



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DETECCIÓN DE ANEUPLOIDÍAS EN  
LESIONES PRECURSORAS DEL  
CÁNCER CERVICOUTERINO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G A**

**PRESENTA:**

**ELSA GUADALUPE GUTIÉRREZ PALACIOS**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE**



**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM**

**2004**



**FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR**



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.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
AVENIDA DE LAS PLANTAS  
MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Elsa Guadalupe Gutiérrez Palacios  
FECHA: 25 de Octubre del 2004  
FIRMA: Gutiérrez Palacios

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
**Jefe de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:  
Detección de aneuploidías en lesiones precursoras  
del cáncer cervicouterino.

realizado por Elsa Guadalupe Gutiérrez Palacios

con número de cuenta 9623497-8 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

**Atentamente**

Director de Tesis

Propietario

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Propietario

Dra. Patricia Ramos Morales

Propietario

M. en C. Dora Patricia Guzmán Bazán

Suplente

M. en C. María Guadalupe Ordaz Telléz

Suplente

M. en C. Emilio Joaquín Córdova Alarcón

**Consejo Departamental de Biología**

FACULTAD DE CIENCIAS

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



UNIDAD DE ENSEÑANZA  
DE BIOLOGÍA

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Toxicología del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt Bonaparte. Fue financiado por el proyecto CONACYT 30950M y el proyecto UC-Mexus 2001-2002.

***“Cuando hay una intención clara,  
Hay un logro claro también”.***

*Swami Chidvilasananda*

## **AGRADECIMIENTOS**

*A mi escuela, la UNAM por darme la oportunidad de sentirme parte de ella a lo largo de estos años, por todas aquellas experiencias que nunca he de olvidar, por formarme como profesionalista pero también como persona.*

*A la Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt, por ser un ejemplo, por aceptarme en su grupo de trabajo, en su lab, por la confianza que ha depositado en mí y por la oportunidad que me ha dado de acercarme a la ciencia con una perspectiva muy humana.*

*A la M. En C. Dora Patricia Guzmán Bazán por su asesoría en la recolección de muestras, en el desarrollo de la hibridación in situ, por todos los útiles consejos que me ha dado, su paciencia y dedicación.*

*A la Dra. Paty Ramos, por sus críticas y sugerencias tan acertadas en este trabajo y por el valioso tiempo que me dedicó.*

*A la M. en C. Lupita Ordaz que a pesar de todo y con un motivo muy importante, me ayudó a mejorar este trabajo.*

*Al M. en C. Emilio Córdova por su atención, su tiempo, sus enriquecedores consejos y enseñanzas hasta los últimos momentos de este trabajo.*

*A la M. en C. Clementina Castro, por su asesoría en la implementación del ensayo de hibridización in situ.*

*Y no por último menos importante, a Dios por permitirme vivir experiencias tan satisfactorias como esta, así como por todas las afortunadas oportunidades que he tenido en mi vida.*

## **DEDICATORIAS**

*A mis padres Rocio y Antonio por ser un motivo de superación. Su ilimitado apoyo durante todo este tiempo, la comprensión que mostraron cuando los momentos parecieron difíciles, la invaluable confianza que me han tenido, el cariño con el que he crecido y su dedicación día a día, me han hecho lograr uno de mis mayores anhelos. No pude tener mejor cuidado que el suyo. Gracias, en realidad no hay palabras para agradecerles todo lo que han hecho por mí.*

*A mis hermanos: Jorge y Alma, gracias por estar conmigo siempre, por su apoyo constante, su amistad incondicional y por todas las cosas que les he aprendido, los admiro, son extraordinarios.*

*A mis amigos de siempre: Nora, Jocabed, Karina, Josué, Héctor, Rogelio, Mayelli, David y Juan Carlos gracias por su amistad de todos estos años, por las cosas que juntos hemos aprendido, pero sobretudo por aquellas experiencias tan divertidas e inolvidables.*

*A Lilis, amiga, que gran oportunidad conocerte y saber que cuento contigo en todos sentidos, gracias por tu linda amistad. Alejandro H. porque fue bastante agradable aprender a tu lado. Ricardo que me enseñó un punto fundamental de la vida que nunca olvidaré. Christopher porque fue bueno conocer personas como tú. José Luis por tu gran ayuda cuando más lo necesite y Alma por tu amistad incondicional y por que juntas compartimos grandes experiencias en momentos cruciales.*

*A Israel una de las personas más importantes de mi vida, gracias "hermanito" por darle un color diferente a mi existencia, contigo a mi lado todo es posible.*

*A Eric gracias por llegar a mi vida, por ser tan querible, por recordarme que siempre hay algo que aprender, por enseñarme a valorar hasta los momentos más simples y porque todo este tiempo he sido tan feliz contigo.*

*A mis compañeros del lab porque sin ustedes nada habría sido lo mismo: Gerardo, Jorge, Wendy, Valeria, Danny, Rox y Sra. Delfína muchas, muchas gracias.*

*A personitas importantes que con su sonrisa constante han hecho más agradable la vida: Karen e Ingrid.*

*A mi padrino Juan José por su interés y cariño muchas gracias.*

## ÍNDICE

RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	2
Problemática del Cáncer cervical .....	2
Virus de papiloma humano y cáncer .....	2
Descripción histológica del cuello uterino .....	3
Sistemas de nomenclatura citológica .....	5
Lesiones Precursoras del cáncer cervicouterino .....	8
Inestabilidad genética, cromosómica y cáncer .....	11
El ADN y los cromosomas .....	12
Morfología de los cromosomas .....	13
División celular .....	15
Contenido genético de las células y ciclo celular .....	15
Aberraciones cromosómicas .....	17
Aneuploidias y cáncer .....	20
Inestabilidad cromosómica en el cáncer cervicouterino .....	21
Metodologías empeladas para la detección de inestabilidad cromosómica .....	21
Fundamento de FISH .....	22
Micronúcleos y daño genético .....	24
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	25
OBJETIVOS .....	26
HIPÓTESIS .....	27
MATERIAL Y MÉTODOS .....	28
Población estudiada .....	28
Procesamiento de las muestras .....	29
Preparación de laminillas .....	29
FISH .....	29
Preparación de la sonda .....	29
Visualización de la hibridación .....	30
Análisis al Microscopio .....	30
Ensayo de micronúcleos .....	30
Análisis estadístico de los datos .....	31
RESULTADOS .....	32
DISCUSIÓN .....	40
CONCLUSIONES .....	44
BIBLIOGRAFÍA .....	45
APÉNDICE .....	53

## ABREVIATURAS

ADN	Acido Desoxirribonucleico
ARN	Acido Ribonucleico
ASCUS	Atypical Squamous Cervical Undetermined Significance
CaCU	Cáncer Cérvico Uterino
CGH	Comparative Genomic Hybridization
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
IARC	International Agency for the Research on Cancer
LIAG	Lesión Intraepitelial de Alto Grado
LIBG	Lesión Intraepitelial de Bajo Grado
Mn	Micronúcleo
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
OMS	Organización Mundial de la Salud
SIL	Squamous Intraepitelial Lesion
VPH	Virus de Papiloma Humano

## RESUMEN

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

Las lesiones precursoras del cáncer cervicouterino se describen histológicamente como displasias. Presentan distintos tipos de anomalías no solo a nivel de morfología celular sino también genético. Un tipo de alteración genética que se observa en este tipo de cáncer son las aberraciones cromosómicas numéricas, como las tetraploidías y aneuploidías. Estas lesiones, pueden representar un marcador de daño al material genético de la célula.

En el presente estudio se analizó el número de células con alteraciones cromosómicas como tetraploidías y aneuploidías en células epiteliales cervicouterinas de pacientes con riesgo para cáncer cervicouterino. Para ello se utilizó el ensayo de FISH con sondas pericentroméricas para los cromosomas 1 y 11. Se analizaron un total de 42 muestras en las que se observó que el número de células con tetraploidías para cromosoma 11 aumentó de forma proporcional a la severidad de la lesión. El análisis del número de aneuploidias para ambos cromosomas se incrementó significativamente conforme al desarrollo de la displasia. La presencia de este tipo de alteraciones sugiere que la infección por HPV se asocia a procesos de pérdida y ganancia de cromosomas. De manera interesante, observamos una elevada frecuencia de células aneuploides en lesiones no malignas como las inflamatorias, lo cual nos indica que este ensayo podría tener un valor diagnóstico.

## INTRODUCCIÓN

### **Problemática del Cáncer cervical**

El cáncer cervicouterino (CaCU) es un problema de salud pública a nivel mundial y aunque la tasa de mortalidad se ha logrado disminuir de manera notable, especialmente en los países en desarrollo, continúa siendo una de las principales causas de muerte en el mundo (Kirchhoff, 1999). En México esta neoplasia representa la primer causa de mortalidad por cáncer entre la población femenina en edad productiva. Se sabe que aunada a la infección por el virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo, existen otros factores que pueden propiciar el desarrollo de este tumor, como el número de parejas, inicio de una vida sexual activa a temprana edad y actividades que aumentan el riesgo de infección por VPH (Hidalgo, 2000).

La mayoría de las displasias son diagnosticadas en las mujeres después de los 20 años de edad. El CaCU se presenta de manera significativa entre los 30 y 39 años mientras que el carcinoma invasor después de los 40 años. Es importante mencionar que no todas las displasias evolucionan a cáncer. Se tienen reportes de que las lesiones intermedias generalmente sufren regresión y sólo un menor porcentaje de éstas, especialmente aquellas infectadas con VPH de alto riesgo progresan hacia estadios más severos. Actualmente se considera al cáncer cervicouterino como una neoplasia potencialmente curable y prevenible. La posibilidad de detectar las lesiones precursoras representa una estrategia exitosa para la disminución de la morbilidad y la mortalidad por este padecimiento (Alonso *et al*, 2000).

### **Virus de papiloma humano y cáncer**

Aproximadamente el 15% de los distintos tipos de cáncer en humano se han visto relacionados con virus oncogénicos. El virus más importante en el desarrollo de tumores en humanos es el papilomavirus el cual está implicado en el desarrollo del cáncer cervicouterino (Einstein y Goldberg, 2002),

Los VPHs son un gran grupo de virus epiteliotrópicos con aproximadamente 100 genotipos conocidos. Algunos VPHs infectan de manera particular la mucosa del tracto genital humano. Basados en la patología de la lesión que producen se han clasificado en VPH de bajo riesgo, los cuales causan tumores benignos (condiloma y verrugas) y VPH de alto riesgo responsables de lesiones en epitelio escamoso volviéndolo susceptible a transformación maligna (Zur Hausen, 1996 y Duensing, 2002). Con base en datos epidemiológicos y moleculares se ha podido concluir que los VPHs de alto riesgo como los tipos 16, 18 y otros, son agentes etiológicos para el desarrollo del cáncer cervicouterino, de tal manera que la IARC (Internacional Agency for the Research of Cancer) los ha clasificado como carcinógenos humanos (IARC, 1995). De esta manera las mujeres infectadas por estos tipos de VPHs tienen un riesgo más elevado de sufrir cáncer del cuello de útero (OMS, 1995 en Duensing, 2002). De esta manera, se ha observado una asociación entre VPH de alto riesgo y LIAG o Cáncer *In Situ* así como en Cáncer invasivo. Mientras que los VPH de bajo riesgo están relacionados a lesiones tempranas, las cuales pueden revertir el fenotipo maligno de manera espontánea.

## **Descripción histológica del cuello uterino**

### *Cuello uterino normal*

El cuello del útero está cubierto por dos tipos de epitelio:

1. Epitelio exocervical que es plano pavimentoso
2. Epitelio endocervical que es cilíndrico mucosecretor

Al sitio donde se unen ambos epitelios se denomina zona de unión escamocolumnar. Es un área dinámica, sujeta a la acción de hormonas tales como los estrógenos encargados de la metaplasia, nombre que recibe la transformación del epitelio endocervical al exocervical. En esta región también suceden eventos de remodelación y proliferación.

### *Epitelio exocervical*

El epitelio exocervical tapiza al exocervix y a la mucosa vaginal, se conforma por tres capas con características celulares particulares:

- I. La capa profunda está formada por varias hileras de células basales, de las cuales la capa germinal es la encargada de la regeneración y recambio celular, o de la integridad del tejido, por lo que está en constante división celular. Las células presentan núcleo grande y poco citoplasma.
- II. La capa intermedia es la más gruesa, ya que está constituida por varias hileras de células.
- III. La capa superficial ocupa el área más próxima a la cavidad vaginal, y se encuentra formada por células aplanadas, poligonales con núcleo pequeño.

El proceso de maduración celular se da de la capa profunda hacia la superficial, con un aumento del tamaño del citoplasma y reducción del núcleo. Por otro lado, la descamación se da al exfoliarse una célula o varios grupos de las capas más superficiales, debido a la acción mecánica ejercida por el crecimiento y renovación del epitelio.

#### *Epitelio endocervical*

La mucosa endocervical está constituida por hileras de células cilíndricas productoras de moco, influenciadas por la acción de hormonas ováricas, en este epitelio se presentan distintos tipos celulares:

- I. Células profundas de reserva: son células muy pequeñas, ubicadas en la profundidad del epitelio. Se sabe muy poco de su origen, en cambio se ha estudiado mucho de su función en la integridad del epitelio en los procesos de metaplasia y neoplasia. Estas células presentan un núcleo prominente, es claro y ovoide. La descamación es muy peculiar ya que los núcleos se conservan mejor y aparecen aislados o en grupos. Estas células raramente aparecen en un frotis.
- II. Células basales y parabasales: son las células más pequeñas, están localizadas en la profundidad del epitelio pavimentoso, también se les conoce como queratinoblastos o prequeratinocitos no diferenciados. Son

redondas u ovoides con núcleos grandes que ocupan más de la mitad del espacio celular.

- III. Células intermedias: presentan abundante citoplasma, el cual está bajo la acción de hormonas como la progesterona. Tienden a descamarse en grupos.
- IV. Células superficiales: son de forma poligonal, citoplasma rosado o rojizo translúcido (en tinción de Papanicolaou), el núcleo es pequeño y picnótico. A menudo estas células se descaman aisladamente, en ocasiones el núcleo se pierde, se queratinizan y se transforman en escamas. La presencia de escamas en un frotis es considerado un signo patológico.
- V. Células endocervicales: pueden encontrarse aisladas o en conjuntos. Por su función secretora presentan formas variadas, desde cúbicas a globosas. En su citoplasma se identifican organelos bien preservados como las mitocondrias y retículo endoplásmico. A diferencia de las intermedias o superficiales presentan gran vitalidad al momento de ser obtenidas (Alonso *et al*, 2000).

La citología exfoliativa permite coleccionar células epiteliales de distintos órganos y evaluar el estado histopatológico del tejido. Estos exámenes cumplen una función diagnóstica y hasta de prevención por la posibilidad de detectar lesiones tempranamente. En el caso de la citología cervicouterina, a través de los exámenes de Papanicolaou, éste examen ha mostrando mucho éxito para disminuir la mortalidad por cáncer cervico-uterino.

### **Sistemas de nomenclatura citológica**

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

### *Clasificación Histológica*

Las biopsias extraídas de tejidos con lesiones precursoras de cáncer de cérvix se han clasificado por lo patólogos como: atíпия benigna, media y moderada; displasia marcada y carcinoma *in situ*. Esta clasificación ha sido aceptada por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

### *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 numeración ha sido abusado y malinterpretado y la clasificación original se ha modificado de acuerdo al criterio de cada patólogo (Alonso *et al*, 2000).

### *Clasificación descriptiva*

Los términos de medio, moderado y displasia marcada 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. 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 todas las lesiones presentan distintos estadios de un mismo tipo de cáncer. 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. 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*

Esta nomenclatura es un sistema tuvo su origen en Maryland, Estados Unidos, en 1988, tiempo desde el cual se han tenido varias reuniones en las que se ha ido perfeccionando el sistema para identificar las lesiones con el objetivo de dar un diagnóstico reproducible no solo a nivel local sino también internacional.

En términos generales el reporte citológico debería incluir:

- Calidad de la muestra
- Categorización general: a) dentro límites normales; b) cambios celulares benignos y c) anomalías celulares del epitelio.
- Diagnóstico descriptiva:

- a) cambios celulares benignos provocados por infecciones de microorganismos.
- b) cambios reactivos asociados a inflamación, atrofia, quimioterapias entre otros.
- c) anomalías celulares del epitelio:
  - i) de células escamosas como ASCUS, LIBG, LIAG y carcinoma
  - ii) de células glandulares.

En este sistema el ASCUS proviene de las siglas en inglés para células escamosas atípicas de significado indeterminado. LIBG o lesión intraepitelial de bajo grado, equivalente a displasia leve, virus de papiloma humano o NIC I. LIAG o lesiones intraepiteliales de alto grado, equivalente a displasia moderada a severa y carcinoma *in situ* o NIC II Y NIC III (Zuher, 1996 y Alonso *et al*, 2000).

### **Lesiones Precursoras del cáncer cervicouterino**

Son un grupo de lesiones intraepiteliales de la mucosa genital femenina que por lo general preceden a las neoplasias invasoras (Fig. 1). En 1949 Papanicolaou introdujo el término displasia, en 1953 Richart lo retoma para referirse a una variedad de lesiones morfológicamente diferentes al carcinoma invasor, pero que precedían su aparición.

Los estudios realizados en pacientes portadoras de lesiones precursoras generaron importantes observaciones como:

- El carcinoma *in situ* se presenta con mayor frecuencia en mujeres más jóvenes que las que tienen carcinoma invasor.
- No todas las lesiones evolucionan a carcinoma invasor.
- Algunos de los cambios pueden desaparecer de manera espontánea.
- Existen diferencias claras y marcadas entre las lesiones.
- Las distintas lesiones son facetas de una misma enfermedad en la que hay un continuo cambio morfológico (Zuher, 1996 y Alonso *et al*, 2000).

### *Displasia leve*

Se caracteriza por la alteración de la tercera parte inferior del epitelio, en donde pierden el orden las células basales dispuestas en empalizadas, mientras que las dos terceras partes restantes conservan su organización normal. Son escasos los cambios superficiales celulares como la presencia de abundante citoplasma, un ligero crecimiento del núcleo y en un extendido celular hay pocas células con anomalías. En el sistema Bethesda estas lesiones están asociadas con cambios coilocíticos (cambios morfológicos asociados a la infección por VPH) están clasificadas en el grupo de lesiones intraepiteliales de bajo grado (Alonso *et al*, 2000, Fig. 1).

### *Displasia moderada*

En este tipo de lesión solo la tercera parte superior del epitelio presentará rasgos de normalidad (estratificación y maduración) y por el contrario las dos terceras partes inferiores estarán reemplazadas por muchas células desordenadas. En un frotis se observará una gran cantidad de células con alteraciones morfológicas de oval a alargada, con núcleos grandes y citoplasma reducido. En el sistema Bethesda corresponde a lesiones intraepiteliales de alto grado (Alonso *et al*, 2000, Fig. 1).

### *Displasia severa y carcinoma in situ*

En este tipo de lesiones, las alteraciones están en todo el espesor del epitelio, algunos autores consideran la presencia de una capa de células diferenciadas como el criterio para considerar la lesión como una displasia grave en lugar de un carcinoma in situ.

Las células tienen aspecto inmaduro casi no tienen citoplasma y el núcleo es de tamaño considerable, aneuploide, de cromatina granular e irregular y con numerosas mitosis anormales (Alonso *et al*, 2000, Fig. 1).

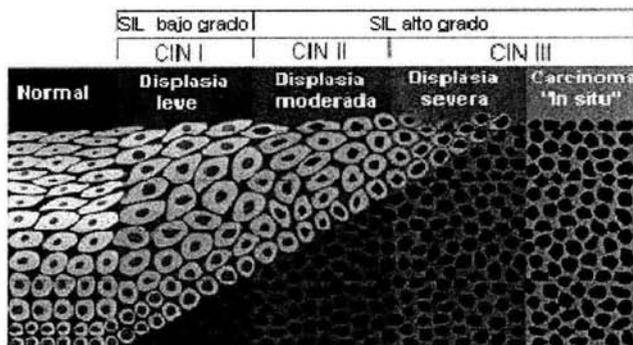


Fig. 1 Lesiones Precursoras del cáncer cervicouterino y equivalencia entre los distintos sistemas de clasificación citológica

### *Cambios Inflamatorios*

La inflamación o Cambios Inflamatorios en el Sistema Bethesda se refiere a la respuesta local en los tejidos vascularizados del cuello uterino, a causa de infecciones y /o acción de agentes físicos. Estos cambios inflamatorios pueden ser leves o intensos de acuerdo a la agresión. Citológicamente la inflamación se presenta como un exudado con células inflamatorias con cambios en mucosas, necrosis y a veces hemorragia. Las células del cuello uterino y vagina presentan cambios degenerativos en el núcleo y la forma de la célula también es afectada. A la inflamación están asociados procesos de regeneración del tejido lesionado por lo que es común encontrar fragmentos que se desprenden en la toma citológica, así como distintas facetas de la reproducción celular y distintas fases de la mitosis, además la célula presenta nucléolos prominentes

Durante el proceso de carcinogénesis asociado a VPH de alto riesgo, la progresión de un epitelio normal hacia un estadio maligno requiere un prolongado periodo, lo cual sugiere que también son necesarias mutaciones en la célula. Se ha caracterizado aumento en la inestabilidad genómica, manifestada en el número anormal de cromosomas (aneuploidías) o de fragmentos cromosómicos (Duensing, 2001 y 2002 y Olaharski *et al*, 2004).

El conocimiento de estos cambios genéticos, así como el del tipo y carga viral en el cáncer cervical podrían mejorar los métodos de diagnóstico y el desarrollo de estrategias terapéuticas más efectivas (Mullokandov, 1996).

### **Inestabilidad genómica, cromosómica y cáncer**

El cáncer es resultado de alteraciones genéticas las cuales causan diversos cambios en el fenotipo de la célula somática. Usualmente, las enfermedades genéticas se generan por la herencia de uno o dos genes anormales de nuestros progenitores, pero en la mayoría de los cánceres, salvo en algunas excepciones, no se ha identificado la herencia de alteraciones genéticas. La mayoría de los genes afectados en las células cancerosas no se transmiten a través de la línea germinal sino que las anormalidades se presentan en las células somáticas. Sin embargo, es importante mencionar que el único rasgo del cáncer como enfermedad hereditaria es que aunque la anormalidad genética no produce *per se* el cáncer sí genera una predisposición. La pregunta entonces, es ¿cómo ocurren cambios en los genes de las células somáticas? (Kastan, 1997).

Los datos epidemiológicos sugieren que la exposición a carcinógenos ambientales contribuyen al proceso de transformación de al menos el 80% de todos los cánceres (Doll y Peto, 1981 en Kastan, 1997). Los cambios genéticos en las células somáticas surgen de un daño causado al ADN como consecuencia de dichas exposiciones. Por lo tanto, es importante entender cómo la célula responde al daño causado al ADN.

Existen tres posibles respuestas celulares ante los agentes genotóxicos: 1) que el daño sea reparado antes de heredar alguna anormalidad a la célula hija; 2) que la célula muera (apoptosis); 3) que una mutación permanente resulte de la replicación de un ADN dañado o que la segregación de cromosomas dañados pueda pasar a las células. Una vez que la apropiada combinación de mutaciones acumuladas se da en un tipo celular se puede producir un fenotipo transformado. La estabilidad genómica es mantener el equilibrio entre reacciones que alteran al ADN y otras que lo reparan (Kastan, 1997 y Coleman y Stongalis, 2002). Durante los pasados 30 años se ha reportado la asociación entre anormalidades

cromosómicas y tipos particulares de tumores. Se ha considerado ampliamente a la inestabilidad cromosómica como un resultado final de la inestabilidad genómica. Los múltiples fenotipos de la inestabilidad genómica pueden inducir una variedad de anomalías a nivel de cariotipo, tales como: traslocaciones, inversiones, deleciones o amplificaciones. Los mecanismos responsables de la inestabilidad cromosómica sugieren estar involucrados a procesos fallidos de la reparación, daños a nivel de telómeros o control erróneo del ciclo celular.

La mayoría de los cánceres (incluidos tumores sólidos, leucemias y linfomas) presentan anomalías cromosómicas, ya sea cambios en la dotación numérica (aneuploidías) o cambios en la estructura. En algunas formas de cáncer las inestabilidades cromosómicas predominan sobre las inestabilidades en la secuencia.

Algunos estudios han demostrado que los tumores aneuploides exhiben una elevada variabilidad de cariotipos lo cual sugiere que las nuevas variables cromosómicas se producen de manera progresiva durante el proceso carcinogénico (Coleman y Tsongalis, 2002)

### **El ADN y los cromosomas**

La función más importante del ADN es portar la información genética específica para la síntesis de proteínas de un organismo. En la célula el ADN está altamente organizado en jerarquías de empaquetamiento. Se pueden estudiar cuatro niveles de organización del ADN, aunque esta división es relativa, ya que todavía no se comprende con claridad como acontece este fenómeno a nivel molecular. Es importante indicar que la condensación y descondensación del ADN a través de esos niveles está ligado a las distintas fases del ciclo celular. El primer nivel de condensación son los nucleosomas y fibras de 10 nm; el segundo nivel lo ocupan las fibras de 30 nm (solenoide); el tercer nivel es la cromatina o cromosoma interfásico y el cuarto es el cromosoma metafásico (Luque y Herráez, 2001).

## **Morfología de los cromosomas**

Cada cromosoma está constituido por una molécula de ADN asociado a proteínas que lo condensan formando una estructura mas fina y compacta (Alberts, 2002).

Los cromosomas no son visibles en la mayor parte del ciclo celular, debido a que el ADN se encuentra muy relajado. La cromatina (del Griego chroma = color debido a sus características propias de tinción) es el complejo ADN-proteínas cromosómicas (histonas y no histonas) (Garndner, 1998).

Los cromosomas normales presentan un solo centrómero, constricción primaria o central, el cual se ve al microscopio como la parte más estrecha del cromosoma. El centrómero es una región de constricción en la que están unidas las cromátidas hermanas. La palabra centrómero proviene de las raíces griegas Kentro = centro y Meros = parte. El centrómero delimita los brazos cromosómicos. Los brazos cortos se designan con la letra p (de petit) y los largos con la letra q (de queue) (Fig. 2). De acuerdo a la posición del centrómero en el cromosoma y por lo tanto el tamaño relativo de los brazos se pueden clasificar en: 1) acrocéntrico si el centrómero esta cerca del final del cromosoma; 2) metacéntrico si el centrómero se encuentra a la mitad del cromosoma y 3) submetacéntrico con brazos del cromosoma son de tamaño distinto. En los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos (excepto el Y) se presentan otros estrechamientos de la cromátida que delimitan una sección terminal del cromosoma, con forma de esfera diminuta llamada satélite cromosómico. Un cromosoma sin centrómero se le llama acéntrico e impide que el cromosoma se una al huso mitótico, provocando que se pierda sin llegar al núcleo de la célula hija. (Strachan, 1999; Luque y Herráez, 2001).

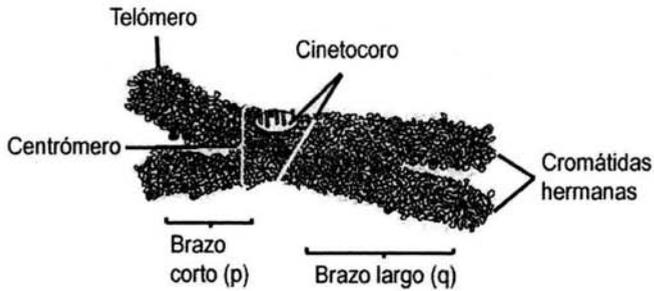


Fig. 2 Morfología de un cromosoma humano

El centrómero como el resto del cromosoma está constituido de cromatina pero presenta un dominio proteico que es el cinetocoro. Esta es la región en la que se unen las fibras que constituyen el huso mitótico (Fig. 2). Las fibras, filamentos contráctiles o microtúbulos, del huso mitótico, son de naturaleza proteica, aportan la tracción necesaria para separar las dos cromátidas hermanas durante la división celular.

La comprensión de la estructura de los centrómeros, al igual que los telómeros, viene de estudios realizados en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) pero los centrómeros de humanos y otros organismos consisten de secuencias cortas y repetidas de ADN, conocidas con ADN  $\alpha$ -satélite. Se sabe que las mismas secuencias repetidas se encuentran en otras regiones del cromosoma (no centroméricas), sin embargo no se tiene claro aún como dan especificidad al centrómero. Estas secuencias son muy ricas en pares Adenina-Timina (AT), tienen unos 170 pares de bases en humanos y se repiten entre 2 000 y 3 000 veces en cada centrómero (Alberts, 2002; Luque y Herráez, 2001 y Wagner, 1993). Los telómeros son las estructuras localizadas en los extremos de los cromosomas lineales eucarióticos, están constituidos por secuencias repetidas en tándem no codificantes (Fig. 2). Tienen usualmente la forma Timina-Guanina (TG) en una cadena y Adenina-Citocina (AC) en la complementaria. Se ha considerado el acortamiento de los telómeros como un reloj biológico celular que mide el proceso de envejecimiento, contando los ciclos que la célula se divide hasta su muerte y

controlando la proliferación correcta en los tejidos (Maser, 2002; Luque- Herráez, 2001 y Nelson, 2002).

### **División celular**

El periodo más largo del ciclo celular se conoce como interfase. La interfase esta divide en tres fases: la fase S o de síntesis del ADN, la fase G1 o primer fase de crecimiento entre la fase de Mitosis (M) y S, y la fase G2 o segunda fase de crecimiento entre la fase S y la M.

La mitosis comprende varios estados de división nuclear: profase, prometafase, metafase, anafase y telofase. Seguida de una división celular o citocinesis.

Como se ve en la figura 2 los cromosomas de las células somáticas se replican durante la fase S del ciclo celular atraviesan la fase G2 y las células se preparan para la mitosis.

Los cromosomas se condensan durante la profase, adoptando el nivel de compactación de ADN conocido como fibras de cromatina. Las cromátidas hermanas se producen por replicación del ADN durante la fase S manteniéndose unidas por el centrómero y alineadas por múltiples puntos en el centro de la célula durante la metafase. Es en la anafase cuando las cromátidas hermanas se separan y migran a polos opuestos del huso mitótico, segregando una de las dos a cada célula hija.

La envoltura nuclear se rompe al inicio de la mitosis en múltiples y pequeñas vesículas que se organizan alrededor de los cromosomas segregados, los cuales se comienzan a descondensar durante la telofase, el último estado de la mitosis. Por último se lleva a cabo la división física del citoplasma o citocinesis que da como resultado las dos células hijas. Siguiendo el ciclo celular, terminada la mitosis las células entran a la fase G1 donde se preparan para una siguiente síntesis de ADN (Garnerd, 1998; Lodish, 2000 y Nelson, 2000).

### **Contenido genético de las células y el ciclo celular**

La mayoría de las células de los humanos son diploides es decir, presentan dos copias del genoma humano. El contenido de DNA y el número cromosómico se

designan como C y n respectivamente. En los humanos  $C = 3.5 \times 10^{-12}$  g aproximadamente y  $n = 23$ .

El ADN contenido en las células diploides es  $2C$  y tienen  $2n$  cromosomas. Las células diploides de nuestro cuerpo se originan de repetidos procesos de mitosis en los ciclos de división celular. Los cromosomas contienen una doble hélice de ADN desde la anafase de la mitosis hasta que es duplicado en la fase S del ciclo celular. De este estado hasta el final de la metafase de la mitosis cada cromosoma consiste en dos cromátidas cada una formada por una doble hélice de ADN, es decir, un par de hélices por cromosomas. El contenido de DNA de una célula diploide ( $2n$ ) antes de la fase S es  $2C$  (dos veces el contenido de una célula haploide  $n$ ) mientras que entre la fase S y antes de la mitosis es  $4C$  (Fig.3).

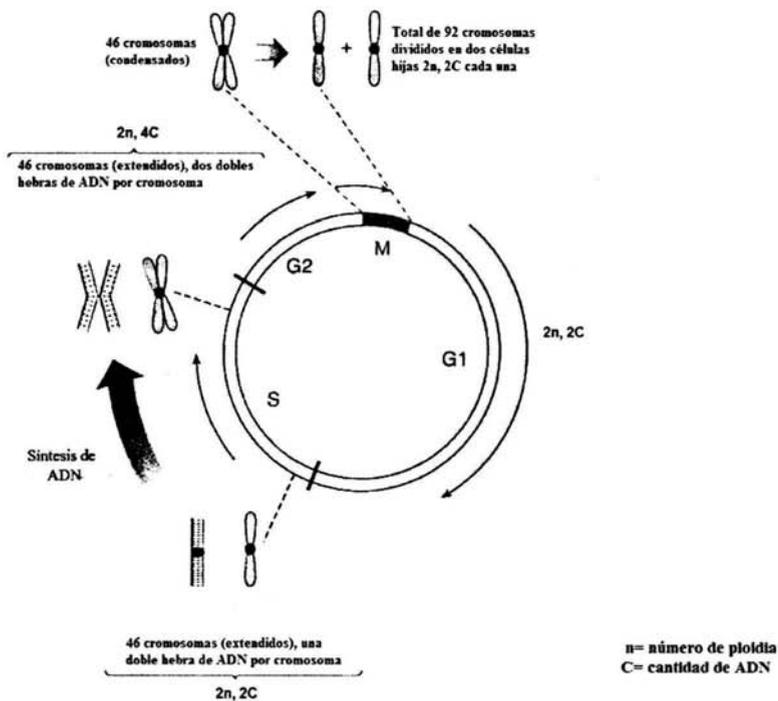


Fig. 3 Contenido de ADN cromosómico durante el ciclo celular (modificado de Strachan, 1999)

## **Aberraciones cromosómicas**

Como su nombre lo indica, se originan por alteración del número o la estructura de los cromosomas produciendo anomalías visibles del cromosoma, las cuales son observables con el microscopio óptico, por lo que se consideran como enfermedades citogenéticas. Son alteraciones que raramente perpetúan, pero cuando lo hacen muestran manifestaciones clínicas muy graves, por lo que pueden considerarse las principales enfermedades genéticas. De hecho son responsables de una gran proporción de abortos espontáneos, malformaciones congénitas, retrasos mentales y tumores. Algunas causas de dichas alteraciones son: errores en los distintos procesos de reparación y la segregación errónea durante la mitosis o meiosis. Las aberraciones caen en dos categorías: 1) alteraciones de la estructura y 2) alteraciones del número. Pueden afectar uno o más autosomas, cromosomas sexuales o ambos de manera simultánea (Salamanca, 1988; Strachan, 1999 y Luque y Herráez, 2001).

### *Aberraciones estructurales*

El mecanismo de aberración estructural se da mediante el rompimiento y reunión de los cromosomas, lo cual origina deleciones, duplicaciones, inversiones y traslocaciones (Gardner, 1998), (Fig.4).

### *Aberraciones numéricas*

Las células somáticas tienen dos copias de cada uno de los 22 autosomas y un cromosoma X y un cromosoma Y o dos cromosomas X; se dice que son diploides (que en griego significa "doble"). Cualquier alteración de esta relación numérica conlleva el riesgo de producir enfermedades ya sea de manera genética o adquirida como lo es el cáncer. (Sack, 2002). Se pueden distinguir tres clases de aberraciones numéricas: la poliploidía, la aneuploidía y la mixoploidía todas asociadas a desarrollo anómalo (Strachan, 1999).

### *Poliploidías*

Se presenta cuando hay una multiplicación del set cromosómico completo, es decir, el número de cromosomas es un múltiplo de  $n$ . Ocasionalmente se han reportado dos complementos cromosómicos euploides: la triploidía ( $3n$  o 69 cromosomas) y la tetraploidía ( $4n$  o 92 cromosomas) (Salamanca, 1988). Una causa de esta anomalía es la endomitosis o la duplicación del DNA sin división celular.

### *Aneuploidías*

Son anomalías 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 es el tipo más frecuente de anomalía cromosómica clínicamente significativo (Salamanca, 1988 y Luque y Herráez, 2001). Las células cancerosas frecuentemente presentan aneuploidías extremas con múltiples anormalidades cromosómicas (Strachan, 1999).

Las aneuploidías más importantes son las siguientes:

- Trisomía: cuando hay un cromosoma adicional ( $2n+1$ )
- Monosomía: si falta un cromosoma ( $2n-1$ )
- Doble trisomía: cuando se encuentran dos cromosomas adicionales de distinto par. ( $2n+2$ )
- Tetrasomía: los dos cromosomas adicionales son del mismo par ( $2n+2$ ). (Salamanca, 1988).

Se sabe que las células aneuploides surgen a través de dos mecanismos principales:

1. Segregación errónea (no disyunción): los cromosomas no segregan correctamente, ya sea durante la meiosis o mitosis (Strachan, 1999).
2. Retardo anafásico: los cromosomas o cromátidas fallan al incorporarse en el núcleo de la célula hija después de la división, resultado de un movimiento retardado durante la anafase (Strachan, 1999), (Fig.4).

### Mixoploidías

La mixoploidía incluye los mosaicos, esto es, cuando un individuo posee dos o más líneas celulares genéticamente diferentes, derivados de un mismo progenitor; y las quimeras término que se da a un individuo que también presenta dos líneas celulares distintas genéticamente, pero que provienen de distintos progenitores. Los mosaicos aneuploides son muy comunes, por ejemplo los mosaicos resultado de tener una proporción de células normales y una proporción de aneuploides triploides, como consecuencia de una anafase retardada. (Strachan, 1999).

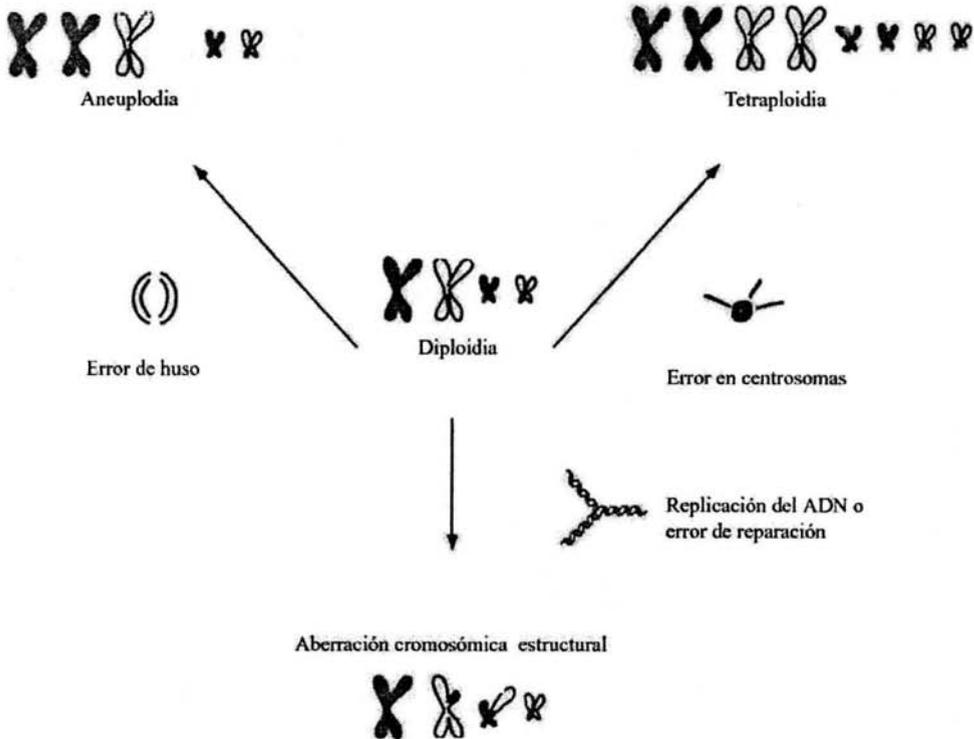


Fig. 4 Origen de Alteraciones cromosómicas (modificado de Hartwell, 1994)

## **Aneuploidías y cáncer**

Hace más de un siglo, que se propuso la aneuploidía como el mecanismo esencial detrás de la transformación cancerosa. La hipótesis se basó en las observaciones de Hansemann de las mitosis asimétricas en cáncer epitelial (Ruhong, 1999), y los trabajos de Boveri en 1900 en los que observó un número anormal de cromosomas en células cancerosas. (Matzke, 2003). Actualmente diversos estudios de cariotipo humano han demostrado en la mayoría de los cánceres una pérdida o ganancia de cromosomas (Lengauer, 1998).

Muchos investigadores consideran que el cáncer se debe a mutaciones a nivel de genes más que a aberraciones a nivel de cromosomas (Ruhong, 1999), y que por lo tanto, la aneuploidía es un efecto tardío del desarrollo del tumor. Sin embargo investigadores como Duesberg afirman que no todos los carcinógenos son mutágenos y una célula para ser cancerosa necesita de la adquisición súbita de nuevas variantes genéticas, sólo sería posible a través de la generación de células que ganan o pierden gran cantidad de información genética en los cromosomas, generando células aneuploídes (Marx, 2002).

La mayoría de los cánceres presentan anormalidades a nivel de cromosomas, ya sean aneuploidías o aberraciones estructurales. Los tumores aneuploídes presentan una frecuencia muy alta de desbalances cromosómicos, debidas a fallas el mecanismo que involucra la disfunción de la segregación cromosómica durante la mitosis.

Algunos ejemplos de aneuploidías presentes en tumores son: la pérdida del cromosoma 10 en gliomastomas, lo que refleja la inactivación del gen supresor de tumores PTEN, y la ganancia del cromosoma 7 en carcinomas renales asociado a una duplicación del encogen MET (Langauer, 1998). Actualmente se tiene claro, que la aneuploidía es uno de los factores que contribuyen a la inestabilidad genómica de células tumorales. Sin embargo, el rol preciso de dicha anomalía en el proceso de carcinogénesis no está claro. Existe evidencia de que tanto las células tumorales como las líneas celulares derivadas de cáncer de próstata, mama, colón, pulmón y cérvix contienen centrosomas con anormalidades en número, tamaño y forma (Coleman y Tsongalis, 2002 y Pihan et al, 2003).

### **Inestabilidad cromosómica en el cáncer cervicouterino**

Estudios citogenéticos de tumores primarios cervicales han mostrado cambios estructurales que involucran cromosoma 1, 4, 5, 11 y 17. (Sreekantaiah, 1987; Atkin, 1990 en Srivatsan, 2002). Mediante estudios de CGH (por sus siglas en inglés: hibridación genómica comparada) de tumores cervicales se identificó la ganancia del cromosoma 3q como un evento recurrente en tumores invasivos y además la pérdida de los cromosomas 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, 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).

### **Metodologías empleadas para la detección de inestabilidad cromosómica**

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. 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 (Schröck, 1996 y 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).

El 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. 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).

### **Fundamento de FISH**

Es una técnica que se basa en el proceso de **desnaturalización** de la cadena dúplex de ADN. Los ácidos nucleicos se desnaturalizan por acción de agentes químicos o físicos, los cuales le hacen perder su conformación tridimensional. La desnaturalización se debe a la ruptura de los puentes de hidrógeno entre los pares de bases y a las interacciones hidrofóbicas entre las bases apiladas al desnaturalizarse el ADN. En consecuencia, las dos hebras se separan sin alterar su estructura primaria ya que no hay ruptura de los enlaces covalentes (Fig.5). Los agentes desnaturalizantes pueden ser químicos como: ácidos, bases y la formamida, o físicos siendo la temperatura el más representativo.

Por otro lado la **renaturalización** del ADN depende únicamente de la complementariedad de secuencias entre las hebras. De esta manera aunque es más probable que se reasocien formando las mismas parejas originales pueden darse otras reasociaciones distintas. Como resultado se tiene la **formación de híbridos** ADN de doble hebra con regiones de apareamiento y no apareamiento. La asociación de moléculas dúplex de ADN que tienen un origen distinto recibe el nombre de híbrido. Los híbridos pueden ser heterodúplex ADN-ARN o los homodúplex ADN-ADN o ARN-ARN (Luque y Herráez, 2001 y Y.S. Fan, 2002). Los ensayos de hibridización se basan en la mezcla de hebras sencillas de ácidos

nucleicos muestra o diana, no marcado, con una sonda de secuencia conocida, marcada, bajo condiciones experimentales que permiten el apareamiento entre bases complementarias, dada la renaturalización se debe contar con un método de **detección de los híbridos** formados, determinado por el tipo de marcaje de la sonda. Durante varios años se han probado una variedad de sondas y estrategias de marcaje para detectar y caracterizar alteraciones cromosómicas. De esta forma se han usado sondas marcadas para el reconocimiento de la región centromérica o pericentromérica para analizar aneuploidías o para cromosomas completos, conocidas también como “painting probes” para detectar alteraciones estructurales. Para la **visualización** del material marcado se hace una contratinción, que permite que el microscopista logre detectar hasta las señales más tenues. La función de los contrastadores es intercalarse en el ADN y fluorescer a similares longitudes de onda de los fluorocromos empleados para FISH (Luque y Herráez, 2001 y Y.S. Fan, 2002).

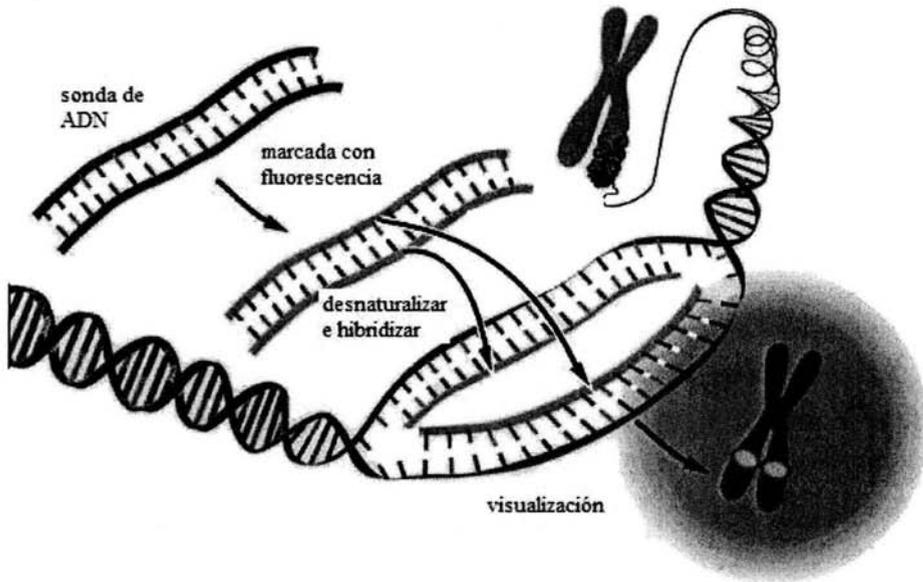


Fig. 5 Técnica de Hibridación *in situ* Fluorescente

## **Micronúcleos y daño genético**

Los micronúcleos (MN) son fragmentos de cromosoma o cromosomas completos que no se incorporan en el núcleo hijo durante la división celular, resultando en la célula hija como pequeños núcleos secundarios. El rompimiento cromosómico y la no disyunción de los cromosomas por mal funcionamiento del huso mitótico o del cinetócoro son causas del origen de los micronúcleos (Heddle, 1991). Desde 1959 Evans y colaboradores establecieron la utilidad del ensayo de MNs como indicador de daño citogenético en *Vicia faba*. Más tarde de Boller y Smith así como Heddle en la década de los 70 contribuyeron a que la prueba de MNs se estableciera como sistema de evaluación de exposición a genotóxicos, sin embargo el paso decisivo estuvo en manos de Fenech y Morley en 1985 al emplear con éxito esta prueba para diferenciar células proliferantes y no proliferantes (Guzmán, 1997). Entre las causas relacionadas con la alta frecuencia de MNs en células epiteliales se encuentran la radiación ionizante, carcinógenos químicos, hábitos de tabaquismo y consumo de alcohol, por lo cual se ha considerado que la predominancia de MNs en puede ser un indicador de riesgo para cáncer en células epiteliales (Tolbert, 1992; Gonsebatt et al, 2000 en Guzmán, 2003). La frecuencia de MNs en células del epitelio cérvicouterino con lesiones precursoras de cáncer cervical, es significativamente mayor que la observada en aquellas que no presentan estas anomalías, es decir, la frecuencia de MNs se incrementa en paralelo con el grado de severidad de la displasia (Guzmán et al., 2003).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El CaCU es un problema de salud pública que afecta de manera importante a nuestro país, ya que es la primera causa de mortalidad en la población femenina. El cáncer cervicouterino al igual que otros tipos de cáncer se caracteriza por presentar muy diversos daños a nivel genético. Las aneuploidias son un indicio de que el material genético de la célula está alterado, tanto por la pérdida como la ganancia de cromosomas. Aunque en el CaCU se ha detectado la presencia de células poliploides y aneuploides en estadios avanzados de la enfermedad como son estadios invasivos, no se han descrito alteraciones numéricas en las lesiones precursoras características de este tipo de cáncer. Los cromosomas 1 y 11 ya han sido empleados como cromosomas marcadores en diversos estudios de aberraciones numéricas cromosómicas en tumores avanzados de cáncer cervicouterino (Mullokandov *et al*, 1996; Haselmeyer *et al*, 1997; Southern and Herrington, 1997; Solinas- Toldo *et al*, 1997; Aubele *et al*, 1998; Kirchhoff *et al*, 1999; Kersemaekers *et al*, 1999; Duensing *et al*, 2000 y Srivatsan *et al*, 2002), puesto que se ha demostrado una alta frecuencia en la pérdida o ganancia de alguno o ambos cromosomas.

En este trabajo se pretende investigar la presencia de alteraciones cromosómicas numéricas en etapas iniciales del cáncer cervicouterino evaluando la frecuencia de aneuploidias y poliploidías en distintas lesiones precursoras del cáncer cervicouterino, con el fin de investigar si existe un patrón específico de alteración numérica en dichas lesiones, que de alguna manera permita caracterizar a nivel citogenético el estado de malignidad del cáncer y que finalmente pudiera contribuir su pronóstico.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Detectar la presencia de células cromosómicamente desbalanceadas (tetraploidías/aneuploidías) en células de epitelio cervical de lesiones precursoras de cáncer cervicouterino mediante el ensayo de FISH.

### **Objetivos particulares**

- Aplicar la técnica de FISH a células epiteliales del cérvix de pacientes con lesiones precursoras de CaCU.
- Evaluar el número de marcas fluorescentes para cada cromosoma 1 y 11.
- Calcular la frecuencia de tetraploidías y/o aneuploidías en los distintos tipos de lesiones precursoras de cáncer cervicouterino.

## **HIPÓTESIS**

La frecuencia de células tetraploides y aneuploides aumenta con la severidad de la displasia en las células exfoliadas cervicouterinas de pacientes con lesiones precursoras de CaCU.

## MATERIAL Y METODOS

### **Población estudiada**

Se estudiaron células exfoliadas cervicouterinas de 42 pacientes que acudían al Servicio de Colposcopia del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) de la Ciudad de México con diagnósticos de lesiones displásicas leves, moderadas y severas como es el Carcinoma intraepitelial y el Carcinoma invasor. 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, género, condiciones socioeconómicas, dieta, hábitos de tabaquismo, alcoholismo, antecedentes familiares, número de parejas sexuales y exposición a factores confusores. 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 utilizó para realizar la prueba de FISH, para lo cual se colocó en un tubo de centrifuga con PBS a 4°C hasta ser procesada en el laboratorio. Se utilizaron los siguientes criterios:

#### Criterios de inclusión:

- i) Pacientes con lesiones displásicas de bajo y alto grado.

#### Criterios de exclusión:

- i) pacientes sometidos a terapia anti-cancerígena
- ii) que presenten otro tipo de virus
- iii) con presencia de otro tipo de tumores

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 solicitó la colaboración de 10 pacientes del hospital Regional 1° de Octubre del ISSSTE. Procediendo de la

misma manera que con las pacientes del INCan. El diagnóstico histopatológico fue realizado en el Departamento de Citopatología del INCan.

### **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. 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) (Apéndice).

### **Preparación de laminillas**

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

### **FISH**

Las muestras se trataron con Proteinasa K (0.5 µg/ml en 2X SSC (ver apéndice) por 12 min a 37 °C, para detener la actividad de la Proteinasa K se enjuagaron con 2X SSC pH 7, temperatura ambiente por 2 min y se post-fijaron con p-formaldehído en PBS al 4% durante 18 min a 4 °C deteniéndolo con un lavado de 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 N<sub>2</sub> gaseoso.

### **Preparación de la sonda**

Se utilizaron sondas de ADN alfa satélite centroméricas para los cromosomas 1 (espectro rojo) y 11 (espectro verde) de la marca Vysis Inc. En un tubo eppendorf se preparó una mezcla de hibridación adicionando 1µl de cada sonda, 1 µl de agua desionizada y 7 µl de Mezcla Maestra (Formamida/2XSSC al 70%) también de Vysis Inc., obteniendo un volumen final de 9 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. Para evitar la evaporación durante la incubación a 37°C, 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 (Apéndice).

### **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, 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 cuantificó 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).

### **Ensayo de micronúcleos**

Se prepararon por goteo laminillas limpias de las mismas 42 muestras empleadas para el análisis de FISH. Se dejaron secar y se les adicionó 10 µl de solución de Hoechst (2µg/ml) se coloca un cubreobjeto y se sella con esmalte de uñas. El conteo de los micronúcleos se hace en el microscopio de epifluorescencia en un total de 1000 células por caso.

### **Análisis estadístico de los datos**

Para determinar si los cromosomas hibridaron con la misma eficiencia se realizó una prueba de "t" de Student pareada de dos colas en donde se compararon los promedios de células con cero marcas para cada uno de los cromosomas.

El análisis de los datos se realizó para cada cromosoma por separado. Se comparó el número de células que presentaban diploidías, tetraploidías y/o aneuploidías en cada categoría de diagnóstico histopatológico mediante un análisis de varianza de Kruskal-Wallis, tomando como significativo cuando  $p < 0.05$ , y se utilizó una prueba post-hoc de Dunn para identificar a los grupos que tuvieran diferencias significativas con los valores normales si  $p < 0.05$ . El mismo procedimiento se siguió para la frecuencia de MN. Para demostrar que el número de células diploides decrece en proporción al grado de lesión cervical se realizó un análisis de correlación de Spearman. Un análisis similar se empleó también para determinar la correlación entre el número de células micronucleadas y el número de células con tetraploidias y aneuploidías. Para que las pruebas se consideraran significativas el valor de p debió ser  $< 0.05$ . Todo el análisis estadístico se llevo a cabo con el software Graph Pad In Stat.

## RESULTADOS

Se analizaron un total de 42 muestras, de las cuales 12 fueron Inflammaciones, 10 LIBG, 10 LIAG y 10 Normales. Se consideraron células diploides como aquellas células que presentaban dos marcas para cada cromosoma, tetraploides como aquellas que presentaban cuatro marcas para ambos cromosomas (Fig. 6). La condición aneuploide se estableció para aquellas células que presentaban tres y más de cuatro marcas para cualquiera de los dos cromosomas. La eficiencia de hibridación se calculó a partir de considerar eficiente una hibridación con menos de 20 núcleos con 0 marca, para cada una de las sondas utilizadas. Una comparación con una prueba de "t" de Student demostró que no hubo diferencias significativas en la eficiencia de hibridación en las dos sondas (Tabla 1).

Tabla 1. Eficiencia de Hibridación

Categoría citopatológica	Cromosoma 1	Cromosoma 11	Valor de P
Normal	2.7	3	0.8013
Inflam	6.6	6.3	0.8752
LIBG	3.3	2.7	0.6414
LIAG	4.1	4.2	0.9445

Promedio  $\pm$  desviación estándar

\* Estadísticamente significativo cuando  $P < 0.05$

### Cromosoma 1

La frecuencia de células diploides, tetraploides y aneuploides para el cromosoma 1 se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Número de células diploides, tetraploides y aneuploides para cromosoma 1

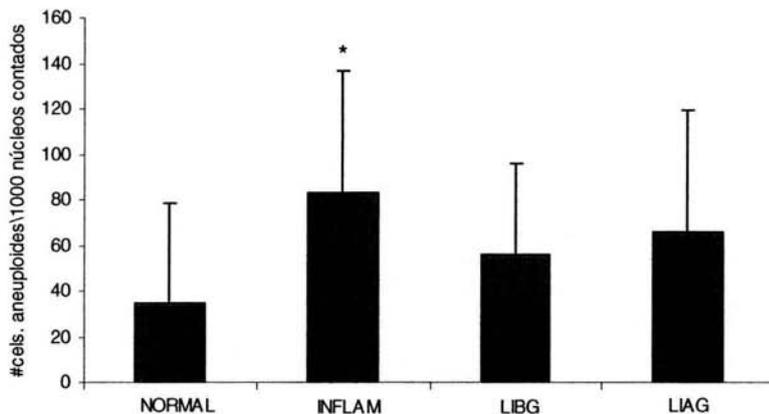
	NORMAL	INFLAM	LIBG	LIAG
DIPLOIDE	855.5 $\pm$ 137.976	750.33 $\pm$ 159.55	829 $\pm$ 114.446	769.4 $\pm$ 105.131
TETRAPLOIDE	41.1 $\pm$ 66.175	53 $\pm$ 60.093	43.6 $\pm$ 53.079	56.3 $\pm$ 70.3563
ANEUPLOIDE	34.8 $\pm$ 43.651	83 $\pm$ 53.523*	55.6 $\pm$ 40.049	65.95 $\pm$ 31.953

Promedio  $\pm$  desviación estándar

\* Estadísticamente significativo cuando  $P < 0.05$

Se observó un incremento significativo ( $p < 0.05$ , Gráfica 1) de células aneuploides en las muestras con diagnóstico inflamatorio pero no en LIBG y LIAG.

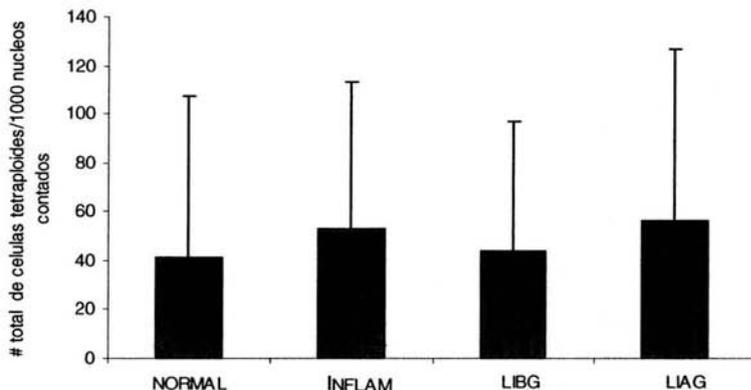
Gráfica 1. Análisis del número de células aneuploides para el cromosoma 1



Promedio ± desviación estándar  
\* Estadísticamente significativo cuando  $P < 0.05$

Cuando se comparó el número de células tetraploides, no se encontró una diferencia significativa entre los grupos (ANOVA de Kruskal-Wallis,  $p > 0.05$ , Gráfica 2).

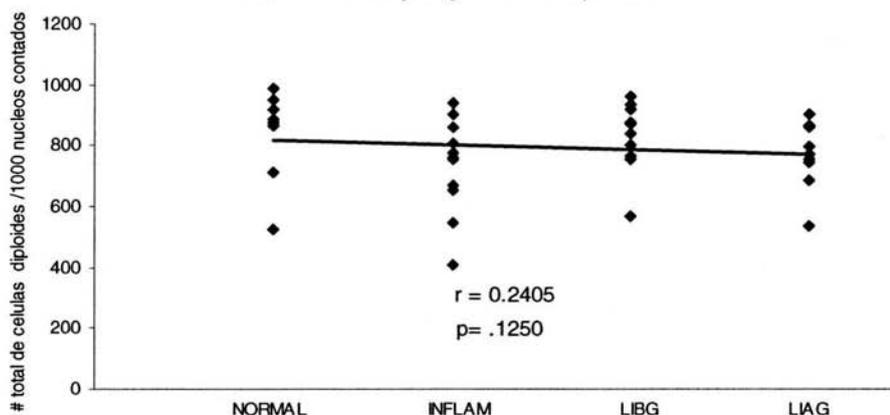
Gráfica 2. Análisis del número de células tetraploides para el cromosoma 1



Promedio ± desviación estándar  
\* Estadísticamente significativo cuando  $P < 0.05$

A pesar de que se aprecia una disminución progresiva de células diploides en las muestras displásicas, no se encontró una asociación entre el número de células diploides y el diagnóstico citopatológico (Correlación de Spearman,  $p = 0.1250$ ,  $r = 0.2405$ , Gráfica 3).

Gráfica 3. Correlación no significativa entre el número de células diploides para el cromosoma 1 y el grado de displasia



### Cromosoma 11

En la Tabla 3 se muestran las frecuencias de diploidias, tetraploidias y aneuploidias para el cromosoma 11.

Tabla 3. Número de células diploides, tetraploides y aneuploides para cromosoma 11

	NORMAL	INFLAM	LIBG	LIAG
DIPLOIDE	922.2±43.812	778.66±172.335	795.8±105.644	795.8±105.644
TETRAPLOIDE	6.6±4.9993	47.08±51.248	22.6±25.722	41.7±54.520
ANEUPLOIDE	17.9±16.175	77.29±56.571	37.55±21.6056	51.8±32.896

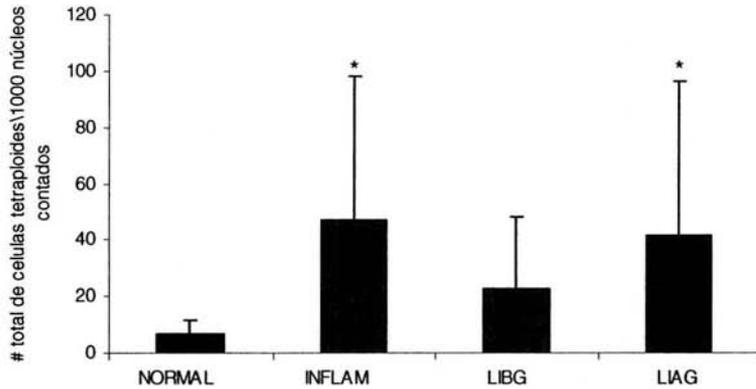
Promedio ± desviación estándar

\*Estadísticamente significativo cuando  $P < 0.05$

\*\*Estadísticamente significativo cuando  $P < 0.01$

Se observó un decremento significativo ( $p < 0.05$ ) en el número de células diploides para el diagnóstico LIAG, pero no para LIBG ni inflamatorias. En el caso de las tetraploidias, se observó una progresión en el número de células con ésta condición, el análisis de varianza arrojó una diferencia significativa entre los grupos ( $p = 0.0290$ ), mostrando significancia ( $p < 0.05$ ) entre normales vs Inflamación y normales vs LIAG (Gráfica 4).

Gráfica 4. Análisis del número de células tetraploides para cromosoma 11

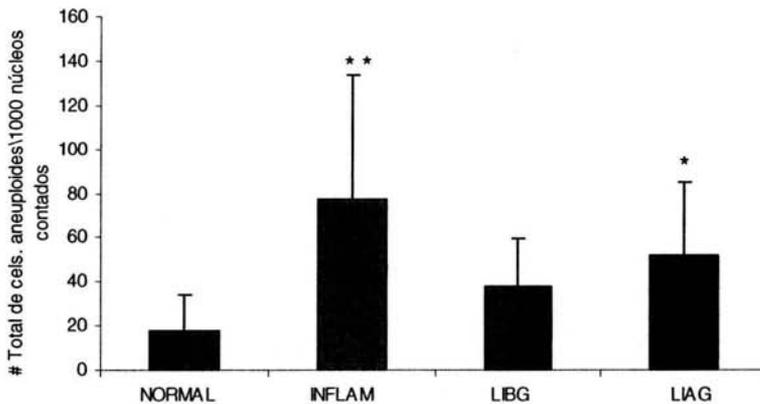


Promedio ± desviación estándar

\* Estadísticamente significativo cuando  $P < 0.05$

El número de células aneuploides se incrementó para el cromosoma 11, de manera significativa al comparar entre las categorías citopatológicas, el análisis de varianza demostró una diferencia significativa ( $p = 0.0074$ ), mostrando significancia ( $p < 0.05$ ) para los grupos inflamación y LIAG (Gráfica 5).

Gráfica 5. Análisis del número de células aneuploides para cromosoma 11



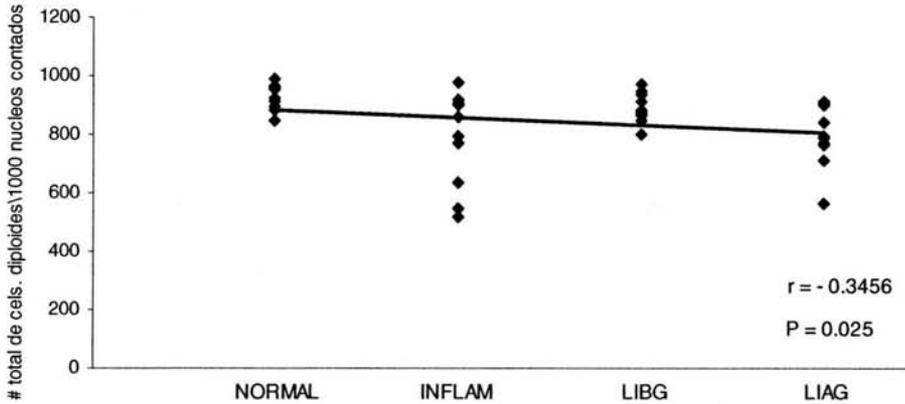
Promedio ± desviación estándar

\*Estadísticamente significativo cuando  $P < 0.05$

\*\*Estadísticamente significativo cuando  $P < 0.01$

Existe una correlación negativa entre el número de células diploides y el grado de lesión (Correlación de Spearman,  $p = 0.0250$   $r = - 0.3456$ , Gráfica 6).

Gráfica 6. Correlación negativa entre el número de diploidias para el cromosoma 11 y categoría displásica



\*Estadísticamente significativo cuando  $P < 0.05$

### Micronúcleos

Los datos de FISH parecen sugerir un aumento de células aneuploides y tetraploides a medida que aumenta el grado de displasia para el cromosoma 11. La pérdida de cromosomas podría originar un aumento de micronúcleos por lo que se analizó su presencia en las mismas 42 muestras. Se analizaron un total de 1000 células consecutivas por caso. La frecuencia de células micronucleadas fue significativamente elevada para la categoría de Inflammatorias y LIAG en comparación con las Normales (Tabla 4).

Tabla 4. Número de células micronucleadas

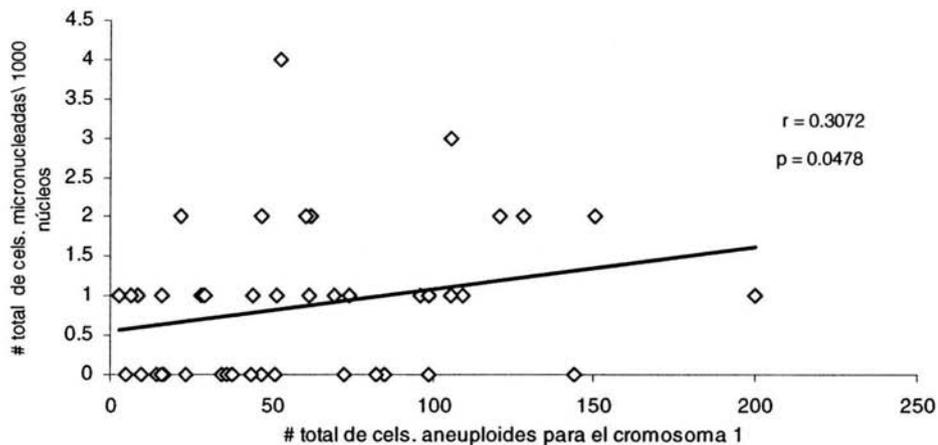
	N	Promedio
Normal	10	0.20±0.42
Inflam.	12	1.08±0.90*
LIBG	10	1.00±0.81
LIAG	10	1.20±1.22*

Promedio ± desviación estándar

\* Estadísticamente significativo vs control cuando  $P < 0.05$

Se realizó un análisis de correlación entre la frecuencia de micronúcleos y la cantidad de células tetraploides y/o aneuploides para cada uno de los dos cromosomas. Para el cromosoma 1 se encontró una correlación significativa entre el número de aneuploidias y número de células con micronúcleos (Correlación de Spearman,  $p= 0.0478$   $r = 0.3072$ , Gráfica 7),

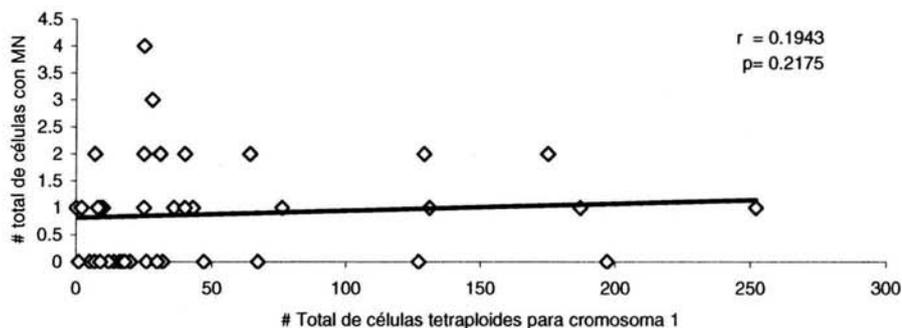
Gráfica 7. Correlación entre número de células con micronúcleos y aneuploidias para cromosoma 1



\*Estadísticamente significativo cuando  $P < 0.05$

pero no hubo significancia al hacer esto mismo con el número de células tetraploides (Correlación de Spearman,  $p = 0.2175$   $r = 0.1943$ , Gráfica 8).

Gráfica 8. Correlación entre número de células con micronúcleos y tetraploidias para cromosoma 1



\*Estadísticamente significativo cuando  $P < 0.05$ .



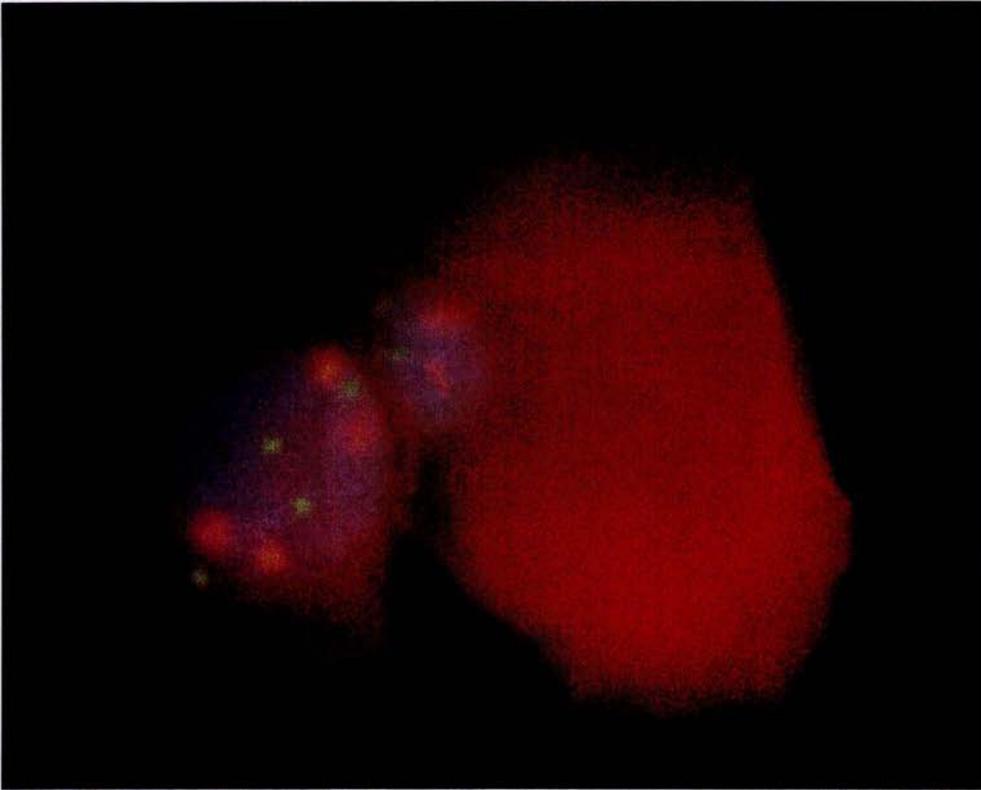


Fig. 6. Esquema de FISH para cromosoma 1(marca roja) y 11(marca verde), contrastada con DAPI. Se muestra una tetraploidía (izquierda) y una diploidía (derecha) en células de epitelio de lesiones precursoras de cáncer cervicouterino.

## DISCUSIÓN

Se ha descrito ampliamente que la mayoría de las células cancerosas son marcadamente aneuploides (Shackney, 1989; Andreassen, 1996 y Duesberg, 2001). Ello ha llevado a postular que la formación de células aneuploides es esencial en el desarrollo de un tumor (Duesberg, 2001). Sin embargo, pocos reportes describen la aparición de células aneuploides en las lesiones precursoras, que caracterizan el desarrollo del CaCU. En un intento por determinar la presencia de aneuploidías en lesiones precursoras de CaCU, así como para identificar la posible pérdida o ganancia preferencial de algún cromosoma en estas condiciones, realizamos este estudio preliminar.

Nuestros resultados indican que el proceso de inestabilidad cromosómica (formación de células aneuploides y tetraploides) comienza a manifestarse desde las etapas iniciales del proceso de alteración de las células cervicales, confirmando nuestros hallazgos previos (Guzmán et al., 2003; Olaharski y Eastmond, 2004 y Olaharski et al., 2004) y corroborando la importancia diagnóstica de este tipo de ensayos. Debido a lo reducido de la muestra, no logramos identificar claramente un patrón de aneuploidización que presente una secuencia de estadios intermedios inestables, como los que ya se han reportado para células provenientes de lesiones precursoras de CaCU (Olaharski y Eastmond, 2004; Olaharski et al., 2004), sin embargo determinamos que el número de células tetraploides y aneuploides incrementa con el grado de lesión del cérvix. Cabe resaltar la presencia de tetraploidías y aneuploidías en las inflamatorias, donde no se esperaría encontrar tan elevados niveles de alteraciones numéricas de los cromosomas por no ser consideradas displásicas.

El cromosoma 1 resulta indicativo de inestabilidad cromosómica sólo en la lesiones de tipo inflamatorio y no en las displásicas, mientras que las alteraciones numéricas del cromosoma 11 se observaron tanto en inflamaciones como en las lesiones de alto grado. Por otro lado, encontramos una clara correlación negativa entre la presencia de células diploides para el cromosoma 11 y displasias, por lo que se infiere que existe un decremento en el número de células con complemento normal conforme aumenta el grado de lesión cervicouterina. Estos

hallazgos pueden deberse a una mayor participación del cromosoma 11 en este proceso displásico lo cual ha sido documentada en estudios previos (Southern y Harrington, 1997; Graham *et al*, 1998; Duensing *et al*, 2000 y Srivatsan *et al*, 2002). La pérdida del cromosoma 11 ha sido reportada frecuentemente en lesiones intraepiteliales cervicales y en carcinoma invasivo del cérvix (Kersemaekers *et al*, 1999 y Mullokandov *et al*, 1996 y Southern y Herrington, 1997). Aunque en menor proporción, también existen reportes en los que se detectado la ganancia del cromosoma 11 en cultivos celulares de keratinocitos que expresan las proteínas E6 y E7 de VPH16 (Duensing *et al*, 2000); así como en líneas celulares de tumores cervicales (Hidalgo *et al*, 2000). Estudios han postulado la presencia tanto de un gen supresor (cuando se pierde el cromosoma 11) como de un proto-oncogen (cuando se gana un cromosoma 11) en cáncer cervical, por lo que cromosoma 11 se vuelve un candidato importante en la investigación citogenética molecular (Solinas-Toldo, 1997) y (Southern y Herrington, 1997).

Los MN son biomarcadores que describen el daño genético que puede presentar un tejido expuesto a algún proceso genotóxico. En este trabajo observamos un incremento significativo de la frecuencia de MN en las muestras inflamatorias y en las lesiones de alto grado, de manera similar a lo observado en un estudio retrospectivo en donde se analizaron más de 250 muestras con distintos grados de displasia (Guzmán *et al*, 2003) y en otro estudio con un número menor de casos analizados (Leal-Garza *et al*, 2002). Consideramos que este parámetro resulta importante porque reafirma los hallazgos del estudio en el sentido de que la progresión de la transformación maligna involucra un incremento en la frecuencia de células con alteraciones cromosómicas, documentables en frotis de células exfoliadas.

En el estudio de Guzmán *et al*, 2003 se sugirió que, los micronúcleos podrían estar formados de cromosomas completos debido al tamaño de los MN, sugiriendo que podrían indicar la generación de células aneuploides. Si la hipótesis es cierta se esperaría observar una correlación positiva entre el número de células micronucleadas y el número de células aneuploides. En este estudio se observó

una correlación positiva y significativa entre la frecuencia de células con MN y la proporción de células con aneuploidías o tetraploidías para ambos cromosomas, lo que sugeriría que parte de los MN se formarían por cromosomas enteros, lo cual fue confirmado por Olaharski *et al*, 2004. Con la utilización de sondas pancentroméricas, documento que aproximadamente el 50% de los MN daban tinción positiva para la sonda pancentromérica.

Una especial atención merece la categoría de Inflamación por haber presentado el mayor número de aberraciones numéricas cromosómicas (tetra/aneuploidias) en especial aneuploidias. Tenjin y cols. en 1979 encontraron que núcleos con cambios regenerativos como los que están presentes en Inflamaciones pueden tener ADN diploide, triploide y aun tetraploide pero casi nunca aneuploide (Alonso *et al*, 2000). Este resultado indicaría que: 1) existen células con alteraciones cromosómicas numéricas en inflamaciones, las cuales ni siquiera están consideradas como displasias, lo que demostraría la sensibilidad de nuestro análisis para detectar cambios celulares muy tempranos; 2) el elevado número de aneuploidías en inflamaciones, representaría un riesgo de desarrollar lesiones más avanzadas y 3) que éste resultado se deba a procesos inflamatorios propios de la célula como el incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno, las cuales a su vez ocasionan daño oxidativo a proteínas y al ADN, lo cual podría incrementar la presencia de células cromosómicamente alteradas (Coussens y Werb, 2002).

ASCUS o Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance es un diagnóstico incluido también en el sistema Bethesda, el cual es vago y ambiguo pues incluye aquellos diagnósticos que no presentan una LIBG ni LIAG pero que tampoco son completamente Normales (Bonfiglio, 2002). De ahí que pueda darse similitud entre los diagnósticos Inflamatorio y ASCUS en cuanto al seguimiento que reciben las pacientes, que en muchos de los casos es prolongado pues se solicitan exámenes posteriores durante uno o dos años debido esto a la imprecisión del diagnóstico mismo. Nuestros hallazgos de que encontramos una elevada frecuencia de aneuploidías para cromosomas 1 y 11 en tejido con diagnóstico Inflamatorio y tetraploidias para el cromosoma 11, coincide con lo que

demuestra el estudio realizado por Olaharski y Eastmond, 2004 en pacientes con diagnóstico de ASCUS. Pensamos que un análisis como el realizado en este estudio además de identificar aberraciones numéricas en esta categoría podría representar una oportunidad de mejorar el seguimiento clínico de estas pacientes. Existe evidencia de que la infección por VPH puede crear un ambiente donde las células tetraploides pueden desarrollarse y proliferar. Se ha identificado que las oncoproteínas virales E6 y E7 son capaces de alterar el ciclo celular, pues estas oncoproteínas pueden unirse a las proteínas celulares p53 y Rb respectivamente, que son responsables de regular la síntesis de DNA, el ciclo celular y la duplicación de centrosomas (Di Leonardo, *et al*, 1997). Aberraciones en el número de centrosomas se han visto implicadas en la aneuploidía y tumorigénesis (Meraldi *et al*, 2002). Las proteínas E6 y E7 están implicadas en la alteración de la mitosis por su habilidad al inducir alteraciones a nivel de centrosomas. Se conoce que E7 conduce a errores en la duplicación de centrosomas en células fenotípicamente normales, ya que se ha visto que E7 desregula la actividad de cdk2 la cual determina la duplicación centrosómica. y la expresión de E6 resulta en la acumulación de centrosomas múltiples en células multinucleadas (Duesing *et al*, 2001; Duesing y Munger, 2002). Reportes previos han identificado la presencia de tetraploidía, en células de epitelio cervical asociadas a la presencia de VPH de alto riesgo, que pueden ser inducidas por la expresión de la E7 *in vitro*. Además como se conoce que el VPH se integra al genoma de la célula durante el proceso de carcinogénesis, las aberraciones estructurales podrían ser resultado de la integración (Southern *et al*, 1997 y Southern *et al*, 2001).

Todos los estudios mencionados anteriormente se han desarrollado en líneas celulares infectadas con VPH o transfectadas con vectores que contienen a las proteínas mencionadas, asimismo los trabajos que documentan la presencia de alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales se realizaron en biopsias de tumores, por lo que consideramos que nuestro estudio tiene gran relevancia ya que pudimos documentar cambios relevantes que demuestran la presencia de inestabilidad genética en tejido cervicouterino sin necesidad de la obtención de biopsias, lo cual hace que este ensayo tenga una aplicación diagnóstica potencial.

## CONCLUSIONES

Las aberraciones cromosómicas numéricas (tetraploidías/aneuploidías) se manifiestan en etapas tempranas del proceso de carcinogénesis del cuello de útero.

El incremento significativo de células aneuploides para los cromosomas 1 y 11 en el diagnóstico inflamatorio, merece especial atención, ya que puede indicar la presencia de inestabilidad genómica en diagnósticos no considerados displásicos.

Asimismo puede indicar la inducción de genotoxicidad por otros agentes, que podría facilitar el inicio de procesos de inestabilidad cromosómica, incrementándose con la presencia del VPH.

## BIBLIOGRAFÍA

📖 Alberts, B., et al. (2002). **Molecular Biology of the Cell**. 4a edition, Garland Science, USA. p 198, 226- 229, 232-233.

📖 Alonso de Ruiz, P. Lazcano E. y Hernández M. (2000) **Cáncer Cervicouterino**. Diagnóstico, prevención y control. Ed. Medica Panamericana, México 254 pp.

📖 Andreassen, P., Martineau, S. and Margulis, R. **Chemical induction of mitotic checkpoint override in mammalian cells results in aneuploidy following a transient tetraploid state**. Mutation Research. (1996) 372 181-184.

📖 Aubele, M., Zitzelberger, H., Schenck, U., Walch, A., Höfler, H. and Wegner, M. **Distinct Cytogenetics Alterations in Squamous Intraepithelial Lesions of the Cervix Revealed by Laser-Assisted Microdissection and Comparative Genomic Hybridization**. Cancer (Cancer Cytopathology) (1998) 84:6 375-379.

📖 Bonfiglio, T. **Atypical Squamous Cell of Undetermined Significance: a continuing controversy**. Cancer Cytopathology. (2002) 96:3 125-128.

📖 Coleman, W. and Tsongalis, G. (2002). **The Molecular basis of Human Cancer**. Humana Press. USA. , p 115-123, 152-155 y 233-236.

📖 Coussens, L. y Werb, Z. **Inflammation and cancer**. Nature (2002) 240 19 860-867.

📖 Di Leonardo, A., Khan, S.H., Linke, S., Greco, V. and Seidita, G. **DNA Rereplication in the Presence of Mitotic Spindle Inhibitors in Human and Mouse Fibroblast Lacking either p53 or pRb Fuction**. Cancer Research 57 (1997) 1013-1019.

📖 Duensing, S., Duensing, A., Crum, C. and Münger, K. **Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein-induced abnormal centrosome synthesis is an early event in the evolving malignant phenotype.** *Cancer Research* 61 (2001) March 15 2356-2360.

📖 Duensing, S., Lee, L., Duensing, A., Basile, J., Piboonniyom, S., González, S., Crum, C. and Münger, K. **The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle.** *Proc. Natl. Acad. Sci USA* (2000) 67: 18 1002-1007.

📖 Duensing, S. y Münger, K. **Human papillomaviruses and centrosome duplication errors: modeling the origins of genomic instability.** *Oncogene* (2002) 21: 6241-6248.

📖 Duesberg, P., Stindl, R., Li, R., Hehlmann, R. and Rasnick, D. **Aneuploidy versus gene mutation as cause of cancer.** *Current Science* (2001) 81: 5 490-500.

📖 Eastmond D., Schuler, M. y Rupa, D. **Advantages and limitations of using fluorescence in situ hybridization for the detection of aneuploidy in interphase human cells.** *Mutation Research* (1995) 348 153-162.

📖 Einstein, M. y Goldberg, L. **Human Papillomavirus and Cervical Neoplasia.** *Cancer Investigation* (2002) 20:7 1080-1085.

📖 Gardner, E., Simmons, M. and Snustad, D. (1998). **Principios de Genética.** 4ª edición. Ed. Limusa Wiley. México. 199 pp.

📖 Graham, D., Southern, S., Mc Dicken, I. and Herrington, S. **Interphase cytogenetic evidence for distinct genetic pathways in the development of**

**squamous neoplasia of the uterine cervix.** Laboratory Investigation (1998) 78:3 289-296.

☞Guzmán P. Sotelo-Regil, R., Mohar, A. and Gonsebatt, M.E. **Positive correlation between the frequency of micronucleated cell and dysplasia in papanicolaou smears.** Environmental and Molecular Mutagenesis (2003) 41 339-343.

☞Guzmán, D.P. (1997) **Evaluación de la presencia de micronúcleos en células epiteliales como prueba para detectar exposición crónica a arsénico.** Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM.

☞Hartwell, L. and Kastan M.B. **Cell cycle control and cancer.** Science (1994) 266 December 16 1821-1828.

☞Heddle, J.A., Cimino, M.C., Hayashi, F., Romagna, M.D., Shelby, M.D., Tucker, J.D., Vanparys, P. and Mc Gregor, J.T. **Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past present and future.** Environmental and Molecular Mutagenesis (1991) 18 277-291.

☞Heselmeyer, K., Macville, M., Schröck, E., Blegen, H., Hellström, A., Shrah, K., Auer, G. and 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 (1997)19 233-240.

☞Hidalgo, A., Schewe, C., Petersen, S., Salcedo, M., Garilio, P., Schlüns, K., Dietel, M. and Petersen, I. **Human papilloma virus status and chromosomal imbalances in primary cervical carcinomas and tumor cell lines.** European Journal of Cancer (2000) 36 542-548.

📖 IARC. **Monograph on the evaluation of Carcinogenesis Risks to Human Papillomavirus**. International Agency for Research of Cancer, (1995) 64 409 pp.

📖 Kastan, M.B. (1997). **Current topics in Microbiology and Immunology**. Vol 221. Genetic Instability and Tumorigenesis. Springer, USA. p 1-17.

📖 Kersemaekers, A., van de Vijver, M., Kenter, G. and Fleuren, G. **Genetic Alterations During the Progression of Squamous Cell Carcinomas of the Uterine Cervix**. *Genes, Chromosomes & Cancer* (1999) 26 346-354.

📖 Kirchoff, M., Rose, H., Petersen, B., Maahr, J., Gerdes, T., Lundsteen, C., Bryndorf, T., Kryger-Baggesen, N., Christensen, L., Engelholm, S. and Philip, J. **Comparative Genomic Hybridization reveals a recurrent pattern of chromosomal aberrations in severe dysplasia/carcinoma in situ of cervix and advanced –stage cervical carcinoma**. *Genes, Chromosomes & Cancer* (1999) 24 144-150.

📖 Leal, C., Cerda, R., Leal, E. and Cortés, E. **Micronuclei in cervical smears and peripheral blood lymphocytes from women with and without cervical uterine cancer**. *Mutation Research* (2002) 515: 57-62.

📖 Lengauer, C., Kinzler, W. and Vogelstein, B. **Genetic instabilities in human cancers**. *Nature* (1998) 396 December 17 643-650.

📖 Li, R., Sonik, A., Stindl, R., Rasnick, D. and Duesberg, P. **Aneuploidy vs. Gene mutation hypothesis or cancer recent study claims mutation but is found to support aneuploidy**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. (2000) 97: 7 3236-3241.

📖 Lodish, H. (2000) **Molecular Cell Biology**. 4a edición. Freeman and Company. USA, p 496-499.

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.

Mark, H., Fieldman, D., Samy, M., Sun, C.L., Das, S., Mark, S. and Lathrop, J. **Assessment of Chromosome 8 copy number in cervical cancer by fluorescent in situ Hybridization.** Experimental and Molecular Pathology (1999) 66 157-162.

Marx, J. **Debate Surges Over the Origins of Genomic Defects in Cancer.** Science (2002) 297 544-546.

Maser, R., and DePinho, R. **Connecting Chromosomes, Crisis and Cancer.** Science (2002) 297 565-569.

Matzke, M., Florian, M., Kanno, T. and Matzke, A. **Does the intrinsic instability of aneuploid genomes have a causal roles in cancer?** Trends in Genetics (2003) 19 May 253-255.

Meraldi, P., Honda, R. and Nigg, E. **Aurora A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p 53 -/- cells.** The EMBO Journal (2002) 21 483-492.

Mian, C., Bancher, D., Bancher, D., Kohlberger, P., Kainz, C., Haitel, A., Czerwenka, K., Stani, J., Breiteneker, G and 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.

Mullokanov, M., Kholodilov, N., Atkin, N., Burk, R., Johnson, A. and Klinger, H. **Genomic alterations in cervical carcinoma: losses of chromosome**

**heterogeneity and human papilloma virus tumor status.** Cancer Research (1996) 56 January 1 197-205.

▣ Nelson, D. and Cox, M. (2002). **Lehninger. Principles of Biochemistry.** 3ª edición. USA, 907-911.

▣ Olaharski, A. and Eastmond, D.A. **Elevated Levels of Tetraploid Cervical Cell in Human Papillomavirus- Positive Papanicolaou Smears Diagnosed as Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance.** Cancer Cytopathology (2004) 102:3 192-199.

▣ Olaharski, A., Sotelo Regil, R., Solorza, G., Gosebatt, M.E., Guzmán, P., Mohar, A. and Eastmond, D.A. (2004) **Induction of Aneuploidy During Cervical Carcinogenesis: Evidence for an Instable Tetraploid Intermediate.** Manuscrito en preparación.

▣ Pihan, G. Wallace, J. Zhou, Y. and Doxey J. **Centrosome abnormalities and chromosome instability occur together in pre-invasive carcinomas.** Cancer Research (2003) 63 March 15 1398-1404.

▣ Sack, G. (2002). **Genética Médica.** Mc Graw Hill Interamericana. México, 55.56.

▣ Salamanca, F. (1988). **Citogenética Humana.** Ed. Panamericana, México, 83-86.

▣ Schär P. **Spontaneous DNA damage, Genomic Instability, and Cancer when DNA replication escapes control.** Cell 104 (2001) February 9 329-332.

▣ 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. and Ried, T.

**Multicolor Spectral Karyotyping of Human Chromosomes.** Science (1996) 273 494-947.

Shackney, S., Smith, C., Miller, B., Burholt, D., Murtha, K., Giles, H., Ketterer, D. and Pollice, A. **Model for the genetic evolution of human solid tumors.** Cancer Research (1989) 49 3344 -3354.

Shan Fan, Y. (2002). **Molecular Cytogenetics. Protocols and Applications.** Methods in Molecular Biology. Vol 204. Ed Humana Press Inc. USA p 3- 12.

Solinas-Toldo, S., Dürst, M. and Lichter, P. **Specific chromosomal imbalances in human papillomavirus transfected cells during progression toward immortality.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1997) 94 3854-3859.

Southern, S. and Herrington, S. **Interphase karyotypic analysis of chromosomes 11, 17 and X in invasive squamous-cell carcinoma of the cervix: morphological correlation with HPV infection.** Int. J. Cancer (1997) 70 502-507.

Southern, S., Evans, M. and Herrington S. **Basal cell tetrasomy in low -grade cervical squamous intraepithelial lesions infected with high-risk human papillomaviruses.** Cancer Research (1997) 57 October 1 4210-4213.

Southern, S., Noya, F., Meyers, C., Broker, T., Chow, L. y Herrington, S. **Tetrasomy is induced by Human Papillomavirus type 18 E7 gene expression in keratinocyte raft cultures.** Cancer Research (2001) 61 June 15 4858-4863.

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. and Redpath, J.

**Localizations of deletion to a 300 Kb interval of chromosome 11q13 in cervical cancer.** *Oncogene* (2002) 21 5631-5642.

📖 Strachan T. (1999). **Human Molecular Genetics 2.** 2a edición Wiley-Liss. New York USA. P 28-52.

📖 Tolbert, P., Shy, C. and Allen, J. **Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears methods development.** *Mutation Research* (1992) 271 69-77.

📖 Wagner, R., Maguire, M. and Stallings, R. 1993. **Chromosomes: A synthesis.** Wiley- Liss. USA, 66-76.

📖 Zuher, N. (1996). **Cytopathology**, 4<sup>a</sup> edition. Little Brown and Company. USA. p 1-5, 127-145.

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

## APÉNDICE

### PBS 10X (Sol. Stock)

NaCl.....	[137 mM ]
KCl.....	[ 2.7 mM ]
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O .....	[4.3 mM ]
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	[1.4 mM ]

ajustar el pH en 7.0-7.4

### 20X SSC (Sol stock)

NaCl.....	[ 3 M ]
Citrato de sodio .....	[0.3 M]
ajustar pH 7.0-7.4 con HCl.....	[ 1M ]

### Formamida 70% (40 ml )

formamida (Sigma- Aldrich Co.) .....	20 ml
20 X SSC.....	4 ml
H <sub>2</sub> O desionizada.....	16 ml

Ajustar pH 7.0-7.4

### Paraformaldehido 4%

p-formaldehído (Sigma- Aldrich Co.) .....	4 g
Mg Cl <sub>2</sub> [100 mM ].....	50 ml
PBS 2X pH 7.....	350 ml

Para disolver se calienta en Baño María o sobre una plancha caliente con agitación frecuente hasta que quede transparente, se deja enfriar y se filtra.  
Se ajusta pH 7.0 - 7.4 con Na OH

### Poli-lisina 0.1%

5 ml de Poly- L – lisina (Sigma- Aldrich Co.) aforar a 45 ml de H<sub>2</sub>O desionizada.

### Proteinasa K

5 µg/ml de Proteinasa K (Sigma- Aldrich Co.) en 2X SSC  
ajustar pH 7.0 -7.4

**DAPI -ANTIFADE**

1µl de solución stock de DAPI en 99 µl de solución stock de Antifade. Conservar a -20°C en oscuridad.

**DAPI (4´ , 6- Diamino-2-fenilindol)**

Solución stock: 1 mg ml en H<sub>2</sub>O destilada

**Antifade ( p- Fenilenediamina)**

Solución stock: 10 mg ml en solución salina de fosfatos (pH 8.2)