



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

DETECCIÓN DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS NUMÉRICAS EN
PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE INFLAMACIÓN

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

ELSA GUADALUPE GUTIÉRREZ PALACIOS

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE

MEXICO DF.

FEBRERO 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.

Puedes llegar a cualquier parte,
siempre que andes lo suficiente” *Caroll Lewis*

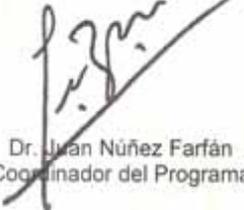
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 3 de noviembre de 2008, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **GUTIÉRREZ PALACIOS ELSA GUADALUPE** con número de cuenta **96234978** con la tesis titulada **"DETECCIÓN DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS NUMÉRICAS EN PACIENTES CON DIAGNÓSTICO INFLAMATORIO"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE**:

Presidente: DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO
Vocal: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA
Secretario: DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
Suplente: DRA. REGINA DORINDA MONTERO MONTOYA
Suplente: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 30 de enero de 2009.



Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

Agradecimientos

Al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias

Este proyecto fue apoyado con una beca de posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT número 199244. Y financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN 216605.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Toxicología del departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental en el Instituto de Investigaciones Biomédicas , bajo la dirección de la Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte. El comité tutorial estuvo además integrado por los Dres: Marcela Lizano Soberón y Luis Alonso Herrera Montalvo

AGRADECIMIENTOS

A mi escuela, la UNAM, por el privilegio de poder ser parte de su comunidad, por las oportunidades y apoyos que nos brinda. Por permitirme crecer tanto como profesionista como persona.

A la Doctora Ma. Eugenia Gonsebatt, por su vasto apoyo y confianza durante este tiempo, una vez más gracias.

A la Doctora Marcela Lizano, por su apoyo incondicional, la confianza de permitirme trabajar en su lab sobretodo por su amistad.

Al Doctor Luis Alonso Herrera por sus críticas y comentario tan atinados a lo largo de este trabajo.

A la Doctora Leticia Rocha por su gran disponibilidad, sus enriquecedores consejos y el tiempo que dedicó a este trabajo.

A la Doctora Regina Montero por su atención, tiempo y dedicación para mejorar este trabajo.

A la Doctora Julieta Rubio por sus comentarios y consejos y dedicación por hacer un grupo de trabajo por demás agradable.

A la M. en C. Adela Carrillo por su asesoría en la implementación de PCR para la tipificación del VPH.

A mis compañeros y amigos del lab: a Wendy, Danny, Jorge, ya que la convivencia diaria no solo nos ha hecho hermanos de conocimiento sino también de experiencias y vivencias personales, a Pavel ya que ha sido muy agradable y por más divertido trabajar con usted y la señora Delfina muchas gracias por todo este tiempo de su trabajo, a César, Luisrael, Celeste, Rebeca, Camilo, Carol, Toño, Víctor, Vicente, Olga, Blanquita, Karina y Perla muchas gracias y Luis Serrano, por tu amistad y parabienes en todo momento

Al lab de la Doc. Marcela Lizano: Adelita, Erick, Vero, Naye, Adriana y Fredy muchas gracias no solo por sus enseñanzas sino también por su gran amistad, pues aunque breve fue muy sustancioso y divertido el tiempo que compartí con cada uno de ustedes.

Quiero compartir, dedicar y agradecer

A mis padres Rocio y Antonio gracias por todo su amor, por su confianza, por sus ganas de verme feliz y por toda su entrega y apoyo incondicional. Esto es por y para ustedes.

A mis hermanos: Alma por acompañarme en esta aventura, sin ti realmente hubiera sido difícil y Jorge, gracias por estar ahí, aquí y en todos momentos, siempre dispuesto a darme la mano, a los dos gracias por brindarme su ayuda como nadie.

En especial y con gran amor a mi amigo de siempre, “mi espíritu gemelo” Rogelio “... gracias por venir...” afortunadamente compartiendo contigo esta alegría, una más juntos, no hay palabras que describan todo el bien que me has hecho en todos los sentidos, porque sin ti hubiera sido doblemente complicado, no solo me has apoyado para terminar este proyecto, sino me das todos los motivos para ir por más... “gracias totales”...!!!

A Lilis gracias una vez más amiga por tu amistad incomparable, por tus consejos, por compartir conmigo tantas experiencias, porque a pesar de la distancia seguimos aprendiendo juntas.

A Héctor, Efrén y Maricruz gracias primos que bien se siente saber que somos familia.

A mi padrino Juan que nunca me deja, gracias por tu gran apoyo y cariño.

A Leo por ser un motivo de inspiración y a Arantxa por sus sonrisas y energía.

A Eric, por tu apoyo en muchos momentos y por tu ayuda absoluta muchas gracias.

Y no por ultimo menos importante a Dios por permitirme ver y experimentar logros y satisfacciones como esta, por todos los momentos afortunados que he tenido en mi vida y por sentir que me quiere y me bendice hoy más que nunca.

CONTENIDO

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCION

- Inestabilidad genética
- Inflamación y cáncer
- Aneuploidía y cáncer
- Poliploidía y cáncer
- Métodos para la detección de aberraciones cromosómicas
- Epidemiología del cáncer cervicouterino
- Historia natural del cáncer cervicouterino
- Cáncer cervicouterino y alteraciones cromosómicas
- Virus del Papiloma Humano
 - VPH de alto y bajo riesgo
 - Ciclo viral en epitelios
 - Inestabilidad cromosómica y VPH
 - Clasificación de los VPH
- Otros factores de riesgo
- Sistemas de clasificación citológica
 - Clasificación de Papanicolaou
 - Clasificación descriptiva
 - Sistema Bethesda
 - Otras neoplasias malignas que se deben especificar
 - Cambios inflamatorios
- Diagnóstico y tratamiento del cáncer cervicouterino
- Reparación de tejidos y expresión de PPAR β

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

HIPOTESIS

OBJETIVOS

MATERIAL Y METODOS

- Población estudiada
- Procesamiento de las muestras
- Preparación de laminillas
- Fluorescence in situ hybridization (FISH)
 - Preparación de la sondas
 - Visualización de la hibridación
 - Análisis al Microscopio
- Tipificación de VPH
 - Extracción y Purificación de DNA
 - Detección y tipificación de VPH
- Inmunocitoquímica
- Análisis estadísticos

RESULTADOS

- Tipificación de VPH
- Células cromosómicamente desbalanceadas
- Aberraciones numéricas e infección de VPH
- Células cromosómicamente desbalanceadas y tratamiento con cono cervical
- Infección de VPH y cono cervical
- Expresión de PPAR β

CONCLUSIONES

PERSPECTIVAS

BIBLIOGRAFIA

RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCU) es un problema de salud pública a nivel mundial pero en particular en países en vías de desarrollo. En México representa la segunda causa de muerte por cáncer entre la población femenina.

Una estrategia preventiva que ha tenido éxito para disminuir la mortalidad por CaCU es la prueba de Papanicolaou. Las lesiones del cuello uterino mediante esta prueba y bajo el sistema de clasificación Bethesda se catalogan en: lesiones de alto y bajo grado que son indicativas de malignidad, ASCUS (que se consideran como dudosas) y negativas a malignidad como lo es la inflamación. En el caso de las pacientes con diagnóstico de inflamación, como es considerado de riesgo, pero negativo a malignidad, se les da un seguimiento prolongado, costoso para nuestros sistemas de salud así como tedioso para la propia paciente.

Las células tumorales, así como las lesiones presentan un elevado número de células cromosómicamente desbalanceadas, tanto poliploidías como aneuploidías. Previamente hemos encontrado la presencia de este tipo de células en muestras de tejido cervical de pacientes con lesiones de alto y bajo grado. Se sabe que el agente etiológico del CaCU es el Virus de Papiloma Humano (VPH) en especial las cepas denominadas de alto riesgo, por lo que se piensa que la infección por VPH es en parte responsable de la generación de células con aberraciones cromosómicas numéricas. Por otro lado, se ha descrito que durante el proceso fisiológico de reparación de tejidos, se forman células tetraploides que podrían contribuir con dicho proceso. Con el propósito de investigar si en los casos de inflamación la presencia de células cromosómicamente desbalanceadas se asocia a la infección y tipo de VPH o a un proceso de reparación tisular, empleamos el método de Hibridación in situ fluorescente (FISH) para analizar 97 casos con este diagnóstico. Además determinamos la presencia de infección por VPH mediante PCR y realizamos inmunocitoquímica para detectar la expresión de PPAR β , un marcador de regeneración tisular.

Nuestros resultados indican que la presencia de VPH no es el único factor asociado a la formación de células tetraploides o aneuploides, ya que la presencia de las células tetraploides se encontró también asociada a la presencia de PPAR β , una proteína relacionada con la reparación de tejidos.

ABSTRACT

The cervical cancer is a public health problem in the world, but especially in developing countries. In Mexico, it is the second cause of cancer deaths among women. In developed nations, cervical cancer rates have dropped dramatically since the introduction of the Pap smear. The Bethesda classification system introduced the terms: positive to malignancy as a low grade intraepithelial lesion (LSIL) and high grade intraepithelial lesion (HSIL) and negative for malignancy as the inflammation. One alternative treatment for the patients with inflammation diagnostic is to take a “wait to see” approach by having the woman return for repeat Pap smears in three to six months. But this in addition to the financial expenditures, women will endure the stress that accompanies the powerlessness of having been diagnosed as a normal.

In the cancer cells commonly is observed the aneuploidy, but is not the only type of numerical chromosomal aberration, another type is the poliploidy. In a previous study we found out a direct association with the rate of cells with chromosomal aberration and the severity of the lesion. There is a great amount of epidemiological evidence to indicate that Human Papillomavirus (HPV) is the main etiological agent associated with cervical cancer, principally the genotypes called the “high risk”. Several reports have been demonstrated that HPV is responsible of the chromosomal instability.

On the other hand, experiments showed an increased tetraploidization rate in well-healing wounds especially during inflammation. The objective of this study is to investigate in patients with inflammation, if the presence of numerical chromosomal aberration is caused by the HPV infection or by the tissue repair process.

Fluorescence in situ hybridization was used to simultaneously analyze alterations in chromosome 3 and 17 in cervical cells from 97 different patients. Polymerase chain reaction (PCR) was used to analyze the cervical cells for the

presence of the HPV. Additionally we used immunocytochemistry to detect the expression of PPAR β , a protein that is expressed during of tissue repair.

Our results indicate that the infection of HPV is not the only causal agent of numerical chromosomal aberration, because this is associated also to the tissue regeneration.

INTRODUCCION

Inestabilidad genética

Para la célula, mantener la integridad de sus cromosomas es de vital importancia. Si falla en esta tarea y si de cualquier manera se divide, ambas células hijas tendrán un complemento cromosómico anormal con consecuencias potencialmente letales para el organismo. Los cambios en el número y estructura de los cromosomas pueden llevar a la muerte o a iniciar un proceso de inestabilidad genética. La consecuencia de la inestabilidad genética puede manifestarse en la alteración del número de copias de uno o más genes.

Los efectos de los desbalances cromosómicos son complejos ya que presumiblemente median la expresión de oncogenes así como la inhibición o pérdida de genes supresores importantes en la oncogénesis. La información disponible parece favorecer la hipótesis de que existen patrones en los desbalances cromosómicos son específicos para ciertos tipos de tumores. Dichos patrones se pueden revisar ahora en bases de datos realizadas a través del análisis de CGH, de Progenetix www.progenetix.de/_pgscripts/progenetix/about_progenetix.html. La evidencia más fuerte de que los desbalances cromosómicos tienen un papel determinante en la patogénesis de un tumor es la asociación de éstos con el pronóstico de la malignidad. Por ejemplo: la pérdida de 1p, 3p, 11q y ganancia de 17q, así como la amplificación del oncogén MYCN (neuroblastoma derived v-myc avian myelocytomatosis viral related oncogene) en tumores de neuroblastoma pediátricos. Actualmente estos desbalances definen dos tipos clinicogenéticos primordiales de la enfermedad (Mc Ardle., et al, 2004). Existen trabajos que han descrito que en el caso del cáncer de mama, más del 12% de los cambios en la expresión genética se debe a la descompensación genética y la alteración en el número de copias de DNA tiene un impacto sustancial en los niveles de expresión de los genes (Pollack, et al., 2002). Subsecuentemente otros grupos han reportado tal correlación significativa en casos de cáncer de próstata (Wolf, et al, 2004),

pulmón(Tonon, et al., 2005) así como en neuroblastoma (Janoueix-Lerosey, et al., 2004).

No todos los genes mapeados en las regiones cromosómicas perdidas o ganadas son necesariamente afectados, debido a que posiblemente existen mecanismos que compensan la pérdida de un alelo. Por ejemplo, en el caso de leucemia mieloide aguda que presenta la ganancia del cromosoma 8 completo, existen subtipos de este padecimiento con la trisomía para este cromosoma y un perfil de expresión de genes distinto entre sí, lo que sugiere que existen otros factores detrás de la dosificación genética que también afectan la expresión (Schoch, et al.,2006). Además de los efectos que tiene la pérdida y ganancia de regiones cromosómicas *per se*, es evidente que también afecta genes que regulan la transcripción de genes que están en otros cromosomas (Stallings, 2007).

Inflamación y cáncer

La asociación entre inflamación y cáncer nace hace más de 150 años, cuando en 1863 los trabajos de Virchow indicaron que el cáncer tiende a originarse en sitios de inflamación crónica (Balkwill, 2001). En el presente existe evidencia epidemiológica que sugiere una fuerte asociación entre enfermedades con inflamación crónica y el aumento del riesgo a desarrollar cáncer (Philip et al., 2004). La inflamación involucra una respuesta innata y adaptativa, muy bien coordinada, del sistema inmune, provocado por infección o daño. Cualquier alteración de la homeostasis del tejido activa las células del sistema inmune. Las células innatas inmunes como macrófagos, células dendríticas (DC) y natural killer (NK) pueden iniciar la respuesta inflamatoria liberando citocinas, quimiocinas, proteasas remodeladoras de matriz, así como especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (NOS) que ayudan a eliminar al agente patógeno y reparar el tejido dañado (Perwez-Hussian, 2007). Sin embargo cualquier falla en el control de los componentes de la respuesta inmune puede derivar en inflamación crónica generando un microambiente patológico el cual podría favorecer la iniciación o progresión a cáncer (Lu, et al., 2006). Un ambiente inflamatorio crónico provee de manera constante ROS y NOS, citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento, los cuales pueden

alterar el proceso biológico de la homeostasis celular produciendo inestabilidad genómica y el riesgo de desarrollar cáncer (Coussens, 2002).

Aneuploidía y cáncer

La aneuploidía es una anomalía genética en donde el número de los cromosomas no es múltiplo del número haploide n , debido a la variación de copias de un solo cromosoma y no de juegos completos de cromosomas. En general se presenta por copias de más o de menos de un solo cromosoma y se han descrito diferentes mecanismos para generar una célula aneuploide (Fig.1). En el ser humano es el tipo más frecuente de anomalía cromosómica que es clínicamente significativo (Salamanca, 1988 y Luque y Herráez, 2001). Las células cancerosas frecuentemente presentan aneuploidías extremas con múltiples anomalías cromosómicas (Strachan, 1999). Hace más de un siglo, que se propuso a la aneuploidía como el mecanismo esencial detrás de la transformación cancerosa.

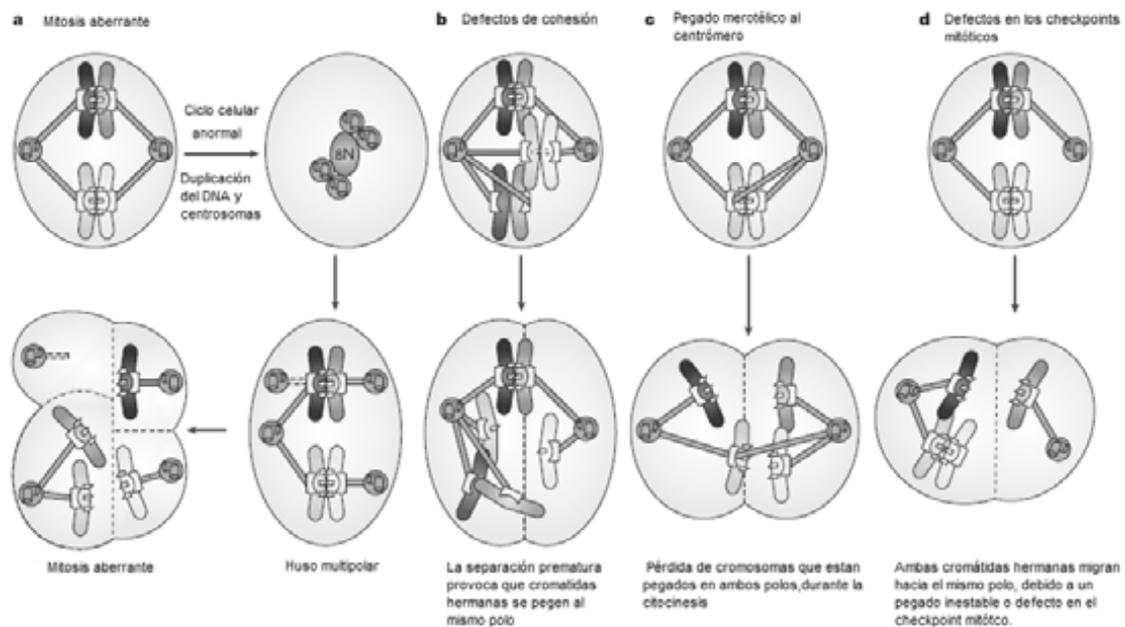


Fig.1 Diferentes mecanismos para generar células aneuploides. a) Mitosis aberrante da origen a centrosomas numerosos, poliploidización y husos multipolares. b) Defectos de cohesión. La pérdida prematura de la cohesión entre las cromátidas hermanas, es responsable de la segregación inadecuada. c) Orientación merotética sucede cuando los microtúbulos de ambos polos se unen al mismo cinetocoro. d) Defectos en el checkpoint mitótico como microtúbulos inestables así como vías de señalización débiles. (Tomado de Kops et al., 2005).

La hipótesis se basó en los trabajos de Boveri en 1900 en los que observó un número anormal de cromosomas en células cancerosas. (Matzke, et al., 2003). Actualmente diversos estudios de cariotipo humano han demostrado en la mayoría de los cánceres como mama (Yuan, et al., 2006), cérvix (Atkin, 1997), pulmón (Gemma, et al., 2000), testículos (Meyer, et al., 2003), colon (Kupka et al., 2001), vejiga (Hernando, et al., 2004) y piel (Liang, et al., 2001) existe una pérdida o ganancia de cromosomas, lo que sugiere que puede ser el cambio genético más común en los tumores sólidos (Olarhaski, 2006).

En 1998, Duesberg y colegas propusieron la teoría aneuploide, de acuerdo con esta teoría el cáncer se desarrolla no necesariamente a causa de mutaciones en genes relacionados con la promoción del cáncer, si no por un desbalance de la dosificación de genes causada por la pérdida o ganancia de cromosomas. También sostiene que los carcinógenos así como las fallas en el ciclo celular tienen mayor efectividad en causar aneuploidía que las mutaciones específicas (Duesberg et al., 1998).

A pesar de la fuerte asociación entre aneuploidía y cáncer, existe controversia, debido a la previa postulación de la hipótesis mutacional, la cual sostiene que las mutaciones en genes que codifican para genes supresores de tumores y oncogenes pueden originar inestabilidad genética, que a su vez promueve un ambiente donde la aneuploidía puede desarrollarse (Lengauer, et al., 1997) Sin embargo esto continúa siendo tema de debate, ya que ninguna de las hipótesis es lo suficientemente sólida para explicar el origen del cáncer (Ravid et al., 2006).

Poliploidía y cáncer

La poliploidía es un evento cromosómico en el cual el genoma se amplifica en múltiplos del estado haploide y se desarrolla cuando hay reduplicación del cromosoma sin división celular. Fue descrita primero en plantas en 1910 por Strassburger y desde entonces ha sido estudiada tanto en plantas como en animales (Ravid et al., 2002).

Particularmente se ha encontrado en distintos tipos de células de mamíferos como en hepatocitos (Krudryavtsev, 1993), cardiomiocitos

(Sandritter, 1964), megacariocitos (Brodsky, 1977), células de músculo liso del útero, que no proliferan y están diferenciados (Heiden, 1975). Bajo condiciones de estrés también se han descrito la presencia de células poliploides como es el caso de miocitos de la pared del ventrículo derecho (Owens, 1982), así como en células del músculo liso de la aorta de animales hipertensos (Owens, 1983).

Se ha observado que la poliploidía y más específicamente la tetraploidía, precede y acompaña el desarrollo de tumores malignos aneuploides como el de esófago (Barret, 2003) y cervix (Olarhasky et al., 2006). Varios estudios han demostrado que existe una alta tasa de cromosomas que se pierden o se ganan en células que son poliploides y que continúan proliferando, lo cual muy probablemente dé origen a las células aneuploides de la tumorigénesis (Ravid et al., 2006). Otros estudios han identificado alteraciones en el número de centrosomas asociados a la presencia de tetraploidías lo que puede dar lugar a inestabilidad genética y como consecuencia las aneuploidías (Meraldi et al., 2002).

Métodos para la detección de aberraciones cromosómicas

En la actualidad el término citogenética molecular describe el análisis de las alteraciones genéticas utilizando principalmente la tecnología basada en la hibridación *in situ*. La hibridación *in situ* fluorescente o FISH por sus siglas en inglés (Fluorescence *in situ* hybridization) se desarrolló a fines de 1980 con el empleo de técnicas radioactivas para el mapeo de genes humanos. (Schröck et al., 1996) En poco tiempo esta tecnología se usó para la caracterización de rearrreglos cromosómicos, cromosomas marcadores, detección de microdeleciones y para diagnóstico prenatal de aneuploidías comunes en los laboratorios de citogenética clínica. Al mismo tiempo numerosas sondas de ADN eran puestas al mercado promoviendo así la aplicación de la citogenética molecular en los estudios de genotoxicidad para detectar aberraciones cromosómicas inducidas tanto *in vitro* como *in vivo* por distintos agentes (Y.S. Fan, 2002).

Ahora se cuenta con nuevas técnicas desarrolladas a partir de FISH entre las que están: FISH de fibras; hibridación genómica comparada (CGH);

FISH multicolor (M-FISH); bandeo de color; cariotipo de espectro (SKY) y FISH interfásico entre otras (Y.S. Fan, 2002).

La FISH permite la detección de secuencias de ácidos nucleicos en células metafásicas, células interfásicas y tejidos con morfología preservada. La detección precisa de cambios estructurales y numéricos del cromosoma completo o regiones específicas es un importante factor predictivo y diagnóstico en enfermedades humanas. También se ha empleado en el análisis de células tumorales puesto que generalmente contienen aberraciones cromosómicas (Halling et al., 2007).

La utilización de FISH en el análisis citogenético molecular ha ganado aceptación por su facilidad de uso, no es necesaria la inducción de una división celular y la rapidez que proporciona permite que miles de células puedan ser evaluadas en un periodo corto de tiempo, incrementando así el tamaño de muestra y el valor estadístico (Eastmond et al., 1995)

Otra técnica muy empleada para evaluar el nivel de ploidía de las células es la citometría de flujo. Este método se ha establecido como un ensayo clínico en oncología y es usado ampliamente para la investigación dentro del área de la biología celular y molecular. En la actualidad existe una variedad de técnicas para medir el contenido de DNA de acuerdo al modo de la permeabilización celular y el tipo de fluorocromo empleado. La principal ventaja del uso de esta técnica es la capacidad de analizar miles de células en pocos minutos, para lo cual es necesario contar con suficiente cantidad celular. La medición del contenido de DNA y la actividad proliferativa se ha utilizado con valor predictivo de distintos tipos de tumores. Para algunos tipos de malignidades el evaluar el estado de ploidía resulta ser un indicador más sensible del ambiente biológico en comparación con el análisis citológico o histopatológico. El análisis de citometría de flujo se ha realizado en tumores ginecológicos incluyendo ovario, endometrio y carcinoma cervical. Sin embargo los resultados obtenidos son controversiales, pues aunque en algunos estudios se evidencia la utilidad de esta técnica para la medición del contenido de DNA, en otros como los realizados en adenocarcinoma de cérvix concluyen que esta técnica no sirve como indicador diagnóstico para determinar el riesgo de esta enfermedad, ya que la resolución en un análisis de contenido de DNA no es tan sensible como

para revelar cambios a nivel de un solo cromosoma (Melamed et al., 1990; Magtibay et al., 1999).

Epidemiología del cáncer cervicouterino

El impacto del CaCU en el mundo es importante, siendo la segunda causa de muerte en la mujer constituye un problema importante de salud pública. Las estadísticas reportadas para el 2002 muestran una incidencia de 500 000 nuevos casos de CaCU y 275 000 muertes a consecuencia de este mal, a nivel mundial (Parkin et al., 2005). Alrededor del 80% de los casos se presentan en países en vías de desarrollo, donde son detectados en estadios muy avanzados debido a la falta o ineficacia, de programas de detección oportuna (Alonso de Ruiz, 2000). Para este mismo año, en México se presentaron cerca de 12 000 nuevos casos de CaCU, y el 46%, es decir, 5700 terminaron en muerte. El cáncer cervicouterino junto con el de mama son las dos primeras causas de muerte por cáncer en las mujeres mexicanas. Se estima que la edad que tienen las mujeres que padecen este mal oscila entre 40 y 50 años. Pero en los últimos años se ha vuelto más común entre mujeres más jóvenes (Ferlay et al., 2002).

Historia natural del cáncer cervicouterino

La historia natural del CaCU se ha estudiado ampliamente y se sabe que presenta una evolución larga, que inicia con los cambios en el epitelio cervical (displasias) que de manera gradual a través de muchos años va aumentando y se transforma de lesiones premalignas en un cáncer invasor. Se ha visto que estos cambios están relacionados con la infección del VPH. Se sabe que más del 70% de las mujeres sexualmente activas adquieren una infección por este virus. Es muy importante resaltar que la mayoría son transitorias y solo 25% desarrolla en una lesión intraepitelial de bajo grado (LIBG). Después solo el 20 al 40% de estas, progresan a lesión intraepitelial de alto grado (LIAG). De las mujeres que en algún momento se infectan con VPH, solo alrededor del 5% desarrollarán una LIAG; mientras que cerca del 90% de las mujeres infectadas no mostrarán evidencia del VPH adquirido de 1 a 3 años. (Shiffman et al., 1995, 2007; Muñoz et al., 2006).

Cáncer cervicouterino y alteraciones cromosómicas

Estudios citogenéticos de tumores primarios cervicales han mostrado cambios estructurales que involucran los cromosoma 1, 4, 5, 11 y 17. (Sreekantiah, 1987; Atkin, 1990 en Srivatsan et al., 2002). Mediante estudios de CGH (por sus siglas en inglés: Comparative Genomic Hybridization) de tumores cervicales se identificó la ganancia del cromosoma 3q como un evento recurrente en tumores invasivos y además la pérdida de los fragmentos 2q, 3p, 6q, 8p, 11q y 13q en la progresión de tumores invasivos a estadios más avanzados (Heselmeyer, 1996 y Allen, 2000 en Srivatsan, 2002). También se han revelado alteraciones numéricas comunes de los cromosomas 1, 3, 11 y 17 (Southern & Herrington, 1997). De igual manera los cromosomas 3, 8, 17 y X en distintos tipos de lesiones precursoras de cáncer (Mark et al., 1999 y Mian et al., 1999).

Virus de Papiloma Humano

El virus de Papiloma Humano (VPH) pertenece a la familia Papillomaviridae, un grupo muy diverso de virus que se encuentran en más de 20 especies de mamíferos, reptiles y aves. Debido a su importancia médica se han realizado extensos estudios que han identificado más de 100 genotipos distintos. (Doorbar, 2005).

VPH de alto y bajo riesgo

Los tipos de VPH que se encuentran de manera frecuente en cáncer cervicouterino, así como otros tipos de cáncer anogenitales, han sido designados como tipos de alto riesgo. Mientras que los virus encontrados en verrugas genitales y lesiones no malignas fueron identificados como de bajo riesgo (Muñoz et al., 2006). Se ha demostrado que sólo las oncoproteínas E6 y E7 de los tipos de alto riesgo fueron capaces de inmortalizar células humanas en cultivo e intervenir en el funcionamiento normal del ciclo celular (zur Hausen, 2002).

Riesgo oncogénico	Tipo de VPH
Bajo riesgo	6, 11,13,40,42,43,44,54,61,70,72,81,89
Alto riesgo	16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59

Tabla 1. Clasificación epidemiológica de los tipos de VPH

Los tipos de alto riesgo, en particular el VPH 16, está ampliamente distribuido en la población humana. La infección es transmitida por contacto sexual que con el tiempo puede llegar a transformarse en una lesión en las mujeres. La mayoría de estas lesiones son resueltas en poco tiempo, debido a la respuesta inmunológica del hospedero. Y solo una pequeña proporción persiste, progresando a una lesión conocida como de alto grado, que si no es tratada clínicamente puede desarrollar en cáncer de cérvix (zur Hausen, 2002; Schiffman, 2003).

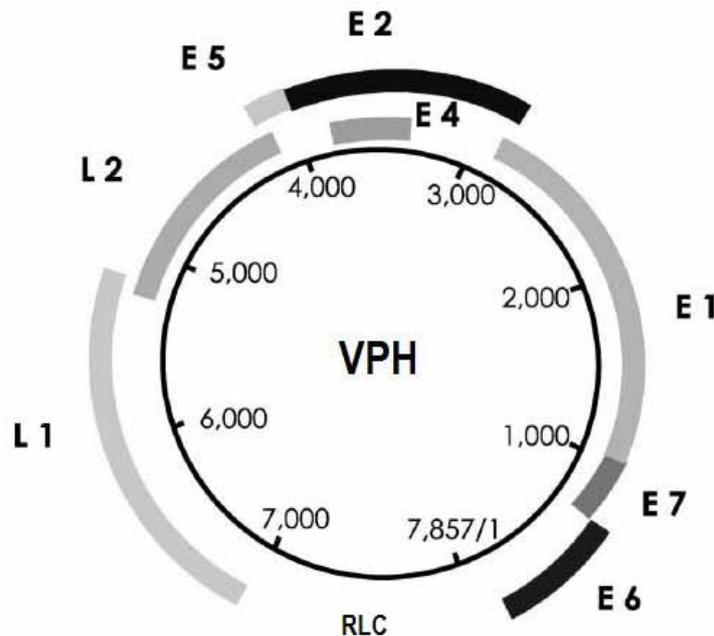


Fig.2 Representación esquemática del genoma de VPH, mostrando el arreglo de los genes de expresión temprana (Early:E), los genes de expresión tardía (Late:L) y la Región Larga de Control (RLC). (Tomado de Muñoz et al., 2006).

Genoma del VPH

El genoma del VPH consiste en una molécula de DNA circular de doble cadena, aproximadamente de 8 Kb. Se divide en tres regiones: la región larga de control o LCR (Long Control Region) que no contiene marco de lectura, pero tiene numerosos elementos que regulan la expresión génica y la replicación

viral, la región que corresponde a las proteínas de expresión temprana (E1 a E7) y la región que corresponde a las proteínas de expresión tardía (L1 y L2). (zur Hausen,1996).

La proteína E6 tiene un potencial oncogénico débil en algunas líneas celulares y coopera con E7 para plena capacidad transformante e inmortalizante. E6 es una de las que se expresan muy tempranamente durante la infección por VPH (Mantovani et al., 2001). Esto le confiere varias funciones que alteran el ambiente celular, como el bloqueo de la apoptosis mediante la degradación de p53, la alteración de la transcripción de genes celulares e incremento de la vida celular por la sobreactivación de la telomerasa (Snijders et al., 2006). La acción clave de E6 de los VPH de alto riesgo es inhibir la función de p53, una proteína supresora de tumores, mediante su degradación por la vía de ubiquitinización (Hengstermann, et al., 2001) Para ello E6 requiere a la proteína celular asociada a E6 (E6-AP). Esta proteína reemplaza a Mdm2, que en células normales no infectadas es quien degrada a p53. Este cambio reduce dramáticamente la vida media de p53 y el nivel de proteína en las células de CaCU a menos de la mitad del nivel presente en las células normales. La mayoría de las proteínas E6 de los VPH de bajo riesgo no se unen a p53 o lo hacen tan débilmente que no lo degradan (Hengstenmann et al., 2001).

E6 también puede retener a p53 en el citoplasma bloqueando su translocación al núcleo y de esta manera se inhibe su función independiente de su degradación (Mantovani, 1999). En consecuencia E6 inhibe la capacidad de p53 para activar o reprimir la actividad de genes blanco. E6 puede superar la apoptosis dependiente e independientemente de p53, ya que se ha visto que interactúa con Bak, una proteína proapoptótica que se expresa en altos niveles en las capas superiores del epitelio en diferenciación (Krajewski et al, 1996). El decremento de p53, que se daría por la proliferación inducida por el VPH, así como la consecuente inducción de apoptosis, probablemente mataría a la célula infectada por el VPH antes de que la replicación ocurriera. Por tanto la modulación de los niveles de P53 por parte de E6 es importante para la infección productiva (Saavedra & Lizano, 2006).

La proteína E7 tiene la mayor capacidad transformante y actúa mediante la unión a proteínas celulares supresoras de tumores de la familia pRB, que a su vez interactúa con familias de factores de transcripción de la familia E2F. La familia de pRB controla la replicación celular (Boyer, et al., 1996). La unión de E7 a la forma activa de pRB lleva a la liberación de los factores de transcripción E2F independientemente de la presencia de otros factores de crecimiento, esto promueve el progreso de la fase S del ciclo celular. También se asocia con otras proteínas tales como desacetilasas de histonas, AP1 e inhibidores de los complejos CDK, como p21 y p27 (Ueno, et al., 2006).

E5 es una proteína de membrana que se halla en retículo endoplásmico y aparato de Golgi, así como en la membrana citoplasmática (Burkhart, et al., 1989; Sparkowski, et al., 1995). Tiene como función principal, formar complejos y promover la actividad de los receptores de los factores de crecimiento (Hwang, et al, 1995). Existen reportes donde se ha probado que participa en la acidificación de los endosomas, regulando así el reconocimiento inmune de los queratinocitos infectados, interrumpiendo la función de las proteínas MCH clase II (Benye, et al., 2003).

Por otro lado, E1 es una helicasa hexamérica que funciona con ATP, participa en la replicación del DNA viral. La unión de E1 a la Región Larga de Control (RLC) depende de su asociación con la proteína viral E2, la cual aumenta la especificidad de E1 por su secuencia y también su capacidad para desenrollar la doble hélice (Wilson et al., 2002). E2 está organizada en tres diferentes dominios y tiene como función regular la transcripción y la replicación del DNA viral. También tiene una función antiproliferativa, puede reprimir el crecimiento e inducir apoptosis, en parte mediante la represión de la transcripción de E6 y E7 (Hedge, 2002). E4 está contenida dentro del marco de lectura de E2 y causa un colapso de las queratinas de los filamentos intermedios del citoplasma, lo cual se ha relacionado con la liberación de los viriones. Además puede expresarse junto con E1 y E2 durante la infección, el hecho de que E2 y E4 puedan inhibir el ciclo celular, sugiere que cooperan durante el ciclo viral (Deborah et al., 2002).

Recientemente se ha descrito una proteína que es resultado de la fusión de la proteína E2 con el producto del gen de E8. Esta nueva proteína tiene la capacidad de reprimir la replicación viral, así como la transcripción, por lo que

se cree que es importante para el mantenimiento del estado latente observado en las células basales del epitelio infectado (Stubenrauch & Zobel, 2001).

Ciclo viral en epitelios

El VPH infecta al epitelio en sus capas basales cuando penetra a través de una microlesión que ya existe en el tejido del cérvix. Se sabe que para los VPH de alto riesgo como lo es el tipo 16, la generación de lesiones cervicales se facilita por que infectan células columnares, las cuales después formarán la capa basal del epitelio estratificado de la zona de transformación. Aún no se ha logrado identificar si existe algún receptor que facilite la entrada del virus, sin embargo, existen estudios que proponen al complejo $\alpha 6\text{-}\beta 4$ integrina como posible candidato. (Evander et al., 1997), también se sabe que la presencia de los proteoglicanos de sulfato de heparina que se encuentran en la membrana plasmática, desempeñan un rol importante en la entrada del virus (Giroglou et al, 2001)

Por endocitosis de vesículas de clatrina se lleva a cabo la internalización del virus (Day, et al., 2003) y el desensamble del virión puede ser a través del rompimiento de los enlaces disulfuro de la cápside, debido al ambiente reductor de la célula, lo que permitiría la liberación del DNA y su transporte al núcleo (Li, et al,1998). En las células basales mantienen su genoma en un número muy bajo de copias con la expresión de las proteínas E1 y E2 (Wilson, et al., 2002) esto facilita la segregación de los genomas durante la división celular. La infección inicial es seguida por una fase proliferativa que conduce al aumento del número de células basales que contienen el genoma viral, lo que requiere la expresión de las proteínas E6 y E7 que estimulan el progreso del ciclo celular de G1 a S. Dicha expresión, bajo el control del promotor temprano en la RLC, evita que la células basales interrumpan el ciclo celular una vez que migran al estrato suprabasal del epitelio, por lo que retardan la diferenciación y promueven la proliferación mediante su interacción con proteínas celulares que regulan el ciclo celular (Sherman, et al, 1997).

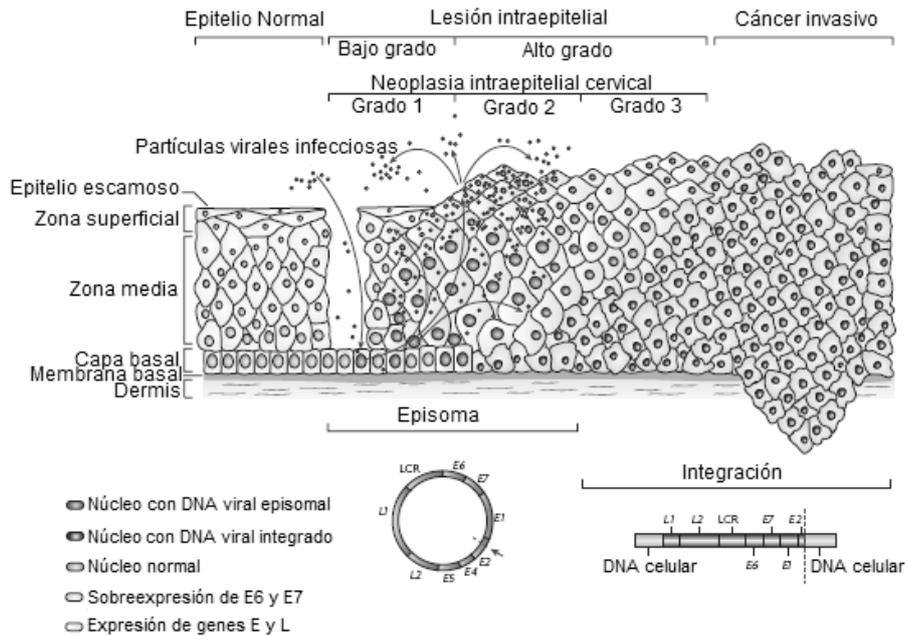


Fig.3 Ciclo de infección del VPH en el epitelio escamoso del cérvix uterino. (Tomado de Woodman et al., 2007).

Para que se produzcan más virus, el VPH debe amplificar su genoma y empaquetarlo. Esto sucede en las capas superficiales del epitelio, en donde la actividad transcripcional del promotor aumenta con la diferenciación. El ensamble ocurre en el estrato granuloso del epitelio y las células infectadas se descaman de la capa superior de este. El virus es estable fuera de la célula, pues resiste la desecación y puede ser transmitido. Aunque las células infectadas pueden permanecer en el ambiente antes de que el virus sea transmitido a otro epitelio (Fig.3). El VPH no tiene un ciclo lítico y se ha sugerido que la proteína E4 contribuye a la salida del virus a través de las capas superficiales mediante el rompimiento de complejos de queratina (Doorbar, 2005).

Inestabilidad Cromosómica y VPH

La inestabilidad cromosómica a través de la pérdida o ganancia de cromosomas enteros o fragmentos es un evento muy común en líneas celulares inmortalizadas (Solinas-Toldo, et al 1997). Las lesiones clínicas son aneuploides aún en estadios iniciales o no invasivos (Bulten, et al, 1998; Steinbeck, 1997). El desarrollo de la aneuploidía está relacionado claramente a la presencia de VPH de alto riesgo y a su ausencia en lesiones causadas por

VPH de bajo riesgo (Fu et al, 1981). Hay reportes que indican que lesiones cervicales aneuploides asociadas al VPH están precedidas por un estadio intermediario tetraploide inestable (Southern, et al, 1997). Las lesiones intraepiteliales aneuploides presentan un mayor riesgo para desarrollar en cáncer, lo que demuestra la importancia de la inestabilidad cromosómica en el cáncer cervicouterino (Kashyap & Das, 1998). Existe evidencia que sugiere que las oncoproteínas E6 y E7 de los VPH de alto riesgo contribuyen directamente al desarrollo de inestabilidad genómica, sin embargo los mecanismos se siguen estudiando (Duensing & Münger, 2002). No obstante, se sabe que E6 y E7 interactúan con los reguladores críticos del ciclo celular de las células huésped. E7 se une y degrada a pRB (Boyer et al, 1996) inactivando así a p21 (Jones, et al., 1997) y p27 (Zerfass-Thome, et al., 1996), como consecuencia el factor de transcripción E2F se activa y promueve la expresión de genes necesarios para la entrada y progreso de la fase S. La ciclina E (Martin, et al., 1998) y ciclina A (Schulze et al., 1998), así como cdc25 (Katich, et al., 2001), los cuales regulan positivamente a cdk2, son expresados, anormalmente, en células que presentan E7 de VPH de alto riesgo (Zerfass, et al, 1995). E6 tiene un papel cooperativo, interactuando con p53 e induciendo su degradación vía proteosoma. La función de E6 involucra su interacción con una ubiquitina ligasa de la célula huésped E6-AP (Scheffner et al., 1993). De tal manera que los niveles de p53 son extremadamente bajos. Cabe mencionar que p53 tiene un papel crucial en garantizar la integridad del genoma, ya que funciona como checkpoint durante el ciclo celular, deteniéndolo cuando la célula presenta anomalías como un contenido tetraploide de DNA (Tomasino, et al., 2003;). A la falta de p53 se le atribuye la acumulación de daños en la célula como centrosomas múltiples (Duensing & Münger, 2002). Otro estudio ha reportado que falta de p53 regula la expresión de Plk1, una proteína cinasa que participa de manera importante en la modulación de la mitosis, de tal manera que altos niveles de Plk1 inducen la formación de tetraploidía en células que expresan E6/E7 de VPH de alto riesgo (Incassati, et al., 2006)(Fig4).

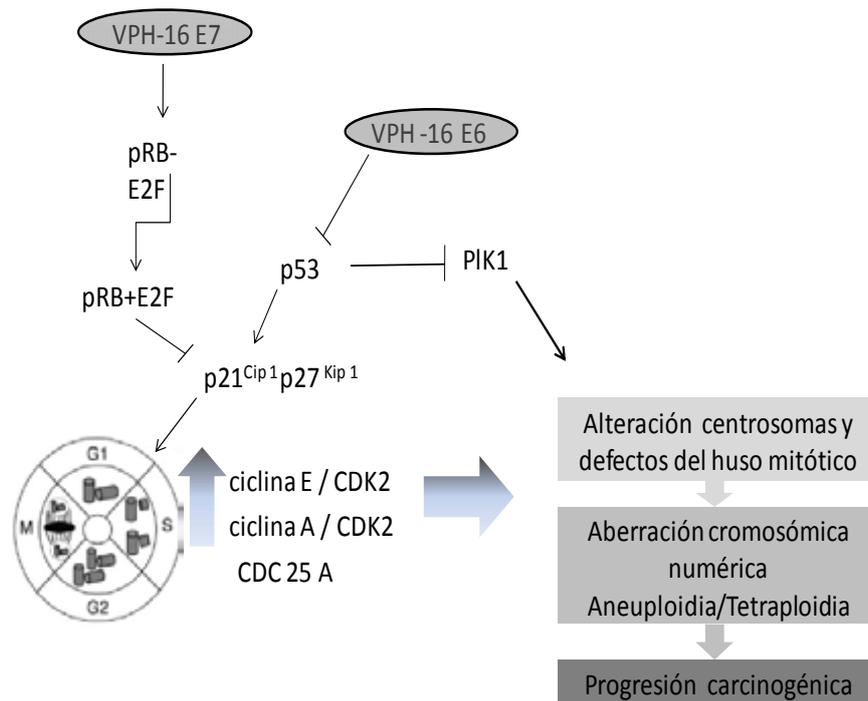


Fig.4 Mecanismos de inestabilidad cromosómica inducidos por la infección de VPH.
(Modificado de Duensing & Münger, 2002).

Clasificación de los VPH

El gen L1 es la región genómica más conservada, por lo que ha sido empleada para identificar nuevos tipos de virus. Se reconoce a un nuevo tipo viral si la secuencia de nucleótidos del gen L1 es diferente por más del 10% que de la del tipo viral más cercano conocido. Las diferencias del 2 al 10% definen un subtipo viral, mientras que las menores al 2% a una variante (Favre., et al, 1975; de Villiers, et al., 2004).

Otros factores de riesgo

Una observación importante es que la mayoría de las mujeres infectadas con VPH no evolucionan a cáncer, lo cual sugiere que existen otros factores que influyen en el desarrollo. Los agentes etiológicos asociados al riesgo de desarrollar cáncer son el número de parejas sexuales, el tabaquismo, el uso de anticonceptivos orales, así como la infección con VIH. Las evidencias con respecto al tabaquismo surgieron a finales de los 70 y estudios posteriores han apoyado esta idea, identificando este hábito como factor de riesgo. Existen

reportes donde se han identificado componentes del humo del cigarro en la mucosa del cérvix y se ha visto que estos pueden incrementar el número de aductos de DNA de fumadores y no fumadores. Aun no se tiene claro el mecanismo por el cual el humo del cigarro influye en la carcinogénesis cervical (Melikian, 1999 y Simons, 1995). Por otro lado, datos epidemiológicos indican que el uso de anticonceptivos orales incrementa el riesgo a desarrollar cáncer cervicouterino. El mecanismo propuesto está asociado a la infección de VPH. La región reguladora de la transcripción del VPH contiene elementos de respuesta a glucocorticoides los cuales son activados por las hormonas esteroideas de los anticonceptivos. Se ha identificado que la unión de la progesterona a estos elementos aumenta la cantidad de las oncoproteínas E6 y E7 directamente relacionadas con la transformación (Muñoz et al., 2006).

Sistemas de clasificación citológica

La clasificación citopatológica de las lesiones precursoras ha resultado un tanto compleja, por lo que se han propuesto distintas clasificaciones aunque ninguna es universalmente aceptada. Las distintas clasificaciones llegan a tomar significado dependiendo de quién las emplee, así llega a ser distinta para un clínico, un citólogo, histopatólogo, colposcopista o un oncólogo.

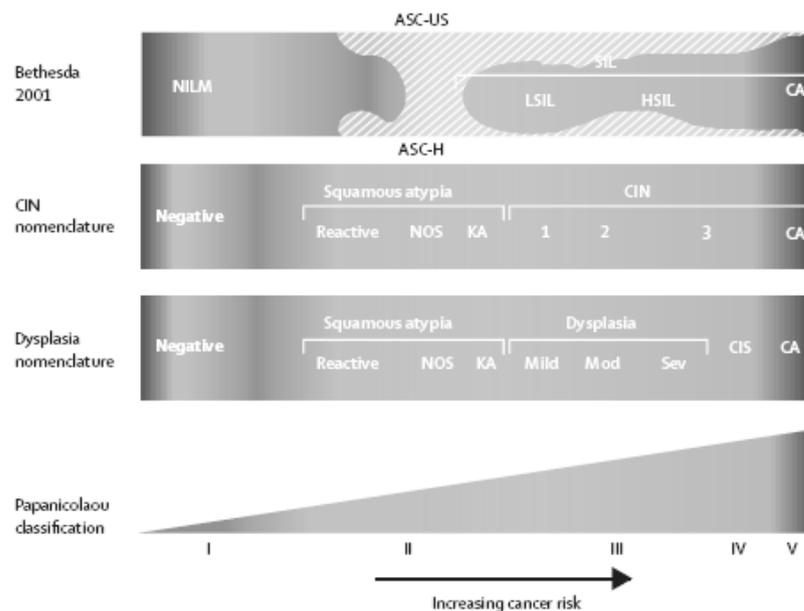


Fig. 5. Diferentes sistemas de clasificación citológica, tomado de Schiffman et al., 2007)

Clasificación de Papanicolaou

Esta clasificación exitosamente diseñada por el Doctor G.N. Papanicolaou y Traut en 1941, originalmente abarca cinco clases que ubican los cambios morfológicos celulares para detectar el cáncer.

Las cinco clases se enuncian en números romanos y correspondían a:

- I. Hallazgos celulares esencialmente normales
- II. Cambios celulares diversos, compatibles con alteraciones tipo inflamatorio
- III. Cambios celulares inciertos, algunos correspondientes a alteraciones inflamatorias y cambios regenerativos sin incluir células con cáncer.
- IV. Células con cambios iniciales de cáncer como cáncer *in situ*.
- V. Células con cambios indudables de cáncer.

Desafortunadamente este sistema de clasificación ha sido abusado y malinterpretado y la clasificación original se ha modificado de acuerdo al criterio de cada patólogo (Alonso de Ruiz et al., 2000).

Clasificación descriptiva

Los términos de medio, moderado y displasia severa utilizados en la clasificación histológica, dieron la falsa impresión de que la lesión cervical necesariamente tenía que pasar sucesivamente por todos los estadios de severidad antes de invadir el estroma (Naylor, 1988). Por otra parte los patólogos no llegaban a un acuerdo para diferenciar entre los estadios. Además con el tiempo y el conocimiento del progreso de las lesiones precursoras de cáncer, surgió la necesidad de contar con otro tipo de nomenclaturas que tuvieran un mayor grado de reproducibilidad entre los observadores. Debido a esto surgieron otras clasificaciones más populares para los clínicos: el sistema NIC y el Bethesda, basados en datos morfológicos de la histopatología, los cuales fueron reconocido por la OMS (Zuher, 1996).

Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC)

En este sistema las lesiones presentan distintos estadios. Comprende tres etapas (I al III) dependiendo del grado de anormalidad celular: NIC I equivalente a displasia media; NIC II displasia moderada; NIC III displasia severa y/o cáncer *in situ*. Con esta clasificación se eliminó el problema de diferenciar una displasia severa inicial de un carcinoma *in situ*, ya que ambos son tratados clínicamente de la misma manera (Alonso de Ruiz, et al., 1981). Sin embargo el problema de este sistema está en que continúa la dificultad para diferenciar entre los tres estadios y de nuevo como en la clasificación del Papanicolaou se cae en la indecisión. Con el tiempo se logró observar que esta clasificación carece de valor predictivo y las lesiones producidas por la infección de virus de papiloma humano no eran tan acertadas con el uso de este sistema, por lo que se propuso otro sistema que incluyera no sólo los cambios producidos por el virus de papiloma humano sino también que identificara los cambios morfológicos que se presentan durante la evolución de la lesión y de manera fundamental la evaluación de la muestra (Zuher, 1996).

Sistema Bethesda

El sistema Bethesda incluye dos categorías generales, con el propósito de que el diagnóstico sea más objetivo. Evalúa y diagnostica un estudio citológico ginecológico. Tiene sus orígenes en el Instituto Nacional del Cáncer de Bethesda, Maryland, en 1998 y se han ido perfeccionando los criterios para identificar las lesiones y emitir un diagnóstico reproducible en todos niveles. La clasificación del sistema Bethesda 2001 contiene los siguientes niveles:

1. Negativo para lesión intraepitelial o malignidad, esta categoría se utiliza cuando no hay evidencia de neoplasia, sin importar la infección por microorganismos y cambios reactivos como los que se asocian con inflamación, atrofia, DIU y otros.
2. Anomalías en células epiteliales
 - i. en células escamosas
 - Células escamosas atípicas (ASC)
 - de significado indeterminado(ASC-US)
 - no puede excluirse una HGSIL(ASC-H)

- Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LIBG): incluye la infección productiva de VPH y la displasia leve.
 - Lesión intraepitelial escamosa de alto grado (LIAG): comprende la displasia moderada y severa, NIC II Y III., características sugestivas de invasión y carcinoma epidermoide.
- ii. en células glandulares
- células glandulares atípicas
 - células atípicas sugestivas de neoplasia
 - adenocarcinoma endocervical in situ
 - adenocarcinoma

(Solomon, et al., 2002)

Otras neoplasias malignas que se deben especificar.

Células escamosas de significado indeterminado ASC-US son las siglas de Atypical Squamous Cell of Undetermined Significance. El término fue introducido para categorizar diagnósticos por exclusión. Son cambios que pueden deberse a procesos benignos pero intensos o bien a algún proceso maligno, por lo tanto como no pueden ser clasificados con plena certeza, son interpretados como de significado incierto o indeterminado (Solomon, et al., 1998). Esta categoría no es reproducible y algunos autores piensan que es más bien una invención norteamericana como parte de una práctica citológica defensiva para evitar, en la medida de lo posible tener falsos negativos que pueden llevar a acciones legales. Sin embargo se ha comprobado que 10-20 % de los AS-CUS son en realidad lesiones intraepiteliales, incluso de alto grado, que no se han logrado evidenciar en el extendido citológico. Esto se ha contemplado ya en la reunión de Bethesda 2001, en la que el término ASC-US se define como una alteración citológica sugestiva de una lesión intraepitelial pero cualitativa y cuantitativamente insuficientes para una interpretación definitiva. Es decir, se reserva el término para aquellos diagnósticos en los que exista sospecha de una lesión intraepitelial (Lacruz, 2003).

Cambios inflamatorios

Las infecciones, así como la acción de algunos agentes físicos como la cauterización, criocirugía, radiaciones, toma de biopsias, colocación de dispositivos intrauterinos provocan una respuesta local en los tejidos vascularizados del cuello uterino, que es la inflamación (Hanselmann & Oberringer, 2001).

Estos cambios inflamatorios se presentan como un aumento del estroma vascularizado, con apariencia de numerosos vasos capilares, gran exudación de líquidos, así como la aparición de células inflamatorias (neutrófilos, macrófagos, linfocitos, eosinófilos y células plasmáticas). Estos cambios pueden ser leves o intensos dependiendo del tipo de agregación causal, fundamentalmente cuando se presentan a consecuencia de una infección bacteriana y de la virulencia del microorganismo. Desde el punto de vista citogenético, existen trabajos que demuestran un incremento significativo en la frecuencia de células poliploides y aneuploides en tejidos con procesos inflamatorios como bronquios (Lothschütz et al., 2002) e hígado (Toyoda et al., 2005).

Asimismo durante la inflamación se observan procesos de regeneración tisular. Este proceso es variado y dependerá de la fase en la que se encuentre el fenómeno de regeneración. Así pueden aparecer todas las facetas del ciclo celular. Tenjin y cols. (en Alonso et al, 2000) así como Oberringer et al. (1999) encontraron que los núcleos con cambios regenerativos pueden tener ADN diploide, triploide y tetraploide, pero casi nunca aneuploide (Alonso et al., 2000;).

Diagnóstico y tratamiento del CaCu

La detección temprana y el tratamiento adecuado del VPH y las lesiones premalignas previenen la progresión a cáncer. Los principales métodos de diagnóstico han sido los métodos citológicos como el Papanicolaou, la histopatología y la colposcopia. Esta última es una inspección basada en la magnificación de la zona de transformación del cérvix en donde suelen presentarse anomalías. Actualmente se están implementando métodos moleculares para la detección del VPH. Las pacientes con resultados de Papanicolaou anormal, pero que no tienen una lesión premaligna son

evaluadas mediante un examen colposcópico, así como por toma de biopsia. Si la colposcopía es considerada inadecuada, se recomienda la realización de un cono cervical (Saavedra & Lizano, 2006).

La conización cervical es el tratamiento de elección para las lesiones premalignas no invasivas. Se puede llevar a cabo por distintos métodos, como la remoción mediante asa electro quirúrgica, láser o criocirugía. La elección del método depende del tamaño de la lesión, el tamaño de la zona de transformación y la extensión de la lesión. El cáncer micro-invasivo o en etapas muy tempranas, en general tienen muchas opciones de tratamiento y se curan de manera sencilla (Aziz & Wu, 2002). Sin embargo existe el riesgo, aunque muy bajo, de que la lesión no se remueva por completo, así como de que la carga viral de los tipos de alto riesgo que permanecen infectando el epitelio promuevan un cambio transformante en el tejido.

Reparación de tejidos y expresión de PPAR β

El proceso de reparación de un tejido tiene lugar en todos los órganos del cuerpo humano. Se han descrito cuatro fases durante el mismo: hemostasis, inflamación, proliferación y remodelación. Diferentes métodos bioquímicos y biológicos han sido empleados para describir la constitución de las células y su regulación por factores de crecimiento y moléculas de adhesión en heridas que están en el proceso de sanación. Un rasgo característico de este tipo de heridas, es su habilidad para generar nuevos grupos de células como resultado de la elevada tasa proliferativa. Estudios citogenéticos han revelado que estos lotes de células presentan un estado tetraploide, a diferencia de las heridas crónicas. Lo cual sugiere que las células tetraploides pueden contribuir para una mejor reparación del tejido. Hasta ahora las células tetraploides han sido descritas en el hígado de ratón y humano, en el miocardio y la placenta cuando están en proceso de reparación (Oberringer et al., 1999). En pacientes con hepatitis aguda y cirrosis hepática, ambos ejemplos de inflamación, muestran una cantidad significativamente alta de células tetraploides en las regiones adyacentes a las zonas de inflamación (Ermis et al., 1998; Toyoda et al., 2005).

Los PPAR por sus siglas en inglés (Peroxisome Proliferator Activated Receptor) son factores de transcripción que pertenecen a una familia de

receptores nucleares de hormonas. Son los principales sensores de ácidos grasos y sus derivados. Existen tres subtipos (α , β o también conocido como δ y γ). La distribución de cada receptor es diferente, lo que sugiere que cada uno tiene una función distinta. PPAR α es expresado en una variedad de tejidos pero especialmente en riñón y en hígado en este último tiene un papel importante en la regulación de la degradación de ácidos grasos y xenobióticos. La expresión de PPAR γ es más restringida que α , pero se encuentra altamente inducido durante la diferenciación de adipocitos.

En contraste, la expresión de PPAR β se presenta en muchos tipos de tejidos. La expresión de esta proteína se localiza en el núcleo, el citoplasma, así como en la membrana de células de colon, intestino delgado, queratinocitos e hígado (Burdick, et al., 2006; Ahmed, et al., 2008; Girrior, et al., 2008). Diversos estudios demuestran que también regula el metabolismo de lípidos, la proliferación celular y la respuesta inflamatoria (Moraes et al., 2006). Otro estudio describe que el RNAm de PPAR β es altamente inducido durante la diferenciación del epitelio escamoso epidermal y traqueobronquial (Matsuura et al., 1999).

La expresión y actividad de PPAR β es fuertemente inducida por estímulos inflamatorios durante el daño epidermal. TNF α , una citocina proinflamatoria induce la transcripción del gen de PPAR β . La expresión de PPAR β es crucial para una eficiente regeneración del tejido, el rol antiapoptótico de este receptor garantiza un buen número de queratinocitos viables para la re-epitelización de la herida. Se sabe que PPAR β modula la activación de Akt1 a través de la regulación de ILK y PDK1, el resultado de la actividad incrementada de Akt1 es una elevada tasa de supervivencia de los keratinocitos, lo que puede contribuir a la regeneración del tejido. Esto, además hace de PPAR β un blanco para fármacos que tienen como fin ayudar a la curación de heridas y reparación de tejidos (Di-Poï et al., 2002 y Tan et al., 2004; Michalik et al., 2007).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El CaCU es un problema de salud pública que afecta de manera importante a nuestro país, ya que está entre las primeras causas de mortalidad por cáncer en la población femenina. Existe suficiente evidencia epidemiológica y molecular que permite concluir que el Virus de Papiloma Humano (VPH), en especial los tipos de alto riesgo como el VPH 16 y 18, son el agente etiológico para este tipo de cáncer (Duensing & Münger, 2002). La progresión carcinogénica de lesiones asociadas a VPH de alto riesgo presenta un periodo de latencia muy largo, sugiriendo que cambios adicionales celulares pueden ser necesarios para la progresión del cáncer. Entre ellos, la inestabilidad genómica, frecuentemente asociada a la infección por VPH (Lengauer et al, 1998). El conocimiento de estos cambios genéticos, así como del tipo de VPH presente en la infección, podrían mejorar los métodos de diagnóstico y el desarrollo de estrategias terapéuticas más efectivas (Mullokanov et al., 1996). Estudios citogenéticos de tumores primarios cervicales han revelado alteraciones numéricas comunes de los cromosomas 3 y 17 en distintos tipos de lesiones precursoras de cáncer (Southern & Herrington, 1997; Mian et al, 1999 y Heselmeyer et al., 1996). Recientemente se demostró que la proporción de células tetraploides y aneuploides en CaCU aumenta con el grado de severidad de la lesión y también se detectó una proporción significativa de este tipo de células en muestras con diagnóstico de inflamación y ASCUS (Olaharski & Eastmond, 2004; Olaharski *et al*, 2006).

En este trabajo se pretende determinar si la presencia de alteraciones cromosómicas numéricas (tetraploidías/aneuploidías) en muestras con diagnóstico de inflamación se asocia a la infección de VPH o a procesos de reparación tisular.

HIPOTESIS

Las pacientes con el diagnóstico de inflamación y que además están infectadas con VPH de alto riesgo presentarán mayor número de células cromosómicamente desbalanceadas en comparación con las que presentan infección con VPH de bajo riesgo o no presentan infección.

OBJETIVOS

Objetivo General

Investigar si la presencia de células cromosómicamente desbalanceadas en pacientes con diagnóstico de inflamación se asocia a la infección de VPH o a procesos de reparación tisular.

Objetivos particulares

- Determinar la frecuencia de células poliploides y aneuploides mediante FISH en muestras de exfoliación cervicouterina con diagnóstico inflamatorio.
- Determinar la presencia y tipo de VPH.
- Analizar si existe una asociación entre ambos factores.
- Determinar la expresión de PPAR β como indicador de regeneración o reparación tisular.

MATERIAL Y METODOS

Población estudiada

Se estudiaron células exfoliadas cervicouterinas de 100 pacientes que acudían al Servicio de Colposcopia del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) de la Ciudad de México con diagnósticos de Inflamación. A cada una de las pacientes se les explicó el alcance del estudio solicitándoles su autorización por escrito y se les interrogó para obtener datos relevantes como: edad, condiciones socioeconómicas, dieta, hábitos de tabaquismo, alcoholismo, antecedentes familiares, número de parejas sexuales y exposición a factores confusores como tabaquismo y el uso de anticonceptivos orales. Durante su consulta se les tomó una muestra de células exfoliadas de epitelio cervicouterino con un cepillo citológico haciendo un barrido de 360°, para realizar la prueba de Papanicolaou. El tejido restante en el cepillo citológico se repartió en distintas alícuotas para realizar la prueba de FISH, tipificación de VPH y análisis de contenido de DNA en el laboratorio.

Se utilizaron los siguientes criterios:

Criterios de inclusión:

- i) Pacientes con diagnóstico de inflamación.

Criterios de exclusión:

- i) pacientes sometidos a terapia anti-cancerígena.
- ii) que presenten otro tipo de virus como Epstein-Barr, VIH y/o hepatitis.
- iii) con presencia de otro tipo de tumores.
- iv) que presenten LIBG, LIAG y Cáncer Cervicouterino.

Por otra parte, dado que la frecuencia de Papanicolaous normales es muy baja en el INCan y para obtener un grupo de células control, se tomaron muestras de epitelio bucal de individuos sin hábitos de tabaquismo.

Cabe mencionar que dentro de nuestra población muestreada, se encontraron 44 casos que habían sido tratadas con una conización cervical, debido a la presencia de una lesión de alto grado en un periodo de 2000- 2005. Es importante resaltar que en el momento que se tomo la muestra para este estudio no hubo evidencia de ningún tipo de lesión.

Procesamiento de las muestras

Las muestras se procesaron agitando el tubo para separar las células del cepillo citológico y se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 min. El pellet obtenido se separó en alícuotas distintas, una para tipificar VPH, a la cual se le agregó 500 ul de buffer de lisis y Proteinasa K (20mg/ml). Para las otras alícuotas se realizó un lavado con una solución de N-acetilcisteína como agente mucolítico al 10% en PBS, para centrifugar nuevamente a 1200 rpm durante 10 min. Por último se fijaron con una solución a 4°C de metanol- ácido acético (3:1), para FISH y con una solución a 4°C de etanol al 70% para análisis de proteínas.

Preparación de laminillas

Se colocaron 20 µl de la muestra en un portaobjetos pretratado con una solución de poli-lisina al 1% y se guardaron al menos 72 horas a -20 °C en atmósfera de Nitrógeno.

Fluorescence in Situ Hybridization (FISH)

Las muestras se trataron con Proteinasa K (0.5 µg/ml en 2X SSC (ver apéndice) por 12 min a 37 °C, se enjuagaron con 2X SSC pH 7 a temperatura ambiente por 2 min y se post-fijaron con paraformaldehído en PBS al 4% durante 18 min a 4 °C. El fijador se lavó con PBS pH 7, a temperatura ambiente por 2 min. La desnaturalización del DNA para proceder a la hibridación *in situ* se llevó a cabo con un tratamiento de 3 min con formamida al 70% en 2X SSC a una temperatura de 70°C. Posteriormente las muestras se deshidratan con una serie de soluciones de etanol al 70, 85 y 100% durante 2 min c/u y se secan las laminillas con N₂ gaseoso.

Preparación de las sondas

Se utilizaron sondas de ADN alfa satélite centroméricas para los cromosomas 3 (espectro rojo) y 17 (espectro verde) (Vysis Inc., Abbott Park, IL, USA). En un tubo Eppendorf se preparó una mezcla de hibridación adicionando 1 µl de cada sonda, 1 µl de agua desionizada y 7 µl de Mezcla Maestra (Formamida/2XSSC al 70%) (Vysis Inc.), obteniendo un volumen final de 10 µl de la mezcla para cada hibridación. Esta mezcla se desnaturaliza a una temperatura de 70 °C por 5 minutos y se agrega inmediatamente a la laminilla y se cubre la laminilla con un portaobjetos de parafilm y pegamento. Se incuban en una cámara húmeda aproximadamente 12 horas a 37 °C en la oscuridad.

Visualización de la hibridación

Pasado el tiempo de incubación se retira el parafilm de las laminillas y se da un lavado con formamida/2XSSC al 50% a 45 °C por 15 minutos, para eliminar las hibridaciones inespecíficas. Posteriormente se lava con 2X SSC durante 1 min. La preparación se contrasta con 15 µl de DAPI/Antifade, se coloca un cubreobjetos para observar al microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse E 400 con filtro de triple banda, Nikon, Tokio, Japón), el cual permite detectar hasta tres fluorocromos simultáneamente.

Análisis al Microscopio

El análisis se realizó con un ocular de 10X y un objetivo 100X. Se cuantificaron el número de marcas observadas para cada uno de los cromosomas, en un total de 1000 células consecutivas por cada caso. De tal manera que se reportan el número de células con 0, 1, 2, 3, 4, y 5 o más marcas para cada cromosoma. La hibridación in situ se consideró eficiente si el porcentaje de los núcleos sin marca no excedía el 2% del total de células analizadas. Para evitar la cuantificación de los linfocitos presentes en algunas muestras, se utilizó como criterio de diferenciación la presencia de citoplasma y núcleo con morfología conservada, además los criterios de lectura para las marcas fluorescentes se siguieron de acuerdo a Y.S. Fan, (2002).

Tipificación de VPH

Extracción y Purificación de DNA

Tanto las muestras de exudado vaginal como los raspados bucales fueron resuspendidas en 1mL de buffer de lisis y proteinasa K, se llevó a cabo en un agitador a 450 rpm durante toda la noche a 55°C. La extracción y purificación del DNA en ambos tipos de muestra se realizó con el procedimiento de fenol:cloroformo y la precipitación con etanol según lo descrito por Sambrook,1989).

Detección y tipificación de VPH

Las muestras de DNA fueron sometidas a diagnóstico de VPH. Se hizo una amplificación previa de β -globina que da un producto de 268 pb a una Tm de 55°C como lo describen Resnick y cols. (1990). Para la detección del VPH se utilizaron juegos de primers universales: MY 09/11, GP5/6 y L1C1/C2 que amplifican fragmentos de distinto tamaño de la región L1 del genoma del VPH (Resnick y cols,1990; Van den Brule y cols, 1990 y Snidjers y cols 1990). Cada reacción se llevo a cabo en un termociclador modelo 480 (Perkin Elmer) en un total de 40 ciclos, un primer ciclo de desnaturalización a 94°C durante 10 min y un ciclo final de extensión a 72°C durante 7 min; los 38 ciclos intermedios se llevaron a cabo a una Tm de 55°C para los oligonucleótidos MY 09/11 y de 48°C para GP5/6 y L1C1/C2. Las amplificaciones fueron visualizadas en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, identificando la banda esperada del tamaño obtenido. Los productos de PCR positivos se secuenciaron y las secuencias obtenidas se analizaron con el BLAST de Genbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para obtener el tipo de VPH.

Inmunocitoquímica

Después de fijar las células con p-formaldehído 2% se lavaron 3 veces con PBS 1X. Se bloquearon con BSA al 3% y se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo primario, anti PPAR β (mouse anti-PPAR β monoclonal antibody, 1:500, Chemicon, Millipore, Billerica, MA, USA) en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Posteriormente se lavan 3 veces con PBS y se incuban con el anticuerpo secundario (FITC-goat anti mouse, 1:50, Zymed, Invitrogen,

Carlsbad, CA, USA) durante 30 minutos en la cámara húmeda, en oscuridad a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se lavan de nuevo en PBS, se dejan secar y se observan al microscopio de fluorescencia utilizando el objetivo de 100x. Se analizaron un total de 100 células por cada caso.

Análisis estadísticos

El análisis de los datos se realizó para los dos cromosomas en conjunto. Se comparó el número de células tetraploides para los distintos rubros como infección y tipo de VPH, así como que hubieran recibido un tratamiento de cono o no, mediante una prueba U de Mann-Whitney, tomando como significativo cuando $p < 0.05$. El mismo procedimiento se siguió para analizar el número de células que expresaban PPAR β . Para determinar que la infección de VPH no está asociada a la inflamación se analizó mediante una tabla de contingencia, aplicando la prueba de Fisher exacta, y se considero significativo si $p < 0.05$. Para demostrar que el número de células tetraploides aumenta en proporción con el aumento de células que expresan PPAR β se realizó un análisis de correlación de Spearman, considerándolo significativo cuando $p < 0.05$. Todo el análisis estadístico se llevó cabo con el software Graph Pad InStat y Graph Pad Prisma 5 (La Jolla, CA, USA).

RESULTADOS

Tipificación de VPH

El análisis de la presencia de VPH se realizó en 97 muestras con diagnóstico inflamatorio. El resultado se interpretó como positivo solo si el DNA del VPH y de β -globina humana amplifica sin producto detectable en el control negativo (Fig. 6).

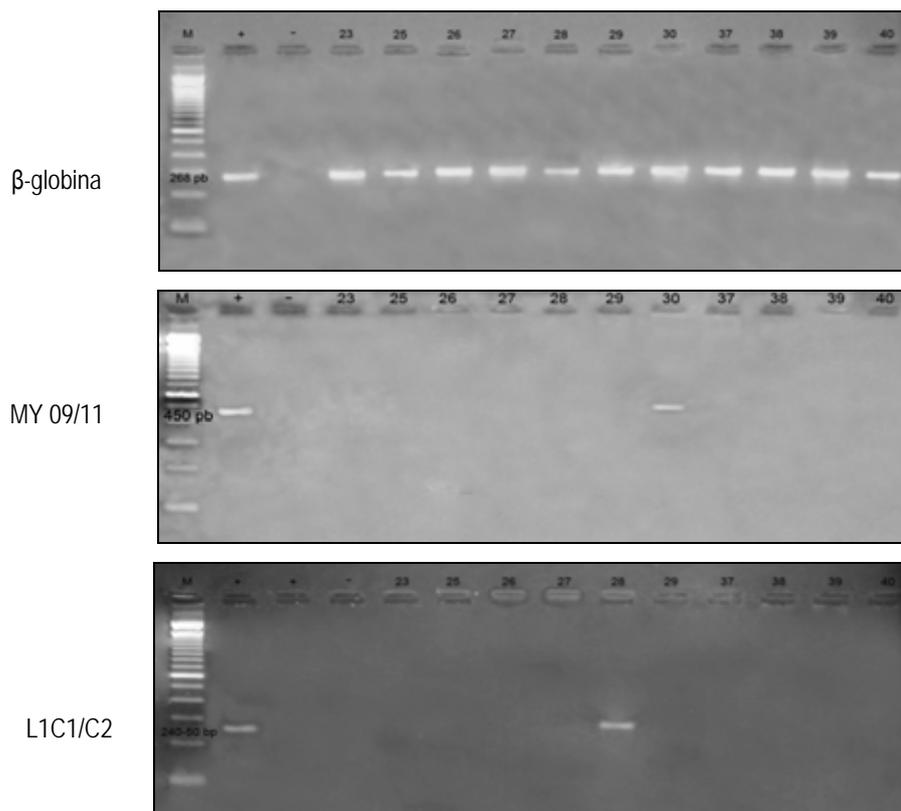


Fig 6. Imagen de la detección de DNA de VPH mediante PCR, M: marcador de peso molecular; (+): control positivo DNA células HeLa para β -globina y MY09/11 y SiHa para L1C1/C2; (-) :control negativo reacción sin DNA.

Se detectó DNA de VPH en 17 muestras, es decir, el 17.52%. Los tipos identificados por secuenciación fueron: 8 de alto riesgo (8.24%) presentando los genotipos: 35, 68, 18, 31,53 y 58. El VPH de bajo riesgo se detectó en 5.82% de las muestras siendo los tipos 84, 81,6, 61 y 89 los hallados. En tres casos se identificó el tipo de VPH, cuyos genotipos son 90, 85 y el X01 que aún no han sido clasificados si son de bajo o alto riesgo. El juego de oligos de GP5/6 no nos arrojaron resultados consistentes, razón por lo cual no se consideraron para la tipificación del VPH.

	Caso	Tipo
1	9	35 AR
2	10	68 AR
3	14	18 AR
4	15	84 BR
5	28	90 ND
6	30	31 AR
7	34	68 AR
8	44	31 AR
9	56	53 AR
10	58	81 BR
11	59	6 BR
12	64	85 ND
13	67	58 AR
14	75	61 BR
15	79	89 BR
16	83	89 BR
17	86	X01 ND

Tabla 2. Tipos de VPH presentes en casos con diagnóstico de inflamación
AR: Alto Riesgo; BR: Bajo Riesgo y ND: No Determinado

Células cromosómicamente desbalanceadas

Del total de muestras se analizaron exitosamente mediante FISH, 77 muestras con el diagnóstico de inflamación. Se consideraron células diploides aquellas que presentaron dos marcas para cada uno de los cromosomas (3 y 17), tetraploides aquellas que presentan cuatro marcas para ambos cromosomas.



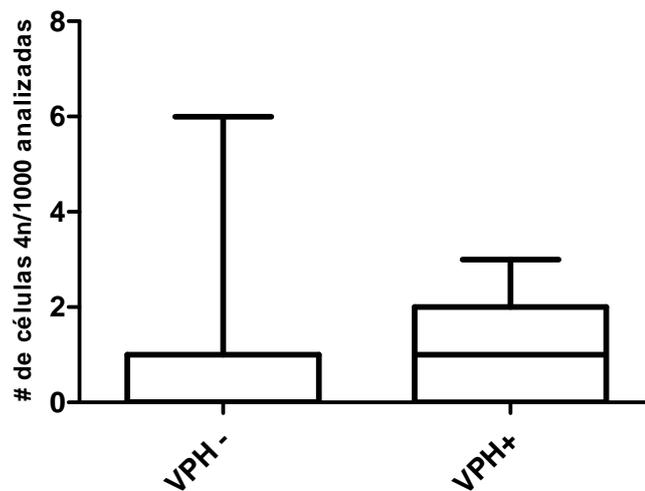
Fig. 7 Imagen de FISH muestran células : diploide (izq), tetraploide (en medio) y aneuploide (der). El cromosoma 3 corresponde a la marca roja y el cromosoma 17 a la verde.

La condición aneuploide se estableció para aquellas células que presentaban un complemento para ambos cromosomas, distinta de la diploide y tetraploide por ejemplo: tres marcas para cromosoma 3 y 2 marcas para el cromosoma 17(Fig. 7), etc.

Aberraciones numéricas e infección de VPH

Haciendo un análisis de las células que presentan un número alterado de cromosomas con respecto a la infección de VPH, se encontró una tendencia en aquellas que tienen presencia del virus, a incrementar el número de células con tetraploidías. Las células infectadas con VPH (VPH+) tienen mayor número de células tetraploides comparadas con las bucales (Tabla 2). Sin embargo no hay diferencias estadísticamente significativas entre las VPH- y VPH+ (Gráfica 1 y 2).

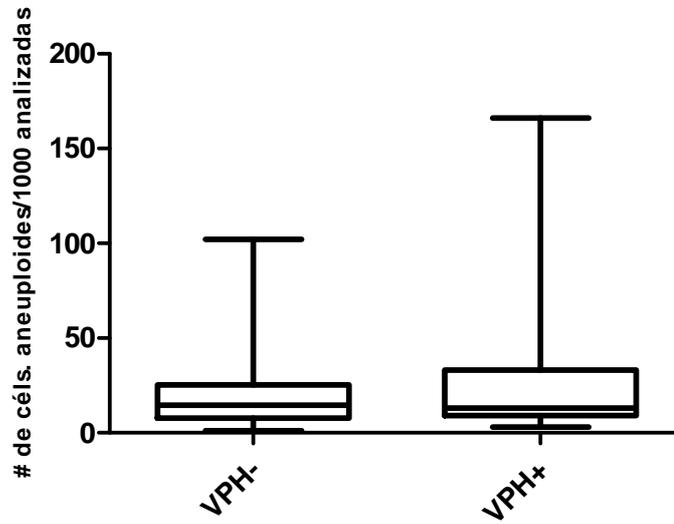
Gráfica 1. Mediana, rango intercuartil y valor de p para células tetraploides en casos de inflamación de acuerdo a su estatus de infección por VPH



Prueba de U de Mann-Whitney, $p > 0.05$

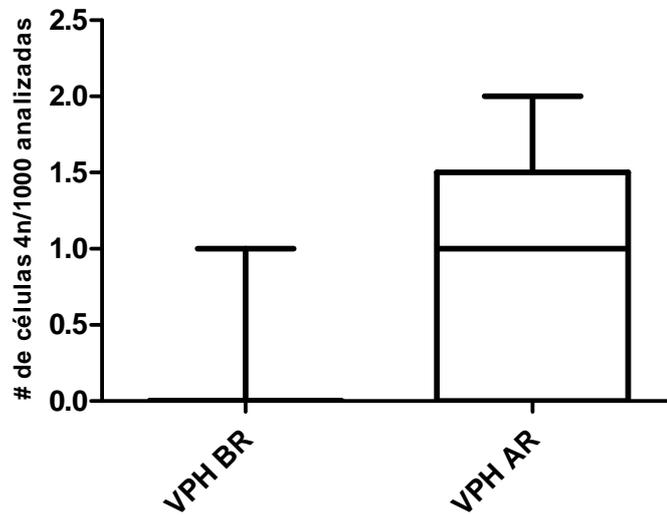
Al tomar en cuenta si el VPH es de alto o bajo riesgo, encontramos de igual manera una tendencia, es decir que los casos infectados con virus de alto riesgo presentan un incremento en el número de células tetraploides con respecto al control (células bucales) y no hay diferencias entre las aneuploides (Tabla 3), tampoco existen diferencias significativas entre las que están infectadas con VPH de bajo riesgo con las que presentan un tipo de alto riesgo (Gráficas 3 y 4).

Gráfica 2. Mediana, rango intercuartil y valor de p para células aneuploides en casos de inflamación de acuerdo a su estatus de infección por VPH



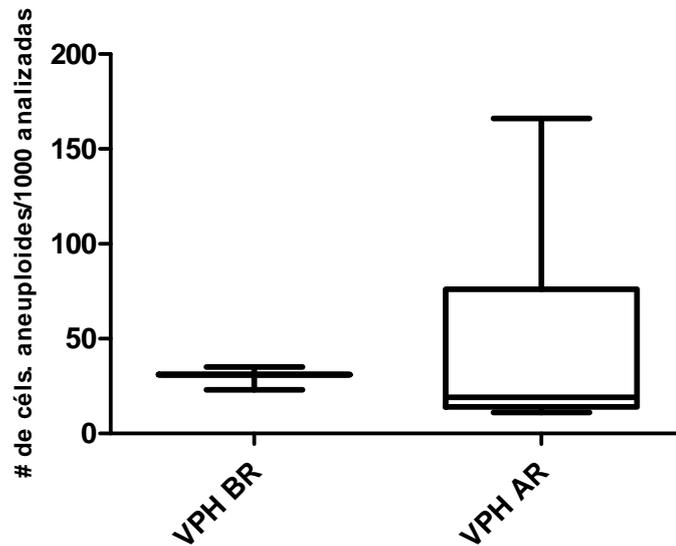
Prueba de U de Mann-Whitney, $p > 0.05$

Gráfica 3. Mediana, rango intercuartil y valor de p para las células tetraploides en casos con diagnóstico de inflamación con respecto al tipo de VPH



Prueba de U de Mann-Whitney, $p > 0.05$

Grafica 4. Mediana, rango intercuartil y valor de p para las células aneuploides en casos con diagnóstico de inflamación con respecto al tipo de VPH



Prueba de U de Mann-Whitney, $p > 0.05$

Células cromosómicamente desbalanceadas y tratamiento con cono cervical

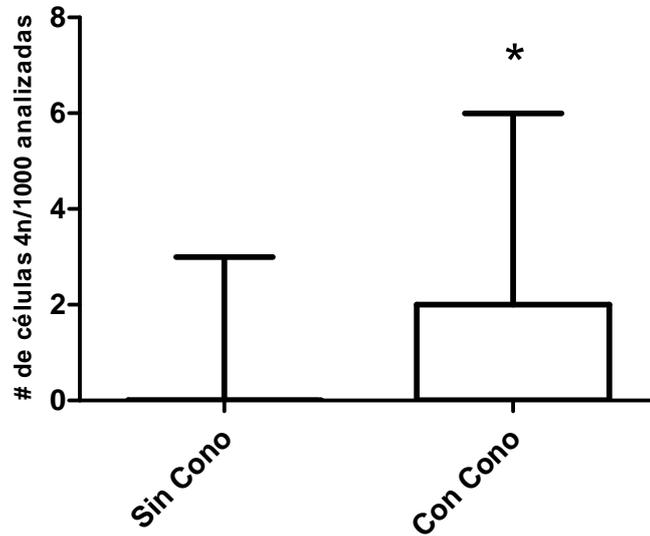
Los datos anteriores parecen sugerir que debe existir alguna otra causa que dé origen a las células tetraploides y aneuploides y no el tipo virus que está infectando el epitelio. Por lo que se decidió realizar un análisis tomando en consideración el tratamiento con cono cervical en los casos. De esta manera se halló una diferencia significativa entre el número de células con tetraploidías en los casos que habían sido tratados con un cono cervical de aquellos que no, sin embargo no ocurrió lo mismo para la aneuploides (Gráficas 5 y 6 respectivamente).

Tabla 3. Número de células con aberraciones cromosómicas numéricas

	Tetraploides				Aneuploides		
	N	Mediana	IQR	Valor de P	Mediana	IQR	Valor de P
Bucal	15	0	0-1	-----	15	6-31	-----
VPH-	62	0	0-6	0.2081	14.5	1-102	0.6848
VPH+	15	1	0-3	0.0212*	13	3-166	0.9449
VPH BR	3	0	0-1	0.5105	31	23-35	0.5342
VPH AR	9	1	0-2	0.0431*	19	11-166	0.2424

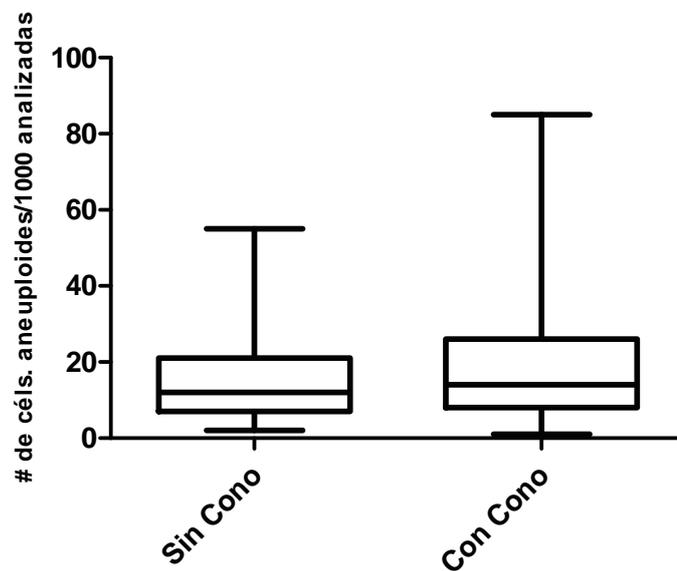
Kruskal-Wallis post- test de Dunn * $p < 0.05$ AR:Alto Riesgo, BR: Bajo Riesgo

Gráfica 5. Mediana, rango intercuartil y valor de p para las células tetraploides en casos con diagnóstico de inflamación y tratados con conización cervical



Prueba de U de Mann-Whitney * $p < 0.05$

Gráfica 6. Mediana, rango intercuartil y valor de p para las células aneuploides en casos con diagnóstico de inflamación tratados con conización cervical



Prueba de U de Mann-Whitney $p > 0.05$

Infección de VPH y cono cervical

El análisis indica que existen casos (12.28%) en los que después del tratamiento de cono cervical se detectó infección con VPH, de los cuales el

42.85% son de alto riesgo. Por otro lado, el 25% de las pacientes que no tuvieron esta cirugía, dieron positivo para infección. Mediante una prueba de Fisher ($p=0.173$), demostramos que no existe una asociación significativa entre ambos factores, o sea que el tratamiento de cono y la infección por VPH no se encontraron asociados en esta muestra.

Expresión de PPAR β

Los datos obtenidos por FISH parecen sugerir que el aumento de células tetraploides en las muestras de inflamación y tratadas con cono cervical son causadas por el proceso de regeneración de tejido al que se encuentran sometidas después de dicha intervención. Por lo que se decidió buscar la expresión de PPAR β , sobretodo por la presencia de casos en donde observamos un elevado número de células tetraploides y no hay infección por el VPH.

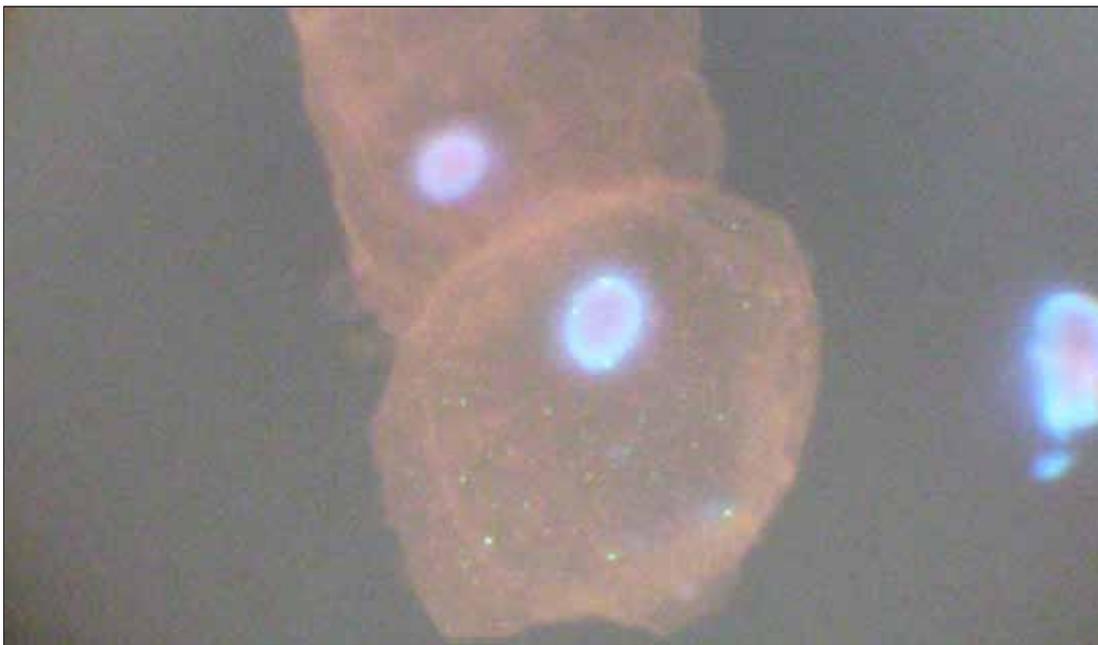
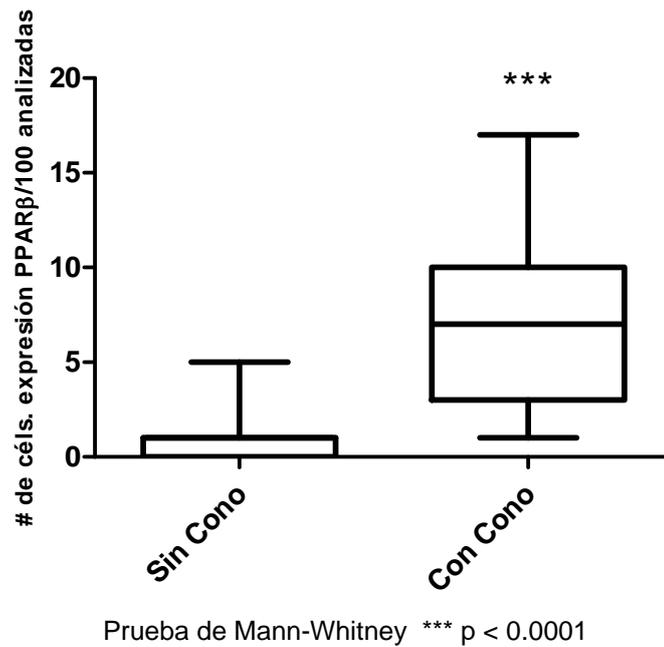


Fig. 8. Expresión de PPAR β en células de exfoliación de epitelio cervicouterino de muestras con diagnóstico de inflamación, detectada con FITC (marca verde) en microscopio de epifluorescencia 100X.

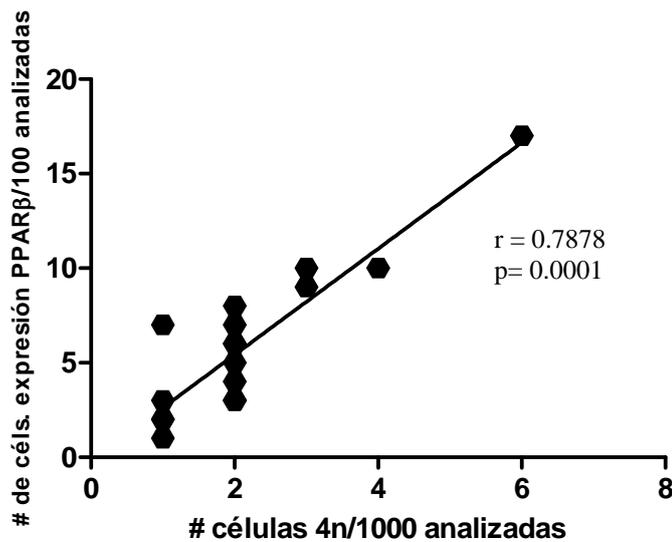
Se decidió considerar como positiva la expresión de PPAR β en aquellas muestras en donde se encontraban más del 7% de células expresando la proteína en núcleo y citoplasma (Figura 8). Se encontró que hay un mayor número de células que expresan PPAR β en las muestras de casos con cono

que en aquellas que no lo han tenido (Gráfica 7). Demostramos que hay una correlación positiva entre las células que son tetraploides y las que expresan PPAR β (Gráfica 8).

Gráfica 7. Mediana, rango intercuartil y valor de p para las células que presentan la expresión de PPAR β en casos con diagnóstico de inflamación tratadas con cono cervical



Gráfica 8. Correlación positiva entre el número de células que son tetraploides y que expresan PPAR β



DISCUSIÓN

Desde los trabajos de Bovery a principios del siglo pasado se ha descrito ampliamente que la aneuploidía es un rasgo característico de las células cancerosas (Weaver et al, 2006), sugiriendo que la formación de células aneuploides es primordial en el desarrollo de un tumor (Duesberg et al., 2001). Sin embargo, hasta estos días, son pocos los trabajos que describen la aparición de células aneuploides en las lesiones precursoras y menos aun en diagnósticos que no están claramente asociados a malignidad como lo es la inflamación. En estudios previos se pudo observar la presencia de células aneuploides en muestras de células cervicales de pacientes con diagnóstico de ASCUS, inflamación y lesiones de bajo y alto grado (Olarhaski et al. 2006). Si embargo en ese reporte no se determinó la presencia de infección por VPH en ninguna de las muestras. El propósito del presente estudio fue el de investigar la presencia de células cromosómicamente desbalanceadas en pacientes que solo tuvieran diagnóstico inflamatorio para la prueba de Papanicolau en las que se caracterizó el tipo de VPH, con la intención de evaluar su sensibilidad diagnóstica.

Es importante recordar que las pacientes que tienen un reporte inflamatorio en su prueba de Papanicolaou, son programadas para realizarles nuevos estudios citológicos en intervalos que van de 3 a 6 meses, hasta que 2 resultados consecutivos sean negativos. La paciente tiene que regresar a sus revisiones de rutina por un período de meses y a veces hasta años. De tal manera que este proceso lleva un tiempo prolongado lo cual resulta estresante y costoso para la paciente, que en muchos de los casos abandona el seguimiento (Writh et al, 2002).

Se ha documentado la alteración de cromosomas 3 y 17 en cáncer cervicouterino así como en lesiones precursoras, en particular la ganancia del cromosoma 3 y la pérdida del cromosoma 17 (Heselmeyer et al.,1996; Southern & Herrington 1997; Mark et al., 1999; Mian et al., 1999; Herrington et al., 2001; Srivatsan et al., 2002 y Olarhaski et al., 2006). En este estudio se investigó la presencia de dichas alteraciones pero en casos con diagnóstico de inflamación, lo cual ayudaría a mejorar el diagnóstico.

Nuestros resultados indican que el proceso de inestabilidad cromosómica (formación de células aneuploides y tetraploides) se manifiesta también en muestras con diagnóstico de inflamación confirmando así los hallazgos previos (Gutiérrez, 2004; Olarhaski, 2004 y 2006) y corroborando la importancia diagnóstica de este tipo de ensayos.

Por otra parte se ha descrito muy bien que el VPH es el agente etiológico del CaCU, en particular los tipos denominados de alto riesgo, pues se ha identificado que las oncoproteínas virales E6 y E7 son capaces de alterar proteínas reguladoras del ciclo celular como p53 y RB, respectivamente (Di Leonardo et al, 1997). Aberraciones en el número de centrosomas se han visto implicadas en la formación de células aneuploides y tumorigénesis (Meraldi et al, 2002). Se conoce que E7 conduce a errores en la duplicación de centrosomas, a través de la desregulación de cdk2, en células fenotípicamente normales (Duensing & Munger, 2002). Reportes previos han identificado la formación de células tetraploides en epitelio cervical asociado a la expresión de E7 de VPH de alto riesgo in vitro (Southern et al, 1997 y Southern et al, 2001). Nuestros resultados muestran una condición tetraploide y aneuploide para los dos cromosomas que se analizaron, mostrando que la presencia del VPH favorece esta condición, al comparar con los controles (bucales). Sin embargo no encontramos una diferencia significativa al analizar por el tipo de VPH, esto es, VPH de alto riesgo y VPH de bajo riesgo. Existe una tendencia que sugiere que las aneuploidías serían más frecuentes en las pacientes con infección por VPH de alto riesgo pero probablemente se necesite ampliar la muestra para obtener significancia estadística. Al analizar los tipos de VPH que se encontraron (Tabla 2) notamos que los tipos de alto riesgo no son los más comunes, es decir los tipos 16 y 18 los cuales se han clasificado como carcinógenos humanos (IARC, 1995). Estos resultados sugieren que la infección del virus es necesaria pero no suficiente para la formación de células tetraploides y/o aneuploides, y que otros son los factores que están contribuyendo a la presencia de dichas células ya que las aberraciones numéricas fueron más frecuentes en las muestras de pacientes que han tenido el procedimiento de cono. Este proceso quirúrgico remueve lesiones epiteliales que se asocian con transformación maligna, sin embargo en la mayoría de las

pacientes que tuvieron el procedimiento quirúrgico no pudimos determinar la presencia de VPH de alto riesgo, ni encontramos una asociación significativa entre el procedimiento y la presencia de infección. Este hecho podría deberse a que el procedimiento para detectar la presencia del virus no es tan sensible como la metodología de FISH, que permite detectar la presencia de células con aberraciones numéricas principalmente en las pacientes que tuvieron lesiones epiteliales por infección viral.

Por otro lado, se ha documentado que durante el proceso de reparación de tejidos, se incrementa la presencia de células poliploides (Ermis et al., 1998; Oberringer et al., 1999; Hanselmann & Oberringer, 2001 y Alonso et al., 2000). Nuestros resultados muestran que la presencia de células tetraploides está fuertemente asociada a las muestras de las pacientes que tuvieron el procedimiento quirúrgico de cono. Lo que sugiere que la presencia de células tetraploides podría estar también asociada a la regeneración del tejido afectado. Para investigar esta posibilidad, y dado que diversos estudios han demostrado la expresión de PPAR β está inducida por estímulos inflamatorios y daño epidérmico y es fundamental para la regeneración del tejido, tanto *in vitro* como *in vivo* (Matsuura et al., 1999; Di-Poï et al., 2002 y Tan et al., 2004), decidimos investigar la expresión de esta proteína en las muestras de tejido.

Nuestros resultados de la detección de PPAR β demuestran que la mayoría de las células que lo están expresando, son en tejidos que han tenido cono y que existe una relación directamente proporcional entre dicha expresión y el número de células tetraploides. Existe evidencia que indica que la tetraploidización celular es un evento esencial que promueve el proceso de regeneración de tejidos como el hígado. Se especula que las células tetraploides tienen ventaja en la síntesis de proteínas, una mejor resistencia al estrés inflamatorio y estabilidad genética. Esto afecta de manera directa la proliferación celular durante el periodo en que se está regenerando el tejido asegurando así la reepitelización. Pero una vez que se ha reparado el tejido las células tetraploides no son necesarias y desaparecen por apoptosis mediado por p53 (Ermis et al, 1998 y Oberringer et al, 1999, Hanselmann & Oberringer, 2001). Si esto es así, y situándonos en nuestros resultados, se esperaría que

en determinado tiempo, cuando el tejido se haya reconstruido, la presencia de estas células tetraploides así como la expresión de PPAR β no se detectarán más.

Sin embargo es conocido el hecho de que la presencia de infección por VPH de alto o de bajo riesgo se asocia con inflamación (Kovacic et al., 2007). No obstante nuestro análisis no corrobora este hallazgo. Lo que apoyaría la hipótesis de que la inflamación está asociada a la regeneración de tejidos.

Es importante hacer notar la prevalencia de la infección de VPH en los casos tratados con cono, 12.28 %, de los cuales el 42.85% son de alto riesgo. Existen estudios que concluyen que la carga viral de los tipos de alto riesgo, es el factor de riesgo a considerar, cuando se ha tratado una lesión y el virus aun está presente (Alonso et al, 2006 y 2007; Park et al, 2007). Por otro lado en los casos no tratados con cono un 25% es VPH positivo.

El microambiente del proceso inflamatorio está dominado por macrófagos, los cuales son los responsables de la producción elevada de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno para combatir cualquier infección. Pero en una situación de daño tisular y proliferación celular prolongados la persistencia de la lucha contra la infección (cualquiera sea su origen: bacteriana o viral) es deletérea produciéndose agentes mutágenos, tales como el peroxinitrito, el cual reacciona con el ADN y causa mutaciones en células epiteliales y del estroma (Maeda et al, 1998). Los macrófagos y linfocitos T pueden liberar el factor de necrosis tumoral (TNF α) y el factor inhibidor de migración de macrófagos que alteran el DNA. El factor de inhibición de la migración también altera la vía de Rb-E2F (Petrenko & Moll, 2005) recordando que Rb es una proteína que regula el ciclo celular y está asociada a la formación de múltiples centrosomas por la interacción de la oncoproteína E7 de VPH(Di Leonardo et al., 1997 ; Duensing & Munger 2002). Por su parte p53 tiene una participación clave, pues regula el estrés inflamatorio regulando la expresión de genes. Se ha reportado una interacción entre p53 y el óxido nítrico (NO *). De tal manera que NO * puede tanto activar la ruta supresora de tumores de p53 pero también inducir mutaciones oncogénicas en p53 (Perwez & Harris, 2007). P53 es otra proteína que regula la actividad del ciclo celular y existen reportes donde la actividad

alterada de p53 está asociada a la formación de alteraciones cromosómicas numéricas (Southern & Herrington, 1997 y Southern et al., 2001).

Existen reportes donde se han identificado componentes del humo del cigarro en la mucosa del cérvix y se ha visto que estos pueden incrementar el número de aductos de DNA de fumadores y no fumadores (Melikian et al., 1999 y Simons et al., 1995). Aun no se tiene claro el mecanismo por el cual el humo del cigarro influye en la carcinogénesis cervical. Cabe mencionar, que en nuestro estudio no encontramos asociación con el hábito de fumar, así como tampoco con la edad de las pacientes y la proporción de células cromosómicamente desbalanceadas (datos no mostrados).

Un factor que no estudiamos y que sería importante tener en consideración en futuros estudios es la regulación epigenética como causa de la progresión a cáncer, aunque en este estudio no se haya evaluado, ya que los cambios epigenéticos, particularmente la metilación del DNA son susceptibles a variaciones y son excelentes candidatos para explicar cómo ciertos factores ambientales incrementan el riesgo de cáncer. El genoma de las células transformadas experimenta hipometilación e hipermetilación de islas CpG asociadas con regiones reguladoras de genes. Estos cambios dramáticos derivan en inestabilidad cromosómica, expresión descontrolada de genes, aneuploidías, mutaciones y silenciamiento de genes supresores de tumores. Los efectos inactivadores asociados a la hipermetilación afecta proteínas de reparación de DNA (HMLH1, BRCA1, MGMT), del ciclo celular (p16, p14, p15, p53 y p73) y de apoptosis (APAF1)(Esteller & Herman 2001; Tomasini et al.,2008)

CONCLUSIONES

- La presencia del VPH parece necesaria pero no suficiente para la formación de aberraciones cromosómicas numéricas en el diagnóstico de inflamación.
- La presencia de células con complemento cromosómico tetraploide está relacionado a la expresión de PPAR β que se considera como un indicador de regeneración del tejido.
- Nuestro estudio es pionero en describir la expresión de PPAR β en relación a la formación de células tetraploides asociadas con la regeneración en este tipo de tejido.

PERSPECTIVAS

- Sería importante contrastar los resultados obtenidos con muestras de epitelio normal y ampliar el tamaño de la muestra para poder discriminar el papel que juega la infección viral, la edad y otros factores de riesgo como el tabaquismo.

BIBLIOGRAFIA

- Ahmed,N., Ridley, C. & Quinn, MA. **An immunohistochemical perspective of PPAR β and one of its putative targets PDK1 in normal ovaries, benign and malignant ovarian tumors.** British Journal of Cancer (2008) 98 1415-1424.
- Alonso de Ruiz, P. Lazcano E. y Hernández M. (2000) **Cáncer Cervicouterino. Diagnóstico, prevención y control.** Ed. Medica Panamericana, México 254 pp.
- Alonso de Ruiz, P. & Ruiz, MJ. **El concepto de neoplasia intraepitelial cervical.** Revista Médica del Hospital General de México. (1981) 44 86-88.
- Atkin;NB. **Cytogenetics of carcinoma of the cervix uteri: a review.** Cancer Genetics and Cytogenetics. (1997) 95 33-39.
- Aziz, X. and Wu, G. (2002) **Cancer screening.** Humana Press USA. 27-41.
- Balkbill, F. & Mantovani, A. **Inflammation and cancer: back to Virchow?** Lancet (2001) 357 539-45.
- Barret,MT., Pritchar, D.,Palanca Wessels, C., Anderson,J.,Reib, BJ. & Ravinovitch, PS. **Molecular phenotype of spontaneously arising 4N (G2-tetraploid) intermediates on neoplastic progression in Barret's esophagus.** Cancer Research (2003) 63:14 4211-4217.
- Benye, Z., Ping, L. & Exing W. **The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon- γ .** Virology (2003) 310 100-108.
- Boyer, SN., Wazer, DE. & Band, V. **E7 protein of human papillomavirus- 16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitina-proteosome pathway.** Cancer Research (1996) 56 4620-4624.
- Boyer,S.,Waser, D. & Band, V. **E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of Retinoblastoma protein through ubiquity-proteosome pathway.** Cancer Research (1996) 56, oct 15 4620-4624.
- Broadsky, WY.& Uryavaeva, IV. **Cell poliploidy: its relation to tissue growth and function.** International Review of Cytology (1977) 50 275-332.
- Bulten, J., Poddighe, PJ., Robben, JCM., Gemmink, JH., de Wild,PCM & Hanselaar AGJM. **Interphase cytogenetic analysis of cervical intraepithelial neoplasia.** American Journal of Pathology (1998) 152 495-503.
- Burdick, A., Kim, D., Peraza, M.,Gonzalez, F. & Petters, J. **The role of Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ in epithelial cell growth and differentiation.** Cellular Signaling (2006) 18 9-20.

- Burkhardt, A., Willingham, M. & Gay, C. **The E5 oncoprotein of bovine papillomavirus is oriented asymmetrically in Golgi and plasma membranes.** *Virology* (1989) 170 334-339.
- Coussens, L. & Werb, Z. **Inflammation and cancer.** *Nature* (2002) 420 860-867.
- Day, PM., Lowry, DR.& Schiller JT. **Papillomavirus infect cells via a clathrin-depent pathway.** *Virology* (2003) 307 1-11.
- De Villiers, EM., Fauquet, C., Broker, T., Bernard, HU. & zur Hausen, H. **Classification of papillomaviruses.** *Virology* (2004) 324 17-27.
- Deborah,E., Jackson,J. & Doorbar J. **Identification of a G2 arrest domain in the E1^AE4 protein of human papillomavirus type 16.** *Journal of Virology* (2002) 76:19 9806-9818.
- Di-Poi, N., Tan, N.S.,Michalik, L.,Whali, W. & Desvergne, B. **Antiapoptotic role of PPAR β in keratinocytes via transcriptional control of Akt1 signaling pathway.** *Molecular Cell.* (2002) 10 721-733.
- Kasiap, V. & Das, BC. **DNA aneuploidy and infection of human pipillomavirus type 16 in preoneoplastic lesion of uterine cervix: correlation to progression to malignancy.** *Cancer Letters* (1998)123 47-52.
- Doorbar, J.**The papillomavirus life cycle.** *Journal of Clinical Virology.* (2005) 32S, S7-15.
- Duensing,S. & Münger, K. **Human papillomaviruses and centrosome duplication errors: modeling the origins of genomic instability.** *Oncogene*(2002) 21 6241-6248.
- Duesberg, P., Rausch, C., Rasnick., D. & Hehlmann, R. **Genetic instability of cancer cells is proportional to their degree of aneuploidy.** *Proccedings of the National Academy of Sciences.* (1998) 95 13692-13697.
- Duesberg,P. Ruhong,L. Rasnick, D. **Aneuploidy approaching a perfect score in predicting and preventing cancer.** *Cell Cycle* (2004). 3:6 823-828.
- Duesberg,P.,Ruhong,L.,Fabarius, A. & Hehlmann.R. **The chromosomal basis of cancer.** *Cellular Oncology* (2005) 27 293-318.
- Eastmond,D.,Schuler, M. & Rupa, D. **Advantages and limitations of using fluorecence in situ hybridization for the detection of aneupoidy in interphase human cells.** *Mutation Research* (1995) 348 153-162.
- Ermis, A., Oberringer, M., Wirbel, R., Koschnick, M., Mutschler, W. & Haselman, R.G. **Tetraploidization is a physiological enhacer of wound healing.** *European Surgical Research.* (1998) 30: 385-392.
- Esteller,M. & Herman J. **Cancer as a epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours.** *Journal of Pathology* (2002)196 1-7.

- Evander, M., Frazer, I. & Payne, E. **Identification of the alpha-6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses.** *Journal of Virology* (1997). 71 2449-2456.
- Favre, M., Orth, G., Croissant, O. & Yaniv, M. **Human papillomavirus DNA: physical map.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* (1975) 72 4810-4814.
- Ferlay, J. et al. **GLOBOCAN 2002: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, iarc cancer base** ([http:// www-dep.iarc.fr/](http://www-dep.iarc.fr/)).
- Fu, Y.S., Reagan, J.W. & Richart, R.M. **Definitions of precursors.** *Gynecologic Oncology* (1981) 12 S220-S231.
- Gemma, A., Seike, M., Seike, Y., Uematsu K., Hibino, S., Kurimoto, F., Yoshimura, A., Shibuya, M., Harris, C.C. & Kudo S. **Somatic mutation of the hBUB1 mitotic checkpoint gene in primary lung cancer.** *Genes Chromosomes and Cancer* (2000) 29 213-218.
- Girrior, E., Hollingshead, E., He, P., Zhu, B. & Perdew, G. **Quantitative expression patterns of Peroxisome proliferator-activated receptor- β/δ (PPAR β/δ) protein in mice.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2008) 371 456-461.
- Graham DA, Southern SA, McDicken IW, Herrington CS. **Interphase cytogenetic evidence for distinct genetic pathways in the development of squamous neoplasia of the uterine cervix.** *Laboratory Investigation* (1998) 78 3:289-96.
- Halling, K. & Kipp, B. **Fluorescence in situ hybridization in diagnostic cytology.** *Human Pathology* (2007) 38 1137-1144.
- Hanselmann, R.G., Oberringer, M. **Polyploidization: a Janus faced Mechanism.** *Medical Hypotheses* (2001) 56 1 58-64.
- Hedge, R. **Structure, function and biology.** *Annual. Review of Biophysics and Biomolecular. Structure* (2002) 31 343-60.
- Heiden, F.L. & James, J. **Poliploidy in the human myometrium.** *Zeitschrift fur Mikroskopisch Anatomische Forschung* (1975) 89 18 26.
- Hengstemann, A., Linares, L., Ciechanover, A., Whitaker, N. & Schefner, M. **Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6 mediated degradation of p53 in cervical cancer cells.** *Proceedings of National Academy of Sciences* (2001) 98:3 1218-1223.
- Herrington, C.S., Whorsham, M., Southern, S.A., Mackowiak, P. & Wolman, S.R. **Loss of sequences of short arm of chromosome 17 is a late event in Squamous carcinoma cervix.** *Journal of Clinical. Pathology and. Molecular Pathology.* (2001) 54 160-164.
- Heselmeyer, K., Macville, M., Schröck, E., Blegen, H., Hellström, A., Shrah, K., Auer, G. & Ried, T. **Advanced-Stage Cervical Carcinomas Are Defined by a Recurrent Pattern of Chromosomal Aberrations Revealing High Genetic Instability and a Consistent Gain of Chromosome Arm 3q.** *Genes, Chromosomes and Cancer* (1996) 19 233-240.

- Incassati.A., Patel, D. & Mc Cance, DJ. **Induction of tetraploidy through loss of p53 and upregulation the of Plk1 by human papillomavirus tye 16-E6.** Oncogene (2006)25 2444-2451.
- Janoueix-Lerosey, I., Novikov, E., Monteiro, M., Gruel, M., Schleiermacher,G., Loriod, B., Nguyen, C.Delattre, O. **Gene expression profiling of 1p35-36 genes in neuroblastoma.** Oncogene (2004) 23 5912-5922.
- Jones, & Ravid, K. **Vascular smooth muscle polyploidization as a biomarker for aging and its impact on differential gene expression.** The Journal of Biological Chemistry. (2004)13 5306-5313.
- Katisch, SC., Zeffass-Thome, K. & Hoffmann, I. **Regulations of the Cdc25A gene by the human papillomavirus type 16E7 oncogene.** Oncogene (2001) 20 543-550.
- Kops,G.J.P.L.,Weaber, B. & Cleveland D. **On de road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint.** Nature Cancer (2005) 5 773-785.
- Krajewski, S., Krajewska M. & Reed, JC. **Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bak expression, a proapoptóica member of the Bcl-2 protein family.** Cancer Research (1996) 56 2849-2855.
- Krudryavtsev, BN., Krudryavtseva, MV., Sakuta, GA.,& Stein GI. **Human hepatocyte poliploidization in the course of life cycle.** Virchows Archive B Cell Pathology Including Molecular Pathology (1993)64 387-393.
- Kupka, S.,Schöder, K.,Porchen, R., Borchard, F., Gregor M.,Blin, N. &Hollzman K. **Comparative genomic hybridization analysis of chromosomal alterations in patiens with long standing ulcerative colitis.** International Journal of Oncology (2001) 19 3 489-494.
- Lacruz, C. (2003).**Nomenclatura de las lesiones cervicales: de Papanicolaou a Bethesda 2001.** Revista. Española de. Patología. 36:1, 5-10.
- Lengauer, C., Kinzier, W. & Vogelstein, B. **Genetic instabilities in human cancers.** Nature (1998) 396 643-65.
- Lengauer, C., Kinzler KW. & Volgenstein, B. **Genetic instability in corectal cancer.** Nature (1997) 386 643-649.
- Li, M., Beard, P. & Estes, PA. **Intercapsomeric disulphide bonds in paillomavirus assembly and disassembly.** Journal of Virology (1998) 72 2160-2167.
- Liang, SB., Furihata, M., Takeuchi, T., Sonobe, H. & Ohtsuki, Y. **Reduced human mismatch repair protein expression in the development of precancerous skin lesion to Squamous cell carcinoma.** Virchows Archives (2001) 439 622-627.
- Lothschütz, D.,Jennewein, M.,Pahl, S., Lausberg, HF., Eichler. A, Mutschler, W., Hanselmann, RG. & Oberringer,M. **Polyploidization and centrosome hyperamplification in inflammatory bronchi.** Inflammation Research (2002) 51 416-422.

- Lothschütz, M. Jennewein¹, S. Pahl, H. F. Lausberg, A. Eichler, W. Mutschler, R. G. Hanselman & Oberringer, M. **Polyploidization and centrosome hyperamplification in inflammatory bronchi**. *Inflammation. Research.* (2002) 51:416,422. Maeda, H. and Akaike H. Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation and cancer. *Biochemistry* (1998) 63:854-65.
- Luque, J. y Herráez, A. (2001). **Biología Molecular e Ingeniería Genética. Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud**. Ed. Harcourt. España, 469 pp.
- Magtibay, P., Perrone, J., Stanhope, R., Katzmann, J., Keeney, G. & Li, H. **Flow-Cytometric DNA Analysis of Early Stage Adenocarcinoma of the Cervix**. *Gynecologic Oncology* (1999) 75-20-24.
- Mantovani, F. & Banks L. **The Human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression**. *Oncogene* (2001) 20 7874-7887.
- Mantovani, F. & Banks, L. **Inhibition of E6 induced degradation of p53 is not sufficient for stabilization of p53 protein in cervical cancer derived cell lines**. *Oncogene* (1999) 18 3309-3315.
- Mark, H., Fieldman, D., Samy, M., Sun, C.L., Das, S., Mark, S. & Lathrop, J. **Assessment of Chromosome 8 copy number in cervical cancer by fluorescent in situ Hybridization**. *Experimental and Molecular Pathology* (1999) 66 157-162.
- Matin, L.G., Demers, G.W. & Galloway D.A. **Disruption of the G1/S transition in human papillomavirus type16E7- expressing human cells is associated with altered regulation of cyclin E**. *Journal of Virology*(1998) 72 975-985.
- Matsuura, H., Adachi, H., Smart, R., Xiaochun, X., Arata, J. & Jetten, A. **Correlation between expression of peroxisome proliferator-activated receptor β and squamous differentiation in epidermal and traqueobronquial epithelial cells**. *Molecular and Cellular Endocrinology* (1999) 147: 85-92.
- Matzke, M., Florian, M., Kanno, T. & Matzke, A. **Does the intrinsic instability of aneuploid genomes have causal roles in cancer?** *Trends in Genetics* (2003) 253-255.
- Mc Ardle, L., Mc Dermontt, M., Purcell, R., Grehan, D., O'meara, A., Catchpoole, D., Culhane, A., Jeffery I., Gallagher, W. & Stallings, R. **Oligonucleotide microarray analysis of gene expression in neuroblastoma displaying loss of chromosome 11q**. *Carcinogenesis* (2004) 25:9 1599-609.
- Melamed, M., Lindmo, T. & Mendelsohn, M. (1990). **Flow Cytometry and sorting**. 2nd edition. Wiley-Liss Inc. USA. 745-746.
- Melikian, A.A., Prokopczyk, P., El Bayoumy, B., Hoffmann, D., Wang, X. & Waggoner, S. **Identification of benzo(a)pyrene metabolites in cervical mucus and DNA adducts in cervical tissues in humans by gas chromatography mass spectrometry**. *Cancer Letters*. (1999) 146, 127-34.

- Meraldi, P., Honda, R. & Nigg, E. **Aurora A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53^{-/-} cells.** The EMBO Journal (2002)21 483-492.
- Meyer, F., Stoop, H., Bokemeyer, C., Oostheortius, JC. & Looijenga, LH. **Aneuploidy of human testicular germ cells tumors is associated with amplification of centrosomes.** Oncogene (2003) 19 22:25 3859-66.
- Mian, C., Bancher, D., Bancher, D., Kohlberger, P., Kainz, C., Haitel, A., Czerwenka, K., Stani, J., Breiteneker, G & Wiener, H. **Florescence in Situ Hybridization in Cervical Smears: Detection of Numerical Aberrations of Chromosomes 7, 3, and X an Relationship to HPV Infection.** Gynecologic Oncology (1999) 75 45 – 46.
- Michalik, L. & Wahli, W. **Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in skin health, repair and disease.** Biochemica et Biophysica Acta (2007) 1771991-998.
- Moraes, L., Piqueras, L. & Bailey, D. **Peroxisome Proliferator Activated Receptors and Inflammation.** Pharmacology and Therapeutics (2006) 110 371-385.
- Muñoz, N., Castellsagué, X., Berrington, A. & Gissmann L. **Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer.** Vaccine (2006) 24S3 S3/1-10.
- Naylor, B. Perspectives in Cytology. **From Battle Creek to New Orleans.** Acta Cytologic (1988) 32 613-621.
- Nguyen, H. & Ravid, K., et al. (2006). **Tetraploidy/Anueploidy and stem cells in cancer promotion: the role of chromosome passenger proteins.** Journal of cellular physiology 208:12-22.
- Oberringer, M., Lothschütz, D., Jennewein, M., Mutschler, W. & Hanselmann, R. **Centrosome Multiplication accompanies a transient clustering of polyploidy cells during tissue repair.** Molecular Cells Biology Research Communications (1999) 2 190-196.
- Olarhaski, A., Sotelo, R. Solorza, G., Guzmán, P., Gonsebatt, M., Mohar, A. & Eastmond, D. **Tetraploidy and chromosomal instability are early events during cervical carcinogenesis.** Carcinogenesis (2006). 27 337-343.
- Owens, GK. & Schwartz, SM. **Alterations in vascular smooth muscle mass in the spontaneously hypertensive rat. Role of cellular hypertrophy, hyperploidy and hyperplasia.** Circulation Research (1982)51 280-289.
- Owens, GK. & Schwartz, SM. **Vascular smooth muscle cell hypertrophy and hyperploidy in the Goldblatt hypertensive rat.** Circulation Research (1983) 53 491-501.
- Parkin, D. et al. (2005) **Global cancer statistics 2002.** CA Cancer Journal Clinical.55:74-108.
- Perwez, H. & Harris, C.C. **Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials.** International Journal of Cancer (2007) 121: 2373-2380.

- Petrenko, O. & Moll, UM. **Macrophage migration inhibitory factor MIF interferes with the Rb-E2F pathway.** *Molecular Cell.* (2005) 17:225-36.
- Philip, M., Rowley, DA. & Schreiber, H. **Inflammation as a tumor promoter in cancer induction.** *Seminary in Cancer Biology* (2004) 14 433-439.
- Pollack, JR., Sorlie, T., Perou, CM., Rees, CA. Jeffrey SS., Lonning, P., Tibshirani, R., Botstein, D., Borresen-Dale, A. & Brown P. **Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program for human breast cancer.** *Proceedings National Academy of Sciences* (2002) 99 12963-12968.
- Ravid, K., Lu, Jun., Zimmet, J., & Jones, M.,. **Roads to polyploidy: The megakaryocyte example.** *Journal of cellular physiology.* (2002) 190, 7-20.
- Resnick, R., Cornelissen, M, Wright D., Eichnigen, GH., Fox HS. & Schegget J. **Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers.** *Journal Natural Cancer Institute.* (1990) 82 1477-1484.
- Saavedra, A. y Lizano, M. **Cáncer Cervicouterino y el Virus del Papiloma Humano: La historia que no termina** *Revista del Instituto Nacional de Cancerologia* (2006) 1:1 31-55.
- Salamanca, F. (1988). **Citogenética Humana.** Ed. Panamericana, México, 83-86.
- Sambrook, J., Fritsch, E., & Maniatis, T. **Molecular Cloning: A laboratory manual.** (1989). 2a ed. USA, Cold Spring Harbor, 2 9-16.
- Sandritter W. & Scomazzoni, G: **Deoxyribonucleic acid content (Feulgen photometry) and dry weight (interference microscopy) of normal and hypertrophical heart muscle fibers.** *Nature* 202 100-101.
- Sawan, C., Vaissiere, T., Murr R. & Herceg, Z. **Epigenetic drivers and genetics passengers on the road to cancer.** *Mutation Research* (2008) 642 1-13.
- Scheffner, M., Huibregtse, JM, Vierstra, RD.& Howley PM. **The HPV 16E6 and E6 AP complex functions as a ubiquitina-protein ligase in the ubiquitination of p53.** *Cell* (1993) 75 495-505.
- Schiffman, M. & Brinton, L. **The epidemiology or cervical carcinogenesis.** *Cancer* (1995) 76 1888-1901.
- Schiffman, M., Castle, P., Jeronimo, J., Rodriguez, A. & Wacholder, S. **Human Papillomavirus and cervical cancer.** *Lancet* (2007) 370 890-907.
- Schiffman; M & Castle, P. **Human Papillomavirus. Epidemiologic and public health** *Archives of. Pathology and. Laboratory Medicine* (2003) 127:930-934.

- Schoch, C., **Impact of trisomy 8 on expression of genes localized on chromosome 8 in different AML subgroups.** *Genes Chromosomes and Cancer* (2006)45 1146-1168.
- Schröck, E., du Manior, S., Veldman, T., Schoell, B., Wienberg, J., Ferguson-Smith, M., Ning, Y., Ledbetter, D., Bar-Am, I., Soenksen, D., Garini, Y. & Ried, T. **Multicolor Spectral Karyotyping of Human Chromosomes.** *Science* (1996) 273 494-947.
- Schulze, A., Mannhardt, B., Zerfass-Thome, K., Zwerchke, W. & Jansen-Durr, P. **Anchorage-independent transcription of the cyclin A gene induced by the E7 oncoprotein of human papillomavirus type 16.** *Journal of Virology* (1998) 72 2323-2334.
- Shan Fan, Y. (2002). **Molecular Cytogenetics. Protocols and Applications.** *Methods in Molecular Biology.* Vol 204. Ed Humana Press Inc. USA. 3- 12.
- Sherman, L., Jackman, A.& Itzhaki, H. **Inhibition of serum and calcium induced differentiation of human keratinocytes by HPV16 oncoproteins: role of p53 inactivation.** *Virology* (1997) 237 296-306.
- Simons,AM., Mugica van Herckenrode,C., Rodriguez,J.A., Maitland,N., Anderson,M., Phillips,D.H. & Coleman, D.V. **Demonstration of smoking-related DNA damage in cervical epithelium and correlation with human papillomavirus type16, using exfoliated cervical cells.** *British Journal of Cancer* (1995) 71,246-9.
- Snidjers,P.,Van den Brule, A.,Schinemaker, H., Snow G., Meijer, Ch. & Walmoomers, JM. **The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes.** *Journal of General Virology* (1990) 71:173-181.
- Snijders,P.,Steenberger,R.,Heideman D. & Meijer C. **HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications.** *Journal of Pathology.* (2006) 208 152-164.
- Solinas-Toldo, S., Dürst, M. & Lichter, P. **Specific chromosomal imbalances in human papillomavirus-transfected cells during progression toward immortality.** *Proceedings of Natural Academy of Sciences* (1997) 94 3854-3859.
- Solomon, D., Davey, D., Kurman, R., Moriarty, A., O'connor, D., Prey, M., Raab, S., Sherman, M., Wilburg, D., Wright, T.& and Young, N. **The 2001 Bethesda System: Terminology for reporting results of cervical cytology.** *Journal of the American Medical Association* (2002)287 16 2114-2119.
- Solomon,D., Fable, WJ., Voojins, PG, Wilbur, DC. **ASCUS and AGUS criteria. IAC. Task Force Summary.** *Acta Cytologic* (1998) 42 16-24.
- Southern, S. & Herrington, S. **Interphase karyotypic analysis of chromosomes 11, 17 and X in invasive squamous-cell carcinoma of the cervix: morphological correlation with HPV infection.** *International Journal of Cancer* (1997) 70 502-507.

- Southern, SA., Evans, MF. & Herrington, CS. **Basal cell tetrasomy in low grade cervical squamous intraepithelial lesions infected with high risk human papillomaviruses.** Cancer Research (1997) 574210-4213.
- Sparkowski,J., Anders, J.& Schlegel, R. **E5 oncoprotein retained in the endoplasmic reticulum/ cis Golgi still induces PDGF receptor atophosphorylation but does not transform cells.** EMBO Journal (1995) 14 3055-3063.
- Srivatsan, E., Chakrabarti, R., Zainabadi, K., Pack, S., Benyamini, P., Mendoca, M., Yang, P., Kang, K., Motamedi, D., Sawicki, M., Zhuang, Z., Jesudan, R., Bengtsson, U., Sun, C., Roe, B., Stanbrige, E., Wilczynski, S. & Redpath, J. **Localizations of deletion to a 300 Kb interval of chromosome 11q13 in cervical cancer.** Oncogene (2002) 21 5631-5642.
- Stallings,R. **Are chromosomal imbalances important in cancer?** Trends in Genetics. (2007). 23:6; 278-283.
- Steinbeck, RG. **Proliferation and DNA aneuploidy in mild dysplasia early steps in cervical carcinogenesis.** (1997) 36 3-12.
- Strachan T. (1999). **Human Molecular Genetics 2.** 2a ed. Wiley-Liss. New York USA. 28-52.
- Stubenrauch,F. & Zobel, T. **The E8 domain confers a novel long distance transcriptional repression activity on the E8E2C protein of high risk human papillomavirus type 31.**Journal of Virology (2001)75:4139-49.
- Tan, N.S., Michalik, L., Di-Poi, N., Desvergne, B. & Wahli, W. **Critical rles of nuclear receptor PPAR β (peroxisome-prolifetaror-activated receptor β) in skin wound healing.** Biochemical Society Transactions (2004) 32:1 7-102.
- Tomasini, N.,Mak, T. & Melino G. **The impact of p53 and p73 on aneuploidy and cancer.** Trends in cell biology (2008) 18:5 244-52.
- Tommasino, MA., Accardi, R., Caldeira, S., Dong, W., Malanchi, I., Smet., A. & Zehbe, I. **The role of TP53 in cervical carcinogenesis.** Human Mutation (2003) 21 307-312.
- Tonon, G.,Wong, KK., Maulik, G., Brennan, C., Fheng, B., Zhang, Y.,Khatry, D., Protopopov, A., You, JM., Aguirre, A., Martin, E., Yang, Z.,Ji, H., Chin, I. & Dephino, R. **High resolutions genomic profiles of human lung cancer** Proceedings of National Academy of Sciences (2005) 102 9625-9630.
- Toyoda, H.B, Bregerie, O.B , Vallet, A.C , Nalpas, B.B , Pivert, G.D , Brechot, C.B , Desdouets, C.. **Changes to hepatocyte ploidy and binuclearity profiles during human chronic viral hepatitis.** Gut (2005) 54, 2: 297-302.
- Ueno,T., Sasaki, K.,Yoshida, S.,Kajitani,N.,Satsuka,A., Nakamura,H & Sakai,H. **Molecular Mechanism of hyperplasia induction by human papilloma virus E7.** Oncogene (2006) 1-10.
- Van den Brule, A.,Meijer, CJL.,Bakels, V.,Kenemans & P.,Walmoomers, JM. **Rapid detection of human papillomavirus in cervical**

scrapes by combined general primer mediated and type specific polymerase chain reaction. Journal of Clinical Microbiology (1990).28 2739-43.

- Wilson, VG., West, M. & Woytek, K. **Papillomavirus E1 proteins: form, function and features.** Virus Genes (2002) 24 275-290.

- Wolf, M., Mousses, S., Hautaniemi, S., Karhu, R., Huusko, P., Allinen, M., Elkahoun, A., Monni, O., Chen, Y., Kallioniemi, A., Kallioniemi, O. **High resolution analysis of gene copy number alteration in human prostate cancer using CGH on cDNA microarrays: impact on copy number of gene expressions.** Neoplasia (2004) 6 240-247.

- Wrigth, T., Cox, J.T., Massad, L., Twiggs, L., & Wilkinson, E. **2001 Consensus Guidelines for the Management of Women With Cervical Cytological Abnormalities.** JAMA (2001) 287: 16 2114-2140.

- Yuan B., Xu Y., Woo JH., Wang, Y., Bae, YK., Yoon, DS., Wersto, RP., Tully, E., Wilsbach, K. & Gabrielson, E. **Increased expression of mitotic checkpoint genes in breast cancer cells with chromosomal instability.** Clinical Cancer Research. (2006) 12 405-410.

- Zerfass-Thome, K., Zwerchke, W., Mannhardt, B., Tindle, R., Botz, JW. & Jansen-Durr, P. **Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16E7 oncoprotein.**

- Zerfass, K., Schulze, A., Spitkovky, D., Friedman, V., Henglein, B. & Jansen-Durr, P. **Secuencial activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16E7 through sequences necessary for transformation.** Journal of Virology. (1995) 69 6389-3699.

- Zuher, N. (1996). **Cytopathology**, 4^a edition. Little Brown and Company. USA. 1-5, 127-145.

- Zur Hausen, H. **Papillomavirus and cancer from basic studies to clinical application.** Nature (2002) 2:342-350.

- zur Hausen, H.. **Papillomavirus infections- a major cause of human cancers.** Bioquimica et Biophysica Acta (1996) 1288, F55-F78.