

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



TESIS

**EVALUACIÓN DE DAÑO CROMOSÓMICO ESPECÍFICO MEDIANTE
DBD-FISH EN PACIENTES CON CÁNCER BUCAL**

POR

JORGE GUILIBALDO GARZA MOLINA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN
INMUNOBIOLOGÍA**

NOVIEMBRE, 2016

COMITÉ DE TESIS

**EVALUACIÓN DE DAÑO CROMOSÓMICO ESPECÍFICO MEDIANTE DBD-FISH
EN PACIENTES CON CÁNCER BUCAL**

Dr. Pablo Zapata Benavides

Presidente

Dr. Moisés A. Franco Molina

Secretario

Dra. Elva Irene Cortés Gutiérrez

Vocal

Dr. Edgar Mendoza Gamboa

Vocal

Dra. Laura María Trejo Ávila

Vocal

DIRECCIÓN DE TESIS

EVALUACIÓN DE DAÑO CROMOSÓMICO ESPECÍFICO MEDIANTE DBD-FISH
EN PACIENTES CON CÁNCER BUCAL

Dr. Pablo Zapata Benavides

DIRECTOR INTERNO

Dra. Elva Irene Cortés Gutiérrez

DIRECTOR EXTERNO

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial a mis directores de tesis la Dra. Elva Irene Cortes Gutiérrez y al Dr. Pablo Zapata Benavides, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continúa de la misma, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de este tiempo.

Especial reconocimiento merece el interés mostrado por mi trabajo y las sugerencias recibidas del M.C. Edgar Manilla Muñoz, con el cual me encuentro en deuda por el ánimo infundido y el apoyo brindado.

Quisiera hacer extensiva mi gratitud a mis compañeras M.C. Catalina Garcia Vielma y QCB. Sanjuana Guardado Limón del Departamento de Citogenética Molecular del CIBIN por el gran apoyo que me ofrecieron, por sus enseñanzas y por su amistad.

Extiendo también mi agradecimiento a mi compañera y amiga C.D. Amelia Cerda López por sus aportaciones a este trabajo en la parte de la toma de muestras de pacientes, además agradezco su amistad y compañía en esa etapa de colecta y procesamiento de muestras.

Quiero agradecer a mis amigos que siempre han estado ahí a mi lado, especialmente a Omar, Beto, Daniela, Arturo, Álvaro, Tere, Buba, Oscar, Martha, Chilo, Eduardo, Karlita y Yolis y entre muchos más que no acabaría de nombrarlos.

Agradezco a la Facultad de Ciencias Biológicas, al Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS y a CONACYT por aceptarme y brindarme esta oportunidad de continuar con mi crecimiento académico.

También quiero dar las gracias al Dr. José Manuel Faz Eguía de la Clínica 23 del IMSS, por su colaboración en el suministro de los datos y muestras necesarias para la realización de esta investigación.

Por ultimo quiero agradecer a mi cómplice en esta vida, a mi pareja Emmanuel Robles, agradezco todo ese apoyo, ánimo, ayuda y amor que no para de brindarme. Gracias por hacer ligero este camino el cual algunas veces se me dificulto y sobre todo en la recta final.

Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y el ánimo recibidos de mi familia.

A todos ellos, muchas gracias.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis amigos y compañeros que durante mi crecimiento académico y como persona han estado allí siempre para apoyarme, brindarme ayuda y su amistad.

De igual manera dedico especialmente este trabajo a mi pareja Emmanuel, que gracias a su apoyo, ayuda y amor que me ha brindado ha logrado darle color a mi vida. Gracias por tus palabras de aliento y tu confianza depositada en mi la cual fue clave para la culminación de esta etapa de mi vida profesional.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. JUSTIFICACIÓN.....	4
3. HIPÓTESIS.....	5
4. OBJETIVOS.....	6
4.1 Objetivo General.....	6
4.2 Objetivos Particulares.....	6
5. ANTECEDENTES.....	7
5.1 CÁNCER.....	7
Factores causales de cáncer.....	7
Detección precoz.....	8
Cáncer Oral y Bucofaríngeo.....	9
Tipos de secuencias de DNA.....	10
5.2 Virus del Papiloma Humano (VPH).....	11
5.3 METODOS PARA DETECTAR DAÑO AL DNA.....	13
Técnicas bioquímicas.....	13
Técnicas de genética molecular.....	15
Técnicas morfológicas.....	17
Técnicas citogenéticas.....	20
DNA Breakage Detection-FISH (DBD-FISH).....	23
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
7. RESULTADOS.....	28
8. DISCUSIÓN.....	36
9. CONCLUSIONES.....	40
BIBLIOGRAFÍA.....	41
RESUMEN BIOGRÁFICO.....	49
ANEXOS.....	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Casos registrados de tumores bucofaríngeos en México en los años 2004, 2005 y 2006.....	9
Tabla 2. Población de Estudio.....	28
Tabla 3. Análisis de la densidad integrada (DI) de fluorescencia en células de individuos sanos (control).....	33
Tabla 4. Análisis de la densidad integrada (DI) de fluorescencia en células de pacientes con cáncer bucal	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Clasificación histológica de las biopsias de los pacientes.....	29
Figura 2. Evaluación de la calidad de las muestras bajo el microscopio compuesto.....	30
Figura 3. Comparación de células de epitelio bucal sin daño y con daño.....	30
Figura 4. Progresión gradual del daño producido por H ₂ O ₂	31
Figura 5. Marcaje específico con la sonda CEP1.....	31
Figura 6. Células control y de pacientes mostrando diferentes niveles de marcaje.....	32
Figura 7. Amplificación de secuencias específicas del Virus del Papiloma Humano en muestras de pacientes con cáncer bucal y controles.....	34

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

μL	Microlitro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
mL	Mililitro
VPH	Virus del Papiloma Humano
DBD-FISH	DNA Breakage Detection Flourescent in situ Hybridization
SCE	Intercambio de cromátidas hermanas
MN	Micronúcleos
Pb	Pares de bases
SLA	Sitios lábiles alcalinos
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
PBS	Buffer fosfato salino
RPM	Revoluciones por minuto
mm	Milimetro
M	Molar
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
SDS	Dodecil sulfato de sodio
mM	Milimolar
ssDNA	DNA de cadena simple
DI	Densidad Integrada
Dapi	4',6-diamino-2-fenilindo

RESUMEN

En los últimos años se ha incrementado a nivel mundial el cáncer de las vías aerodigestivas, con una incidencia anual global de 400,000 personas. Los principales factores de riesgo son la exposición a tabaco y alcohol, sin embargo recientemente se ha reportado la presencia del virus del papiloma humano (VPH). Existen diferentes técnicas capaces de detectar y medir roturas en las cadenas de DNA, que se han utilizado para buscar biomarcadores de detección, por ejemplo la técnica de micronúcleos, aberraciones cromosómicas estructurales, intercambio de cromátidas hermanas, entre otras. La técnica de reciente desarrollo denominada *DNA breakage detection-fluorescence 'in situ' hybridization* (DBD-FISH) permite evaluar en forma sensible y específica el daño al DNA de la célula inducido por diferentes agentes, ya sea en todo el genoma o en secuencias específicas de DNA, lo que convierte al DBD-FISH en una técnica de gran utilidad en estudios de nutrición (estilos de vida), estudios epidemiológicos en poblaciones expuestas a un contaminante determinado, así como en carcinogénesis oral. El objetivo de este estudio fue evaluar el daño al DNA en genoma completo en epitelio bucal de pacientes con cáncer bucal respecto a un grupo “control” mediante la técnica de DBD-FISH, así como determinar la presencia de VPH en muestras de epitelio bucal sano y proveniente de pacientes con cáncer bucal. Para ello fueron colectadas muestras de epitelio bucal de 38 pacientes con cáncer bucofaríngeo y 10 muestras de pacientes sanos, que fueron usadas como control. Las muestras fueron procesadas mediante la técnica DBD-FISH descrita en la literatura y finalmente se realizó la captura y análisis de imagen. Por otro lado se realizó la extracción del DNA de las muestras y se realizó el análisis de secuencias del VPH a través del kit comercial Inno-LiPA VPH (Innogenetics NV, Ghent, Belgium). Los resultados del DBD-FISH revelaron que todas las muestras analizadas dieron una señal fluorescente, en las células sanas el marcaje se consideró como daño basal, mientras que la densidad integrada de fluorescencia fue significativamente mayor en células de los diferentes tipos de cáncer bucal. Finalmente se logró la detección molecular del VPH solo en una de las 48 muestras analizadas (38 pacientes y 10 individuos sanos), lo que representó el 2.6% de la población con cáncer bucal. Con los resultados obtenidos en este trabajo se establece que la técnica DBD-FISH es fácil de aplicar en raspados de epitelio bucal y proporciona resultados rápidos y sensibles y se confirma que el daño al DNA está estrechamente asociado al proceso neoplásico en células bucales.

ABSTRACT

In the past few years the cancer of the upper aerodigestive tract has been increasing with a global incidence of more than 400,000 cases. The principal risk factors are the exposure of tobacco and alcohol, nevertheless recently it has been reported the presence of the Human Papillomavirus (HPV) in samples of oral cancer. There are different techniques able to detect and quantify DNA breakage, these techniques have been used to search for potential biomarkers, for example: the micronuclei technique, chromosomal aberration test, test for sister chromatid exchanges, among others. The most recent technique in development named DNA breakage detection-fluorescence *in situ* hybridization (DBD-FISH) allows to evaluate in a sensible and specific way the damage induced by different agents in the cell's DNA, either on the whole genome or in a specific DNA sequences, this makes the DBD-FISH a useful technique in nutrition studies (lifestyles), epidemiological studies in a specific contaminant exposed population, as well as oral carcinogenesis. The purpose of this study was to evaluate the damage in the DNA on the whole genome on buccal epithelium in patients with buccal cancer in contrast to a control group using the DBD-FISH technique, as well as to determine the presence of HPV on samples of healthy buccal epithelium and samples of patients with buccal cancer. For this purpose, 38 samples of buccal epithelium from patients with oropharyngeal cancer were collected and also 10 samples from healthy controls. The samples were processed using the DBD-FISH technique described in the literature, and finally, the images obtained were analyzed. On the other hand, an extraction of DNA was made of the samples, and using a commercial kit INNO/LiPA HPV (Innogenetics NB, Ghent, Belgium) the sequences obtained of HPV were analyzed. The results of the DBD-FISH showed that all the samples analyzed gave a fluorescent signal, on the healthy cells the signal was considered as basal damage, while the integrated density of the fluorescence was significantly higher on different type of buccal cancer cells. Finally, the molecular detection of HPV was done on the 48 samples analyzed (38 patients and 10 healthy individuals) and only one was positive, this represents the 2.6% of the population of buccal cancer. With these results, this study establishes that the DBD-FISH technique is easy to use on buccal epithelium and provides fast and sensible results and confirms that the DNA damage is closely associated to the neoplastic process on buccal cells.

INTRODUCCIÓN

Patológicamente el cáncer es un conjunto de enfermedades en las cuales el organismo produce un exceso de células malignas conocidas como cancerígenas o cancerosas, con crecimiento y división más allá de los límites normales, esto es, invasión de tejido circundante y algunas veces, metástasis, que se refiere a la propagación de éstas células originarias del cáncer a otras partes del organismo por vía fundamentalmente linfática o sanguínea y el crecimiento de nuevos tumores en los lugares de destino de dicha metástasis, esta particular propiedad es la que diferencia un tumor maligno de uno benigno.

Dentro de los cánceres aerodigestivos superiores, el cáncer bucal y orofaríngeo representan un grupo importante, ya que representan el 50% de las malignidades de esta región. Los cánceres de esta área han sido asociados a factores de riesgo como el tabaco y el alcohol, sin embargo, existe evidencia que el virus del papiloma humano (VPH) juega un importante papel en la patogénesis del mismo con independencia de la participación del tabaco, el alcohol o ambos.

Aunque es relativamente raro, el cáncer bucal y bucofaríngeo es una malignidad importante, ya que su pronóstico es malo y las secuelas del tratamiento suelen ser desgastantes para el paciente. Hasta 60% de los pacientes son diagnosticados en etapas avanzadas y el tratamiento del mismo en etapas avanzadas está compuesto de combinación de cirugía, radioterapia y quimioterapia, estos tratamientos con frecuencia producen pérdidas funcionales severas y significativo deterioro estético. Es por esta razón que es de suma importancia el uso de biomarcadores para el diagnóstico y control de este tipo de cáncer.

Actualmente solo la técnica DBD-FISH permite detectar y evaluar el daño cromosómico específico célula a célula a diferencia de técnicas ya implementadas tales como aberraciones cromosómicas estructurales, intercambio de cromátidas hermanas, ensayo cometa, entre otras.

JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial, el cáncer de las vías aerodigestivas representa la sexta malignidad más común con una incidencia anual de aproximada de 400,000 personas en el mundo. En México este tipo de cáncer representa del 2 al 3% de las malignidades diagnosticadas.

Estudios recientes han demostrado que el daño genético está estrechamente relacionado con el avance de la neoplasia, actualmente se han desarrollado técnicas moleculares muy prometedoras para la prevención del cáncer oral, entre las cuales está el desarrollo de biomarcadores de riesgo, los cuales pueden anticipar el diagnóstico clínico y así prevenir el cáncer. Además estos biomarcadores pueden conducir las intervenciones en las poblaciones en riesgo, debido a la exposición a agentes carcinógenos o por su susceptibilidad genética.

Los biomarcadores citogenéticos más utilizados para evaluar el daño al DNA en la sangre periférica son las aberraciones cromosómicas intercambios de cromátidas hermanas (SCE) y micronúcleos (MN). Estas técnicas no reconocen el efecto inicial y su evolución, sólo el resultado final de algunas de las lesiones de toda la extensa cantidad.

Actualmente se ha desarrollado la técnica DNA breakage damage-FISH (DBD-FISH), siendo esta la única que permite estudiar “*in situ*”, célula a célula, el daño en secuencias específicas de DNA, pudiéndose valorar las diferencias en sensibilidad entre las diferentes secuencias cromatínicas dentro de una misma célula.

Actualmente no existe información acerca del daño al DNA en diferentes secuencias cromatínicas de células cancerosas. Estos conocimientos mejorarían nuestra comprensión de la propia organización genómica desde un punto de vista no estático sino funcional y dinámico, y tendrán una vertiente aplicada en el desarrollo de herramientas útiles para la detección temprana del cáncer bucal y orofaríngeo.

HIPÓTESIS

Los pacientes con cáncer bucofaríngeo presentan un nivel de daño al DNA mayor en genoma completo con respecto a un control sin cáncer.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar y comparar el daño al DNA en genoma completo en células de epitelio bucal de pacientes con cáncer bucofaríngeo y “controles” mediante la técnica de DBD-FISH.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Estandarizar la técnica DBD-FISH para la determinación del daño cromosómico a nivel de genoma completo en células de epitelio bucal.
- 2) Evaluar y comparar el daño al DNA en el genoma completo en células de epitelio bucal de pacientes con cáncer bucofaríngeo y “controles” mediante la técnica de DBD-FISH.
- 3) Analizar la presencia de secuencias del Virus del Papiloma Humano en muestras de epitelio bucal de individuos sanos y pacientes con cáncer bucal

ANTECEDENTES

CÁNCER

Cáncer es un término genérico para un grupo de más de 100 enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Otros términos utilizados son neoplasias y tumores malignos. Una de las características que define el cáncer es la generación rápida de células anormales que crecen más allá de sus límites normales y pueden invadir zonas adyacentes del organismo o diseminarse a otros órganos en un proceso que da lugar a la formación de las llamadas metástasis. (Organización Mundial de la Salud, 2014)

A nivel mundial, el cáncer, se ha convertido en la primera causa de mortalidad, hasta el 2007 se le atribuyen 7,9 millones de muertes (aproximadamente 13% del total).(Organización Mundial de la Salud, 2014)

Aproximadamente el 72% de las defunciones por cáncer ocurridas en 2007 se registraron en países de ingresos bajos y medianos. Se prevé que el número de defunciones anuales mundiales por cáncer seguirá aumentando y llegará a unos 12 millones en 2030.(Organización Mundial de la Salud, 2014)

Los tipos de cáncer más frecuentes a nivel mundial (ordenados según el número de defunciones mundiales) son los siguientes:

- Entre hombres: de pulmón, estómago, hígado, colon-recto, esófago y próstata
- Entre mujeres: de mama, pulmón, estómago, colon-recto y cuello uterino.

Factores causales de cáncer

El cáncer comienza en una célula. La transformación de una célula normal en una tumoral es un proceso que abarca varias fases y suele consistir en una progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno. Esas modificaciones son resultado de la interacción entre los factores genéticos de una persona y tres categorías de agentes exteriores, a saber:

- carcinógenos físicos, como la luz ultravioleta y la radiación ionizante;

- carcinógenos químicos, como el asbesto y el humo del tabaco
- carcinógenos biológicos, como las infecciones causadas por determinados virus, bacterias o parásitos.

El envejecimiento es otro factor fundamental en el desarrollo de cáncer. La incidencia de cáncer aumenta espectacularmente con la edad, muy probablemente porque con la edad aumenta la acumulación de factores de riesgo de tipos específicos de cáncer. La acumulación general de factores de riesgo se combina con la tendencia de los mecanismos de reparación celular al perder eficacia con la edad.

El consumo de tabaco, el consumo de alcohol, la ingesta insuficiente de frutas y hortalizas, las infecciones por virus de la hepatitis B, de la hepatitis C y por virus del papiloma humano son los principales factores de riesgo de cáncer en los países de ingresos bajos y medianos. El cáncer cérvico-uterino causado por VPH es una de las principales causas de defunción por cáncer entre las mujeres en países de bajos ingresos.

En los países de ingresos elevados, el consumo de tabaco y alcohol, el exceso de peso y la obesidad son causas muy importantes de cáncer.

Detección precoz

Aproximadamente la tercera parte de la carga de morbilidad por cáncer se podría reducir si los casos se detectaran y trataran precozmente. La detección precoz del cáncer está fundamentada por la observación de que el tratamiento resulta más eficaz si el cáncer ha sido detectado tempranamente. El objetivo es detectar el cáncer cuando está localizado (antes de la metástasis). Las actividades de detección precoz constan de dos elementos:

- Educación para ayudar a las personas a reconocer los signos precoces de cáncer y solicitar rápidamente atención médica; los síntomas pueden ser inflamación, dolor, indigestión persistente, tos persistente, o pérdida de sangre por orificios corporales.
- Programas de detección precoz del cáncer o de las lesiones precancerosas antes de que se manifiesten signos reconocibles, por ejemplo mediante mamografías para el cáncer de mama y citología (prueba de Papanicolaou) para el cáncer cérvico-uterino. (Organización Mundial de la Salud, 2010)

Cáncer Oral y Bucofaríngeo

El cáncer escamoso de las vías aerodigestivas superiores (CE-VADS), se ha vuelto importante ya que es la sexta malignidad más común, con una incidencia anual de 400,000 de personas en el mundo. En México representa del 2 al 3% de las malignidades diagnosticadas. (Compendio del Registro Histopatológico de las neoplasias en México. Mortalidad y Morbilidad. 2002)

En México, la información con relación al cáncer bucal y bucofaríngeo es escasa. Según el Registro Histopatológico de Neoplasias de México en el 2002 se reportaron 820 casos de cáncer bucal y 147 de bucofaríngeo de un total de 108,064 malignidades, lo que significó casi el 1% de estas. El 75% de los casos ocurrió en la cavidad bucal y 25% en la oro faringe. Se estima que uno de cada dos afectados muere por la enfermedad. En un dato más actualizado, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica reporta en el 2011 el registro histopatológico de los tumores de labio, cavidad bucal y la faringe en el año 2004 sumaron 1,657 registros, el 1.44% del total del registro de ese año. En la Tabla 1 se puede ver a detalle el tipo de cáncer reportado y el número de casos por año.

Tabla 1. Casos registrados de tumores bucofaríngeos en México en los años 2004, 2005 y 2006.

Causa	2004		2005		2006	
	N	%	N	%	N	%
Labio	105	0.09	99	0.09	118	0.11
Base de la lengua	29	0.03	8	0.01	13	0.01
Otras no especificadas de a lengua	330	0.29	350	0.31	295	0.28
Encía	133	0.12	103	0.09	90	0.08
Piso de la Boca	65	0.06	55	0.05	49	0.05
Paladar	148	0.13	102	0.09	125	0.12
Oteas no especificadas de la boca	139	0.12	127	0.11	117	0.11
Glándula parótida	239	0.21	213	0.19	220	0.21
Otras glándulas	137	0.12	117	0.10	114	0.11
Amígdala	111	0.10	87	0.08	71	0.07
Orofaringe	44	0.04	37	0.03	35	0.03
Nasofaringe	54	0.05	34	0.03	49	0.05
Seno piriforme	15	0.01	12	0.01	5	0.00
Hipofaringe	65	0.06	38	0.03	42	0.04
Otros no definidos de cavidad bucal	43	0.04	24	0.02	26	0.02

A pesar de su relativamente rareza, el cáncer bucal y bucofaríngeo, es el cáncer más frecuente del tracto aerodigestivo superior y es de importancia ya que representa un

problema clínico importante debido a que comúnmente se diagnostica en etapas avanzadas, acercándose a un diagnóstico grave. (Frias *et al.*, 1997)

La acumulación de diversos cambios genéticos y epigenéticos asociados con el desarrollo de este cáncer dan a sugerir dos diferentes vías asociadas, una a la exposición de agentes carcinogénicos tales como el tabaco y el alcohol y la otra exclusivamente con la participación del VPH. (Smeets *et al.*, 2006) Aunado a estos factores también se ha descrito que las aberraciones cromosómicas juegan un papel importante al fomentar el desarrollo del cáncer. (George *et al.*, 2014)

Tipos de secuencias de DNA

A nivel molecular, en el genoma humano se encuentran tres grandes grupos de DNA en cuanto a la abundancia del número de copias; (1) secuencias únicas con menos de 10^2 copias, (2) moderadamente repetida con 10^2 - 10^4 copias y (3) altamente repetidas con más de 10^5 copias (Jean Pierre, 1994).

Dentro de este último grupo se encuentran el DNA repetido en tándem es decir unas repeticiones a continuación de las otras y DNA satélite, el cual, mediante gradientes de densidad se pueden diferenciar cuatro fracciones denominadas satélite clásico I, II, III y IV:

(a) Satélite clásico I formado por dos unidades alternantes de 17 y 25 pb repetidas. Se localiza en regiones pericentroméricas de los cromosomas 3 y 4, y brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos 13, 14, 15, 21 y 22).

(b) Satélite clásico II-III formado por variantes de la repetición básica de 5 pares de bases. Estos satélites se localizan principalmente en la heterocromatina yuxtacentromérica de los cromosomas 1, y 16 y en el brazo largo del cromosoma- Y.

(c) Satélite IV. Los satélites III y IV son difíciles de diferenciar entre sí, debido a su homología y a que las secuencias de DNA repetidas pueden ser compartidas entre ellas (Jean Pierre, 1994).

Existen otros dos tipos de DNA altamente repetidos en tándem que no se pueden separar por centrifugación en gradiente de densidad; (a) satélite alfoide con un monómero principal de 171 pb de longitud que se presenta en los centrómeros de todos los

cromosomas y (b) secuencias teloméricas con una unidad de repetición de 6 pb que se encuentra en las secuencias terminales de todo los cromosomas (Jean Pierre, 1994).

Estudios recientes han sugerido que estas regiones que contienen secuencias altamente repetidas presentan altos niveles de sitios lábiles alcalinos (SLA). En leucocitos humanos la región rica en SLA corresponde al área de DNA satélite de 5pb (Fernández *et al.*, 2001), en esplenocitos de ratón corresponde a secuencias de DNA satélite de regiones peri-centroméricas (Rivero *et al.*, 2001) y en hámster chino a secuencias teloméricas (Rivero *et al.*, 2004). La alta concentración de SLA en estas secuencias puede promover la fragilidad en regiones específicas y facilitar la formación de aberraciones cromosómicas como translocaciones entre cromosomas acrocéntricos y telocéntricos, las cuales pueden estar asociadas a cáncer (Gravholt *et al.*, 1992).

Virus del Papiloma Humano (VPH)

El virus del papiloma humano (VPH) pertenece a la familia de virus Papillomaviridae. Los VPH constituyen un grupo de más de 200 virus relacionados que se transmiten por contacto sexual directo, de la piel y de las membranas mucosas de personas infectadas a la piel y a las membranas mucosas de sus parejas (Scully *et al.*, 2000).

Los tipos de VPH que se transmiten sexualmente corresponden a dos categorías: los VPH de alto riesgo, causan cáncer, y los dos principales responsables de la mayoría de los cánceres causados por VPH son los tipos 16 y 18. Los VPH de bajo riesgo, por lo general causan verrugas en piel, genitales, ano, boca o garganta. Por ejemplo, los tipos 6 y 11 de VPH causan 90% de todas las verrugas genitales (Lowy and Schiller, 2012).

Los VPH poseen una sola molécula de DNA de doble cadena que está conformada aproximadamente por 8,000 pares de bases (Garcia *et al.*, 1993). La organización genética de los mismos es muy similar, se encuentra formada por tres regiones, una región temprana en la que se encuentran los genes de la transcripción, replicación y transformación, que son conocido como genes E, una región tardía la cual codifica dos proteína de la cápside y

finalmente una región larga de control que se encarga de la regulación y replicación viral (Bernard, 2005).

Estudios recientes han demostrado que la infección del VPH de alto riesgo con la subsiguiente sobre-expresión de las oncoproteínas virales E6 y E7 e inactivación del gen *p53* y *Rb* inducen rompimientos de DNA (Duensing and Münger, 2004). Y esto se puede observar en el caso del cáncer *bucal* y bucofaríngeo (Ha and Califano, 2004).

La prevalencia de VPH oral es mucho menos común que la infección anogenital. Su vía de transmisión no está bien elucidada, por lo que se han realizado estudios de prevalencia de DNA del virus en hombres VIH-negativos que tienen sexo con hombres. La prevalencia de cualquier VPH oral y de VPH de alto riesgo fue del 13,7% incluyendo el VPH 16/18, lo anterior se detectó en muestras orales (King *et al.*, 2015), mientras que un estudio en mujeres que acudieron a las pruebas de Papanicolaou se obtuvo un 14% de infección oral por VPH. En total se identificaron siete genotipos, incluyendo los genotipos de alto riesgo 16, 18, 58 y 59 y los genotipos de bajo riesgo 6, 81 y 13, el último de los cuales es un tipo exclusivo de la mucosa oral (González *et al.*, 2015), el comportamiento no se asoció con la presencia de los tipos de VPH genitales en la mucosa oral, además los tipos de VPH genitales estaban presentes en la mucosa oral de las mujeres sin manifestaciones clínicas asociadas; sin embargo, la conducta sexual no se asoció con la infección, y por lo tanto deben explorarse otras vías de transmisión (González *et al.*, 2015).

Los programas de prevención no han sido eficaces en los países en desarrollo, lo que conduce a investigación sobre ensayos alternativos para la detección de cáncer cervical. La expresión de proteínas que inducen una respuesta inmune humoral pueden ser útiles como marcadores de exposición a VPH en las primeras etapas de la enfermedad (Salazar *et al.*, 2016).

METODOS PARA DETECTAR DAÑO AL DNA

Una herramienta muy útil en el estudio del daño y reparación del DNA es el empleo de técnicas capaces de medir las roturas de cadena (roturas de cadena sencilla o doble). La importancia en el desarrollo y mejora de estas técnicas es de gran relevancia debido a que pueden aplicarse además en el estudio de otros tipos de lesiones en el DNA, ya que la mayoría de las lesiones se transforman en roturas y por lo tanto esto hace que se puedan cuantificar con las técnicas adecuadas (Ahnström, 1988) .

Dada la gran importancia de las técnicas y la gran variedad existente, en este apartado se hará referencia a aquellas que han sido más utilizadas. Con el fin de estructurar el apartado se han dividido en cuatro grupos de técnicas: citogenéticas, bioquímicas, genética molecular y morfológicas, y teniendo en cuenta que puede haber algún solapamiento entre ellas.

Técnicas bioquímicas

Otros procedimientos permiten el estudio del daño inicial originado por agentes mutagénicos. Estas técnicas bioquímicas, tales como la sedimentación en gradiente de sacarosa, elusión neutra o alcalina, y desnaturalización alcalina, analizan el DNA total, estudiándose el daño global, en promedio, no pudiéndose evaluar el daño en secuencias específicas.

Sedimentación en gradiente de sacarosa (neutra o alcalina)

En un principio, la velocidad de sedimentación se empleó para determinar el tamaño de las macromoléculas ya que en un gradiente de sacarosa los fragmentos de DNA más largos sedimentarán posteriormente a los fragmentos más pequeños (Mc Grath and Williams, 1966).

Con el tiempo la técnica se utilizó para la detección de roturas en el DNA y se encontraron con el gran problema de la degradación del DNA al ser extraído. Esto se resolvió aplicando un tratamiento alcalino que separaba las hebras y además inactivaba las enzimas celulares y eliminaba las proteínas (Ahnström, 1988). Se basa en que los agentes

que dañan el DNA, como la irradiación, generan roturas en el DNA y por lo tanto lo fragmentan.

De este modo, las células se marcan previamente con timidina radioactiva, se lisan en una solución alcalina y se depositan en la parte superior del tubo que contiene el gradiente de sacarosa y se centrifuga.

Después se recogerán las distintas fracciones y se les medirá la cantidad de radiactividad, calculando la frecuencia de roturas en cada una de las fases. Si se emplea un pH neutro se obtendrá una estima de las roturas de cadena doble y si es alcalino, del conjunto de todas las roturas. Dado que las roturas de cadena sencilla son más frecuentes tras la irradiación, éstas serán cuantificadas de modo preferente.

La desventaja de esta técnica es su poca sensibilidad porque se obtiene una gran señal de fondo debido a que se han introducido roturas durante la manipulación. Además las moléculas de elevado tamaño tienen una sedimentación anormal en el gradiente de sacarosa.

Elución neutra o alcalina

Esta técnica utiliza filtros para discriminar entre diferentes tamaños de DNA, ya que los filtros actúan mecánicamente impidiendo el paso del DNA. Se puede utilizar para medir tanto roturas de cadena sencilla como doble, lugares lábiles alcalinos, entrecruzamiento entre el DNA y las proteínas y entrecruzamiento entre hebras del DNA. Los filtros que se utilizan son de policarbonato (útil en la detección de roturas de cadena simple) o de cloruro de polivinilo (útil en la detección de entrecruzamientos entre el DNA y las proteínas) (Khon *et al.*, 1981).

Primero las células se dejan crecer en medio con timidina radiactiva y se eliminan la mayor parte de las moléculas que no son DNA mediante una solución de lisis, que pasa a través del filtro por gravedad. Después los extremos del filtro se conectan a una bomba peristáltica, se coloca una solución neutra o alcalina, y se van recogiendo fracciones en función del tiempo. La cantidad de DNA retenida en cada fracción se cuantifica por contaje de la radiactividad emitida y se relaciona directamente con el número de roturas. Si se emplea la solución neutra se detectarán roturas de cadena doble y se denomina *elución*

neutra. Si se emplea la solución alcalina, se detectarán roturas totales, principalmente las de cadena sencilla y se denomina *elución alcalina* (Khon *et al.*, 1981).

Desnaturalización alcalina (unwinding alcalino) del DNA y cromatografía de hidroxapatita: Esta técnica se basa en que el DNA se desnaturaliza a partir de las roturas, en presencia de álcali (Von Sonntag, 1987). Las células, cuyo DNA se marca radiactivamente, se lisan en una solución con detergentes y alta concentración de sales y el DNA se desnaturaliza a pH elevado. Después de neutralizar, se realiza un tratamiento con ultrasonidos que fragmenta el DNA.

La cantidad relativa de DNA de cadena sencilla y doble contenida en la muestra se determina mediante cromatografía de hidroxapatita (Ahnström and Edvardsson, 1974), en la cual la columna tiene mayor afinidad por el DNA de cadena doble. El DNA de cadena sencilla se eluye con fosfato, pH 7, 0,12 mol / dm³, mientras que el DNA de cadena doble necesita un fosfato a mayor concentración, 0,4 mol / dm³ y citrato a 10⁻² mol / dm³ (Von Sonntag, 1987). Posteriormente se mide el nivel de radiactividad de las fracciones obtenidas.

Aunque el DNA se mide mediante radioactividad, también se puede realizar con técnicas de fluorescencia (Kanter and Schwartz, 1982). Se podrían incubar las fracciones con Hoechst 33258 y medir la cantidad de DNA como fluorescencia relativa de la muestra con un espectrofluorímetro, calculando posteriormente por calibración el porcentaje de DNA y la cantidad de roturas.

Otro método para discriminar entre roturas de DNA de cadena sencilla y doble es la digestión con nucleasa S1 en la fracción de DNA de cadena sencilla, seguido de una centrifugación del resto del DNA, de doble cadena (Sheridan and Huang, 1977).

Técnicas de genética molecular

Ciertas metodologías de genética molecular tales como la desnaturalización alcalina/Southern blot y la electroforesis de campo pulsante acoplada al Southern blot permiten estudiar el daño en secuencias específicas, pero no permiten valorar la posible

heterogeneidad intercelular en el daño inducido o en su reparación, lo cual puede ser importante cuando se analizan poblaciones tumorales.

Técnica de desnaturalización alcalina / Southern blot

Este método combina la desnaturalización alcalina con el Southern blot. El álcali desnaturaliza el DNA porque rompe los enlaces de hidrógeno entre los pares de bases. La tasa de desnaturalización es mayor si hay roturas de cadena, porque son lugares de inicio de desnaturalización (Bunch *et al.*, 1992). En esta técnica se realiza una modificación del método de desnaturalización alcalina (Sheridan and Huang, 1977), donde el DNA desnaturalizado se digiere con nucleasa S1, que es una endonucleasa específica de cadena sencilla.

Posteriormente se realiza el Southern blot en el DNA resistente a esta nucleasa, y se cuantifica el daño en la región específica, analizando la disminución de la intensidad de la señal emitida por la cantidad de sonda hibridada (Bunch *et al.*, 1992). Permite detectar inducción y reparación de lesiones en regiones cromatínicas específicas como en el DNA satélite, oncogenes o genes como la β -globina, que debido a sus actividades funcionales pudieran mostrar diferente sensibilidad a la inducción de roturas (Bunch *et al.*, 1995).

La desventaja de esta técnica es que nos proporciona una estima global de la población celular, no pudiendo analizar la posible heterogeneidad intercelular tanto en las lesiones generadas como en la reparación.

Técnica de electroforesis de campo pulsante en gel de agarosa / Southern blot

En la electroforesis, los fragmentos de DNA migran debido a su carga negativa y según su peso molecular. La electroforesis en campo eléctrico continuo tiene la limitación de no poder resolver moléculas de DNA mayores de 50 kb (Fangman, 1978). Las moléculas grandes se mueven entonces a través de la matriz del gel con una velocidad que es independiente de su tamaño y forman una banda difusa en el gel. Sin embargo, este problema se solucionó si se reorientaba periódicamente el campo eléctrico. De este modo se podían resolver moléculas de varias megabases (Chu *et al.*, 1986).

En la electroforesis en campo pulsante el campo eléctrico se altera discontinuamente de modo periódico forzando de modo intermitente el cambio de conformación y la

dirección de migración de las moléculas. El tiempo que necesita cada molécula de DNA para alterar su conformación y reorientarse es dependiente del tamaño, reorientándose más rápidamente las moléculas de menor tamaño (Chu, 1991).

Otra diferencia con la electroforesis habitual es que, en la electroforesis en campo pulsante, las muestras (ya sean células completas, núcleos con el DNA relajado o DNA desnudo) no se colocan en los pocillos en forma líquida sino formando pequeños bloques de agarosa que encajan perfectamente en los huecos. De este modo se evitan las posibles roturas en las moléculas de DNA originadas por la manipulación, y la lisis celular se realiza en los bloques de agarosa.

Mediante esta técnica se pueden cuantificar roturas de cadena doble, para lo cual se realiza una comparación entre la muestra y una muestra de DNA de peso molecular conocido. Además, si se combina con la técnica de Southern Blot se pueden estudiar lesiones en regiones específicas.

Técnicas morfológicas.

Actualmente existen metodologías que permiten un estudio “*in situ*” de la célula para evaluar las roturas inducidas en el DNA. Estas roturas pueden marcarse mediante técnicas enzimáticas (“*in situ* nick translation” o “*in situ* end labelling”). Sin embargo no pueden analizarse secuencias concretas y sólo son detectables aquellas roturas accesibles a las enzimas empleadas.

En otras metodologías “*in situ*”, las roturas son cuantificadas en células embebidas en microgeles y desproteinizadas, analizando la expansión de los halos del nucleoide o la imagen de “cometa” resultante tras una electroforesis. Posiblemente estas técnicas detectan toda la variedad de roturas del DNA, pero sólo en el genoma global, no en secuencias específicas. Todos los estudios de mutagénesis que se basan en técnicas morfológicas o estudios célula a célula, valoran el DNA global, sin distinción del tipo de secuencia específica.

Técnica de traslado de mella “*in situ*”

Esta técnica se basa en la adición de nucleótidos marcados (radioactivamente o mediante biotina o digoxigenina) en la región de la rotura (o nick). Primero se cultivan las células en frascos cuya base es un portaobjetos, después se fijan las células en etanol / ácido acético. Seguidamente se incuban las células en una solución de “Nick –translation”, que contiene un tampón, la DNA polimerasa de *E.coli*, una mezcla de 4 desoxinucleótidos trifosfatos conteniendo dTTP marcado radiactivamente con ³H u otro nucleótido unido a biotina o digoxigenina. Después se para la reacción con Tris-HCl, se deshidratan los portaobjetos en etanol y se dejan secar al aire. Finalmente los portaobjetos se sumergen en emulsión fotográfica y se dejan en oscuridad a 4°C para obtener la autorradiografía. En caso de usar biotina o digoxigenina se revelan con un fluorocromo o mediante un sistema enzimático. Para terminar, las células se tiñen con hematoxilina y se realiza un conteo de los granos de los núcleos mediante un sistema de análisis de imagen.

Las ventajas de esta técnica son el no requerimiento de grandes cantidades de células, la no modificación de la morfología de las células y la posibilidad de aplicación a una gran variedad de tipos celulares. Es útil para predecir susceptibilidad a la irradiación, hipertermia y agentes químicos (Maehara *et al.*, 1989).

Técnica de exonucleasa III-Random Priming

En esta técnica se emplea la enzima Exonucleasa III que genera cadena sencilla a partir de los puntos donde haya roturas. Se realiza entonces una incubación con secuencias hexaméricas al azar y algunas de éstas serán complementarias a los fragmentos de cadena sencilla generados, uniéndose y formando dúplex que actuarán como cebadores para la enzima klenow (fracción de la polimerasa sin actividad exonucleasa 5’-3’). De esta manera se añaden nucleótidos marcados y se ponen de manifiesto las zonas de rotura (Gosálvez *et al.*, 1993).

Ensayo TUNEL o marcaje enzimático en extremo de rotura

Este método permite detectar “*in situ*” extremos de cadena de DNA 3’-OH en células aisladas. La enzima transferasa terminal (TdT) cataliza la incorporación de

nucleótidos marcados en los núcleos fijados, usando los extremos 3'-OH libres. La radioactividad se detecta por autorradiografía y después se cuantifica (Fertil *et al.*, 1984).

Esta técnica, sin embargo, no permite cuantificar cualquier tipo de roturas ya que, por ejemplo, las roturas inducidas por peróxido de hidrógeno no parecen marcarse con este método (Kodym and Hört 1995). La desventaja de las técnicas que emplean enzimas es que solamente marcan las roturas accesibles y/o reconocibles por la enzima empleada.

Técnica del halo neutro

Es una prueba simple que se ha desarrollado para medir el daño ocurrido en el DNA de células individuales. El procedimiento se basa en la evaluación microscópica de los halos de los nucleoides que se adhieren al cubreobjetos. Los nucleoides se obtienen mediante la extracción de las proteínas nucleares con detergentes y/o soluciones salinas altamente concentradas. Se piensa que los halos de los nucleoides son bucles (loops) del DNA libre que proceden del núcleo. Cuando se observan mediante tinción con bromuro de etidio, los halos de los nucleoides primero se expanden y después se contraen a medida que la concentración de etidio aumenta. La exposición de los nucleoides a niveles muy bajos de tratamientos que rompen la cadena de DNA produce un aumento en la expansión de los halos, con lo cual la medición del radio del halo nos da una indicación de la cantidad de roturas (Thomas and Thomas, 1989).

Electroforesis en microgel ó Ensayo de cometas

En 1978 Rydberg y Johansson demostraron que cuando lisaban células en condiciones alcalinas el núcleo permanecía formando una estructura bastante condensada. Si irradiaban las células con dosis crecientes de rayos X, el núcleo adquiría una estructura cada vez más difusa conforme aumentaba la dosis (Rydberg and Johansson, 1978).

Basándose en estas observaciones, Östling y Johansson en 1984 desarrollaron otro método en el cual las células, en una matriz de agarosa y colocadas sobre un portaobjetos, se lisaban en una solución neutra. Después se realizaba una electroforesis que provocaba que parte del DNA se dirigiera hacia el ánodo. Para visualizar los núcleos, éstos se teñían con Naranja de Acridina. Observaron que a medida que aumentaba la dosis de rayos X

aumentaba la fluorescencia a cierta distancia del centro del núcleo (Östling and Johansson, 1984).

La solución de lisis, que contiene detergentes, se emplea para la extracción de la mayor parte de las proteínas de la cromatina. El nucleoide resultante, DNA más proteínas residuales, forma un halo, que será de mayor tamaño cuanto mayor sea el número de roturas. Posteriormente se realiza la electroforesis sobre los nucleoides, con lo cual, la corriente eléctrica empuja el DNA cargado desde el núcleo, de modo que los fragmentos rotos migrarán más lejos (Klaude *et al.*, 1996). Como resultado se obtienen imágenes con aspecto de cometas, con una cabeza y una cola. La cola del cometa obtenido bajo condiciones neutras parece ser el resultado de bucles de DNA que se encuentran unidos a la estructura del núcleo. La longitud y/o la cantidad de DNA que ha migrado hacia la cola es proporcional al número de roturas. Posteriormente los cometas se tiñen con algún compuesto que se intercale en el DNA, como por ejemplo el bromuro de etidio, y de este modo se pueden realizar las mediciones pertinentes con el programa informático adecuado y obtener una estima del número de roturas existentes. Cuando se emplean condiciones neutras se detectan los rompimientos de cadena doble, sin embargo, si se emplean condiciones alcalinas antes y durante la electroforesis, aumenta la sensibilidad en la detección de las lesiones, ya que se facilita la desnaturalización del DNA y permite la detección de rompimientos de cadena simple (Singh *et al.*, 1988).

Una de las desventajas de esta técnica es la determinación del tiempo de electroforesis, ya que si el tiempo es muy corto no se podrán apreciar bien las diferencias, y si el tiempo es muy largo, el álcali puede dar lugar a un aumento considerable en el número de lesiones. Esto se podría evitar añadiendo antioxidantes o también se podrían utilizar fluorocromos más eficaces.

Técnicas citogenéticas

Las técnicas citogenéticas como: aberraciones cromosómicas, micronúcleos, intercambio de cromátides hermanas e hibridación *in situ* fluorescente nos proporcionan información exclusivamente acerca del resultado final tras una serie de complejos procesos de inducción de daño, reconocimiento del mismo y su procesamiento y reparación.

Estas técnicas no reconocen el efecto inicial y su evolución, sólo el resultado final de algunas de las lesiones de toda la extensa cantidad y variedad primaria.

Técnica aberraciones cromosómicas estructurales.

Las aberraciones cromosómicas son importantes en cuanto al estudio del efecto tras la exposición a agentes genotóxicos en humanos (Natarajan, 2002).

La técnica consiste en la estimulación con fitohemaglutinina de linfocitos T, (son aproximadamente el 70% de los linfocitos de sangre periférica), que se encuentran en fase G₀. Después, las células se detienen en metafase mediante el tratamiento con colchicina. Las células se centrifugan y tras eliminar el sobrenadante, se realiza un tratamiento hipotónico. Se centrifuga de nuevo y se elimina el sobrenadante. Posteriormente se realiza la fijación en metanol-ácido acético (3:1) tres veces. Finalmente se realiza la extensión, dejando caer una gota de la muestra sobre un portaobjetos limpio, y dejando secar al aire. Generalmente se tiñen con Giemsa y se analizan las metafases.

Agentes genotóxicos inducen en linfocitos en estadio G₀ aberraciones cromosómicas que se pueden clasificar en inestables (anillos céntricos, dicéntricos, fragmentos acéntricos) y estables (translocaciones, inversiones).

Técnica de Micronúcleos (MN)

Los micronúcleos son fragmentos acéntricos y/o cromosomas que son incapaces de ir a los polos de la célula durante la mitosis. Durante la telofase se forma la envuelta nuclear alrededor de estos fragmentos y cromosomas, lo que les confiere el aspecto de micronúcleos. Los micronúcleos, por lo tanto, proporcionan información acerca de la rotura de cromosomas y de la pérdida de cromosomas.

Técnica: Para distinguir qué células se han dividido, se emplea citocalasina B. La citocalasina B es un inhibidor de la polimerización de actina, que se necesita para la formación del anillo de microfilamentos que constriñe el citoplasma durante la citocinesis. Por lo tanto, las células que se han dividido se pueden identificar por su aspecto binucleado. Los micronúcleos se cuentan entonces solamente en estas células binucleadas. Permite

comparar el daño en los cromosomas entre poblaciones celulares que pueden diferir en su cinética de división celular (Singh *et al.*, 1996).

Para poder determinar si los micronúcleos son fragmentos acéntricos o cromosomas enteros se puede emplear la hibridación *in situ* con sondas específicas (painting, sonda centromérica específica, sonda para todos los centrómeros) o el método del anticuerpo anticinetocoro. Es evidente que los micronúcleos sólo se expresan en células eucarióticas en división, por lo tanto esta técnica no se puede emplear en poblaciones celulares que no se estén dividiendo ni en las que no se posea información acerca de su cinética de división.

Intercambio de cromátidas hermanas (SCEs)

El intercambio de cromátidas hermanas se descubrió a finales de los años 50. Se cultivaban las células durante un ciclo con timidina tritiada, y mediante autorradiografía se observaba que una cromátida se marcaba y la otra no, permitiendo observar además intercambios entre las cromátidas (Das, 1988). Más adelante se utilizó la bromodeoxiuridina (BrdU) haciendo la técnica más precisa. Se pueden distinguir tres tipos de cromátidas, basándose en que las dos cadenas, una o ninguna pueden incorporar BrdU.

Un aumento en la tasa de SCEs es un indicador del potencial carcinogénico y mutagénico de un agente.

Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH)

La hibridación *in situ* consiste en la hibridación directa de una sonda con el DNA o RNA de cortes citológicos o de cromosomas metafásicos.

En la hibridación *in situ* sobre cromosomas, éstos se obtienen en metafase, generalmente a partir de linfocitos circulantes, de linfoblastos y a partir de fibroblastos. La hibridación se realiza directamente sobre preparaciones citogenéticas, las cuales se han fijado sobre un portaobjetos y previamente pueden someterse a un tratamiento con RNAasa para destruir el RNAm y/o a una desproteínización mediante la proteínasa K. Hasta hace poco tiempo la hibridación se realizaba con una sonda marcada con un isótopo radiactivo, generalmente con tritio. Pero hoy en día es posible el uso de marcajes no radiactivos, los cuales permiten visualizar directamente las secuencias únicas sin tener que recurrir a recuentos estadísticos. El principio de este sistema consiste en la unión covalente de la

biotina al DNA de la sonda o bien de un hapteno como la digoxigenina, los cuales son detectados después de la hibridación mediante la avidina o anticuerpos marcados con fluorocromos o mediante una enzima. La señal común más utilizada es la fluorescente, conocida como FISH. El método permite la visualización simultánea de varias sondas diferentes marcadas por distintos fluorocromos.

Los resultados se obtienen en pocos días, siendo una gran ventaja frente a la hibridación radioactiva, la cual necesita varias semanas para su visualización (Baiget *et al.*, 1995).

Hasta hace poco tiempo, para el estudio de las aberraciones cromosómicas se empleaban tinciones sólidas como el Giemsa o Feulgen. Sin embargo, la detección de las translocaciones no se realiza de forma precisa con estas tinciones. Se empleó entonces el bandeado cromosómico, pero la definición alcanzada por la técnica no era suficiente para poder detectar e identificar adecuadamente ciertas translocaciones o reordenamientos complejos. Posteriormente, con la aparición de la técnica de “painting”, que permite realizar el FISH marcando un cromosoma completo, se pudieron detectar cromosomas concretos en metafase y analizar por lo tanto de manera más fácil las aberraciones cromosómicas estructurales.

DNA Breakage Detection-FISH (DBD-FISH)

Recientemente se ha desarrollado una nueva técnica que permite la aplicación de la hibridación “*in situ*” fluorescente (FISH) en células interfásicas aisladas, para la detección del daño genético originado en las mismas. Dicha técnica ha sido denominada DBD-FISH (Fernández *et al.*, 1998), la cual se basa en el empleo de microgeles, desnaturalización alcalina parcial (alkaline unwinding) y el uso de la técnica de FISH para su interpretación (Santos *et al.*, 1997). Esta técnica está fundamentada en las técnicas que habitualmente se utilizan en radiobiología para la detección de roturas radioinducidas en el DNA (McKelvey-Martin *et al.*, 1993; Fairbairn *et al.*, 1995). Las células vivas, englobadas en un microgel de agarosa extendido sobre un portaobjetos, son tratadas brevemente con una solución alcalina. Este tratamiento provoca la desnaturalización parcial del DNA a partir de los extremos de rotura radioinducidos. De este modo se originan áreas de cadena sencilla,

tantas más cuantas más roturas estén presentes. Estas áreas denominadas “sitios lábiles alcalinos (SLA)” “pueden ser dianas para posteriormente hibridar con sondas específicas de DNA. Tras el tratamiento alcalino, se procede a una desproteinización usando soluciones lisantes, dejando nucleoides residuales inmersos en la matriz de agarosa, procediendo finalmente a la incubación de sondas de DNA. Si en una secuencia específica de DNA alojada en una estructura cromatínica concreta se producen pocas roturas, el tratamiento alcalino originará pocas áreas de cadena sencilla. Cuando se incuba con una sonda fluorescente específica de DNA complementaria para esa secuencia completa, esta hibridará en escasa cantidad y la fluorescencia emitida será débil y distribuida en una superficie pequeña. Por el contrario si en esa secuencia se originan muchas roturas, el tratamiento alcalino producirá mucha cadena sencilla y habrá mucha hibridación de la sonda complementaria.

La intensidad de la fluorescencia y su área de emisión serán grandes, lo cual es evaluable usando las modernas técnicas de análisis digital de imagen. La sonda de DNA selecciona la región cromatínica a analizar. La técnica DBD-FISH es la única que permite estudiar “*in situ*”, célula a célula, el daño y la reparación en secuencias concretas de DNA, pudiéndose valorar las posibles diferencias en sensibilidad entre las diferentes secuencias cromatínicas dentro de una misma célula, así como la posible variabilidad intercelular en dicha sensibilidad o capacidad de reparación.

En resumen, todos los estudios de mutagénesis y cáncer que se basan en técnicas morfológicas o estudios célula a célula, valoran el DNA global, sin distinción del tipo de secuencia específica. Actualmente no existe información acerca de la evaluación del daño en secuencias cromatínicas específicas en pacientes con cáncer. Esta información sería de gran importancia para determinar la sensibilidad de regiones específicas asociadas al origen y progresión del tumor.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de Estudio: Este estudio se realizó con células bucales de 38 pacientes afectados con cáncer bucofaríngeo, usando así mismo como control 10 muestras de pacientes sanos, estas muestras se consiguieron de la Unidad de Médica de Alta Especialidades (UMAE) 25 del IMSS. A todos los pacientes incluidos en este estudio se les incluyo una carta de consentimiento y se les aplico una encuesta que incluía información como: edad, historial familiar, historial médico y diagnóstico patológico.

Obtención de Muestra: Células de epitelio bucal fueron colectadas de estos 38 individuos mediante un cepillado suave de la parte interior del labio con un cepillo citológico después de lavar la boca varias veces con agua destilada tibia, para eliminar las células exfoliadas muertas. Los cepillos se agitaron en tubos de 15 ml de plástico con 1ml de PBS, se lavaron dos veces, se centrifugaron a 1500 rpm durante 10min a temperatura ambiente, y se resuspendieron en 2 ml de PBS.

Preparacion de las Muestra: La selección de la muestra fue evaluada tomando 20 μ l de la muestra y colocándola sobre una laminilla, esta se observó bajo microscopio para poder evaluar la calidad de la muestra. Como criterio de inclusión se tomó en cuenta la cantidad de células por campo, y se procesaron las que mostraron una concentración de 30 a 35 células por campo. Se realizó además el análisis visual de las muestras, para asegurar que la muestra tuviera una buena calidad, se desecharon aquellas muestras que mostraron un alto grado de materia alba.

Preparación de las Células: La suspensión celular se mezcló con agarosa de bajo punto de fusión (concentración final de 0.7%) a 37⁰C. Posteriormente se depositaron 15 μ l de la mezcla en portaobjetos pre tratados y cubiertos con un cubreobjetos (24mm x 24 mm), se incubaron a 4⁰C por 5 min. y posteriormente se retiró el cubreobjetos cuidadosamente.

DBD-FISH: La técnica de DBD-FISH según Fernández *et al.*(2005) consistió básicamente en los siguientes pasos.

(a) **Remoción proteica.** En el caso de células epiteliales y linfocitos las laminillas fueron tratadas con una solución de lisis (NaCl al 2 M, EDTA AL 0.05 M, y Tris- base AL 0.4 M, y SDS AL 1%), a 43°C por 25 min. Las lamillas se incubaron en posición horizontal para evitar la dispersión cromática.

(b) **Lavado de nucleótidos.** Se lavaron en NaCl al 0.9% por 10 min. a temperatura ambiente.

(c) **Producción de ssDNA.**A continuación se incubaron en una solución “unwinding alcalino” (NaOH al 0.03 M y NaCl al 1 M) por 2.5 min a temperatura ambiente y en solución neutralizante (Tris-HCl al 0.4 M, pH 7.5) , por 5 min. a temperatura ambiente.

(d) Luego se lavaron en buffer TBE (Tris al mM, ácido bórico al 89 mM, EDTA al 2.5 mM, pH=8.3) por 2 min.

(e) Para la estabilización de los ssDNA, las laminillas fueron deshidratadas en una serie de alcoholes a diferentes concentraciones (70, 90 y 100%) por 2 min cada uno, y fueron secadas al aire.

FISH.Las sondas de DNA del genoma completo fueron obtenidas a partir de linfocitos usando un kit comercial para extracción de DNA (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA).

Un microgramo de cada muestra de DNA se marcó con biotina empleando el kit comercial “nick-translation” (Roche Diagnostics Corporation). Esta sonda se usó como referencia de daño total.

Las sondas marcadas con biotina fueron desnaturalizadas a 70 °C por 10 min. y puestas a hibridar por 12 horas a 37⁰ C en las células blanco. Posteriormente las laminillas se lavaron en formamida al 50% /2x SSC, pH 7 por 5 min. y en 2 x SSC, pH 7, por 3 min. a temperatura ambiente.

Las sonda hibridadas fueron detectadas usando FITC avidina (1:400) (Roche Diagnostics Corporation) por 30 min. Finalmente, las laminillas se contrastaron con DAPI (1 µg/mL) de Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

Captura y análisis de imagen.

Se adquirieron aproximadamente de 20 a 30 imágenes por paciente de las señales de DBD-FISH seleccionadas al azar para cada grupo experimental.

El análisis de fluorescencia se llevó a cabo con el programa comercial ImageJ v1.48. Este programa permite la segmentación del área de interés, la cuantificación de dicha área, el estudio de la intensidad en cada uno de los píxeles de dicha área tras las correcciones de variaciones de luminosidad en el campo, ruido electrónico y sustracción del nivel de fondo. Para este estudio se midió el área de intensidad detectada así como el área por fluorescencia detectada, este cálculo se le denomina densidad integrada y este se mide en píxeles.

Análisis Estadístico.

Empleando la estadística descriptiva se calculó la media, varianza, desviación típica, coeficientes de variación etc. y se utilizó la prueba ANOVA. Además, se realizó un análisis de punto de corte para área (67.46 píxeles) y densidad integrada (12643.34 píxeles).

RESULTADOS

Población de Estudio

Las muestras fueron obtenidas de la Unidad de Médica de Alta Especialidad (UMAE) No. 23 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), en total se colectaron 48 muestras: 38 de pacientes con cáncer bucal y 10 de individuos sanos (control). El 79% de las muestras fueron de hombres y el 21% de mujeres, mientras que en las muestras controles se tuvo una relación de 1:1. Con respecto a los factores que predisponen al cáncer bucal, el 31% de la población con cáncer era consumidora de tabaco, 36% de alcohol y el 60% tenían factores de riesgo desconocidos (Tabla 2).

Tabla 2. Población de Estudio. Se presenta la descripción de edad promedio, sexo y factores de predisposición al cáncer identificados en el historial clínico de pacientes e individuos sanos (controles).

	Pacientes	Controles
No. de Controles	38	10
Edad (Promedio)	65 (± 10)	58 (± 10)
Sexo:		
Hombres	30	5
Mujeres	8	5
Factores de predisposición:		
Consumo de Tabaco	12	0
Consumo de Alcohol	14	0
Factores desconocidos	23	0

En la población de estudio de cáncer bucal se encontraron diferentes tipos histológicos, siendo el más predominante el cáncer de laringe (47%), seguido por el cáncer de lengua (21%) (Figura 1). En un 5% de los casos no existía un diagnóstico confirmatorio, es decir pacientes de primera visita los cuales estaban en espera de resultados para confirmar el tipo de cáncer.

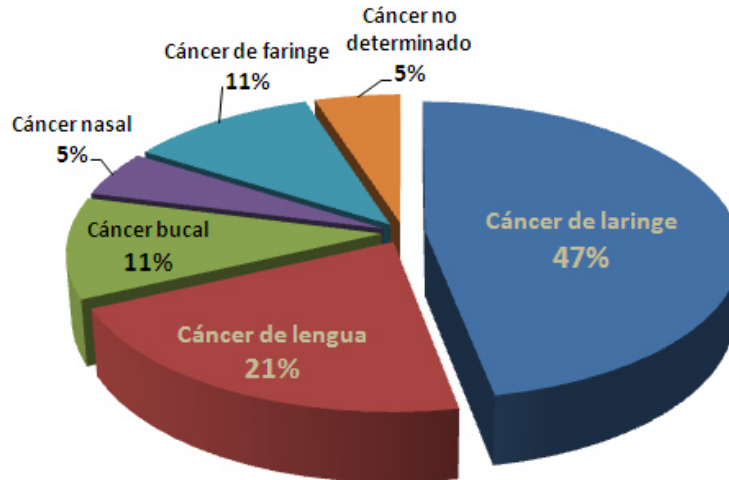


Figura 1. Clasificación histológica de las biopsias de los pacientes.

Selección de muestras

Se realizó el análisis de cada una de las muestras de los pacientes y controles bajo el microscopio compuesto, con la finalidad de evaluar la calidad de la muestra conforme a los criterios de la selección de la muestra. Al observar un número mínimo de 30 a 35 de células por campo, así como las características morfológicas normales del epitelio bucal, se consideró que la muestra cumplía con la calidad requerida para realizar la técnica de DBD-FISH. Esta consideración cuantitativa se estableció partiendo que durante el proceso del DBD-FISH se van perdiendo células durante los pasos de lavados, y a una menor concentración no prevalecen suficientes células para poder continuar con la técnica. Se tomó en cuenta también la calidad de la toma de muestra, ya que se observó que algunas muestras tenían demasiada materia alba y escasa cantidad de células por campo. En la Figura 2 se puede observar la calidad de las muestras que se utilizaron para este estudio. Bajo este criterio solo 6 muestras de pacientes y 5 controles resultaron útiles para ser procesadas para la técnica DBD-FISH.

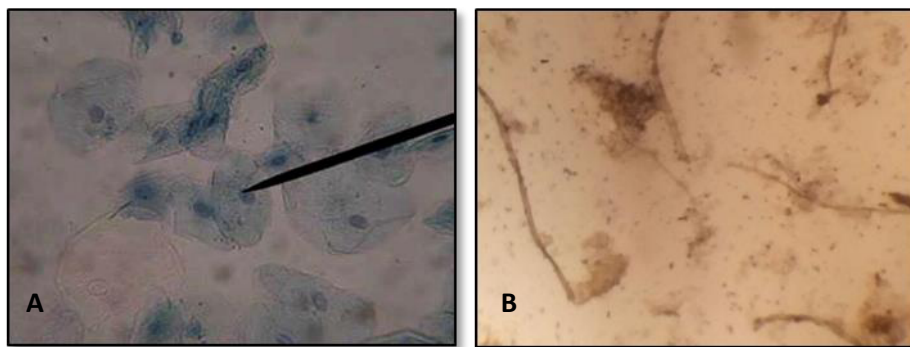


Figura 2. Evaluación de la calidad de las muestras bajo el microscopio compuesto (40X). A. Muestra de células bucales sin materia alba. B. Muestra de células bucales con alta concentración de materia alba.

DBD-FISH

Se realizó la estandarización de la técnica para células de epitelio bucal, con el propósito de establecer las condiciones óptimas para la evaluación de daño al DNA en genoma completo en las muestras de los pacientes. En las células epiteliales control, se observó un nivel de marcaje fluorescente considerado como basal o normal, mientras que en una célula de paciente (previamente obtenida para su uso en la estandarización), se observó un daño mayor (Figura 2).

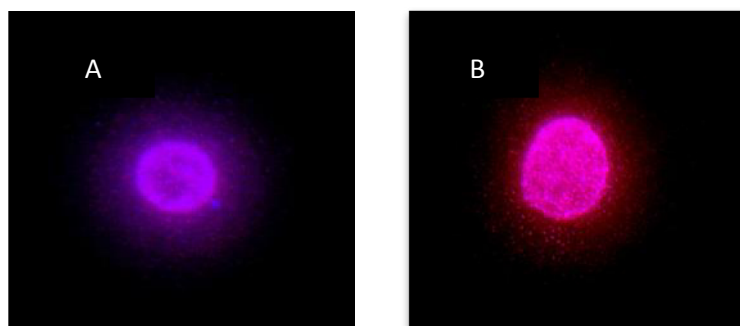


Figura 3. Comparación de células de epitelio bucal sin daño y con daño.

(A) Célula control presentando daño basal (B) Célula de paciente con cáncer mostrando una mayor intensidad de fluorescencia.

Una vez establecida la técnica, se corroboró su efectividad para la detección gradual de daño en células de epitelio bucal, esto se realizó siguiendo un protocolo establecido en el laboratorio por Cortes-Gutierrez *et. al.* (2012). Esta prueba consistió en provocar un daño a

las células utilizando peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a diferentes concentraciones (0.03%, 0.3% y 3%) y compararlas con células control. Se observó que a medida que aumenta la concentración de H_2O_2 se incrementa el nivel de fluorescencia comparado con la célula control con daño basal, lo cual permite confirmar una progresión del daño en dichas células (Figura 4).

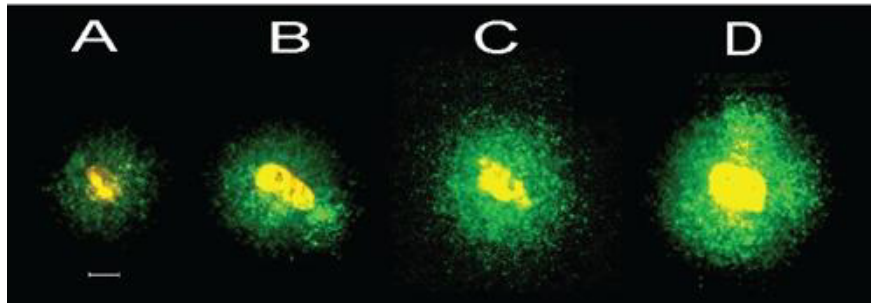


Figura 4. Progresión gradual del daño producido por H_2O_2 . (A) Célula control mostrando daño basal, (B) célula con 0.03% de H_2O_2 , (C) con 0.3% y (D) con 3%.

Para confirmar y sustentar los resultados obtenidos por la prueba previamente realizada se optó por el uso de una sonda específica comercial para la región CEP1. Se siguió el mismo proceso utilizado para la sonda completa y se observó la señal fluorescente esperada, con lo que se corroboró la funcionalidad de la técnica DBD-FISH (Figura 5).

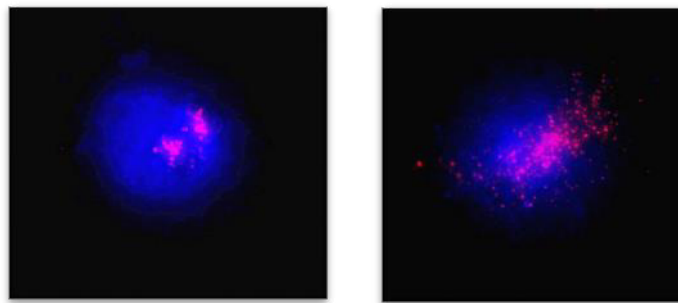


Figura 5. Marcaje específico con la sonda CEP1. (A) Célula control mostrando un marcaje basal. (B) Célula de paciente con cáncer mostrando el marcaje con la sonda CEP1.

Posteriormente se realizó la técnica DBD-FISH a las 5 muestras control y 6 muestras de pacientes que fueron seleccionadas. El resultado obtenido fue satisfactorio, lo cual fue evidenciado por la detección de la señal fluorescente en todas las muestras. Una vez procesadas las laminillas con la técnica DBD-FISH estas fueron analizadas con microscopía de fluorescencia, en células de epitelio bucal se observó la formación de un halo de material genético disperso alrededor de los núcleos en el cual se observaba claramente la diferencia pronunciada entre muestras control y muestras problema (Figura 6). El marcaje observado en las muestras del grupo control se consideró como daño basal. El resultado obtenido fue satisfactorio, lo cual fue evidenciado por la detección de la señal fluorescente en todas las muestras.

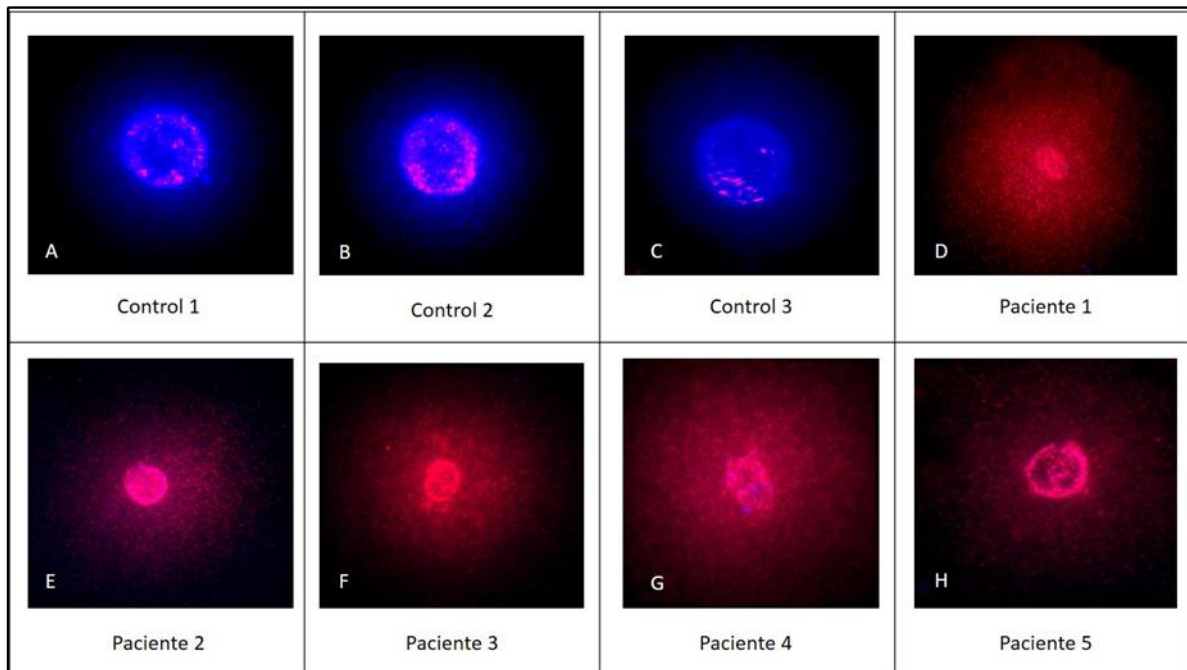


Figura 6. Células control y de pacientes mostrando diferentes niveles de marcaje.

Las imágenes A, B y C pertenecen a células control mostrando un nivel basal de daño, el núcleo se muestra con fluorescencia azul, mientras que el daño se muestra en color rojo; las imágenes D, E, F, G y H pertenecen a células de pacientes, las cuales muestran un daño notorio que se evidencia por la fluorescencia roja y el núcleo apenas visible se muestra en color azul.

El análisis estadístico para evaluar el daño en células de epitelio bucal mostró un incremento significativo de la Densidad Integrada (DI) de acuerdo al desarrollo neoplásico.

El valor de DI promedio para células control fue de 11309.216 y para células de pacientes 49338.33, lo que resulta en una DI 4.3 veces mayor en células de pacientes con respecto a células control. Los datos para células de individuos sanos (control) y pacientes se presentan en las Tablas 3 y 4.

Tabla 3. Análisis de la densidad integrada (DI) de fluorescencia en células de individuos sanos (control).

Controles	Área	Intensidad	Densidad Integrada
1	40.67	206.21	8907.5
2	108.67	168.55	20270.7
3	47.14	170.85	8778.19
4	30.81	173.72	5942.77
5	67.38	172.13	12646.92
Promedio	58.934	178.292	11309.216

Tabla 4. Análisis de la densidad integrada (DI) de fluorescencia en células de pacientes con cáncer bucal.

Paciente	Tipo de Malignidad	Área	Intensidad	Densidad Integrada
1	Cáncer Epidermoide de Lengua	163.18	188.28	32869.66
2	Tumor Maligno de la Laringe	369.21	185.04	75931.73
3	Tumor Maligno de la Lengua	250.5	189.15	50225.05
4	Tumor Maligno de la Orofaringe	234.04	188.02	46336.86
5	Tumor Maligno de la Boca	305.71	157.34	52348.58
6	Tumor Maligno de la Laringe	209.93	162.56	38318.09
Promedio		255.43	178.4	49338.33

Detección molecular del Virus del Papiloma Humano (VPH)

El total de muestras obtenidas tanto de pacientes de cáncer bucal como controles fueron procesadas para la detección de secuencias del VPH. La detección del virus se hizo a través del kit comercial Inno-LiPA VPH (Innogenetics NV, Ghent, Belgium). Se realizó la extracción de DNA de las muestras y se procedió a la amplificación de secuencias específicas del virus, de esta manera se encontró que de las 48 muestras sólo una correspondiente a un paciente con cáncer bucal contaba con la presencia del VPH, lo cual representa el 2.6 % de la población con cáncer bucal analizada. En la Figura 7 se observa el corrimiento electroforético de la amplificación del VPH en un gel de agarosa.

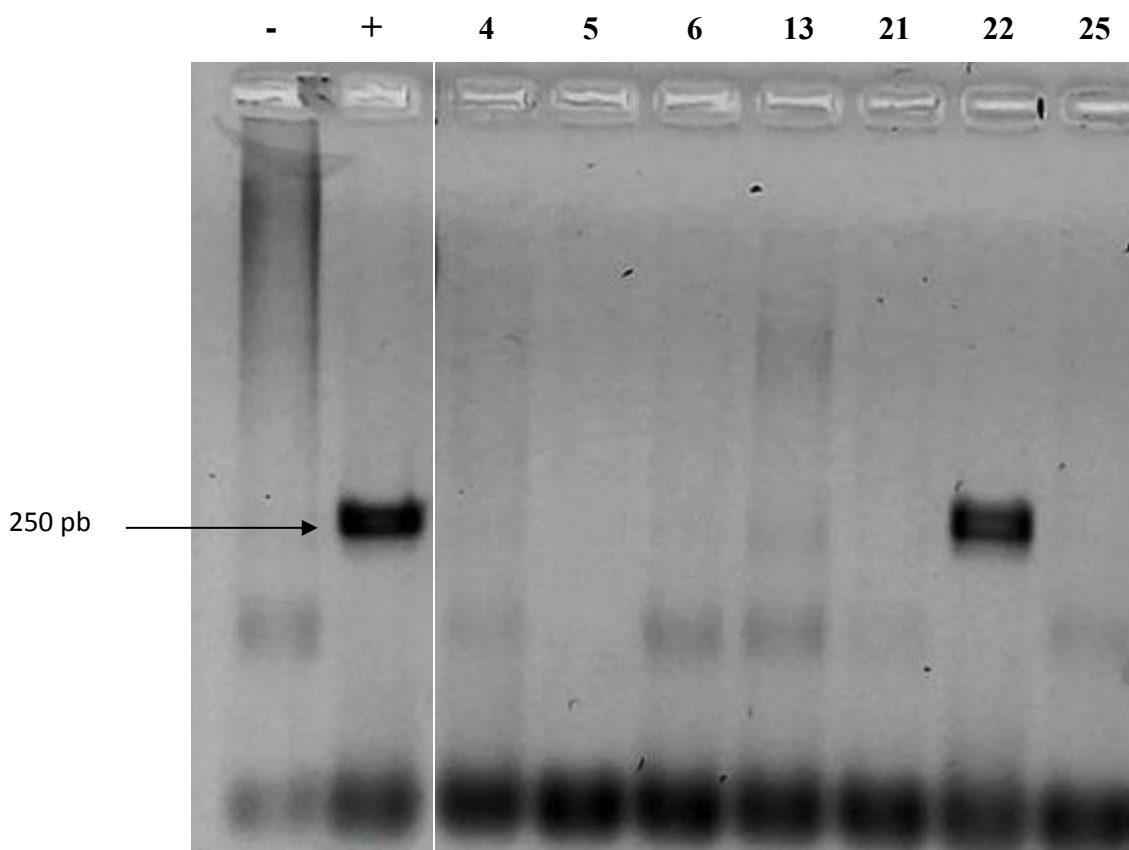


Figura 7. Amplificación de secuencias específicas del Virus del Papiloma Humano en muestras de pacientes con cáncer bucal y controles. El corrimiento electroforético se realizó en un gel de agarosa al 1.5%. Carriles: -: control negativo; +: control positivo; 4, 5, 6, 13, 21 y 25 muestras de pacientes negativos a VPH; mientras que el carril 22 muestra de paciente con presencia de VPH.

Estadística

Utilizando la prueba de ANOVA se encontró que si hay una diferencia significativa ($P < 0.0001$) en todas las variables (área, intensidad de fluorescencia y densidad integrada) entre los dos grupos analizados (controles y pacientes). Con la prueba de puntos de corte se demostró que un porcentaje de un poco más del 88% de las células de pacientes caen en valores mayores de 67.46 pixeles y 12643.34 pixeles. En controles, la mayoría de las células, arriba del 75%, caen en valores menores de 67.46 y 12643.34 como se pueden apreciar en las Tablas 6 y 7 ubicadas en el Anexo 2.

DISCUSIÓN

El DBD-FISH es una técnica versátil y sensible establecida recientemente que ha mostrado un gran potencial en la evaluación de daño al DNA en genoma completo o en secuencias específicas, lo que se busca es visualizar y evaluar el daño al DNA en respuesta a condiciones de estrés, tales como la radiación (Fernández *et al*, 2001) o virus (Cortés *et al*, 2011).

Las células más utilizadas en estudios con DBD-FISH en seres humanos son los linfocitos de sangre periférica y recientemente se ha sugerido el uso de células de epitelio bucal como una alternativa no invasiva para el monitoreo del efecto de diversos agentes genotóxicos, tanto de exposición laboral como ambiental. Reportes previos en la literatura han demostrado que las células bucales son más sensibles que los linfocitos al daño genético inducido por humo de cigarro (Salama *et al.*, 1999), mutágenos ambientales (Yildirim *et al.*, 2006) y cáncer oral (Saran *et al.*, 2008).

Por lo anterior en este trabajo se planteó la utilización de la técnica de DBD-FISH como una alternativa viable y sensible para evaluar el daño al DNA en células provenientes de muestras de epitelio bucal normal en comparación con células de biopsias de pacientes con diversos tipos de cáncer oral, encontrando diferencias significativas en el daño al DNA en genoma completo entre células normales y tumorales, lo que podría ser explicado por la inestabilidad genómica característica de las células de cáncer oral, lo que ha sido demostrado a través de numerosos estudios, incluyendo inestabilidad de microsatélites, inestabilidad cromosómica, metilación de DNA, entre otros (Manisha and Vidhi, 2011).

Un estudio realizado por Cortés-Gutiérrez *et.,al*, 2011 sugiere que el daño al DNA es una característica estructural inherente en células epiteliales normales del cérvix y está presente en bajos niveles que pueden ser detectables con la técnica DBD-FISH. También observaron que el incremento del daño al DNA mostraba una correlación positiva con el grado o estadio en cáncer cervical, indicando el valor pronóstico de la técnica (Cortés *et al*, 2011).

También se están realizando investigaciones multifactoriales para evaluar el grado de correlación entre cáncer bucal y diversos factores de riesgo. En un estudio realizado en el 2015 se analizaron las variables: edad, género, índice de masa corporal, consumo de tabaco (activo y pasivo), alcohol, bebidas calientes, traumatismo crónico de la mucosa oral, candidiasis bucal, VPH, pérdida dentaria, dieta, carcinógeno ambientales, arsénico en agua de consumo e historia familiar de cáncer. Se concluye que mayor número de factores de riesgo a los que un individuo haya estado expuesto, mayor es el riesgo de aparición de cáncer bucal (Piemonte, 2015).

El análisis del género en la población de pacientes con cáncer bucal en este estudio muestra una proporción hombres-mujeres de 4 a 1, lo que es similar a otros estudios realizados en nuestro país (Frias *et al.*, 1998). Reportes de la literatura muestran que la proporción de nuevos casos diagnosticados es variable entre distintos países, por ejemplo en el 2014 el Instituto Nacional del Cáncer en Brasil se reportó una proporción de hombres-mujeres de 2.8 a 1 (Inca Brasil, 2014), mientras que en México un estudio reveló una proporción de 3-5 a 1 (Frias *et al.*, 1998). En general se tiene el consenso que el mayor número de casos de cáncer bucal ocurre en el sexo masculino, lo es atribuible a los roles de género, ya que tradicionalmente los varones asumen estilos de vida menos saludables, se dedican a profesiones de riesgo y descuidan con más facilidad su salud bucal (Rieta *et al.*, 2005; Cruz *et al.*, 2006).

La edad promedio del diagnóstico de lesiones cancerosas en la cavidad oral en este estudio fue de 65±10 años, reportes similares muestran que en países de occidente la edad promedio del diagnóstico de cáncer bucal oscila entre 51 y 60 años (Gaviria *et al.*, 2006). En México se ha descrito que la máxima incidencia de cáncer de orofaringe ocurre entre los 50 y 70 años de edad (Frias *et al.*, 1998).

Los principales factores relacionados con la aparición de cáncer bucal son el consumo de tabaco y alcohol y se ha demostrado ampliamente la existencia de un sinergismo en la génesis de este tipo de cáncer. El historial de consumo en los pacientes de este estudio, muestran que alrededor de un tercio de ellos eran consumidores habituales de ambos productos. Varios estudios han concluido que el riesgo de desarrollar cáncer oral es nueve veces mayor en fumadores que en no fumadores (Jovanovic *et al.*, 1993; Lewin *et al.*,

1998). El mecanismo de carcinogénesis propuesto involucra numerosos constituyentes del humo del tabaco, sin embargo se ha encontrado que algunos polimorfismos en enzimas requeridas en la biotransformación de procarcinógenos asociados al tabaco podrían estar involucrados en la susceptibilidad a cáncer oral (Singh *et al.*, 2013).

En un estudio reciente se evaluó el daño al DNA en células exfoliadas de la mucosa oral en fumadores y no fumadores, a través de análisis de micronúcleos y muerte celular (pícnosis, cariólisis y cariorrexis). Los resultados mostraron una diferencia significativa entre ambos grupos, indicando que el cigarro es capaz de inducir la formación de micronúcleos en células de la mucosa oral, pero sin afectar eventos de muerte celular característicos de la necrosis, con ello los autores proponen a la prueba de micronúcleos como un método adecuado para predecir el riesgo de cáncer oral (Pereira *et al.*, 2015).

El consumo de alcohol es otro factor asociado al desarrollo de cáncer bucal. Se ha propuesto que la degradación y metabolismo de este en el organismo genera formas activas que tienen potencial carcinogénico, como es el caso del acetaldehído, un producto de la oxidación del etanol (Boccia *et al.*, 2008).

En este estudio se realizó también la búsqueda de secuencias específicas del Virus del Papiloma Humano (VPH), de las 48 muestras analizadas (38 pacientes y 10 controles) solamente en una muestra se amplificó la secuencia específica para VPH (2.6% de las muestras de cáncer). A diferencia de lo que ocurre en cáncer cervical, donde existe una fuerte asociación al VPH, en cáncer bucal la relación no está aún bien establecida, sin embargo estudios recientes sugieren la existencia de un rol carcinogénico del VPH en tumores de cavidad oral, especialmente en el caso de VPH 16 (Vargas *et al.*, 2012). La prevalencia reportada de VPH en tumores de cavidad oral es muy variable, siendo de al menos 18.9% (Quintero *et al.*, 2013). En una investigación reciente realizada en Brasil, se analizaron 30 muestras de carcinoma bucal de células escamosas para VPH, en ninguna de ellas se logró la amplificación, lo cual si ocurrió en líneas celulares utilizadas como control positivo, los autores mencionan que de acuerdo a la literatura los sitios anatómicos más frecuentemente positivos a VPH son la base de la lengua, seguida de las tonsilas palatinas, que con correspondieron a los sitios de colecta de sus muestras (Simonato *et al.*, 2016).

El género como factor de riesgo de desarrollar cáncer de orofaringe fue analizado en un estudio cohorte de infección oral por VPH 16, de una población de 409 pacientes jóvenes (18-25 años de edad), se encontró que el riesgo de infección se incrementó significativamente en función del número de parejas con las que se practicó sexo oral en los últimos 3 meses en hombres, pero no en mujeres. En contraste, el riesgo entre las mujeres, pero no entre los hombres disminuyó significativamente a mayor número de parejas sexuales vaginales (D'Souza *et al.*, 2016).

El impacto de la vacunación contra VPH en la prevención de cáncer bucal ha sido abordado recientemente. Un estudio aleatorizado controlado publicado en el 2013 mostró que la prevalencia de VPH oral en mujeres vacunadas 4 años atrás fue menor que en mujeres que no recibieron la vacuna, lo que sugiere un impacto positivo de la vacunación en la prevención de cánceres de cavidad oral asociadas a VPH (Herrero *et al.*, 2013).

Desde una perspectiva clínica, la presencia de daño genómico evaluado por la técnica DBD-FISH permite distinguir entre malignas bucales significativas de aquellas que no lo son, y también establecer las lesiones cancerosas con más riesgo a evolucionar a una etapa más avanzada, por lo que puede ser una herramienta de gran utilidad para el diagnóstico y pronóstico en cáncer oral. Sin embargo se requiere realizar más estudios para su validación.

CONCLUSIONES

La técnica DBD-FISH es fácilmente aplicable a laminillas de células bucales y proporciona resultados certeros que son fáciles de interpretar.

Los diferentes tipos de cáncer bucal muestran una elevada inestabilidad genómica, que se traduce en un mayor daño al DNA en genoma completo, en comparación con células bucales sanas.

La prevalencia del Virus del Papiloma Humano (VPH) fue del 2.6% en la población con cáncer bucal y no se encontró en muestras de pacientes sanos.

Se sugiere a la técnica DBD-FISH con sondas de DNA de genoma completo o secuencias específicas como una nueva herramienta tanto diagnóstica como pronóstica en cáncer bucal, sin embargo se requieren estudios adicionales para validar su potencial aplicación en la clínica.

BIBLIOGRAFÍA

Ahnström G, Edvardsson KA. 1974. Radiation-induced single-strand breaks in DNA determined by rate of alkaline strand separation and hydroxyapatite chromatography: an alternative to velocity sedimentation. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 26, 493-497.

Ahnström G. 1988. Techniques to measure DNA strand breaks in cells: a review. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 54, 695-707.

Baiget M, Gallano P, Tizzano E. 1995. Técnicas de biología molecular. Sociedad española de bioquímica clínica y patología molecular. Ed. SEQC.

Bernard HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol.* 2005, 32 Suppl 1: S1-6

Boccia S, Cadoni G, Sayed-Tabatabaei FA, Volante M, Arzani D, De Lauretis A, 2008 CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, EPHX1 exons 3 and 4, and NAT2 polymorphisms, smoking, consumption of alcohol and fruit and vegetables and risk of head and neck cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*;134:93-100.

Bunch R, Gewirtz DA, Povirk LF. 1992. A Combined alkaline unwinding / southern blotting assay for measuring low levels of cellular DNA breakage within specific genomic regions. *Oncology Research* 4, 7-15.

Bunch RT, Gewirtz DA, Povirk F. 1995. Ionizing radiation-induced DNA strand breakage and rejoining in specific genomic regions as determined by alkaline unwinding/Southern blotting method. *Int. J. Radiat. Biol. Relat Stud Phys Chem Med* 68, 553-562.

Chu G, Vollrath D, Davis RW. 1986. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science* 234, 1582-1585.

Chu G. 1991. Bag model for DNA migration during pulsed-field electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci* 88, 11071-11075.

Cortés-Gutiérrez EI, Dávila Rodríguez MI, Fernández JL, López-Fernández C, Gosálvez J. 2011 DNA damage in women with cervical neoplasia evaluated by DNA breakage detection-fluorescence in situ hybridization. *Anal Quant Cytol Histol* ;33:175-81.

Cruz GD, Salazar CR, Morse DE. 2006 Oral and pharyngeal cancer incidence and mortality among Hispanics, 1996-2002: the need for ethnoregional studies in cancer research. *Am J Public Health*; 96(12):2194-200.

Das BC. 1988. Factors that influence formation of sister chromatid exchanges in human blood lymphocytes. *Crit Rev Toxicol* 19, 43-86.

DGE-RHNM. Compendio del Registro Histopatológico de las neoplasias en México. Mortalidad y Morbilidad. 2002.

D'Souza Gypsyamber, Wentz Alicia, Kluz Nicole, Zhang Yuehan, Sugar Elizabeth, Youngfellow Renee M., Guo Yingshi, Xiao Weihong and Gillison Maura L. 2016 Gender differences in risk factors and natural history of oral human papillomavirus (HPV) infection. *J Infect Dis*. 213 (12): 1893-1896.

Duensing S, Münger K. 2004. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int J Cancer* 109 (2):157-166

Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* 339: 37-59.

Fangman WL. 1978. Separation of very large DNA molecules by gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 5, 653-665.

Fernández JL, Goyanes VJ, Ramiro-Díaz J, Gosálvez J. 1998. Application of FISH for in situ detection and quantification of DNA breakage. *Cytogenet Cell Genet* 82:251-6.

Fernández JL, Vázquez-Gundín F, Rivero MT, Genescá A, Gosálvez J, Goyanes V. 2001 DBD-FISH on neutral comets: simultaneous analysis of DNA single- and doublestrand breaks in individual cells. *Exp Cell Res*; 270:102-9.

Fernández JL, Vázquez-Gundín F, Rivero MT, Goyanes V, Gosálvez J. 2001. Evidence of abundant constitutive alkali-labile sites in human 5 bp classical satellite DNA loci by DBD-FISH. *Mutat Res* 473(2): 163-8.

Fertil B, Modak S, Chavaudra N, Debry H, Meyer F, Malaise EP. 1984. Detection in situ of γ -ray induced DNA strand breaks in single cells: enzymatic labeling of free 3'-OH ends. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 46, 529-540.

Frías M, Zeichner G, Suchil L, Ochoa FJ. 1997 Epidemiología descriptiva del cáncer de cavidad bucal en el Instituto Nacional de Cancerología. *Rev Inst Nal Cancerol*;43:80-85.

Frías M, Zeichner G, Suchil L. 1997. Epidemiología descriptiva del cáncer de cavidad bucal en el Instituto Nacional de Cancerología (1985-1992). *Cancerología*. 43: 80-85

García-Carranca A, Gariglio PV. Molecular aspects of human papillomaviruses and their relation to uterine cervix cancer. *Rev Invest Clin*. 1993, 45: 85-92

Gaviria LA, Monsalve BM, Monsalve PA, Peláez MC. 2006 Caracterización del cáncer oral en 127 muestras tomadas en laboratorios de la ciudad de Medellín de 1999 al 2003. *CES Odontol*; 19(1):39-49.

Gonzalez-Losa Mdel R, Barrera ES, Herrera-Pech V, Conde-Ferrández L, Puerto-Solís M, Ayora-Talavera G. 2015 Epidemiology of oral HPV in the oral mucosa in women without signs of oral disease from Yucatan, Mexico. *Braz J Microbiol.*;46(1):301-6.

Gosálvez J, Lopez-Fernández C, García de la Vega C, Mezzanotte R, Fernández JL, Goyanes V. 1993. Selective digestion of mouse chromosomes with restriction endonucleases. Oligonucleotide priming of single-stranded DNA produced with exonuclease III. *Genome* 36, 230-234.

Gravholt CH, Friedrich U, Caprani M, Jørgensen AL. 1992. Breakpoints in Robertsonian translocations are localized to satellite III DNA by fluorescence in situ hybridization, *Genomics* 14 924–930.

Ha PK , Califano JA. The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004, 15: 188-196

Herrero R, Quint W, Hildesheim A, Gonzalez P, Struijk L, Katki HA, 2013 Reduced prevalence of oral human papillomavirus (HPV) 4 years after bivalent HPV vaccination in a randomized clinical trial in Costa Rica. *PLoS One*;8:68329.

Instituto Nacional de Câncer (Inca). Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro.

Jean Pierre M. 1994 Human satellite 2 and 3. *Ann Genet*37,163-171.

Jovanovic A, Schulten EA, Kostense PJ, Snow GB, van der Waal I. 1993 Tobacco and alcohol related to the anatomical site of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*;22:459-462.

Kanter PM, Schwartz HS. 1982.A fluorescence enhancement assay for cellular DNA damage. *Molecular Pharmacology* 22, 154-151.

King EM, Gilson R, Beddows S, Soldan K, Panwar K, Young C, Jit M, Edmunds WJ, Sonnenberg P. 2015 Oral human papillomavirus (HPV) infection in men who have sex with men: prevalence and lack of anogenital concordance. *Sex Transm Infect*; 91(4):284-6.

Klaude M, Eriksson S, Nygre J, Ahnström G. 1996. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutation Res* 363, 89-96.

Kodym R, Hörth E. 1995. Determination of radiation-induced DNA strand breaks in individual cells by non-radioactive labelling of 3'OH ends. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 68, 133-139.

Kohn KW, Ewig RAG, Erickson LC, Zwelling LA. 1981. Measurement of strand breaks and cross links by alkaline elution. *DNA Repair: A Laboratory Manual of Research Procedures*, Edited by P.C. Hanawalt and E.C. Friedberg (New York: Marcel Dekker), pp 379-401.

Lewin F, Norell SE, Johansson H, Gustavsson P, Wennerberg J, Biorklund A, 1998 Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck: a population-based case-referent study in Sweden. *Cancer*; 82:1367-1375.

Lowy DR, Schiller JT. 2012 Reducing HPV-associated cancer globally. *Cancer Prevention Research (Philadelphia)*; 5(1):18-23.

Maehara Y, Anai H, Kusumoto T, Sakaguchi Y, Sugimachi K. 1989. Nick Translation Detection in situ of cellular DNA strand break induced by radiation. *A. J. Pathol.* 134, 7-10.

Manisha Tijare, Vidhi Mathur. 2011 Genomic instability in Oral Cancer: An update and Review. *International journal of Dental Clinics*; 3(2): 65-67.

McGrath RA, Williams RW. 1966. Reconstruction in vivo of irradiated E. coli deoxyribonucleic acid; The rejoining of broken pieces. *Nature* 212, 534-535.

McKelvey-Martin VJ, Green MH, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Méo MP, Collins A. 1993. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat Res* 288: 47-63.

Natarajan AT. 2002. Chromosome aberrations: past, present and future. *Mutat Res* 504, 3-16.

Organización Mundial de la Salud. 2010. Nota descriptiva N°297

Östling O, Johanson K.J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123, 291-298.

Pereira da Silva V.H, Luna Antonio, Pompeia S.B, Ribeiro D.A. 2015 Cytogenetic Biomonitoring in Buccal Mucosa Cells from Young Smokers. *Acta Cytologica*;59:474-478.

Quintero K, Giraldo GA, Uribe ML, 2013 Human papillomavirus types
Riera P, Martínez B. 2006 Morbilidad y mortalidad por cáncer oral y faríngeo en Chile. *Rev Méd Chile*; 133(5):555-63.

Rivero MT, Mosquera A, Goyanes V, Slijepcevic P, Fernández JL. 2004. Differences in repair profiles of interstitial telomeric sites between normal and DNA double-strand ALS in mammalian sperm break repair deficient Chinese hamster cells. *Exp Cell Res* 295(1); 161-172.

Rivero MT, Vazquez-Gundin F, Goyanes V, Campos A, Blasco M, Gosálvez J, Fernandez JL. 2001. High frequency of constitutive alkali-labile sites in mouse major satellite DNA, detected by DNA breakage detection-fluorescence in situ hybridization. *Mutat Res* 483(1-2): 43-50.

Rydberg B, Johansson KJ. 1978. Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. *DNA Repair Mechanisms*. Edited by P.C. Hanawalt, E.C. Friedberg and F.C. Fox, New York. Academic Press, pp 465-468.

Salama A, Serrana M, Au WW. 1999 Biomonitoring using human cells for exposure and health risk assessment. *Mutat Res*; 436:99-112.

Salazar-Piña DA, Pedroza-Saavedra A, Cruz-Valdez A, Ortiz-Panozo E, Maldonado-Gama M, Chihu-Amparan L, Rodriguez-Ocampo AN, Orozco-Fararoni E, Esquivel-Guadarrama F, Gutierrez-Xicotencatl L. 2016 Validation of Serological Antibody Profiles Against Human Papillomavirus Type 16 Antigens as Markers for Early Detection of Cervical Cancer. *Medicine (Baltimore)*; 95(6).

Santos SJ, Singh NP, Natarajan AT. 1997. Fluorescence in situ hybridization with comets. *Exp Cell Res* 232:407-11

Saran R, Tiwari RK, Reddy PP, Ahuja YR. 2008 Risk assessment of oral cancer in patients with pre-cancerous states of the oral cavity using micronucleus test and challenge

Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol.* 2000, 36: 256-263

Sheridan RB, Huang PC. 1977. Single strand breakage and repair in eukaryotic DNA as assayed by S1 nuclease. *Nucleic Acids Res* 4, 299-318.

Simonato LE, Tomo S, Garcia JF, Veronese LA, Miyahara GI. 2016 HPV detection in floor of mouth squamous cell carcinoma by PCR amplification. *J Bras Patol Med Lab.* 52(1):43-49.

Singh R, Haridas N, Shah F, Patel JB, Shukla SN, Patel PS. 2013 Gene polymorphisms, tobacco exposure and oral cancer susceptibility: a study from Gujarat, West India. *Oral Dis*;20:84-93.

Singh, NP, McCoy MT, Tice, RR, Schneider, EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175, 184-91.

Singh N, Smith C, Szabó P, Tang M, Thomale J, Tornaletti S, Ugozzoli L, Van Der Luijt R, Van Houten B, Van Orsouw N, Vijg J, Wallace R, Wallace S, Walsh D, Weinfeld M, Yakes M. 1996. Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations. Ed Pfeifer, G. Plenum Publishing Corporation. pp. 25-34

Smeets SJ, Braakhuis BJ, Abbas S, Snijders PJ, Ylstra B, van de Wiel MA, Meijer GA, Leemans CR, Brakenhoff RH. 2006. Genome-wide DNA copy number alterations in head and neck squamous cell carcinomas with or without oncogene-expressing human papillomavirus. *Oncogene.* 25: 2558-2564

Thomas EA, Thomas CA Jr. 1989. Nucleoid halo expansion indirectly measures DNA damage in single cells. *Exp Cell Res* 183, 149-158.

Vargas-Ferreira F, Nedel F, Etges A, Gomes AP, Furuse C, Tarquinio SB. 2012 Etiologic factors associated with oral squamous cell carcinoma in non-smokers and non-alcoholic drinkers: a brief approach. *Braz Dent J*;23:586-590.

Von Sonntag, C. 1987. *The chemical basis of radiation biology*. Taylor and Francis Ltd. London. pp 71-80

World Health Organization. 2008.

Yildirim LH, Yesilada E, Yologlu SY. 2006 Micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes and exfoliated buccal cells of untreated cancer patients. *Genetika*; 42:705-10.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Jorge Guilibaldo Garza Molina

Candidato para el grado de

Maestro en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

Tesis: EVALUACIÓN DE DAÑO CROMOSÓMICO ESPECÍFICO MEDIANTE
DBD-FISH EN PACIENTES CON CÁNCER BUCAL

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León el 11 de Enero de 1986, hijo de Guilibaldo Garza Molina y Patricia Laura Molina García.

Educación: Egresado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León con el grado de Lic. en Biología en el 2009.

Experiencia Profesional: Puesto de Químico en el Laboratorio Estatal de la Secretaria de Salud en el Departamento de Control Microbiológico en el área de Biología Molecular desde el 2016.

ANEXO 1

Datos clínicos de los pacientes incluidos en el estudio.

No. De Paciente	Sexo	Edad	Probables factores causales				Tipo de Cancer
			Tabaquismo	Alcoholismo	VPH	Otros	
1	M	65	P	P	A		NASAL
2	M	60	A	P	A		LARINGE
3	M	62	A	A	A		LARINGE
4	M	53	A	A	A		LARINGE
5	M	65	P	P	A		NASAL
6	F	73	A	A	A		LENGUA
7	M	75	P	P	A		GANGLIOS LINFÁTICOS
8	M	73	A	A	A		LABIO
9	M	70	P	P	A		GANGLIOS LINFÁTICOS
10	M	51	A	P	A		LENGUA
11	M	66	P	P	A		LARINGE
12	M	61	A	A	A		LENGUA
13	F	72	A	A	A		LENGUA
14	M	74	A	P	A	TRABAJO DE ALTA EXPOSICION	OROFARINGE NO ESPECIFICADO
15	M	70	P	P	A		FARINGE
16	F	78	A	A	A		BUCAL NO ESPECIFICADO
17	F	76	A	A	A		BUCAL NO ESPECIFICADO
18	M	68	A	A	A		LARINGE
19	M	71	A	A	A		LENGUA
20	M	68	P	P	A		LARINGE
21	M	65	A	P	A		LENGUA
22	M	56	A	A	P		LARINGE
23	M	57	A	A	A		LARINGE
24	M	72	A	A	A		LARINGE
25	F	74	A	A	A		BUCAL NO ESPECIFICADO
26	F	32	A	A	A		BUCAL NO ESPECIFICADO
27	M	61	A	A	A		LARINGE
28	M	74	P	A	A	TRABAJO DE ALTA EXPOSICION	LARINGE
29	F	51	P	A	A		LENGUA
30	F	73	A	A	A		LENGUA
31	M	52	P	P	A		LARINGE
32	M	61	A	A	A		LARINGE
33	M	56	P	P	A	TRABAJO DE ALTA EXPOSICION	LARINGE
34	M	76	A	A	A		LARINGE
35	M	70	A	A	A		LARINGE
36	M	57	A	A	A	TRABAJO DE ALTA EXPOSICION	BUCAL NO ESPECIFICADO
37	M	49	A	P	A		LARINGE
38	M	63	P	P	A		LARINGE

ANEXO 2

* PC_Punto de Corte* (Área)

Grupo				PC_Punto de Corte		Total
				<=67.46	>67.46	
Paciente	Individuo 1	Count	2	16	18	
		% within Individuo	11.1%	88.9%	100.0%	
	Individuo 2	Count	1	16	17	
		% within Individuo	5.9%	94.1%	100.0%	
	Individuo 3	Count	1	28	29	
		% within Individuo	3.4%	96.6%	100.0%	
	Individuo 4	Count	0	25	25	
		% within Individuo	0.0%	100.0%	100.0%	
	Individuo 5	Count	0	14	14	
		% within Individuo	0.0%	100.0%	100.0%	
	Individuo 6	Count	0	17	17	
		% within Individuo	0.0%	100.0%	100.0%	
	Total		Count	4	116	120
			% within Individuo	3.3%	96.7%	100.0%
Control	Individuo 7	Count	16	2	18	
		% within Individuo	88.9%	11.1%	100.0%	
	Individuo 8	Count	5	7	12	
		% within Individuo	41.7%	58.3%	100.0%	
	Individuo 9	Count	15	2	17	
		% within Individuo	88.2%	11.8%	100.0%	
	Individuo 10	Count	12	2	14	
		% within Individuo	85.7%	14.3%	100.0%	
	Individuo 11	Count	9	6	15	
		% within Individuo	60.0%	40.0%	100.0%	
	Total		Count	57	19	76
		% within Individuo	75.0%	25.0%	100.0%	

PC_Punto de Corte * (Densidad Integrada)

Grupo				PC_Punto de Corte		Total
				<=67.46	>67.46	
Paciente	Individuo 1	Count	2	16	18	
		% within Individuo	11.1%	88.9%	100.0%	
	Individuo 2	Count	1	16	17	
		% within Individuo	5.9%	94.1%	100.0%	
	Individuo 3	Count	1	28	29	
		% within Individuo	3.4%	96.6%	100.0%	
	Individuo 4	Count	0	25	25	
		% within Individuo	0.0%	100.0%	100.0%	
	Individuo 5	Count	0	14	14	
		% within Individuo	0.0%	100.0%	100.0%	
Individuo 6	Count	0	17	17		
	% within Individuo	0.0%	100.0%	100.0%		
Total		Count	4	116	120	
		% within Individuo	3.3%	96.7%	100.0%	
Control	Individuo 7	Count	16	2	18	
		% within Individuo	88.9%	11.1%	100.0%	
	Individuo 8	Count	5	7	12	
		% within Individuo	41.7%	58.3%	100.0%	
	Individuo 9	Count	15	2	17	
		% within Individuo	88.2%	11.8%	100.0%	
	Individuo 10	Count	12	2	14	
		% within Individuo	85.7%	14.3%	100.0%	
	Individuo 11	Count	9	6	15	
		% within Individuo	60.0%	40.0%	100.0%	
Total		Count	57	19	76	
		% within Individuo	75.0%	25.0%	100.0%	