



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ANEUPLOIDÍA E INFLAMACIÓN EN
TEJIDO CÉRVICO-UTERINO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

LUISRAEL SANTIAGO CRUZ



TUTORA
DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

Formato	Ejemplo
<p>1. Datos del alumno Apellido paterno Apellido materno Nombre(s) Teléfono Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Carrera Número de cuenta</p>	<p>1. Datos del alumno Santiago Cruz Luisrael 56715723 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 404033035</p>
<p>2. Datos del tutor Grado Nombre (s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>2. Datos del tutor Dra María Eugenia Gonsebatt Bonaparte</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Grado Nombre (s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>3. Datos del sinodal 1 Dr Luis Felipe Jiménez García</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Grado Nombre (s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>4. Datos del sinodal 2 Dra María de Lourdes Segura Valdez</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Grado Nombre (s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>5. Datos del sinodal 3 Dra Leticia Rocha Zavaleta</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 Grado Nombre (s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>6. Datos del sinodal 4 Dra Regina Dorinda Montero Montoya</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito Título Número de páginas Año</p>	<p>7. Datos del trabajo escrito Aneuploidía e inflamación en tejido cérvico-uterino 81 páginas 2009</p>

Agradezco a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) el apoyo que me otorgó durante la realización de esta tesis a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT). Proyecto número IN216605.

Esta tesis fue desarrollada en el Laboratorio 3 de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental a cargo de la doctora María Eugenia Gonsbatt Bonaparte, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

A la mujer casta y risueña...

... o mi "madre que no tuvo hijos, sino síntomas"

Juan José Millás

Y al hombre del fuego y la leña...

*... porque "nunca alegre vivirás si por
voluntad de muchos te riges"...*

Fernando de Rojas, 1499

*Tanto sabe Dios como yo sé
Que lo mejor siempre nos dieron,
Y nos desean con amor y fe
Se cumplan los ideales soñados,
Mas si creen que en algo fallaron...
No es así, son los caminos tomados...*

Matriz (fragmento), 2004

Cuando en la escuela primaria, en mi natal Putla Villa de Guerrero, en el estado de Oaxaca, yo me pronuncié como un entusiasta niño de apenas 11 o 12 años que deseaba estudiar para físico-matemático y además en la mayor casa de estudios que México puede tener, la UNAM, sólo dos personas compartieron mi prematuro y ambicioso sueño... Bertina y Sebastián, mis padres. Ellos me acompañaron física o mentalmente en mis juveniles recorridos y hasta en mis más perniciosas ensoñaciones durante la secundaria y el bachillerato cuando por fin me decidí a estudiar la ciencia en la que ahora intento probarme como posible profesional.

Allí estaban ellos, ¡al pie del cañón! como solemos decir. Cuando viajé aquí al Distrito Federal a presentar el examen de selección a esta casa de estudios. Cuando intenté en otra universidad, por sí "las moscas" y no era aceptado en la UNAM. Estuvieron delante de mí cuando dije: ¡he sido aceptado, aprobé el examen! Y desde luego, han estado conmigo en esta larga y maravillosa travesía que ha sido mi educación superior. Así que por supuesto agradezco a mis padres la oportunidad que me han dado, que crean en mí, porque sin ellos este sueño simplemente habría sido difícil de lograr...

Hay tantas personas más a las que agradecer, a mis hermanas Isis y Adriana, por ejemplo, que también han compartido mis alegrías y más aún cuando han tenido que soportar mis cambios de humor y sin embargo se han quedado conmigo.

A las familias Guzmán Cruz, Torres Guzmán y Guzmán García, tíos y primos, que han hecho muy agradable mi estancia, su apoyo es invaluable y se los agradezco con mucho cariño.

A mis motores o mis niños, en cuya avidez por aprender y en la esperanza que su formación representa para la sociedad me he esforzado y exigido, aunque en ocasiones la pereza me hace presa. Mis niños Adán, Sharik, Evelyn, Charito, Erandi, y Alan de quien el ánimo y el deseo de vivir inquebrantables son un estímulo constante.

A esos amigos de la infancia de los que no sólo guardo el recuerdo, pues aún conservo el placer de llamarlos amigos, mis veintiúnicos amigos: Narda, Noemí, Verónica, José Manuel y Moisés. Gracias por seguir conmigo.

A la doctora Silvia Zárate quien me asistió en los días de enfermo y fue, además, un par de oídos maravillosos siempre atentos a escucharme, gracias.

A mis profesores y amigos de mi vida como estudiante, gracias. Principalmente a los del Colegio de Bachilleres.

A mis queridos amigos de carrera Citlalli, Marisol, Tania, Eduardo, Giovanni y José Luis, con quienes empecé esta aventura, gracias por su amistad, su tiempo, las charlas, la compañía, los juegos. Gracias amigos.

A mis maestros y amigos, en la Universidad, Mariana Nava y Roberto Márquez que me han recordado que siempre existen otros horizontes por andar en esta ciencia.

A mi maestra y amiga Alette, por su amistad, entusiasmo, palabras y apoyo incondicional.

A la doctora Patricia Ramos por el maravilloso taller que tiene a cargo pues fue en este taller donde esta tesis comenzó a ser realidad.

A la doctora María Eugenia Gonsebatt por su confianza, por aceptarme primero en su grupo y luego incluirme en este maravilloso proyecto, gracias por su tiempo, su paciencia y su gran apoyo.

A mis sinodales, los doctores Luis Felipe Jiménez García, María de Lourdes Segura Valdez, Leticia Rocha Zavaleta y Regina Dorinda Montero Montoya, cuyas sugerencias y comentarios han terminado de moldear esta tesis.

A todos los que participan y participaron en el laboratorio de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental durante mi estancia: la doctora Julieta Rubio por ser guía, el doctor Pavel Petrosyan por hacer del trabajo en el laboratorio una actividad amena. Por su amistad y aportaciones a Wendy, César, Jorge, Manuel, Miriam, Rebeca, Celeste, Alicia, Karol, Mariana, Camilo, Roxanna, Dannia, Nidia. A Danny que siempre ha sido apoyo y confianza. A Elsa, gracias por permitirme compartir tu trabajo, aprender de ti, intercambiar ideas, ser amigos incluso y hasta discutir. Muchas gracias.

Tal vez no todos a los que agradezco ahora puedan enterarse que lo hago, quizás algunos a quienes tengo en alta estima y lean este documento yo haya olvidado mencionar, pero a todos los que de una u otra manera han participado en mi vida les agradezco.

Gracias a los forjadores del conocimiento, a los que fueron, a los que son y a los que serán, porque la vida tiene sentido en la incesante curiosidad del hombre.

Agradecimientos colosales a mi Universidad, gracias por esta oportunidad de llamarme "universitario" a tu amparo. Gracias a aquellos que te dieron autonomía y a quienes hacen de ti una entidad viva.

Y los últimos agradecimientos, al proceso maravilloso de la evolución, a la conjunción irrenunciable de las leyes físicas, químicas y biológicas que han derivado y organizado la materia en lo que conocemos y somos hoy. Gracias a este momento sorprendente que es la vida.

Luisrael Santiago Cruz

*“Lo que he buscado toda mi vida
es comprender el misterio de la naturaleza”*

Leonardo Da Vinci

*“... el cocodrilo, al igual que los esclavos de ideas fijas,
era un animal estúpido.”*

Sir James Matthew Barrie

ÍNDICE

I.	RESUMEN	11
II.	INTRODUCCIÓN	12
A.	CÁNCER Y ANEUPLOIDÍA	14
1.	La teoría mutacional	16
2.	La teoría aneuploide del cáncer	19
B.	MECANISMOS DE GENERACIÓN DE LA ANEUPLOIDÍA	20
1.	Errores durante el ciclo celular	20
2.	La tetraploidía como fuente de aneuploidía	26
C.	IDENTIFICACIÓN DE ANEUPLOIDÍAS EN MUESTRAS CELULARES	27
1.	Hibridación <i>in situ</i>	28
D.	CÁNCER DEL CUELLO UTERINO (CaCU)	30
1.	El cuello del útero	30
2.	Clasificación de las lesiones intrauterinas	32
3.	El virus del papiloma humano (HPV)	37
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	42
IV.	HIPÓTESIS	43
V.	OBJETIVO GENERAL	43
A.	Objetivos particulares	43
VI.	JUSTIFICACIÓN	44
VII.	MATERIAL Y MÉTODOS	45
A.	Marcadores de genotoxicidad	45
B.	Procedimiento general para el análisis de aberraciones cromosómicas numéricas a través de la hibridización <i>in situ</i>	45
1.	Obtención de las muestras de tejido	45
2.	Fijación de las muestras celulares	46

3.	Pretratamiento	46
4.	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	47
5.	Lavados y Revelado	48
6.	Observación de las hibridaciones	48
C.	Análisis estadístico	50
VIII.	RESULTADOS	52
A.	Inestabilidad cromosómica en células del cuello uterino con diagnóstico de “inflamación”	52
1.	Análisis de los cariotipos más frecuentes	52
2.	Estructura de los cariotipos cromosómicamente desbalanceados	55
B.	La aneuploidía en relación con otros factores etiológicos	63
1.	Aneuploidía y poliploidía en muestras HPV positivas	63
2.	La edad	64
3.	Tabaquismo	66
IX.	DISCUSIÓN	68
X.	CONCLUSIONES	74
A.	Perspectivas	75
XI.	BIBLIOGRAFÍA	76

LISTA DE ABREVIATURAS

A, T, G, C	Bases nitrogenadas: Adenina, Timina, Guanina y Citosina
APC/C	Complejo promotor de la anafase/Ciclosoma
ASC	Células escamosas atípicas
ASC-H	Células escamosas atípicas, no es posible descartar HSIL
ASC-US	Células escamosas atípicas de significado indeterminado
BER	Reparación por escisión de bases
CA	Carcinoma
CaCu	Cáncer del cuello uterino
Cdk	Ciclina dependiente de cinasas
CIN	Neoplasia cervical intraepitelial
CIS	Carcinoma <i>in situ</i>
cr.	Cromosoma
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSB	Rompimiento de dos cadenas
EBV	Virus de Epstein-Barr
FISH	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente
GIN	Inestabilidad genómica
GST	Gen (es) supresor (es) de tumores
HBV	Virus de la hepatitis B
HCV	Virus de la hepatitis C
HeLa	Línea celular de cáncer de cuello uterino
HPV	Virus del papiloma humano
HPV-HR	Virus del papiloma humano de alto riesgo
HPV-LR	Virus del papiloma humano de bajo riesgo
HSIL	Lesión intraepitelial de células escamosas de alto grado
HTLV-1	Virus del linfoma humano de células T tipo 1
IARC	International Agency for Research on Cancer
INEGI	Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática
ISH	Hibridación <i>in situ</i>
KA	Atipia koilocítica
LSIL	Lesión intraepitelial de células escamosas de bajo grado
M-FISH	FISH múltiple
MIN	Inestabilidad microsatelital
MMR	Reparación mismatch o de apareamientos erróneos
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NER	Reparación por escisión de nucleótidos
NILM	Negativo para lesión intraepitelial maligna
NOS	Sin especificar
PBS	Búfer de fosfatos
RNA	Ácido ribonucleico
RNOS	Especies reactivas del nitrógeno
ROS	Especies reactivas del oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
SIL	Lesiones intraepiteliales escamosas
SKY	Cariotipo espectral
SSB	Rompimiento de una cadena
SSC	Solución de sales de citrato
SV40	Virus del simio 40
WHO	World Health Organization

I. RESUMEN

<<omnis cellula e cellula>> Françoise-Vincent Raspail

“Donde surge una célula, ahí debió existir una célula predecesora, de la misma manera en que los animales sólo pueden descender de otros animales y las plantas de otras plantas”, este es el segundo principio de la teoría celular citada hace ya 150 años por el patólogo alemán Rudolf Virchow. De acuerdo con este principio todas las células vivas son el resultado de la división de células preexistentes, y las células de un tumor con capacidad de reproducción clonal no son la excepción, pues son consecuencia de la reproducción de células que adquirieron en algún momento de su ciclo vital alguna anomalía molecular que representó una ventaja proliferativa, un proceso de selección natural a nivel celular. La adquisición de estas ventajas ha sido descrita en innumerables trabajos de investigación en cáncer y sabemos que es un proceso paulatino. Los modelos de carcinogénesis actuales describen a la transformación maligna como un proceso que requiere de varias etapas como la iniciación, la promoción y la progresión. Por ello entre la adquisición de eventos transformantes y el desarrollo del cáncer podemos desarrollar prácticas de diagnóstico temprano basadas en la identificación de tales eventos transformantes. En este trabajo analizamos la presencia de células con alteraciones cromosómicas numéricas en pacientes con diagnóstico de inflamación del cuello uterino. El cáncer de este tejido cérvicouterino representa un problema importante de salud pública en México. Nosotros evaluamos la frecuencia de anomalías cromosómicas numéricas, que es la forma más común de inestabilidad cromosómica en las células tumorales, como marcador de genotoxicidad en muestras de tejido cervicouterino con diagnóstico de inflamación. Estudios previos han utilizado las aberraciones cromosómicas como marcadores de genotoxicidad y un estudio anterior correlacionó satisfactoriamente la frecuencia de cariotipos poliploides/aneuploides con el grado de lesión del tejido del cuello del útero. Los resultados obtenidos en el presente estudio permitieron observar que en tejido inflamado se detectan alteraciones en el número de cromosomas que anteriormente habían sido descritas en lesiones de mayor grado, y que estas anomalías son, al parecer, resultado del proceso inflamatorio *per se*. Nuestros resultados sugieren que la condición inflamatoria contribuye de manera significativa al desarrollo de inestabilidad cromosómica en el tejido por lo que el análisis de variaciones en el cariotipo en los tejidos inflamados apoyaría el diagnóstico y la toma de decisiones en el tratamiento que debe seguir la paciente.

II. INTRODUCCIÓN

El siglo XIX y el XX provocaron una reforma en la práctica de la biología y en la manera de entender los fenómenos biológicos, incluidas las enfermedades, a los que el hombre se encuentra expuesto. Aunque si bien Heráclito y Aristóteles, entre otros en la antigua Grecia, habían conseguido ya la sistematización del conocimiento sobre el hombre, no fue sino hasta los dos siglos pasados que los descubrimientos científicos generados en diversas áreas permitieron una visión regenerada de la biología (Jiménez, 2006).

En el siglo XIX el planteamiento de la teoría celular por Theodor Schwann y Matthias Schleiden, la teoría evolutiva de Darwin, las observaciones sobre transmisión de caracteres (herencia) en plantas de Gregor Mendel, la superación de la teoría de la generación espontánea por Louis Pasteur, entre otros hallazgos, originaron la biología moderna (Jiménez, 2006) y allanaron el camino para el surgimiento de una nueva rama científica, la genética molecular. Esta nueva aproximación de la biología nace al amparo de algunos descubrimientos y conclusiones del siglo XX: el redescubrimiento de las leyes de Mendel por Carl Correns, Hugo de Vries y Eric Von Tschermak (1900); la proposición de la “Teoría cromosómica de la herencia” basada en el paralelismo entre los factores de Mendel y la conducta de los cromosomas en la meiosis por Boveri y Sutton en 1902; en la década de los 20, el equipo de Thomas Morgan descubrió la herencia ligada al sexo, proponen que los genes están en los cromosomas y demuestran la teoría cromosómica mediante la no disyunción del cromosoma X; y la determinación de la estructura del ácido desoxirribonucleico (DNA) en 1953 por James Watson y Francis Crick.

La genética molecular ha favorecido el estudio de la genética humana con numerosas aplicaciones en el área de la salud. Ahora somos capaces de entender algunas enfermedades a partir de las características genéticas y celulares del tejido donde se localiza o genera la patología, y relacionarlo con el efecto sistémico que puede ocasionar. En este sentido la toxicología en su aproximación genética y la epidemiología molecular plantean y favorecen la identificación de “biomarcadores”, que son indicadores moleculares, celulares o bioquímicos que permiten reconocer el agente causal del daño o el daño mismo que se produce en el DNA o los cromosomas de las células y por tanto denotarían el inicio, progreso y manifestación de la enfermedad clínica (Brusick, 1999; Zeiger, 2001; Wang et al., 2001).

De acuerdo con la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), miembro de la Organización Mundial de la Salud (WHO), el cáncer se sitúa entre los primeros diez lugares de la lista mundial de enfermedades frecuentes en los rubros de incidencia de nuevos casos y de muertes anuales (IARC-WHO, 2007). En nuestro país, según datos del Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) los tumores malignos figuran entre las tres principales causas de defunciones en el país (Tabla I-1) (INEGI, 2006; INEGI, 2008). Ante este panorama, la identificación de biomarcadores de la patología cancerígena se vuelve una necesidad, ya que la evaluación basada en marcadores moleculares, bioquímicos y/o celulares del proceso de iniciación tumoral representa una estrategia efectiva para el diagnóstico temprano, de pronóstico, e incluso podría ser de utilidad en el diseño de estrategias terapéuticas.

	Decesos	Hombres (%)	Mujeres (%)
Totales 2006	494 471	55.43	44.57
Por principal causa de muerte			
1 <i>Enfermedades del corazón</i>	81 248	15.46	17.65
2 <i>Diabetes mellitus</i>	68 417	11.64	16.58
3 <i>Tumores malignos</i>	63 885	11.31	14.93

Tabla I-1 Las tres principales causas de muerte en México para el 2004. Vista por género (INEGI, 2006).

A. CÁNCER Y ANEUPLOIDÍA

La carcinogénesis o el surgimiento de un cáncer, es un proceso que tiene múltiples etapas en las cuales la nueva célula transformada evoluciona de una sola célula normal hacia fenotipos cada vez más malignos (Duesberg y Li, 2003) por la adquisición secuencial de alteraciones genéticas que son las causales de tales cambios fenotípicos (Rajagopalan y Lengauer, 2004; Kastan, 1997). Estas alteraciones genéticas ocurren en un periodo durante el cual se verifica una gran inestabilidad genómica (GIN) en donde las células sufren mutaciones a una tasa mucho más elevada que la normal (Cheng y Loeb, 1997), que a su vez favorecen la acumulación de los defectos genéticos característicos del estado canceroso como las mutaciones en genes específicos, los rearrreglos cromosómicos, las deleciones y las inversiones (Lengauer et al., 1998; Sugimura, 2000; Schär, 2001; Draviam et al., 2004; Kamranvar et al., 2007). Ésta es una razón por la cual se considera firmemente que el cáncer humano es una “enfermedad genética” (Choy, 2001). Estas alteraciones en el DNA pueden ser transmitidas a través de las líneas celulares germinales y conferir susceptibilidad al cáncer o pueden ser el resultado de mutaciones en células somáticas (Futreal et al., 2004).

La adquisición de GIN es uno de los eventos más importantes en el desarrollo de cáncer humano (Lengauer et al., 1998; Storchova y Pellman, 2004; Margolis, 2005) estimulado por la gran cantidad de factores físicos, químicos y biológicos de naturaleza exógena y endógena que pueden dañar el DNA o a través de los mecanismos celulares de reparación cuando resultan ineficientes (Tabla I-2, Figura I-1) (Cheng y Loeb, 1997; Motoyama y Naka, 2004).

Además, los cambios fenotípicos de las células tumorales requieren de modificaciones que les permitan: i) autosuficiencia en señales de crecimiento, ii) insensibilidad ante señales inhibitoras del crecimiento, iii) evasión de apoptosis o muerte celular programada, iv) potencial replicativo poco limitado, v) angiogénesis sostenida, vi) invasión de otros tejidos o metástasis (Hanahan y Weinberg, 2000); y vii) GIN (Pollack, 2006; Castedo et al., 2006).

La GIN se presenta en dos niveles, en un número reducido de tumores la inestabilidad es observada a nivel de la secuencia del material hereditario como resultado de sustituciones de bases, deleciones o inserciones de algunos nucleótidos y de errores en los sistemas de reparación, por ejemplo la inestabilidad microsateletal (MIN) (Cheng y Loeb, 1997) que resulta de errores en el sistema de reparación de apareamientos errados de nucleótidos (reparación mismatch). El otro nivel de la inestabilidad se reconoce en la mayoría de los padecimientos cancerosos, opera a nivel cromosómico y está caracterizado por la pérdida y/o ganancia de cromosomas completos o fragmentos grandes de los mismos conocida como inestabilidad cromosómica y que evoluciona en un ambiente donde el cariotipo es inestable, de esta clase de inestabilidad la aneuploidía es el tipo más frecuente (Lengauer et al., 1998; Weaver y Cleveland, 2006). De hecho, han surgido dos corrientes que tratan de explicar el origen de los tumores basando sus propuestas en cada una de las formas de GIN.

FUENTE	DAÑO AL DNA	SISTEMA DE REPARACIÓN	TIPO DE GIN INDUCIDO	PATOLOGÍA COMÚN ASOCIADA	BIBLIOGRAFÍA
EXÓGENA					
Físicas					
Radiación X	Ruptura de una cadena SSB	Escisión de bases BER	Aberraciones cromosómicas	Ataxia telangiectasia	Fry, et al., 1999; Boer y Hoeijmakers, 2000; Little, 2000; Márquez, et al., 2000; Hoeijmakers, 2001; González, 2004
Radiación UV	Ruptura de dos cadenas DSB	Reparación por recombinación	Mutaciones puntuales y cromosómicas	Xeroderma pigmentosum	
	Dímeros de pirimidona y de pirimidina	Escisión de nucleótidos NER			
Químicas					
Agentes alquilantes (gas mostaza)	Alquilación de las bases nitrogenadas, especialmente guanina	BER	Mutaciones puntuales	Gran potencial mutágeno que puede incrementar el riesgo a padecer cáncer en cualquier órgano afectado por estos compuestos.	Joseph y Mannervik, 2006; Wogan, et al., 2004; Oesch y Arand, 1999
	Sustitución de bases timina por citocina				
	Alquilación del oxígeno 6	O ⁶ -metilguanina metil-transferasa			
Aminas aromáticas	Aductos en el carbono 8 de la guanina	NER	Mutaciones puntuales y cromosómicas	Asociados a cáncer de vejiga y riñón	Joseph y Mannervik, 2006; Sugimura, 2000; Poirier, 2004
Aminas heterocíclicas	Aductos en el carbono 8 de la guanina	NER	Mutaciones puntuales y cromosómicas	Asociados a cáncer de vejiga, mama, colon, próstata y páncreas	
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	Aductos con la desoxiguanosina	NER	Mutaciones puntuales y cromosómicas	Incrementan el riesgo a padecer cáncer de pulmón, mama, esófago	Joseph y Mannervik, 2006; Poirier, 2004
Aflatoxinas	Aductos con la desoxiguanosina	NER	Mutaciones puntuales y cromosómicas	Asociado con cáncer de hígado	Poirier, 2004
Biológicas					
Virus de Epstein Barr (EBV)	Translocaciones	Reparación recombinacional	Mutaciones puntuales y cromosómicas	Linfoma de Burkitt	Pagano, 1999; Butel, 2000; Kamranvar, 2007; Jox, et al., 1997; Kuhn-Hallek, 1995; Gualandi, et al., 2001
Virus de la Hepatitis B y C (HBV y HCV)	Inducido por estrés oxidante	BER	Mutaciones puntuales	Carcinoma hepatocelular	Butel, 2000; Hsieh, et al., 2004; Wogan, et al., 2004
Virus del Papiloma Humano de alto riesgo (HPV-HR)	Metilaciones y daño inducido por ROS	BER	Mutaciones puntuales	Cáncer cervicouterino, cáncer de pene, y cáncer de ano, principalmente	Morris, 2007; Tornesello, et al., 2008; Uronis y Bendell, 2007; Virmani, 2001; Widschwendter, et al., 2003; Widschwendter, 2004; Bellanger, et al., 2005
HTLV-1	Inestabilidad microsatelital MIN	Reparación de apareamientos erróneos MMR	Mutaciones génicas	Leucemias y linfomas	Butel, 2000; Haoudi, et al., 2003; Herrera, et al., 2005
	Daño inducido por ROS	BER			
<i>Helicobacter pylori</i>	MIN	MMR	Mutaciones génicas	Carcinoma gástrico	Cruz-Bustillo, 2005; Shirai, et al., 2006; Hatakeyama, 2004
	Daño inducido por ROS	BER			
Helminthos	Intercambio de cromátidas hermanas	Reparación por recombinación	Mutaciones génicas	Cáncer de vejiga (<i>Schistosoma haematobium</i>),	Herrera, et al., 1994; Mayer, y Fried, 2007
	Daño inducido por	BER		cáncer de vías	

	ROS			biliares (<i>Opisthorchis viverrini</i>)	
ENDÓGENAS					
Metabolismo celular					
Depuración	Formación de sitios abásicos Transversión de G a T o de A a T	BER por la endonucleasa apurínica	Mutaciones génicas	Factor de riesgo para varios tipos de cáncer	Cheng y Loeb, 1997 Jackson y Loeb, 2001
Deaminación de la citosina	Transversiones de C a T	BER	Mutaciones génicas	Factor de riesgo asociado a múltiples tumores	
Metabolismo oxidante	Transiciones simples C a T y dobles en tandem CC a TT Sitios abásicos	BER	Mutaciones génicas	Factor de riesgo para varios tipos de cáncer	
Inflamación crónica					
ROS y RNS	DSB SSB	Reparación recombinacional	Mutaciones cromosómicas	Carcinoma gástrico, de colon, de páncreas y hepatocelular	Feig, D. I., et al., 1994; Lawrence, 2007; Lawrence y Gilroy, 2007; Coussens y Werb, 2002; Shacter y Weitzman, 2002; Herrera, et al., 2005; Jackson, A. L. y Loeb, L. A., 2001
	Sitios abásicos	BER			
	Transversiones de C-T	MMR	Mutaciones génicas		
Errores en la síntesis del DNA					
Replicación del DNA	Inserción errónea de nucleótidos	MMR	Mutaciones génicas	Factor de riesgo para varios tipos de cáncer	Cheng y Loeb, 1997 Jackson y Loeb, 2001

Tabla I-2 Inestabilidad genómica: fuentes, tipos y patologías asociadas (más frecuentes). Basado en Cheng y Loeb, 1997 y Márquez et al., 2000.

1. La teoría mutacional

La “teoría mutacional” considera que el cáncer tiene su origen en las mutaciones que ocurren en genes específicos, los llamados **proto-oncogenes** y los **genes supresores de tumores** (GST) en humanos (Carney y Sikora, 1990) que tienen papeles clave en el control del crecimiento, la diferenciación y la muerte celular a través de cascadas de señalización ordenadas en respuesta a factores de crecimiento, sus receptores y los genes que controlan su expresión, así como factores moduladores negativos del crecimiento (Figura I-2). Estos dos grupos de genes fueron descubiertos a la par que los estudios en genética del cáncer identificaron los oncogenes virales de SV40 y del sarcoma de Rous (1970), ocasionando que la relación entre el cambio genético y la malignidad se moviera de la escala cromosomas/cariotipo a la escala molecular (Joseph y Mannervik, 2006).

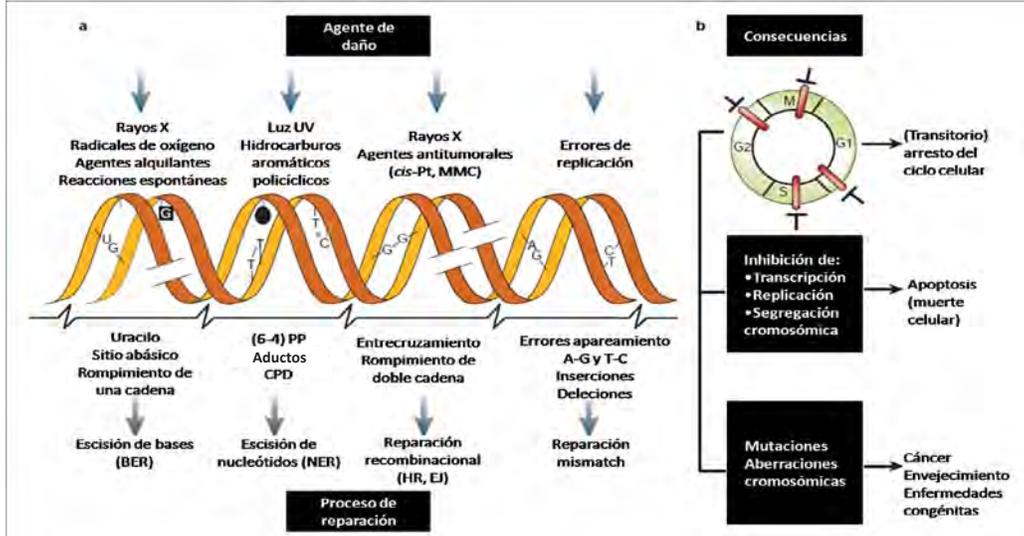


Figura I-1 Daño al DNA, mecanismos de reparación y consecuencias. **a**, Agentes comunes de daño al DNA (arriba); lesiones que ocasionan (centro); y mecanismos de reparación (abajo). **b**, Efectos agudos del daño al DNA en la progresión del ciclo celular (arriba) y en el metabolismo del DNA (centro). Abreviaturas: *cis*-Pt y MMC, cisplatina y mitomicina C; (6-4)PP y CPD, fotoproducto 6-4 y dímero de ciclobutano y pirimidina; HR y EJ, recombinación homóloga y unión terminal (Modificado de Hoeijmakers, 2001).

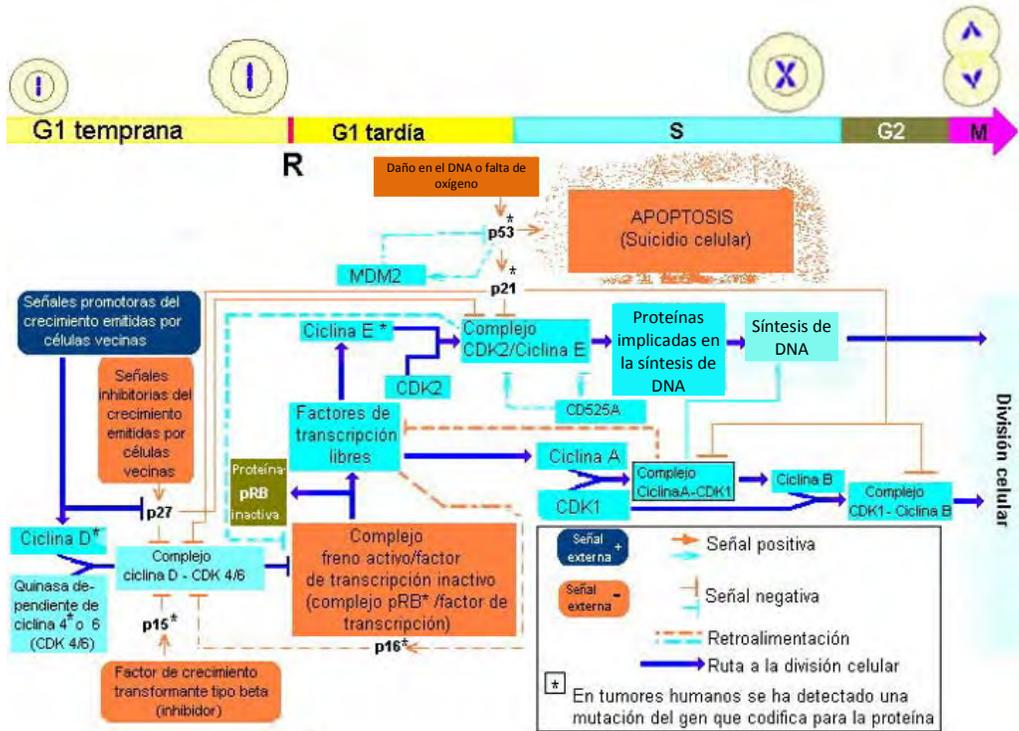


Figura I-2 Cascadas de señalización implicadas en el control del ciclo celular (Tomado de Weinberg, 1996).

Los oncogenes (Tabla I-3) son una familia de secuencias únicas de DNA cuya expresión anormal está asociada con el desarrollo del comportamiento celular maligno (Gullick y Sikora, 1990) porque son funcionalmente activados por mutaciones específicas que modifican las tasas de transcripción y traducción de las proteínas que codifican (Josephy y Mannervik, 2006; Carney y Sikora, 1990) Por su parte los GST's (Tabla I-4), que fueron descubiertos a través del estudio de padecimientos cancerosos hereditarios (Ponder, 1990; Friend, 1990), regulan negativamente los procesos de crecimiento y diferenciación celular, favorecen el ingreso de las células a la fase G0 del ciclo y los procesos de muerte. Cuando estos genes mutan, los procesos de crecimiento y diferenciación celular quedan sin control permitiendo la expansión clonal (Carney y Sikora, 1990; Lowe et al., 2004; Weinberg, 1996).

ONCOGEN	LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA (HUMANOS)	PROTEÍNA/FUNCIÓN	CÁNCER ASOCIADO
<i>c-kit</i>	4q11-q12	Receptor del factor de células madre (tirosina cinasa)	Gastrointestinal, leucemias
<i>PDGFR</i>	5q31-q32	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (tirosina cinasa)	Gliomas (un cáncer de cerebro)
<i>erb-B1</i>	7q12	Receptor del factor de crecimiento epidérmico	Glioblastoma (un cáncer de cerebro) y cáncer de mama
<i>c-myc</i>	8q24.21	Componente de factor de transcripción	Leucemias, carcinomas de mama, estómago y pulmón
<i>H-ras</i>	11p.15.5	Proteína G, transmisora citoplásmica de cascadas de señales estimuladoras	Pulmón, ovario, colón, páncreas, leucemias
<i>MDM2</i>	12q14.3-q15	Cifra proteína antagonista de p53	Sarcomas, entre otros
<i>fos, jun</i>	14q24.3, 1p32-p31	Componentes del factor de transcripción AP-1	
<i>Bcl-2</i>	18q21.3	Cifra proteína que bloquea el suicidio celular	Linfomas de células B
<i>Src</i>	20q12-q13	Tirosina cinasa	Colon
<i>PDGFB</i>	22q13.1	Factor de crecimiento derivado de plaquetas	Gliomas (un cáncer de cerebro)

Tabla I-3 Oncogenes y oncoproteínas representativas (la tabla es muy extensa) comúnmente asociados a tumores. (Modificada de Weinberg, 1996; Josephy y Mannervik, 2006; Weinberg, 2007; NCBI, 2008).

GST	LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA (HUMANOS)	PROTEÍNA/FUNCIÓN	CÁNCER ASOCIADO
<i>hMSH2</i>	2p22-p21	Reparación mismatch (de apareamientos erróneos) en el DNA	Carcinoma colo-rectal hereditario no polipósico (HNPCC)
<i>hMLH1</i>	3p21.3		HNPCC
<i>RASSF1A</i>	3p21.3	Múltiples funciones	Varios tumores
<i>TGFBR2</i>	3p22	Receptor de TGF-β	Colon, gástrico, carcinomas pancreáticos
<i>APC</i>	5q21-q22	Proteína citoplasmática. Múltiples funciones en adhesión, señalización (?)	Cánceres de colón y estómago
<i>MTS1</i>	9p21	Cifra la proteína p16. Componente del control del ciclo celular	Muchos cánceres
<i>PTEN</i>	10q23.3	Fosfatidasa fosfatidilinositol	Varios tumores
<i>BRCA2</i>	13q12.3		Mama
<i>Rb</i>	13q14	Cifra la proteína nuclear pRB. Regula la progresión del ciclo celular (?)	Retinoblastoma, cánceres de vejiga, pulmón, mama y óseos
<i>p53</i>	17p13.1	Cifra la proteína nuclear p53. Factor de transcripción; arresto del ciclo celular; apoptosis	Gran diversidad de carcinomas
<i>NF1</i>	17q11.2	Cifra una proteína citoplasmática inhibidora de la proteína Ras	Neurofibromas, feocromocitomas (sistema nervioso periférico), leucemia mieloide, colon
<i>BRCA1</i>	17q21	Reparación de rupturas de doble cadena en el DNA (?)	Mama y ovario

Tabla I-4 Genes supresores de tumores y sus proteínas representativas (la tabla es muy extensa) comúnmente asociados a tumores. (Modificada de Weinberg, 1996; Josephy y Mannervik, 2006; Weinberg, 2007; NCBI, 2008).

2. La teoría aneuploide del cáncer

Todas las células somáticas normales, incluyendo aquéllas que rodean un tumor, contienen 46 cromosomas, sin embargo, muchos cánceres humanos no sólo contienen células que poseen un número aberrante de cromosomas, (a menudo entre 60 y 90) sino que incluso entre esas células hay diferencias en el contenido cromosómico (Rajagopalan y Lengauer, 2004).

La aneuploidía, o el número anormal de cromosomas presentes en una célula, había sido reconocida por Hanseemann desde 1890 como una característica de los cánceres humanos muy cercana a la ubicuidad (Heim y Mitelman, 1995; Draviam et al., 2004) y en 1914, Theodor Boveri postuló que la aneuploidía es una causa en la transformación de las células tumorales y no una consecuencia del estado canceroso (Boveri, 1914) como se maneja hoy (Rajagopalan y Lengauer, 2004; Weaver y Cleveland, 2006).

La teoría aneuploide del cáncer propone que el cáncer es causado por la dosis anormal de miles de genes normales, esta dosis anormal es generada por la ganancia o pérdida de cromosomas específicos o segmentos de los cromosomas, lo que es conocido como aneuploidía (Sen, 2000; Barlow y Malkin, 2001; Duesberg et al., 2004). El proceso carcinogénico es iniciado por una aneuploidía azarosa, que puede ser inducida por un carcinógeno o espontáneamente, y establece una reacción en cadena de aneuploidizaciones, las cuales generan combinaciones y rearrreglos de cromosomas cada vez más anormales y eventualmente cáncer-específicos, con lo cual se establece el corolario: “entre más aneuploide es el cariotipo, más maligno es el cáncer” (Atkin y Baker, 1982; Atkin y Baker, 1984; Duesberg y Rasnick, 2000; Duesberg y Li, 2003; Pihan et al., 2003; Rajagopalan y Lengauer, 2004; Sy et al., 2005; Balachandar et al., 2007).

Aún cuando no ha sido asignada la causalidad del cáncer a la aneuploidía de manera absoluta, su papel es realmente importante ya que: 1) La aneuploidía es la forma de GIN más frecuentemente encontrada en los tumores sólidos y aún en los estados pre-cancerosos de algunos de ellos, como el cáncer de colon (Nowak et al., 2002), próstata (Balachandar et al., 2007), cuello uterino (Olaharski et al., 2006), entre otros. 2) La aneuploidía tiene capacidad autocatalítica, es decir que al suceder el primer evento aneuploidizante, en la siguiente división celular se esperan células con cariotipos aneuploides (Duesberg y Li, 2003). 3) La aneuploidía correlaciona con las largas latencias de la formación neoplásica (revisado en Duesberg et al., 2005) 4) Algunos carcinógenos actúan como aneuploidógenos (Tabla I-2), es decir, que inducen la aneuploidía (en Duesberg y Rasnick, 2000; Duesberg et al., 2001). 5) La aneuploidía causa fenotipos anormales y complejos por la alteración de la dosis de miles de genes (Duesberg y Rasnick, 2000). 6) Entre más maligno es el cáncer, mayor es el grado de aneuploidía que sus células presentan (Duesberg y Rasnick, 2000). 7) El reconocimiento de anomalías cromosómicas específicas en carcinomas (en Duesberg et al., 2004 y Duesberg et al., 2005; Plentz, 2005).

B. MECANISMOS DE GENERACIÓN DE LA ANEUPLOIDÍA

La participación causal de la aneuploidía en la patogénesis del cáncer no ha sido, aún, confirmada experimentalmente, pero existen diferentes vías en que este fenotipo puede generarse en las células (Weaver y Cleveland, 2006). La mayoría de estos mecanismos resultan de errores en la segregación cromosómica (Figura I-3) durante el ciclo celular. La segregación adecuada es mantenida tanto por las propiedades intrínsecas de la maquinaria mitótica como por el punto de control del huso (Draviam et al., 2004). Pero la aneuploidía puede ser generada también en procesos independientes del punto de restricción mitótico (Storchova y Pellman, 2004; Weaver y Cleveland, 2006; Ganem et al., 2007)

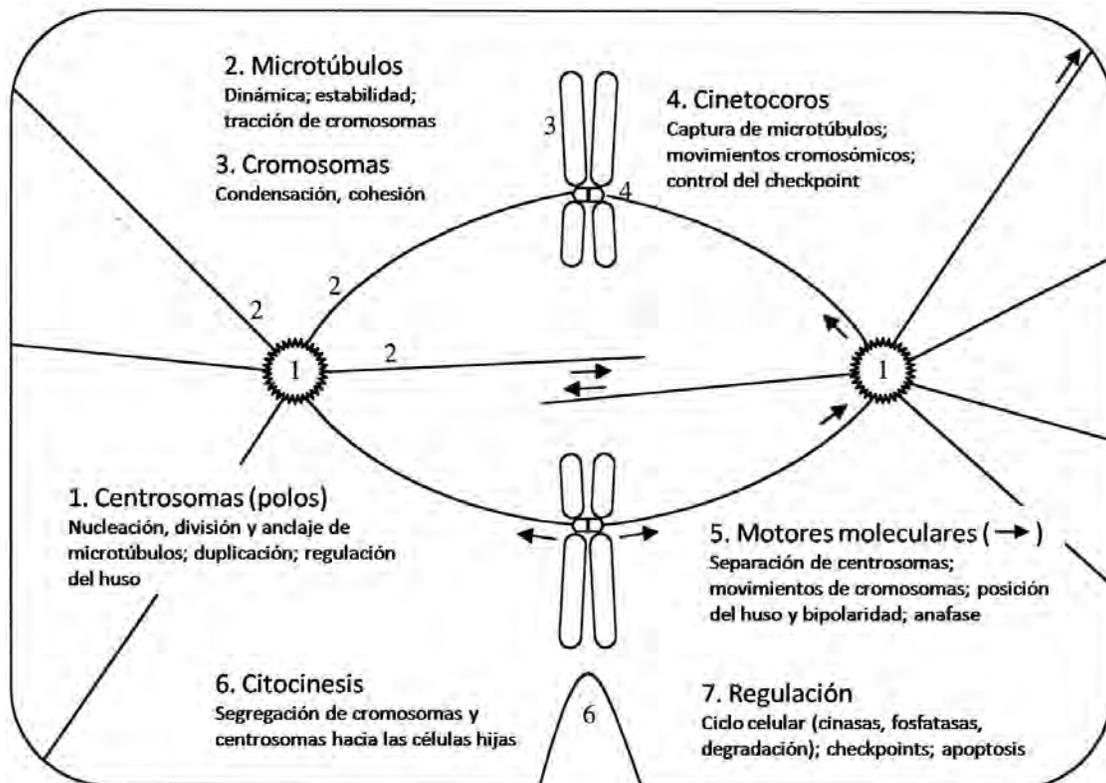


Figura I-3 Componentes de la maquinaria mitótica y sus funciones. Los defectos en alguno de estos elementos tiene el potencial para contribuir a la segregación cromosómica aberrante y tumorigénesis (Tomado de Pihan y Doxsey, 1999).

1. Errores durante el ciclo celular

El ciclo celular es un concepto que envuelve el proceso constituido por una serie de eventos ordenados que guían la replicación de las células (Figura I-2); está dividido en cuatro fases principales. El ciclo se inicia cuando una célula en reposo (fase G₀) recibe señales (factores de crecimiento) que estimulan la activación del ciclo, es decir, el ingreso en la **fase G₁**. El progreso a través de las siguientes fases está regulado por un pequeño número de proteínas cinasas

heterodiméricas llamadas **ciclinas** y cuyas subunidades catalíticas son las **cinasas dependientes de ciclinas (Cdks)** que forman complejos específicos que dan el paso a cada fase y preparan los elementos moleculares necesarios para cada etapa. En la **fase S** (síntesis) el DNA de los cromosomas es replicado y la célula ingresa a la **fase G2** donde se prepara para dividirse en la mitosis, también llamada **fase M**, en ésta los cromosomas se condensan, la envoltura nuclear se elimina y los husos mitóticos son ensamblados. Esta última fase está dividida en otras etapas, en la etapa llamada **metafase** los cromosomas duplicados (cromátidas hermanas) son alineados en la placa ecuatorial coordinados por los centrosomas a través de los microtúbulos (husos mitóticos) que se anclan al centrómero de los cromosomas. La célula está preparada para dividirse, entonces otro complejo proteico llamado **Complejo Promotor de la Anafase/Ciclosoma (APC/C)**, con capacidad de ubiquitina, controla el paso de la metafase a la **anafase**, cuando las cromátidas hermanas se separan y alistan para segregarse hacia las células hijas, evento que también es favorecido por el APC (Weinberg, 1996; Lodish et al., 2000; Alberts et al., 2002).

Durante el proceso evolutivo las células eucariotas desarrollaron un sistema de control del ciclo celular que resguarda la fidelidad del mismo para garantizar el adecuado desarrollo de los organismos multicelulares (Lodish et al., 2000; Alberts et al., 2002). Los complejos Cdk-ciclina y el APC son parte de este sistema, y participan junto con otros elementos que son llamados puntos de control o checkpoints, en los que el ciclo puede ser arrestado para evitar el ingreso prematuro a las fases siguientes. Existen tres puntos de restricción: 1) en la fase G1, donde las proteínas pRb y p53 (de la familia de los GST) determinan la integridad del DNA y del ambiente para dar paso a la fase S; 2) en la fase G2, se censura el estado replicativo del DNA, su integridad y la del ambiente; y 3) en la fase M, llamado punto de restricción metafásico o del huso mitótico, censura el anclaje del huso a los cromosomas para permitir o arrestar la progresión hacia la anafase y cariocinesis (Weinberg, 1996; Lodish et al., 2000; Alberts et al., 2002). El fallo en cualquiera de estos puntos de restricción representa un riesgo para la integridad genómica de las células hijas. Pero con respecto a la generación de aneuploidía, es el sitio de restricción mitótico el principal guardián durante el ciclo celular (Pihan y Doxsey, 1999; Jallepalli y Lengauer, 2001; Draviam et al., 2004; Rajagopalan y Lengauer, 2004; Yuen et al., 2005; Weaver y Cleveland, 2006). Aunque cabe aclarar que no es la única vía de generación, pues las aneuploidías pueden ocurrir aún cuando el punto de control está intacto (Weaver y Cleveland, 2006)

a) Deficiencias del punto de control mitótico

El punto de control mitótico es el complejo molecular que evalúa la unión efectiva entre el huso mitótico de los centrosomas y el cinetocoro de las cromátidas hermanas. En este punto participa un gran número de proteínas (BUB1, BUBR1, BUB3, MAD1, MAD2, MAPK, CENP-E, Aurora B, entre otras). Cuando todos los cromosomas han sido anclados correctamente se produce el paso hacia la anafase, mismo que es irreversible y prepara a los cromosomas para segregarse hacia las células hijas (Pihan y Doxsey, 1999; Yue et al., 2005; Weaver y Cleveland, 2006). Sin embargo, excepcionalmente suelen ocurrir errores en alguno o algunos elementos de la maquinaria mitótica provocando el surgimiento de células hijas aneuploides (Draviam et al., 2004; Weaver y Cleveland, 2006) como es el caso de los genes BUB1 y BUB1B (codifica la proteína BUBR1), ampliamente

reportados en condición mutante en cánceres colon-rectales con inestabilidad cromosómica (Lengauer y Wang, 2004)

Quizás uno de los errores más comunes de este punto de restricción es la **no disyunción** de las cromátidas hermanas (Figura I-4b) (Yuen et al., 2005; Weaver y Cleveland, 2006) que da lugar a la generación de células aneuploides (Weaver et al., 2006) o poliploides que en repeticiones sucesivas derivarían en aneuploidías (Shi y King, 2005; Shi y King, 2006). Esta separación es mediada por el APC/C (Figura I-5), una proteína con capacidad de ubiquitina ligasa que, en condiciones normales, se encuentra inactivada en la metafase por proteínas del punto de control mitótico hasta que los husos de microtúbulos se anclan a los cromosomas (Pihan y Doxsey, 1999; Weaver y Cleveland, 2006) y los orientan en la placa metafásica (Wirth et al., 2006). Una vez que esto se logra, el APC/C es activado por fosforilaciones, favoreciendo su unión a la proteína Cdc20 que a su vez reclutará los sustratos cuya degradación es requerida para la progresión hacia la anafase (securina) y la terminación del ciclo celular (ciclina B). La degradación de la securina y de la ciclina B permite la liberación y activación de la separasa, una proteasa que degrada a la cohesina (la proteína que mantiene unidas a las cromátidas hermanas desde su síntesis y hasta este momento); con la eliminación de la ciclina B también se promueve la progresión del ciclo celular hacia la cariocinesis (Jallepalli y Lengauer, 2001; Peters, 2002; Harper et al., 2006; Weaver y Cleveland, 2006; Wirth et al., 2006). Sin embargo, cuando la unión de los microtúbulos sólo se produce con uno de los cinetocoros de las cromátidas hermanas, éstas no puede alinearse en la placa metafásica y la cohesina que une a las cromátidas no es rota por la separasa generando células con ganancia y pérdida de cromosomas individuales (Jallepalli y Lengauer, 2001; Lengauer y Wang, 2004; Wirth et al., 2006); cuando la separasa es ineficiente por alguna mutación, suele arrestarse el ciclo produciendo una célula poliploide (Wirth, 2006), igualmente por otros factores mutados de esta maquinaria se pueden producir errores aneuploidizantes (Yuen et al., 2005); también hay formación de células aneuploides por no disyunción cuando algunos componentes del punto de control mitótico se encuentran presentes en niveles reducidos (Weaver y Cleveland, 2006).

La completa inactivación del punto de control mitótico resultante de la eliminación de elementos clave guía a una aneuploidización rampante por mal-segregación masiva de cromosomas (Figura I-4c), aunque las células en estas condiciones mueren después de seis divisiones por lo que su contribución al proceso carcinogénico es mínimo (Weaver y Cleveland, 2006).

Una combinación de errores del punto de control mitótico y del anclaje microtúbulos-cinetocoro pueden propiciar eventos de segregación cromosómica inadecuada. Éstos son referidos de acuerdo con la orientación que los cromosomas presentan al formar la placa metafásica. En la prometafase temprana pueden ocurrir: a) anclajes monotélicos (Figura I-6A), en los cuales una cromátida hermana se une a los microtúbulos de un centrosoma pero la otra queda sin unirse al centrosoma del polo opuesto; y b) anclajes sintélicos (Figura I-6B), en este caso los dos cinetocoros hermanos son anclados, se unen a husos mitóticos que proceden del mismo polo. En ambos casos,

si el punto de restricción es óptimo se dispara arrojando el ciclo celular hasta que las uniones microtúbulos-cinetocoro sean corregidas (Cimini, 2007)

b) Independiente del punto de control mitótico

Siguiendo con los errores ocurridos durante el anclaje de los husos mitóticos con los cinetocoros en los cromosomas, en algunas ocasiones ocurre que el cinetocoro de una sola cromátida es apresada por husos mitóticos de los dos polos, este fenómeno es conocido como anclaje merotélico (Figura I-4d). Como el doble anclaje genera la tensión normal que censa el sitio de control no hay ningún problema con la progresión del ciclo. La tensión dominante de alguno de los husos puede determinar el destino de este cromosoma, o bien puede permanecer en la zona media de la mitosis y quedar excluido de las dos células hijas, o segregarse a una célula hija formando un micronúcleo (Weaver y Cleveland, 2006; Cimini, 2007).

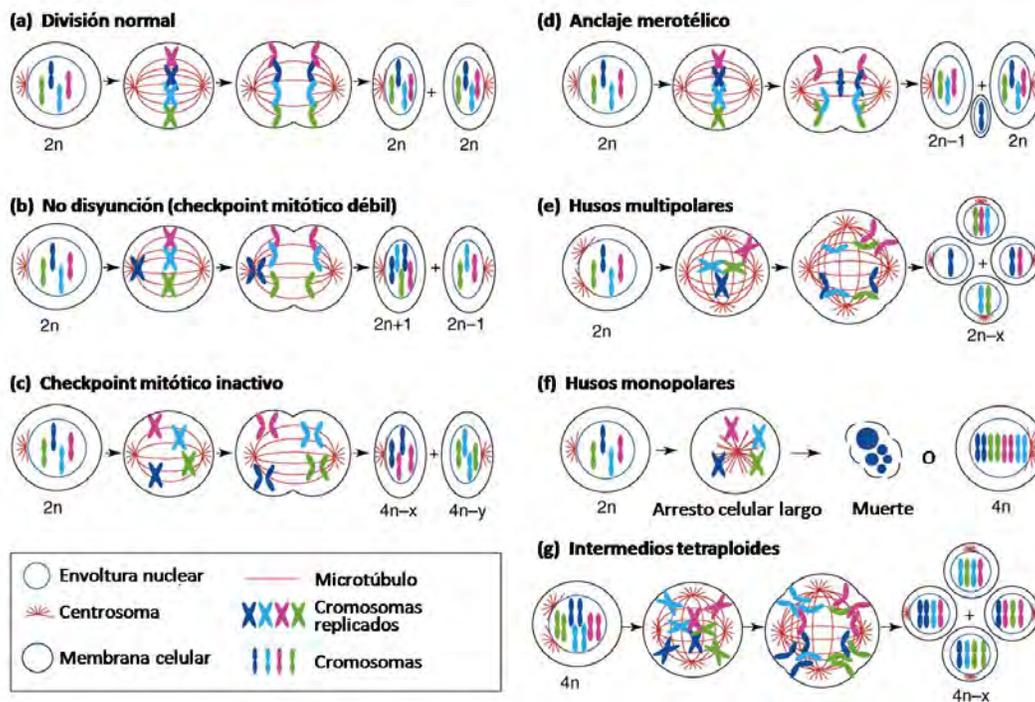


Figura I-4 Mecanismos que generan aneuploidía. (a) División normal con progenie diploide, el anclaje microtúbulos-cinetocoros es anfitético o normal. (b-c) Errores de segregación por deficiencias en el checkpoint mitótico. (d-f) Errores de segregación independientes del checkpoint mitótico. (g) Intermediario tetraploide que con divisiones sucesivas puede generar células aneuploides. En cada caso (a-g), de izquierda a derecha, la primer imagen muestra una célula diploide (a-f) o tetraploide (g) en interfase. El segundo panel representa la metafase. La tercera imagen muestra la segregación en la anafase (a-e, g). La última imagen trata de las células hijas producidas, ahora en G1. Se muestra la ploidía de las células parentales y de la progenie (Modificado de Weaver y Cleveland, 2006).

En algunas células falla la duplicación de los centrosomas. Las anomalías de los centrosomas han sido reportadas tanto en lesiones precancerosas como en carcinomas *in situ* (Pihan et al., 2003). Los centrosomas han sido reconocidos como factores importantes para el

ensamble de los husos mitóticos, para dar polaridad a la célula y organizar a los cromátidas hermanas para su separación y segregación (Doxsey, 2001; Krämer et al., 2002; Sluder y Nordberg, 2004; Yang et al., 2008). Una de las dos consecuencias de errores en la duplicación centrosómica es la formación de múltiples husos polares (la principal causa asociada, hasta ahora, es la reducción de la expresión de la proteína **tastina** [Yang et al., 2008]). Cuando esto sucede, el checkpoint no previene la segregación porque los cromosomas establecen uniones productivas con dos de los polos disponibles, generando tres o más células hijas con cariotipos aneuploides por la segregación cromosómica desigual (Figura I-4e) (Sluder y Nordberg, 2004; Weaver y Cleveland, 2006).

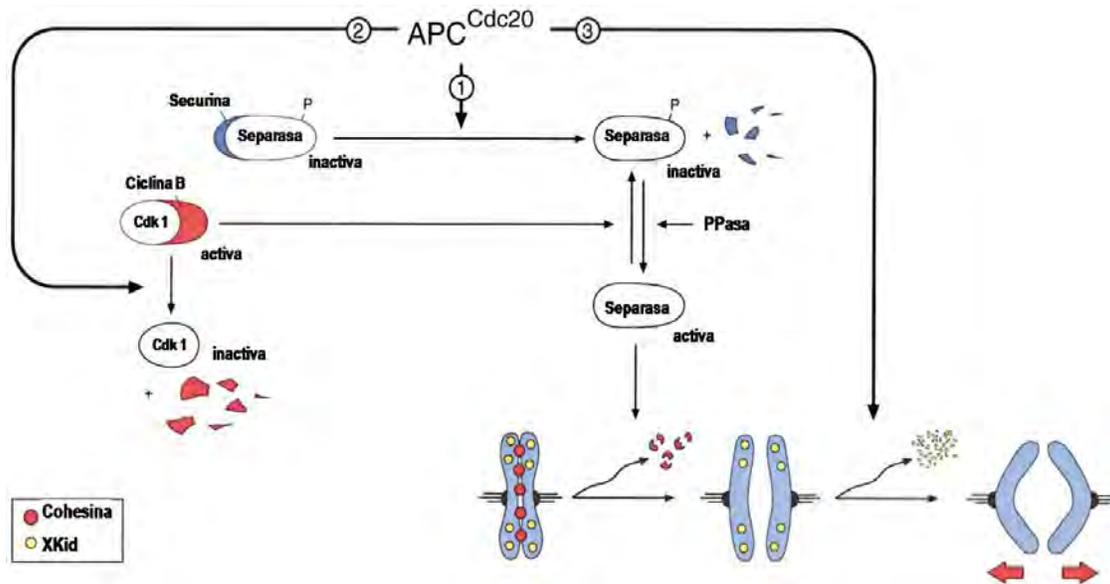


Figura I-5 Inducción de la anafase por el APC: 1) El APC activa la proteasa separasa por degradación de la securina. La separasa, separa las cromátidas hermanas al romper los complejos de cohesina. (2) El APC ayuda en la activación de la separasa al iniciar la degradación de la ciclina B y otras ciclinas mitóticas. La degradación de la ciclina inactiva a Cdk1 permitiendo la remoción de los residuos de fosfato que inactivan a la separasa, a través de fosfatasas proteicas (PPasas). (3) El APC inicia la degradación de la quinesina XKid en los brazos cromosómicos. XKid en las mitosis tempranas previene la segregación, por lo que su degradación facilita la migración de las cromátidas hacia los polos en la anafase (Tomado de Peters, 2002).

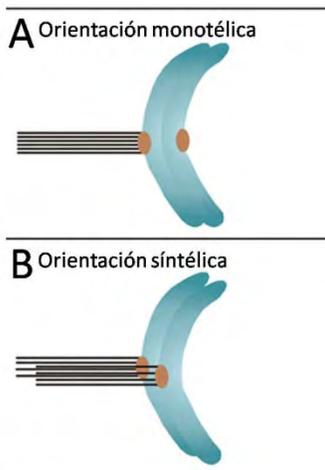


Figura I-6 Orientaciones cromosómicas en la mitosis que pueden inducir aneuploidía. (A) Orientación monotélica. Mientras que un cinetocoro es unido por los microtúbulos, el cinetocoro de la otra cromátida hermana queda sin unir. (B) Orientación sintélica. Los dos cinetocoros, de las cromátidas hermanas, se unen a microtúbulos procedentes del mismo polo (Tomado de Cimini, 2007).

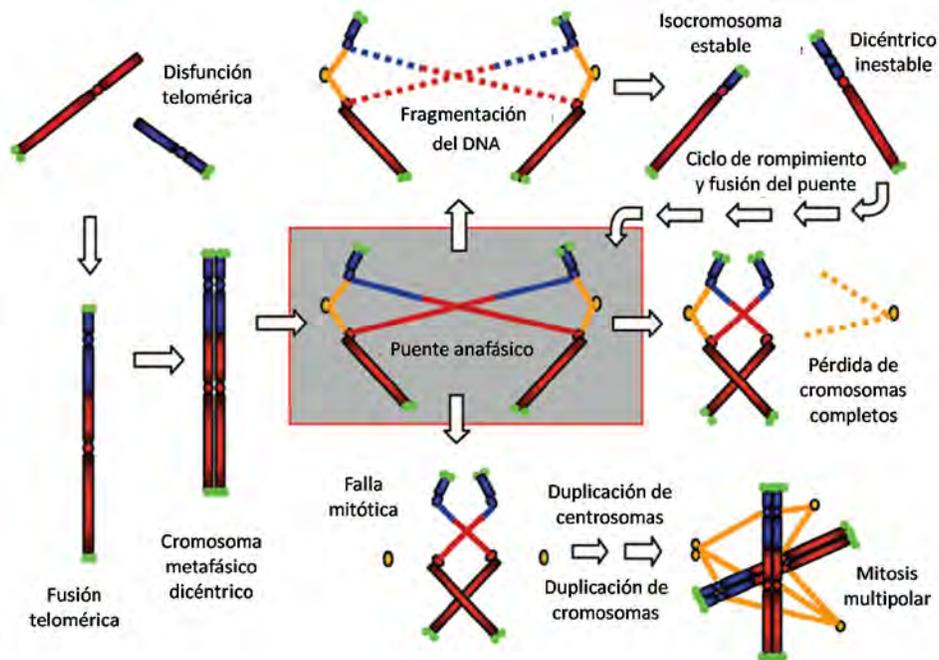


Figura I-7 Papel del acortamiento telomérico en cáncer. Se muestra la serie de eventos cruciales ligados a la disfunción telomérica y a los puentes anafásicos, rompimientos y pérdidas cromosómicas, y divisiones celulares multipolares (Gisselsson, 2005). El acortamiento de los telómeros durante el envejecimiento y la enfermedad crónica guían a la disfunción telomérica y la inducción de checkpoints de senescencia. Las fallas en los checkpoints cooperan con la disfunción de telómeros y favorece la inestabilidad cromosómica y la iniciación del cáncer (Ju y Rudolph, 2006). (Modificado de Gisselsson, 2005).

La segunda consecuencia de los errores en la duplicación del centrosoma es la producción de células monopolares, es decir que solo tienen un centrosoma. La sobreexpresión de la proteína tastina (Yang et al., 2008) y la inhibición del aparato requerido para la separación del centrosoma replicado (Weaver y Cleveland, 2006) son las causas que se han encontrado para este fenómeno. Las células que contienen husos monopolares, debido a fallas en la duplicación del centrosoma, son susceptibles también de generar células aneuploides (Figura I-4f). En este caso, algunas cromátidas quedan libres de la unión a microtúbulos, debido a la diferencia en la tensión producida por la tracción de los husos, el punto de control arresta la progresión del ciclo; pero durante el arresto prolongado algunas de esas células pueden morir o evadir el arresto, pese a que nunca se produjo la segregación cromosómica, dando lugar a una célula tetraploide (contenido doble del número cromosómico normal) en la fase G1 celular (Krämer et al., 2002; Weaver y Cleveland, 2006).

Los telómeros, las repeticiones TTAGGG finales de los cromosomas, determinan el número de ciclos replicativos de las células, los protegen de deleciones, de uniones entre terminales de diferentes cromosomas, de ser sustrato para el sistema de reparación de rompimientos de doble cadena (DBS) y tienen la capacidad de arrestar este proceso cuando el acortamiento rebasa el límite, por lo tanto desempeñan un papel importante en la patología del cáncer (Gisselsson, 2005;

Ju y Rudolph, 2006; Cosme-Blanco y Chang, 2008; Uziel et al., 2008). Y es que cuando la respuesta al acortamiento de los telómeros falla (Figura I-7), se permite la proliferación celular y el acortamiento anormal de las terminales cromosómicas, resultando por último en la recombinación de cromosomas desprovistos de telómeros en configuraciones aberrantes, forman puentes de cromatina y generan al menos tres formas de inestabilidad cromosómica: 1) rearrreglos estructurales debidos a la fragmentación extensiva de la cromatina, pudiendo formar isocromosomas y translocaciones de brazos completos. 2) pérdida de cromosomas completos por la separación del huso mitótico. 3) falla de la citocinesis, formando poliploidización y centrosomas supernumerarios que llevarían a mitosis multipolares (Gisselsson et al., 2002; Gisselsson, 2005).

2. La tetraploidía como fuente de aneuploidía

Cuatro mecanismos generales son capaces de producir células tetraploides. La evasión del arresto del ciclo celular producido por el punto de control mitótico es una de las vías poliploidizantes, como ya se mencionó (Figuras I-4f, I-8C). La **endorreplicación** (Figura I-8B) es un proceso normal, programado, por el cual ocurre la replicación del DNA sin que medie un proceso de división celular, el resultado es la creación de células autopoliploides (tetraploides), sin embargo, en el humano es un proceso que sólo ha sido descrito en megacariocitos, células de la médula ósea que generan plaquetas. Otro proceso normal, que también produce células tetraploides, es la **fusión celular** (Figura I-8A). La fusión celular es un proceso normal y fisiológicamente importante durante el desarrollo en ciertos tejidos del cuerpo (músculo esquelético y osteoclastos), produciendo células diferenciadas pero durante estados de enfermedad puede ocurrir, generalmente como resultado de infecciones virales. La cuarta vía de formación de células poliploides está relacionada con el ciclo celular, en este caso específicamente con la falla en el aparato celular que coordina la citocinesis (Figura I-8C) (Storchova y Pellman, 2004; Ganem et al., 2007). Shi y King en 2005 reportaron que sus resultados mostraban que la no disyunción era causa de progenie tetraploide y no aneuploide (en líneas celulares de queratinocitos humanos, HeLa y epiteliales prostáticas) ya que se produce la regresión del proceso y se evita la citocinesis. Sin embargo, esta idea aún carece de un sustento irrefutable ya que en otros tipos celulares la no disyunción da lugar a células con cariotipo aneuploide muy cercano a la condición diploide (Weaver et al., 2006).

En 2001, Andreassen et al., propusieron la existencia de un punto de restricción para la tetraploidía cuya función consiste en censar la presencia de células tetraploides y arrestarlas en G1, este mecanismo entonces prevendría la GIN causada por mitosis multipolares, pero no existe mayor evidencia de la presencia de tal punto de control, por el contrario, se ha visto que las células tetraploides son capaces de proceder a través del ciclo celular (Weaver y Cleveland, 2006). Una vez en el ciclo celular, la vía de producción de células aneuploides depende de la formación de múltiples centrosomas. Estos centrosomas son capaces de producir husos multipolares con tres o cuatro polos (Figura I-4g), lo cual resultaría en células hija aneuploides durante mitosis subsecuentes (Storchova y Pellman, 2004; Weaver y Cleveland, 2006; Ganem et al., 2007). Obviamente, en estas células pueden presentarse todas las variaciones mecánicas que se han

descrito antes y que conllevan a la obtención de progenie con alteraciones numéricas del cariotipo y posteriormente al desarrollo tumoral.

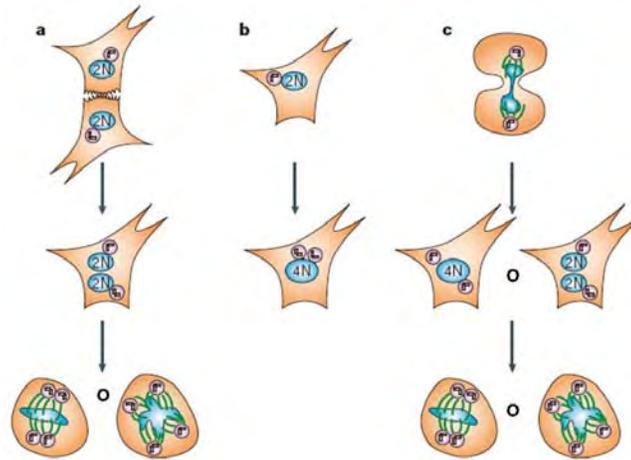


Figura I-8 Rutas a la poliploidía. **a** | Fusión celular: después de la fusión la célula ingresa al ciclo celular con dos centrosomas, subsecuentemente duplicados. En la mitosis, si los centrosomas se agrupan, se establece una división bipolar (izquierda), pero si no están emparejados, ocurre una mitosis multipolar (derecha). **b** | Endorreplicación. Es la replicación del DNA en la ausencia de mitosis. **c** | Ciclo celular abortado. Una falla en un paso crucial del proceso de división resulta en una célula tetraploide (4n) en la fase G1. Si el defecto ocurre en la cariocinesis la célula contendrá un solo núcleo (izquierda, medio); pero si el defecto ocurre en la anafase tardía o en la citocinesis, la célula tendrá dos núcleos (Tomado de Storchova y Pellman, 2004).

C. IDENTIFICACIÓN DE ANEUPLOIDÍAS EN MUESTRAS CELULARES

Los cromosomas no son meramente agregados de unidades génicas discretas.
En cierta medida ellos mismos son unidades.
G. L. Stebbins, 1950

La ruta tradicional para el diagnóstico ha sido a través de la evaluación morfológica de biopsias y la correlación de este análisis con las consecuencias clínicas. La base morfológica en el diagnóstico tiene sus limitaciones. Es bien sabido que los tumores que lucen igual bajo el microscopio y que parecen tener un fenotipo muy similar, pueden tener cursos clínicos radicalmente diferentes. El desarrollo de nuevas metodologías en el campo de la patología molecular obliga al estudio del origen de los padecimientos a partir de la caracterización de la información genética: genes, cromosomas, transcripción y movimientos de los ácidos nucleicos (Levsky y Singer, 2003).

El análisis cromosómico ha estado en uso por más de 45 años para diagnosticar errores en el número o en la forma de los cromosomas que pueden resultar en desórdenes genéticos y enfermedades (Andrews et al., 1994). Existe un gran número de métodos o variantes metodológicas ampliamente usadas en laboratorios de investigación y clínicos activos en la

citogenética del cáncer (Heim y Mitelman, 1995). Las tinciones de Giemsa y sus variantes, así como las nuevas metodologías de tinción con agentes fluorescentes son excelentes auxiliares para la detección de anomalías numéricas y estructurales de los cromosomas, que parten del uso de la microscopía óptica y de fluorescencia, respectivamente, pues facilitan la visualización de los cromosomas o de estructuras específicas de éstos.

1. Hibridación *in situ*

Las metodologías que emplean la fluorescencia para el reconocimiento de los cromosomas en características estructurales y numéricas sientan sus bases en la técnica conocida como hibridación *in situ* (ISH), también llamada 'hibridación histoquímica' o 'hibridación citológica', introducida por primera vez en 1969 por tres grupos de trabajo: Buongiorno-Nardelli y Amaldi, Gall y Pardue, y John y colaboradores (van Dekken et al., 1993; Segura Valdez et al., 1997; Höfler et al., 1998)

La hibridación *in situ* recibe este nombre porque la hibridación se realiza en secciones de tejido o en células fijadas (Höfler et al., 1998) y se basa en la capacidad que poseen los ácidos nucleicos para hibridarse o unirse entre sí en vista de que las monocadenas de ácidos nucleicos tienen secuencias de bases complementarias. La hibridación puede ser de DNA-DNA, DNA-RNA o RNA-RNA. Como la hibridación es muy específica es posible demostrar con gran especificidad la presencia de determinadas secuencias de DNA o de RNA en su localización en la célula (Höfler et al., 1998; Morel, 1993; Perret, 1993; van Dekken et al., 1993; Geneser, 2006), secciones de tejido o preparaciones de cromosomas (Höfler et al., 1998)

La sensibilidad de la ISH depende de las siguientes variables: (a) el efecto de la preparación del tejido sobre la retención y accesibilidad al DNA o RNA blanco; (b) el tipo de construcción de la sonda, incluyendo la eficiencia del marcaje de la sonda y la sensibilidad del método usado para la detección de la señal; y (c) el efecto de las condiciones de la hibridación sobre la eficiencia de hibridación (Höfler et al., 1998)

Para la técnica de hibridación *in situ* se utiliza una sonda formada por un ácido nucleico monocatenario o bicatenario con una secuencia de bases conocida de longitud variable (desde 10-15 bases o varios cientos de ellas), complementaria a la secuencia de bases que se desea demostrar. Las sondas se pueden marcar de dos maneras, una es por **marcaje directo**: a la molécula de DNA o de RNA se ancla directamente la molécula reportera que suele ser un fluorocromo (fluoresceína, rodamina o TexasRed); la otra forma de marcar la sonda es indirecta: donde puede ocurrir que un hapteno (biotina o digoxigenina, los más empleados) sea anclado a la sonda y detectado por otra proteína de unión marcada (avidina) o que el híbrido sonda-blanco sea detectado por un anticuerpo específico (van Dekken et al., 1993; Segura Valdez et al., 1997; Höfler et al., 1998; Bakkenist y McGee, 1998). Ahora, las sustancias que pueden emplearse para marcar las sondas pueden ser isótopos radiactivos, cuando se desea mostrar por radioautografía (Pardue y Gall, 1969); o con sustancias no isótopos que pueden ser una ramificación adosada (un cromóforo como la biotina), que permite identificar la sonda por otras técnicas como la inmunohistoquímica (Höfler et al., 1998; Geneser, 2006) o con un fluorocromo (Bauman et al.,

1980; van Dekken et al., 1993; Segura Valdez et al., 1997; Höfler et al., 1998; Sunday, 1998; Bakkenist y McGee, 1998; Lewis y Baldino, 1990; Perret, 1993) detectado directamente por microscopía fluorescente, o indirectamente por técnicas inmunohistoquímicas (Bakkenist y McGee, 1998).

Hibridación in situ fluorescente (FISH). La primera aplicación de la FISH por marcaje directo de la sonda con un fluorocromo ocurrió en 1980, por el grupo de Bauman. Aprovechando la capacidad de producir la unión covalente del fluorocromo con la molécula de RNA usada como sonda, consiguieron identificar secuencias específicas de DNA (Bauman et al., 1980; Levsky y Singer, 2003). El marcaje directo de sondas de DNA para identificar secuencias específicas del material hereditario fue introducido en 1988 por el equipo de investigación de Lichter (en Bayani y Squire, 2004).

La técnica de FISH se basa en la hibridación con sondas marcadas con un agente fluorescente para identificar una secuencia de DNA específica o una estructura cromosomal particular (Tabla I-3) (Heim y Mitelman, 1995; Segura Valdez et al., 1997). También, con la FISH se han podido detectar marcadores cromosómicos, cromosomas derivativos, translocaciones no balanceadas *de novo* y algunas regiones anormalmente bandeadas, que pasan inadvertidas para otros sistemas citogenéticos y moleculares. Es posible determinar el número y la localización de tales eventos. Otra de las grandes ventajas de esta aplicación es que a diferencia de otras aproximaciones, la FISH no requiere células con cromosomas metafásicos, ya que las células en interfase, e incluso células de archivo o embebidas en parafina, son también blancos de este procedimiento (Heim y Mitelman, 1995; Segura Valdez et al., 1997; Galán, 2002; Bayani y Squire, 2002; Bayani y Squire, 2004). Y la desventaja es la especificidad inherente del método, pues se consigue información sólo de aquellos cromosomas que han sido evaluados (Heim y Mitelman, 1995).

TIPO	INTENSIDAD DE LA FLUORESCENCIA	APLICACIONES COMUNES
Sondas centroméricas	Fuerte	Ideal para principiantes en la técnica. Comúnmente empleado para enumerar monosomías y trisomías, y para la determinación sexual en estudios de transplantes.
Sondas específicas subteloméricas	Moderado/débil	Usado para identificar pequeños rearrreglos cercanos a los telómeros.
Pinturas cromosómicas	Fuerte/moderado	Útil en la identificación de aberraciones cromosómicas, si se sospecha de un cromosoma específico. También, para confirmar los resultados por SKY y MFISH.
Sondas de secuencia única – translocaciones	Moderado	Usado para detectar la presencia de translocaciones específicas en células en interfase o en metafase.
Sondas de secuencia única – microdeleciones	Moderado	Identificación de pequeñas deleciones submicroscópicas usando metafases.
Sondas de detección de amplificaciones génicas	Fuerte	Para la detección de amplificaciones génicas (varias copias) en células en interfase y en metafase.

Tabla I-7 Diferentes clases de sondas comúnmente usadas en el análisis con FISH. Nota: la intensidad de la señal depende del tamaño y la aplicación de la sonda así como del origen del DNA blanco y el estado de la célula (Tomado de Bayani y Squire, 2004)

Las aplicaciones clínicas de la FISH incluyen: 1) el estudio de las anomalías cromosómicas en metafase, 2) la detección de anomalías cromosómicas en células en interfase, 3) el mapeo del genoma humano, 4) el estudio de anomalías cromosómicas sutiles o crípticas (anomalías subteloméricas). Cuya importancia no tiene cabida únicamente en el análisis citogenético del cáncer, pero dada la gran información que sobre la integridad genómica puede aportar, representa una herramienta muy poderosa para la caracterización de las anomalías presentes en las células tumorales, para la comprensión del papel que pueden desempeñar en la transformación maligna y para el desarrollo de estrategias diagnósticas y terapéuticas.

D. CÁNCER DEL CUELLO UTERINO (CaCu)

El cáncer del cuello uterino es el segundo tipo de cáncer más común entre mujeres a nivel mundial (IARC, 2002; Parkin y Bray, 2006), la primera en México (Carrillo et al., 2004; INEGI, 2006; INEGI, 2008) (Figuras I-8 e I-9). Alrededor del 83% de los casos ocurren en países en desarrollo (Figura I-10), donde el cáncer cervicouterino representa el 15% de los padecimientos cancerosos en la mujer, con riesgo a partir de los 65 años, mientras que en los países desarrollados se trata sólo del 3.6% de nuevos casos anuales de cáncer. En países como los europeos (con excepción de aquéllos de Europa Oriental), Estados Unidos de Norteamérica, Japón y China, las tasas de mortalidad son realmente bajas debido al diagnóstico temprano, que desde luego también está disponible en los países en desarrollo, sin embargo la población femenina de estos países, por ignorancia o por razones relacionadas con el estilo de vida no asisten a las unidades de diagnóstico (Parkin y Bray, 2006).

Los estudios sobre la epidemiología del CaCu han demostrado que este padecimiento se comporta como una enfermedad de transmisión sexual, y diversos factores de riesgo parecen estar involucrados en su desarrollo. Los de mayor asociación son el inicio temprano de relaciones sexuales, el número de parejas sexuales, las infecciones virales y bacterianas, hábitos reproductivos, uso de anticonceptivos orales, hábitos dietéticos, tabaquismo, entre otros (Carrillo et al., 2004)

1. El cuello del útero

El útero se ubica en el centro de la cavidad pelviana y termina, hacia abajo, en la vagina. El útero se divide en una parte superior ancha, el **cuerpo**, que representa 2/3, y una parte inferior, más angosta, el **cuello**, que representa el 1/3 restante del órgano. El cuello (Figura I-12) tiene forma cilíndrica y está perforado en su extremidad inferior, penetra en la bóveda de la vagina, y los puntos de reflexión de la pared vaginal lo dividen en una parte superior, la *portio supravaginalis*, y otra inferior, la *portio vaginalis*, que tienen, aproximadamente, la misma longitud (Lejárcegui, 1974; Geneser, 2006).

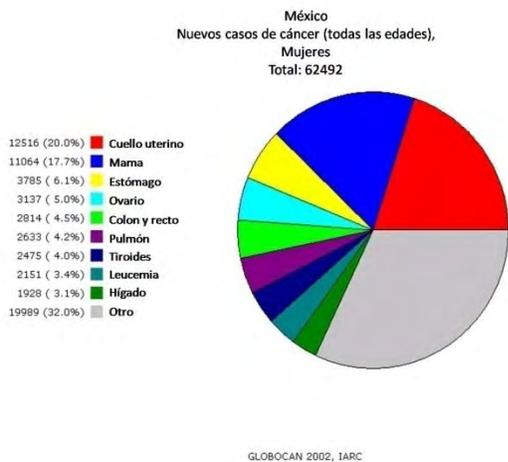


Figura I-9

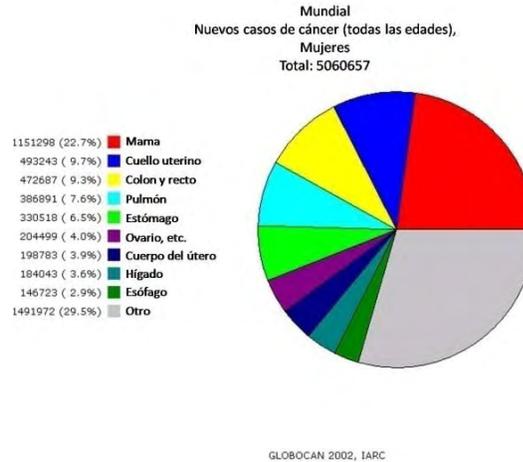


Figura I-10



Figura I-11

La superficie de la porción vaginal del cuello uterino (ectocérvix) está cubierta por un epitelio escamoso estratificado idéntico al de la vagina y con capas comparables a las de la piel, se encarga de segregar y acumular cantidades variables de glucógeno, además de ser un tejido protector debido a su superficie queratinizada. El conducto cervical (endocérvix) está tapizado por un epitelio cilíndrico monoestratificado, sus núcleos son compactos, pequeños y bien teñidos y se

sitúan en el polo basal. Entre las regiones cilíndricas y escamosas se forma una zona de transición (Figura I-12) que puede ser abrupta o gradual. Histológicamente, la zona de transición puede aparecer como una unión brusca entre el epitelio cilíndrico del endocérnix y el epitelio estratificado del ectocérnix, o bien, su aspecto histológico puede pertenecer a diferentes etapas de la metaplasia escamosa. El epitelio que reviste la zona de transición es de naturaleza delicada y fácilmente traumatizable, en constante destrucción y reparación (Lejárcegui, 1974). Esta zona limitante tiene gran importancia en la clínica, dado que allí se desarrolla el cáncer de cuello uterino (Geneser, 2006).

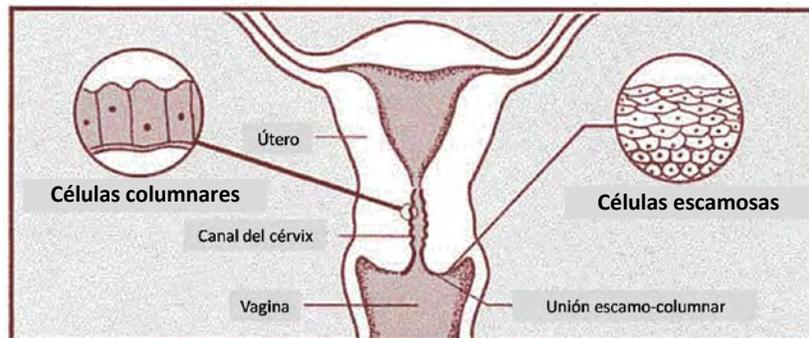


Figura I-12 El cuello uterino. Indicando el área de unión entre el epitelio endocervical y el ectocervical: *unión escamo-columnar*, también llamada *zona de transformación* (Tomado y modificado de <http://www.gynalternatives.com>).

2. Clasificación de las lesiones intrauterinas

Los primeros sistemas de clasificación de los cambios histológicos que se consideraban “precursores del cáncer cervical” estaban subdivididos en cuatro categorías (displasia leve, moderada, severa y carcinoma *in situ*) o en tres categorías de neoplasias intraepiteliales cervicales (CIN 1, 2 y 3), que reflejaban una secuencia biológica pero desestimaban el papel y los cambios histológicos ocasionados por el virus del papiloma humano (HPV). En diciembre de 1988, un grupo de profesionales en citología, histopatología y clínica participó de un encuentro en Bethesda, Maryland, con el objeto de elaborar un sistema que sirviera para dar a conocer la interpretación citológica al ginecólogo de un modo claro y relevante de los exámenes de Papanicolaou. El sistema Bethesda al igual que los previos, basa el diagnóstico en el análisis morfológico de las células del cuello uterino. Con este método las categorías que indicaban riesgo para el desarrollo de la neoplasia quedaban reducidas a sólo dos: lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado y de alto grado (LSIL y HSIL) (Figura I-13), donde el HPV es un factor importante. Clínicamente las lesiones intraepiteliales escamosas (SIL) indican un riesgo de cáncer cervicouterino, es por eso que la paciente con una valoración LSIL está sujeta a seguimiento, mientras que el diagnóstico HSIL implica la realización de colposcopia, tanto en uno como en otro caso con el objetivo de descartar la progresión tisular a malignidad (Kurman, 2003).

El sistema Bethesda incorporó también categorías diagnósticas que no representan un riesgo evidente de transformación maligna. La categoría “células escamosas atípicas” (ASC) incluye

cambios que no están vinculados a la infección y neoplasia provocada por los tipos oncogénicos del HPV y a otros hallazgos que sugieren la posible presencia de una neoplasia intraepitelial cervical (CIN). Las interpretaciones ASC pueden dividirse aún en dos categorías: “de significado indeterminado” (ASC-US), en la cual los cambios pueden sugerir LSIL o SIL de grado indeterminado; y la segunda para la que “no es posible descartar HSIL” (ASC-H), en los cuales los cambios citológicos sugieren HSIL (Sherman et al., 2003)

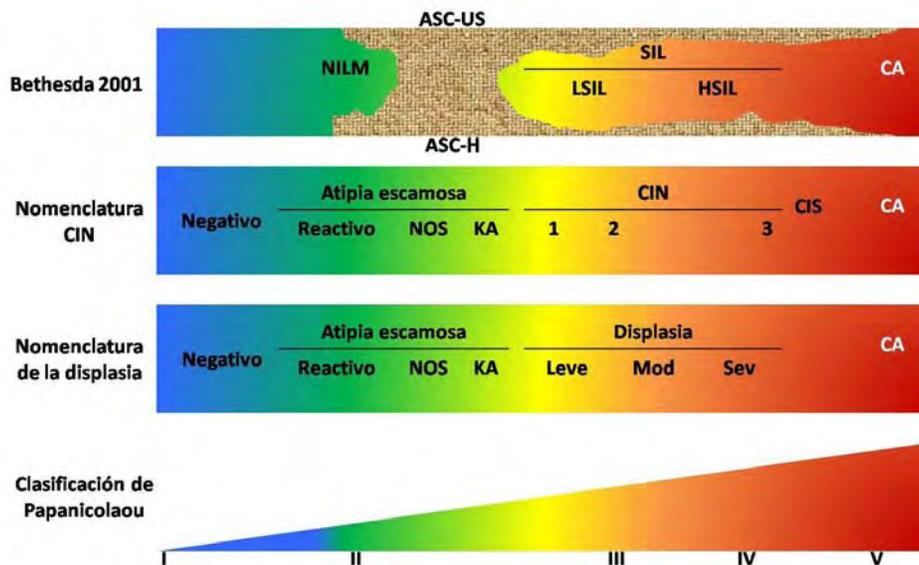


Figura I-13 Comparación entre las cuatro clasificaciones citológicas de las células escamosas. Los tonos indican la secuencia morfológica de los hallazgos citológicos y las transiciones imprecisas que separan a las distintas categorías: **azul** = negativo; **verde** = ambiguo; **amarillo** = anomalías epiteliales de bajo grado (generalmente, infección con HPV); **naranja** = anomalías intraepiteliales de alto grado (generalmente, neoplasias intraepiteliales vinculadas con HPV); y **rojo** = carcinoma. Las categorías ASC-US y ASC-H están representadas por puntos que abarcan varias categorías a fin de recalcar la naturaleza no jerárquica que tienen estas categorías. **Abreviaturas:** NILM = negativo para lesión intraepitelial y malignidad; ASC-US = células escamosas atípicas de significado indeterminado; ASC-H = células escamosas atípicas, no se puede descartar HSIL; SIL = lesión escamosa intraepitelial; LSIL = lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; HSIL = lesión escamosa intraepitelial de alto grado; CA = carcinoma; NOS = sin especificar; KA = atipia koilocítica; CIN = neoplasia intraepitelial cervical; CIS = carcinoma *in situ*; Leve = displasia leve; Mod = displasia moderada; Sev = displasia severa. (Modificado de Kurman, 2003)

La categoría “negativo para lesión intraepitelial o malignidad” (NILM) incluye aquellas valoraciones clínicas del tejido cervicouterino en las que no se identifica ninguna anomalía epitelial. La presencia de infecciones o colonizaciones de microorganismos y los cambios celulares reactivos como la inflamación, entre otros, son considerados hallazgos no neoplásicos y clasificados en la categoría NILM. Estos cambios deben ser muy bien reconocidos, ya que pueden representar el diagnóstico diferencial de LSIL, o incluso de carcinoma (Young et al., 2003). En este sentido, la implementación de otras aproximaciones puede ser útil en la diferenciación del grado real de las muestras clasificadas en esta categoría.

a) La inflamación

La inflamación es una respuesta de protección al daño tisular (resultante de la infección por patógenos, irritación química y/o heridas (Lu et al., 2006); es la respuesta primordial que elimina o neutraliza organismos o material extraño de nuestro organismo (Lawrence y Gilroy, 2007). A través de una red multifactorial de señales químicas se inicia y mantiene para 'sanar' al tejido dañado (Coussens y Werb, 2002).

El proceso inflamatorio es iniciado por las células cebadas y los macrófagos cercanos al tejido que colectivamente reclutan y activan células inflamatorias procedentes del sistema venoso como los leucocitos (granulocitos polimorfonucleares, monocitos, neutrófilos y eosinófilos) gracias a la liberación de una batería de mediadores inflamatorios, aminas bioactivas, citocinas, quimiocinas y mediadores lipídicos (Coussens y Werb, 2002; Karin et al., 2006; Lawrence, 2007; Lawrence y Gilroy, 2007). Esta primer respuesta del hospedero es la inflamación aguda, de naturaleza auto-amplificante (Lawrence, 2007), a lo largo de la cual las células atraídas contribuyen al saneamiento tisular fortaleciendo y manteniendo la defensa contra la infección (Lu et al., 2006), al mismo tiempo que la proliferación celular es estimulada para que el tejido se regenere (Coussens y Werb, 2002).

En condiciones normales la inflamación es auto-limitante. La producción y liberación de mediadores anti-inflamatorios resuelven el proceso en el sitio inflamado al conseguir la remoción total del agente causal y la completa reparación del tejido (Coussens y Werb, 2002). La resolución de la inflamación también requiere la apoptosis de leucocitos y su fagocitosis por macrófagos locales (Karin et al., 2006; Lawrence, 2007). La resolución de la inflamación implica la protección del organismo del daño excesivo y el favorecimiento de la restauración tisular en estructura y función (Lawrence y Gilroy, 2007).

La relación de la inflamación con el cáncer aparece en escenarios donde la presencia de células y mediadores pro-inflamatorios en el sitio de saneamiento se vuelve persistente o cuando los mecanismos endógenos anti-inflamatorios se desregulan ocasionando un estado inflamatorio crónico que puede prolongarse días, meses o incluso años (Coussens y Werb, 2002; Lawrence, 2007; Lawrence y Gilroy, 2007). En este caso, pueden reconocerse dos vías en que la inflamación crónica consigue influir la iniciación y la progresión tumoral: i) por promoción de la transformación celular a través del daño inducido al DNA por las ROS y RNS generados por la actividad de las células inflamatorias (Lu et al., 2006), y ii) por la proliferación celular sostenida en el contexto del saneamiento celular y en microambientes ricos en células inflamatorias y factores de crecimiento/supervivencia (Coussens y Werb, 2002).

Aunque el estado inflamatorio crónico puede ser inducido por varios agentes (Tabla I-6), las infecciones persistentes son el factor más común y es una hipótesis plausible que muchas malignidades surjan de áreas con infección e inflamación (Coussens y Werb, 2002). Está bien establecido, por ejemplo, que la infección con la bacteria Gram-negativa *Helicobacter pylori* es la principal causa del cáncer de estómago y que los virus C y B de la hepatitis representan un factor de riesgo importante para el desarrollo del carcinoma hepatocelular, así como el hecho de que el

virus del papiloma humano y el virus de Epstein-Barr son agentes asociados con el desarrollo de tumoraciones malignas (ver Tabla I-2) (Coussens y Werb, 2002; Lu et al., 2006; Karin et al., 2006).

CONDICIÓN PATOLÓGICA	NEOPLASIA ASOCIADA	AGENTE ETIOLÓGICO
Asbestosis, silicosis	Mesotelioma, carcinoma de pulmón	Fibras de asbesto, partículas de sílice
Bronquitis	Carcinoma de pulmón	Sílice, asbestos, fumar (nitrosaminas, peróxidos)
Inflamación de la vejiga, cistitis	Carcinoma de vejiga	Indwelling crónico, catéter urinario
Gingivitis, lichen plano	Carcinoma oral de células escamosas	
Enfermedad inflamatoria intestinal (enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa crónica)	Carcinoma colo-rectal	
Esclerosis de Lichen	Carcinoma vulvar de células escamosas	
Pancreatitis crónica, pancreatitis hereditaria	Carcinoma pancreático	Alcoholismo, mutación en el gen tripsinogen en el cromosoma 7
Esofagitis por reflujo, esófago de Barrett	Carcinoma esofágico	Ácidos gástricos
Sialadenitis	Carcinoma de glándulas salivales	
Síndrome de Sjogren, tiroiditis de Hashimoto	Linfoma del tejido linfoide asociado a mucosa (MALT)	
Inflamación de la piel	Melanoma	Luz ultravioleta
Cánceres asociados con agentes infecciosos		
<i>Opisthorchis</i> , <i>Cholangitis</i>	Colangiosarcoma, carcinoma de colon	Lombrices hepáticas (<i>Opisthorchis viverrini</i>), ácidos biliares
Colecistitis crónica	Cáncer de la vejiga de Gall	Bacterias, piedras de gall en la vejiga
Gastritis, úlceras	Adenocarcinoma gástrico, MALT	<i>Helicobacter pylori</i>
Hepatitis	Carcinoma hepatocelular	Virus de la hepatitis B y/o C
Mononucleosis	Linfoma de no-Hodgkin de células B, linfoma de Burkitts	Virus Epstein-Barr
Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)	Linfoma de no-Hodgkin, carcinomas de células escamosas, sarcoma de Kaposi	Virus de inmunodeficiencia humana, herpes virus humano tipo 8
Osteomielitis	Carcinoma de piel en senos nasales	Infección bacteriana
Enfermedad inflamatoria pélvica, cervicitis crónica	Carcinoma de ovarios, carcinoma cervical/anal	Gonorrea, clamidia, virus del papiloma humano
Cistitis crónica	Vejiga, hígado, carcinoma rectal, linfoma folicular del bazo	Esquistosomiasis
Prostatitis ^a	Cáncer de próstata	Infección bacteriana

Tabla I-6 Condiciones inflamatorias crónicas asociadas con neoplasias. (Tomado de Coussens y Werb, 2002; ^aPalapattu et al., 2004)

(1) ***Inflamación, aneuploidía y cáncer de cuello uterino.***

Los tumores sólidos están compuestos por dos compartimientos discretos pero interdependientes: 1) las células malignas y 2) el estroma que ellas mismas inducen y en el cual se distribuyen. El estroma tumoral resulta sorprendentemente similar a los coágulos que se forman

en el tejido dañado o infectado. Ambos se componen de vasos sanguíneos, células inflamatorias (macrófagos y leucocitos, principalmente), tejido conectivo y una matriz de gel de fibrina en el caso del estroma tumoral. Tal parece que los tumores se comportan en el cuerpo como heridas y de hecho, inducen su estroma por la activación de la respuesta inmunológica del hospedero (Dvorak, 1986).

La inflamación crónica se caracteriza por el daño tisular sostenido, la proliferación celular estimulada por el daño, y la reparación tisular (Lu et al., 2006). El microambiente generado es dominado por macrófagos capaces de generar, junto con otros leucocitos, altos niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS) para atacar la infección; sin embargo, en un ambiente de continuo daño y proliferación celular, la persistencia de esos agentes es deletérea para las células propias. Es posible que se produzcan agentes mutagénicos como el peroxinitrito que reacciona con el DNA y cause mutaciones en las células proliferantes tanto del epitelio como del estroma (Lu et al., 2006). La liberación del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y del factor inhibitorio de migración de los macrófagos exagera el daño al DNA (Pollard, 2004). El factor inhibitorio de migración interfiere las respuestas protectoras dependientes de p53 (Hudson et al., 1999) e interfiere, también, la vía de Rb, causando la acumulación de mutaciones oncogénicas (Petrenko y Moll, 2005).

El daño genético causado por la exposición a una inflamación crónica o persistente puede repercutir en los mecanismos moleculares de control de la división celular en las células proliferantes y por tanto conducir a mutaciones cromosómicas numéricas.

La amplificación anormal de centrosomas y el acortamiento de los telómeros, son consecuencias cruciales de la exposición persistente a factores inflamatorios. Desde inflamaciones agudas hasta crónicas, es posible observar que la aneuploidía correlaciona con la presencia de múltiples centrosomas (Oberringer et al., 1999; Lothschütz et al., 2002) y mitosis multipolares (Lothschütz, et al., 2002). La multiplicación anormal de centrosomas es una consecuencia común en células donde el gen *p53* se encuentra regulado por debajo de los valores normales o simplemente no existe (Fukusawa et al., 1996).

En cuanto a los telómeros, el acortamiento que presentan en patologías como la colitis ulcerante (Kinouchi et al., 1998; O'Sullivan et al., 2002), el esófago de Barret (Finley et al., 2006), la cirrosis y el carcinoma hepatocelular (Plentz et al., 2004; Plentz et al., 2005) está correlacionado con la presencia de aneuploidías con frecuencias tan elevadas que representa un alto riesgo para la iniciación y/o la progresión tumoral maligna.

Las inflamaciones del cuello uterino o "cervicitis" son un problema frecuente en la patología ginecológica, asociándose, en muchas ocasiones, a otras afecciones o alteraciones, como las ectopias, desgarros cervicales, infecciones vaginales, del endometrio o las trompas (Márquez, 1974). Pese a este hecho, la inflamación no es considerada una lesión que implica riesgo al desarrollo neoplásico desde la aproximación morfológica (Young et al., 2003), a menos que se presenten condiciones macroscópicas específicas que llamen la atención como la presencia de ulceraciones cervicales para recurrir a la biopsia y a otras evaluaciones que determinen si la

inflamación tiene carácter neoplásico o no (Márquez, 1974). Pero como hemos visto, existe evidencia de que los productos de los procesos inflamatorios pueden dirigir la transformación maligna alterando los diversos mecanismos involucrados en el control del ciclo celular, y la aneuploidía, siendo una característica frecuente en otros padecimientos inflamatorios, puede ser un marcador útil en el proceso patológico del cuello uterino.

3. El virus del papiloma humano (HPV)

La familia Papillomaviridae está compuesta por cinco géneros: Alfa, Beta, Gamma, Mu y Nu. Los principales géneros son el Alfa y el Beta, pues de los más de 100 tipos caracterizados molecularmente, hasta ahora, cerca del 90% pertenece a alguno de estos grupos (Doorbar, 2006).

El grupo más grande es el de los Alfa-papilomavirus, incluye a los más de 30 tipos de HPV capaces de infectar el tracto genital (Doorbar, 2006; Muñoz et al., 2006), comportándose como una enfermedad de transmisión sexual (Schiffman y Castle, 2003; Carrillo et al., 2004). En los carcinomas de pene, vulva, vagina, cuello uterino y ano, el HPV es considerado un factor importante para la progresión maligna (Parkin y Bray, 2006).

Los HPVs que infectan la mucosa genital son clasificados en dos grupos: i) papilomavirus de alto riesgo (HPV-HR) y ii) papilomavirus de bajo riesgo (HPV-LR). El criterio para clasificarlos de esta manera se basa en la patogenicidad o virulencia que el tipo viral posee y que depende de la expresión de proteínas particulares que interfieren procesos elementales en el control celular del hospedero. Como ejemplo tenemos que el HPV-HR tipo 16 es responsable de aproximadamente el 50% de todas las infecciones en los casos de cáncer cervicouterino (CaCu) (Doorbar, 2006), e incluso puede ser identificado en muy alta frecuencia en lesiones de bajo grado (Nindl et al., 1999). Otro HPV-HR de importancia es el tipo 18, éste se encuentra en aproximadamente el 20% de todos los casos del mismo padecimiento (Carrillo et al., 2004). Razón por la cual en el caso particular del cáncer del cuello uterino, la infección viral se considera el factor etiológico más importante (von Knebel Doeberitz, 2006). Los HPVs de bajo riesgo, como los tipos 6 y 11 (los más frecuentes en las lesiones), rara ocasión están asociados con el desarrollo tumoral pero son de importancia médica, ya que son causa de verrugas genitales (Doorbar, 2006).

Los HPVs son virus de DNA circular de doble cadena que consta de 8000 pares de bases contenidas en una cápside de 55nm de diámetro con forma de icosaedro (Figura I-14). Su genoma (Figura I-15) puede ser dividido en tres grandes porciones: una región temprana (E, por early en inglés) de aproximadamente 4kb, que codifica proteínas no estructurales; una región tardía (L, por late en inglés) de aproximadamente 3kb, codificante de las dos proteínas que construyen la cápside; y de una región de 1kb, aproximadamente, no codificante, pero que regula la replicación y la expresión génica viral, es la región larga de control (LCR) (Münger et al., 2004).

a) El HPV en la patología del cáncer de cuello uterino

La infección por HPVs, en el cuello uterino, requiere que las partículas virales alcancen la capa basal epitelial ya que es la única en constante división (Münger et al., 2004; Doorbar, 2006; von Knebel Doeberitz, 2006). Para conseguirlo requieren rupturas o heridas del epitelio (Figura I-16) (Doorbar, 2005; Woodman et al., 2007).

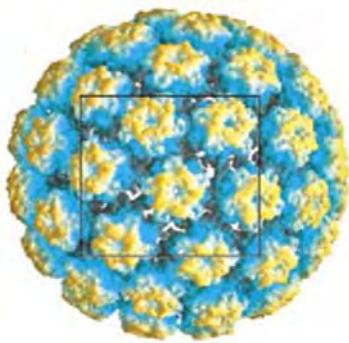


Figura I-14 Vista de la superficie molecular de la cápside del modelo atómico del HPV (Tomado de Modis et al., 2002).

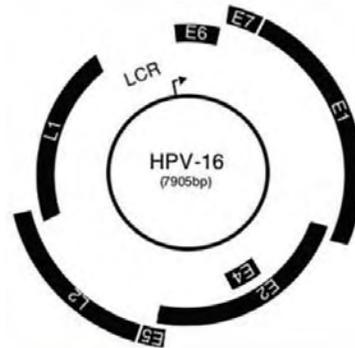


Figura I-15 Representación del genoma de DNA circular de doble cadena. Mostrando las regiones E, L y LCR, así como el principal motor temprano P₉₇, indicado con una flecha (Tomado de Münger et al., 2004).

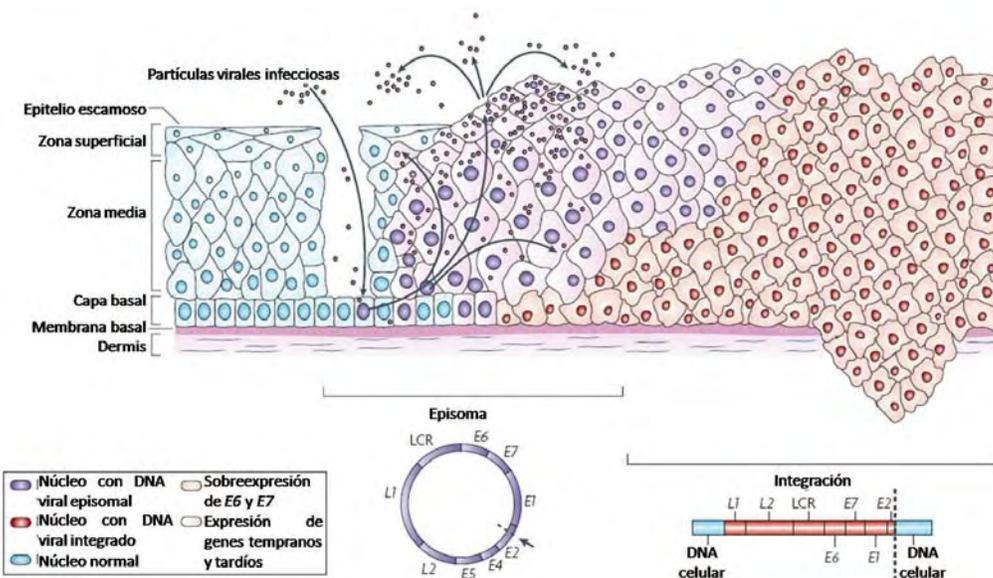


Figura I-16 Progresión a cáncer cervical mediada por HPV. Se cree que el HPV accede a las células basales a través de micro-lesiones en el epitelio cervical. Después de la infección, los genes tempranos E1, E2, E4, E5, E6 y E7 son expresados y el DNA episomal se replica. En las capas superiores del epitelio (zonas media y superficial) el genoma viral se replica a una tasa más alta y los genes tardíos L1 y L2 son expresados para encapsidar los nuevos viriones (Tomado y modificado de Woodman et al., 2007).

La zona de transformación es particularmente susceptible, al menos por tres razones: i) es un área de unión, a veces abrupta, de dos tipos de tejido (el cilíndrico y el estratificado) (Lejárcegui, 1974); ii) ofrece rupturas del tejido, existentes o producidas durante el coito, debido a su naturaleza delicada y traumatizable (Lejárcegui, 1974; Vidart Aragón et al., 1997). En cualquiera de estos dos escenarios se ofrecen rupturas del tejido o espacios a través de los cuales los viriones pueden alcanzar la capa basal, evento que nos lleva a la última razón de la susceptibilidad de la

zona de transformación: iii) esta zona está en constante actividad proliferante, por lo que los blancos celulares óptimos parecen ser las células subcolumnares y/o las células metaplásicas, que además se presentan expuestas al virus (Vidart Aragón et al., 1997).

El ingreso del virus a la célula aún no ha sido dilucidado completamente. Algunos estudios apuntan a que los proteoglicanos de sulfato de heparina juegan un papel importante en el anclaje inicial y/o en su ingreso. Se propone también que la internalización de viriones puede depender, igualmente, de vesículas endocíticas con clatrina. Es en los endosomas o lisosomas tardíos donde el desensamble de las partículas víricas tiene lugar y se deja libre el DNA viral para que ingrese al núcleo celular (revisado en Doorbar, 2005; y Doorbar, 2006).

La transferencia del DNA viral al núcleo es facilitado por la proteína de la cápside L2. En el núcleo de las células basales, el genoma viral se establece como un episoma estable (sin integrarse al genoma celular) (Doorbar, 2006) y es mantenido en un número bajo de copias (Münger et al., 2004). Tanto el estado episomal del virus, como la baja tasa replicativa del mismo se consigue con la expresión de los genes E1 y E2 (Doorbar, 2006). La proteína E2 juega distintos papeles importantes durante la infección activa, es requerida en el mantenimiento del genoma viral en las células basales (al igual que E1), en la iniciación de la replicación viral, en el control de la expresión de otros genes virales y en la segregación del genoma (Webser et al., 2000; Doorbar, 2006).

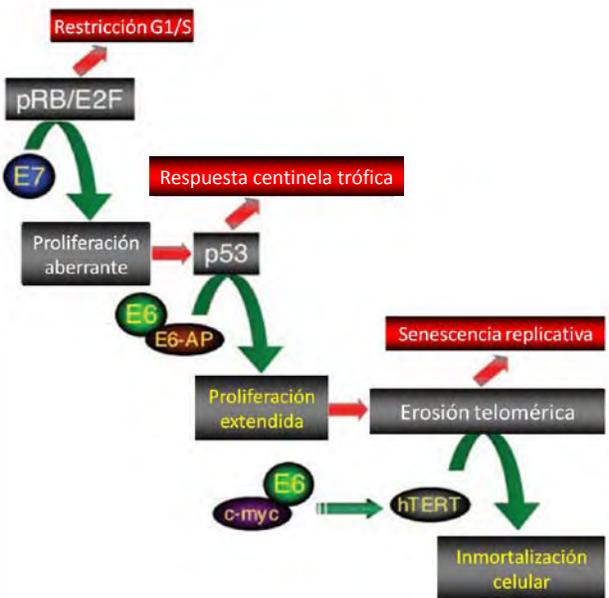


Figura I-17 Esquema de los pasos críticos de la carcinogénesis inducida por el HPV. La inactivación de las vías supresoras de tumores pRb y p53 y la expresión de la subunidad catalítica de la telomerasa (hTERT) constituyen una parte de los pasos que son necesarios para la generación de células epiteliales completamente transformadas *in vitro* (Tomado y modificado de Münger et al., 2004)

En el estado episomal, la proteína E2 controla la expresión de otros genes virales como el gen que codifica la proteína E6 y el gen que cifra a la proteína E7. Estas dos proteínas interactúan con diferentes actores del control celular replicativo, sin embargo las interacciones más importantes las mantienen con las proteínas supresoras de tumores p53 y pRb (Figura I-17), respectivamente. La proteína E6 induce la degradación prematura de la proteína p53 y entonces

interfiere con sus funciones apoptóticas. En tanto, la proteína E7 favorece la desestabilización del complejo proteico retinoblastoma (pRb) permitiendo a la célula evadir los controles del ciclo celular. La eliminación de p53 y pRb implica varias alteraciones en las funciones mitóticas que pueden resultar en la iniciación de inestabilidad cromosómica (von Knebel Doeberitz, 2006) e iniciando el proceso de transformación maligna. Curiosamente, ha sido observado que la proteína E2, en ausencia de otras proteínas virales es capaz de inducir apoptosis empleando la vía de p53 (Webster et al., 2000)

Cuando las células infectadas comienzan a diferenciarse y migran hacia la superficie del epitelio, los virus comienzan a incrementar el número de copias de su genoma a la tasa más alta, los genes tardíos (L1 y L2) de la cápside son expresados y se produce y libera la progenie viral (Münger et al., 2004).

En ocasiones, el genoma viral se integra al genoma de la célula infectada. La inserción implica la pérdida de algunos genes virales y es el gen E2 el que se ve frecuentemente afectado, donde la ruptura del genoma viral circular/episomal ocurre para permitir su inserción en la secuencia de DNA celular (Figura I-16) (Webster et al., 2000; Pett y Coleman, 2007; Woodman et al., 2007). La integración guía la sobreexpresión de los oncogenes virales E6 y E7, con un efecto más pronunciado sobre las proteínas supresoras de tumores que a su vez conlleva a la inmortalización celular, ventajas proliferativas y la generación de GIN (Münger et al., 2004; von Knebel Doeberitz, 2006; Pett y Coleman, 2007).

(1) El HPV favorece la generación de inestabilidad cromosómica.

La inestabilidad cromosómica, en sus formas numérica y/o estructural, puede ocurrir durante el proceso infeccioso del HPV por diferentes vías:

- ~ Durante la segregación de los episomas virales replicados hacia las células hijas. E2 se encarga de anclar los episomas a los cromosomas mitóticos, este paso es crítico porque puede afectar la correcta segregación cromosómica (revisado en Doorbar, 2006).
- ~ La proteína E2 es capaz de inducir bloqueo mitótico aún en la presencia de las proteínas virales E6 y E7. E2 puede bloquear a las células evitando que terminen la mitosis por inactivación del complejo promotor de la anafase. Aquellas células que evaden el arresto, presentan fenotipos aberrantes: pérdidas cromosómicas (parciales y completas) y multiplicaciones de centrosomas (Bellanger et al., 2005).
- ~ Diversos genes implicados en vías de control del ciclo celular y la apoptosis están metilados en células infectadas con HPVs-HR. Principalmente en lesiones de alto grado y en cáncer invasivo (Widschwendter et al., 2004). Las metilaciones pueden causar mutaciones puntuales.
- ~ La oncoproteína viral E6 induce tetraploidía. Con la degradación de la proteína e inactivación del gen p53, E6 puede inducir tetraploidía por sobreexpresión de la proteína cinasa tipo polo (Plk1) (Incassati et al., 2006).

- ~ El nivel de aneuploidía y el estado (episomal o integrado) del HPV correlacionan. En lesiones de alto grado y en carcinomas del cuello uterino tanto la aneuploidía como el estado integrado del HPV al DNA celular son elevados. La incógnita es cuál de los dos eventos es inicial y favorece la ocurrencia del segundo (Melsheimer et al., 2004).
- ~ La proteína E6, induce la actividad de la telomerasa. La erosión de las terminales teloméricas de los cromosomas y, por tanto, la restricción de la capacidad proliferativa, se ve abatida en células cervicales infectadas con HPV. Las proteínas E6 y E7 inducen la expresión de la subunidad catalítica de la telomerasa (hTERT) que lleva a la inmortalización celular (Münger et al., 2004).
- ~ E6 y E7 inducen inestabilidad genómica. La interacción de las oncoproteínas E6 y E7 con las proteínas celulares p53 y pRb deja desprovistas a las células de los principales mecanismos de control del ciclo celular, permitiendo la acumulación de mutaciones, la aneuploidía es la más notable (Münger et al., 2004).
- ~ La integración del HPV se ha encontrado altamente relacionada con el incremento en el número de copias del gen *TERC*, que codifica el templado de RNA de la telomerasa (Hopman et al., 2006).

El HPV induce poliploidías y aneuploidías en células escamosas. En células procedentes del cuello uterino con diagnóstico HSIL, y positivas para la infección con HPV-HR, el contenido de DNA generalmente se encuentra multiplicado (poliploidía), pero también se identifican aneusomías de algunos cromosomas (Méhes et al., 2004) que han sido correlacionadas con la expresión oncogénica (von Knebel Doeberitz, 2006).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La neoplasia de células escamosas del cuello uterino ocupa, entre las neoplasias malignas que afectan a la mujer, el segundo lugar como causa de mortalidad en nuestro país (INEGI, 2008). En el resto del mundo el panorama no es más alentador. De acuerdo con la base de datos del año 2002 de la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC), el carcinoma de cuello uterino era el segundo tipo tumoral con los niveles más altos de incidencia de nuevos casos y el tercero como causa de muerte en mujeres a nivel mundial, siendo los principales contribuyentes a estos índices los países en vías de desarrollo (IARC-GLOBOCAN, 2002).

Aunque la prueba de Papanicolaou ha sido una gran herramienta para combatir esta patología al favorecer el diagnóstico oportuno y el tratamiento adecuado, es necesario estudiar el carcinoma cervicouterino y desarrollar metodologías diagnósticas a partir de otras aproximaciones, además de la morfológica. El análisis citogenético de las células exfoliativas del cuello uterino ofrece una alternativa a través de la valoración de aberraciones cromosómicas numéricas. Nuestro grupo documentó la presencia de tetraploidías y aneuploidías en lesiones precursoras de CaCu (Olaharski et al., 2006) y en pacientes con ASC-US. Nos interesa documentar la presencia de estos tipos de aberraciones cromosómicas en pacientes con diagnósticos de inflamación puesto que en estos casos las pacientes reciben un seguimiento cuatrimestral o semestral. Este tipo de procedimiento es costoso para las instituciones de salud pública y la deserción es elevada y el encontrar un indicador de riesgo como un aumento de aneuploidías en lesiones inflamatorias podría apoyar en el diagnóstico.

Los largos períodos de revisión para pacientes con un diagnóstico de inflamación se deben a que éste no es considerado un diagnóstico de riesgo, sin embargo, durante el reclutamiento de células inflamatorias, así como a lo largo del proceso inflamatorio, el microambiente generado puede ser capaz de inducir diversas alteraciones, entre ellas la aneuploidía. Además, a partir de otros estudios sabemos que algunos tumores proceden de sitios donde la inflamación se torna crónica debido a infecciones persistentes (Coussens y Werb, 2002; Lu et al., 2006; Karin et al., 2006). En este sentido nos interesa averiguar si existe alguna relación sinérgica entre el estado diagnóstico y la presencia del virus del papiloma humano.

IV. HIPÓTESIS

La inflamación del tejido cervical uterino induce la generación de células con aberraciones cromosómicas numéricas, mismas que pueden representar riesgo en la evolución del daño tisular hacia lesiones de mayor grado y ser resultado de la influencia de otros factores de riesgo como la infección con el papilomavirus humano (HPV), la edad o el tabaquismo.

V. OBJETIVO GENERAL

Investigar la frecuencia de aberraciones cromosómicas numéricas en células exfoliadas de cérvix uterino de pacientes con diagnóstico de inflamación.

A. OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar si la aneuploidía puede ser utilizada como marcador biológico de genotoxicidad y predecir si el tejido inflamado del cuello del útero, considerado como una lesión de poca relevancia en la progresión neoplásica, representa un riesgo para la evolución del daño tisular hacia lesiones de mayor grado.

Evaluar el efecto sinérgico de algunos factores considerados de riesgo en la progresión maligna (infección con el HPV, la edad y el hábito de fumar) con la inflamación sobre la frecuencia de células con anormalidades cromosómicas numéricas.

VI. JUSTIFICACIÓN

El actual sistema de clasificación de las lesiones cérvico-uterinas se basa en la valoración de los atributos morfológicos de las células escamosas, mismos que revelan gran información acerca del grado de transformación neoplásica que el tejido puede estar desarrollando. Pero sucede que los primeros cambios en la tumorigénesis se presentan a nivel del material hereditario, a través de mutaciones puntuales y/o cromosómicas, que serán finalmente las responsables del fenotipo celular (caracteres morfológicos). Dado que las células de un tejido con diagnóstico de inflamación no presentan cambios morfológicos significativos, la inflamación no se considera un estado de riesgo carcinogénico. Sin embargo, la presencia de células inflamatorias con la consecuente liberación de mediadores pro-inflamatorios, generan condiciones que pueden influir la formación de células con alteraciones numéricas del cariotipo, por lo que nos interesa analizar la frecuencia de aberraciones cromosómicas numéricas en pacientes con diagnóstico de inflamación del cuello uterino.

Por otra parte, se ha visto y reportado que algunos factores como la edad y el hábito de fumar influyen la progresión hacia grados de mayor riesgo neoplásico en diferentes tipos de tumor. En cuanto al cáncer de cuello uterino, el principal factor etiológico es la infección con el virus del papiloma humano (HPV), el cual se ha visto que influye principalmente la progresión de lesiones malignas como las lesiones intraepiteliales de bajo y alto grado (LSIL y HSIL) hacia el carcinoma *in situ*. Estas razones nos llevan a considerar la evaluación de estos factores en la formación de células inestables cromosómicamente en el tejido cérvicouterino inflamado.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

A. MARCADORES DE GENOTOXICIDAD

El marcador empleado como signo de genotoxicidad fue la frecuencia de aberraciones cromosómicas numéricas, evaluadas en muestras de tejido exfoliativo del cuello uterino de mujeres mexicanas pacientes del Instituto Nacional de Cancerología de la Ciudad de México (INCAN). Las aberraciones numéricas fueron clasificadas en aneuploidías (cerca de la diploidía, a la triploidía o a la tetraploidía) y poliploidías (triploidías y tetraploidías), los criterios considerados para clasificarlas de esta manera se comentan más adelante al tratar el método de observación.

B. PROCEDIMIENTO GENERAL PARA EL ANÁLISIS DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS NUMÉRICAS A TRAVÉS DE LA HIBRIDIZACIÓN *IN SITU*¹

La técnica de hibridización *in situ* fluorescente empleada en este proyecto, sigue la secuencia metodológica siguiente:

TEJIDO
FIJACIÓN
PRETRATAMIENTO
HIBRIDIZACIÓN
LAVADOS
REVELADO
OBSERVACIÓN

1. Obtención de las muestras de tejido.

Las pacientes fueron escogidas de acuerdo con su expediente médico, fueron seleccionadas las mujeres cuyo examen de Papanicolaou reportara inflamación del tejido cervical uterino. Previo a la toma de muestra, a las pacientes seleccionadas se les aplicó un cuestionario en el cual se controlaban además de la información personal básica, otros aspectos relativos al estilo de vida como nivel socioeconómico, estado civil, número de hijos, hábitos como tabaquismo y alimenticios, historia médica e historia sexual.

Para establecer control sobre la presencia del marcador de genotoxicidad, es decir, las aberraciones cromosómicas numéricas, se determinó la obtención de dos grupos de muestras del

¹ Basado en la descripción de Gérard Morel (1993)

mismo individuo (muestras pareadas). Así, a la paciente se le tomaba una muestra del tejido del cérvix uterino y, como control, una muestra del tejido epitelial de la cavidad oral.

a) Muestras de tejido cervical.

Veinte mujeres fueron muestreadas, con edad promedio de 42.6 años (el rango de edades fue de 31 a 63 años), con diagnóstico de inflamación en el tejido cervical-uterino, pacientes del INCAN. De acuerdo con el historial de las pacientes, ocho de ellas fueron intervenidas alguna vez con la técnica de conización, sin embargo, el último diagnóstico, posterior a la conización, fue clasificado como inflamación.

Las muestras fueron obtenidas a partir del epitelio de exfoliación por raspado con cepillo citológico (CytoBrush™) del cuello del útero de estas mujeres siguiendo el procedimiento rutinario para la evaluación por Papanicolaou.

Las muestras colectadas fueron guardadas en amortiguador de fosfatos (PBS) en frío (4°C), para mantener la integridad de las células exfoliadas hasta su tratamiento en el laboratorio.

b) Muestras de tejido bucal.

El tejido de referencia escogido fue el epitelio de la cavidad oral de las pacientes referidas en el muestreo de tejido cervical. La cavidad oral fue elegida por las siguientes razones: 1) en el INCAN sólo se da atención a pacientes que presentan un diagnóstico que hace sospechar la integridad del tejido cervical uterino, por tanto no fue posible obtener muestras de tejido sano del cuello uterino; 2) el tejido bucal es un tejido epitelial al igual que el tejido cervicouterino; 3) se asumió que las muestras bucales eran negativas para un diagnóstico de inflamación.

Para obtener las células de la cavidad bucal se utilizó también el raspado con cepillo citológico (CytoBrush™) y fueron almacenadas en PBS en frío (4°C) como se describió antes.

2. Fijación de las muestras celulares.

En el laboratorio las muestras colectadas del cuello uterino y de la cavidad oral fueron recuperadas del amortiguador por resuspensión con el vórtex. Luego de centrifugar a 1400 rpm durante 10 minutos (10') para eliminar el sobrenadante, el pelet formado fue resuspendido en la solución fijadora metanol-ácido acético en concentración de 3:1 y posteriormente guardadas en frío a -20°C hasta la elaboración de las laminillas.

3. Pretratamiento².

a) *Preparación de las laminillas.*

Los portaobjetos empleados fueron tratados previamente con poli-lisina (SIGMA-Aldrich, Co., México) con el propósito de favorecer la fijación de las células en la laminilla durante el pretratamiento con lavados. Las laminillas fueron lavadas en ácido acético y secadas con algodón, en seguida fueron lavadas con acetona y finalmente durante 5' fueron depositadas en un vaso de precipitados que contenía la solución de poli-lisina 0.1% para después dejarlas secar a 70°C durante 40'.

Para preparar las laminillas con las muestras correspondientes a los tejidos bucal y cervical, se realizó un cambio de amortiguador seguido por resuspensión del botón celular y después centrifugación a 1400 rpm durante 10' para obtener el botón celular nuevamente. Se eliminó la mayor parte del sobrenadante y las laminillas fueron preparadas con goteo de 20 µl de muestra y secadas a temperatura ambiente. Se preparó una laminilla por muestra de tejidos cervical y bucal, que se mantuvieron en refrigeración a -20°C en bolsas selladas conteniendo nitrógeno gas (N_{2g}) durante 72 horas antes de ser hibridadas.

b) *Preparación de las células para la hibridación.*

La preparación de las células antes de la hibridación se hizo de la siguiente manera: transcurridas las 72 horas de refrigeración con N_{2g}, las laminillas fueron lavadas con paraformaldehído 2% a 4°C durante 30 segundos (30''), seguido de un lavado por 30'' en solución de sales de citrato (2X SSC). Durante 2' se dejaron secar a temperatura ambiente para realizar el lavado con el detergente formamida a una concentración del 70% y calentada a 72°C en baño maría durante 5'. A continuación, las células fueron sometidas a un tratamiento deshidratante con alcoholes graduados en 70, 85 y 100% durante 2' en cada solución. Para eliminar el alcohol excedente las laminillas se secaron con corrientes de N_{2g}.

La permeabilidad necesaria en las células para permitir la hibridación se obtuvo a través del tratamiento aplicado a las laminillas con una concentración igual a 5µg/ml de proteinasa K (Invitrogen, México), puesta en baño maría a 37°C, durante 13'. En seguida se lavaron nuevamente con la solución 2X SSC (30'') para repetir el tratamiento con los alcoholes pero en esta ocasión sólo por un minuto en cada solución. Paralelo a este procedimiento las sondas para la hibridación fueron preparadas como se explicará adelante, mientras tanto las laminillas podían mantenerse en la solución 100% de alcohol etílico hasta antes de terminar el tiempo de desnaturalización de las sondas para cuando los restos de alcohol debían ser eliminados con corrientes de N_{2g}.

4. Hibridación *in situ* fluorescente (FISH).

Se empleó la técnica FISH de dos colores. Las sondas consisten de secuencias de DNA repetidas en tandem específicas al cromosoma de interés, están conjugadas con un fluoróforo

² De acuerdo con el procedimiento usado por Olaharski, 2006.

(Vysis®) y son específicas para la detección de la secuencia alfa-satélite del centrómero; la sonda viene mezclada con DNA bloqueador no marcado que suprime las secuencias repetitivas más frecuentes que son comunes a otros cromosomas (Abbott Molecular Inc., 2006). La sonda que fluoresce en color anaranjado es específica para la región pericentromérica del cromosoma 3 (CEP® 3 alfa SpectrumOrange, Abbott Laboratories, USA) ampliamente reportado en la literatura como uno de los cromosomas que más frecuentemente presenta anormalidades tanto numéricas y estructurales (deleciones, duplicaciones, inversiones, etc) (Mian et al., 1999; Méhes et al., 2004; Sy et al., 2005; Yue et al., 2006; Huang, 2007) como génicas (Yumamoto et al., 2007) en células cancerosas. Mientras que la fluorescencia color verde corresponde a la sonda específica para la región pericentromérica del cromosoma 17 (CEP® 17 alfa SpectrumGreen, Abbott Laboratories, USA) cuya importancia radica en el hecho de que contiene entre otros genes, al gen que codifica para *TP53* (proteína tumoral p53) importante en el control de funciones celulares como el ciclo celular y la apoptosis y considerado un supresor de tumores (Méhes et al., 2004; Olaharski, 2006; NCBI). También existen reportes donde se muestran alteraciones cromosómicas no aleatorias para estos dos cromosomas en lesiones pre-cancerosas (Olaharski et al., 2006) y en células cancerosas del cérvix uterino (Atkin y Baker, 1982; Atkin y Baker, 1984; Heselmeyer et al., 1996).

En tanto las laminillas pasaban por la serie de deshidratación de 1' por cada solución de etanol, se hizo la preparación de las sondas como sigue: la solución de hibridación era formada por 1µl de la sonda para el cromosoma 3, 1µl de la sonda para el cromosoma 17, 2µl de agua MiliQ y 7µl del amortiguador incluido con la sonda. Una vez preparada la solución para hibridar se desnaturalizaba durante 5' con calor en un baño maría previamente calentado a 72°C.

Luego de secar las laminillas con N_{2g}, se depositaba en ellas la solución con la sonda desnaturalizada, se sellaban con parafilm y cemento. Las laminillas eran entonces incubadas a 37°C en una cámara húmeda cerrada durante toda la noche.

5. Lavados y Revelado.

Posterior a la incubación, se retiraba el parafilm de las laminillas para realizar los lavados post-hibridación en formamida al 50% y posteriormente en 2X SSC durante 5' en cada solución a 42°C, con el objeto de eliminar las hibridaciones inespecíficas, es decir, hibridaciones extranucleares sonda-sonda y nucleares sonda-sonda y sonda-DNA no blanco.

Una vez conseguido el paso anterior lo siguiente es revelar las señales fluorescentes, lo cual se consiguió al agregar 15µl de la solución DAPI/Antifade (DAPI II Counterstain, Abbott Laboratories) para la contracoloración de cromosomas y núcleos con emisión de un color azul fluorescente y el citoplasma en color rojo, para hacer evidentes las marcas de hibridación durante la localización de los cromosomas de interés. Las laminillas se sellaron con cubreobjetos y esmalte.

Este último paso, y aún los lavados que lo preceden, debieron realizarse en el cuarto oscuro en vista de la sensibilidad de las sustancias fluorescentes a excitar sus electrones ante el

estímulo de fuentes luminosas, incluida la natural, para garantizar la obtención de señales intensas y claras.

6. Observación de las hibridizaciones.

Para analizar las muestras hibridizadas se empleó un microscopio Nikon Eclipse E400 con epifluorescencia habilitado con el filtro que permite observar la tinción de DAPI (que emite a una longitud de onda de 455 nm).

Se contabilizaron 1000 células por muestra para obtener la frecuencia de anomalías cromosómicas numéricas presentes en el tejido exfoliativo inflamatorio de cuello uterino y en el tejido control.

a) Criterios de inclusión y exclusión de las células durante el conteo³.

Los criterios considerados para incluir a una célula en el análisis de inestabilidad cromosómica fueron los siguientes: a) citoplasma presente y definido, b) núcleo definido y en contraste con el citoplasma, c) núcleo sin citoplasma pero bien definido. Los criterios de exclusión fueron: a) células en racimo, no es posible distinguir los límites entre una y otra o sus núcleos se sobreponen, b) núcleo fracturado aunque con citoplasma definido, c) núcleo definido pero las marcas no son intensas ni están definidas (ver Tabla M-2).

b) Criterios de inclusión y exclusión de las marcas de hibridización³.

Cada marca fluorescente identifica al centrómero de un cromosoma, por lo tanto, al contar las señales visibles obtenemos el número de cromosomas 3 y de cromosomas 17 que cada célula posee de acuerdo con el color que se observa.

Las marcas de hibridización y por consiguiente las células que las contenían fueron consideradas dentro del conteo bajo los siguientes criterios: a) marcas intensas y definidas, b) marcas difusas pero aisladas unas de otras e intensas. Los criterios de exclusión fueron: a) marcas de hibridización difusas, poco intensas y muy próximas (las señales tienen el doble del tamaño de una señal definida), b) señales poco intensas, no se distinguen bien, c) las señales se observan por encima del núcleo celular, d) las señales de hibridización son de menos de la mitad del tamaño de una señal óptima o hay muchas pequeñas señales (ver Tabla M-2).

³ Siguiendo el criterio de Van Stedum y King, 2002

c) Clasificación de las anomalías cromosómicas numéricas⁴.

Los grados de ploidía identificados en las muestras analizadas se agruparon en tres estados del genoma: diploidía, o contenido normal de cromosomas; aneuploidía, definido como la ganancia o pérdida de cromosomas individuales; y poliploidía, definido como la multiplicación del cariotipo haploide (n) distinto del doble o normal, según se muestra en la tabla siguiente:

Estado del cariotipo	# de señales óptimas	
	Anaranjadas (cr. 3)	Verdes (cr. 17)
Diploidía	2	2
Aneuploidías		
Trisomía 3	3	2
Trisomía 17	2	3
Tetrasomía 3 y trisomía 17	4	3
Tetrasomía 3	4	2
Tetrasomía 17 y trisomía 3	3	4
Tetrasomía 17	2	4
Poliploidías		
Triploidías	3	3
Tetraploidías	4	4

Tabla M-1 Clasificación de los estados del cariotipo.

C. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para comparar la frecuencia de células con inestabilidad cromosómica entre los tejidos se empleó la prueba no paramétrica *U* de Mann-Whitney. Una prueba de correlación se planteó para establecer si existía tal entre la frecuencia de células tetraploides y la frecuencia de células aneuploides cercanas a la tetraploidía. La prueba *t* de Wilcoxon para datos pareados se utilizó para comparar la pérdida y ganancia preferencial de los cromosomas 3 y 17.

Para evaluar la influencia de los factores etiológicos considerados, se utilizaron: las pruebas *U* de Mann-Whitney, la prueba *t* para datos no pareados en el análisis de la presencia del HPV y el papel del tabaquismo; la prueba *t* para datos pareados y el análisis de varianza (ANOVA) de una vía con la prueba posterior de Tukey para comparar grupos y diferenciar las medias en el análisis de la edad.

Los valores de $P < 0.050$ fueron considerados significativos para todos los análisis.

⁴ En concordancia con el criterio de riesgo a desarrollar cáncer según el grado de inestabilidad cromosómica (Duesberg et al., 2004)

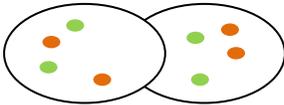
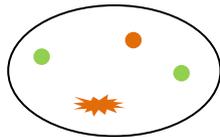
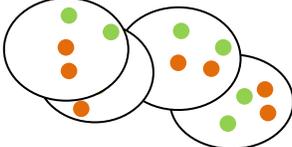
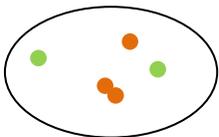
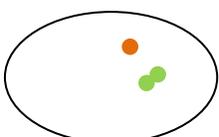
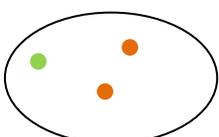
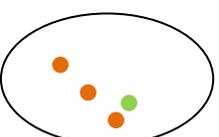
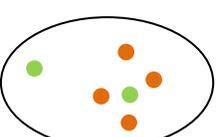
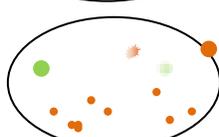
1		Los núcleos están traslapados y hay áreas que no son visibles pero las señales no se encuentran en la región de traslapamiento. Contar como dos señales anaranjadas y dos señales verdes en cada núcleo.
2		Contar como dos señales anaranjadas y dos señales verdes. Una señal anaranjada es difusa pero intensa.
3		No contar. Los núcleos están sobrepuestos y algunas de las marcas de hibridación están en el área de sobreposición.
4		Contar como tres señales anaranjadas y dos verdes, aún cuando dos señales anaranjadas son muy próximas.
5		Contar como una señal anaranjada y dos verdes. Las señales verdes están próximas pero se distingue claramente la forma de cada una.
6		Contar como dos señales anaranjadas y una señal verde.
7		Contar como tres señales anaranjadas y una verde.
8		Contar como cuatro señales anaranjadas y dos señales verdes.
9		No contar, puede ser el resultado de hibridaciones inespecíficas, también hay marcas poco intensas y definidas. Una señal anaranjada se observa fuera del núcleo celular.

Tabla M-2 Guía de inclusión y exclusión de las células hibridadas y del conteo de señales. Las marcas anaranjadas representan el centrómero del cromosoma 3, las marcas verdes indican el cromosoma 17. Modificado de Van Stedum y King, 2002

VIII. RESULTADOS

A. INESTABILIDAD CROMOSÓMICA EN CÉLULAS DEL CUELLO UTERINO CON DIAGNÓSTICO DE “INFLAMACIÓN”.

Quince de las veinte muestras (75%) de células del cuello uterino con diagnóstico de “inflamación”, colectadas y procesadas para este estudio fueron satisfactoriamente analizadas con la técnica de hibridización *in situ* fluorescente al igual que 19 muestras de las veinte (95%) que formaron el grupo control o de referencia. El grupo control se refiere a células bucales de las mismas pacientes. De cada una de las 34 muestras se analizaron 1000 células para detectar simultáneamente las aberraciones numéricas de los cromosomas 3 y 17.

1. Análisis de los cariotipos más frecuentes.

Las células de las muestras analizadas fueron clasificadas de acuerdo a los siguientes criterios (Olaharski et al., 2006):

1) Diploide (Imagen R-1): caracterizada por la presencia de dos marcas de hibridización para el cromosoma 3 y dos para el cromosoma 17, también considerada el estado normal;

2) Aneuploidías (Imagen R-2), identificadas por la presencia de números dispares de señales de hibridización de los cromosomas 3 y 17; y

3) Poliploidías (Imagen R-3), definidas por igual número de cromosomas 3 y 17 pero distintos del par.

En las muestras de tejido cervical uterino (n=15) la frecuencia de células diploides arrojó un valor promedio de 945.5 ± 7.8 , las células aneuploides promediaron en 25.4 ± 4.8 y células con cariotipos poliploides fueron identificadas en 13/15 casos con un promedio de 5.6 ± 0.9 (Tabla R-1). En las muestras de tejido bucal (control, n=19) la diploidía tuvo un valor promedio de 983 ± 1.9 ; las células aneuploides se detectaron en 12/19 muestras bucales con un promedio de 4.52 ± 0.9 , mientras que las células poliploides, detectadas en 10/19 muestras bucales, promediaron 0.68 ± 0.17 (Tabla R-2). La Tabla R-3 muestra la comparación entre la frecuencia de células con inestabilidad cromosómica en el tejido bucal, empleado en este trabajo como tejido control, con respecto a la reportada en la literatura para el tejido cervicouterino normal.

Al analizar la frecuencia de células diploides procedentes de tejido cervicouterino con diagnóstico “inflamatorio” se obtuvo un valor para la mediana de 937, mientras que en tejido control se obtuvo una mediana de 985 (*U* de Mann-Whitney, $P=0.0001$). Con respecto a las frecuencias de las células aneuploides, éstas mostraron una mediana igual a 20 contra un valor de 3 para el mismo parámetro en el tejido bucal ($P=0.0001$). Por otro lado el valor de la mediana para

las poliploidías de tejido con inflamación fue de 5 contra un valor igual a 1 en el tejido bucal ($P < 0.0001$, Tabla R-4).

a) Pacientes con antecedentes de conización.

El historial clínico de las pacientes nos permitió conocer que 8 de las 15 pacientes hubo sido intervenida para conización del tejido cervical uterino debido a un diagnóstico previo de riesgo neoplásico. Al analizar la estabilidad numérica del cariotipo de estas pacientes encontramos que el tejido cervicouterino de estas pacientes también exhibe anormalidades numéricas de los cromosomas estudiados, de hecho, aunque la diferencia no es significativa, la frecuencia en las pacientes post-cono es mayor que en las pacientes sin antecedente de conización (prueba estadística ANOVA de una vía. Figura R-1).

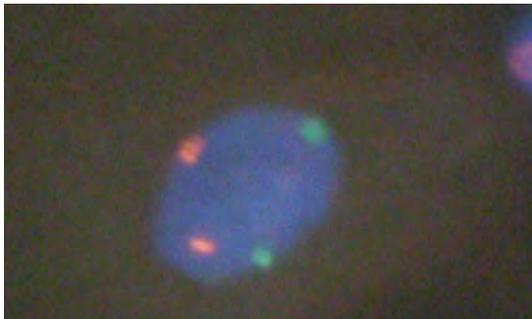


Imagen R-1 Fotografía de una célula de tejido cervical uterino 'inflamado' con contenido cromosómico normal (diploide, 2n). Cromosoma 3, en anaranjado; cromosoma 17, en verde. 100X.



Imagen R-3 Fotografía de una célula de tejido cervical uterino 'inflamado' con contenido cromosómico poliploide (tetraploide, 4n). Cromosoma 3, en anaranjado; cromosoma 17, en verde. 100X.

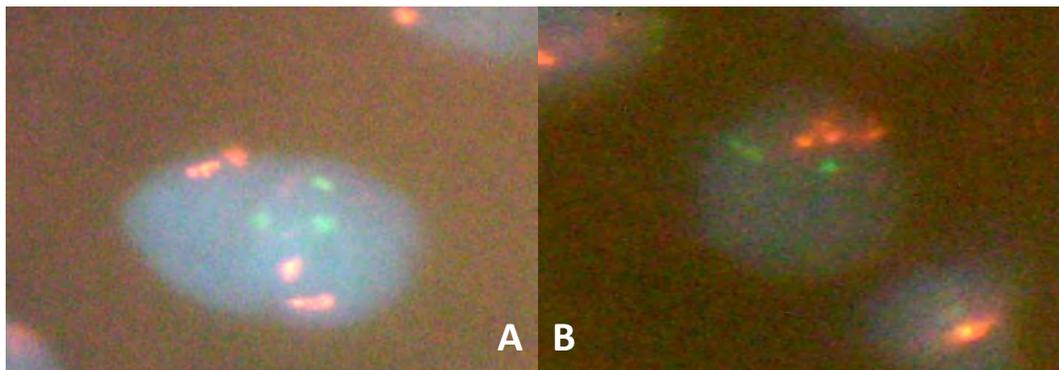


Imagen R-2 Fotografías de células del cuello uterino con cariotipo aneuploide. **A** Célula cercana a la tetraploidía (tetrasomía 3 y trisomía 17). **B** Célula con trisomía 3. Las marcas de fluorescencia anaranjada indican el centrómero del cromosoma 3, la fluorescencia verde indica el centrómero del cromosoma 17. Objetivo 100X.

Caso	Edad	Diploidías	Aneuploidías	Poliploidías
1	39	980	9	5
2	49	937	40	7
3	38	925	52	8
4	36	959	16	5
5	42	937	34	10
6	33	957	20	4
7	63	919	48	10
8	31	911	55	0
9	51	914	19	11
10	50	910	43	6
11	52	907	26	9
12	33	987	2	0
13	47	978	4	5
14	41	980	7	3
15	35	982	6	1
Prom ± SEM^a	42.6	945.5 ± 7.867	25.4 ± 4.801	5.6 ± 0.93

Tabla R-1 Frecuencia de los cariotipos comunes en células de tejido inflamado del cuello uterino.

^aPromedio ± error estándar de la media

Caso	Edad	Diploidías	Aneuploidías	Poliploidías
1	39	992	1	0
2	49	988	2	0
3	38	968	9	1
4	36	984	13	2
5	42	988	2	0
6	33	977	11	2
7	63	970	7	1
8	31	976	10	1
9	51	985	4	0
10	50	985	3	1
11	52	977	5	2
12	33	984	0	1
13	47	989	3	0
14	41	966	9	1
15	35	996	0	1
16 ^a	22	983	2	0
17 ^a	40	990	2	0
18 ^a	49	986	3	0
19 ^a	58	993	0	0
Prom ± SEM^b	42.57	983 ± 1.956	4.52 ± 0.931	0.68 ± 0.1719

Tabla R-2 Frecuencia de los cariotipos comunes en células de tejido de la cavidad oral (control).

^aCasos de tejido bucal sin correspondencia en el grupo de muestras inflamadas del cuello uterino.

^bPromedio ± error estándar de la media

Autor	Presentación de Resultados	Diploidía	Inestabilidad Cromosómica
Lizard, et al., 1998	Porcentaje de casos	100%	0%
Pieber, et al., 2000	Porcentaje de células	>75%	~6% *
Olaharski, et al., 2006	Frecuencia por 1000 células		1 célula
Santiago, 2009	Frecuencia por 1000 células	~983	~5 células *
	Porcentaje de células		0.52% *

Tabla R-3 Comparación entre la frecuencia de células con inestabilidad cromosómica reportada en la literatura para el tejido de la mucosa cervical normal con respecto a los datos obtenidos en el presente trabajo (Santiago, 2009) para la cavidad oral empleada como control.

* Los cariotipos monosómicos no son considerados.

Muestra	N	Diploidía			Aneuploidía			Poliploidía		
		Mediana	IQR ^a	P	Mediana	IQR ^a	P	Mediana	IQR ^a	P
Controles	19	985	977 – 989	-----	3	2 - 9	-----	0	0 – 2	-----
Inflamaciones	15	937	914 – 980	0.0001*	20	7 - 43	0.0001*	5	3 – 9	<0.0001*

Tabla R-4 Frecuencia de cariotipos normales, aneusómicos y poliploides en células de tejido bucal y en células del cuello uterino. Mientras que la frecuencia de células diploides en tejido inflamado es significativamente menor que en tejido control, las aneusomías y poliploidías son significativamente más elevadas en la inflamación cuando se compara con el tejido control.

* Estadísticamente significativo con la prueba *U* de Mann-Whitney.

^a IQR es el rango de intercuartiles.

2. Estructura de los cariotipos cromosómicamente desbalanceados.

Las aberraciones numéricas identificadas en las muestras analizadas se clasificaron en dos grupos atendiendo al tipo de desbalances cromosómicos: a) si los pares cromosómicos presentaban el mismo número de copias cromosómicas, se les llamó poliploidías; y b) si los pares cromosómicos contenían distinto número de copias cromosómicas, entonces se clasificaban como aneuploidías. Estas aberraciones fueron analizadas comparando la frecuencia observada en las muestras de tejido cérvico-uterino con diagnóstico de inflamación respecto de aquella cuantificada en el tejido bucal. Se encontró que cada forma de inestabilidad cromosómica era más prevalente en tejido inflamado y no en tejido relativamente sano como se muestra a continuación.

a) Las poliploidías en tejido inflamado y control.

Se encontraron células triploides (3n) y tetraploides (4n) tanto en muestras de tejido bucal como en tejido inflamado. Una célula era triploide cuando en ella se identificaban 3 marcas de hibridización para cada cromosoma, y tetraploide cuando la célula contenía ocho marcas fluorescentes, es decir, cuatro copias del cromosoma 3 y cuatro copias del cromosoma 17.

Ambos tipos fueron significativamente más frecuentes en tejido inflamado que en el tejido bucal. Células 3n fueron cuantificadas en 13 de las 15 (86,6%) muestras de tejido cervicouterino reportando un valor para la mediana igual a 5. En el tejido control, 10 de 19 (52,6%) muestras fueron positivas por contener al menos una célula trisómica con lo que el valor de la mediana se fijó en 0 (prueba *U* de Mann-Whitney, $p = 0.0001$, Tabla R-5 y Figura R-1).

En cuanto a las células 4n, 7 de 15 (46,6%) casos contenían células tetrasómicas y sólo 1 de las 19 muestras bucales (5,2%). El valor de las medianas para la frecuencia de células 4n en ambos tejidos fue el mismo (mediana = 0), sin embargo, el análisis estadístico reportó diferencias significativas entre los dos grupos con $p = 0.0021$, de tal manera que la frecuencia de células con cariotipo 4n, como 3n, es efectivamente mayor en el tejido inflamado que en el bucal (prueba *U* de Mann-Whitney, Tabla R-5 y Figura R-1).

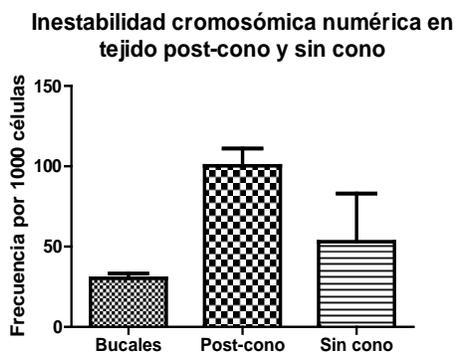


Figura R-1 Frecuencia de anomalías cromosómicas numéricas en tejido del cuello uterino post-conización y en tejido uterino sin conizar. Prueba estadística ANOVA de una vía. $P > 0.05$.

Caso	Edad	Triploidías		Tetraploidías	
		Bucal	Cervical	Bucal	Cervical
1	39	0	5	0	0
2	49	1	7	0	0
3	38	2	7	0	1
4	36	0	5	0	0
5	42	2	7	0	3
6	33	1	4	0	0
7	63	1	7	0	3
8	31	0	0	0	0
9	51	0	7	1	4
10	50	2	6	0	0
11	52	1	3	0	6
12	33	0	0	0	0
13	47	0	3	0	2
14	41	0	1	0	2
15	35	0	1	0	0
16	22	2		0	
17	40	1		0	
18	49	0		0	
19	58	1		0	
Mediana	41	0	5	0	0
IQR^a	35 – 50	0 - 1	1 – 7	0 - 0	0 – 3
P	----	----	0.0001*	----	0.0021*

Tabla R-5 Frecuencia de los cariotipos poliploides por grupo tisular.

^a Rango de Intercuartiles.

* Significancia estadística con la prueba *U* de Mann-Whitney, al comparar los casos con los controles.

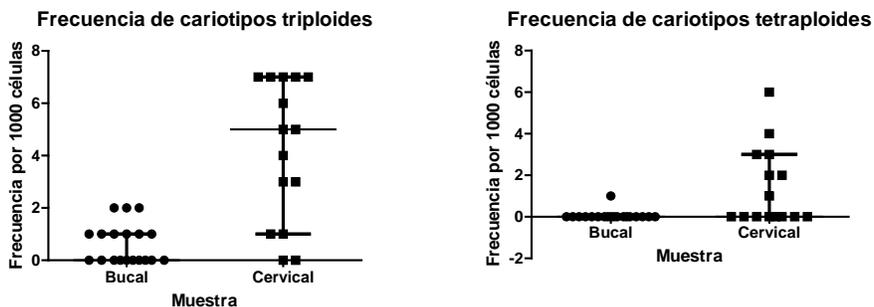


Figura R-2 Análisis de distribución de cariotipos poliploides. *Izquierda:* frecuencia de células 3n en tejido bucal y cervical, siendo mayor en el último con significancia estadística ($p=0.0001$). *Derecha:* frecuencia de células 4n en tejido bucal y cervical, también es mayor y estadísticamente significativa en el tejido inflamado ($p=0.0021$).

(1) *El intermediario tetraploide*

Uno de los mecanismos propuestos de formación de células con cariotipos aneuploides, indica la presencia de un intermediario tetraploide, es decir, que las aneuploidías de las células tumorales derivan de una célula tetraploide (Storchova y Pellman, 2004; Weaver y Cleveland, 2006; Ganem et al., 2007) ya que este cariotipo es muy inestable (Olaharski et al., 2006).

Olaharski y colaboradores en 2006, encontraron que entre la frecuencia de células tetraploides y la frecuencia de células aneuploides cercanas a la tetraploidía¹ existía una correlación positiva en la categoría diagnóstica HSIL. Con este análisis concluyeron que tales aneuploidías resultaban de los procesos mitóticos de intermediarios tetraploides.

En un intento por evaluar si las aneuploidías en células inflamadas pudieran originarse a partir de células 4n, implementamos un análisis de correlación entre la frecuencia de células con cariotipo tetraploide y la frecuencia de células con cariotipos “cercanos a la tetraploidía”. El cariotipo considerado “cercano a la tetraploidía” ha sido descrito como las células que contienen cuatro marcas de hibridación para un cromosoma y tres para el otro (Olaharski et al., 2006).

El resultado obtenido del análisis no presenta correlación y no es estadísticamente significativo, con una R^2 de 0.1005 y un valor de P mayor a 0.05 (Figura R-2).

¹ Las células cercanas a la tetraploidía son aquéllas que han perdido algún cromosoma del complemento tetraploide. En el análisis por FISH con dos colores, las células cercanas a la tetraploidía presentan cuatro marcas fluorescentes para alguno de los dos cromosomas y tres del otro cromosoma.

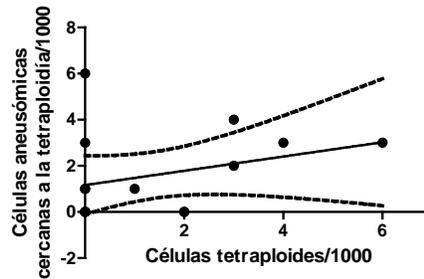


Figura R-2 Análisis de correlación para las células tetraploides y cercanas a la tetraploidía del cuello uterino inflamado. La correlación no es estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

b) Las aneuploidías en tejido inflamado y control.

Cinco patrones cromosómicos considerados aneuploidías fueron frecuentes en los casos estudiados y son descritos en la siguiente tabla:

Tabla R-6 Formas aneuploides del cariotipo identificadas en este trabajo.

Aneusomía	Características
1 Trisomía 3	Tres copias del cromosoma 3 y dos copias del cromosoma 17
2 Trisomía 17	Tres copias del cromosoma 17 y dos copias del cromosoma 3
3 Tetrasomía 3 ²	Cuatro copias del cromosoma 3 y dos copias del cromosoma 17
4 Tetrasomía 3 Trisomía 17	Cuatro copias del cromosoma 3 y tres copias del cromosoma 17
5 Tetrasomía 17 Trisomía 3	Cuatro copias del cromosoma 17 y tres copias del cromosoma 3

Cada uno de estos cariotipos fue siempre significativamente más frecuente en la categoría con diagnóstico de inflamación del cuello uterino que en el tejido bucal empleado como control (prueba U de Mann-Whitney). La trisomía del cromosoma 3 se detectó en el 100% de los casos evaluados, en las muestras de tejido bucal este cariotipo se detectó en 13 el 68,4% (13/19

² El cariotipo 'Tetrasomía 17' no fue identificado en las muestras de tejido cervical ni en las muestras de tejido bucal.

muestras). Pese a ser un cariotipo común en ambos tejidos, al comparar su frecuencia en los dos tejidos estudiados la prueba estadística arrojó diferencias significativas con $P < 0.0001$. La trisomía 17 fue frecuente en 12 de las 15 muestras ginecológicas (80%) con una mediana igual a 5; en los controles esta trisomía estuvo presente en 9 de las 19 muestras de tejido de la cavidad oral (47,3%) y el valor de la mediana para este grupo fue de 0, se obtuvo diferencia significativa entre estos dos grupos con una $P=0.0017$ (Tabla R-7, Figura R-4).

Muestra	N	Trisomía 3			Trisomía 17		
		Mediana	IQR ^a	P	Mediana	IQR ^a	P
Bucal	19	3	0 – 4	-----	0	0 - 2	-----
Cervical	15	12	6 – 28	< 0.0001*	5	1 - 9	0.0017*

Tabla R-7 Frecuencia de cariotipos aneusómicos en células de tejido bucal y en células del cuello uterino.

* Estadísticamente significativo con la prueba *U* de Mann-Whitney al comparar casos *versus* controles.

^a IQR es el rango de intercuartiles.

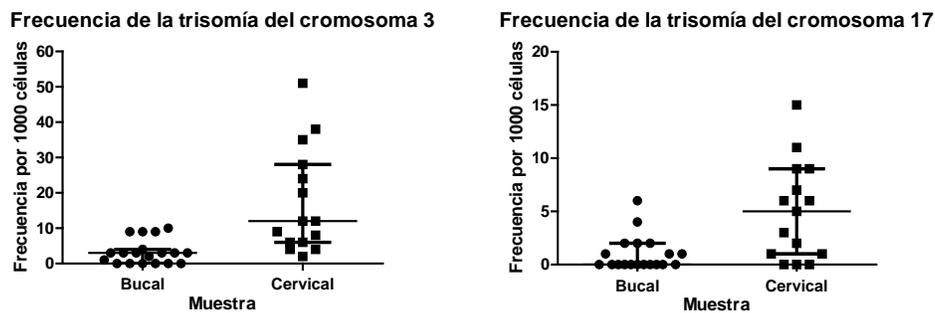


Figura R-4 Análisis de distribución de cariotipos con trisomía en alguno de los pares cromosómicos estudiados. Se muestran los rangos de intercuartiles y la mediana de cada grupo.

El 66,6% de los casos de inflamación (10/15) y el 15,7% de los controles (3/19) presentaron al menos una célula conteniendo cuatro copias del cromosoma 3 y dos copias del cromosoma 17. La mediana de estos grupos fue de 1 y 0, respectivamente, con diferencia estadística significativa ($P= 0.0005$; Tabla R-8; Figura R-5)

Muestra	N	Tetrasomía 3		
		Mediana	IQR ^a	P
Bucal	19	0	0 – 0	-----
Cervical	15	1	0 – 3	0.0005

Tabla R-8 Frecuencia del cariotipo Tetrasomía 3 en células de tejido bucal y en células del cuello uterino.

* Estadísticamente significativo con la prueba *U* de Mann-Whitney al comparar casos *versus* controles.

^a IQR es el rango de intercuartiles.

Frecuencia de la tetrasomía del cromosoma 3

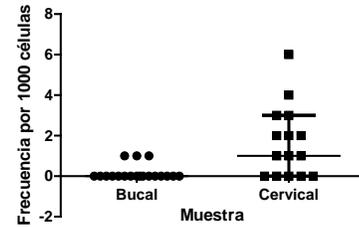


Figura R-5 Análisis de la frecuencia de células con tetrasomía 3. La frecuencia de este cariotipo es más frecuente en tejido inflamado que en el bucal.

Otra forma de inestabilidad cromosómica numérica, y a la que ya nos hemos referido antes es la llamada “cercana a la tetraploidía”. Este cariotipo lo identificamos en dos formas o variantes. Una de estas formas consistió en la tetrasomía del cromosoma 3 acompañada por trisomía del cromosoma 17. En los casos de células del cuello uterino con diagnóstico inflamatorio, el 60% mostró tener células con este cariotipo, mientras que en los controles sólo un caso (de 19, 5.2%) mostró contenerlo. El análisis estadístico arrojó una diferencia significativa con $P=0.0003$ (Tabla R-9; Figura R-6). La otra forma de aneusomía consistió en la tetrasomía 17 y trisomía 3, aunque en una frecuencia mucho menor.

Muestra	N	Tetrasomía 3 – Trisomía 17		
		Mediana	IQR ^a	P
Bucales	19	0	0-0	-----
Cervical	15	1	0-2	0.0003

Tabla R-9 Frecuencia del cariotipo Tetrasomía 3 y Trisomía 17 en células de tejido bucal y en células del cuello uterino.

* Estadísticamente significativo con la prueba *U* de Mann-Whitney al comparar casos *versus* controles.

^a IQR es el rango de intercuartiles.

Frecuencia de células con tetrasomía 3 y trisomía 17

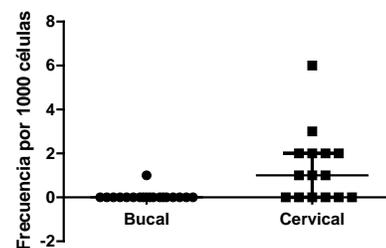


Figura R-6 Análisis de la frecuencia de células con cariotipo tetrasomía 3 y trisomía 17 en tejido bucal e inflamado.

(1) Ganancia cromosómica

De acuerdo con la estructura de las aneuploidías y los datos que para cada tipo se mostró, podemos identificar dos eventos de particular interés. La primera está dada por la categoría 'Trisomía'. De acuerdo con la Tabla R-6 aquellas células en las que se identificaban tres marcas de hibridación para alguno de los dos cromosomas (3 o 17), en tanto que el otro mantenía el número cromosómico diploide, fueron clasificadas dentro de esta categoría y fueron analizadas para determinar si existe ganancia preferencial de alguno de los cromosomas estudiados, para ello se empleó la prueba estadística exacta de Fisher.

En las muestras de tejido bucal relativamente sano, encontramos que 3/19 muestras no presentaron la ganancia de ninguno de los dos cromosomas analizados (3 y 17), en 11/19 muestras se detectó la ganancia preferencial del cromosoma 3 y 5/19 muestras bucales presentaron ganancia preferencial del cromosoma 17. En las muestras de tejido del cuello uterino inflamado, 14/15 muestras presentaron la ganancia preferencial del cromosoma 3, mientras que el cromosoma 17 se ganó con preferencia en 1/15 casos de inflamación del cuello uterino (Figura R-7; prueba estadística de Wilcoxon para datos pareados, $P=0.0017$).

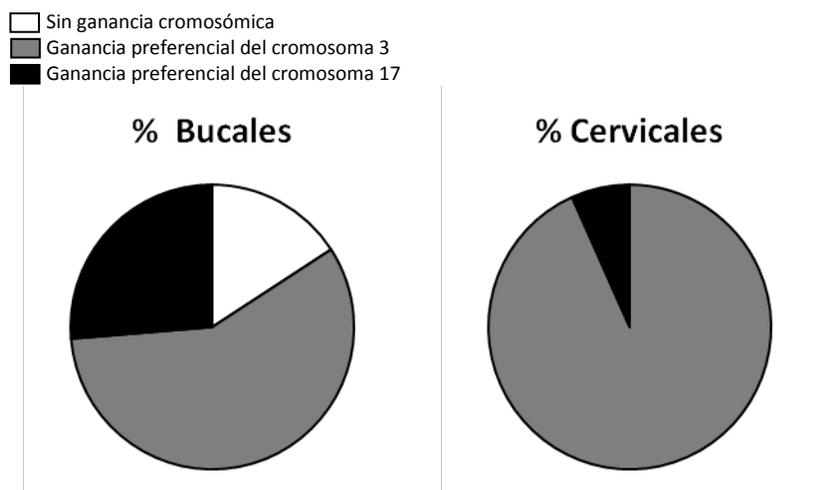


Figura R-7 Gráfica de pastel que ilustra la ganancia preferencial del cromosoma 3 identificada en las muestras bucales (control) e inflamadas del cuello uterino (trisomía 3 y disomía 17). Aunque las muestras control también presentan una alta incidencia en la ganancia del cromosoma 3 e incluso del cromosoma 17 muestran además algunos casos en los cuales ningún cromosoma fue ganado (3/19), pero en los casos de inflamación todos ellos reportaron la ganancia de uno de los cromosomas, siendo preferencial la del cromosoma 3 (14 de 15 casos) con $P=0.0017$ (prueba t de Wilcoxon para datos pareados).

(2) Pérdida cromosómica

El segundo evento, reportado en la literatura y reconocido como característica de algunas neoplasias, es la pérdida de cromosomas de un intermediario tetraploide (Olaharski et al., 2006), es decir, una célula que derivó de un cariotipo 4n la cual perdió cromosomas. También se les llama 'células son cercanas a la tetraploidía'.

En el 53% (8/15) de las muestras de inflamación del cuello uterino se detectó la pérdida preferencial del cromosoma 17, denotada por la presencia de cuatro marcas fluorescentes del cromosoma 3 (color anaranjado) y tres marcas del cromosoma 17 (color verde). Las células con tetrasomía 17 y trisomía 3 (pérdida de una copia del cromosoma 3) fue presente en 3 de las 15 muestras, pero en ninguno de éstos fue más frecuente que el cariotipo con pérdida del cromosoma 17, sólo en un caso se encontró que el mismo número de células presentaba estos cariotipos, y por lo tanto fue clasificada 'sin pérdida preferencial'. Los 6 casos restantes no mostraron pérdida de alguno de los cromosomas. E (Figura R-8, P=0.006, prueba t de Wilcoxon).

Los controles mostraron que 18 de 19 muestras no presentaron células con pérdida cromosómica en alguno de sus pares, la muestra restante presentó pérdida del cromosoma 17 (Figura R-8).

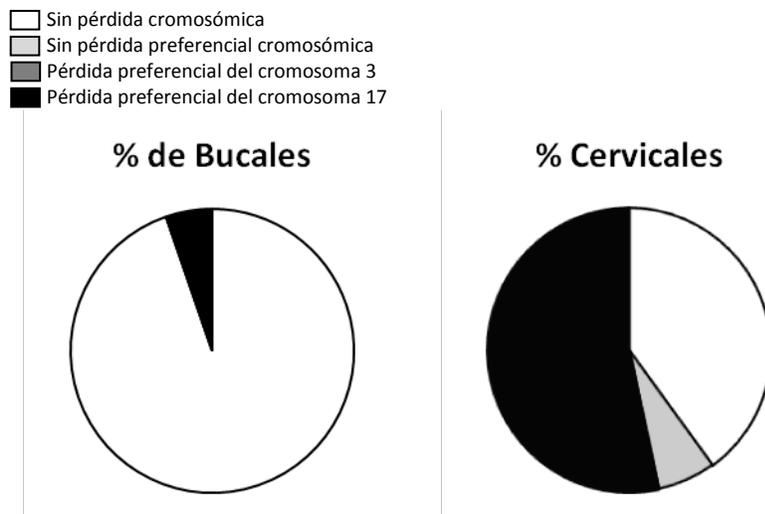


Figura R-8 Gráfica en pastel. La pérdida del cromosoma 17 fue un evento muy frecuente en las células cervicales donde 8 de 15 (53,3%) casos de inflamación presentaron células con esta condición. Mientras que en las muestras de tejido bucal, sólo 1 de 19 controles presentó la pérdida preferencial del cromosoma 17 (prueba estadística t de Wilcoxon para datos pareados, P=0.006).

B. LA ANEUPLOIDÍA EN RELACIÓN CON OTROS FACTORES ETIOLÓGICOS.

1. Aneuploidía y poliploidía en muestras HPV positivas

La detección de HPV en las muestras analizadas se realizó previamente en nuestro laboratorio utilizando los siguientes juegos de oligonucleótidos universales: MY09/MY11, L1C1/L1C2 y GP5/GP6. Estos oligonucleótidos universales amplifican fragmentos de diferente tamaño de la región L1 del genoma viral (en Carrillo et al., 2004).

De las 15 muestras cervicales analizadas para la frecuencia de anomalías en el número de cromosomas, tres resultaron positivas a la infección con el virus del papiloma humano (HPV). De tal modo que se procedió a evaluar si la presencia del HPV podía desempeñar una actividad sinérgica a la formación de células con desbalances cromosómicos en tejido inflamado del cuello uterino. Este análisis consistió en la comparación de las frecuencias de células con contenido cromosómico anormal (aneuploidías y poliploidías, respectivamente) entre el grupo de muestras positivas para la infección viral y el grupo de muestras de tejido cervicouterino negativas para la misma infección. La prueba estadística *U* de Mann-Whitney fue empleada para este análisis.

Las muestras HPV positivas presentaron células poliploides. El tipo de poliploidía frecuente en estas muestras corresponde a la triploidía, de ambos cromosomas analizados. En ninguno de los tres casos positivos para HPV, se identificaron células con cariotipo tetraploide. En cambio, sí se encontraron este tipo de células en las muestras HPV negativas. El valor de la mediana de la frecuencia de células 4n fue de 1.5 células por cada 1000. La ausencia de células tetraploides en las muestras positivas para infección con HPV fue motivo para excluir del análisis estadístico a esta categoría.

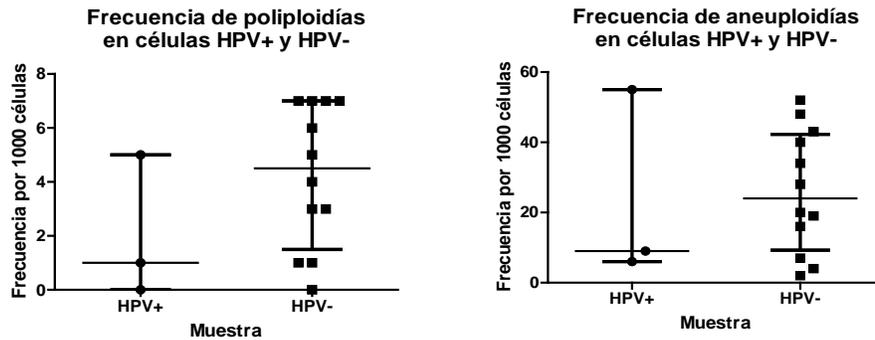
Las muestras con células triploides en tejido HPV positivo tuvieron una mediana de 1 célula por 1000. En las muestras negativas, el valor de la mediana fue de 4.5 células triploides por cada 1000 evaluadas con FISH. Sin embargo, la diferencia entre estos grupos no fue significativa (Tabla R-10, Figura R-9A).

Así mismo, la valoración estadística de la frecuencia de células aneuploides no arroja diferencias significativas cuando se compara como un grupo (Tabla R-10, Figura R-9B). Cuando el análisis se planteó para evaluar el efecto de la infección viral en la frecuencia de anomalías numéricas de los cromosomas en cada una de las categorías identificadas de aneuploidía (Tabla R-6), la categoría 'Trisomía 17' mostró un valor de *P* marginal. El valor de la mediana reportada en el grupo negativo para el HPV fue de 6 por cada 1000 células, mientras que en el grupo de muestras con la infección viral fue de 1 célula por cada 1000, con $P=0.0554$ (Tabla R-11, Figura R-10).

Inflamación	N	Poliploidías			Aneuploidías		
		Mediana	IQR ^a	<i>P</i>	Mediana	IQR ^a	<i>P</i>
HPV+	3	1.00	0.0 – 5.0	>0.05	9	6.00 – 55.00	>0.05
HPV-	12	4.50	1.5 – 7.0		24	9.25 – 42.25	

Tabla R-10 Comparación de la frecuencia de células poliploides y aneusómicas en células inflamadas del cuello uterino de acuerdo con la presencia de papilomavirus humano. Prueba estadística *U* de Mann-Whitney.

^a IQR es el rango de intercuartiles



A

B

Figura R-9 Gráfica de la distribución de aneuploidías en células del cuello uterino con diagnóstico de inflamación, atendiendo a la existencia de infección con papilomavirus humano. **A** Distribución de la frecuencia de células triploides. **B** Distribución de la frecuencia de células con aneuploidía de alguno de los cromosomas estudiados. No se reportan diferencias significativas en la frecuencia de cariotipos aberrantes contenidos en tejidos infectados o no con el virus del papiloma humano. Prueba estadística *U* de Mann-Whitney.

Inflamación	N	Aneuploidía Trisomía 17		
		Mediana	IQR ^a	P
HPV+	3	1.00	0.0 – 2.0	0.0554
HPV-	12	6.00	1.5 – 9.0	

Tabla R-11 La categoría ‘Trisomía 17’ mostró un valor marginal de *P* en la frecuencia de células trisómicas para el cromosoma 17 entre muestras HPV+ y HPV- (Prueba estadística *U* de Mann-Whitney). El análisis con otra prueba estadística como la *t* de student para datos no pareados sí reporta diferencias significativas.

^aIQR es el rango de intercuantiles.

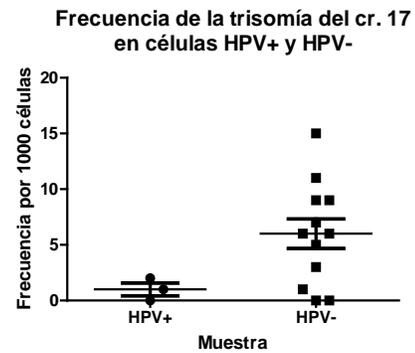


Figura R-10 Frecuencia de células con trisomía 17 en muestras de tejido cervicouterino positivas y negativas para la infección con HPV.

Prueba estadística *U* de Mann-Whitney, con $P \leq 0.05$.

2. La edad

El acortamiento de los telómeros está relacionado con la historia replicativa y la vida de las células somáticas y por lo tanto con la edad del individuo (Aubert y Lansdorp, 2007). Sin la respuesta al acortamiento de los telómeros, las células somáticas son capaces de continuar el ciclo proliferativo y el acortamiento anormal de los telómeros hasta su pérdida total, con lo cual el nacimiento de células cromosómicamente inestables es un evento común (Ju y Rudolph, 2006).

Por las razones expuestas se procedió a la evaluación del papel que la edad de las pacientes estudiadas pudo desempeñar en la frecuencia de células con cariotipos cromosómicamente desbalanceados. La edad de las pacientes osciló entre los 31 años y los 63 años. Se crearon tres grupos de edad: de 31 a 40 años, de 41 a 50 años y de 51 o más años. Siete muestras (46.7%) pertenecían a la primera categoría de edad, cinco (33.3%) correspondían a la segunda, mientras que el tercer grupo contenía tres muestras (20%).

Los datos obtenidos de las muestras de quince pacientes (controles e inflamaciones, pareadas) se evaluaron de las siguientes maneras: 1) evaluar las diferencias en la frecuencia de células aneuploides entre los dos tipos de tejido (cervical y bucal) según la categoría de edad (prueba estadística t para datos pareados); y 2) evaluar las diferencias en la frecuencia de células aneuploides entre las categorías de edad del tejido cervicouterino inflamado.

En el primer análisis se observó que los cariotipos aneuploides son más frecuentes en el tejido inflamado que en el tejido bucal, para cada grupo de edad (Tabla R-12, prueba t para datos pareados, $p < 0.05$). Como se puede observar, el cariotipo tetraploide no es común en células del cuello uterino inflamado de pacientes jóvenes (31-40 años), la frecuencia es muy parecida a la mostrada por el grupo control. Sin embargo, la frecuencia del mismo cariotipo sí es estadísticamente significativa en el tejido inflamado de pacientes mayores de 51 años.

Grupos de Edad (años)	N	Tetraploidía (4n)			Triploidía (3n)			Aneuploidía		
		Bucales	Cervicales	P	Bucales	Cervicales	P	Bucales	Cervicales	P
31-40	7	0	0.1	>0.05	0.42	4.0	0.005*	4.0	22.8	0.019*
41-50	5	0	1.4	0.040*	1.0	3.2	0.042*	6.0	25.4	0.028*
51+	3	0.3	4.3	0.028*	0.66	4.3	>0.05	7.3	31.6	0.035*

Tabla R-12 Valor promedio de la frecuencia de células aneuploides en tejido cervicouterino inflamado con respecto del tejido control (bucal). Puede observarse que la frecuencia de células aneuploides en cada tejido aumenta conforme lo hace el grupo de edad. Estadísticamente pudo probarse que la frecuencia de células cariotípicamente inestables es más alta en células del cuello uterino con diagnóstico de inflamación que sus correspondientes controles.

*Estadísticamente significativo, prueba estadística t para datos pareados, $p < 0.05$.

El análisis estadístico entre los grupos de edad reportó que la frecuencia de células tetraploides (cuatro marcas de fluorescencia por cada cromosoma estudiado) aumenta conforme lo hace la edad (ANOVA, $p = 0.0003$; Figura R-11). Aunque si bien la diferencia no es evidente entre las categorías '31-40 años' y '41-50 años', se puede observar cierta tendencia. En tanto la categoría '51-o más años' es estadísticamente distinta de las categorías que la preceden (prueba posterior de Tukey de comparación múltiple, $P < 0.05$; Tabla R-13).

Las células con cariotipos triploides (tres marcas de hibridización por cada cromosoma) y aquéllas con aneuploidías (marcas de hibridización dispares por cada cromosoma) muestran una tendencia de incremento, sin embargo no existen diferencias significativas entre los grupos de edad (Tabla R-13). El grupo de las aneuploidías consta de la agrupación de todos los tipos de

aneusomía identificados en este trabajo, pero incluso en el análisis individual de las aneusomías no encontramos diferencias significativas entre los grupos de edad.

Grupo de edad (años)	N	Tetraploidía			Triploidía			Aneuploidía		
		Media	SEM (\pm)	P	Media	SEM (\pm)	P	Media	SEM (\pm)	P
31-40	7	0.14	0.14		4.00	1.04		22.86	8.23	
41-50	5	1.40	0.60	0.0003*	3.20	1.11	>0.05	25.40	8.45	>0.05
51-60	3	4.33	0.88		4.33	2.18		31.67	8.57	

Tabla R-13 Evaluación de la frecuencia de células con cariotipos con aberraciones numéricas entre los grupos de edad. El cariotipo 'Tetraploidía' fue el único que presentó diferencias estadísticas con significancia entre los tres grupos de edad de acuerdo con la prueba ANOVA de una vía ($p=0.0003$), la prueba posterior de Tukey mostró que el grupo de 51 a 60 o más años presenta una frecuencia de células tetraploides estadísticamente significativa respecto de los otros grupos, y entre estos no hay diferencia. En las categorías aneuploides 'Triploidía' y 'Aneusomía' no se reportan diferencias significativas.

Frecuencia de células tetraploides en células inflamadas de acuerdo con la edad

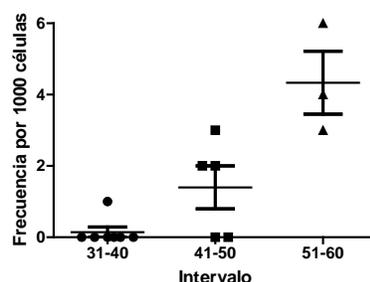


Figura R-11 La categoría 'Tetraploidía' fue la única variante que mostró significativamente que su frecuencia aumenta conforme aumenta la edad de las pacientes. El grupo de edad '51-60 años o más' mostró una frecuencia de células aneuploides estadísticamente significativa de la frecuencia reportada en las edades predecesoras (ANOVA de una vía, $p=0.0003$, y prueba posterior de Tukey, $p<0.05$).

3. Tabaquismo

El hábito de fumar es considerado un factor de riesgo para la progresión neoplásica del tejido de cuello uterino, sin embargo, los mecanismos a través de los cuales ejerce tal influencia no han sido completamente dilucidados (Carrilo et al., 2004; Hussain et al., 2008). En este estudio analizamos la frecuencia de las células con aberraciones cromosómicas detectadas en los casos de mujeres con diagnóstico de inflamación del cuello uterino agrupando los casos según el hábito de fumar.

En el cuestionario practicado a las pacientes de quienes se obtuvo muestra, 4/15 admitieron ser fumadoras regulares, las 11 restantes no tienen por hábito el fumar. Curiosamente en el tejido bucal, que es el órgano directamente expuesto al humo de tabaco se encontró que la frecuencia de células cromosómicamente desbalanceadas era menor en las pacientes fumadoras, sin significancia estadística (Tabla R-14).

En la Tabla R-15 se reúnen los resultados obtenidos para la frecuencia de cariotipos anormales según el hábito de fumar. La frecuencia de células poliploides fue menor en pacientes fumadoras, con una mediana igual a 3 células, que en pacientes no fumadoras cuya mediana fue de 6 células. La frecuencia de células aneuploides mostró una mediana de 29.5 células en pacientes fumadoras y de 20 en pacientes no fumadoras. En ninguno de estos ensayos se encontró diferencias significativas entre ser fumadora y no serlo.

Bucales	N	Poliploidías			Aneuploidías		
		Mediana	IQR ^a	P	Mediana	IQR ^a	P
Fumadoras	4	0.00	0.00 – 1.50	>0.05	3	2.00 – 4.75	>0.05
No Fumadoras	11	1.00	0.00 – 1.00		7	2.00 – 10.0	

Tabla R-14 Comparación de la frecuencia de células poliploides y aneuploides en células bucales según el hábito de fumar. Prueba estadística *U* de Mann-Whitney.

^a IQR es el rango de intercuartiles.

Cervicales	N	Poliploidías			Aneuploidías		
		Mediana	IQR ^a	P	Mediana	IQR ^a	P
Fumadoras	4	3.00	0.75 – 6.00	>0.05	29.5	7.00 – 52.0	>0.05
No Fumadoras	11	6.00	3.00 – 7.00		20.0	6.00 – 40.0	

Tabla R-15 Comparación de la frecuencia de células poliploides y aneuploides en células inflamadas del cuello uterino según el hábito de fumar. Prueba estadística *U* de Mann-Whitney.

^a IQR es el rango de intercuartiles.

IX. DISCUSIÓN

Una de las estrategias para disminuir la mortalidad por cáncer es la detección temprana. En el caso del CaCu, los programas de detección temprana han sido mucho más exitosos en los países desarrollados que en los países como México. Los exámenes ginecológicos periódicos y la prueba de Papanicolaou son herramientas eficaces en la detección temprana de este tipo de cáncer. Sin embargo, las pacientes con diagnóstico de inflamación son recomendadas por los citopatólogos a realizarse evaluaciones periódicas a tiempo largos (de hasta 6 meses) hasta confirmar o descartar el diagnóstico de inflamación, lo que en ocasiones llega a provocar desidia en la paciente y abandono de los exámenes ginecológicos.

En las lesiones cervicales, los estudios de inestabilidad cromosómica han sido desarrollados en lesiones de células escamosas intraepiteliales de alto grado (HSIL) y de bajo grado (LSIL), en las cuales las aberraciones numéricas y parciales de los cromosomas son consideradas factores importantes para la progresión tumoral (Mian et al., 1999; Olaharski et al., 2006). En nuestro trabajo encontramos que las anomalías numéricas de los cromosomas 3 y 17 se asemejan a aquéllas reportadas en los grados diagnósticos de SIL. Este hallazgo puede estar en relación con la intervención quirúrgica, específicamente con la práctica de conización del tejido, puesto que hemos observado que en el tejido del cuello uterino de pacientes post-cono, la frecuencia de células con inestabilidad cromosómica numérica es mayor que en las pacientes sin este tratamiento, razón por la cual, el cariotipo de las células de tejido inflamado es tan similar al reportado en las lesiones HSIL y LSIL. Por lo tanto la técnica de FISH y la evaluación de la inestabilidad cromosómica pueden contribuir al diagnóstico de inflamación con el propósito de identificar a las pacientes con estas características y separarlas para garantizar el diagnóstico.

En nuestro trabajo se evidencia asimismo que el tejido cervical no transformado presenta células con aberraciones cromosómicas numéricas con una frecuencia significativamente mayor que la que se presenta en células epiteliales de tejido bucal de las mismas pacientes (Tabla R-4).

Está documentado que, durante los procesos inflamatorios se reclutan leucocitos en el tejido dañado como defensa contra infecciones lo que puede liberar citocinas que estimulen la proliferación celular (Lu et al., 2006; Coussens y Werb, 2002). En este proceso la presencia de células y mediadores pro-inflamatorios generan especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS), capaces de inducir daño al DNA (Coussens y Werb, 2002; Palapattu et al., 2004; ver Tabla I-6). Estos eventos pueden afectar los controles del ciclo celular. Tengamos en cuenta, además, que por sus características histológicas el cuello uterino es una zona de transición en donde se da la unión de dos tipos de epitelios diferentes y es susceptible a traumas mecánicos (Lejárcegui, 1974). Este evento produce destrucción y reparación constante, a lo que se suma la inflamación con su ambiente oxidante. Todo ello le confiere a esta región cierta susceptibilidad para generar células con cariotipos anormales.

En tejido inflamado se ha reportado que la principal forma de inestabilidad cromosómica es la formación de células 4n. Oberringer y cols. en 1999 reportaron que en tejido en reparación la

tasa de células tetraploides se incrementaba durante el proceso inflamatorio y persistía hasta la reparación del tejido mediado por los niveles de expresión de la proteína GST p53. Aunque la inflamación es un proceso autolimitante, la desregulación del mismo y su persistencia, debido a infecciones crónicas o al daño tisular constante, podrían promover el daño al genoma celular (Lawrence, 2007). Por otro lado, se sabe que el acortamiento de las regiones teloméricas de los cromosomas está relacionado con la edad de las pacientes y que cuando la respuesta al acortamiento extremo de dichas regiones falla en las células, éstas son propensas a fallar la citocinesis formando células poliploides con centrosomas supernumerarios (Gisselsson et al., 2002; Gisselsson, 2005). En nuestros resultados podemos observar que la edad puede desempeñar un papel sinérgico a la inflamación del cuello uterino en la generación de células con cariotipo 4n. En la Tabla R-13 y en la Figura R-11 se muestra que las pacientes de mayor edad presentan una mayor frecuencia de células 4n en comparación con las muestras de pacientes más jóvenes.

La falta de correlación entre los cariotipos tetraploide y cercano a la tetraploidía, así como la diferencia en la frecuencia de células aneuploides y células tetraploides entre los grupos de edad, son motivo para pensar que el origen de las células aneuploides en el tejido cervical uterino inflamado tiene otras fuentes o mecanismos. Por ejemplo, en las pacientes de mayor edad la formación de células aneuploides puede deberse a la pérdida de los telómeros que provocaría la segregación desigual de cromosomas por separación del huso mitótico (Gisselsson et al., 2002; Gisselsson, 2005). Tanto el proceso inflamatorio como la edad, en nuestro estudio, muestran ser elementos importantes que comprometen la integridad genómica de las células en el tejido cervical uterino.

La tetraploidía también puede ser el resultado de la evasión del arresto del ciclo celular producido por el punto de control mitótico (Figura I-4, Figura I-8C) cuando los genes responsables son afectados por mutaciones inducidas por las condiciones inflamatorias (Storchova y Pellman, 2004; Ganem et al., 2007). Por ejemplo, si la separasa es ineficiente el ciclo suele arrestarse y se produce una célula poliploide (Wirth, 2006), lo que también puede suceder si el APC/C no es activado o si falla en el proceso de degradación del complejo securina /ciclina B para liberar a la separasa y promover la citocinesis (Jallepalli y Lengauer, 2001; Peters, 2002; Harper et al., 2006; Weaver y Cleveland, 2006; Wirth, 2006) o si en el proceso replicativo falló la duplicación centrosómica originando una célula monopolar (Krämer et al., 2002; Weaver y Cleveland, 2006).

La fusión celular también es un mecanismo que genera células 4n en estados patológicos asociados con infecciones virales (Storchova y Pellman, 2004; Duelli et al., 2007; Ganem et al., 2007; Salsman et al., 2008), sin embargo, el virus del papiloma humano (HPV) no ha sido reportado como un virus fusogénico, es decir, capaz de inducir la fusión de células en tejido infectado.

Nuestros resultados muestran que el HPV no tiene actividad sinérgica a la inflamación en la aneuploidización del tejido cervical uterino, en vista de que el cariotipo 4n no fue detectado en los casos HPV+ (3/15), mientras que sí se detectó en los casos HPV- y que la frecuencia de células con cariotipos cromosómicamente desbalanceados fue mayor en el tejido negativo a la infección

con HPV, como se puede observar en la Tabla R-10. Desde luego, el tamaño de la muestra positiva a la infección viral puede ser que influya el resultado observado.

Curiosamente, cuando analizamos la frecuencia de cada tipo de aneuploidía en relación con la infección viral encontramos un resultado interesante que se expone en la Tabla R-11 y la Figura R-10. La trisomía 17 fue un cariotipo común en el tejido inflamado y negativo a la infección viral, pero no en el tejido inflamado y positivo a la infección. Entonces la pregunta es ¿de qué manera podría ser explicada la baja frecuencia de células con trisomía 17 en tejido cérvicouterino inflamado y positivo a la infección con HPV? Una posible explicación tiene base en la consideración del contenido génico del cromosoma 17 (acarrea al GST *TP53*) y del papilomavirus, así como en el estado físico del genoma viral. Nosotros pensamos que en las muestras HPV+ analizadas podría estar sucediendo lo siguiente: 1) como la trisomía del cromosoma 17 implica la presencia de tres copias del gen *TP53*, puede haber un incremento en la síntesis de la proteína p53 que como sabemos es el blanco celular de la oncoproteína viral E6 y está implicada en importantes procesos celulares como la progresión del ciclo celular y la apoptosis; 2) el DNA viral se encuentra en estado episomal, por lo tanto la expresión de la oncoproteína viral E6 está altamente regulada por la proteína viral E2 (Pett et al., 2004; Bellanger et al., 2005); y 3) la baja expresión de la oncoproteína viral E6 podría ser insuficiente para ubiquitinar a la proteína celular p53, la cual podría, a su vez, estar guiando hacia el proceso de muerte apoptótica.

Otro resultado interesante en torno al papel del HPV, lo encontramos en el análisis del cariotipo trisomía 3 en donde uno de los tres casos HPV+ reportó una frecuencia de 51/1000 células con dicho cariotipo, mientras que los otros casos HPV+ reportaron 6/1000 células y en los casos HPV- la frecuencia más alta de células con este cariotipo fue de 38/1000 células. Si bien la trisomía del cromosoma 3 es común tanto en el tejido infectado como en el negativo a la infección, lo cual significaría que, en la inflamación del cuello del útero, la trisomía 3 es independiente de la infección viral, el caso mencionado nos parece importante e interesante porque puede mostrar un factor de riesgo para la progresión hacia grados de mayor malignidad ya que en el cromosoma 3q está cifrado el gen *TERC*, un componente del mRNA de la telomerasa, la ganancia del brazo q de este cromosoma y la integración del genoma viral al genoma celular son eventos fuertemente asociados en la transición de la displasia del cuello uterino al carcinoma invasivo (Hopman et al., 2006).

Como antes se comentó, los resultados obtenidos de la caracterización de los desbalances cromosómicos numéricos en tejido inflamado del cérvix uterino realizada en este trabajo nos hace pensar que diferentes mecanismos intervienen en la configuración de las aberraciones cromosómicas detectadas. Los mecanismos que podrían estar ocurriendo son eventos de no disyunción, anclajes sintéticos, mitosis multipolares y monopolares, así como la pérdida de las terminales teloméricas.

Durante los procesos inflamatorios, incluso los agudos, la amplificación anormal de centrosomas (Oberringer et al., 1999; Lothschütz et al., 2002), las mitosis multipolares (Lothschütz et al., 2002) y el acortamiento de los telómeros (Kinouchi et al., 1998; O'Sullivan et al., 2002;

Plentz et al., 2004; Plentz et al., 2005; Finley et al., 2006) son causales comunes de aneuploidía y son consideradas de alto riesgo para la iniciación y/o durante la progresión tumoral maligna. Con estas consideraciones se reafirma la proposición de la identificación de células aneuploides como biomarcador de genotoxicidad en la citología cervical uterina capaz de ofrecer apoyo al diagnóstico por Papanicolaou, empleando la técnica de FISH, que como se aprecia, una de sus principales ventajas al usar dos sondas es que permite identificar ganancias y pérdidas de los cromosomas elegidos en la misma célula (Olaharski et al., 2006).

Las trisomías fueron eventos comunes en el tejido inflamado del cuello uterino e incluso en el tejido bucal. Pieber y colaboradores (2000) encontraron resultados parecidos en tejido normal de mucosa cervical, y vieron además que la frecuencia de estos cariotipos incrementaba según lo hacía el grado de la lesión, por lo tanto concluyeron que la trisomía es un evento temprano que puede contribuir la progresión neoplásica. Consideramos a las trisomías eventos de ganancia cromosómica donde la diferencia en la ganancia de alguno de los dos cromosomas estudiados podría responder a un proceso selectivo que subyace al contenido génico de cada cromosoma, en principio para el buen ejercicio de la regeneración tisular mientras dure el proceso inflamatorio (Oberringer et al., 1999) pero que bajo condiciones anormales podría significar riesgo neoplásico. Como se puede observar en la Figura R-7, la frecuencia de la trisomía 3 es, con significancia estadística, mayor que la trisomía 17, con lo cual tenemos que el cromosoma 3 es ganado preferencialmente en el tejido inflamado del cuello del útero.

El cromosoma 17 alberga el GST *TP53* uno de los más importantes en el control del ciclo celular, encargado de censar la fidelidad e integridad del DNA después de ser replicado. En 2003 Duesberg y Li anotaron que con la aneuploidía se altera la dosis de genes normales, bajo este precepto los niveles de expresión de *TP53* se incrementarían en las células trisómicas para el cromosoma 17. La consecuencia directa será el aumento de la actividad de la proteína dirigiendo el arresto de estas células con mayor eficiencia para evitar su reingreso en el ciclo y promover su muerte. Si esto en verdad sucede, entonces explicaría la menor frecuencia de células con trisomía 17. El cromosoma 3, por su parte, contiene cifrado en su brazo q un componente del mRNA de la telomerasa (Hopman et al., 2006; NCBI, 2008), la enzima de la telomerasa es activa sólo en las células totipotenciales y cesa su función cuando las células se diferencian (Ju y Rudolph, 2006), aunque se ha visto activa en procesos de reparación cromosómica (NCBI, 2008). Este hecho justifica la mayor frecuencia de células con trisomía 3 en tejido inflamado del cuello del útero que necesita repararse y regenerarse, pues la ganancia del cromosoma 3 es una ventaja proliferativa. Si el gen con el componente del RNA de la telomerasa (*TERC*) se reactiva, la proliferación se promueve pero también se franquea el bloque hacia la inmortalización celular; en 1996 Heselmeyer y colaboradores encontraron que la ganancia del brazo q del cromosoma 3 es importante en la progresión maligna del cuello uterino.

En el tejido bucal también encontramos células con trisomía 3 o con trisomía 17. El tejido bucal fue elegido como tejido de referencia asumiendo que se trataba de uno relativamente sano, sin embargo, la cavidad oral se encuentra constantemente expuesta a distintos irritantes que pudieron haber influido las frecuencias de estos cariotipos.

Los cariotipos cercanos a la tetraploidía se consideraron de esta manera porque mostraban un cariotipo caracterizado por la pérdida de un cromosoma del complemento tetraploide. De acuerdo con el análisis mostrado en la Figura R-8 el cromosoma 17 presentó pérdida preferencial en las muestras tanto de tejido inflamado como de tejido control, aunque en esta última sólo un caso presentó la condición. Este resultado nos remite nuevamente a la consideración del contenido génico de los cromosomas estudiados. Ya antes se había reportado la pérdida preferencial del cromosoma 17 en estudios de metafases de tumores cervicales cercanos a la tetraploidía (en Olaharski et al., 2006) y en tejido del cuello uterino con diagnósticos LSIL y HSIL, lo que llevó a la conclusión de que la pérdida de este cromosoma es un evento temprano en la carcinogénesis cervical (Olaharski et al., 2006). En nuestro trabajo hemos encontrado que la pérdida preferencial del cromosoma 17 también se detecta en el tejido inflamado del cuello uterino, clínicamente considerado como un daño tisular de no riesgo a malignidad. Olaharski encontró que de 41 casos HSIL analizados, 28 mostraron pérdida preferencial del cromosoma 17, es decir el 68% de sus casos. Mientras que en nuestro estudio 8 de 15 casos de inflamación (53%) perdieron con preferencia el cromosoma 17. Que el porcentaje de casos que muestran esta tendencia sea menor en tejido inflamado indica el menor grado de severidad de este diagnóstico con respecto a los diagnósticos LSIL y HSIL, en la progresión tumoral. Sin embargo, sí es evidente que la inflamación comparte con los diagnósticos de riesgo la pérdida del cromosoma 17, previamente identificada en tumores cervicales (Atkin y Baker, 1984; Heselmeyer et al., 1996). La frecuencia a la cual se observa la pérdida preferencial del cromosoma 17 en tejido inflamado del cuello uterino nos permite apoyar que este evento no es azaroso y que puede jugar un papel importante en la transformación del epitelio cervical, ambas ideas expuestas en 2006 por Olaharski y colaboradores. Ante tales evidencias la proposición de utilizar la aneuploidía como un marcador temprano de riesgo apoyaría el diagnóstico clínico y la toma de decisiones para el tratamiento oportuno, en virtud de que los análisis morfológicos no advierten estas similitudes.

En el análisis del cariotipo también se identificaron células $3n$ en tejido cérvicouterino. A diferencia del origen de las células $4n$, explicar el origen de los cariotipos $3n$ es un poco más complejo. Retomando a Shi y King (2005) podemos suponer que los cariotipos triploides tendrían su origen a partir de un evento de no disyunción múltiple. Aún así, debemos recordar que en este trabajo el nombre del cariotipo fue asignado en función del análisis de hibridación de dos cromosomas (3 y 17), lo cual representa una desventaja de esta metodología pues aunque identificamos la misma alteración numérica para los cromosomas evaluados, se ignora lo que acontece con los otros pares cromosómicos.

El hábito de fumar ha sido correlacionado con el riesgo a desarrollar carcinomas tanto cervicales como vulvares, pese a que el mecanismo que le subyace no ha sido reconocido (Viniés et al., 2004; Hussain et al., 2008). En el presente estudio el papel del tabaquismo en la generación de células con inestabilidad cromosómica numérica no pudo ser confirmada ni para el tejido bucal ni para el cervical uterino inflamado. Una solución posible a la mayor frecuencia de células con cariotipos aneusómicos y poliploides en el tejido bucal es que algunas de las pacientes no fumadoras se encuentran expuestas a otros factores capaces de inducir eventos aneuploidizantes

y que nosotros no tuvimos en cuenta, por ejemplo irritantes de los alimentos, medicamentos, o incluso humo proveniente de otras fuentes distintas del tabaco como de la combustión de productos maderables y combustibles fósiles.

En el caso del tejido cérvicouterino inflamado y el hábito de fumar, el tamaño de la muestra, al igual que en el análisis del papel del HPV, es importante para reconocer el papel del tabaquismo que por ahora se supone a través del efecto inmunosupresor de algunos metabolitos del humo de cigarro (revisado en Hussain et al., 2008) y la variación genética en la interleucina (IL) 2 de efecto de alta producción (Hussain et al., 2008).

Hussain y colaboradores también apuntaron en 2008 que una variante alélica que induce la sobreexpresión de IL2 puede contribuir la interacción positiva con el tabaquismo en el riesgo a cáncer vulvar a través de una vía inflamatoria, basados en un reporte que data de 1998. Los resultados de Baginski y colaboradores (2006), aunque obtenidos en células pulmonares, indican que el hábito de fumar es un factor sinérgico de sobreexpresión de la mucina inducida por estímulos y procesos inflamatorios; además, revisaron que fumar cigarros puede favorecer la inflamación del tejido a través de la activación de factores de transcripción pro-inflamatorios. Por otra parte, el hábito de fumar ha sido positivamente correlacionado con la generación de aneuploidía en esperma humano por incremento del daño oxidante al DNA y errores mitóticos (Shi et al., 2001; Robbins et al., 2005) y ha sido propuesto como causa de la aneuploidía en mosaico que caracteriza los abortos espontáneos de las mujeres fumadoras por no disyunción en células germinales (Vorsanova et al., 2008).

Las muestras de pacientes con diagnóstico de inflamación del cuello uterino que hemos analizado a nivel de desbalances cromosómicos numéricos, indica que, pese a que dicho diagnóstico en la clínica se clasifica en la categoría NILM, existe una inestabilidad cromosómica de los cromosomas 3 y 17 aquí estudiados similar a las detectadas en tejidos diagnosticados como LSIL y HSIL. Incluso en las pacientes que habían sido intervenidas con el procedimiento de conización es posible identificar aberraciones cromosómicas numéricas, lo que nos habla de la sensibilidad y funcionalidad de la técnica FISH en la detección de inestabilidad cromosómica numérica. De hecho, algunas de estas anomalías han sido asociadas con la progresión de estas lesiones hacia carcinoma *in situ*, como la ganancia del cromosoma 3 y la tetraploidía. La detección de estas anomalías en etapas como la inflamación advierte que, pese a ser considerada un diagnóstico negativo para malignidad, podría progresar hacia lesiones de mayor grado bajo ciertas condiciones. Es por ello que creemos que la propuesta de la presencia de aneuploidía y poliploidía como marcadores de genotoxicidad en las células exfoliativas de tejido cervical inflamado puede ser un auxiliar de las estrategias clínicas convencionales, así como de las decisiones médicas sobre tiempos de evaluación y tratamientos. Para apoyar esta propuesta sería necesario caracterizar las anomalías cromosómicas numéricas en pacientes cuyo tejido cervicouterino sea sano, así como en pacientes con diagnósticos de inflamación aguda y crónica.

X. CONCLUSIONES

Las células del tejido exfoliativo cérvico-uterino de pacientes mexicanas presentan niveles de aneuploidía y poliploidía mayores que el identificado en las células del tejido exfoliativo bucal de las mismas pacientes.

Las anomalías cromosómicas identificadas en tejido cervical uterino inflamado, como la ganancia preferencial del cromosoma 3, la pérdida preferencial del cromosoma 17 y la presencia de células tetraploides, indican que las células del tejido inflamado comparten características a nivel del cariotipo con las lesiones premalignas LSIL y HSIL.

Estas anomalías condicionan la integridad genética de las células hijas y podrían representar un riesgo neoplásico bajo condiciones inflamatorias persistentes. Estos cambios no se advierten con la prueba citopatológica de rutina, la prueba de Papanicolaou.

Las pacientes con tratamiento de conización quirúrgica presentan una mayor frecuencia de células con desbalances numéricos de los cromosomas que las pacientes sin este tipo de intervención en su historial. Esto nos hace pensar que pese al proceso de conización, en el tejido pudieron quedar algunas células remanentes de la lesión anterior (LSIL, HSIL o carcinoma *in situ*), detectables con la técnica de FISH, pero no con la técnica de Papanicolaou.

La edad de las pacientes es un factor importante que condiciona el nivel de células tetraploides. Las pacientes con mayor edad presentan una frecuencia mayor de células 4n las cuales podrían generar células hijas con cariotipos aneuploides cuya inestabilidad podría, a su vez, comprometer el curso de la lesión. A diferencia de la edad, la infección viral con el HPV y el hábito de fumar no se encontraron asociados con los niveles de aneuploidía y poliploidía.

El cariotipo trisomía 17 tiene una baja representación en las muestras de tejido inflamado, y es aún menor en las muestras positivas a la infección con el HPV, quizás debido a la sobrerrepresentación del gen *TP53* que estaría dirigiendo las células infectadas hacia el proceso de muerte.

La ganancia preferencial del cromosoma 3 soporta la importancia de la aneuploidía como marcador de genotoxicidad. Al considerar el contenido génico vemos que este evento podría proveer a las células de una ventaja proliferativa, que en su momento puede significar riesgo neoplásico.

El empleo de la técnica de hibridización *in situ* fluorescente (FISH) con dos sondas en tejido exfoliativo del cuello uterino con diagnóstico "inflamación" dirigido a los cromosomas 3 y 17 empleado en este trabajo contribuye la comprensión de la biología de este daño tisular y la estimación de los posibles riesgos. Los resultados obtenidos en este trabajo respaldan la utilidad de considerar a la aneuploidía y la poliploidía como biomarcadores de efecto y susceptibilidad, pues podrían contribuir a un diagnóstico adecuado y a un tratamiento oportuno.

A. PERSPECTIVAS.

El presente estudio nos ha permitido caracterizar las anormalidades cromosómicas numéricas en tejido inflamado del cuello uterino aunque en una muestra pequeña de casos por lo que sería importante incrementar el tamaño de la muestra de los casos, los cuales podrían ser divididos según el grado de la inflamación y como controles incluir muestras de tejido sano del cérvix uterino, con el fin de promover el tratamiento oportuno de las pacientes con inflamación del cuello uterino.

Al mismo tiempo que el tamaño de la muestra se incrementa, el papel del HPV en la generación de células con anomalías cromosómicas resulta interesante y conveniente atendiendo al estado físico del virus en el núcleo celular y al tipo viral que ha causado la infección.

El análisis de otros marcadores moleculares como las regiones teloméricas para establecer una asociación de mayor fidelidad entre la presencia de inestabilidad cromosómica numérica y la edad, o la detección de centrosomas supernumerarios favorecería la detección de factores de riesgo asociados con la formación de células aneuploides y poliploides así como a develar los mecanismos que conducen hacia estos fenotipos.

Nuestros resultados indican que la inflamación induce la formación de células aneusomías de los cromosomas 3 y 17, sin embargo, para ampliar nuestro conocimiento sobre la importancia de la aneuploidía en las etapas previas a las lesiones malignas sería de gran utilidad incrementar el número de cromosomas a evaluar pues nos permitiría: 1) conocer con mayor proximidad la ploidía de las células del tejido lastimado, y 2) identificar alteraciones numéricas de cromosomas específicos. Incluso, con las nuevas y más completas técnicas de identificación de aberraciones cromosómicas como la hibridización genómica comparativa (CGH), el cariotipo espectral (SKY) o la FISH múltiple (M-FISH) se podrían conocer simultáneamente los cambios numéricos y estructurales de todos los cromosomas.

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbott Molecular Inc. 2006. CEP® chromosome enumeration DNA FISH probes. Des Plaines, Illinois. 60018. USA.
2. Aguilera, A. y Gómez-González, B. 2008. Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat Rev Genet* **9**:204-217.
3. Alberts, B., et al. 2002. Molecular biology of the cell. Chapter 17: The cell cycle and programmed cell death. pp 983-1026. 4^a ed. Garland Science. New York. USA. 1543 p.
4. Andreassen, P. R. et al. 2001. Tetraploid state induces p53-dependent arrest of nontransformed mammalian cells in G1. *Mol Biol Cell* **12**:1315-1328.
5. Andrews, L. B., et al. 1994. Assessing genetic risks: Implications for health and social policy. pp 59-60. National Academy Press. Washington, D. C. USA. 338 p.
6. Atkin, N. B. y Baker, M. C. 1982. Nonrandom chromosome changes in carcinoma of the cervix uteri. I. Nine near-diploid tumors. *Cancer Genet Cytogenet* **7**:209-222.
7. Atkin, N. B. y Baker, M. C. 1984. Nonrandom chromosome changes in carcinoma of the cervix uteri. II. Ten tumor in the triploid-tetraploid range. *Cancer Genet Cytogenet* **13**:189-207
8. Aubert, G. y Lansdorp, P. M. 2008. Telomeres and aging. *Physiol Rev* **88**(2):557-579.
9. Baginski, T. K., et al. 2006. Cigarette smoke synergistically enhances respiratory mucin induction by proinflammatory stimuli. *Am J Respir Cell Mol Biol* **35**:165-174.
10. Bakkenist, C. J. y McGee, J. O'D. 1998. The preparation of non-radioisotopic hybridization probes. En: *In situ* hybridization. Principles and practice. Polak, J. M. y McGee, J. O'D (eds). pp 21-33. 2^a ed. Oxford. Gran Bretaña. 212 p.
11. Balachandar, V., et al. 2007. Identification of a high frequency of chromosomal rearrangements in the centromeric regions of prostate cancer patients. *J Zhejiang Univ Sci B* **8**(9):638-646.
12. Barlow, J. W. y Malkin, D. 2001. Human cancer genetics. En: Genetic toxicology and cancer risk assesment. pp 1-28. Choy, W. N. (ed). Marcel Dekker. New York. USA. 390 p.
13. Bauman, J. G. J., et al. 1980. A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochromelabelled RNA. *Exper Cell Res* **128**:485-490.
14. Bayani, J. M. y Squire, J. A. 2002. Applications of SKY in cancer cytogenetics. *Cancer Invest* **20**(3):373-386.
15. Bayani, J. y Squire, J. A. 2004. Fluorescence in situ hybridization (FISH). *Curr Protoc Cell Biol Chapter* **22** Unit 22.4:1-52.
16. Bayani, J. y Squire, J. A. 2004. Comparative Genomic Hybridization. *Curr Protoc Cell Biol Chapter* **22** Unit 22.6:1-15.
17. Bayani, J. y Squire, J. A. 2004. Multi-color FISH techniques. *Curr Protoc Cell Biol Chapter* **22** Unit 22.5:1-25.
18. Bellanger, S., et al. 2005. High-risk but not Low-risk HPV E2 proteins bind to the APC activators Cdh1 and Cdc20 and cause genomic instability. *Cell Cycle* **4**(11):1608-1615.
19. Boer, J. de y Hoeijmakers, J. H. J. 2000. Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* **21**(3):453-460.
20. Brusick, D. J. 1999. Genetic toxicology. En: Toxicology. Marquardt, H. (ed.). pp 127-149 . Academic Press. San Diego, Cal. USA. 1330 p.
21. Butel, J. S. 2000. Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease. *Carcinogenesis* **21**(3):405-426
22. Carney, D. N. y Sikora, K. 1990. Genes and cancer. John Wiley and sons. Chichester. England. 348 p
23. Carrillo, A., et al. 2004. Utilidad en la combinación de oligonucleótidos universales para la detección del virus del papiloma humano en cáncer cervicouterino y lesiones premalignas. *Salud Pública Méx* **46**(1):7-15.
24. Castedo, M., et al. 2006. Apoptosis regulation in tetraploid cancer cells. *EMBO J* **25**:2584-2595.
25. Cheng, K. C. y Loeb, L. A. 1997. Genomic stability and instability: a working paradigm. En: Current topics in microbiology and immunology. Kastan, M. B. (ed) pp 5-17. Springer. USA.
26. Choy, W. N. 2001. Genotoxic and nongenotoxic mechanisms of carcinogenesis. En: Genetic toxicology and cancer risk assesment. Choy, W. N. (ed) pp. 48-57. Marcel Dekker. New York. USA. 390 p.
27. Cimini, D. 2007. Detection and correction of merotelic kinetochore orientation by Aurora B and its partners. *Cell Cycle* **6**(13):1558-1564.
28. Cosme-Blanco, W. y Chang, S. 2008. Dual roles of telomere dysfunction in initiation and suppression of tumorigenesis. *Exp Cell Res* **314**(9):1973-1979.
29. Coussens, L. M. y Werb, Z. 2002. Inflammation and cancer. *Nature* **420**(6917):860-867.
30. Cruz-Bustillo, D. 2005. Inestabilidad genómica y cáncer colorrectal. *Rev Española Enf Digest* [online] **97**(10):683-687. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-01082005001000001&lng=es&nrm=iso. ISSN 1130-0108
31. Doorbar, J. 2005. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* **32S**:S7-S15.
32. Doorbar, J. 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci* **111**:525-541.
33. Doxsey, S. J. 2001. Centrosomes as command centres for cellular control. *Nat Cell Biol* **3**(5):E105-E107.

34. Draviam, V. M., Xie, S. y Sorger, P. K. 2004. Chromosome segregation and genomic instability. *Curr Opin Genet Dev* **14**:120-125.
35. Duelli, D. M., et al. 2007. A virus causes cancer by inducing massive chromosomal instability through cell fusion. *Curr Biol* **17**:431-437.
36. Duesberg, P. y Rasnick, D. 2000. Aneuploidy, the somatic mutation that makes cancer a species of its own. *Cell Motil Cytoskeleton* **47**:81-107.
37. Duesberg, P., et al. 2001. Aneuploidy versus gene mutation as cause of cancer. *Curr Sci* **81(5)**:490-500.
38. Duesberg, P. y Li, R. 2003. Multistep carcinogenesis: A chain reaction of aneuploidizations. *Cell Cycle* **2(3)**:202-210.
39. Duesberg, P., Li, R. y Rasnick, D. 2004. Aneuploidy approaching a perfect score in predicting and preventing cancer: Highlights from a conference held in Oakland in January 2004. *Cell Cycle* **3(6)**:823-828.
40. Duesberg, P., et al. 2005. Chromosomal basis of cancer. *Cellular Oncology* **27**:293-318.
41. Dvorak, H. F. 1986. Tumors: wounds that do not heal: similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* **315(26)**:1650-1659.
42. Feig, D. I., et al. 1994. Reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Res* **54(7 Suppl.)**:1890s-1894s
43. Finley, J. C., et al. 2006. Chromosomal instability in Barrett's esophagus is related to telomere shortening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **15(8)**:1451-1457.
44. Friend, S. 1990. The genetic basis of cancer. En: *Molecular genetics in cancer diagnosis*. Cossman, J. (ed). pp 19-28. Elsevier Science Publishing. USA. 465 p.
45. Fry, R. J. M., et al. 1999. Radiation. En: *Toxicology*. Marquardt, H., Schäfer, S. G., McClellan, R. O. y Welsch, F. (eds) pp 937-958. Academic Press. California. USA. 1330 p.
46. Fukusawa, K., et al. 1996. Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science* **271(5256)**:1744-1747.
47. Futreal, P. A., et al. 2004. A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer* **4**:177-183.
48. Galán Gómez, E. 2002. Aplicaciones del laboratorio de citogenética a la clínica. *Pediatría Integral* **6(9)**:820-830.
49. Ganem, N. J., Storchova, Z. y Pellman, D. 2007. Tetraploidy, aneuploidy and cancer. *Curr Opin Genet Dev* **17**:157-162.
50. Geneser, F. 2006. *Histología*. 3ª ed. Panamericana. Buenos Aires. Argentina. 828 p.
51. Gisselsson, D., et al. 2002. Centrosomal abnormalities, multipolar mitosis, and chromosomal instability in head and neck tumours with dysfunctional telomeres. *Br J Cancer* **87**:202-207.
52. Gisselsson, D. 2005. Mitotic instability in cancer: is there method in the madness? *Cell Cycle* **4(8)**:1007-1010.
53. González, J. 2004. La tecnología nuclear en el mejoramiento de las plantas. *Ciencia* **abril-junio**:43-52.
54. Gualandi, G., et al. 2001. Enhancement of genetic instability in human B cells by Epstein-Barr virus latent infection. *Mutagenesis* **16(3)**:203-208
55. Gullick, W. y Sikora, K. 1990. Oncogenes as clinical tools. En: *Genes and cancer*. Carney, D. N. y Sikora, K. (eds) pp. 11-17. John Wiley and sons. New York. USA. 348 p.
56. Hanahan, D. y Weinberg, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**:57-70.
57. Hanawalt, P. C. 1998. Genomic instability: environmental invasions and the enemy within. *Mutat Res* **400(1-2)**:117-125.
58. Haoudi, A., et al. 2003. Human T-cell Leukemia Virus-1 Tax oncoprotein functionally targets a subnuclear complex involved in cellular DNA damage-response. *J Biol Chem* **278(39)**:37736-37744.
59. Harper, J. W., Burton, J. L. y Solomon, J. M. 2006. The Anaphase-Promoting Complex: it's no just for mitosis any more. *Genes Dev* **16**:2179-2206.
60. Hatakeyama, M. 2004. Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Nature* **4**:688-694.
61. Heim, S. y Mitelman, F. 1995. *Cancer Cytogenetics. Chromosomal and molecular genetic aberrations of tumor cells*. 2ª ed. Wiley-Liss. New York. USA. 536 p.
62. Herrera, L. A., et al. 1994. Immune response impairment, genotoxicity and morphological transformation induced by *Taenia solium* metacestode. *Mutat Res* **305(2)**:223-228.
63. Herrera, L. A., et al. 2005. Role of infectious diseases in human carcinogenesis. *Environ Mol Mutagen* **45**:284-303.
64. Heselmeyer, K., et al. 1996. Gain of chromosome 3q defines the transition from severe dysplasia to invasive carcinoma of the uterine cervix. *Proc Natl Acad Sci* **93**:479-484.
65. Hoeijmakers, J. H. J. 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**:366-374.
66. Höfler, H., et al. 1998. Principles of *in situ* hybridization. En: *In situ hybridization. Principles and practice*. Polak, J. M. y McGee, J. O'D (eds). pp 1-19. 2ª ed. Oxford. Gran Bretaña. 212 p.
67. Hopman, A. H. N., et al., 2004. Transition of high-grade cervical intraepithelial neoplasia to micro-invasive carcinoma is characterized by integration of HPV 16/18 and numerical chromosome abnormalities. *J Pathol* **202**:23-33.
68. Hopman, A. H. N., et al. 2006. Genomic integration of oncogenic HPV and gain of the human telomerase gene *TERC* at 3q26 are strongly associated events in progression of uterine cervical dysplasia to invasive cancer. *J Pathol* **210**:412-419.
69. Hsieh, Y-H., et al. 2004. Pre-S mutant surface antigen in chronic hepatitis B virus infection induce oxidative stress and DNA damage. *Carcinogenesis* **25(10)**:2023-2032.
70. Huang, K-F., et al. 2007. Chromosomal gain of 3q and loss of 11q often associated with nodal metastasis in early stage cervical squamous cell carcinoma. *J Formos Med Assoc* **106(11)**:894-902.

71. Hudelist, G., et al. 2004. Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecol Oncol* **92**:873-880.
72. Hudson, J. D., et al. 1999. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J Exp Med* **190**:1375-1382.
73. Hussain, S. K., et al. 2008. Cervical and vulvar cancer risk in relation to the joint effects of cigarette smoking and genetic variation in interleukin 2. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **17(7)**:1790-1799.
74. Incassati, A., Patel, D. y McCance, D. J. 2006. Induction of tetraploidy through loss of p53 and upregulation of Plk1 by human papillomavirus type-16 E6. *Oncogene* **25**:2444-2451.
75. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). 2006. "Estadísticas a propósito del día internacional de la mujer" Datos Nacionales. <http://www.inegi.gob.mx/>
76. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). 2008. Estadísticas sobre mortalidad general 2006. <http://www.inegi.gob.mx/>
77. International Agency for Research on Cancer (IARC). 2002. GLOBOCAN 2002 database. <http://www-dep.iarc.fr/>
78. International Agency for Research on Cancer-World Health Organization (IARC-WHO). 2007. *Cancer Mondial*. <http://www.iarc.fr/>
79. Jackson, A. L. y Loeb, L. A. 2001. The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat Res* **477**:7-21.
80. Jallepalli, P. V. y Lengauer, C. 2001. Chromosome segregation and cancer: cutting through the mystery. *Nat Rev* **1**:109-117.
81. Jiménez, L. F. 2006. *Conocimientos fundamentales de biología*. Vol. 1. UNAM - Pearson Educación. México. 175 p.
82. Josephy, P. D. y Mannervik, B. 2006. *Molecular toxicology*. 2ª ed. Oxford University Press. New York. USA. 589 p.
83. Jox, A., et al. 1997. Integration of Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma cells leads to a region of enhanced chromosome instability. *Ann Oncol* **8(2)**:131-135.
84. Ju, Z. y Rudolph, K. L. 2006. Telomeres and telomerase in cancer stem cells. *Eur J Cancer* **42**:1197-1203.
85. Kamranvar, S. A., et al. 2007. Epstein-Barr virus promotes genomic instability in Burkitt's lymphoma. *Oncogene* **26**:5115-5123.
86. Karin, M., Lawrence, T. y Nizet, V. 2006. Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell* **124**:823-835.
87. Kastan, M. B. 1997. Genetic instability and tumorigenesis: Introduction. En: *Current topics in microbiology*. V 221. Kastan, M. B. (ed). pp 1-3. Springer. USA.
88. Kinouchi, Y., et al. 1998. Telomere shortening in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol* **33**:343-348.
89. Krämer, A., Neben, K. y Ho, A. D. 2002. Centrosome replication, genomic instability and cancer. *Leukemia* **16**:767-775.
90. Kuhn-Hallek, I., et al. 1995. Expression of recombination activating genes (RAG-1 and RAG-2) in Epstein-Barr virus-bearing B cells. *Blood* **85**:1289-1299.
91. Kurman, R. J. 2003. El sistema Bethesda, una perspectiva histórica. En: *El sistema Bethesda para informar la citología cervical: definiciones, criterios y notas aclaratorias*. Solomon, D. y Nayar, R. (eds). Journal. Buenos Aires, Argentina. 224 p.
92. Lawrence, T. 2007. Inflammation and cancer: a failure of resolution? *Trends Pharmacol Sci* **28(4)**:162-165.
93. Lawrence, T. and Gilroy, D. W. 2007. Chronic inflammation: a failure of resolution? *Int J Exp Pathol* **88**:85-94.
94. Lejárcegui, J. A. 1974. Histología normal del cuello uterino. Epitelio escamoso. Epitelio columnar y zona de transición. En: *el cuello uterino. Anatomía patológica, citología y colposcopia*. Márquez, M. et al. (eds) Salvar Editores. Barcelona, España. 282 p.
95. Lengauer, C., Kinzler, K. W. y Vogelstein, B. 1998. Genetic instability in human cancers. *Nature* **396**:643-648.
96. Lengauer, C. y Wang, Z. 2004. From spindle checkpoint to cancer. *Nat Genet* **36(11)**:1144-1145.
97. Levisky, J. M. y Singer, R. H. 2003. Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *J Cell Sci* **116**:2833-2838.
98. Lewis, M. E. y Baldino, F. 1990. Probes for *in situ* hybridization histochemistry. En: *In situ hybridization histochemistry*. Chesselet, M-F. (ed). pp 2-21. CRC Press. Florida. USA. 211 p.
99. Little, J. B. 2000. Radiation carcinogenesis. *Carcinogenesis* **21(3)**:397-404.
100. Lizard, G., et al. 1998. Morphological analysis of *in situ* hybridization signals in cervical intraepithelial neoplasia containing human papillomavirus type 16 or 18: Relationship with histological grade and DNA content. *Cytometry* **34**:180-186.
101. Lodish, H., et al. 2000. *Molecular cell biology*. Chapter 13: Regulation of the eucaryotic cell cycle. pp 495-536. 4ª ed. W. H. Freeman and company. 1138 p.
102. Lothschütz, D., et al. 2002. Polyploidization and centrosome hyperamplification in inflammatory bronchi. *Inflamm Res* **51**:416-422.
103. Lowe, S. W., Cepero, E. y Evan, G. 2004. Intrinsic tumour suppression. *Nature* **432**:307-315.
104. Lu, H., Ouyang, W. y Huang, C. 2006. Inflammation, a key event in cancer development. *Mol Cancer Res* **4(4)**:221-234.
105. Margolis, R. L. 2005. Tetraploidy and tumor development. *Cancer Cell* **8(5)**:353-354.
106. Márquez, L., Carrasco, C. E. y Villa, S. 2000. La génesis, señalización y quimioprevención del cáncer. *Mensaje Bioquímico* **24**:1-31.

107. Márquez, M. 1974. Inflamaciones del cuello uterino. En: El cuello uterino: anatomía patológica, citología y colposcopia. Márquez, M., et al. (editores). pp 33-36. Salvat Editores. Barcelona, España. 282 p.
108. Mayer, D. A. and Fried, B. 2007. The role of helminth infections in carcinogenesis. *Adv Parasitol* **65**:239-296.
109. Méhes, G., et al. 2004. Chromosomal aberrations accumulate in polyploid cells of high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL). *Pathol Oncol Res* **10(3)**:142-148.
110. Melsheimer, P., et al. 2004. DNA aneuploidy and integration of human papillomavirus type 16 E6/E7 oncogenes in intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix uteri. *Clin Cancer Res* **10**:3059-3063.
111. Mian, C., et al. 1999. Fluorescence *in situ* hybridization in cervical smears: detection of numerical aberrations of chromosomes 7, 3, and X and relationship to HPV infection. *Gynecol Oncol* **75**:41-46.
112. Modis, Y., Trus, B. L. y Harrison, S. C. 2002. Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J* **21(18)**:4754-4762.
113. Morel, G. 1993. Hybridization techniques for electron microscopy. CRC Press. Florida. USA. 360 p.
114. Morris, B. J. 2007. Why circumcision is a biomedical imperative for the 21st century. *BioEssays* **29**:1147-1158.
115. Motoyama, N. y Naka, K. 2004. DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability. *Curr Opin Genet Dev* **14**:11-16.
116. Münger, K., et al. 2004. Mechanism of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* **78(21)**:11451-11460.
117. Muñoz, N., et al. 2006. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* **24S3**:S3/1-S3/10.
118. National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2008. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
119. Nindl, I., et al. 1999. Distribution of 14 high risk HPV types in cervical intraepithelial neoplasia detected by a non-radioactive general primer PCR mediated enzyme immunoassay. *J Clin Pathol* **52**:17-22.
120. Oberringer, M., et al. 1999. Centrosome multiplication accompanies a transient clustering of polyploid cells during tissue repair. *Mol Cell Biol Res Commun* **2**:190-196.
121. Oesch, F. y Arand, M. 1999. Xenobiotic metabolism. En: Toxicology. Marquardt, H., Schäfer, S. G., McClellan, R. O. y Welsch, F. (eds) pp 83-109. Academic Press. California. USA. 1330 p.
122. Olaharski, A. J. 2004. Characterization of numerical chromosomal aberrations during cervical carcinogenesis. Tesis doctoral. University of California, Riverside. USA. 214 p.
123. Olaharski, A. J. y Eastmond, D. A. 2004. Elevated levels of tetraploid cervical cells in human papillomavirus-positive papanicolaou smears diagnosed as atypical squamous cells of undetermined significance. *Cancer Cytopathol* **102(3)**:192-199.
124. Olaharski, A. J., et al. 2006. Tetraploidy and chromosomal instability are early events during cervical carcinogenesis. *Carcinogenesis* **27(2)**:337-343.
125. Organización Mundial de la Salud (World Health Organization). <http://www.who.int/en/> Consulta: Enero, 2008.
126. O'Sullivan, J. N., et al. 2002. Chromosomal instability in ulcerative colitis is related to telomere shortening. *Nat Genet* **32**:280-284.
127. Pagano, J. S. 1999. Epstein-Barr virus: the first human tumor virus and its role in cancer. *Proc Assoc Am Physicians* **111(6)**:573-580.
128. Palapattu, G. S., et al. 2004. Prostate carcinogenesis and inflammation: emerging insights. *Carcinogenesis* **26(7)**:1170-1181.
129. Pardue, M. L. y Gall, J. G. 1969. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci* **64**:600-604.
130. Park, J. S., et al. 1997. Physical status and expression of HPV genes in cervical cancers. *Gynecol Oncol* **65**:121-129.
131. Parkin, D. M. y Bray, F. 2006. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine* **24S3**:S3/11-S3/25.
132. Perret, C. W. 1993. The molecular principles of *in situ* hybridization. En: Hybridization techniques for electron microscopy. Morel, G. (ed) pp 14-43. CRC Press. Florida. USA. 360 p.
133. Peters, J. M. 2002. The Anaphase-Promoting Complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell* **9**:931-943.
134. Petrenko, O. y Moll, U. M. 2005. Macrophage migration inhibitory factor MIF interferes with the Rb-E2F pathway. *Mol Cell* **17**:225-236.
135. Pett, M., et al. 2004. Acquisition of high-level chromosomal instability is associated with integration of Human Papillomavirus type 16 in cervical keratinocytes. *Cancer Res* **64**:1359-1368.
136. Pett, M. y Coleman, N. 2007. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *J Pathol* **212**:356-367.
137. Pieber, D., et al. 2000. Numerical chromosomal aberrations of chromosome 1 and 7 in dysplastic cervical smears. *Life Sciences* **67**:671-678.
138. Pihan, G. A. y Doxsey, S. J. 1999. The mitotic machinery as a source of genetic instability in cancer. *Cancer Biol* **9**:289-302.
139. Pihan, G. A., et al. 2003. Centrosome abnormalities and chromosome instability occur together in pre-invasive carcinomas. *Cancer Res* **63**:1398-1404.
140. Plentz, R. R., et al. 2004. Hepatocellular telomere shortening correlates with chromosomal instability and the development of human hepatoma. *Hepatology* **40(1)**:80-86.
141. Plentz, R. R., et al. 2005. Telomere shortening correlates with increasing aneuploidy of chromosome 8 in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **42(3)**:522-526.
142. Poirier, C. M. 2004. Chemical-induced DNA damage and human cancer risk. *Nature* **4**:630-637.

143. Pollack, J. R. 2006. Chromosome instability leaves its mark. *Nat Genet* **38(9)**:973-974.
144. Pollard, J. W. 2004. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* **4**:71-78.
145. Ponder, B. A. J. 1990. Inherited cancer syndromes. En: *Genes and cancer*. Carney, D. y Sikora, K. (eds). pp 99-106. John Wiley & sons. England. 348 p.
146. Rajagopalan, H. y Lengauer, C. 2004. Aneuploidy and cancer. *Nature* **432**:338-341.
147. R&D systems. 2005. Genomic instability syndromes. [online] URL http://www.rndsystems.com/mini_review_detail_objectname_MR04_GenomicInstability.aspx
148. Robbins, W. A., et al. 2005. Effect of lifestyle exposures on sperm aneuploidy. *Cytogenet Genome Res* **111**:371-377.
149. Salsman, J., et al. 2008. A virus-encoded cell-cell fusion machine dependent on surrogate adhesins. *PLoS Pathog* **4(3)**:e1000016.
150. Schär, P. 2001. Spontaneous DNA damage, genome instability, and cancer when DNA replication escapes control. *Cell* **104**:329-332.
151. Segura Valdez, M. de L., López Velázquez, G. y Jiménez García, L. F. 1997. Hibridación *in situ* ultraestructural. Plaza y Valdés. México. 27 p.
152. Sen, S. 2000. Aneuploidy and cancer. *Curr Opin Oncol* **12**:82-88.
153. Schiffman, M. y Castle, P. E. 2003. Human papillomavirus: epidemiology and public health. *Arch Pathol Lab Med* **127**:930-934.
154. Shacter, E. y Weitzman, S. A. 2002. Chronic inflammation and cancer. *Oncology* **16(2)**:217-226.
155. Sherman, M. E., et al. 2003. Células escamosas atípicas. En: *El sistema Bethesda para informar la citología cervical: definiciones, criterios y notas aclaratorias*. Solomon, D. y Nayar, R. (eds). Journal. Buenos Aires, Argentina. 224 p.
156. Shi, Q., et al. 2001. Cigarette smoking and aneuploidy in human sperm. *Mol Reprod Dev* **59**:417-421.
157. Shi, Q. y King, R. W. 2005. Chromosome nondisjunction yields tetraploidy rather than aneuploidy. *Nature* **473**:1038-1042.
158. Shi, Q. y King, R. W. 2006. Shi and King replay. *Nature* **442**:E10.
159. Shirai, K., et al. 2006. Interleukin-8 gene polymorphism associated with susceptibility to non-cardia gastric carcinoma with microsatellite instability. *J Gastroenterol Hepatol* **21(7)**:1129-1135.
160. Sluder, G. y Nordberg, J. J. 2004. The good, the bad and the ugly: the practical consequences of centrosome amplification. *Curr Opin Cell Biol* **16**:49-54.
161. Storchova, Z. y Pellman, D. 2004. From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Mol Cell Biol* **5**:45-54.
162. Sugimura, T. 2000. Nutrition and dietary carcinogens. *Carcinogenesis* **21(3)**:387-395.
163. Sunday, M. E. 1998. The design and generation of probes for *in situ* hybridization. En: *In situ hybridization. Principles and practice*. Polak, J. M. y McGee, J. O'D (eds). pp 21-33. 2ª ed. Oxford. Gran Bretaña. 212 p.
164. Sy, S. M-H., et al. 2005. Regional over-representations on chromosome 1q, 3q y 7q in the progression of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol* **18(5)**:686-692.
165. Tornesello, M. L., et al. 2008. Human papillomavirus genotypes and HPV16 variants in penile carcinoma. *Int J Cancer* **122**:132-137.
166. Uronis, H. E. y Bendell, J. C. 2007. Anal cancer: an overview. *Oncologist* **12**:524-534.
167. Uziel, O., et al. 2008. Oxidative stress causes telomere damage in Fanconi anaemia cells – a possible predisposition for malignant transformation. *Br J Haematol* **142**:82-93.
168. van Dekken, H., et al. 1993. DNA *in situ* hybridization and confocal microscopy. En: *Hybridization techniques for electron microscopy*. Morel, G. (ed) pp 65-97. CRC Press. Florida. USA. 360 p.
169. Van Stedum y King. 2002. Sample and hybridization. En: *Molecular cytogenetics: protocols and applications. Methods in molecular biology*, V 204. Fan, Y. S. (ed). Humana Press. New Jersey. USA.
170. Vidart Aragón, J. A., Cristóbal García, I., y Herraiz Martínez, M. A. 1997. Papilomavirus y patología cervical. En: *El útero: fisiología y patología*. Botella Llusá, J. (ed) pp 245-268. Díaz de Santos. Madrid. España. 401 p.
171. Vineis, P., et al. 2004. Tobacco and cancer: recent epidemiology evidence. *J Natl Cancer Inst* **96(2)**:99-106.
172. Virmani, A. K., et al. 2001. Aberrant methylation during cervical carcinogenesis. *Clin Cancer Res* **7**:584-589.
173. von Knebel Doeberitz, M. 2006. Biomarkers in screening of cervical cancer. En: *Emerging issues on HPV infections: from science to practice*. Monsenjo, J. (editor). pp 1-19. Basel. Karger.
174. Vorsanova, S. G., Yurov, Y. B. y Iourov, I. Y. 2008. Maternal smoking as a cause of mosaic aneuploidy in spontaneous abortions. *Med Hypotheses* **71(4)**:607.
175. Wagner, R. P., Maguire, M. P. y Stallings, R. L. 1993. *Chromosomes: A synthesis*. 2ª ed. Wiley-Liss. New York, USA. 523 p.
176. Wang, J-S., Link, J. M., Groopman, J. D. 2001. Molecular epidemiology and biomarkers. En: *Genetic toxicology and cancer risk assessment*. Choy, W. N. (ed) pp 271-298. Marcel Dekker. New York. USA. 390 p.
177. Weaver, B. A. A. y Cleveland, D. W. 2006. Does aneuploidy cause cancer?. *Curr Opin Cell Biol* **18**:658-667.
178. Weaver, B. A. A., Silk, A. D. y Cleveland, D. W. 2006. Nondisjunction, aneuploidy and tetraploidy. *Nature* **442**:E9-E10.
179. Webster, K., et al. 2000. The human papillomavirus (HPV) 16 E2 protein induces apoptosis in the absence of other HPV proteins and via a p53-dependent pathway. *J Biol Chem* **275(1)**:87-94.
180. Weinberg, R. A. 1996. Así se produce el cáncer. *Investigación y Ciencia* **Nov**:10-18.
181. Weinberg, R. A. 2007. *The biology of cancer*. Garland Science, Taylor and Francis Group. New York. USA. 800 p.

182. Widschwendter, A., et al. 2003. DNA methylation in serum and tumors of cervical cancer patients. *Cancer Res* **10**:565-571.
183. Widschwendter, A., et al. 2004. Analysis of aberrant DNA methylation and human papillomavirus DNA in cervicovaginal specimens to detect invasive cervical cancer and its precursors. *Clin Cancer Res* **10**:3396-3400.
184. Williams, G. M. 2001. Mechanism of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. *Toxicology* **106**:3-10.
185. Wirth, K. G., et al. 2006. Separase: a universal trigger for sister chromatid disjunction but not chromosome cycle progression. *J Cell Biol* **172(6)**:847-860.
186. Wogan, G. N., et al. 2004. Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* **14**:473-486.
187. Woodman, C. B. J., Collins, S. I. y Young, L. S. 2007. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* **7**:11-22.
188. Yang, S., et al. 2008. Tustin is required for bipolar spindle assembly and centrosome integrity during mitosis. *FASEB J* **22(6)**:1960-1972.
189. Young, N. A., et al. 2003. Hallazgos no neoplásicos. En: *El sistema Bethesda para informar la citología cervical: definiciones, criterios y notas aclaratorias*. Solomon, D. y Nayar, R. (eds). Journal. Buenos Aires, Argentina. 224 p.
190. Yue, Y., et al. 2006. Segmental duplication associated with evolutionary instability of human chromosome 3p25.1. *Cytogenet Genome Res* **112(3-4)**:202-207.
191. Yuen, K. W. Y., Montpetit, B. y Hieter, P. 2005. The kinetochore and cancer: what's the connection?. *Curr Opin Cell Biol* **17**:576-582.
192. Yumamoto, N., et al. 2007. Loss of heterozygosity (LOH) on chromosomes 2q, 3p and 21q in Indian oral squamous cell carcinoma. *Bull Tokyo Dent Coll* **48(3)**:109-117.
193. Zeiger, E. 2001. Genetic toxicity tests for predicting carcinogenicity. En: *Genetic toxicology and cancer risk assessment*. Choy, W. N. (ed) pp. 29-46. Marcel Dekker. New York. USA. 390 p.

LECTURA COMPLEMENTARIA

1. Zar, J. H. 1984. *Biostatistical analysis*. 2nd edition. Prentice-Hall. New Jersey. USA. 718 pp.