio óptico son: anaplasia este término procede de Hansemann y fué utilizado por dicho autor para designar los fenómenos de desdiferenciación celular que con frecuencia se observan en el cáncer. Las células adquieren un alto grado de inmadurez que es parecido al estado embrionario, por lo que es prácticamente imposible de reconocer en ellas el menor vestigio anatómico y funcional, del tejido que les diera origen (Hansemann 1893). Las células anaplásicas muestran gran variación en su forma y tamaño, este pleomorfismo excede del que se observa en las células displásicas

(Balanguero 1971). El cociente núcleo-citoplasma puede acercarse a 1:1 en lugar de la cifra normal 1:4 o 1:6. Los núcleos anaplásicos son variables en forma y tamaño, son voluminosos, con frecuencia múltiples o polilobulados provistos de gran densidad cromática condensada, al lado de los núcleos anormales por su forma y tamaño pueden observarse otros modificados en menor grado (anisonucleosis). Los nucleolos a menudo son grandes, varían de forma y generalmente hay un aumento del número de estos (Balanguero 1971). Existe un número excesivo de mitosis atípicas y pueden presentarse en las capas más superficiales del epitelio (Schultz 1957).

En el carcinoma "in situ" el epitelio se encuentra distorsionado en su estructura, las células anaplásicas no muestran orientación pues existe una irregularidad arquitectónica que afecta a todos los estratos del epitelio. Uno de los rasgos más sobresalientes es la falta de maduración (Balanguero 1971).

La tendencia de los elementos jóvenes a madurar desaparece; lo que sucede es que los elementos celulares conservan, aún en las capas más superficiales una indiferenciación, por lo que todo el grueso del epitelio se muestra entonces como formado por una sola capa, poco diferenciada, de aspecto basal (Balanguero 1971). Algunos autores consideran que el carcinoma "in situ" puede presentar diversos grados de maduración histológica (Nesbitt y Stein, 1958; Nieburgs 1963; Wielenga et al. 1965; Atkin et al. 1967).

Reagan y Hicks en 1953 (en Balanguero 1971) describen dos modalidades del carcinoma in situ, una compuesta por células de tipo pequeño y otra integrada por células de tipo grande.

El carcinoma in situ puede progresar a carcinoma invasor pero es una evolución muy lenta que puede necesitar muchos años, quizá más de 10 para salir de los confines de la membrana basal (Robbins 1990).

El carcinoma in situ es una lesión que puede ser erradicada por completo por métodos sencillos como biopsia, tratamientos farmacológicos, etc. (Balanguero 1971).

#### I.4. CANCER INVASOR

Algunos autores consideran que la evolución del cáncer cervical es completa cuando las células neoplásicas invaden los tejidos subepiteliales por infiltración a través de la membrana basal; se conoce con el nombre de cáncer microinvasor cuando esta infiltración no excede de 0.5 mm y cuando sobrepasa este margen recibe el nombre de carcinoma



invasor del cuello uterino, que se desarrolla a partir de la displasia por un proceso muy lento que se torna progresivamente menos reversible conforme el epitelio es substituido por células atípicas (Robbins 1990). (Figura 1).

El carcinoma invasor adopta tres formas histológicas; la más frecuente es el tumor fungiforme que comienza con el engrosamiento nodular en el epitelio; la segunda es la forma ulcerada y la menos frecuente es la infiltrante que tiende a penetrar al estroma subyacente (Robbins 1990).

En etapas avanzadas hay malignización a los ganglios linfáticos con metástasis a distancia que suelen afectar pulmones, huesos e hígado. Otra forma de diseminación del cáncer es cuando el tumor invade el tejido vecino afectando a ligamentos y vasos. Una tercera forma de diseminación es la hematogena en donde las células tumorales tienen la capacidad de iniciar nuevos crecimientos a distancia (Robbins 1990).

Existe un sistema de clasificación en periodos que se basa unicamente en la extensión del tumor primario sin referirse a ataque ganglionar ni metástasis (Robbins 1990).

## I.5. ORIGEN HISTOLOGICO DEL CANCER CERVICO-UTERINO

En la zona de transición de la vagina y el útero la disposición de las células cambia. En la vagina el epitelio consta de varias capas (estratificado), en el cual las células a medida que se acercan a la superficie se aplanan, pierden el núcleo y son desprendidas en forma de escama. En la transición al útero la disposición y forma de las células cambia, se alargan y disponen en columnas, este epitelio columnar tiene un espesor de una o dos células por lo que las células de la superficie no sufren la muerte celular rápida que se da en el epitelio estratificado (Ham y Cormack 1986).

El carcinoma del cuello uterino suele comenzar en la zona que corresponde al límite entre el epitelio estratificado y cilíndrico (Robbins 1990).

Existen dos tipos de cáncer cérvico-uterino que derivan de las dos clases de epitelio que recubren el cuello; del epitelio estratificado, que recubre la cara externa y el último tercio del canal cervical, se originan carcinomas del tipo epidermoide llamados también de células escamosas; del epitelio cilíndrico, que recubre los dos tercios internos del canal cervical, se origina el carcinoma de células cilíndricas que al crecer toma aspecto glandular y se denomina adenocarcinoma (Robbins 1990).

## I.6. FACTORES RELACIONADOS CON EL CANCER DE CERVIX

Estudios epidemiológicos han relacionado ciertos factores como: la promiscuidad sexual, inicio temprano de actividad sexual y pobre higiene entre otras, con carcinoma de cérvix (Meisels et al. 1981; Rapp y Jenkins 1981). Diversos virus han sido propuestos como agentes infecciosos asociados al cáncer cérvico uterino, principalmente el virus del herpes simple tipo II y más recientemente los papilomavirus humanos (Rapp y Jenkins 1981). Sin embargo han surgido evidencias experimentales que indican que el virus del herpes no es el principal factor etiológico del cáncer cérvico uterino (Rapp y Jenkins 1981; Gariglio y García 1990).

El virus del papiloma humano ha adquirido un lugar de gran importancia en la actualidad (Meisels et al. 1981; Rapp y Jenkins 1981; Howley 1986; Zur Hausen 1981; Shevchuk et al. 1982), fundamentalmente debido a la utilización de técnicas de Biología Molecular, la clonación del genoma viral y la hibridización "in situ" de ácidos nucleicos que han permitido proponer una relación estrecha entre infección viral, displasia y cáncer (Howley 1986).

La primera evidencia concreta que relacionó al virus del papiloma humano con el cáncer cervical, provino del reconocimiento de que cambios morfológicos previamente interpretados en citología exfoliativa y biopsia como displasia, eran alteraciones debidas a infección por papilomavirus (Howley 1986).

## I.7. ANALISIS CITOLOGICOS RELACIONADOS CON EL CANCER DE CERVIX

Existe una disminución en la frecuencia de carcinoma del cuello uterino atribuible en gran medida al análisis citológico de Papanicolau, el cual permite un diagnóstico temprano y por consiguiente un tratamiento curativo de las pacientes.

El diagnóstico se basa en el estudio de dos frotis; uno obtenido del fondo del saco vaginal posterior, necesario para el diagnóstico funcional y otro del cuello uterino que ayuda al estudio complementario de las alteraciones tisulares (Robbins 1990).

La prueba de Schiller es indicativa de anomalías celulares las cuales posiblemente puedan causar cáncer. Se funda en el hecho de que las células atípicas presentan agotamiento del glucógeno; se pinta el cuello uterino con una solución de yodo y yoduro potásico; el epitelio normal se tiñe de pardo, en tanto que el foco canceroso permanece sin teñir (Robbins 1990).

Recientemente se está empleando cada vez más la colposcopia; la cual brinda un panorama bien iluminado y amplificado del cuello uterino, para descubrir displasia y lesiones in situ; también es útil para elegir áreas con el fin de efectuar biopsia (Robbins 1990).

## I.8. NUCLEO INTERFASICO

Los estudios realizados en el campo de la microscopía electrónica y la bioquímica han ayudado al conocimiento de los elementos que constituyen el núcleo celular en interfase.

Desde los estudios de Monneron y Bernhard en 1969 se sabe más sobre los componentes de los núcleos en interfase, puesto que además de conocer la estructura y función de la membrana nuclear, la cromatina y el nucleolo, prácticamente se inicia el estudio morfofuncional de otras estructuras nucleares, sobresaliendo lo referente a las partículas de

ribonucleoproteínas; Bernhard diseñó una técnica que permitió contrastar preferencialmente las partículas ribonucleoproteicas intranucleares sin la superposición de la cromatina (Bernhard 1969). Cogliati y Gautier en 1973 diseñaron una técnica que permitió contrastar preferencialmente la cromatina sin la superposición de las ribonucleoproteínas; Peters y Giese en 1971 y Moyne en 1972 obtienen un contraste específico para la cromatina; posteriormente Vázquez-Nin y cols. también diseñan un método preferencial para la cromatina, el cual es utilizado en el presente trabajo para contrastar los núcleos de las células cérvico-uterinas (Vázquez-Nin et al. 1973).

En todas las células eucariontes el núcleo celular en interfase presenta una envoltura nuclear que consiste de dos membranas fosfolipídicas de 5 a 7 nm de grosor, separadas por un espacio de 10 a 15 nm aproximadamente conocido como espacio perinuclear (Dupraw 1971). La membrana externa es continua con el retículo endoplásmico (Newport y Forbes 1987) y posee ribosomas que realizan la síntesis proteica. La membrana interna está en contacto con la lámina nuclear y la cromatina (Alberts et al. 1983). La envoltura nuclear actúa protegiendo al nucleoplasma de partículas y grandes moléculas que se hallan en el citoplasma (Alberts 1983) y separa los procesos de la transcripción y de la traducción (De Robertis y De Robertis 1983). Las envolturas nucleares presentan poros nucleares. Cada uno de los cuales está rodeado por una estructura discoidal llamada anillo que junto con el poro forman el complejo del poro; estos complejos tienen forma circular de 70 a 80 nm de diámetro, revestido por 3 anillos. Cada uno de estos anillos está compuesto de 8 subunidades embebidas en una matriz (Alberts et al. 1989). La parte central del poro es el canal principal por el que circulan las moléculas hidrosolubles entre el núcleo y el citoplasma (Green 1982). Adherida a la cara interna de la membrana interna de la envoltura nuclear se encuentra la lámina nuclear la cual es una estructura fibrosa que tiene un espesor de 50 a 80 nm, contiene proteínas específicas que forman los poros en la envoltura nuclear (Alberts et al. 1983). Se cree que desempeña un papel importante en la organización de la envoltura nuclear y en mantener la cromatina condensada e inactiva en la periferia separándola de la activa (Newport y Forbes 1987). Distribuido en todo el núcleo está la matriz nuclear formando una red de proteínas no histónicas. Este armazón presenta asociación estrecha con la lámina densa y los poros (Berezney 1979). Esta estructura puede extraerse con detergentes, nucleasas y altas concentraciones de sales. Además de estas estructuras en el núcleo interfásico se presentan complejos de ácidos nucleicos y proteínas, como son la cromatina y las ribonucleoproteínas.

## **Cromatina**

Complejo compuesto por ácido desoxirribonucleico (DNA), histonas y proteínas no histónicas. La unidad fundamental de empaquetamiento de la cromatina es el nucleosoma, el cual es una estructura aplanada en forma de disco que confiere a la cromatina la apariencia de cuentas de collar de 11 nm de diámetro y 5.7 nm de altura que se encuentran unidos entre si por un filamento de DNA (Avers 1987) .

Se ha propuesto que cada cuenta nucleosómica posee un conjunto de 8 moléculas de histona, 2 copias de cada una de las 4 histonas altamente conservadas, H2A, H2B, H3 y H4. Estas moléculas forman un núcleo proteico alrededor del cual se enrolla el fragmento de ADN de doble hebra, de una longitud de 140 pb (Alberts et al. 1983). Cada cuenta está separada de la siguiente por una región de ADN espaciador, que posee aproximadamente 60 pb. El nucleosoma contiene aproximadamente 200 pb de ADN (Alberts et al. 1983). Cuando es ligeramente dispersado, se observan al microscopio electrónico las fibras de 30 nm. Se requiere de la histona H1 para el plegamiento de las cadenas de nucleosomas, ya que esta estructura es estabilizada por interacciones entre dichas histonas en nucleosomas adyacentes (Avers 1987).

Las proteínas que se unen al DNA de eucariontes se clasifican en dos grupos: a) las histonas.- Se encuentran en gran cantidad, son cortas y básicas ya que contienen entre 10 y 20 % de los aminoácidos lisina y arginina, cargados positivamente por lo que se unen fuertemente al DNA. Existen cinco tipos de histonas: H1,H2A,H2B,H3 y H4 (Avers 1987), las cuales tienden a asociarse entre sí, las H2A y H2B forman dímeros en tanto que H3 y H4 forman tetrámeros (Gariglio 1987). Las histonas H2A y H2B son relativamente ricas en lisina, las histona H3 y H4 son ricas en arginina. Estas son semejantes entre las diversas especies y se encuentran entre las más conservadas de todas las proteínas conocidas. Las histonas H1 son muy ricas en lisina y no son conservadas entre las especies e incluso presentan formas específicas para diversos tejidos. Tienen la función de empaquetar al nucleosoma en fibras de 30 nm; cada molécula presenta una porción central globular y dos brazos extendidos, la porción central se une al nucleosoma y los brazos se extienden cubriendo el DNA espaciador (Alberts et al. 1983). b) proteínas no histónicas.- Este término involucra miles de proteínas diferentes con funciones muy diversas. En ellas se incluyen por ejemplo a: RNA polimerasa, DNA polimerasa, helicasas, topoisomerasas, etc. y una gran cantidad de proteínas regulatorias (De Robertis y De Robertis 1983). Estas

proteínas se encuentran en cantidades muy reducidas y algunas de ellas influyen en rasgos estructurales como la transcripción y replicación genética (Alberts et al. 1983).

Hay dos categorías principales de cromatina según el estado de condensación. La forma compacta, llamada heterocromatina desde 1928 por Heitz (en Avers 1987), quien observó que permanecía condensada durante la interfase y la forma no condensada llamada eucromatina la cual se extiende y distribuye laxamente en el núcleo interfásico.

En la mayoría de los núcleos en interfase, la cromatina compacta se observa a lo largo de la pared interna de la cubierta nuclear, asociada a los nucleolos y en forma de grumos dispersos en el nucleoplasma (Comings 1968; Monneron y Bernhard 1969; Brasch y Setterfield 1974).

Los estudios autorradiográficos y bioquímicos han demostrado que durante el ciclo celular las regiones heterocromáticas de los cromosomas se replican más tarde que las regiones eucromáticas además de ser consideradas transcripcionalmente inactivas. La eucromatina es transcripcionalmente activa, principalmente en la región adyacente a la zona pericromatiniana (Alberts et al. 1983).

La heterocromatina puede ser facultativa o constitutiva. Esta última forma siempre está condensada y aparece en todos los tipos celulares y puede localizarse en centrómeros en la mayoría de plantas y animales, y en telómeros sobre todo de vegetales (De Robertis y De Robertis 1983). Puede tener un papel estructural en los cromosomas. La cromatina facultativa también es inactiva en cuanto a la transcripción; sin embargo, solo se condensa en ciertos tipos celulares o en momentos del desarrollo (Alberts et al. 1983).

## **RIBONUCLEOPROTEINAS**

### **Nucleolo**

El nucleolo es una estructura ribonucleoproteica nuclear conspicua, que se presenta como un cuerpo compacto o presentando una configuración nucleolonemal con fibras y granos, y rodeado de cromatina perinucleolar. Mc Clintock (1934) demostró que el nucleolo está asociado con un locus cromosómico específico, al que llamó cuerpo organizador del nucleolo. Su función es la síntesis y procesamiento del RNA-pre-ribosómico (pre-rRNA) y el ensamblaje de los ribosomas (En Jiménez-García 1988).

Las micrografías electrónicas de cortes finos celulares han ayudado a reconocer en la estructura del nucleolo diversos componentes:

a) Los centros fibrilares.- contienen fibras de aproximadamente 50 Å de espesor, probablemente pertenezcan a la cromatina de los organizadores nucleolares (NORs). Contienen RNA polimerasa 1 encargada de transcribir el rDNA; además proteínas de la región nucleolar que se tiñen con técnicas de plata (proteínas Ag-NOR). Son ricos en las proteínas nucleolares fibrilarina y la fosfoproteína C23 y puede ser que en los confines de estos sitios ocurra la transcripción muy temprana del pre-rRNA (En Jiménez-García 1988).

b) Región fibrilar densa.- compuesta de fibras muy abundantes de 40 a 80 Å de espesor. Contiene proteínas Ag-NOR, fibrilarina y las fosfoproteínas C23 y B23. Probablemente representa el sitio con la actividad transcripcional mas abundante y del procesamiento temprano del pre-rRNA (En Jiménez- García 1988).

c) Región granular.- está constituida por gránulos de 150 a 200 Å de diámetro, es abundante en la fosfoproteína B 23 y productos intermedios del procesamiento del precursor pre-rRNA. Es el sitio de procesamiento mas tardío, maduración y ensamblado de los RNA pre-ribosómicos (En Jiménez-García 1988).

d) Los constituyentes fibrilares y granulares del nucleolo conforman una red fibrilar gruesa conocida como nucleolonema, compuesto por las fibras de 40 a 80 Å de espesor y 200 a 400 Å de longitud, y de los gránulos de 150 a 200 Å de diámetro (En Jiménez-García 1988).

### Fibras Pericromatinianas

Monneron y Bernhard en 1969 describen a las fibras pericromatinianas (FPC), las cuales presentan forma irregular, diámetro variable entre 30 a 50 Å, son fácilmente destruidas por RNasa, se localizan en la superficie de la cromatina condensada y son alteradas por efectos químicos (Monneron y Bernhard 1969).

Las drogas que inhiben la síntesis de hnRNA disminuyen el número de FPC, es el caso de la bleomicina que es un glucopentapéptido aislado de *Streptomyces verticillus* que altera la transcripción nucleolar y extranucleolar (Vázquez-Nin et al. 1979) y el ribósido de diclorobenzimidazol (DRB), análogo de la adenosina.

Las drogas que estimulan la síntesis de RNA aumentan el número de FPC es así como la acción de la cortisona en ratas en ayuno y después de ser realimentadas da como resultado un incremento en las FPC (Petrov y Bernhard 1971).

Con estudios autoradiográficos y citoquímicos se demuestra que la transcripción del hnRNA es llevada a cabo en el borde de la cromatina densa y que las FPC son las primeras estructuras RNP marcadas en el área extranucleolar del núcleo celular interfásico en mamíferos (Puvion y Moyne 1978).

Se sugiere que las fibras contienen RNA heterogéneo nuclear unido a proteínas formando las estructuras ribonucleoproteicas (RNP) relacionadas con el borde de la cromatina densa (Puvion y Moyne 1978). Monneron y Bernhard propusieron que las FPC representan la expresión morfológica de la transcripción (Monneron y Bernhard 1969). Progresivamente, una parte de las fibras migran hacia el espacio intercromatiniano donde se entremezclan con cromatina dispersa (Fakan y Bernhard 1973).

### Gránulos Pericromatinianos

Los gránulos pericromatinianos (GPC) fueron descritos por primera vez por Watson en 1962 en hepatocitos de ratón y rata. Se encuentran en todos los núcleos de las células de mamíferos donde han sido visualizados con el microscopio electrónico (Monneron y Bernhard 1969). Utilizando la técnica regresiva del EDTA; se observan como cuerpos esféricos de 300 a 500 Å de diámetro, rodeados por un halo claro de aproximadamente 250 Å de espesor. Se localizan en la periferia de la heterocromatina compacta. Son estructuras densas a los electrones. Están formados por fibras de entre 10 y 30 Å de grosor (Monneron y Bernhard 1969). Su posible función así como su composición han sido muy estudiadas.

En condiciones fisiológicas normales los GPC aparecen rara vez agrupados, pero se ha observado que alterando el estado fisiológico de las ratas con la administración de cicloheximida, los GPC del núcleo de hepatocitos aparecen mas bien agrupados que distribuidos azarosamente en el nucleoplasma (Moyne et al. 1977).

Vázquez-Nin y Bernhard en 1971 estudiaron las similitudes estructurales entre GPC y los gránulos de los anillos de Balbiani de los cromosomas gigantes de *Chironomus thummi* utilizando varias técnicas citoquímicas y autorradiográficas. Ellos observaron que presentan propiedades citoquímicas comunes; los gránulos de Balbiani pueden ser vistos atravesando el poro nuclear hacia el citoplasma en forma de bastones (Vázquez-Nin y Bernhard 1971); es raro encontrar a los GPC cerca del nucleoporo pues pierden contraste y parecen ser deshilachados pasan y en forma de fibras (Monneron y Bernhard 1969).



En el proceso de formación de los gránulos de Balbiani y los GPC están involucradas fibras pericromatinianas, asociadas a la superficie de la cromatina condensada (Vázquez-Nin et al. 1979; Vázquez-Nin et al. 1979). Se sugiere que los GPC se forman por el enrollamiento de las fibras pericromatinianas durante el proceso de transcripción y que corresponden a formas de almacenamiento del hnRNA (pre-mRNA) recién sintetizado (Vázquez-Nin y Bernhard 1971).

Variaciones en el número de gránulos pericromatinianos observadas bajo condiciones fisiológicas, de stress o agresión a las células. Es decir, el número de GPC se incrementa después de la administración de ciertas drogas en células de mamíferos. Monneron y Bernhard en 1969 demostraron que la lasiocarpina, la aflatoxina, o la actinomicina D administradas a ratas a concentraciones que bloquearan la síntesis ribosomal pero no la síntesis de RNAm daba como resultado un incremento de los GPC (Daskal 1981).

La bleomicina, que también altera el procesamiento y/o transporte del RNA hacia el citoplasma, se relaciona con el aumento observado de los GPC (Vázquez-Nin et al. 1979).

El uso de estas drogas no aporta evidencias claras del mecanismo por el cual se alteran en número y disposición. El efecto del estradiol se estudió en núcleos de células epiteliales endometriales de rata y se observó que hay un decremento en el número de GPC seguido por la normalización de su número. Posteriormente se estudió la síntesis y transporte de RNA al citoplasma mediante marcado con uridina tritiada y autorradiografía cuantitativa con lo que se demostró que la abundancia de GPC depende de la relación entre la velocidad de síntesis de RNA y su migración al citoplasma (Vázquez-Nin et al. 1979).

Se estudiaron las características estructurales y morfométricas de los GPC y de otras RNP durante la diferenciación celular, fenómeno que lleva consigo casi siempre cambios irreversibles de la expresión genética y por esto, en el patrón de síntesis de RNA, en condiciones normales. Se tomaron como modelos 1) la diferenciación de célula matriz a neuroblasto, la de éste en neuronas y la maduración de la misma en médula espinal cervical de embrión de pollo, pues se conoce sobre la citodiferenciación e histogénesis del sistema (Langman y Hadden 1970; Vázquez-Nin et al. 1980; Vázquez-Nin et al. 1983). Los resultados fueron muy significativos pues se demostró que los GPC casi no existen en células matrices y en neuroblastos, y aumentan mucho en número cuando éstos ya se transforman en neuronas y establecen contactos sinápticos (Vázquez-Nin et al. 1980; Vázquez-Nin et al. 1983). y 2) La diferenciación de células musculares en el embrión de pollo en diferentes estados del desarrollo, muestran que la densidad de los GPC es baja en células mononucleadas y en miotubulos. La frecuencia de GPC no cambia durante la transición de las células en ciclo mitótico a mioblasto y durante la diferenciación

miofibrilar, sin embargo hay un importante incremento en la frecuencia cuando la fibra motora nerviosa establece contacto sináptico con músculo (Zavala et al. 1992).

Monneron y Bernhard en 1969 sugirieron que los GPC son ribonucleoproteínas posiblemente involucradas con el transporte de información de los genes hacia el citoplasma (Monneron y Bernhard 1969).

Moyné y colaboradores confirman que los GPC no tienen DNA, usando una tinción específica para DNA (Moyné et al. 1977).

Estudios recientes sobre la distribución ultraestructural de snRNP en el núcleo de células de las glándulas salivares de *Chironomus* utilizando anticuerpos específicos indican que los GPC contienen ARNm maduro, que ya ha sufrido el proceso de pérdida de intrones (Vázquez-Nin et al. 1990).

### **Gránulos Intercromatinianos**

Los gránulos intercromatinianos (GI) son partículas pequeñas densas de 200 a 250 Å de diámetro, se presentan en las células de mamíferos como cúmulos interconectados por delgadas fibrillas distribuidas al azar en las áreas intercromatinianas. Son estructuras sensibles a la acción de la pronasa seguida de RNasa y la DNasa no tiene efecto sobre ellos (Monneron y Bernhard 1969).

Berezney en 1979 demuestra que son componentes de la matriz nuclear (Berezney 1969). Spector et al en 1983 y posteriormente Fakan en 1984 demostraron por inmunolocalización y análisis ultraestructural que contienen snRNPs, partículas relacionadas con la maduración del pre-mRNA (Spector et al. 1983; Fakan et al. 1984).

Su función no es aún clara pero se les considera como partículas en las que tendría lugar el procesamiento post-transcripcional del pre-RNA ribosomal.

## Cuerpos Espiralados

Observados por Monneron y Bernhard en 1969, son estructuras esféricas formadas por diminutas fibras de 50 Å de grosor. Son fuertemente teñidas al utilizar el método regresivo del EDTA, si se les da un tratamiento de RNasa seguido por pronasa, el contraste de los cuerpos espiralados decrece por lo que se les considera como estructuras ribonucleoproteicas. Se localizan cercanos al nucleolo y algunas veces se encuentran en continuidad con la cromatina blanqueada (Monneron y Bernhard 1969).

Utilizando inmunocitoquímica en células de hígado de ratón y rata, Fakan y col. en 1984 demostraron que contienen snRNPs (Fakan et al. 1984).

## I.9. NUCLEO DE CELULA CANCEROSA

La aplicación de la microscopía electrónica al estudio de las neoplasias malignas se inició en 1955 con las primeras observaciones realizadas por Bernhard y Oberling en el Instituto del Cáncer en Villejuif, Francia (Martínez-Palomo 1977). Las limitaciones metodológicas iniciales que impedían la conservación satisfactoria de los tejidos fueron pronto solucionadas, y así se inicia una larga serie de estudios sobre la ultraestructura de diversas neoplasias humanas y de tumores malignos de aparición espontánea o inducidos experimentalmente en animales (Martínez-Palomo 1977).

La ultraestructura del núcleo de células cancerosas ha sido estudiada en el microscopio electrónico por diversos autores. Por ejemplo, Leduc y Wilson en 1959 mencionan la presencia de invaginaciones profundas de la membrana nuclear hacia el nucleoplasma incluyendo material citoplasmático ( en Bernhard et al. 1963). Otro tipo de inclusiones nucleares han sido descritas por Friedlander en 1959 quien observó depósitos de glucógeno formados por inducción química en sarcoma de pollo ( en Bernhard et al. 1963). Klärner y Gieseking en 1960 mostraron estructuras vacuolares en tumores de pulmón de ratón. Lephus y col. en 1961 así como Besis y Thiery en 1962 mencionan las frecuentes irregularidades de la distribución de la cromatina en la enfermedad de Hodgkin

en humanos. Granboulan y Riviére en 1962 demuestran alteraciones en cuanto al tamaño de los componentes granulares y fibrilares del nucleolo observados en el núcleo del linfoma de ratón (en Bernhard et al. 1963). Bernhard y Granboulan en 1963 estudiaron los cambios ultraestructurales de los componentes nucleares en células cancerosas. Murad y Scarpelli en 1967 observaron un incremento de los gránulos pericromatinianos en varios tumores. En 1968 Bernhard estudió la ultraestructura de las células cancerosas y menciona que los cambios observados en estas no pueden ser considerados constantes y ligados con el proceso de malignización pues varían de un caso a otro (Bernhard 1969). Además describe los cambios que pueden presentarse más frecuentemente en las células cancerosas los cuales son: el agrandamiento del núcleo, las irregularidades en la distribución de la cromatina, Los gránulos pericromatinianos e intercromatinianos pueden ser más numerosos ó no experimentar cambios, los cuerpos nucleares están frecuentemente presentes, la membrana nuclear es caracterizada por profundas invaginaciones y el nucleolo aumenta de tamaño (Bernhard 1969). Ver figura 2.

No se ha encontrado una alteración morfológica característica de las células tumorales. De hecho las diferencias entre células normales y células cancerosas son menos aparentes con microscopía electrónica que con microscopía de luz (Martínez- Palomo 1977).

Todos los estudios realizados hasta la época actual han ayudado a crear las bases para el conocimiento moderno del núcleo de célula cancerosa.

Desde un principio en el estudio de las neoplasias se ha intentado estudiar los cambios estructurales, básicos de la célula cancerosa, que permitan, aunado con otras técnicas de análisis celular, identificar la naturaleza de los cambios celulares que determinan la proliferación ilimitada y la invasividad de las células cancerosas (Martínez-Palomo 1977). Siendo el cáncer una enfermedad con afección del material genético nuclear, es de importancia mencionar que la actividad de genes para la transcripción y procesamiento del ácido ribonucleico, es un fenómeno indispensable para las células normales como patológicas, ya que el ácido ribonucleico constituye un enlace esencial entre la información genética almacenada y la síntesis de proteínas. Experimentalmente se ha demostrado que el número de las partículas ribonucleoproteicas en especial los gránulos pericromatinianos y la distribución de la cromatina varían significativamente en diversos estados funcionales (Vázquez-Nin et al. 1978), durante la diferenciación celular (Vázquez-Nin et al. 1980) y

bajo condiciones experimentales especiales (Puvion et al. 1977). Sin embargo existe poca información sobre el comportamiento de estas partículas en trastornos patológicos y en especial en alteraciones progresivas que en el caso particular serían los cambios que se presentan desde las displasia hasta el cáncer invasor del cuello uterino. Se cree que en los estados con cancerización, un factor importante en el control de la expresión de algunos genes está mediado por el transporte de ARNm, relacionado con la función de malignización de la célula.

**El trabajo aquí presentado está dirigido al estudio de los gránulos pericromatinianos relacionados con el almacén y/o transporte del RNA mensajero maduro y de la cromatina compacta la cual puede indicar en forma indirecta la activación de genes para la transcripción del ácido ribonucleico.**

**Se utilizó la técnica regresiva de contraste preferencial para RNP y la tinción preferencial para cromatina con el fin de determinar los posibles cambios en la disposición y número de las estructuras en cuestión en los diferentes estadios con cancerización.**

## **II. OBJETIVOS**

**-Obtener un mayor conocimiento de los aspectos morfológicos ultraestructurales del núcleo interfásico, durante el proceso de transformación neoplásica, mediante el empleo de la microscopía electrónica cualitativa y cuantitativa, utilizando técnicas de contraste preferencial para núcleo.**

**-Tratar de relacionar el aspecto del núcleo con el grado de malignidad de la lesión.**

### **III. HIPOTESIS**

-En los núcleos interfásicos de células normales del epitelio cervical, existe un patrón morfológico constante en la disposición de la cromatina y ribonucleoproteínas. Los núcleos interfásicos de células displásicas, carcinoma "in situ" y cáncer invasor presentan modificaciones morfológicas ultraestructurales así como variaciones en la cantidad de ribonucleoproteínas y cromatina, lo que posiblemente permita inferir alteraciones relacionadas con la malignidad de estas lesiones.



## IV. MATERIAL Y METODO

Se procesaron muestras obtenidas por biopsia de pacientes caracterizadas clínicamente, las cuales no están infectadas por el virus del papiloma humano.

Se estudiaron 5 pacientes con epitelio cervical normal. Estas muestras forman el grupo control, los grupos con alteraciones fueron: 5 pacientes con displasia leve, 7 con displasia moderada, 5 con displasia severa, 8 con carcinoma "in situ", 1 cáncer microinvasor y 7 con cáncer invasor.

El procedimiento fue el siguiente: Las muestras se cortaron en pequeños fragmentos de 1 mm y se fijaron para microscopía electrónica con glutaraldehído al 2.5 % disuelto en amortiguador de fosfatos 0.16 M pH 7.3 durante 2 horas, el material se enjuagó 3 veces en el mismo amortiguador (10 minutos cada una). No se postfijaron en tetraóxido de osmio sino que de acuerdo con la finalidad de demostrar ribonucleoproteínas o cromatina, la mitad del material se deshidrató en alcoholes graduales, empezando con el de 70% hasta llegar al de 100% realizando 3 cambios de 15 minutos cada uno. Después se introdujeron en óxido de propileno, 3 cambios de 15 minutos cada uno. La preinclusión se realizó en una mezcla de 2 partes de óxido de propileno por una de resina epóxica, durante 12 horas. Posteriormente se hizo el cambio a una mezcla de 1 parte de óxido de propileno por una de resina epóxica durante 12 horas y un tercer cambio a una mezcla de 1 parte de óxido de propileno por 2 de resina epóxica, durante 12 horas.

El procedimiento se llevó a cabo a temperatura ambiente. La inclusión se hizo en moldes planos de plástico, en donde se colocó la resina epóxica con algunos fragmentos de epitelio cervical. La polimerización se realizó en una estufa a 60 °C durante 24 horas.

El material restante se incluyó en dos diferentes resinas: 1) Una parte del material en una resina acrílica hidrosoluble como el LR-White por lo que todos los procedimientos se llevaron a cabo a 4 °C. y 2) La otra parte se deshidrató y embebió con glicolmetacrilato (GMA) siguiendo la técnica de Leduc y Bernhard (1967).

El procedimiento a seguir para incluir en LR-White fue el siguiente:

La deshidratación se empezó con el alcohol al 30 % hasta llegar a 90 %, 1 hora en cada uno, en el de 100 %, se llevaron a cabo 3 cambios de 1 hora cada uno. La infiltración fue en 3 pasos: 1) Las muestras se colocaron en una mezcla de 2 partes de alcohol 100 % por 1 de LR-White, 3 horas; 2) después en una mezcla de 1 parte de alcohol 100 % mas 2 de LR-White, 3 horas; 3) por último en LR-White toda la noche. Al día siguiente se realizaron 3 cambios de LR-White, en el transcurso del día.

Los fragmentos de tejido cérvico uterino fueron puestos en cápsulas de gelatina con LR-White, tratando de dejar la menor cantidad posible de aire. La polimerización se llevó a cabo en una estufa a 60 °C durante 24 horas.

A continuación se detalla la inclusión en GMA.

La deshidratación se practicó en el mismo medio de inclusión (GMA), se preparó a diferentes porcentajes para hacer una deshidratación gradual.

- 1) En una solución de GMA al 70 % se hicieron 2 cambios, de 10 minutos cada uno
  - 2) En GMA al 80 % se realizan 2 cambios como se mencionaron anteriormente.
  - 3) En GMA al 97 % también 2 cambios de la misma forma.
  - 4) En una solución 50:50 de GMA 97 % y solución de inclusión no polimerizada, se dejan 20 minutos.
  - 5) En una solución de inclusión no polimerizada, permanecen 20 minutos.
  - 6) Se colocaron los trocitos de tejido en un prepolímero de GMA durante 12 horas.
  - 7) Se pasaron a cápsulas de gelatina con prepolímero nuevo y se taparon, tratando de dejar la menor cantidad posible de aire.
- La polimerización se lleva a cabo con luz ultravioleta, durante 24 horas.

### **Microtomía**

Se obtuvieron cortes semifinos en un ultramicrotomo Sorvall MT 2, de un grosor aproximado de 240 nm. éstos fueron montados en portaobjetos, teñidos con azul de toluidina y observados en un microscopio óptico Carl Zeiss, para un reconocimiento general de las células epiteliales cérvicoúterinas determinando su grado de malignización (displasias, carcinoma "in situ" y cáncer invasor).

Después de reconocer la zona deseada se procedió a obtener cortes ultrafinos de aproximadamente 60 a 90 nm de grosor, los cuales fueron montados en rejillas de cobre de 150 mesh.

### **Método de contraste**

Se utilizó la técnica habitual que es el acetato de uranilo y citrato de plomo así como la técnica regresiva y preferencial para ribonucleoproteínas (RNPs) de Bernhard (1969) en el material que fue incluido en resina epóxica y la técnica de ácido fosfotungstico, de acuerdo al método de Vázquez-Nin, en el material incluido en LR-White y GMA.

Técnica de tinción con acetato de uranilo y citrato de plomo.- Las rejillas se contrastaron por flotación sobre una solución de acetato de uranilo durante 20 minutos; se enjuagaron

con agua bidestilada y se secaron con papel filtro, esto se realiza en una caja de petri que contenga un algodón mojado para evitar precipitaciones. Posteriormente se colocaron sobre una gota de citrato de plomo durante 10 minutos, se lavaron y secaron, esto se lleva a cabo dentro de una caja de petri que contenga NaOH y humedad.

Técnica regresiva con EDTA de Bernhard, preferencial para RNPs. Las rejillas con los cortes se contrastaron por flotación sobre una solución de acetato de uranilo durante 1.5 minutos; se enjuagaron con agua bidestilada y se secaron con papel filtro, posteriormente se colocaron sobre una gota de solución de ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 0.2 M pH 6.8 durante un tiempo de 18-36 minutos, se enjuagaron y se secaron. Estas flotaciones se realizan dentro de una caja de petri con un algodón húmedo el cual evita precipitación en la preparación. Por último, se contrastaron con la solución de citrato de plomo durante 3 minutos, se lavaron y secaron; para evitar la formación de precipitados sobre la preparación, se realiza este paso dentro de una caja de petri que contenga humedad y pastillas de NaOH que absorbe el CO<sub>2</sub> atmosférico evitando que reaccione con el plomo. Contraste preferencial para DNA con ácido fosfotungstico (PTA) de Vázquez-Nin.- Las rejillas se contrastaron por flotación sobre una solución de ácido fosfotungstico por 3 minutos, se enjuagaron con agua bidestilada y se secaron con papel filtro.

#### **Observación y registro de la imagen**

Las rejillas ya contrastadas fueron observadas en un microscopio electrónico de transmisión Carl Zeiss M-10 operado a 60 Kv. Se obtuvieron electromicrografías tomadas a 12500 aumentos de los núcleos del epitelio cérvico uterino ubicados en el estrato basal, en la capa media y superior (5 de cada estrato), sin embargo en el cáncer invasor no existen estratos definidos pues las células no guardan un orden, así que se tomaron 15 núcleos al azar.

Se seleccionaron células típicas de los diferentes estadios de malignización y se obtuvieron electromicrografías de los núcleos de la forma antes mencionada.

Se imprimieron las micrografías de núcleos que muestran las RNPs y de núcleos donde se observa la cromatina. Se analizaron cualitativamente y cuantitativamente con el fin de obtener datos que fueron sometidos a análisis estadístico.

Las técnicas de análisis se realizaron sobre imágenes de micrografías impresas en papel para determinar, áreas nucleares y cromatinicas, para lo cual se emplearon programas de computación diseñados para el laboratorio de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias. UNAM. Es importante mencionar que en el estadio de cáncer invasor el área

nuclear fué medida utilizando 1) dos diferentes programas de computación y 2) por planimetría, la conversión numerica en micras se efectuó dividiendo el valor en cm entre el aumento final elevado al cuadrado.

La frecuencia de los gránulos pericromatinianos se evaluó directamente contando los gránulos para relacionarla con el área nuclear obtenida por los programas de computación y planimetría. En esta forma se estimó la densidad de gránulos pericromatinianos.

Los datos se procesaron para obtener los valores de media, varianza, desviación estandar y error estandar.

Para los valores de la media, de los gránulos pericromatinianos se evaluó la significación de la diferencia entre dos series de valores sucesivos (ej. núcleos normales basales vs núcleos normales medios) por medio de la prueba de T de Student.

Las preparaciones ópticas que contienen los cortes semifinos teñidos con azul de toluidina fueron observadas en un microscopio de la casa Carl Zeiss, provisto de un ocular micrométrico y se tomaron las medidas del diámetro mayor nuclear y el diámetro menor nuclear, para obtener su volumen; se empleó un programa de computación elaborado en el Laboratorio de Microscopía Electrónica.

## V. RESULTADOS

### Microscopía óptica

#### Volumen Nuclear.

La tinción con azul de toluidina ayudó a determinar el grado de malignización de las células epiteliales cérvico-uterinas, de acuerdo a los caracteres empleados en la patología diagnóstica y también se usaron para medir el volumen nuclear. Las medidas de los núcleos tendientes a obtener su volumen fueron realizadas en cada una de las células ubicadas en los distintos estratos: basal, medio y superficial. (Ver tabla I), En esta tabla se aprecia que los núcleos ubicados en el estrato superficial del epitelio normal y en las displasias leve, moderada y severa tienden a un incremento nuclear, con respecto a los núcleos ubicados en el estratos basal y medio; en el carcinoma "in situ" se muestra que los núcleos de los tres estratos son notablemente más grandes que los otros casos; el cáncer invasor presenta dos grupos de núcleos, uno con mayor volumen nuclear y otro con menor volumen nuclear. Cuando los datos se manejan por estadios, como se muestra en la gráfica 1, los resultados están de acuerdo a los de Hillemanns y su grupo de Freiburg en 1968, quienes demostraron la existencia de variaciones en el tamaño nuclear en relación directa con el estadio evolutivo de la neoplasia.

**Epitelio cérvico uterino normal.**-Existe maduración normal desde las células ubicadas en el estrato basal hasta las del estrato superior (las cuales tienen una forma aplanada). El volumen ( $\mu\text{m}^3$ ) de los núcleos ubicados en el estrato basal va de 10.8 a 175.7.

El volumen de los núcleos ubicados en el estrato medio va de 28.0 a 207.9. El volumen de los núcleos ubicados en el estrato superficial va de 71.5 a 321.5.

**Displasia Leve.**- Se caracteriza por aparición de células atípicas en las capas basales del epitelio, con conservación de la diferenciación celular normal en las capas más superficiales. El volumen  $\mu\text{m}^3$  de los núcleos ubicados en el estrato basal va de 16.3 a 199.53. El volumen de los núcleos ubicados en el estrato medio va de 19.6 a 315.9. El de los núcleos superficiales va de 32.2 a 572.1.

**Displasia moderada.**- Existe un avance progresivo de malignización en mayor número de las capas del epitelio, afectando generalmente al estrato basal y parte del estrato medio, es decir, las células inmaduras están en más de la mitad de la altura del epitelio pero conservando una diferenciación normal en la capa superficial donde las células son muy alargadas y aplanadas. El volumen  $\mu\text{m}^3$  de los núcleos ubicados en la capa basal va de 25.4 a 434.8. El volumen de los núcleos ubicados en la capa media va de 33.5 a 492.8. El volumen de los núcleos superficiales va de 49.3 a 394.5.

**Displasia severa.**- más de los 2/3 del epitelio están constituidos por células inmaduras pero existe maduración en la superficie. El volumen  $\mu\text{m}^3$  de los núcleos ubicados en el estrato basal va de 13.4 a 268.0. El volumen de los núcleos del estrato medio va de 16.36 a 268.0. El volumen de los núcleos de la capa superficial va de 46.1 a 421.1.

**Carcinoma "in situ".**- Todo el grosor del epitelio está constituido por células inmaduras, el epitelio se encuentra distorsionado en su estructura y orientación, existe gran cantidad de mitosis, se conserva la integridad de la membrana basal. El volumen  $\mu\text{m}^3$  de los núcleos de la capa basal va de 28.7 a 508.0. El volumen de los núcleos de la capa media va de 47.7 a 706.4. El volumen de los núcleos de la capa superficial va de 43.0 a 572.1.

**Cáncer microinvasor.**- Existe infiltración de las células atípicas hacia el estroma pero no se excede de .5 mm de grosor.

**Cáncer invasor.**- Las células cancerosas invaden el estroma subyacente y los tejidos por infiltración de la membrana basal. El volumen de los núcleos va de 40.1  $\mu\text{m}^3$  a 350.77  $\mu\text{m}^3$ .

## Microscopía Electrónica

### Aspectos ultraestructurales de los núcleos en los distintos estadios

Se analizaron los núcleos de células del estrato basal, en la capa media y superior del grupo control y de los grupos afectados excepto del cáncer invasor donde se analizaron núcleos al azar.

A continuación se describen con detalle los núcleos de los diferentes estadios, que se tomaron como más representativos, aunque en todos los casos las variaciones fueron grandes. Mencionaré primeramente las partículas ribonucleoproteicas que fueron contrastadas con la técnica de EDTA y luego la cromatina compacta contrastada por el método de PTA.

#### EPITELIO CERVICO-UTERINO NORMAL:

**Núcleos de células del estrato basal.**- Presentan una forma alargada irregular ya que la membrana nuclear es frecuentemente invaginada ocasionando una deformación nuclear, los nucleolos compactos, el núcleo tiene numerosos gránulos pericromatinianos (GPC) al borde de la cromatina compacta así como fibras pericromatinianas (FPC), los cúmulos de gránulos intercromatinianos (GIC) y fibras son abundantes en el espacio nuclear. La cromatina compacta forma una capa de grosor irregular en contacto con la envoltura nuclear, además de grumos que están distribuidos en el espacio nuclear y alrededor del nucleolo (figura 3). Tabla II.

**Núcleos de células del estrato medio.**- De forma alargada irregular, los nucleolos son compactos; tienen numerosos GPC Y FPC cercanos a la cromatina compacta, en el espacio intercromatiniano los cúmulos de GIC y fibras son abundantes, una capa discontinua de cromatina compacta está en contacto con la membrana nuclear y bastantes cúmulos son distribuidos en el espacio nuclear y alrededor del nucleolo (figura 4). Tabla III.

**Núcleos de células de la capa superior.**- Los nucleos son alargados irregulares con la membrana nuclear poco invaginada, la región pericromatiniana posee pocos GPC y la

región intercromatiniana tiene escasos cúmulos de GIC, la cromatina compacta forma una capa discontinua en la periferia del núcleo y son escasos los que están distribuidos en el espacio nuclear. Tabla IV.

#### DISPLASIA LEVE:

**Núcleos de células del estrato basal.-** Presentan una forma alargada irregular, la membrana nuclear con invaginaciones, se distingue el nucleolo compacto, abundantes GPC se observan en la región pericromatiniana, en el nucleoplasma los cúmulos de GIC y fibras también abundan, se aprecian inclusiones citoplasmáticas en el espacio nuclear, la cromatina compacta forma una capa discontinua que está en contacto con la membrana nuclear y bastantes cúmulos pequeños distribuidos en el espacio nuclear. Tabla II.

**Núcleos de células del estrato medio.-** Presenta una forma alargada irregular. La membrana nuclear con invaginaciones las cuales pueden causar una lobulación profunda, los nucleolos son compactos, los GPC son abundantes en la región pericromatiniana y los cúmulos de GIC son numerosos en el espacio nuclear, así como las fibras; la cromatina compacta forma una capa discontinua en contacto con la membrana nuclear y varios cúmulos son distribuidos en el nucleoplasma; y alrededor del nucleolo. Tabla III.

**Núcleos de células del estrato superior.-** Los núcleos tienen forma alargada irregular; la membrana nuclear algunas veces tiene invaginaciones con lobulaciones profundas, el nucleolo es compacto y rodeado por cromatina perinucleolar, poseen pocos gránulos pericromatinianos en el borde de la cromatina compacta, así como cúmulos de GIC y Fibras en el nucleoplasma, la cromatina compacta está distribuida en una capa discontinua de grosor variable en contacto con la membrana nuclear y existen cúmulos distribuidos en el espacio nuclear. Tabla IV.

#### DISPLASIA MODERADA:

**Núcleos de células del estrato basal.-** Tienen forma alargada irregular, la membrana puede presentar invaginaciones con lobulaciones profundas, el nucleolo es compacto, los GPC son muy numerosos en el borde de la cromatina compacta y además no están restringidos a la región pericromatiniana; los cúmulos de GIC y las fibras son abundantes en el nucleoplasma, la cromatina compacta forma una abundante capa discontinua en



contacto con la envoltura nuclear y numerosos cúmulos son distribuidos en el espacio nuclear y alrededor del nucleolo. Tabla II.

**Núcleos de células del estrato medio.**-son núcleos pleomórficos en general alargados e irregulares. La membrana nuclear presenta invaginaciones, algunas de las cuales son profundas, se pueden observar uno o más nucleolos rodeados por cromatina perinucleolar, compactos ó con una estructura nucleolonemal típica; los GPC son abundantes y no están restringidos a la región pericromatiniana, abundantes cúmulos de GIC y fibras están distribuidas en el espacio intercromatiniano, varias inclusiones citoplasmáticas y algunos cuerpos nucleares pueden estar presentes, la cromatina compacta forma una capa discontinua de grosor variable que está en contacto con la membrana nuclear y varios cúmulos grandes estan distribuidos en el nucleoplasma. Tabla III.

**Núcleos de células del estrato superior.**- Presentan la misma forma que los núcleos medios. La membrana nuclear presenta invaginaciones y algunas son profundas, el nucleolo varía de tamaño y puede ser compacto ó descompactado, rodeado por cromatina perinucleolar. Pocos GPC están en la región pericromatiniana, son escasos los cúmulos de GIC y fibras en la región intercromatiniana. Numerosas inclusiones citoplasmáticas y varios cuerpos nucleares. se observan. La cromatina compacta forma una capa discontinua en la periferia nuclear y varios cúmulos son distribuidos en el nucleoplasma. Tabla IV.

#### DISPLASIA SEVERA:

**Núcleos de células de la capa basal.**- Presentan forma alargada irregular; la membrana nuclear posee ondulaciones, el nucleolo es compacto presente con pocos GPC, las FPC escasas así como los cúmulos de GIC y fibras del espacio intercromatiniano, la cromatina compacta está distribuida en una escasa capa discontinua en contacto con la membrana nuclear y varios pequeños cúmulos distribuidos en el nucleoplasma y alrededor del nucleolo. (figura 5). Tabla II.

**Núcleos de células de la capa media.**- Tienen la misma forma que el estrato anterior, en algunos núcleos se presenta uno o dos nucleolos compactos, rodeados por cromatina perinucleolar, pocos GPC, los cúmulos de GIC y FPC son abundantes, la distribución de la cromatina compacta es en una capa discontinua de grosor variable y varios cúmulos distribuidos en el nucleoplasma (figura 6). Tabla III.

**Núcleos de células de la capa superior.**- Son núcleos con forma alargada irregular, la membrana nuclear posee invaginaciones profundas, el nucleolo es compacto, los GPC son escasos y los cúmulos de GIC y fibras están poco frecuentes en el nucleoplasma, la cromatina compacta tiene las mismas características que en los núcleos de la capa media. Tabla IV.

#### CARCINOMA "IN SITU":

**Núcleos de células de la capa basal.**- Pleomórficos; la membrana nuclear es frecuentemente invaginada y algunas veces las lobulaciones son profundas, los nucleolos son compactos, y pueden presentarse más de dos, poseen pocos GPC que no están limitados a la región pericromatiniana, abundantes cúmulos de GIC mezclados con fibras en el nucleoplasma, numerosos cuerpos nucleares, la cromatina compacta forma una delgada capa discontinua en contacto con la membrana nuclear y numerosos cúmulos distribuidos en el nucleoplasma. Tabla II.

**Núcleos de células de la capa media.**- Muestran las mismas características que los núcleos del estrato basal, excepto porque no se observan cuerpos nucleares. Tabla III.

**Núcleos de células de la capa superior.**- Pleomórficos; los nucleolos son compactos, rodeados por cromatina perinucleolar, los GPC son escasos y no están restringidos a la región pericromatiniana, los cúmulos de GIC mezclados con fibras son numerosos en el nucleoplasma, se observan cuerpos nucleares en el espacio nuclear, la cromatina compacta se encuentra distribuida formando una delgada capa continua en contacto con la membrana nuclear y abundantes cúmulos distribuidos en el nucleoplasma. Tabla IV.

## CANCER INVASOR:

Los núcleos son pleomórficos, la membrana nuclear posee invaginaciones con lobulaciones profundas, los nucleolos son compactados o descompactados, rodeados por cromatina perinucleolar y generalmente dos por núcleo, las FPC así como los GPC son pocos en algunos casos o muy abundantes en otros, en la región pericromatiniana, los cúmulos de GIC mezclados con fibras son numerosos en la región intercromatiniana, se observan inclusiones citoplasmáticas y cuerpos nucleares en el nucleoplasma, la cromatina compacta en contacto con la membrana nuclear es abundante en algunos casos o poca en otros y varios o escasos cúmulos están distribuidos en el espacio nuclear (figuras 7,8,9,10).  
Tabla V.

Se describen las características generales de los núcleos del epitelio normal y de los diferentes grados de malignización, considerando el estrato basal, medio y superficial como uno solo. Tabla VI.

## Análisis morfológico y estadístico

### Número total de GPC / Area nuclear

La gráfica 2 muestra la densidad de los GPC de los núcleos ubicados en los distintos estratos de los diferentes estadios tomados sistemáticamente. En el estrato basal se observan diferencias significativas entre: 1) los núcleos celulares del estadio normal con los núcleos del carcinoma "in situ", ( $p < 0.050$ ); 2) los núcleos de displasia leve con los núcleos del carcinoma "in situ" ( $p < 0.050$ ); 3) los núcleos de displasia moderada con los núcleos del carcinoma "in situ" ( $p < 0.050$ ) y 4) los núcleos de displasia severa con los núcleos del carcinoma "in situ" ( $p < 0.050$ ). En los demás núcleos celulares de los diferentes estadios (excepto cáncer invasor) no se ven diferencias significativas ( $p > 0.050$ ). No existen diferencias significativas entre los núcleos celulares ubicados en el estrato medio con los núcleos de los distintos estadios ( $p > 0.050$ ) (excepto cáncer invasor). En el estrato superficial existen diferencias significativas entre: 1) los núcleos normales con los núcleos

de displasia leve ( $p < 0.050$ ), los núcleos de displasia moderada ( $p < 0.005$ ), los núcleos de displasia severa ( $p < 0.025$ ) y los núcleos del cáncer microinvasor ( $p < 0.010$ ); 2) los núcleos de displasia leve con los núcleos del cáncer microinvasor ( $p < 0.050$ ); 3) los núcleos de displasia severa con los núcleos de carcinoma "in situ" ( $p < 0.001$ ); 4) los núcleos de displasia severa con los núcleos de carcinoma "in situ" ( $p < 0.025$ ) y 5) los núcleos de carcinoma "in situ" con los núcleos de cáncer microinvasor ( $p < 0.001$ ). (Excepto cáncer invasor).

La gráfica 3 muestra la densidad de los gránulos pericromatinianos de los núcleos ubicados en el estrato basal, medio y superior, tomados en conjunto, representando un sólo grupo de los diferentes estadios estudiados. Existen diferencias estadísticamente significativas entre los núcleos de los siguientes estadios, epitelio normal, displasia leve, moderada, y severa, carcinoma "in situ" y microinvasor con los núcleos del cáncer invasor ( $p < 0.050$ ), se observa una tendencia a disminuir la densidad de gránulos pericromatinianos con respecto a la media.

La gráfica 4 representa un histograma de frecuencia de la densidad de los gránulos pericromatinianos en la población celular del cáncer invasor.

La gráfica 5 representa dos poblaciones celulares en el cáncer invasor, la primera población (Inva1) presenta pocos GPC y en la segunda (Inva2) son numerosos. Son significativamente diferentes ( $p < 0.001$ ). Los diferentes programas utilizados produjeron resultados similares.

#### **Area de cromatina / Area nuclear.**

Con el objeto de conocer el área nuclear ocupada por la cromatina compacta se hicieron mediciones en los núcleos de los distintos estadios que se tomaron sistemáticamente  
Tabla VII.

El cáncer invasor en donde no distinguimos capas, presenta 2 poblaciones, una tres veces más abundante en cromatina compacta que la otra. ( $p < 0.050$ ). Tabla VII. Existen diferencias significativas en el área nuclear ocupada por cromatina compacta en: los

núcleos ubicados en el estrato basal del epitelio normal con los núcleos de displasia leve y carcinoma "in situ" ( $p < 0.050$ ). Tabla VII. Entre los núcleo restantes no hay diferencias significativas ( $p > 0.050$ ). Decidimos estudiar los datos tomándolos como un solo universo representativo de cada estadio, la gráfica 6 muestra la variación de la cromatina compacta en seis estadios estudiados (normal, displasia leve, moderada y severa, carcinoma "in situ" y cáncer invasor), no se muestran diferencias significativas entre los núcleos de los distintos estadios excepto el carcinoma "in situ" ( $p < 0.050$ ). Con respecto al cáncer invasor existe un grupo de núcleos con bastante cromatina compacta y otro grupo con poca cromatina compacta ( $p < 0.050$ ).

## VI. DISCUSION

Los componentes ribonucleoproteicos y la distribución de la cromatina han sido objeto de análisis, empleando métodos de cuantificación que permiten demostrar variaciones del estado fisiológico de las células (Zavala-Padilla 1980; Jiménez-García 1983; Benítez Gutiérrez 1982). En este estudio ambos componentes nucleares se tomaron como parámetros de evaluación para estudiar su comportamiento, analizando muestras de células con alteraciones progresivas de la transformación neoplásica, como son displasia leve, moderada y severa; carcinoma "in situ"; cáncer microinvasor e invasor.

Las mediciones en un mismo campo microscópico del volumen nuclear de las células de distintos estratos en los diferentes estadios, muestran que el estrato superficial, a excepción de carcinoma "in situ" y cáncer invasor, tiende a un incremento del volumen nuclear con respecto a los estratos basal y medio. En el carcinoma "in situ" el aumento significativo del volumen nuclear en los tres estratos con respecto a los otros grupos, apoya el criterio de alteración de volumen nuclear de células malignizadas con respecto a las normales, como demuestra Hillemanns y su grupo de Freiburg, los cuales mostraron la existencia de variaciones en el tamaño nuclear en relación directa con el estadio evolutivo del cáncer cérvico-uterino; independientemente de la separación en estratos (Hillemanns y Prestel 1968). Los mismos autores registraron una reducción significativa del volumen de los núcleos del carcinoma "in situ" justo antes de iniciarse la invasión. El cáncer invasor se caracteriza por diferentes estadios citofisiológicos de las poblaciones celulares, probablemente debido a variaciones microambientales en el seno del tumor. En nuestro análisis de resultados por estadios, las variaciones en el volumen nuclear en relación con los diferentes procesos patológicos, coincide con los propuestos por Hillemanns y col en 1968).

En el presente estudio utilizando las técnicas específicas para cromatina y ribonucleoproteínas, los resultados de cáncer invasor muestran la existencia de dos tipos celulares, uno de los cuales está caracterizado por la presencia de núcleos con baja densidad de gránulos pericromatinianos y poca cromatina compacta, mientras que el otro presenta núcleos con alta densidad de gránulos pericromatinianos y abundancia de cromatina compacta. El primer corresponde a una población indiferenciada como se observa en células de neuroblasto en estado temprano del desarrollo (Vázquez-Nin et al. 1980; Vázquez-Nin et al. 1983), donde las células cancerosas tienen un elevado

metabolismo, aumento en su actividad transcripcional, pues son células que se están continuamente dividiendo y por lo tanto invadiendo al tejido subyacente (Robbins 1990), no forman uniones estables, son las células metastásicas (Martínez-Palomo 1977). El segundo tipo celular del cáncer invasor corresponde a una población diferenciada como se observó en la diferenciación de células musculares en el embrión de pollo en diferentes estados del desarrollo (Zavala et al. 1992), la cual no dará origen a más células pues está próxima a la muerte celular. Algunas células muestran apoptosis que de acuerdo a Dive et al. 1992 y Wyllie et al. 1980, se caracteriza por los siguientes cambios morfológicos: contracción celular por lo que la forma es distorsionada, condensación de la cromatina, formación de una banda densa de heterocromatina a lo largo de la membrana nuclear la cual presenta severas ondulaciones. Se ha observado que el centro de muchos tumores a menudo se torna necrótico, posiblemente por falta de riego sanguíneo. El oxígeno, por ejemplo puede difundir radialmente alrededor de 150  $\mu\text{m}$  desde los capilares pero las células cancerosas que avanzan, invaden tejidos normales que tienen vasculatura bien desarrollada, así los tumores siguen aumentando de dimensiones con la vascularización periférica suficiente, al tiempo que las zonas centrales de necrosis se tornan cada vez más grandes (Robbins 1990). De acuerdo con Wyllie et al. 1980 la muerte celular por necrosis es morfológicamente y bioquímicamente diferente que por apoptosis ya que consideran que la necrosis está asociada con un aumento celular, ruptura de membranas y disolución de la organización estructural y la apoptosis es caracterizada por la disminución celular y condensación de cromatina (Wyllie 1980).

La muerte celular está relacionada con el envejecimiento el cual es una propiedad innata de las células normales, que poseen capacidad limitada para dividirse (Hayflick 1980). Se supone la existencia de "genes de envejecimiento" que frenarían o detendrían vías bioquímicas de forma secuencial y conducirían a una expresión programada de los cambios propios del envejecimiento. Las células cancerosas escapan del proceso del envejecimiento y muerte celular ya que tienen una capacidad ilimitada de dividirse son "inmortales" (Hayflick 1980).

Por otro lado, este trabajo complementa una serie de investigaciones sobre la ultraestructura nuclear. Anteriormente se han utilizado drogas, hormonas y un sistema modelo de diferenciación con el objeto de aclarar el posible papel citofisiológico de las partículas nucleares relacionadas con el metabolismo postranscripcional del RNA en sistemas alterados.

Se determinó la presencia de inclusiones citoplasmáticas en todos los tipos celulares, más frecuentemente en células con alto grado de malignización, como se ha demostrado para otros tipos de cáncer (Bernhard y Granboulan 1963). Pueden deberse a alteraciones a nivel de la membrana nuclear y/o nucleoesqueleto. (Echeverría O. comunicación personal).

En los núcleos de células con diferente grado de malignización, en el cáncer de la enfermedad de Hodgkin (Hernández-Pando et al. 1988) y en el cáncer de tiroides, se determinó por el método de EDTA la presencia de estructuras parecidas a cuerpos nucleares, lo que sugiere su naturaleza ribonucleoproteica. (Echeverría O. comunicación personal).

En los núcleos celulares seleccionados del estadio invasor existen algunas diferencias encontradas ultraestructuralmente con los núcleos del epitelio normal como son: la presencia de invaginaciones de la membrana nuclear hacia el nucleoplasma, ocasionando lobulaciones profundas. El nucleoplasma presenta numerosas estructuras parecidas a cuerpos nucleares e inclusiones citoplasmáticas. Estas diferencias permiten distinguir una célula normal o displásica de una célula cancerosa (Bernhard 1969).

El estudio de las variaciones de las partículas ribonucleoproteicas especialmente los gránulos pericromatinianos y de la distribución de la cromatina, utilizando criterios totalmente objetivos como los cambios cuantificables y analizables estadísticamente de parámetros definidos en trabajos anteriores (Zavala-Padilla 1980; Jiménez-García 1983; Benítez Gutiérrez 1982), no permite establecer criterios para diagnóstico del grado de malignización. El análisis de los resultados muestra variaciones en los núcleos celulares del grupo control y en los grupos afectados, por lo que no existe un patrón constante en la cantidad de gránulos pericromatinianos y de cromatina compacta en cada una de las entidades patológicas consideradas. Estas variaciones pueden deberse a:

- 1) Las muestras de biopsias tomadas de pacientes de hospital no siempre tienen la calidad deseable para estudios exigentes de ultraestructura.
- 2) El epitelio cervical normal es una zona sujeta a múltiples cambios por ser células sometidas a agresión local, traumatismo, infecciones, cambios hormonales etc, así es que son células que están alteradas en cierto grado (Robbins 1990).



3) En los estadios precursores, las displasias (leve, moderada y severa) sólo son unas pocas células que presentan núcleos anormales de cuantas componen el epitelio, las que están iniciándose en el proceso de malignización, por lo que las demás, podrían ser células "normales".

## VII. CONCLUSIONES

1) El presente trabajo es el primer estudio sistemático en células epiteliales cérvico-uterinas con diferentes grados de malignización que emplea dos métodos de contraste preferencial. 1) La técnica regresiva de Bernhard para RNP y 2) La técnica para ADN de Vázquez-Nin y col. en núcleo celular interfásico.

2) Se determinó una marcada relación entre volumen nuclear y grado de malignización que apoya criterios anteriormente propuestos por Hillemanns y col (1968).

3) En el cáncer invasor existen dos poblaciones celulares que corresponden a: 1) Población indiferenciada la cual está caracterizada por núcleos con baja densidad de GPC y cromatina compacta y 2) Población diferenciada, que presenta núcleos con alta densidad de GPC y cromatina compacta.

4) Los criterios tales como los cambios cuantificables y analizables así como las dificultades que existen para el muestreo, por ser en humanos, interfieren en la obtención de criterios claros que relacionen el aspecto del núcleo con la malignidad de la lesión y el establecimiento de patrones bien definidos.

5) En los estadios precursores las células analizadas corresponden a células alteradas y a células normales, por lo que para estudiarlos se necesita seleccionar las pocas células afectadas que existen, para hacer otra aproximación en un estudio cuantitativo.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## VIII REFERENCIAS

- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D.:1983. Molecular biology of the cell. Grarland. New York. pp 1146.
- Avers Ch.J.:1987.Biología celular. Iberoamericana. México. pp 784.
- Atkin N. B., Baker M.C., Wilson S: 1967. Stemline karyotypes of 4 carcinomas of the cervix uteri. Amer. J. Obstet. Gynec. 99:506.
- Balanguero Llado L:1971. El carcinoma in situ del cuello uterino. Espaxs. Barcelona. pp 255.
- Beltrán Ortega A: 1990. Morbilidad hospitalaria. Instituto Nacional de Cancerología. pp. 35.
- Benítez Gutiérrez A.Y: 1982. Cambios en la disposición de la cromatina de los núcleos de las células endometriales durante el ciclo estral de la rata. Tesis de licenciatura. Biología. Facultad de Ciencias. U.N.A.M. México.
- Berezney R:1979. Dynamic properties of the nuclear matrix.En:Busch H (ed). The cell nucleous. Academic press. New York. pp 413-456.
- Bernhard W., Granboulan N:1963.The fine structure of cancer cell nucleus. Experimental Cell Research Suppl. 9:19-53.
- Bernhard W:1969:Ultrastructure of the cancer cell.Hadbook of molecular cytology.28:687-715.
- Bernhard W:1969. A new procedure for electron microscopical cytology. J. Ultrastruct Res.27:250-265.
- Brasch K., Setterfield G:1974.Structural organization of chromosomes in interphase nuclei.Exp. Cell. Res.83:175-185.
- Broders A. C: 1932. Carcinoma in situ contrasted with benign penetrating epithelium. J.A.M.A. 99:1670.
- Cogliati R., Gautier A: 1973. Mise en évidence de l'ADN et des polysaccharides a l'aide d'un nouveau u réactif "de type Schiff". C. R. Acad. Sc. Paris. pp. 276.
- Comings D.E:1968. The rationale for an ordered arrangement of chromatin in the interphase nucleus. Amer. J. Genet.20:440-460.
- Daskal Yerach:1981.Perichromatin granules. En The cell Nucleus. Volumen VIII. Acad. press Inc. Yew York. pp 117-137.
- De Robertis E.D.P., De Robertis E.M.F:1983.Biología celular y molecular. El ateneo. Buenos Aires. pp 15,321-322.

- Dive C., Evans C.A., Whetton A.D: 1992. Induction of apoptosis-new targets for cancer chemotherapy. *Cancer biology*. 3:417-427.
- Dupraw J:1971. *Biología celular y molecular*. Omega. Barcelona pp 487-530.
- Fakan S., Bernhard W:1973. Nuclear labelling after prolonged  $^3\text{H}$ -uridine incorporation as visualized by high resolution autoradiography. *Exp. Cell. Res.* 79:431-444.
- Fakan S., Leser G., Martin T:1984.Ultrastructural distribution of nuclear ribonucleoproteins as visualized by immunocytochemistry in thin sections.*J. Cell. Biol.*98:358-363.
- Fu S. Yao.,Reagan W.J., Ralph M. R: 1981. Definition of precursors. *Gynecology Oncology*. 12:220-234.
- Galvin G.A., Te Inder R.W: 1949. Present day status of noninvasive cervical carcinoma. *Amer. J. Obstet. Gynec.* 57:15.
- Gariglio P.V:1987.Control de la transcripción en organismos eucariontes,oncogenes y cáncer humano.En: López Revilla R, Tsutsumi V y Frixione E. (ed). *Temas selectos de Biología Celular I. SEP/cosnet/cinvestav*. México. D.F. pp 323-350. *biología molecular*.p 323-350.
- Gariglio P., García C. A:1990.Papilomavirus humanos y cáncer cérvico uterino. *Adel. Microbiol. Enf. Infec.*8:45-58.
- Green N:1982:The nuclear pore a biological grommet. *Nature*.297:287
- Guerra G., Banaza S., Morales V: 1990. Anuario estadístico. Secretaría de salud. Fuente S:S:A: dirección general de epidemiología. pp. 444
- Hayflick L: 1980. *Biología celular del envejecimiento humano*. pp.
- Ham A.W., Cormack H.D:1986.Tratado de histología.Interamericana.México. pp 971-975.
- Hansemann D. V: 1893. studien iiber die spezifizität, altruismus und die anaplasia der zellen mit besonderer berucksichtigung der geschwiilste. En: Balanguero Llado L: 1971. *El carcinoma in situ del cuello uterino*. Espaxs. Barcelona. pp. 255.
- Hernández-Pando R., Vázquez-Nin G., Zavala G: 1988. Estudio ultraestructural de los constituyentes ribonucleoproteicos y la disposición cromatínica en varias células en la enfermedad de hodkin. *Arch.Invest. Méd.* 19:173.
- Hillemanns H.G., Prestel E: 1968. Karyometric mit dem teichengossenanalysator (T:G:Z.) am beispil des cervixcarcinoms und seinen vorstufen. *Z. Krebsforsch.* 71.316.
- Howley M. P:1986. On human papillomaviruses. *New Engl Jour Med.* 23:1089-1090.

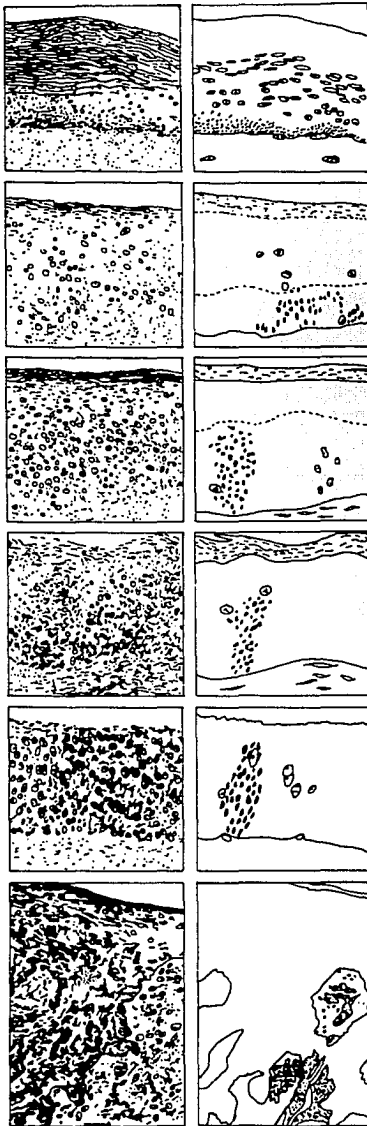
- Jiménez-García L.F.:1983. Estudio de las variaciones cuantitativas de la cromatina durante la diferenciación y maduración neuronal. Tesis de licenciatura. Biología. Facultad de Ciencias. U.N.A.M. México.
- Jiménez-García L.F.:1988. El nucleolo:Relación entre la distribución espacial de ácidos nucleicos y proteínas. Tesis doctoral, Biología, Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- Langman J., Hadden C: 1970. Formation and migration of neuroblasts in the spinal cord of the chick embryo. *J. Comp. Neurol.* 138:419-432.
- Leduc E. H., Bernhard W: 1967. Recent modifications of the glycol-metacrilate embedding procedure. *J. Ultrastruc. Res.* 19: 196-199.
- Martínez-Palomo Adolfo:1977.Microscopía electrónica de la célula neoplásica. *Gaceta Médica de México.* Vol.113.3:123-131
- Mateu Aragónés: 1982. Cáncer de útero diagnóstico precoz del carcinoma cervical y endometrial. *J/MS.* Barcelona. pp 516.
- Mc Clintock B: 1934.*Z. Zellforsch.* En: Dupraw J:1971. Biología celular y molecular. Omega. Barcelona. pp.487-530.
- Meisels A., M.D., FIAC., Carol Morin: 1981. Human papillomavirus and cancer or uterine cervix. *Gynecology Oncology.* 12:111-123.
- Monneron A., Bernhard W:1969. Fine structural organization of the interphase nucleus of some mammalian cells. *J. Ultrastruct.Res.*27:266-288.
- Moyne G:1972. Une méthode cytochimique de mise en évidence de l'ADN. á l'usage de la microscopie électronique. *C.R. Acad.Sc.Paris.*274:247-250.
- Moyne G.,Nash R.E., Puvion E:1977. Perichromatin granules in isolated rat hepatocytes treated with cortisol and cycloheximide.*Biol.Cell.*30;5-1.6
- Newport J., Forbes:1987.The nucleus:structure,function and dynamics.*Ann Rev.Biochem.*56:535.
- Nieburgs H. E: 1963. The significance of tissue cell changes preceding uterine cervix carcinoma.*Cancer (Philand).* 16:137.
- Nesbitt R. E., Stein A.A: 1958. A. Histochemical evaluation of carcinoma in situ of the cervix uteri. *Surg Gynec. Obstet.* 107: 161.
- Peters V. D., Giese H:1971. Elektronenmikroskopischer nachweis von DNS. *Acta Histochem.* 40: 119-125.
- Peto R: 1986. Viral etiology of cervical cancer.Cold Spring Harbor laboratory. Cold Spring Harbor. New York. 3 p.

- Petrov P., Bernhard W:1971.Experimentally induced changes of extranucleolar ribonucleoprotein components of the interphase nucleus.*J. Ultrastructure Research.*35:386-402.
- Puvion E., Viron A., Bernhard E.: 1977. Unusual acumulation of ribonucleoprotein in the nucleus of cultured rat liver cells after hipotermical shock. *Biol. Cell.* 29:81-88
- Puvion E., Moyne G:1978.Intranuclear migration of newly synthesized extranucleolar ribonucleoproteins.*Experimental Cell Reserach.*115:79-88.
- Rapp Fred., Jenkins J.F: 1981.Genital cancer and viruses. *Gynecology Oncology.*12:525-541.
- Robbins Stanley: 1990. *Patología humana. Iberoamericana. México.* pp 83-116, 574-584.
- Sceautres C:1981.La deteccion del cáncer.Mundo científico.vol (1)9:1004-1016.
- Schultz W: 1957. Die bedeutung pathologischer mitosen en frúherkennung des collumcarcinoms.En: Balanguero Llado L:1971. El carcinoma in situ del cuello uterino. *Espaxs. Barcelona.* pp.255.
- Scully E.R:1981.Definition of precursors in gynecologic cancer. *Cancer.*48:531-537.
- Shevchuk M. M., Ralph M.R: 1982.DNA content of condyloma acuminatum.*Cancer.*49:489-492.
- Spector D.L., Schrier W.H., Busch H:1983.Immunolectron microscopic localization of snRNPs.*Biol.Cell.*49:1-10.
- Vázquez-Nin G.H., Bernhard W:1971. Comparative ultraestructural study or perichromatin and Balbiani Ring Granules. *J. Ultraestruc Res.*36:842-860.
- Vázquez-Nin G. H., Chávez B., Tomas-Martin C:1973. A preferential staining method for chromatin in electron microscopy.*J. Microscopie.*16:243-246.
- Vázquez-Nin G.H., Echeverría O.M., Molina E., Fragoso J:1978. Effects of ovariectomy and estradiolinjection on nuclear structures of endometrial epithelial cells.*Acta Anat.* 102:308-318.
- Vázquez-Nin G.H., Echeverría O.M., Pedron J:1979 Effects of estradiol on the ribonucleoprotein constituents of the nucleus of cultured endometrial epithelial. *Cells. Biol. Cellulaire.*35:221-228.
- Vázquez-Nin G.H., Echeverría O., Pedron J:1979. Ultrastructural and autoradiographic study of the effects of bleomycin on the interphase nucleus of cultured normal cell. *Cancer Research.*39:4218-4223.

- Vázquez-Nin G.H., Ortega-Rangel J.R., Echeverría O.M.: 1980.  
Nuclear aspects of neuroblast differentiation in the chick embryo. *Biol. Cell.* 39: 143-146.
- Vázquez-Nin G.H., Ortega-Rangel., Echeverría O.M., María del Rosario Parra., Jimenez-García L. F.:1983. Changes in nuclear ribonucleoprotein constituents and chromatin disposition during neuronal differentiation and maturation. *Biol.Cell.*48:17-24.
- Vázquez-Nin G.H., Echeverría O.M., Fakan S., Leser G., Martin T. E.:1990. Immunoelectron microscope localization of snRNPs in the polytene nucleus of salivary glands of *Chironomus thummi*. *Chromosoma.*99:44-51.
- Verduzco S.C., Lopez C. M., Vandale T. S.:1986. Principales características epidemiológicas de la mortalidad por cáncer en México. *Salud pública. Méx.* 28:5 43-550.
- Watson M. L.: 1962. Observations on a granule associated with chromatin in the nuclei of cells of rat and mouse. *J. Cell. Biology.*13:162-167.
- Wielenga G.J., Old J.W., Von Haam E: 1965. Squamous carcinoma in situ of the uterine cervix II. Topography and clinical correlations. *Cancer (Philad).* 18: 1612.
- Wyllie A.H., Kerr J.F., Currie A.R., 1980. Cell death:the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68:251-306.
- Zalce H., Blancarte R., Nicolás C: Los programas de detección de cáncer cervicouterino y mamario en los estados de la frontera norte de México. *Salud pública de México.* Vol. XVII. 6:803-811.
- Zavala-Padilla G:1980. Cambios de las partículas ribonucleoproteicas intranucleares de las células epiteliales endometriales durante el ciclo estral de la rata. Tesis de licenciatura. *Biología.* Facultad de Ciencias. U.N.A.M. México.
- Zavala.-Padilla, Aguilar X., Jimenez-García, Echeverría., Vázquez-Nin: 1992. Changes in the ribonucleoprotein constituents of the nucleus during the differentiation of muscle cells in the chick embryo. *Biol.Cell.*76:159-165
- Zur Hausen H., De Villiers Ethel-Michele., Gissmann L: 1981. Papillomavirus infection and human genital cancer. *Gynecology Oncology.* 12:124-128.

## FIGURAS





**A. REVESTIMIENTO NORMAL**  
 Maduración normal (aplaniamiento de las células)

lámina basal  
 (1 capa de células inmaduras que constituyen la membrana (o lámina) basal)

corion mucoso con vasos

**B. DISPLASIA LIGERA**

Maduración normal en la superficie  
 anomalía citológica aislada

células inmaduras con anomalías citológicas que ocupan 1/3 del espesor del revestimiento

membrana basal  
 corion mucoso

**C. DISPLASIA MODERADA**

maduración superficial  
 células muy alargadas, aplanadas

células inmaduras con anomalías citológicas en más de la mitad de la altura del revestimiento

mitosis  
 membrana basal  
 corion mucoso

**D. DISPLASIA ACENTUADA**

maduración superficial

más de los 2/3 del revestimiento están constituidos por células inmaduras con anomalías citológicas

mitosis  
 corion mucoso

**E. CARCINOMA "IN SITU"**

ausencia de maduración en superficie

todo el espesor del revestimiento está constituido por células inmaduras con anomalías citológicas importantes

gran cantidad de mitosis  
 corion

**F. CÁNCER INVASIVO**

Corion mucoso invadido por trabéculas de células cancerosas (rotura de la lámina basal)

trabéculas de células cancerosas

Fig. 1. Muestra la imagen en microscopía óptica de tejidos que presentan la evolución de las diferentes displasias hasta llegar al verdadero cáncer (lesado invasivo A) Revestimiento cervico-uterino normal; B) Displasia leve (ligera); C) Displasia moderada; D) Displasia acentuada (o grave); E) Carcinoma "in situ"; esta lesión considerada como el estadio ceto del cáncer, en el que las células tumorales todavía no han invadido los otros tejidos y permanecen en el seno del revestimiento epitelial ocupándolo en su totalidad. La membrana basal permanece intacta y bien conservada. F) Cáncer invasivo: las células cancerosas, después de la rotura de la membrana basal, invaden el corion subyacente. La cancerización se extiende a los tejidos vecinos y progresivamente llega a los ganglios linfáticos próximos, dando origen a metastasis regionales. (Según J. Chasie, centro F. Badelass, Casen.). Tomado de Catherine Scautras, 1981. Mundo Científico. Vol. 1:9. 1004-1016.



Fig.2. Esquema del núcleo celular interfásico de una célula normal (A) y de una célula cancerosa (B), realizado por Bernhard y Gramboulan (1963). 1) Cromatina; 2) Cromatina perinucleolar; 3) Substancia intercromatínica; 4) Nucléolo; 5) Gránulos intercromatínicos; 6) Gránulos pericromatínicos; 7) Poros nucleares; 8) Invaginación de la membrana nuclear. Se han incluido todas las partes, aún cuando no hay una técnica que permita verlas a un mismo tiempo.

TABLA I. VOLUMEN NUCLEAR EN  $\mu\text{m}$

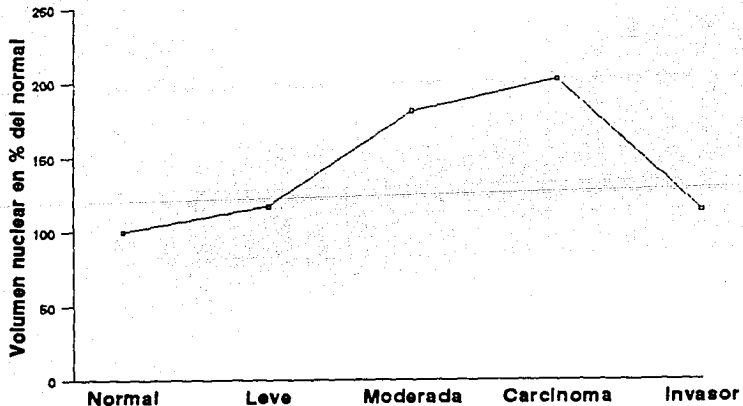
ESTADIO	ESTRATO BASAL	ESTRATO MEDIO	ESTRATO SUPERFICIAL	SIN CAPAS
	Vol.Nu. X D.E.	Vol.Nu. X D.E.	Vol.Nu. X D.E.	
EPITELIO NORMAL	58.3 ± 21.5	60.2 ± 13.0	154.0 ± 9.82	
DISPLASIA LEVE	71.5 ± 21.1	104.8 ± 12.7	134.0 ± 44.7	
DISPLASIA MODERADA	147.3 ± 110.2	118.8 ± 79.1	153.9 ± 56.6	
DISPLASIA SEVERA	50.6 ± 29.4	62.3 ± 28.1	140.5 ± 95.2	
CARCINOMA "IN SITU"	214.9 ± 27.5	264.7 ± 80.3	204.9 ± 16.3	
CANCER INVASOR				81.7 ± 8.17
				143.7 ± 54.5

Vol.Nu.: Volumen nuclear en  $\mu\text{m}$ .

X: Media prosedio

D.E.: Desviación estándar

## VOLUMEN NUCLEAR

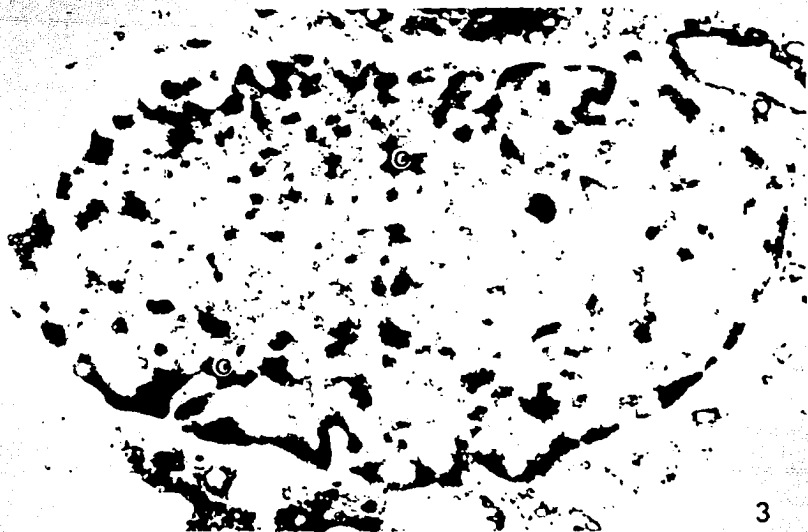


← Porcentaje

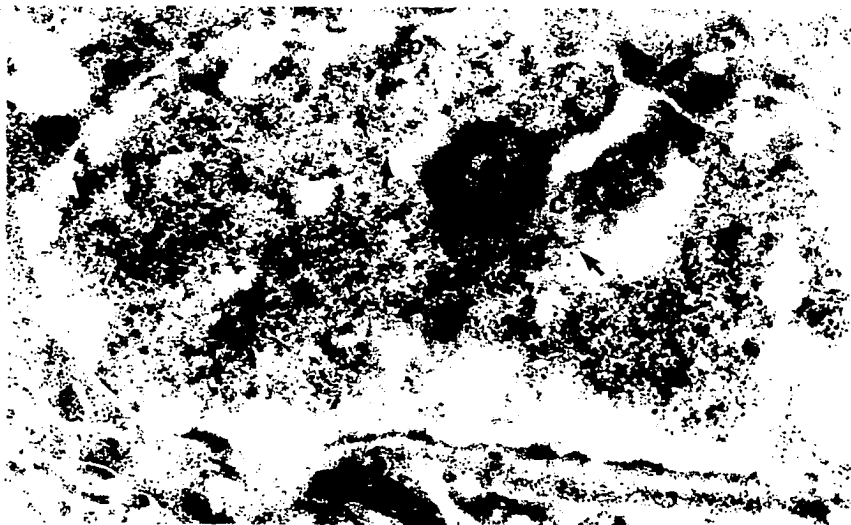
Gráfica 1. Representa el volumen nuclear en distintos estados patológicos del epitelio cérvico-uterino.

**Fig.3. Núcleo de una célula normal ubicada en el estrato medio. Contraste preferencial para ADN a base de PTA; se observa la cromatina compacta (c) en color oscuro adyacente a la envoltura nuclear y algunos grumos distribuidos en el nucleoplasma, las zonas en gris representan áreas de ribonucleoproteínas. Aprox 16,000 X.**

**Fig.4. Núcleo celular interfásico de una célula normal del estrato basal. Técnica regresiva de contraste preferencial para ribonucleoproteínas a base de EDTA. Se aprecian estructuras como: el nucleolo (n) rodeado por cromatina perinucleolar (c), gránulos pericromatinianos con su halo característico (flecha), cúmulos de gránulos intercromatinianos mezclados con fibras (cabeza de flecha) así como fibras pericromatinianas (fp) al borde de la cromatina compacta (c). Aprox 28.750 X.**

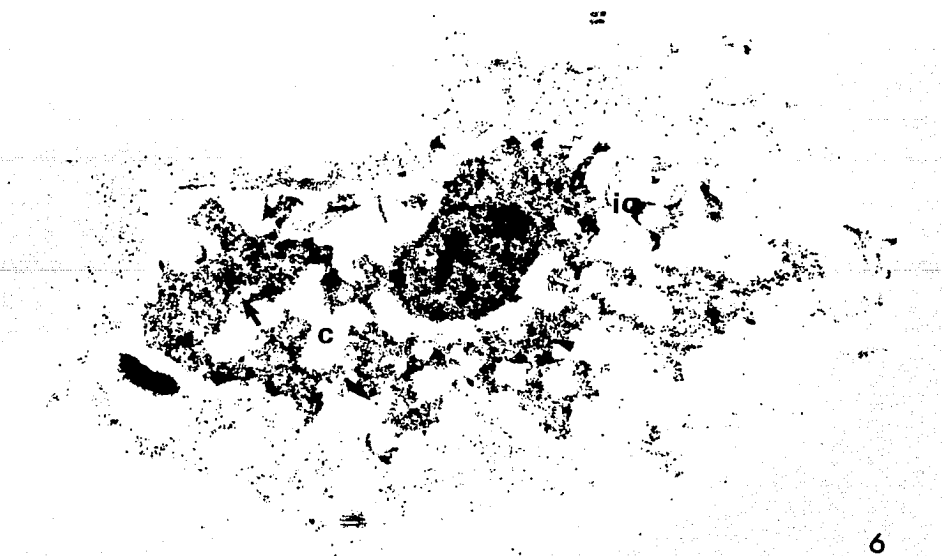
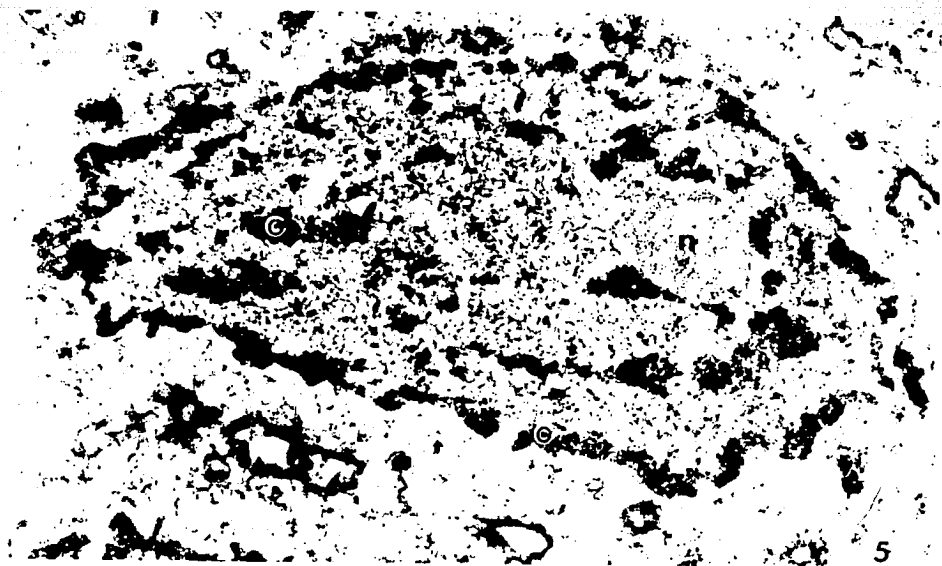


3



**Fig.5. Núcleo celular de una célula ubicada en el estrato basal con displasia severa. Tinción con PTA; la cromatina compacta (c) está formando una capa discontinua en contacto con la membrana nuclear, alrededor del nucleolo (n) y en cúmulos dispersos en el espacio nuclear, las ribonucleoproteínas están representadas en gris. Aprox 20,800 X.**

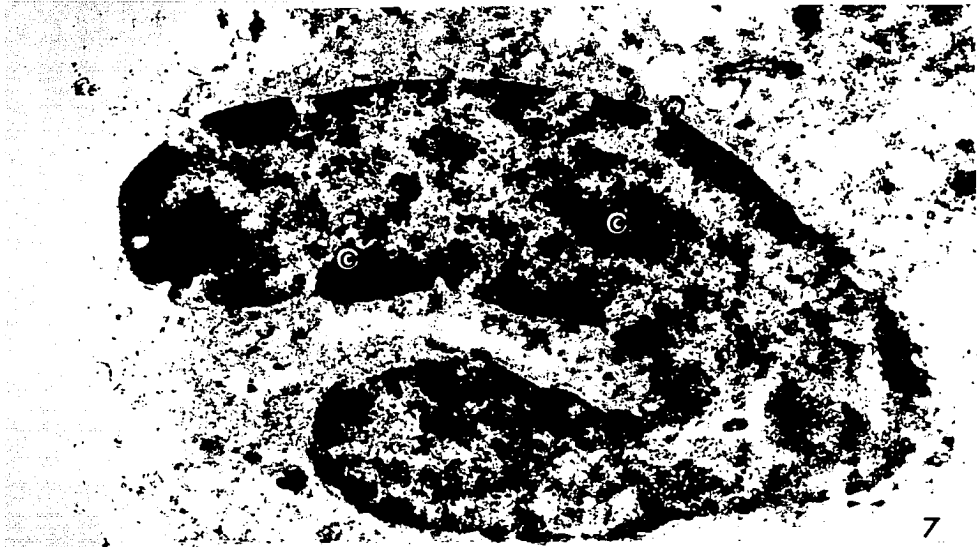
**Fig.6. Núcleo de una célula de la capa media con displasia severa. Tinción con EDTA, el nucleolo (n) es compacto, los gránulos pericromatinianos no están restringidos a la región pericromatiniana (flecha), abundantes cúmulos de gránulos intercromatinianos mezclados con fibras (cabeza de flecha), la cromatina compacta (c) se observa blanqueada, inclusiones citoplasmáticas (ic). Aprox 22,400 X.**



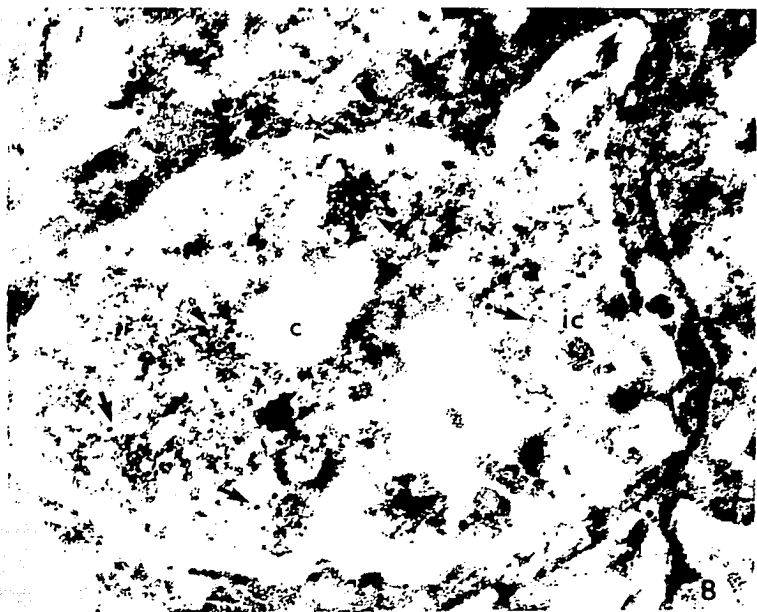
**Fig.7. Núcleo de una célula con cáncer invasor. Contraste con PTA; la cromatina compacta (c) es abundante en contacto con la membrana nuclear y algunos grumos distribuidos en el nucleoplasma, donde se encuentran las estructuras ribonucleoproteicas representadas en gris. Aprox 38,750 X.**

**Fig.8. Núcleo de una célula con cáncer invasor. Contraste con EDTA; se observan varios GPC (flecha) al borde de la cromatina compacta (c), cúmulos de gránulos intercromatinianos mezclados con fibras (cabeza de flecha), inclusiones citoplasmáticas (lc). Aprox 30,000 X.**





7



8

**Fig.9. Núcleo de una célula con cáncer invasor. Contraste con PTA; la cromatina compacta (c) es poca en contacto con la membrana nuclear, alrededor del nucleolo (n) y escasos grumos distribuidos en el nucleoplasma, donde se encuentran las ribonucleoproteínas. Aprox 26,250 X.**

**Fig.10. Núcleo de una célula con cáncer invasor. Contraste con EDTA; el nucleolo (n) es compacto, pocos GPC (flecha) al borde de la cromatina compacta, cúmulos de gránulos intercromatinianos mezclados con fibras (cabeza de flecha). Aprox 25,000 X.**

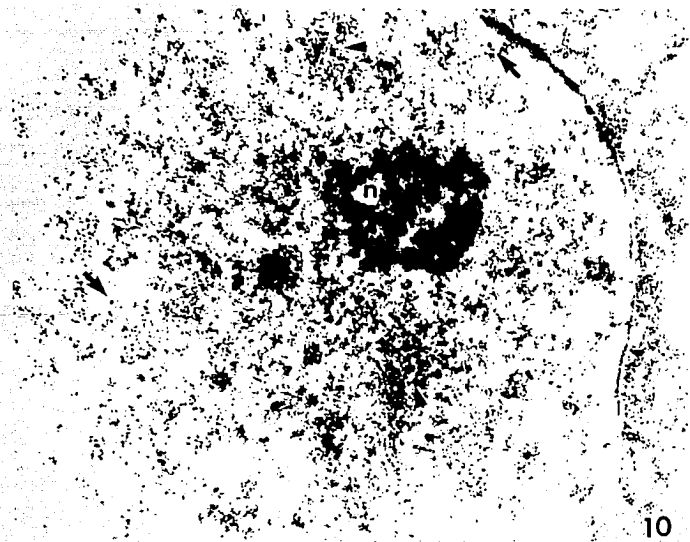
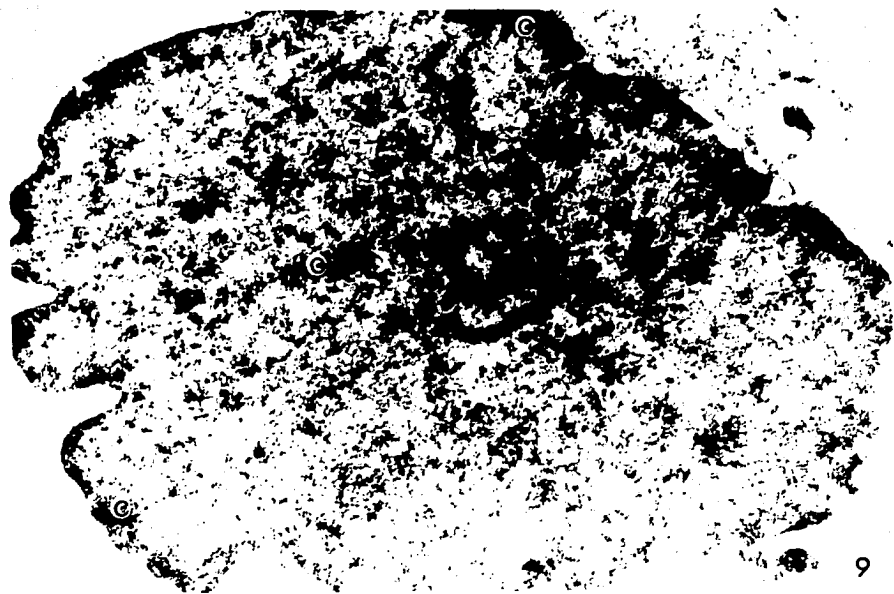


TABLA II. DIFERENCIAS EN LA ULTRAESTRUCTURA DE LOS NUCLEOS DE CELULAS DEL ESTRATO BASAL DEL EPITELIO NORMAL CON LOS NUCLEOS DE LOS DIFERENTES GRADOS DE MALIGNIZACION.

	EPITELIO NORMAL	DISPLASIA LEVE	DISPLASIA MODERADA	DISPLASIA SEVERA	CARCINOMA "IN SITU"
FORMA NUCLEAR	Alargada irregular	*	*	*	Pleomórficos
MEMBRANA NUCLEAR	Pequeñas invaginaciones	*	Invaginaciones con lobulaciones profundas.	Invaginaciones con lobulaciones profundas.	Invaginaciones con lobulaciones profundas.
CRÓMATINA COMPACTA	Abundante, capa discontinua en contacto con la M.N. y varios cúmulos.	Capa discontinua en contacto con la M.N. y abundantes cúmulos.	Capa discontinua y varios cúmulos.	Capa discontinua de grosor variable en contacto con la M.N. y varios cúmulos.	Capa de grosor variable en contacto con la M.N.
NUCLEOLO	Compactos	*	*	*	Gral. más de dos compactos y decompactados.
GRANULOS PERICROMATINIANOS	Numerosos al borde de la Cr. C.	*	Numerosos y no restringidos a la Re. Pe.	Pocos al borde Cr. C.	Pocos al borde Cr. C.
FIBRAS PERICROMATINIANAS	Numerosas en la periferia.	*	*	Poca en la periferia.	Abundantes en la periferia
GRANULOS INTERCROMATINIANOS	Abundantes en el Es. Nu.	*	*	Abundantes en el Es. Nu.	*
OTRAS ESTRUCTURAS	No presenta	Inclusiones citoplasmáticas	*	*	Cuerpos nucleares en el Es. Nu.

M.N.: Membrana nuclear  
 Cr. C.: Cromatina compacta  
 Es. Nu.: Espacio nuclear  
 Re. Pe.: Región pericromatiniiana  
 \* : Mismas características del epitelio normal

TABLA III. DIFERENCIAS EN LA ULTRAESTRUCTURA DE LOS NUCLEOS DE CELULAS DEL ESTRATO MEDIO DEL EPITELIO NORMAL CON LOS NUCLEOS DE LOS DIFERENTES GRADOS DE MALIGNIZACION.

	EPITELIO NORMAL	DISPLASIA LEVE	DISPLASIA MODERADA	DISPLASIA SEVERA	CARCINOMA "IN SITU"
FORMA NUCLEAR	Alargada irregular	*	*	*	Pleomórficos
MEMBRANA NUCLEAR	Pequeñas invaginaciones	Invaginaciones profundas.	Invaginaciones profundas.	Invaginaciones profundas.	Invaginaciones con lobulaciones profundas.
CRÓMATINA COMPACTA	Abundante, en contacto con la M.N. y varios cúmulos.	Capa discontinua en contacto con la M.N. y abundantes cúmulos.	Capa discontinua de grosor variable y numerosos cúmulos.	Capa discontinua de grosor variable en contacto con la M.N. y varios cúmulos	Capa de grosor variable en contacto con la M.N. y numerosos cúmulos.
NUCLEOLO	Compacto	*	Gral. uno o dos compactos.	Gral. uno o dos compactos.	Compactos y decompactados.
GRANULOS PERICROMATINIANOS	Numerosos al borde de la Cr. C.	*	Numerosos y no restringidos a la Re. Pe.	Pocos en la Re. Pe.	Escaras al borde de la Cr. C. en algunos y muy abundantes en otros.
FIBRAS PERICROMATINIANAS	Numerosas cercanas a la Cr. C.	*	*	*	*
GRANULOS INTERCROMATINIANOS	Abundantes en el Es. Nu.	*	*	*	Numerosos en el espacio intercromatiniiano
OTRAS ESTRUCTURAS	No presenta	Inclusiones citoplasmáticas	Inclusiones citoplasmáticas y cuerpos nucleares.	*	*

M.N.: Membrana nuclear  
 Cr. C.: Cromatina compacta  
 Es. Nu.: Espacio nuclear  
 Re. Pe.: Región pericromatiniiana  
 \* : Mismas características del epitelio normal

TABLA IV. DIFERENCIAS EN LA ULTRAESTRUCTURA DE LOS NUCLEOS DE CELULAS DEL ESTRATO SUPERIOR DEL EPITELIO NORMAL CON LOS NUCLEOS DE LOS DIFERENTES GRADOS DE MALIGNIZACION.

	EPITELIO NORMAL	DISPLASIA LEVE	DISPLASIA MODERADA	DISPLASIA SEVERA	CARCINOMA "IN SITU"
FORMA NUCLEAR	Alargada irregular	*	*	*	Pleomórficos
MEMBRANA NUCLEAR	Pequeñas invaginaciones	Invaginaciones profundas.	Invaginaciones profundas.	Invaginaciones profundas.	Invaginaciones con lobulaciones profundas.
CRONATINA COMPACTA	Capa discontinua en contacto con la M.N. y cúmulos.	Capa discontinua de grosor variable.	Capa discontinua y numerosos cúmulos.	Capa discontinua en contacto con la M.N. y varios cúmulos.	Capa discontinua y abundantes cúmulos.
NUCLEOLO	No presenta	Compacto	Compacto y descompactados.	Compactos	Compactos
GRANULOS PERICROMATINIANOS	Pocos al borde de la Cr. C.	*	*	Escasos en la Re. Pe.	Escasos al borde de la Cr. C.
FIBRAS PERICROMATINIANAS	Pocas cercanas a la Cr. C.	*	*	*	Pocas
GRANULOS INTERCROMATINIANOS	Abundantes cúmulos en el Es. Nu.	*	*	Pocos en el espacio intercromatiniario.	Numerosos en el espacio intercromatiniario
OTRAS ESTRUCTURAS	No presenta	Inclusiones citoplasmáticas	Inclusiones citoplasmáticas y cuerpos nucleares.	*	Cuerpos nucleares

M.N.: Membrana nuclear  
 Cr. C.: Cronatina compacta  
 Es. Nu.: Espacio nuclear  
 Re. Pe.: Región pericromatiniaria  
 \*: Mismas características del epitelio normal

TABLA V. CARACTERISTICAS ULTRAESTRUCTURALES DE LOS NUCLEOS DE CELULAS EPITELIALES CON CANCER INVASOR.

	CANCER INVASOR
FORMA NUCLEAR	Pleomórficos
MEMBRANA NUCLEAR	Invaginaciones con lobulaciones profundas.
CRONATINA COMPACTA	Abundante en contacto con la M.N. en algunos casos o poca en otros y varios o escasos cúmulos.
NUCLEOLO	Generalmente dos por núcleo, compactos o descompactados.
GRANULOS PERICROMATINIANOS	Pocos en la Re. Pe. en algunos casos o muy abundantes en otros.
FIBRAS PERICROMATINIANAS	Pocas en algunos casos o muy abundantes en otros.
GRANULOS INTERCROMATINIANOS	Numerosos en el espacio intercromatiniario.
OTRAS ESTRUCTURAS	Cuerpos nucleares e inclusiones citoplasmáticas

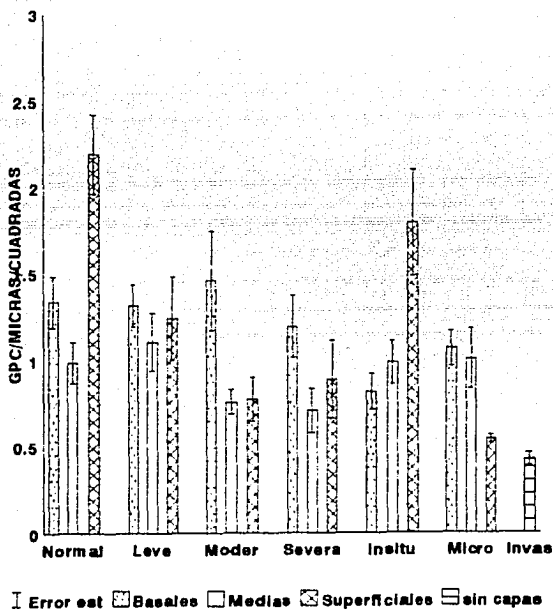
M.N.: Membrana nuclear  
 Re. Pe.: Región pericromatiniaria

TABLA VI. DIFERENCIAS EN LA ULTRAESTRUCTURA DE LOS NUCLEOS DE CELULAS DEL EPITELIO NORMAL CON LOS NUCLEOS DE LOS DIFERENTES ESTADIOS DE MALIGNIZACION.

	EPITELIO NORMAL	DISPLASIA LEVE	DISPLASIA MODERADA	DISPLASIA SEVERA	CARCINOMA "IN SITU"	CANCER INVASOR
FORMA NUCLEAR	Alargada irregular	Alargada irregular	Alargada irregular	Alargada irregular	Pleonórficos	Pleonórficos
MEMBRANA NUCLEAR	Pequeñas invaginaciones	Invaginaciones pequeñas en algunos casos y profundas en otros.	Invaginaciones profundas.	Invaginaciones con lobulaciones profundas.	Invaginaciones con lobulaciones profundas.	Invaginaciones con lobulaciones profundas.
CROMATINA COMPACTA	Abundante en contacto con la M.N.	Capa discontinua y abundantes cúmulos.	Capa discontinua y varios cúmulos.	Capa discontinua y numerosos cúmulos.	Capa discontinua y abundantes cúmulos.	Abundantes en contacto con M.N. o pocos
NUCLEOLO	Compactos	Compactos	Compactos y descompactados	Compactos	Generalmente uno o dos compactos o descompactados.	Generalmente dos por núcleo, compactos o descompactados.
GRANULOS PERICROMATINIANOS	Numerosos al borde de la Cr. C. en algunos casos o pocos en otros.	Numerosos y no restringidos a la Re. Pe. en algunos casos o pocos en otros.	Abundantes y no restringidos a la Re. Pe. o pocos en otros casos.	Pocos en la Re. Pe.	Pocos al borde de la Cr. C. o muy abundantes.	Pocos en la Re. Pe. o muy abundantes.
FIBRAS PERICROMATINIANAS	Numerosas en la Re. Pa. en algunos casos y pocas en otros.	Abundantes	Numerosas en la Re. Pe.	Pocas o varias en otros casos	Numerosas en el espacio inter-cromatínico y al borde de la Cr. C.	Pocas en algunos casos o muy abundantes en otros.
GRANULOS INTERCROMATINIANOS	Abundante en el Es. Nu.	Numerosos	Abundantes en el Es. Nu.	Numerosos o pocos	Abundantes	Numerosos en el espacio inter-cromatínico
OTRAS ESTRUCTURAS	No presentan	Inclusiones citoplasmáticas	Inclusiones citoplasmáticas y cuerpos nucleares.	No presentan.	Cuerpos nucleares	Cuerpos nucleares e inclusiones citoplasmáticas

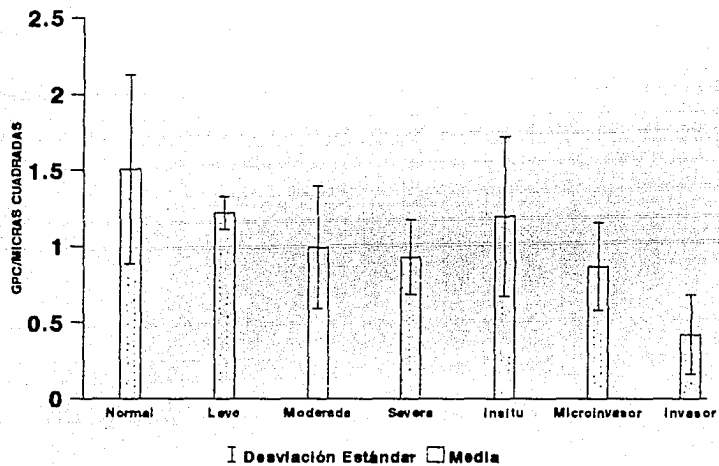
M.N.: Membrana nuclear  
 Cr. C.: Cromatina compacta  
 Es. Nu.: Espacio nuclear  
 Re. Pe.: Región pericromatínica

## GRANULOS PERICROMATINIANOS



Gráfica 2. Representa la variación de los GPC durante la evolución del cáncer cérvico-uterino, en los siete estadios estudiados.

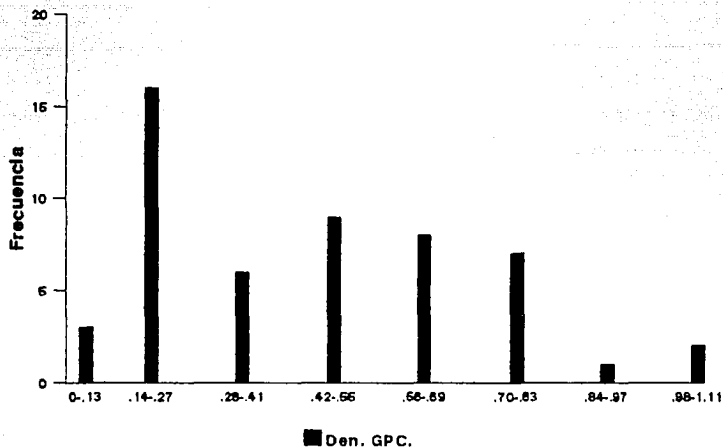
## GRANULOS PERICROMATINIANOS



Gráfica 3. Representa la variación de los GPC durante la evolución del cáncer cérvico-uterino, en los siete estadios estudiados

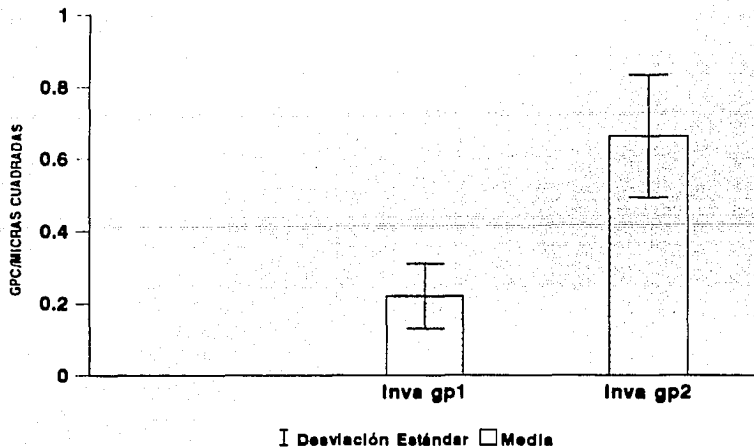


## HISTOGRAMA DE FRECUENCIA CANCER INVASOR



Gráfica 4. El histograma muestra la frecuencia de la densidad de los gránulos pericromatinianos en la población celular del cáncer invasor.

## GRANULOS PERICROMATINIANOS CANCER INVASOR



Gráfica 5. Representa la variación de los GPC, en las dos poblaciones celulares del cáncer invasor.

TABLA VII. FRACCCION DEL AREA NUCLEAR OCUPADA POR CROMATINA COMPACTA.

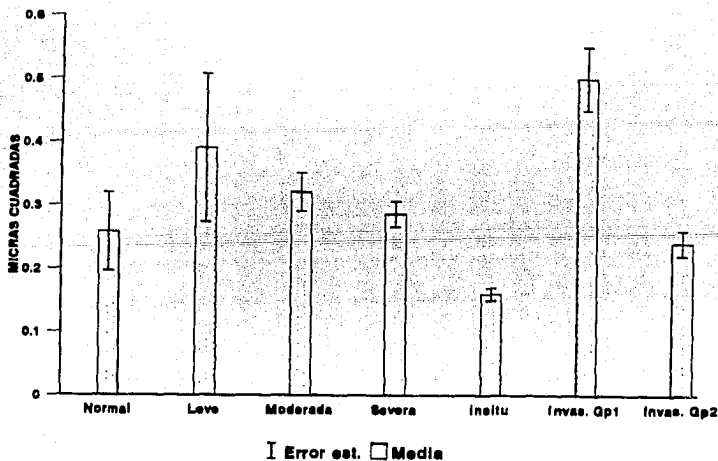
ESTADIO	ESTRATO BASAL Ac/An		ESTRATO MEDIO Ac/An		ESTRATO SUPERFICIAL Ac/An		SIN CAPAS Ac/An	
	X	E.s.	X	E.s.	X	E.s.	X	E.s.
EPITELIO NORMAL	0.52	± 0.11	0.11	± 0.03	0.33	± 0.13		
DISPLASIA LEVE	0.11	± 0.12	0.09	± 0.17	0.20	± 0.11		
DISPLASIA MODERADA	0.31	± 0.03	0.37	± 0.04	0.14	± 0.03		
DISPLASIA SEVERA	0.24	± 0.05	0.22	± 0.02	0.09	± 0.03		
CARCINOMA "IN SITU"	0.11	± 0.03	0.15	± 0.01	0.24	± 0.01		
CANCER INVASOR							0.4	± 0.03
							0.13	± 0.03

Ac/An.: Fracción del área ocupada por cromatina compacta.

X.: Media proaedio

E.s.: Error estándar

## CROMATINA COMPACTA



Gráfica 6. Representa la variación de la cromatina compacta durante la evolución del cáncer cérvico-uterino, en los seis estadios estudiados