

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA DE GRADUADOS



**PAPILOMAVIRUS HUMANO E INESTABILIDAD
CROMOSOMICA EN PACIENTES CON CANCER
CERVICOUTERINO EN EL NORESTE DE MEXICO.**

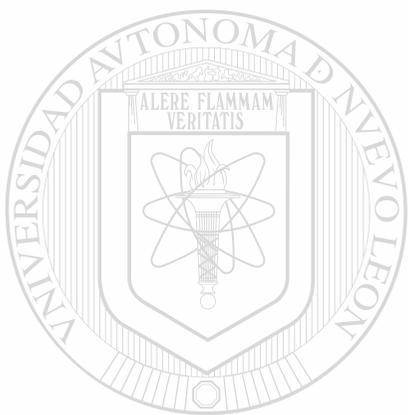
T E S I S

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CON ESPECIALIDAD EN GENÉTICA**

PRESENTA:

M.C. ELVA I. CORTES GUTIERREZ

JULIO DEL 2001



U A N L

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

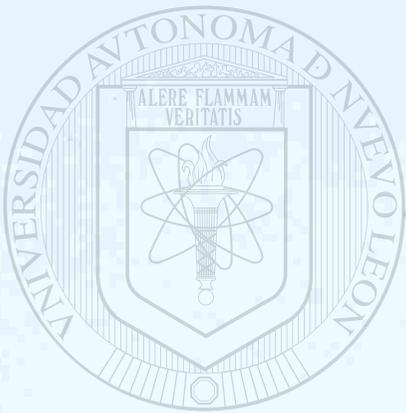
PAPILOMAVIRUS HUMANO E INESTABILIDAD CROMOSOMICA EN PACIENTES
CON CANCER CERVICOUTERINO EN EL NORESTE DE MEXICO.

TD
RC280
.U8
C67
2001
c.1

2001



1080124444



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

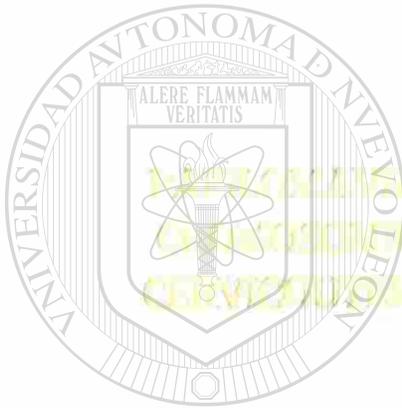
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

EXAMEN DE GRADUADOS



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

QUE COMO REQUISITO PARCIAL
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CON ESPECIALIDAD EN GENÉTICA

PRESENTA:

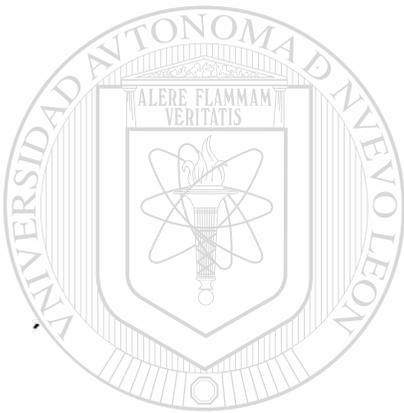
M.C. ELVA I. CORTES GUTIERREZ

JULIO DEL 2001



TD
RC 280

C 7
2001



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

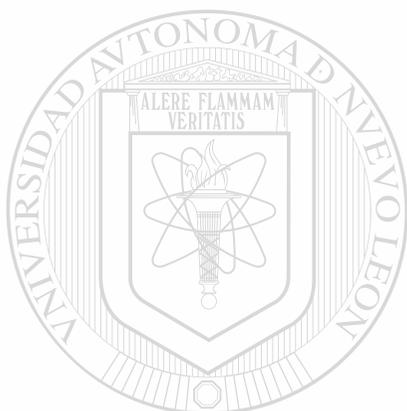
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA DE GRADUADOS

**Papilomavirus Humano e Inestabilidad Cromosómica en Pacientes
con Cáncer Cervicouterino en el Noreste de México.**



TESIS

UANL

que como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en
Ciencias Biológicas con especialidad en Genética presenta la

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

M.C. Elva I. Cortés Gutiérrez

Julio del 2001

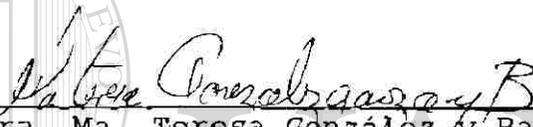
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA DE GRADUADOS

Papilomavirus Humano e Inestabilidad Cromosómica en
Pacientes con Cáncer Cervicouterino en el Noreste de México.

COMISIÓN DE TESIS:



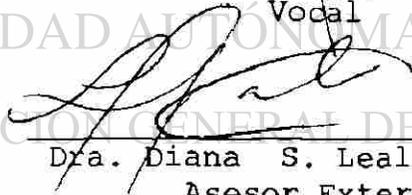
Dr. Mario Morales Vallarta
Director



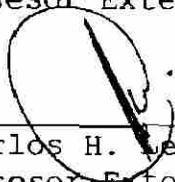
Dra. Ma. Teresa González y Barrón
Secretario



Dr. Juan Manuel Aldocer González
Vocal



Dra. Diana S. Leal Klevezas
Asesor Externo



M.C. Carlos H. Leal Garza
Asesor Externo



Dra. Julia Verde Star
Subdirectora de la Subdirección de Postgrado

Julio del 2001

INDICE

| | |
|--|------------|
| Lista de Abreviaturas | <i>i</i> |
| Lista de figuras y tablas | <i>iii</i> |
| Dedicatoria | <i>v</i> |
| Agradecimientos | <i>vi</i> |
| Resumen Autobiográfico | <i>vii</i> |
| | |
| I. Resumen | 1 |
| | |
| II. Introducción | 3 |
| | |
| III. Antecedentes | |
| A. Generalidades | 5 |
| B. Intercambio de Cromátides Hermanas (ICH) en Pacientes con Cáncer Cervicouterino..... | 8 |
| C. Micronúcleos (MN) en pacientes con Cáncer Cervicouterino..... | 10 |
| D. Validez de la técnica Molecular de PCR-RFLPs para la detección del VPH | 12 |
| | |
| IV. Material y Métodos. | |
| A. Población Estudiada | 16 |
| B. Intercambio de Cromátides Hermanas (ICH) | 18 |
| C. Micronúcleos (MN)..... | 19 |
| D. Técnica Molecular de PCR-RFLPs | 21 |
| E. Análisis Estadístico | 26 |

V. Resultados.

A. Intercambio de Cromátides Hermanas (ICH) en
Pacientes con Cáncer Cervicouterino 28

B. Micronúcleos (MN) en pacientes con Cáncer
Cervicouterino..... 29

C. Validez de la técnica Molecular de PCR-RFLPs
para la detección del VPH 31

VI. Discusiones

A. Intercambio de Cromátides Hermanas (ICH) en
Pacientes con Cáncer Cervicouterino 34

B. Micronúcleos (MN) en pacientes con Cáncer
Cervicouterino 36

C. Validez de la técnica Molecular de PCR-RFLPs
para la detección del VPH 38

VII. Conclusiones y Perspectivas 40

VIII. Bibliografía 42

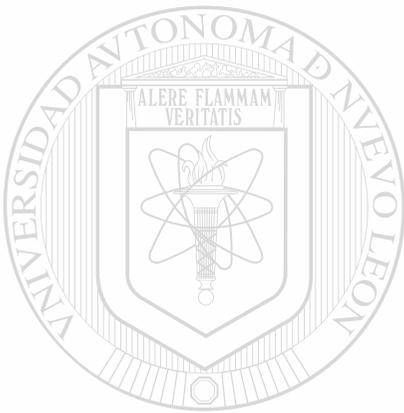
IX. Publicaciones Producidas 49

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Lista de Abreviaturas

| | |
|----------|---|
| CaCU | Cáncer Cervicouterino |
| DOC | Detección Oportuna de Cáncer |
| DNA | ácido desoxiribonucléico |
| d dNTP's | nucleótido |
| d ATP | nucleótido (adenina) |
| d CTP | nucleótido (citosina) |
| d GTP | nucleótido (guanina) |
| d TTP | nucleótido (timina) |
| E | Región temprana "early" |
| FIGO | Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia |
| gl | grados de libertad |
| ICH | Intercambio de Cromátides Hermanas |
| L | Región tardía "late" |
| M | Molar |
| mg | miligramo |
| mM | milimolar |
| MgCl | Cloruro de Magnesio |
| MN | Micronúcleos |
| ml | mililitro |
| NIC | Neoplasia Intraepitelial Cervical |
| ng | nanógramo |
| nm | nanómetro |
| OR | Razón de momios |
| ORF | Región de control |
| P | Probabilidad |
| Pap | Papanicolaou |
| pb | pares de bases |
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa |
| Pmol | Pico moles |

| | |
|-------|---|
| RFLPs | Restriction Fragment Length Polymorphisms |
| µg | microgramo |
| µl | microlitro |
| VPH | Virus del Papiloma Humano |



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Lista de Figuras y Tablas

| | Pag. |
|----------|---|
| Figura 1 | Microscopia electrónica del VPH tipo 16 7 |
| Figura 2 | Mapa genético del VPH tipo 16 7 |
| Figura 3 | Metafase obtenida a partir de cultivos de Linfocitos de sangre periférica donde se muestran los ICHs 11 |
| Figura 4 | Linfocito de sangre periférica donde se muestra un MN 11 |
| Figura 5 | Koilocitos caracterizados por una gran zona peri nuclear y binucleación 14 |
| Figura 6 | Condilomas cervicales observados mediante Colposcopio (60X)..... 14 |
| Figura 7 | Amplificación molecular de la región viral L1 mediante PCR utilizando los iniciadores MY09 y MY11 23 |
| Figura 8 | Digestión de los productos amplificados por PCR (MY09 y MY11) para análisis de RFLPs 25 |

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

Lista de Figuras y Tablas

| | Pag. | |
|---------|--|----|
| Tabla 1 | Secuencia nucléotica de los primers utilizados para la amplificación del VPH (MY09 y MY11) y para el gen beta globina (GH20 y PC04)..... | 22 |
| Tabla 2 | Número promedio de ICH en pacientes con CaCU.... | 28 |
| Tabla 3 | Heterogeneidad (X^2) de MN en epitelio cervical y linfocitos de sangre periférica entre los grupos estudiados | 29 |
| Tabla 4 | Análisis univariado de células con MN en epitelio y linfocitos | 30 |
| Tabla 5 | Prueba de tendencia lineal en una tabla de contingencia de 2x4 | 30 |
| Tabla 6 | Distribución del número de mujeres infectadas con VPH diagnosticadas mediante los métodos de citohistopatología, colposcopia y PCR | 31 |
| Tabla 7 | Resumen estadístico de los valores de validez de la PCR versus las técnicas citohistopatológica/Colposcopia | 32 |
| Tabla 8 | Análisis univariado de la infección de VPH de acuerdo a su genotipo | 33 |

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Dedicatoria

A MIS PADRES: *Leonel Cortés Guajardo (†).
Emma Gutiérrez de Cortés.*

Quienes con su cariño, ejemplo de una vida sencilla y su gran confianza en mí; hicieron posible la realización de otra meta en mi vida.

A MIS HERMANOS: *Leonel y Emma.*

Por su gran cariño y la alegría de convivir con ellos.

A MIS SOBRINOS: *Karla, Laura, Héctor, Leonel y Sofía*

A MIS MAESTROS, COMPAÑEROS Y AMIGOS: *Por la gran suerte de tenerlos.*

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Biomédica del Noreste (CIBIN), IMSS, al Hospital Regional de Especialidades No. 23 Ignacio Morones Prieto, IMSS, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. Instituciones que hicieron posible la realización de este trabajo.

Al Dr. Mario Morales Vallarta, Dra. Ma. Teresa González y Barrón, Dr. Juan Manuel Alcocer González, Dra. Diana S. Leal Klevezas, y al M.C. Carlos H. Leal Garza por su valiosa dirección y asesoría.

Al Dr. Ricardo M. Cerda Flores por el apoyo estadístico brindado.

Al Dr. Antonio Luna y al Sr. Francisco Treviño por la realización del trabajo gráfico que ilustra esta tesis.

A todo el personal de enfermería de la Consulta de Ginecología-Oncológica de Departamento de Oncología por el apoyo brindado en la toma de muestras. Muy especialmente al Dr. Fernando Hernández Garza y al Dr. Ramiro Reyna Hinojosa por el apoyo clínico brindado. ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A mis compañeros de trabajo y amigos: Martha, Elisamaría, Julie, Yolanda, Adriana, Odila, Toño, Ricardo, y Charles por su compañerismo y el apoyo brindado durante el desarrollo de este trabajo.

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

M.C. Elva Irene Cortés Gutiérrez

FECHA DE NACIMIENTO : 4 de Septiembre de 1962

EDUCACIÓN: Biólogo. Enero de 1986. Maestría en Ciencias con Especialidad en Genética. Diciembre de 1991.

EXPERIENCIA PROFESIONAL: Investigador Asociado del Centro de Investigación Biomédica del Noreste, CIBIN, IMSS desde Junio de 1996 a la fecha.

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: Citogenética molecular y mutagénesis del cáncer.

SNI: Candidato a Investigador en el Sistema Nacional de Investigadores a partir de Enero del 2000 a la fecha.

PUBLICACIONES:

- Micronuclei in cervical smears and peripheral lymphocytes from women with and without cervical uterine cancer Leal-Garza CH, Cerda-Flores R, Leal-Elizondo E, Cortes-Gutierrez EI. Mutation Research (en prensa).
- Polymorphism of Ag(+)-NORs in cervical smears from women with cervical cancer. Cortes-Gutierrez EI, Leal-Elizondo E, Cerda-Flores RM, Leal-Garza CH. Anal Quant Cytol Histol 2001 Feb 23:1 9-14.
- Sister chromatid exchanges in peripheral lymphocytes from women with carcinoma of the uterine cervix. Cortes-Gutierrez EI, Cerda-Flores RM, Leal-Garza CH Cancer Genet Cytogenet 2000 Oct 15 122:2 121-3.
- Gonadal dysgenesis and Rokitansky syndrome. A case report. Guitron-Cantu A, Lopez-Vera E, Forsbach-Sanchez G, Leal-Garza CH, Cortes-Gutierrez EI, Gonzalez-Pico I. J Reprod Med 1999 Oct 44:10 891-3.
- Mutagenic activity of diazepam evaluated by in vivo cytogenetic tests. Leal Garza CH, Valenciano Cedillo GG,

Rojas Alvarado MA, Cortes Gutierrez EI. *Arch Med Res* 1998 Winter 29:4 285-9.

- Activity satellite association and polymorphism of Ag stained nucleolus organizer regions (Ag+ NORs) in lymphocytes from women with cervical uterine cancer. Cortes_Gutierrez EI, Reyna_Hinojosa R, Silva_Cudish J, Rojas-Alvarado MA, Leal-Garza CH. *Arch Med Res* 1997 Spring 28:1 19-23
- A case of mosaic Down's syndrome with two Robertsonian translocations. Leal_Garza CH, Cortes_Gutierrez EI, Ortiz_Jalomo R, Garcia_Cavazos R. *Rev Invest Clin* 1996 Sep-Oct 48:5 385-8.
- [Molecular diagnosis of infectious and parasitic diseases] Said-Fernandez S, Leal-Garza CH, Cortes-Gutierrez EI, Barrera-Saldana HA, Sifuentes-Rincon AM, Revol-de Mendoza A, Arguello-Garcia G, Ortega-Pierres MG, Flores-Castaneda MS *Gac Med Mex* 1996 May-Jun 132:3 295-318.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

I. RESUMEN

El Cáncer Cervicouterino (CaCU) es una patología de gran importancia en salud pública a nivel mundial. En nuestro país constituye la primera causa de muerte en mujeres mayores de 25 años de edad. Recientemente se ha establecido que el principal factor etiológico del CaCU es la infección por algunos tipos de Virus de Papiloma Humano (VPH) y que la inestabilidad cromosómica de células infectadas puede determinar la progresión del tumor. Los VPH son pequeños virus de DNA con forma icosaédrica que pertenecen a la familia Papovaviridae. Por lo tanto se hace necesario el establecimiento de métodos diagnósticos-pronósticos adecuados para este tipo de neoplasia. Los objetivos de este estudio fueron: (1) Determinar cualquier posible asociación entre el número promedio de Intercambio de Cromátides Hermanas (ICH)/metafase y Micronúcleos (MN) en mujeres con y sin CaCU. (2) Evaluar la validez de la prueba patológica versus la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la identificación del VPH, y determinar el riesgo de desarrollar CaCU de acuerdo al tipo de VPH mediante la razón de momios (OR). Las mujeres incluidas en este estudio fueron seleccionadas, diagnosticadas y clasificadas de acuerdo al Papanicolaou (Pap) y estudio colposcópico / biopsia en el Hospital de Ginecología y Obstetricia "Ignacio Morones Prieto" del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en Monterrey, México. El estudio de mutagénesis mediante las técnicas citogenéticas de ICH y MN y la detección-tipificación molecular del VPH mediante la PCR-RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms) se llevo a cabo en el laboratorio de citogenética molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste (CIBIN), IMSS. Los

resultados obtenidos en este trabajo indican que: (1) El estudio de mutagénesis mostró un incremento significativo de ICH en mujeres con carcinoma cervical (7.80 ± 1.05) con respecto al grupo control (6.98 ± 1.13) con un poder estadístico de 0.80 y un valor de alfa de 0.05 ($p < 0.05$; t-test). Las frecuencias de MN revelaron una asociación entre la frecuencia de MN y los grados de la lesión cervical, y una tendencia lineal positiva entre la frecuencia de MN y el incremento de riesgo de desarrollar cáncer cervical (2) El método molecular de la PCR identificó al VPH con mayor precisión y exactitud (validez) que los métodos morfológicos convencionales. Una mujer con un VPH de alto riesgo, tiene un riesgo nueve veces mayor de desarrollar CaCU que una mujer con un VPH de bajo riesgo. Nuestros resultados sugieren que estos parámetros citogenéticos-moleculares pueden ser utilizados como biomarcadores para evaluar el riesgo de desarrollar cáncer cervical. Por lo tanto su incorporación a un programa adecuado de Detección Oportuna de Cáncer (DOC) sería de gran utilidad en el diagnóstico, profilaxis y control de esta patología en nuestra región.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Palabras claves : Cáncer Cervicouterino, Virus de Papiloma Humano (VPH), Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), Intercambio de Cromátides Hermanas (ICH), Micronúcleos (MN).

II. INTRODUCCIÓN

El cáncer Cervicouterino (CaCU) es uno de los carcinomas más comunes en las mujeres a nivel mundial y es una de las causas de mortalidad más frecuente en los países en desarrollo. En México, más del 36% de las neoplasias en la mujer corresponden al CaCU, representando así un problema de salud pública muy importante. De acuerdo a las entidades federativas el primer lugar lo ocupa el Distrito Federal con 3,711 casos anuales seguido por el estado de Nuevo León con 1,093 casos (*Dirección General de Epidemiología, 1996*).

El CaCU es una enfermedad caracterizada por el crecimiento anormal y diseminado de células que al desarrollarse en forma incontrolada, avanzan entre los tejidos normales y los destruyen, alterándose así el funcionamiento del organismo. La lesión precursora del CaCU es la Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) y dependiendo del grado de anormalidad celular son clasificados como NIC grado I (displasia leve), NIC grado II (displasia moderada), y NIC III (displasia severa o carcinoma *in situ*), y cuando las células cancerosas neoplásicas epiteliales invaden tejidos subyacentes se le denomina carcinoma invasor (grado I a IV) (*Nelson JH y Cols. 1984*).

Bethesda (*Turman RJ y Cols. 1994*) clasifica este tipo de lesiones en: (1) lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LGSIL) que incluye la NIC I y (2) lesión intraepitelial escamosa de alto grado (HGSIL) que incluye la NIC II y NIC III.

Actualmente, se considera que si se lleva a cabo un diagnóstico temprano de esta neoplasia es potencialmente curable.

En un estudio previo nosotros determinamos que los principales factores de riesgo para el CaCU en el Noreste de México son: edad de 40-49 años, inicio temprano de actividad sexual, promiscuidad sexual, multiparidad, antecedentes de abortos y uso de anticonceptivos orales (Cortés Gutiérrez EI y Cols. 1995). Sin embargo, recientemente diversos estudios moleculares han establecido al Virus del Papiloma Humano (VPH) como el principal factor etiológico en el desarrollo del CaCU (Torroella-Kouri M y Cols. 1998) y algunos estudios citogenéticos sugieren que la presencia de este virus junto con la inestabilidad cromosómica de células infectadas se relacionan estrechamente con la progresión del tumor (Paz-y-Mino C y Cols. 1992).

Por lo tanto se hace necesario en nuestra región el establecimiento de biomarcadores citogenéticos (ICH y MN) y moleculares (detección-tipificación molecular del VPH) útiles en el diagnóstico, profilaxis y control de esta neoplasia.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

III. ANTECEDENTES

A. Generalidades

Virus de Papiloma Humano (VPH). Los VPH son pequeños virus de DNA de la familia Papovaviridae que infectan una gran variedad de vertebrados incluyendo al hombre. Miden 50 nm de diámetro, carecen de membrana, y su cápside tiene forma icosaédrica compuesta por 72 capsómeros (figura 1). A pesar de su amplia distribución, muestran un alto grado de tropismo celular, es decir únicamente infectan epitelios secos (piel) y mucosas (orales y genitales) induciendo la formación de lesiones benignas (verrugas o papilomas), y en asociación con ciertos cofactores pueden producir carcinomas (Peto R, 1986).

Genoma Viral. El genoma de los VPH está constituido de DNA circular de doble cadena de aproximadamente 8,000 pares de bases. La estructura entre ellos varía de 45% a 85% de homología. Su genoma se divide en 3 regiones: (1) región de control (ORF), (2) región temprana (Early = E) y región tardía (Late=L). La región E codifica para proteínas relacionadas con la replicación (E1), la transcripción (E2) y la transformación celular (E6 y E7). La región de expresión tardía (L) codifica para proteínas de la cápside (L1 y L2) (figura 2) (García Carranca A y Cols. 1993).

Papilomavirus Humano y Cáncer Cervicouterino. La primera asociación directa entre VPH y CaCU se puso de manifiesto con el aislamiento del VPH tipo 6, de un condiloma acuminado (zur Hausen H, 1976), posteriormente diversos estudios

epidemiológicos-moleculares han revelado patrones de prevalencia del VPH en lesiones cervicales. Actualmente se estima que más del 95% de las mujeres con CaCU presentan algún tipo de VPH (Torroella-Kouri M y Cols. 1998).

De los más de 80 tipos de VPH descritos actualmente, sólo algunos de ellos (VPH-6, -11, -16, -18, -31, -33 y -35) se localizan en la región genital. Los VPH-6 y -11 se han encontrado en el 90-100% de las lesiones verrugosas o benignas, por lo que son considerados como virus de bajo riesgo de desarrollar CaCU. Por el contrario, los VPH-16, -18, -31, -33 y -35 se han reportado en aproximadamente un 75% a 99% de las lesiones cancerosas por lo que son considerados virus de alto riesgo de desarrollar cáncer.

Mediante estudios de seguimiento de casos se ha observado, que la historia natural de las lesiones de cérvix varía de acuerdo al tipo viral que presentan inicialmente. El 46% de las lesiones con VPH-16 y el 27% con VPH-18 progresaron hasta carcinoma invasor a diferencia de las lesiones que contienen el VPH-6 y -11 (García Carranca A y Cols. 1993). ®

Por lo tanto, las evidencias clínicas y de laboratorio son consistentes en el hecho de que el VPH es el principal factor etiológico del CaCU.

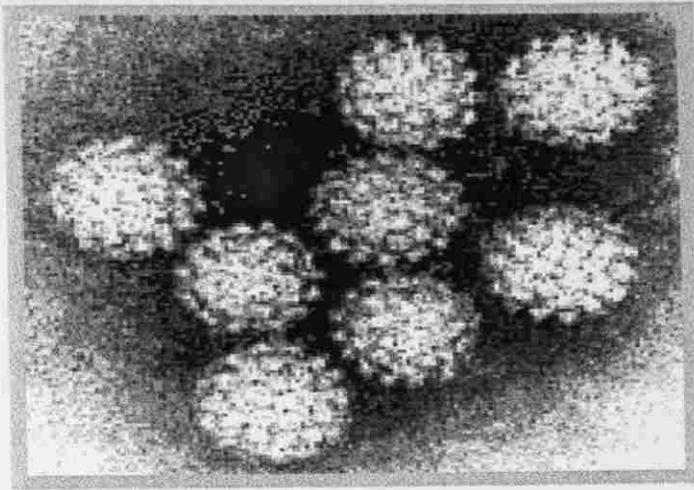


Figura 1. Microscopia electrónica del VPH 16

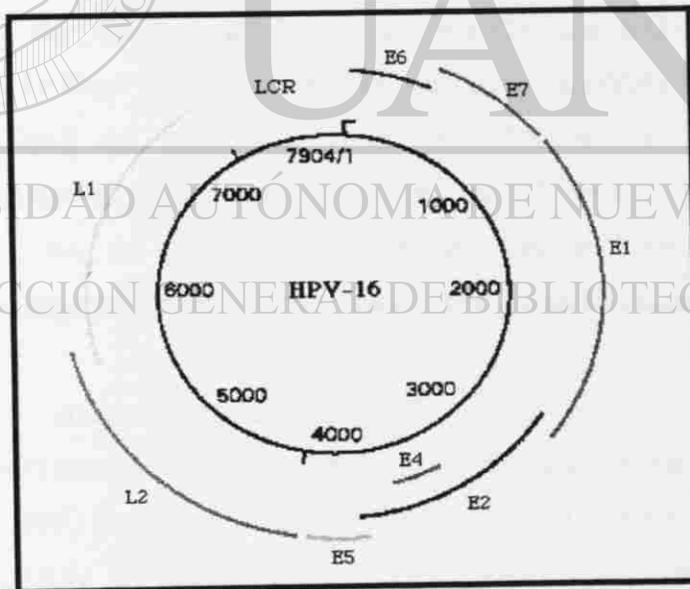
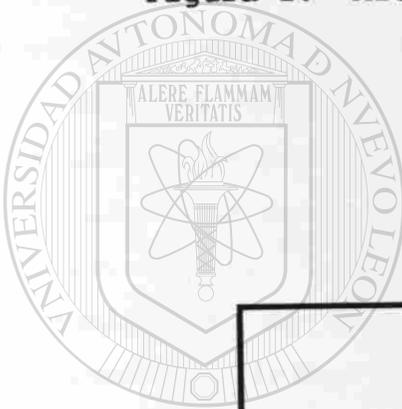


Figura 2. Mapa Genético del VPH 16

B. Intercambio de Cromátides Hermanas (ICH) en pacientes con Cáncer Cervicouterino.

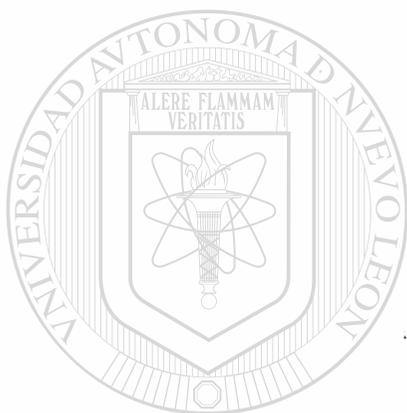
Los ICH son intercambios recíprocos entre cromátides de un mismo cromosoma. Estos generalmente son visualizados al exponer las células (*in vitro* o *in vivo*) a 5-bromo-2-deoxiuridina BrdU) por dos ciclos celulares, y la subsecuente tinción diferencial. Los ICH son detectados como "cambios" en regiones teñidas entre cromátides hermanas (figura 3). El mecanismo molecular de su formación no es conocido, pero estos ocurren después de la exposición a agentes genotóxicos y son indicadores de daño al DNA (Coke D y Cols. 1989).

Los ICH han sido ampliamente utilizados como un indicador de inestabilidad cromosómica (Carrano AV y Cols 1978) y ha sido sugerido como un marcador preclínico de cáncer (Livingston GK y Cols. 1980).

La evaluación de daño genómico mediante la prueba de ICH en cultivos de linfocitos de pacientes con cáncer cervical, es más práctico que en tumores sólidos, debido a la dificultad de obtener material adecuado para su análisis. Además el uso de linfocitos es basado sobre la estrecha asociación entre los niveles de daño cromosomal en linfocitos y células tumorales.

Un incremento significativo de ICH en linfocitos ha sido reportado previamente en pacientes con cáncer cervical (Mitra AB y Cols. 1982; Murty WVS y Cols. 1986; Lukovic I y Cols. 1992; Xu CF 1993; Dhillon VS y Cols. 1996) sin embargo, otros estudios no muestran diferencias significativas (Adhvary SG y Cols. 1985). Nosotros consideramos que la inconsistencia en estos resultados puede ser atribuido al bajo poder estadístico en los diseños experimentales.

El poder estadístico es una medida que determina si un estudio es capaz de establecer diferencias o asociaciones en una población bajo investigación y es de gran importancia para aceptar o rechazar una hipótesis. Se considera un poder estadístico igual o mayor a 0.80 como aceptable. Aunado a esto, el poder estadístico puede ser incrementado fácilmente, aumentando el tamaño de muestra (Fox N y Cols. 1997).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

C. Micronúcleos (MN) en Pacientes con Cáncer Cervicouterino.

Los Micronúcleos (MN) son masas cromatínicas con apariencia de pequeños núcleos presentes en el citoplasma (Figura 4). Estos están compuestos de fragmentos cromosómicos o cromosomas completos que quedan rezagados durante la anafase en la división celular. Su presencia en la célula es un reflejo de aberraciones cromosómicas durante la mitosis celular. Los MN en linfocitos de sangre periférica han sido utilizados como un biomarcador citogenético para evaluar riesgo genotóxico (*Jenssen D y Cols. 1980; Ribeiro LG y Cols. 1993*). La base conceptual para esta aplicación es que el incremento de daño citogenético incrementa el riesgo de desarrollar cáncer (*Wogan GN 1992; Tucker JD y Cols. 1996*). Para evaluar el daño genómico en pacientes con carcinoma cervical la prueba de MN en exudado cervical y en cultivo de linfocitos es más práctica que en tumores sólidos. El uso de linfocitos se basa en que el daño cromosomal en linfocitos puede asociarse al daño en las células tumorales (*Nordeson I y Cols. 1984*).

Un incremento significativo en el número de MN ha sido reportado previamente en pacientes con CaCU sin embargo su utilidad clínica como biomarcador no ha sido establecida (*Chakrabarti RN y Cols. 1988; Cerequeira EM y Cols. 1998*).

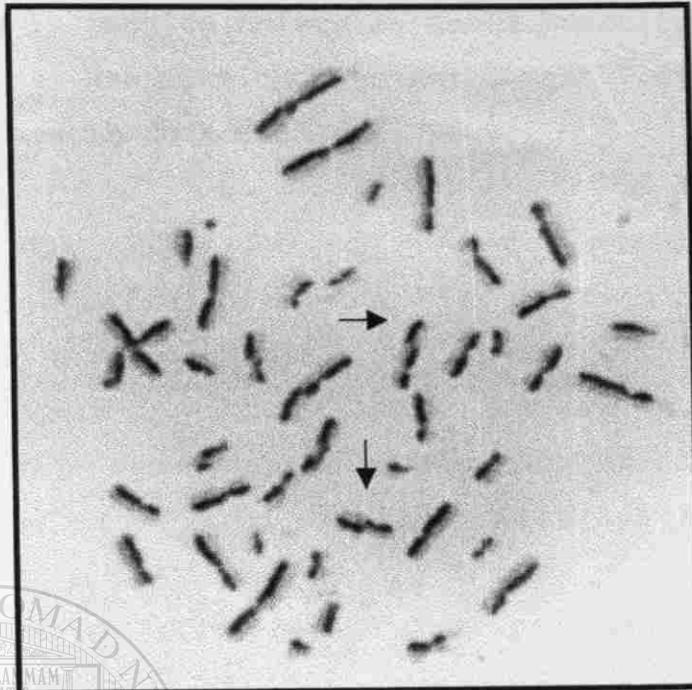


Figura 3. Metafase obtenida a partir de cultivos de linfocitos de sangre periférica donde se muestran los ICH.

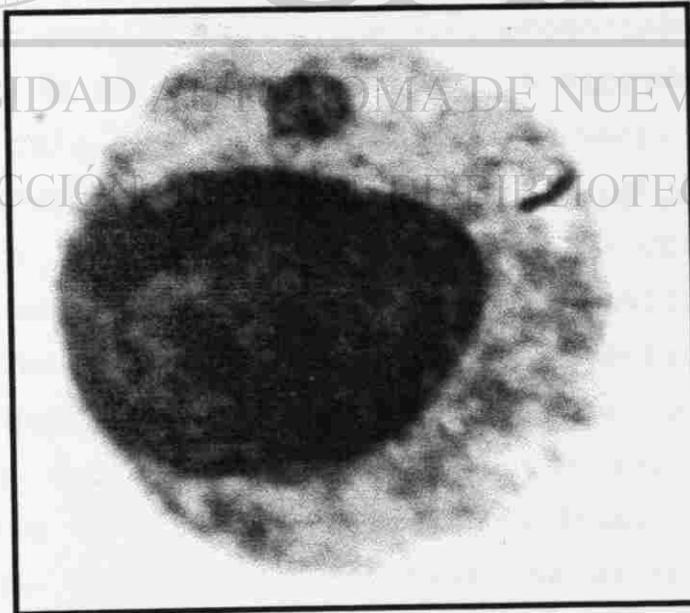


Figura 4. Linfocito de sangre periférica con citoplasma preservado donde se muestra un MN.

D. Validez de la técnica molecular de la Reacción en Cadena de la Polimerasa-Restriction Fragment Length Polymorphisms (PCR-RFLPs) para la detección del VPH.

Diagnóstico del VPH. Existen varios métodos para el diagnóstico de una infección por VPH. La técnica clásica de citología e histopatología en donde la presencia de coilocitos (figura 5) caracterizados por una gran zona clara peri nuclear y a menudo binucleación, son un indicio de la presencia del virus (Leal-Garza CH y Cortés Gutiérrez EI, 1996).

La colposcopia es otro método que permite visualizar el cérvix adecuadamente, es fácil sobre todo para la detección de VPH por la lesión tisular (condilomas) (figura 6) que esos producen, y es una herramienta diagnóstica muy útil para aclarar dudas que no se puedan resolver con la clínica.

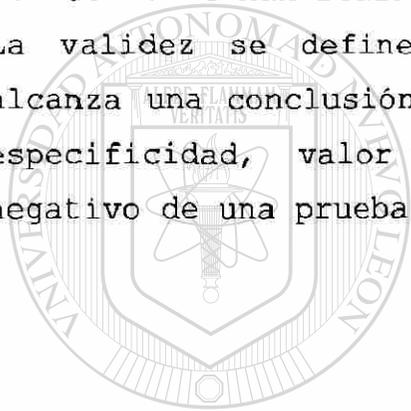
Estos métodos morfológicos han mostrado especificidad para la detección del VPH pero son poco sensible ya que solamente detecta infecciones activas y con gran producción del VPH.

El desarrollo de técnicas moleculares de hibridación *in situ* (Shah KV y Cols. 1990) con sondas radioactivas (Southern blot), y con sondas fluorescentes (Allan GM y Cols. 1989; Wickenden C y Cols. 1985) han incrementado grandemente los valores de sensibilidad. Sin embargo la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha permitido la identificación del VPH con una mayor precisión y exactitud, ya que es posible que una sola copia del DNA viral pueda ser detectado en 100,000 copias analizadas. Para clasificar los distintos tipos del VPH, la tecnología se basa las diferencias de sus secuencias internas. Por lo que se utilizan enzimas de restricción, que cortan al DNA sólo en los sitios donde encuentra cierta secuencia y por lo tanto, el número y tamaño

de los fragmentos obtenidos por esta digestión restringida, es distinto y característico para cada tipo de VPH. Estos fragmentos son denominados RFLPs (siglas en inglés: Restriction Fragment Length Polymorphisms) (Hans-Ulrich B y Cols. 1994).

Recientemente se ha sugerido la incorporación de esta técnica a protocolos de Detección Oportuna de Cáncer (DOC), sin embargo son muy escasos los trabajos donde se evalúe su validez (Lie AK y Cols. 1997; Zazove P y Cols.1998) y en México no se han realizado este tipo de estudios.

La validez se define como el grado en que una medición alcanza una conclusión correcta y consta de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, y valor predictivo negativo de una prueba.



UANL

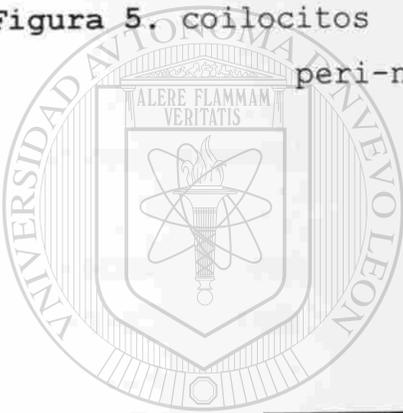
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Figura 5. koilocitos caracterizados por una gran zona clara peri-nuclear y binucleación.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

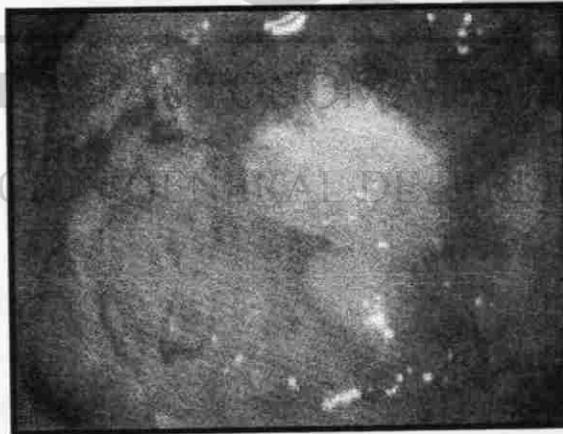


Figura 6. Condilomas cervicales observados mediante colposcopio (60X).

OBJETIVOS

Objetivo General:

Analizar la posible utilidad de algunos biomarcadores citogenéticos-moleculares para mejorar el diagnóstico-pronóstico del cáncer Cervicouterino.

Objetivos Específicos:

1. Determinar cualquier posible asociación entre el número promedio de ICH / metafase en mujeres con CaCU y mujeres control.

2. Investigar la asociación entre los estadios progresivos de carcinoma cervical y la frecuencia de células micronucleadas en epitelio cervical y en linfocitos de sangre periférica.

3. Evaluar la validez de la prueba de PCR para la identificación del VPH, y determinar el riesgo de desarrollar CaCU de acuerdo al tipo de VPHs mediante la razón de momios (OR).

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

A. Población Estudiada.

Los datos analizados en este estudio fueron colectados en el Hospital de Ginecología y Obstetricia del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en Monterrey, Nuevo León, México. Este estudio hospitalario no pareado de casos-controles fue aprobado por el comité de ética del Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS.

Todas las mujeres incluidas en este estudio recibieron evaluación ginecológica al mismo tiempo que se les tomo muestra citológica (PAP) con espátula Ayre. Si el examen ginecológico y/o coploscópico revelaba una lesión precancerosa macroscópica se tomaba biopsia.

Las laminillas de PAP fueron interpretadas por un solo patólogo de acuerdo al sistema de clasificación de Bethesda (Turman RJ y Cols. 1994). Otro patólogo interpretó las secciones de biopsias de acuerdo al criterio de la International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) (Creasman W, 1990). Las mujeres incluidas en este trabajo fueron clasificadas de acuerdo al resultado de PAP y al estudio coploscópico/biopsia en : LGSIL, (lesión intraepitelial escamosa de bajo grado), HGSIL, (lesión intraepitelial escamosa de alto grado), y carcinoma invasor. Mujeres sin ninguna alteración neoplásica fueron consideradas como controles.

La identificación del VPH se llevo acabo por la presencia de *coilocitos* en citologías/ biopsias, y/o por la observación de

condilomas (puntillero blanco) en la revisión colposcópica de acuerdo al criterio de *Pixely EC, 1987*.

La edad promedio (rango) para pacientes fue de 43.04 años (31-55) y para controles de 45.51 años (34-56). Las pacientes no habían sido tratadas con quimioterapia ni radioterapia, y ninguna de ellas presentó historia clínica de infecciones crónicas, uso de drogas (incluyendo anticonceptivos), tabaquismo ni exposición a radiaciones.

En este estudio, nosotros aplicamos el criterio de homogeneidad genética reportada para el Noreste de México (*Cerda-Flores RM y Cols. 1991*).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

B. Intercambio de Cromátides Hermanas (ICH)

Obtención de Metafasas. Linfocitos de sangre periférica de 28 mujeres con CaCU y 28 mujeres controles fueron cultivados por 72 horas en medio McCoy 5A suplementado con 2% de fitohemaglutinina, 15% de suero fetal de ternera y una solución de antibióticos (estreptomicina-penicilina). Después de 24 horas de incubación, la Bromodeoxiuridina se agregó a una concentración final de 10 µg/ml. La colchicina se agregó 45 minutos antes de la cosecha, y las laminillas fueron preparadas de acuerdo a procedimientos convencionales (Verma *RS* y *Cols.* 1989).

Tinción y Cuantificación. La diferenciación de ICH se llevó a cabo mediante la técnica de Fluorescence Plus Giemsa (Perry *P* y *Cols.* 1974). Para cada mujer el número promedio de ICH fue calculado a partir de 30 a 50 metafases, las cuales fueron analizadas por un solo observador y por "análisis ciego".

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

C. Micronúcleos (MN)

Preparación Citológica. El material citológico de 10 mujeres con HLSIL, 10 con HGSIL, 10 con cáncer cervical invasor y 10 mujeres control fue colectado con un hisopo de algodón de las áreas colposcopicamente anormales. El material colectado fue sumergido en 5 ml de suero fisiológico (NaCl 0.9%) y centrifugado a 1,200 rpm por 5 minutos. El paquete celular fue suspendido en una solución de metanol/ ácido acético (3:1) y centrifugado. Este último paso se repite hasta que el paquete celular se observe completamente limpio. Finalmente se colocan de 1-2 gotas de la suspensión celular en laminillas limpias.

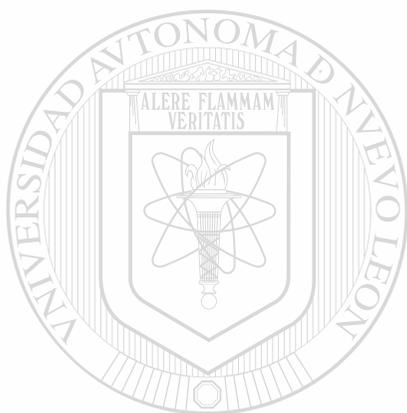
Cultivo de Linfocitos. Las muestras de sangre periférica de las pacientes y los controles fueron colectadas en tubos heparinizados estériles. Los linfocitos fueron cultivados de acuerdo a la técnica habitual descrita previamente (Verma RS y CoIs. 1989). Los linfocitos con citoplasma preservado fueron obtenidos mediante técnicas convencionales (Hogstedt B, 1984).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Prueba de MN. Las laminillas citológicas y linfocitos cultivados fueron teñidos de acuerdo al método de Feulgen (reactivo de Schiff). Las laminillas se lavaron en agua destilada, se aclararon en xilene y fueron montadas en resina (Hogstedt B, 1984).

Conteo de MN. Para cada mujer, fueron estudiados 1000 células epiteliales de exudado cervical, y 1000 linfocitos de sangre periférica bajo microscopio de luz convencional con objetivo

100X (aceite de inmersión) por medio del "análisis ciego". Los criterios utilizados para identificar los MN fueron : (a) diámetro menor de 1/3 que el núcleo principal (b) no-refractario (c) mismo color o más pálido que el núcleo principal , y (d) localización dentro del citoplasma. Todas las células con fenómenos degenerativos como, cariolisis, cariorrhexis, picnosis, binucleación etc. fueron excluidos del análisis (Hogstedt B, 1984).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

D. Técnica Molecular de PCR-RFLPs.

Toma de Muestras. De 23 mujeres con CaCU y 23 controles se obtuvo muestra del endocérnix con citobrush, la cual se recibió en 2 ml de PBS 1X y se congeló a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para la posterior extracción de DNA.

Extracción de DNA. El DNA de las muestras cervicovaginales fue extraído mediante la digestión con proteinasa K (0.1 mg/ml), extracción con fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (25:24:1), y precipitación con acetato de sodio 3M-etanol absoluto (10:2). Los precipitados se lavaron con etanol al 70%, se secaron con un evaporador de vacío, y se resuspendieron en amortiguador TE. Finalmente se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso (Baurer H y Cols. 1992).

La cuantificación del DNA se determinó por absorbancia a 260 nm y 280 nm. Considerándose que el DNA se encontraba puro cuando una relación entre las dos absorbancias varió entre 1.7 y 1.8.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La amplificación génica del VPH se realizó con la técnica de PCR utilizando los iniciadores MY09 y MY11, que corresponden a la región L1 que es altamente conservada entre los diferentes tipos de VPH. Además, se utilizó como control interno el gen de la β -globina (PC4 y GO20) (Baurer H y Cols. 1992) (Tabla 1).

| Tabla 1. Secuencia nucleotídica de los iniciadores utilizados para la amplificación de VPH (MY09 y MY11) y para el gen beta globina (GH20 y PC04). | | |
|--|---------------------------|----------------------------|
| MY09 | río arriba (VPH L1) | GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG |
| MY11 | río abajo (VPH L1) | CGT CCM AAR GGA WAC TGA TC |
| GH20 | río arriba (beta globina) | GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC |
| PC04 | río abajo (beta globina) | CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC |

W = A+T, Y = C+T, M = A+C, R = A+G

Mezcla de Reacción. Los componentes de reacción para 100 µl fueron: 100 mM/1 Tris HCl (pH=8.3), 500 mM/ 1KCl, 15 mM/1 MgCl 0.01% (p/v) de gelatina, 20 pmol de cada uno de los oligonucleótidos consenso (MY11, MY09, GH20, PC04), 200 µM/1 de cada dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 2.5 U de Taq polimerasa y 100 ng-1.0 µg de DNA genómico humano (Baurer H y Cols. 1992).

Condiciones de Amplificación. La PCR se realizó en 40 ciclos incluyendo cada uno: desnaturalización a 95 °C por 1 min, alineamiento a 55 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 1 min. Los productos de la amplificación fueron analizados en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio. Se consideraron como VPH(+) aquellas mujeres en las que se identificó la banda correspondiente al VPH (450 pb) y el gen de la β-globina (260 pb) y como VPH(-) aquellas que no presentaron amplificación para el VPH pero sí para el gen constitutivo (β-globina). Las muestras que no amplificaron para el gen de la β-globina fueron eliminadas del estudio (Baurer H y Cols. 1992) (Figura 7).

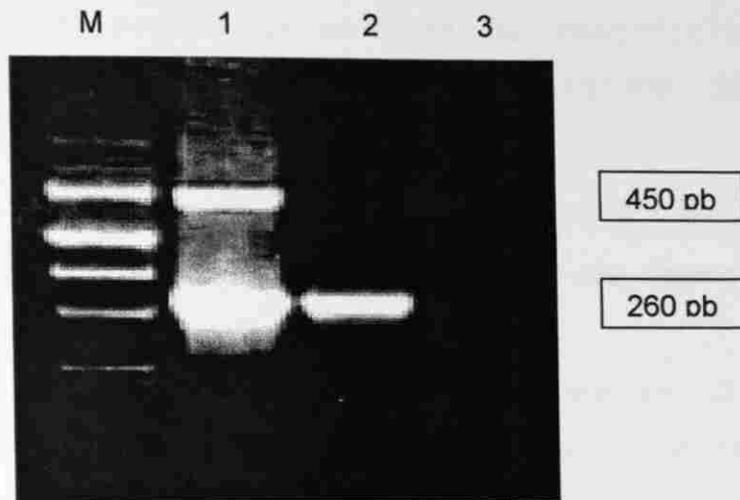


Figura 7. Amplificación molecular de la región L1 mediante PCR utilizando los iniciadores MY09 y MY11. El producto de amplificación para el VPH es un fragmento de aproximadamente 450 pb, y para el gen β -globina de 260 pb.

M ; marcador de peso molecular líder de 100 pb.

Carril 1; positivo para VPH y para β -globina.

Carril 2; positivo para β - globina y negativo para VPH.

Carril 3; negativo para β - globina y para VPH.

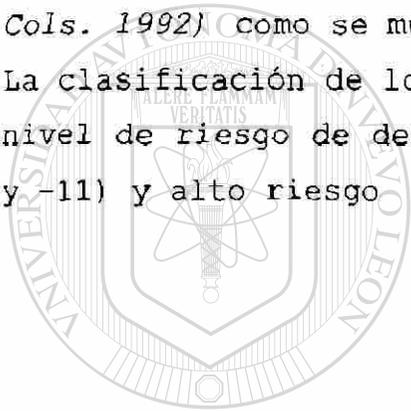
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Análisis de RFLPs. Los productos amplificados fueron tipificados mediante el análisis RFLPs. Para ello, inicialmente se utilizaron las enzimas de restricción Hae III, Pst I y Rsa I y si era necesario se utilizaron HaeIII, HinfI, XbaI, AccI, Pst μ l y KpnI.

Los componentes de la digestión para 25 μ l fueron: 0.5 μ l de cada enzima de restricción, 2.5 μ l de buffer de reacción, y 25 μ l del producto amplificado .

Los productos de la digestión fueron analizados en geles de acrilamida al 8% teñidos con bromuro de etidio (Baurer H y Cols. 1992) como se muestra en la Figura 8.

La clasificación de los tipos de VPH se realizó de acuerdo al nivel de riesgo de desarrollar CaCU en: bajo riesgo (VPH-6 y -11) y alto riesgo (VPH-16, -18, -30, -31, -33 y -35).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

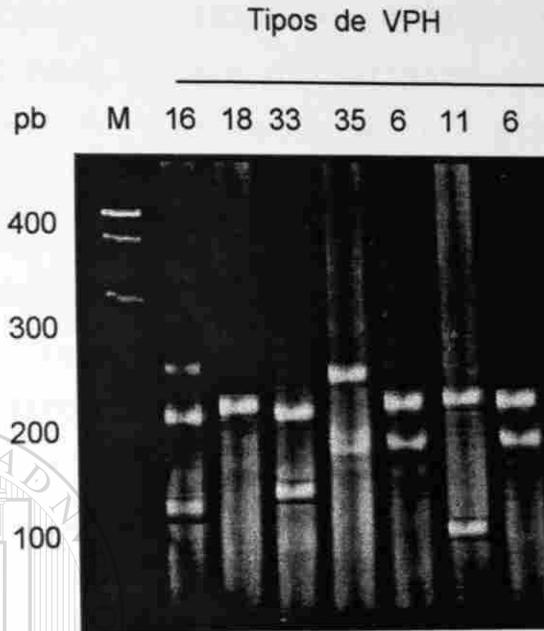


Figura 8. Digestión de los productos amplificados por PCR (primer MY09 y MY11) con las enzimas de restricción Hae III, Pst I, y Rsa I revelaron diferente número y tamaño de fragmentos, lo cual permite tipificar los VPH 6, 11, 16, 18, 31, 33 y 35.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

M; marcador de peso molecular líder de 100 pb.
 pb; pares de bases
 VPH; Virus del Papiloma Humano

E. Análisis Estadístico.

La comparación estadística de ICH entre pacientes y controles se llevó a cabo mediante la prueba t de student. El tamaño de muestra fue estimado usando el software Stata (versión 6.0) ($\alpha = 0.05$, $1-\beta = 0.80$). Un valor de $p < 0.05$ fue considerado significativo (Zar JH, 1999).

El análisis estadístico de MN se llevo a cabo en tres pasos :

(1) Se probó la heterogeneidad dentro de los grupos estudiados (control, LGSIL, HGSIL, y carcinoma invasor) mediante la prueba χ^2 , (Lovel DP y Cols. 1989).

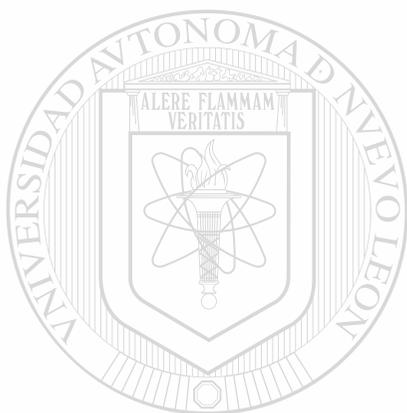
(2) Se probó la tendencia lineal entre la frecuencia de MN y el riesgo de desarrollar cáncer mediante una tabla de contingencia (Lovel DP y Cols. 1989; Thakur AT y Cols. 1985; Elwood 1998).

(3) Se probó la asociación entre el cáncer cervical y el número de células con MN en los 4 grupos de mujeres estudiadas (Elwood M, 1998) mediante las pruebas de razón de momios (OR) e intervalos de confianza (CI).

Un valor de $p < 0.05$ fue considerado con significancia estadística.

La validez es una propiedad de toda medición que consta de cuatro elementos: sensibilidad, especificidad, valor predictivo de una prueba positiva y valor predictivo de una prueba negativa (Elwood M 1998). Para evaluar la validez del método de PCR versus la citohistopatología / colposcopia para la detección del VPH se utilizó el análisis Bayesiano :
(<http://www.hutchon.freeseve.co.uk/Diagnostic-test.htm>).

Para determinar el riesgo de desarrollar CaCU de acuerdo a la tipificación molecular de VPH se realizó el análisis de razón de momios (OR) con intervalos de confianza del 95% de acuerdo al método de Cornfield (Programa EPISODE).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

V. RESULTADOS

A. Intercambio de Cromátides Hermanas (ICH) en Pacientes con CaCU.

El número promedio de ICH en pacientes fue de 7.80 ± 1.05 / metafase. En las mujeres control fue de 6.98 ± 1.13 / metafase. La frecuencia de ICH en pacientes resultó estadísticamente mayor ($P = 0.045$), comparado con las mujeres control (Tabla 2). Estos valores mostraron varianzas homogéneas cuando la prueba de Levene fue aplicada ($P > 0.05$).

Tabla 2. Número promedio de Intercambios de Cromátides Hermanas (ICH) en pacientes con cáncer Cervicouterino

| Grupo | No. de individuos | No. de metafases estudiadas | Media de ICH/ metafase \pm DE |
|-----------|-------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| Pacientes | 28 | 1,200 | $7.59 \pm 1.05^*$ |
| Control | 28 | 810 | 6.98 ± 1.13 |

Prueba de Levene $F=0.547$ $P = 0.463$, * Significancia de $P = 0.045$

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

B. Micronúcleos (MN) en pacientes con CaCU

La distribución del número de MN en epitelio y linfocitos en los grupos estudiados se muestra en la Tabla 3. Todos los grupos fueron homogéneos cuando se realizó la prueba de heterogeneidad χ^2 ($P > 0.05$)

Tabla 3. Heterogeneidad (Chi-cuadrada) de MN en epitelio y en linfocitos entre los grupos estudiados.

| Group | N | No. cells | MN Epitelio | $\chi^2_{(df=9)}^a$ | P | MN Linf. | $\chi^2_{(df=9)}$ | P |
|---------|----|-----------|-------------|---------------------|-------|----------|-------------------|--------|
| Control | 10 | 10000 | 30 | 6.02 | >0.05 | 62 | 8.05 | > 0.05 |
| LGSIL | 10 | 10000 | 71 | 14.03 | >0.05 | 95 | 4.52 | > 0.05 |
| HGSIL | 10 | 10000 | 97 | 4.38 | >0.05 | 98 | 2.89 | > 0.05 |
| Invasor | 10 | 10000 | 140 | 6.38 | >0.05 | 130 | 5.46 | > 0.05 |

^a grados de libertad

La Tabla 4 muestra el análisis univariado [razón de momios (OR) e intervalo de confianza (CI)] de las células con MN en epitelio cervical y en linfocitos de mujeres con cáncer cervicouterino y mujeres control. Para las células con MN en epitelio, se observó una diferencia significativa entre el grupo control (referencia) y LGSIL (OR, 2.38), HGSIL (OR, 3.26), carcinoma invasor (OR, 4.72) ($P < 0.001$, χ^2 para tendencia lineal). Para las células con MN en linfocitos, también se observaron diferencias significativas entre el grupo control y LGSIL (OR, 1.54), HGSIL (OR, 1.59), carcinoma invasor (OR, 2.11) ($P < 0.001$, χ^2 para tendencia lineal).

Tabla 4 . Análisis Univariado de células con MN en epitelio y linfocitos.

| Grupo | No. de células | MN Epitelio ^a | OR ^c | CI ^d | MN linf ^b | OR | CI |
|---------|----------------|--------------------------|-----------------|-----------------|----------------------|------|------------|
| Control | 10000 | 30 | 1.00 | Referencia | 62 | 1.00 | Referencia |
| LGSIL | 10000 | 71 | 2.38 | 1.46-3.87 | 95 | 1.54 | 1.05-2.24 |
| HGSIL | 10000 | 97 | 3.26 | 2.06-5.13 | 98 | 1.59 | 1.09-2.31 |
| Invasor | 10000 | 140 | 4.72 | 3.08-7.24 | 130 | 2.11 | 1.49-2.99 |

^aX² = 76.25, df = 3, P < 0.001, ^bX² = 24.30, df = 3, P < 0.001, ^cRazón de momios, ^d Intervalo de confianza.

En la tabla 5 se muestran los resultados de la prueba de tendencia lineal en una tabla de contingencia de a 2x4. Las células con MN en epitelio mostraron un incremento lineal significativo (X² = 75.6, b [pendiente] = 3.56 x 10⁻³, probabilidad de tendencia < 0.001) y también para los linfocitos con MN (X² = 22.48, b = 2.07 x 10⁻³, probabilidad de tendencia < 0.001).

Tabla 5. Prueba de tendencia lineal en una tabla de contingencia de 2 x 4.

| Tejido | Prueba | d.f. | Chi-cuadrada | P |
|-------------------------|-----------------------|------|--------------|---------|
| Epitelio ^a | Regresión lineal | 1 | 75.631 | < 0.001 |
| | Desviación | 2 | 0.623 | > 0.05 |
| | X ² global | 3 | 76.254 | < 0.001 |
| Linfocitos ^b | Regresión lineal | 1 | 22.476 | < 0.001 |
| | Desviación | 2 | 1.829 | > 0.05 |
| | X ² global | 3 | 24.305 | < 0.001 |

^a b (pendiente) = 0.00356, S_b (error estándar) = 4.09 x 10⁻⁴, Z = b/S_b = 8.696, P < 0.001

^b b = 0.00207, S_b = 4.37x 10⁻⁴, Z = 4.74, P < 0.001

C. Validez de la técnica Molecular de PCR-RFLPs para la detección del VPH.

De acuerdo al diagnóstico histopatológico / colposcópico a 23 mujeres se les diagnosticó CaCU. En 11 mujeres se detectaron coilocitos y/o condilomas sugestivos de VPH, mientras que la PCR resultó positiva en 26 casos (tabla 6).

Tabla 6. Distribución del número de mujeres infectadas con VPH diagnosticadas mediante los métodos: citohistopatología, colposcopia y PCR.

| Grupo | n | Detección de VPH | | |
|--------------|-----------|--------------------|-------------|-----------|
| | | Citohistopatología | Colposcopia | PCR |
| Control | 17 | 5 | 5 | 9 |
| CaCU | 23 | 6 | 6 | 17 |
| Total | 40 | 11 | 11 | 26 |

Utilizando la técnica citohistopatológica / colposcópica como "estándar de oro" la PCR mostró una sensibilidad del 100%, una especificidad del 35.3%, un valor predictivo negativo del 100%, una ganancia diagnóstica del 9.2% y una exactitud del 52.1% (tabla 7).

Tabla 7. Resumen estadístico de los valores de validez de la PCR versus las técnicas cito histopatológica / colposcópica.

VALORES DE VALIDEZ PARA LA PCR EN LA DETECCIÓN DEL VPH

| | |
|-------------------------------------|---------------|
| Verdaderos positivos | 6 |
| Falsos positivos | 11 |
| Falsos negativos | 0 |
| Verdaderos negativos | 6 |
| | |
| Sensibilidad | 1 |
| Especificidad | 0.353 |
| Prueba de proporción a priori | 0.353 |
| Prueba de proporción a posteriori | 0.545 |
| LR+ | 1.545 |
| LR- | 0 |
| Prueba de probabilidad a priori | 0.353 |
| Prueba de probabilidad a posteriori | 0.261 |
| Ganancia diagnóstica | 0.285 |
| Exactitud | 0.521 |
| PV+ | 0.353 |
| (95% CI) | (0.173-0.587) |
| PV- | 1 |
| (95% CI) | (0.609-1) |

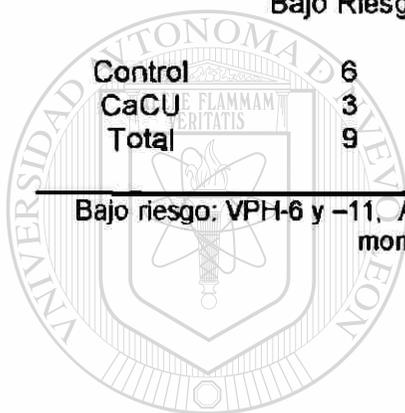
LR+: Proporción de probabilidad positivo
 LR-: Proporción de probabilidad negativo
 PV+: Valor predictivo positivo
 PV-: Valor predictivo negativo

A partir de la tipificación en las 26 mujeres con PCR (+) se encontraron los VPH-6 y -11 (bajo riesgo) y los VPH-16, -18, -31, -33 y -35 (alto riesgo). Las mujeres con CaCU mostraron un OR de 9.33 veces mayor de tener VPH de alto riesgo (14/17) que en controles (3/6) ($P < 0.05$, $gl = 1$) (tabla 8).

Tabla 8. Análisis univariado de la infección del VPH de acuerdo a su genotipo.

| Grupo | VPH Bajo Riesgo | VPH Alto Riesgo | OR | CI |
|---------|--------------------|--------------------|------|-------------|
| Control | 6 | 3 | 1.00 | Referencia |
| CaCU | 3 | 14 | 9.33 | 1.45; 60.22 |
| Total | 9 | 17 | | |

Bajo riesgo: VPH-6 y -11, Alto Riesgo: VPH-16, -18, -31, -33 y -35, OR: Razón de momios CI: Intervalo de confianza



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



VI. DISCUSIONES

A. Intercambio de Cromátides Hermanas (ICH) en Pacientes con CaCU.

Nuestros resultados sugieren que el número promedio de ICH en pacientes con carcinoma cervical (7.59 ± 1.05) es más alta que en controles (6.98 ± 1.13) con un poder estadístico de 0.80. Esto indica que los pacientes con cáncer cervical presentan inestabilidad cromosómica.

Estos resultados están de acuerdo con lo reportado por otros autores (Mitra AB y Cols. 1986; Murty WVS y Cols. 1986; Yakota K y Cols 1989; Lukovic I y Cols. 1992; Xu CF 1993; Dhillon VS y Cols. 1996). Nosotros encontramos altos valores de poder estadístico en todos ellos (0.99 a 1.00) computarizado de acuerdo al software Stata.

Por otro lado, Adhvary SG y Cols. 1985 no encuentra significancia estadística en la frecuencia de ICH en pacientes con cáncer cervical debido al bajo poder estadístico (0.57) en su diseño experimental (Apéndice 1).

Algunos mecanismos han sido propuestos para explicar el incremento de ICH en pacientes con cáncer cervical: (1) el stress metabólico debido al crecimiento tumoral (Benerjee R y Cols. 1982) , (2) los productos clastogénicos liberados por las células tumorales (Werkmeister J y Cols. 1980) y (3) la integración viral al genoma celular que produce inestabilidad cromosómica. La presencia del VPH ha sido observada en 70 a 95% de lesiones preneoplásicas y neoplásicas de cervix (Paz-y-Mino y Cols. 1992).

**Apéndice 1. Número promedio de Intercambio de Cromátides
Hermanas y poder estadístico en pacientes con cáncer
Cervicouterino reportado por otros autores.**

| Referencia | Grupo | n | Media ICH / metafases ± DE | Poder estadístico |
|------------|----------|----|-------------------------------|----------------------|
| 1 | Paciente | 13 | 10.05 ± 2.35* | 0.99 |
| | Control | 11 | 6.95 ± 1.53 | |
| 2 | Paciente | 46 | 10.15 ± 2.49* | 1.00 |
| | Control | 43 | 7.55 ± 2.24 | |
| 3 | Paciente | 13 | 9.68 ± 0.97 | 0.57 |
| | Control | 13 | 8.91 ± 1.15 | |
| 4 | Paciente | 35 | 10.00 ± 1.80* | 1.00 |
| | Control | 18 | 7.60 ± 0.80 | |
| 5 | Paciente | 21 | 8.92 ± 1.47* | 0.99 |
| | Control | 19 | 6.94 ± 1.00 | |
| 6 | Paciente | 14 | 9.44± 1.27* | 1.00 |
| | Control | 20 | 6.09± 1.07 | |
| 7 | Paciente | 30 | 7.18± 1.23* | 1.00 |
| | Control | 15 | 4.68± 1.82 | |

Referencias: 1. Mitra y Cols. (1982), 2. Murty y Cols. (1986), 3. Adhvaryu y Cols. (1985), 4. Yokota y Cols. (1989), 5. Lukovic y Cols. (1992), 6. Dhillon y Cols. (1996), 7. Capalash y Cols. (1996). * P < 0.05

B. Micronúcleos (MN) en pacientes con Cáncer Cervicouterino.

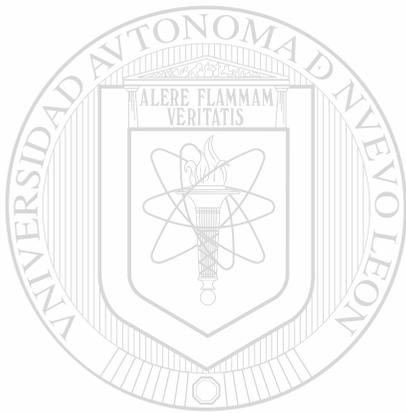
Los resultados presentados en este estudio muestran un incremento progresivo de MN / célula en epitelio, de acuerdo al desarrollo neoplásico. Esto está de acuerdo con lo reportado previamente por *Chakrabarti RN y Cols. 1988*, y *Chakrabarti EM y Cols. 1998*. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que el incremento de MN refleja la liberación de un factor mutagénico en pacientes con carcinoma cervical.

Nosotros observamos una asociación significativa entre el daño cromosomal y carcinoma cervical en cultivo de linfocitos. Esto concuerda con lo reportado previamente por *Nordeson I y Cols. 1984*.

Algunos factores han sido involucrados en el incremento de MN en pacientes con cáncer cervical : (1) El genoma de estos pacientes es frágil (*Sobti RC y Cols. 1991*); esta inestabilidad cromosómica puede producir células con aberraciones cromosómicas estructurales particularmente de los cromosomas 1, 3, 5, 11, y 17 (*Atkin NB 1997*). Estos pacientes tienen un mayor riesgo de desarrollar tumores secundarios debido a la inestabilidad cromosómica inherente que resulta en pequeñas subpoblaciones de células con anomalías cromosómicas y (2) La presencia del VPH; debido a que algunos tipos de VPH (16, 18, 31, 33, y 35) han sido involucrados en el desarrollo de lesiones cervicales precancerosas y cancerosas (*Wilczynski S y Cols. 1988*). La integración viral al genoma celular produce manifestaciones citogenéticas no específicas. Los cambios producidos son ; índices mitóticos alterados, poliploidía, gaps, fracturas, y figuras cromosómicas anormales (*Popescu NC y Cols. 1990*). En un estudio sobre mujeres con lesiones preneoplásicas y neoplásicas de cérvix, se observó un incremento en la

fragilidad cromosómica debido a la presencia HPV (Paz-y-Mino C et al 1992). En el presente estudio, nosotros encontramos que el 73% de las pacientes presentaron VPH de alto riesgo (tipo 16, 18, 31, 33, 35) mientras que todas las mujeres del grupo control fueron VPH negativas.

El incremento en el número de células con MN en epitelio y en linfocitos de acuerdo al desarrollo neoplásico, puede indicar que la progresión de la lesión esta asociada con una alta proporción de daño cromosómico.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

C. Validez de la técnica Molecular de PCR-RFLPs para la detección de VPH.

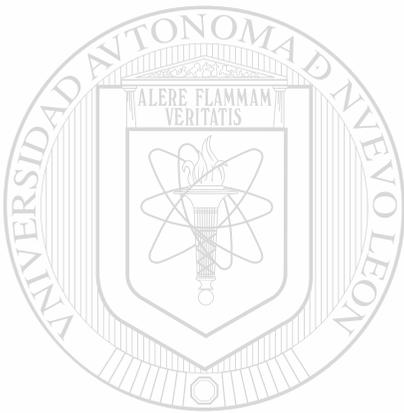
Recientemente se ha establecido al VPH como agente causal del CaCU (Herrington CS, 1994). En estos trabajos se sugiere la gran utilidad clínica de la PCR-RFLPs para la detección del VPH como marcador pronóstico de malignidad (González-Garay ML y Cols. 1992; Hernández-Ávila M y Cols. 1997; Torroella-Kouri M y Cols. 1998). Sin embargo, estudios realizados para validar esta prueba son muy escasos (Lie AK y Cols. 1997; Zazove P y Cols. 1998).

En México, este es el primer trabajo donde se evalúa la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la prueba de PCR utilizando como "estándar de oro" la prueba patológica /colposcópica.

Los resultados obtenidos en este estudio están de acuerdo con estudios previos donde informan que estos métodos morfológicos son poco sensibles para la detección de VPH (Lie AK y Cols. 1997; Gjoen K y Cols. 1997; Zazove P y Cols. 1998; Lie AK y Cols. 1999). Además informan que la PCR disminuye significativamente el número de falsos negativos. En nuestro estudio nosotros detectamos 14 mujeres VPH positivos que habían sido reportadas previamente mediante las pruebas morfológicas como VPH negativas.

Las frecuencias de infección de VPHs observadas en pacientes en este estudio, están de acuerdo con la literatura previa (González-Garay ML y Cols. 1992; Hernández-Ávila M y Cols. 1997; Torroella-Kouri M y Cols. 1998). Estos trabajos establecen que la infección de VPH-16 y -18 puede ser considerada como un factor pronóstico de malignidad, el cual

puede ser de gran utilidad clínica en la evolución de lesiones precancerosas a cancerosa. Nuestros resultados revelaron que toda mujer con un VPH de alto riesgo (VPH-16, -18, -30, -31, -33 y 35) tiene 9.33 veces mayor riesgo de desarrollar CaCU que una mujer con VPH de bajo riesgo (VPH-6 y -11). Sin embargo su utilidad pronóstico en mujeres sanas aún no es bien establecida.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

VII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

1. Los ICH están asociados con el cáncer cervical. La inconsistencia en los resultados en estudios previos puede ser atribuida al bajo poder estadístico en los diseños experimentales (*Cortés-Gutiérrez EI. y Cols. 2000*).

Sin embargo, la utilidad de los ICH como marcador preclínico para identificar mujeres con alto riesgo de desarrollar cáncer requiere futuros estudios de seguimiento.

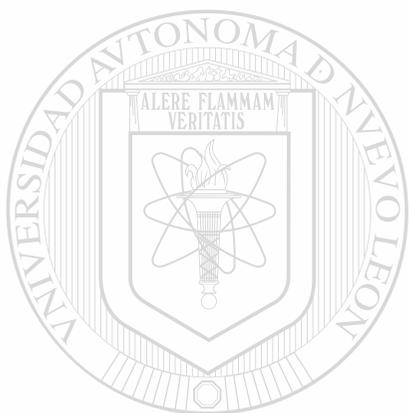
2. La frecuencia de células con MN en epitelio y en linfocitos, nos puede dar información acerca del comportamiento de la célula cancerosa y de la transformación maligna. Este biomarcador citogenético puede ser útil en estudios de cáncer cervical, debido a los valores significativos de OR y tendencia lineal encontrados (*Leal-Garza CH y Cortés-Gutiérrez EI. En prensa*).

3. Consideramos que la técnica de PCR-RFLPs tiene una alta validez para la detección-tipificación del VPH y es una técnica sencilla que no requiere de una intensa interpretación de resultados, por lo que puede ser de gran utilidad clínica para evaluar el riesgo de desarrollar CaCU (*Cortés-Gutiérrez EI. Enviado a publicación*).

La información obtenida en este estudio puede ser utilizada por el médico ginecólogo para tomar decisiones mucho más adecuadas en cuanto al tipo de tratamiento médico o quirúrgico, extensión de cirugía o necesidad de emplear otras

medidas, además de proporcionar un pronóstico con mucho más fundamento científico.

Por lo tanto la incorporación de estos biomarcadores citogenéticos- moleculares a un protocolo adecuado de detección oportuna de cáncer (DOC) sería de gran utilidad en el diagnóstico-pronóstico del CaCU para disminuir la incidencia y mortalidad por esta neoplasia en nuestra población.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Adhvary SG, Vyas RC, Dave BJ, Trivedi AH, Parikh BN. Spontaneous and induced sister chromatid exchange frequencies and cell cycle progression in lymphocytes of patients with carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Genet Cytogenet* 1985; 14:67-72.
- Allan GM, Tood D, Smyth JA, Mackie DP, Burns J, McNulty MS. In situ hybridization: an optimized detection protocol for a biotinylated DNA probe render it more sensitive than a comparable ³⁵S-labelled probe. *J Virol Methods* 1989;24:181.
- Atkin, N.B. Cytogenetics of carcinoma of the cervix uterine. A review. *Cancer Genet Cytogenet* 1997;95:33-39.
- Bauer H, Greer C, Manos M. Detection of human papillomavirus infection using PCR, in Herrington CS, McGee JO'D (eds): *Diagnostic molecular Pathology: A practical approach*. Oxford, Oxford Univ Press, 1992; p. 131-152.
- Benerjee R, Goldfer A, Mitra J. High frequency of in vivo sister chromatid exchange in bone-marrow cells of mice bearing mammary adenocarcinoma dbrB. *Cancer Genet Cytogenet* 1982; 5:321-6.
- Carrano AV, Thompson LH, Lindl PA, Minkler JL. Sister chromatid exchanges as an indicator of mutagenesis. *Nature* 1978; 271:551-553.
- Cerda-Flores RM, Kshatriya GK, Barton SA, Leal-Garza CH, Garza-Chapa, Schull WJ, Chakraborty R. Genetic structure of the populations migrating from San Luis Potosi and Zacatecas to Nuevo León in Mexico. *Hum Biol* 1991; 63:309-327.
- Cerequeira EM, Santoro CL, Donoso NF, Freitas BA, Pereira CA, Bevilacqua RG, Machado-Santelli GM. Genetic damage in exfoliated cells of the uterine cervix. Association and interaction between cigarette smoking and progression to malignant transformation?. *Acta Cytologica* 1998;42:639-649.

- Chakrabarti RN, Dutta K. Micronuclei test in routine smears from uterine cervix. *Eur J Gynaecol Oncol* 1988;9:370-372.
 - Cooke D, Allen J, Clare MG, Doré CJ, Henderson L. Statistical methods for sister chromatid exchange experiments. In Kirkland DJ (eds.): *Statistical evaluation of mutagenicity test data*. Cambridge, Great Britain: Cambridge University Press 1989:155-183.
 - Cortés-Gutiérrez EI, Rojas-Alvarado MA, Reyna-Hinojosa R, Garza-Chapa R, Leal-Garza CH. Algunos factores epidemiológicos en el cáncer cervicouterino. *Rev Méd IMSS* 1995; 33:177-182.
 - Cortes-Gutierrez EI, Cerda-Flores R, Leal-Garza CH. Sister chromatid exchange in peripheral lymphocytes from women with carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;122:121-123.
 - Cortés-Gutiérrez EI, Cerda-Flores RM, Leal-Klevezas DS, Leal-Garza CH. Validity of PCR analysis for detecting the Human Papillomavirus in Women with Cervical Intraepithelial Neoplasia (enviado a publicación).
 - Creasman W. New gynecologic cancer staging. *Obstet Gynecol* 1990;75:287-288.
-
- Dhillon VS, Kler RS, Dhillon IK. Chromosome instability and sister chromatid exchange (SCE) studies in patients with carcinoma of cervix uteri. *Cancer Genet Cytogenet* 1996; 86:54-57.
 - Dirección General de Epidemiología, Histopathological registry of malignant Neoplasm, SSA, Mexico, 1996.
 - Elwood M. *Critical appraisal of epidemiological studies and clinical trials*. Oxford University Press 1998; 107-113.
 - Fox N, Mathers N. Empowering research: statistical power in general practice research. *Fam Pract* 1997; 14:324-329.

- García-Carrancá A, Gariglio PV. Aspectos moleculares de los papilomavirus humanos y su relación con el cáncer cervico-uterino. Rev Inv Clin 1993; 45: 85-92.
- GjØen K, Sauer T, Olsen AO, Orstavik I. Correlation between polymerase chain reaction and cervical cytology for detection of human papillomavirus infection in women with and without dysplasia. APMIS 1997; 171-175.
- Gonzalez-Garay ML, Barrera-Saldaña HA, Aviles LB, Alvarez-Salas LM, Gariglio P. Prevalence in two Mexican cities of HPV DNA sequences in cervical cancer. Rev Inv Clin (Mexico) 1992; 44:491-499.
- Hans-Ulrich B, Shih-Yen Ch, Manos MM, Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, RFLP, nucleotide sequence and phylogenetic algorithms. J Infect Dis 1994; 170:1077-1085.
- Hernández-Avila M, Lazcano-Ponce EC, Berumen-Campos J, Cruz-Valdes A, Alonso de Ruiz P, Gonzalez-Lira G. Human papillomavirus 16-18 infection and cervical cancer in Mexico : a case-control study. Arch Med Res 1997; 28:265-271.
- Hogstedt B. Micronuclei in lymphocytes with preserved cytoplasm. A method for assessment of cytogenetic damage in man. Mutation Res 1984;130:63-72.
- Jenssen D, Ramel C. The micronucleus test as a part of a short-term mutagenicity test program for the prediction of carcinogenicity evaluated by 143 agents tested. Mutation Res 1980;75:191-202.
- Leal-Garza CH, Cortés Gutiérrez EI. Detección molecular del virus del papiloma humano en mujeres con cáncer cervicouterino. Gac Med (Mex) 1996; 132: 295-318.
- Leal-Garza CH, Cerda-Flores R, Leal-Elizondo E, Cortes-Gutierrez EI. Micronuclei in cervical smears and peripheral lymphocytes from women with and without cervical uterine cancer. Mutation Research (en prensa).

- Lie AK, Skjeldestad FE, Hagen B, Johannessen E, Skarsvag S, Haugen A. Comparison of light microscopy, in situ hibridization and polymerase chain reaction for detection of human papillomavirus in histological tissue of cervical intraepithelial neoplasia. *APMIS* 1997;115-120.
- Lie AK, Isaksen CV, Skarsvåg S, Haugen OA. Human Papilomavirus (HPV) in high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN) detected by morphology and polymerase chain reaction (PCR) a cytohistologic correlation of 277 cases treated by laser conization. *Cytopathology* 1999;10:112-121.
- Livingston GK, Fineman RM, Johnson P, King MC, Mc.Lellan T, Bishop DT. Genetics of breast cancer: gynecological clusters, major genes, linkage and sister chromatid exchange as a preclinical marker. *Am J Hum Genet* 1980; 32:455-151A.
- Lovell DP, Albanese R, Clare G, Richold M, Savage JRK, Anderson D, Amphhlett GE, Ferguson R, Papworth DG. Statistical analysis of in vivo cytogenetic assay. In: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*. DJ Kirkland, 1989 ed. Cambridge University Press, Cambridge, Great Britain, pp. 200-204.
- ~~Lukovic I, Milasin J. Sister chromatid exchanges in patients with carcinoma in situ of cervix uteri. *Cancer Genet Cytogenet* 1992;59:84-85.~~
- Mitra AB, Murty WVS. Sister chromatid exchange in leukocytes of patients with cancer of cervix uteri. *Hum Genet* 1982; 60:214-215.
- Murty WVS, Mitra AB, Luthra UK, Singh IP. Sister chromatid exchange in patients with precancerous and cancerous lesion of cervix uteri. *Hum Genet* 1986; 72:37-42.
- Nelson JH, Averetle HE, Richart RM: Displasia, Carcinoma in situ and early invasive cervical carcinoma. *Cancer Clinicians* 1984 34:306-315.
- Nordeson I, Beckman L, Liden S, Stjernber N. Chromosomal aberrations and cancer risk. *Hum Hered* 1984;34:76-81.

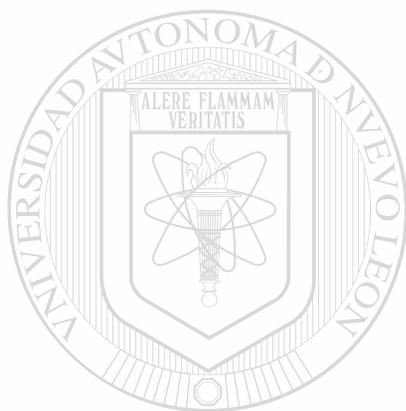
- Paz-y-Mino C, Ocampo L, Narvaez L. Chromosome fragility in lymphocytes in women with cervical uterine lesions produced by human papillomavirus. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; 59:173-6.
- Perry P, Wolff S. New giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 1974; 251:156-158.
- Peto R. Introduction: geographic patterns and trends. En: Peto R, zur Hausen H, eds. *Viral etiology of cervical cancer*. Banbury Report 21. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1986; 3-15.
- Pixley EC. Colposcopic appearances of human Papillomavirus of the uterine cervix. In syrjänen K, Gissman L, koss LG eds. *Papillomavirus and human disease*. New York : Springer Verlag, 1987. p. 268.
- Popescu NC, Zimonjic D, Dipaolo JA. Viral integration, fragile sites and proto-oncogenes in human neoplasia. *Hum Genet* 1990;84:383-386.
- Ribeiro LG, Takahashi CS, Erdtman B, Oliveira SV, Alvares da Costa CT, Gimmeler-Luz MC. Inter-laboratory calibration program for the mouse micronuclei test. *Rev Brasil Genet* 1993;16:631-638.
- ~~Shah KV, Howley PM. Papillomaviruses. En: Fields Virology Vol.2, Bernard N. Fields Ed. Raven Press, N.Y. 1990;59:1651-1676.~~
- Sobti RC, Bhardwaj DK, Gupta BD. Spontaneous chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes of patients with cancer. *Med Sci Res* 1991;19:23-25.
- Thakur AT, Berry BJ, Mielke PW. A FORTRAN program for testing trend and homogeneity in proportions. *Computer Programs in Biomedicine* 1985;19:229-233.
- Torroella-Kouri M, Morsberger S, Carrillo A, Mohar A, Meneses A, Ibarra M, Daniel RW, Ghaffari AM, Solorza G, Shah KV. HPV prevalence among mexican women with neoplastic and normal cervixes. *Gynecol Oncol* 1998; 70:115-120.

- Tucker, J.D., and Preston, R.J. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchange and cancer risk assessment. *Mutation Research* 1996;365:147-159.
- Turman RJ, Solomon D. The Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytologic diagnosis. New York, Spring-Verlang, 1994.
- Verma RS, Babu A. Specialized techniques in human chromosomes. Manual of basic techniques. Pergamon Press 1989; 129-131.
- Werkmeister J, Zaunders J, McCarthy W, Hersey P. Characterization of an inhibitor of cell division released in tumors cell cultures. *Clin Exp Immunol* 1980;41:487-96.
- Wickenden C, Steele A, Malcom AD, Coleman DV. Screening for wart infection in normal and abnormal cervixes by DNA hybridization of cervical scrapes. *Lancet* 1985; 1:65- 67.
- Wilczynski S, Walker J, Liao S, Bergen S, Berman M. Adenocarcinoma of the cervix associated with human papillomavirus. *Cancer* 1988;62:1331-1336.
- Wogan GN. Molecular epidemiology in cancer risk assessment and prevention; recent progress and avenues for future research. *Enviro Health Perspect* 1992;98:167-178.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

- Xu CF. The frequencies of sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations in the peripheral lymphocytes in patients with cervical carcinoma. *Cung Hua Fu Chan Ko Ko Tsa Chih* 1993; 28:496-497.
- Yakota K, Ueda K, Ohama K, Fujiwara A. Increased spontaneous and mitomicin C-induced sister chromatid exchange in patients with cancer of the cervix uteri, with special reference to stage of cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 1989; 43:79-97.
- Zar JH. Biostatistical analysis, 4th ed. Upper Saddle River. Prentice-Hall, N.J; 1999:192-193.

- Zazove P, Reed BD, Gregoire L, Ferenczy A, Gorenflo DW, Lancaster WD. Low false negative rate of PCR analysis for detecting human Papillomavirus-related cervical lesions. J Clin Microbiol 1998; 36:2708-2713.
- Zur Hausen H. Condylomata acuminata and human genital cancer. Cancer Res 1976;36-794.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

IX. PUBLICACIONES PRODUCIDAS

1. Leal-Garza CH, Cortés Gutiérrez EI. Detección molecular del virus del papiloma humano en mujeres con cáncer cervicouterino. Gac Med (Mex) 1996; 132: 295-318.

2. Cortes-Gutierrez EI, Cerda-Flores R, Leal-Garza CH. Sister chromatid exchange in peripheral lymphocytes from women with carcinoma of the uterine cervix. Cancer Genet Cytogenet 2000;122;121-123.

3. Leal-Garza CH, Cerda-Flores R, Leal-Elizondo E, Cortes-Gutierrez EI. Micronuclei in cervical smears and peripheral lymphocytes from women with and without cervical uterine cancer. Mutation Research (en prensa).

4. Cortés-Gutiérrez EI, Cerda-Flores RM, Leal-Klevezas DS, Leal-Garza CH. Validity of PCR analysis for detecting the Human Papillomavirus in Women with Cervical Intraepithelial Neoplasia (enviado a Obstetrics Gynecology).[®]

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

mo por efecto de estos antígenos. Estas moléculas para su uso en técnicas clásicas de inmunoprecipitación o métodos modernos, como inmunotransferencia, agregan una más a nuestra lista de ventajas de los métodos modernos para el diagnóstico de enfermedades infecciosas o parasitarias: no se requiere el aislamiento de los agentes causales, sólo una pequeña muestra de sangre.

De acuerdo con lo anterior, prácticamente todas las enfermedades infecciosas y parasitarias pueden ser diagnosticadas al menos con uno de los métodos antes mencionados, con las adecuaciones que cada caso requiera.

En este simposio hemos querido ofrecer a ustedes un panorama general sobre este tema, con ejemplos de las técnicas que existen para el diagnóstico molecular de enfermedades producidas por virus, bacterias y protozoarios. Hablaremos específicamente de la identificación de papilomavirus, una de las causas de cáncer cervicouterino, bacterias pertenecientes al género *Brucella*,

responsables de graves infecciones en el hombre y severas pérdidas económicas en la industria pecuaria, así como de dos protozoarios, *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica*, cuya importancia médica es ampliamente conocida.

Deseo expresar mi agradecimiento a los miembros de la mesa directiva por la oportunidad y el honor de mostrar a ustedes nuestros resultados dentro del programa académico de la Academia Nacional de Medicina y a las autoridades del Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados, mi alma mater, por brindarnos la ocasión de compartir y disfrutar de una jornada plena de estimulantes actividades, durante la celebración de nuestra reunión conjunta. Agradezco cumplidamente a los distinguidos investigadores, M en C. Carlos Leal Garza, Dr. Hugo Barrera Saldaña y Dra. Guadalupe Ortega Pierres, sus valiosas contribuciones que seguramente enriquecerán esta sesión con su experiencia y conocimientos.

II. Detección molecular del virus del papiloma humano en mujeres con cáncer cervicouterino

Carlos H. Leal-Garza*, Elva I. Cortés-Gutiérrez*

Los virus son organismos que pueden causar una gran variedad de infecciones y pueden sobrevivir solamente dentro de las células vivas. Hay una diversidad de tipos, pero todos ellos comparten dos características comunes: están formados de material genético (ADN o ARN) y este material está protegido por una cápside protéica que lo reviste. Se han identificado varias familias de virus sobre la base de su estructura, composición química y por sus similitudes en su contenido genético.

Un virus que puede ser transmitido a su hospedero de varias formas: inhalado, tragado o transmitido a través de las relaciones sexuales y formas menos comunes tales como penetrar a través de la

piel o por inoculación directa en sangre, pero una vez dentro de la célula, el virus puede integrar su material genético al de la célula hospedera, produciendo cambios que permiten a ellos reproducirse y causar una enfermedad.

Se ha estimado que un buen porcentaje (5 al 10%) de todos los cánceres en la población, están asociados con algún tipo de virus, y que algunos de ellos contribuyen al cambio de una célula normal en una cancerosa, conociéndoseles a este grupo como virus oncogénicos. En algunos casos pueden actuar directamente sobre la célula causándole pérdida en la habilidad de control de crecimiento, por lo que ésta continúa dividiéndose, formando masas

*Centro de Investigación Biomédica del Noroeste.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Carlos H. Leal Garza, Instituto Mexicano del Seguro Social, Monterrey, Nuevo León, México Admon. Correos 4, Independencia, 64720 Monterrey, N.L.

de tejido anormal (tumores). En otros casos los virus pueden actuar directamente dañando células del sistema inmune y logrando que el organismo sea incapaz de mantener la división celular normal.

A nivel mundial, cerca de 500 mil nuevos casos de carcinoma invasor del cuello uterino son diagnosticados anualmente,¹ y en países subdesarrollados es la enfermedad neoplásica más frecuente y responsable aproximadamente del 25% de todos los casos de cáncer que se presentan en el sexo femenino.

La lesión precursora del Cáncer Cérvico-Uterino (CaCu) es la neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y dependiendo del grado de anormalidad celular son clasificados como NIC grado I (displasia leve), NIC grado II (displasia moderada), y NIC III (displasia severa o carcinoma *in situ*) y cuando las células cancerosas epiteliales invaden tejido subyacente se le denomina cáncer invasor.²

El tiempo de evolución entre NIC I hasta llegar a carcinoma invasor es de 10 a 20 años, pero hay lesiones precursoras que revierten o regresan espontáneamente a su estado normal o pueden permanecer sin modificarse durante casi toda la vida.

En diversos estudios clínicos y epidemiológicos se ha mostrado que el virus del papiloma humano, principalmente el transmitido por vía sexual, está involucrado en una gran proporción de los CaCu, así también se le ha detectado en las lesiones precursoras NIC I, II y III y del condiloma del cérvix.^{3, 4}

Los papilomavirus humanos (VPH) son un grupo de más de 70 tipos de virus y su nombre proviene porque ellos son causantes de las verrugas o papilomas y que son tumores benignos. Diferentes tipos de VPH causan las verrugas comunes que crecen en manos y pies, así como los que se desarrollan en boca y áreas genitales, algunos VPH genitales, transmitidos sexualmente han sido asociados a procesos neoplásicos tanto en mujeres como en hombres.

Los VPH no son los únicos virus que se les ha implicado en el CaCu, ya que se ha asociado el virus del herpes simple tipo 2; sin embargo, existe evidencia de que los VPH son un agente más serio de factor de riesgo para el CaCu que el herpes.⁵

El genoma de los VPH está constituido de ADN doble cadena, circular en su forma y posee aproximadamente 8 mil pares de bases, la estructura entre ellos es similar con una homología de se-

cuencia que va del margen de 45% a una homología alta del 85%. En ellos se han identificado marcos de lectura abierta (ORF), los cuales están organizados en regiones de expresión temprana (E) que codifican para proteínas relacionadas con la replicación (E1), transcripción (E2) y la transformación celular (E6 y E7) y las regiones de expresión tardía (L) que codifican para proteínas de la cápside (L1 y L2).⁶

De los tipos diferentes de VPH que se conocen hay los llamados de "bajo riesgo", es decir, aquellos que causan papilomas o verrugas alrededor de los genitales y el ano tanto en hombres como en mujeres y son asociados con los tipos números 6 y 11, ya que se ha observado que raramente desarrollan cáncer. Otros conocidos como virus de "alto riesgo" han sido asociados con la aparición de neoplasias, y aquí se incluyen principalmente los tipos números 16, 18, 31, 33, 35 y otros que presentan altos índices de asociación con el NIC y con carcinoma *in situ* o invasor en un 90%, de éstos del 50 al 90% corresponden al tipo 16 y 18, y de esos dos el primero es más frecuente.

Han causado gran interés los recientes estudios que indican que la proteína celular p53 es capaz de unirse a la proteína E6 principalmente en el virus VPH tipo 16.⁷ La asociación de p53 con la carcinogénesis humana está empezando a establecerse, el gen que codifica para la fosfoproteína nuclear p53 ha sido localizado en el cromosoma 17 en su región p13. Este gen fue originalmente considerado como un oncogene, pero ahora se cree que tiene propiedades de un gen supresor de tumores. Mutaciones en él representan las anomalías genéticas más comunes observadas en tumores, tales mutaciones causan pérdida de la función supresora.⁸

Hay funciones que apoyan la teoría de que la proteína p53 se une a la proteína E6 de los VPH tipos 16/18 en el citoplasma celular, y de este modo previene la función supresora del tumor en el núcleo.⁹

Como dato interesante podemos mencionar que pocos estudios cromosómicos han sido hechos en el CaCu, debido a la dificultad para obtener preparaciones cromosómicas adecuadas en tumores sólidos. Anomalías en la estructura de los cromosomas 1, 4, 5 y 11 son comunes, pero además se han observado anomalías numéricas en estructura.¹⁰⁻¹²

La infección por tipos definidos de VPH no es suficiente para la producción del CaCu, algunas observaciones apoyan lo anterior, ya que el progreso a cáncer es una rara consecuencia de la infección por VPH por sí sola, además, el periodo latente entre la infección el desarrollo del proceso neoplásico puede estar en el orden de 20 hasta los 50 años,¹³ hay estudios epidemiológicos que han implicado como factores de riesgo al hábito de fumar, así como al uso de los anticonceptivos orales entre otros factores.¹⁴

Para el diagnóstico de una infección por VPH podemos echar mano de varios métodos, uno de ellos es la clásica técnica citológica y la histopatología en donde la presencia de koilocitos caracterizados por una gran zona clara perinuclear y a menudo binucleación, son un fuerte indicio de la presencia del virus, aunque se ha informado que partículas virales o sus antígenos son detectados sólo en una pequeña proporción en tales células afectadas por medio de la técnica de la peroxidasa-antiperoxidasa.¹⁵

La colposcopia es un método que permite visualizar el cérvix adecuadamente, es útil sobre todo para la detección de VPH por la lesión tisular que éstos producen,¹⁶ y es una herramienta diagnóstica muy útil para aclarar dudas que no se puedan resolver con la clínica.

La introducción de la biología molecular a los laboratorios de histopatología ha resultado en un diseño de métodos innovadores en la patología molecular. Mientras que características clínicas pueden indicar una infección viral, el diagnóstico definitivo debe basarse sobre la demostración directa de la presencia del virus, ya sea por cultivo o por detección por inmunocitoquímica. Para la mayoría de los virus su cultivo es extremadamente tedioso y consumen tiempo, incluso a veces es imposible lograrlo como es el caso de los VPH.

La detección inmunológica de los antígenos de las cápsides virales ha mostrado que no es del todo confiable, en la mayoría de los casos, por la complejidad de la infección viral.

Por medio de las técnicas de hibridación *in situ* de los ácidos nucleicos utilizando sondas radioactivas (HP, y S) específicas para las secuencias de ADN viral, es posible identificar y localizar al virus en las células o tejidos infectados. Las sondas radioactivas en general, aunque muy útiles tienen

sus desventajas: el tiempo de exposición en la autoradiografía es largo, la resolución morfológica puede ser pobre y el uso de material radioactivo requiere condiciones especiales en el laboratorio, aunque el uso de sondas marcadas con S han mostrado tener una resolución y una sensibilidad excelente.

Es preferible utilizar las técnicas de hibridación *in situ* por métodos no radioactivos utilizando para ello la sonda de ADN viral marcada con biocina o digoxigenina, misma que después de ser hibridada con la muestra de ADN por analizar, es detectada inmunológicamente incubando con un complejo formado por estreptavidina acoplado con fosfatasa alcalina o peroxidasa y sustancia cromógena para revelar la hibridación.¹⁷⁻¹⁹

La sensibilidad para detectar secuencias de ADN viral 6,11,16 y 18 en secciones de tejido incluidas en parafina o en biopsias de áreas genitales con este sistema de sondas con marcaje no radioactivo, es comparable a la obtenida con aquellas marcadas con ³⁵S en la localización de híbridos a nivel celular.²⁰⁻²⁴

La hibridación usando la técnica de *Southern blot* de sondas de ADN extraídos de tejidos frescos, ha sido quizá la prueba más utilizada y sensible tanto para la detección de la presencia como para la identificación de subtipos de VPH y además nos puede dar información si el genoma viral está en las células como episoma o está integrado al genoma celular,²⁵ esta técnica requiere una intensa labor en el laboratorio.

La técnica dot-blot o hibridación slot-blot,²⁶ también se utiliza ADN puro de células o tejido infectado, mismo que es desnaturalizado y colocado directamente como mancha o gota en una membrana o papel filtro de nitrocelulosa, esto evita los pasos de la electroforesis en gel y la transferencia de la hibridación Southern, y después de esto, el ADN es sometido a la hibridación con la sonda marcada y denaturalizada.

Otras variantes de estas técnicas de hibridación utilizan células exfoliadas que son filtradas sobre una membrana de nitrocelulosa, desnaturalizada e hibridada a alta temperatura,²⁷ o pueden utilizar cortes de tejidos que habían estado incluidos en parafina, esta técnica es la única en la cual la señal es vista con relación topográfica a la lesión patológica.²⁸

El número de tipos distintos de VPH identificados ha ido en aumento rápidamente durante los últimos 15 años, en la actualidad excede de los 70²⁹ y aproximadamente la mitad de ellos ha sido aislada de áreas genitales. Se considera un nuevo tipo de VPH sólo si su genoma completo ha sido aislado y establecido su secuencia nucleotídica de sus genes E6, E7 y L1 y que sea diferente en más del 10% de cualquiera de los VPH descritos previamente.³⁰

Se requiere de métodos alternativos para una evaluación rápida y eficiente de detección e identificación, para esto se emplea un método que permite la amplificación de secuencias génicas presentes en muy pequeñas cantidades en el material a investigar; a este método se le ha dado el nombre de reacción en cadena de la polimerasa (RCP) y consiste en que el ADN de doble cadena es calentado hasta su desnaturalización, las cadenas simples se aparean con un par de oligonucleótidos sintéticos específicos llamados iniciadores, que son complementarios uno en el extremo 5 del gen o fragmento del gen que se desea amplificar, y el otro en el extremo 3 del mismo, pero en la cadena opuesta, estos oligonucleótidos actúan como cebadores para la ADN polimerasa que sintetiza dos nuevas cadenas de ADN complementarias con las cadenas originales. Estos sucesos se repiten hasta 30 veces, lográndose doblar en cada ciclo la cantidad de ADN blanco. Después de esto se realiza un análisis directo por cortes con enzimas de restricción o hibridación con sondas no radioactivas para comprobar la identidad del gen amplificado.³¹

El uso de esta técnica con iniciadores o cebadores consenso (MY11, MY09) pueden amplificar una gran gama de tipos de VPH. Los iniciadores blanco de los VPH son genes de la región L1 que codifican para la cápside viral, para detectar los productos de la amplificación son usados sondas consenso de más de 400 pares de bases y los tipos individuales de virus que pueden ser diferenciados con sondas de pocos oligonucleótidos.^{32,33}

La aplicación de las técnicas moleculares de detección han reafirmado el papel importante que desempeñan los VPH en el desarrollo del CaCu. Aun cuando la identificación de los tipos, subtipos y variantes de los VPH es complicada y a menudo compleja, es importante el continuar con este tipo

de estudios, así como los encaminados al avance de las lesiones preneoplásicas, la evolución y el tipo específico de virus asociado a ellas, para tener en un futuro, un protocolo de manejo adecuado que permita un diagnóstico oportuno, la profilaxis, así como el control definitivo de los carcinomas genitales.

Referencias

1. Peto R. Introduction: geographic patterns and trends. En: Peto R, zur Hausen H, eds. *Viral etiology of cervical cancer*. Banbury Report 21, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1986; 3-15.
2. Nelson JH, Averette HE, Richart RM. Dysplasia, carcinoma in situ and early invasive cervical carcinoma. *Cancer J Clinicians* 1984; 34:306-315.
3. Koutsky LA, Galloway DA, Holmes KK. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Epidemiol Rev* 1988; 10:122-162.
4. Muñoz N, Bosch X, Kaldor JM. Does human papillomavirus cause cervical cancer? The state of the epidemiological evidence. *Br J Cancer* 1988; 57:1-5.
5. Vonka V, Kanka J, Roth Z. Herpes simplex type 2 virus and cervical neoplasia. *Ad Cancer Res* 1987; 48:149-91.
6. García-Carrancá A, Gariglio PV. Aspectos moleculares de los papilomavirus humanos y su relación con el cáncer cervico-uterino. *Rev Inv Clin* 1993; 45:85-92.
7. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990; 248:76-79.
8. Vogelstein B, Kinzler J. p53 function and dysfunction. *Cell* 1993; 70:523-526.
9. Liang XH, Volkman M, Klein R, Herman B, Lockett SJ. Colocalization of the tumour-suppressor protein p53 and human papillomavirus E6 protein in human cervical lines. *Oncogene* 1993; 8:2645-2652.
10. Atkin Nb, Baker MC. Chromosome 1 in 26 carcinomas of the cervix uterin. *Cancer* 1979; 44:604-613.
11. Atkin Nb, Baker MC. Nonrandom chromosome changes in carcinoma of the cervix uterin I. Nine near diploid tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1982; 7:209-222.
12. Atkin Nb, Baker MC. Nonrandom chromosome changes in carcinoma of the cervix uterin II. Ten tumors in the triploid-tetraploid range. *Cancer Genet Cytogenet* 1984; 13:189-207.
13. Zur Hausen H. Intracellular surveillance of persisting viral infections. Human genital cancer results from deficient control of papillomavirus infection. *Lancet* 1986; 2:489-491.
14. Vessey MP. Epidemiology of cervical cancer: role of hormonal factors, cigarette smoking and occupation. En: Peto R, Zur Hausen H, eds. *Viral etiology of cervical cancer*. Banbury Report 21. Cold Spring Harbor, New York. 1986; 29-43.
15. Morin C, Braun L, Casas-Cordero M, Shan KV, Roy M, Fortier M. Confirmation of the papillomavirus etiology

- of condylomatous cervix lesions by the peroxidase-antiperoxidase technique. JNCI 1981;66:831-842
16. Schanaider A, Hotz M, Gissmann L. Increased prevalence of human papillomaviruses in the lower genital tract of pregnant women. Int J Cancer 1987;40:198.
 17. Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative high sensitivity, fluorescence hybridization. Proc Natl Acad Sci. USA 1986;83:2934.
 18. Lewis FA, Griffiths S, Dunncliff R, Wells M, Dudding N, Bird CC. Sensitive *in situ* hybridization technique using biotin-streptavidin polyalkaline phosphatase complex. J Clin Pathol 1987;40:163.
 19. Allan GM, Tood D, Smyth JA, Mackie DP, Burns J, McNutly MS. *In situ* hybridization: an optimized detection protocol for a biotinylated DNA probe render it more sensitive than a comparable ³⁵S-labelled probe. J Virol Methods 1989;24:181.
 20. Heino P, Hukkanen V, Arstila P. Detection of human papillomavirus (VPH) DNA in genital biopsy specimens by *in situ* hybridization with digoxigenin-labeled probes. J Virol Methods 1989;26:331-338.
 21. Amortegui AJ, Meyer MP, McIntyre K, Locker J. Detection of human papillomavirus DNA in cervical lesion by *in situ* hybridization using biotinylated DNA probes. Int J Gynecol Pathol 1990;9:306-315.
 22. Furutay, Shinohara T, Sano K, Meguro M, Magashima K. *In situ* hybridization with digoxigenin labelled DNA probes for detection of viral genomes. J clin Pathol 1990;43:806-809.
 23. Sarkar S, Verma K, Kaur H, Seth P. Detection of human papillomavirus types 16 and 18 DNA in cervical lesions of indian women using *in situ* hybridization. Indian J med Res 1992;96:356-360.
 24. Handley JM, Maw RD, Lawter H, Horner T, Bharucha H, Dinsmore WW. Human papillomavirus DNA detection in primary anogenital warts and cervical low-grade intraepithelial neoplasias in adults by *in situ* hybridization. Sex Transm Dis 1992;19:225-229.
 25. Shah KV, Howley PM. Papillomaviruses. En Fields Virology Vol. 2. Bernard N. Fields Ed. Raven Press. N Y 1990;59:1651-1676
 26. Wickenden C, Steele A, Malcom Ad, Coleman DV. Screening for wart infection in normal and abnormal cervixes by DNA hybridization of cervical scrapes. Lancet 1985;1:65-67.
 27. Wagner D, Ikenberg H, Boehm N, Gissmann L. Identification of human papillomavirus in cervical swabs by deoxyribonucleic acid *in situ* hybridization. Obstet Gynecol 1984;64:767-772.
 28. Gupta JW, Gupta PK, Rosenshein N, Shah K. Detection of human papillomavirus in cervical smears. A comparison of *in situ* hybridization, immunocytochemistry, and cytopathology. Acta Cytol 1987;31:387-396.
 29. De Villiers EM. Heterogeneity in the papillomavirus group. J Virol 1989;63:4898-4903
 30. Van Ranst Ma, Tachezy R, Delius H, Burk RD. Taxonomy of the human papillomaviruses. Papilloma-virus Rep 1993;4:61-65.
 31. Barrera HA. Medicina Molecular. En Barrera H. Información genética, estructura, función y manipulación, México CONACYT 1992;53-62.
 32. Bauer HM, Manos MM. PCR detection of genital human papillomavirus. En: Diagnostic molecular microbiology Principles and applications. Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ. editores. American society for microbiology, Washington, D. C. 1993;407-413
 33. Hans-Ulrich B, Shih-Yen Ch, Manos MM. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, RFLP, nucleotide sequence and phylogenetic algorithms. J Infect Dis 1994;170:1077-1085.

III. Diagnóstico de brucelosis por la reacción en cadena de la polimerasa

Hugo A. Barrera-Saldaña*, Ana María Sifuentes-Rincón*, Agnés Revol-de Mendoza*

La brucelosis, fiebre de malta o fiebre ondulante, es una zoonosis causada por bacterias del género *Brucella* y es considerada como un problema económico y de salud pública muy importante, sobre todo en los países en vías de desarrollo. Aunque es fundamentalmente una enfermedad de animales domésticos, el hombre puede infectarse de forma

secundaria, siendo *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, y *Brucella abortus*, las principales especies responsables.

La infección por brucelas en humanos tiene una distribución prácticamente mundial. Sin embargo, existen diferencias geográficas importantes según las especies implicadas: *Bbrucella melitensis*

* ULIEG, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, U.A.N.L.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Hugo A. Barrera Saldaña. Av. Madero y Dr. Eduardo Aguirre Pequeño, Col. Mitras Centro, C.P. 64460. A.P. 3-4125, Monterrey, N.L. Tel. (81)329-4173 y Fax: (81) 333-7747. E-Mail:hbarrera@ccr.dsi.uan1.mx

Sister chromatid exchanges in peripheral lymphocytes from women with carcinoma of the uterine cervix

Elva I. Cortés-Gutiérrez*, Ricardo M. Cerda-Flores, Carlos H. Leal-Garza

División de Genética, Centro de Investigación Biomédica del Noroeste, Instituto Mexicano del Seguro Social, 2 de Abril y San Luis Potosí, Colonia Independencia, 64720 Monterrey, N.L., México

Received 6 March 2000; received in revised form 27 April 2000; accepted 3 May 2000

Abstract

Sister chromatid exchanges (SCE) are reciprocal exchanges between sister chromatids. It has been reported that in patients with cervical cancer, the frequency of SCE in peripheral lymphocytes is significantly higher than that in normal individuals; however, other studies have shown no significant difference. The aim of this unmatched case-control study was to compare the mean number of SCE per metaphase in lymphocytes from women with and without carcinoma of the cervix uteri. The SCE specimens were prepared by the fluorescence plus giemsa technique in peripheral lymphocytes from 28 women with carcinoma of cervix uteri and 28 controls. The mean number of SCE per metaphase in women with carcinoma of cervix uteri (7.80 ± 1.05) was higher than the control group (6.98 ± 1.13) ($P < 0.05$; t-test). This study had a statistical power of 0.80 and an alpha value of 0.05. This finding suggests that an increased number of SCE in peripheral lymphocytes is associated with cervical cancer. We consider that the lack of reported association of SCE and cervical cancer might be attributed to the none determination of the statistical power and sample size. © 2000 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Cervical cancer represents the second most common malignant neoplasia in women worldwide. In Mexico, cervical cancer is the most common female malignancy. Therefore, it is necessary to establish early diagnostic and prognostic methods [1].

Sister chromatid exchanges (SCE) are reciprocal exchanges between sister chromatids. They are generally visualized by exposing cells (*in vitro* or *in vivo*) to 5-bromodeoxyuridine (BrdU) for two cell cycles, allowing subsequent differential staining of sister chromatids. Exchanges are detected at switches in stained regions between sister chromatids. The molecular mechanisms of SCE are not known, but they occur after exposure to many genotoxic agents and are believed to indicate DNA damage [2].

The SCE phenomenon is widely used as a reliable indicator of chromosome (DNA) instability [3], and has been suggested as a preclinical marker for the breast cancer gene [4].

The SCE test in cultured lymphocytes for evaluating the genomic damage in patients with cervical carcinoma is more practical than in solid tumors due to the difficulties in obtaining surgical specimens. The use of lymphocytes is based on the assumption that there should be an association

between the extent of chromosomal damage in lymphocytes and in tumor cells [5].

A significant increase of the number of SCEs has been reported previously in patients with cancer of the uterine cervix [6–11]; however, other studies have not shown significant differences [12]. We consider that the inconsistency in these results might be attributed to the low statistical power in the experimental designs.

Statistical power is a measure of the extent to which a study is capable of discerning differences or associations that exist within the population under investigation, and is of critical importance whenever a hypothesis is statistically tested. Conventionally, studies should reach a power level of 0.8, such that four times out of five a false null hypothesis will be rejected by a study. The easiest way to increase statistical power is by increasing sample size [13].

The aim of this unmatched case-control study was to determine any possible association between the mean number of SCE per metaphase in women with and without carcinoma of cervix uteri.

2. Materials and methods

2.1. Studied population

Data analyzed in this research were collected at the Hospital de Ginecología y Obstetricia del Instituto Mexicano

* Corresponding author. Centro de Investigación Biomédica del Noroeste, IMSS, Administración de Correns 4, Apartado Postal 20, 64720 Monterrey, N.L., México. FAX: +52-8-190-40-35

E-mail address: elvarencortes@hotmail.com (E.I. Cortés-Gutiérrez).

del Seguro Social (IMSS) in Monterrey, Nuevo León, Mexico during 1997.

An unmatched case-control study that was approved by the Ethical Committee of the Centro de Investigación Biomedica del Noreste, IMSS, was conducted. The subjects were 28 patients affected by carcinoma of the cervix uteri, according to the UICC classification [14], and 28 normal women. The mean ages were 45 (range: 24–76) and 44 (range: 23–75) years for the patients and control groups, respectively. None of the patients had previous chemotherapy or radiotherapy, nor a clinical history of chronic infection, drug intake (including contraceptives), cigarette smoking, or radiation exposure.

Molecular analysis for every control woman was performed in order to detect the presence of human papilloma virus (HPV), and all women were negative for this test.

The criteria of genetic homogeneity found in the North-eastern Mexico population by Cerda-Flores et al. [15] was applied in this study.

2.2. Biological samples

Peripheral blood samples of patients and controls were collected in sterile heparinized disposable syringes.

2.3. Metaphases

Lymphocytes were cultured for 72 hours in McCoy 5A medium supplemented with 2% phytohemagglutinin, 15% fetal calf serum, and antibiotics (streptomycin-penicillin). Bromodeoxyuridine was added at a final concentration of 10 µg/ml after 24h of incubation. Colchicine was added 45 minutes prior to harvesting, and slides were prepared according to the standard procedure [16].

Sister chromatid differentiation was achieved using the fluorescence plus giemsa technique [17]. For each woman the mean number of SCE was calculated from 30 to 50 metaphases analyzed by one observer by means of blind analysis.

2.4. Statistical analysis

The statistical comparison of the mean number of SCE per metaphase in women with and without carcinoma of cervix uteri was made using the Student's *t*-test. Sample size for two-sample comparison of means was estimated using the STATA software (version 6.0) ($\alpha = 0.05$, $1 - \beta = 0.80$). A value of $P < 0.05$ was considered significant.

3. Results

The mean value of SCE in patients was 7.80 ± 1.05 per metaphase. In the controls, however, it was 6.98 ± 1.13 per metaphase. The SCE frequency in patients was statistically significant ($P = 0.045$), as compared with the control subjects (Table 1). There was homoscedasticity in the variances when the Levene test was applied ($P > 0.05$).

Table 1

Sister chromatid exchange frequencies in women with and without carcinoma of the cervix uteri

| Subjects | Metaphases studied | Mean SCE/Cell \pm SD |
|-----------------------|--------------------|------------------------|
| Patients ^a | 1200 | $7.80 \pm 1.05^*$ |
| Control ^b | 840 | 6.98 ± 1.13 |

Levene test: $F = 0.547$; $P = 0.463$.

^aThe mean number of SCE was calculated for 30 to 50 metaphases/patient.

^bThe mean number of SCE was calculated for 30 metaphases/control.

^{*}Significant at $P = 0.045$.

4. Discussion

The results suggest that the frequency of SCE in patients with cervical carcinoma is higher than in controls with a statistical power of 0.80. It could be assumed that these patients show a certain amount of chromosome instability. This finding is in accord with other authors [5–11]. High values of statistical power (0.99 to 1.00) are demonstrated in all of the references shown in Table 2 (computed according to the STATA software by the authors). On the other hand, Adhvaryu et al. [12] did not find SCE to be statistically significant in cervical cancer patients, possibly because of the low statistical power ($1 - \beta = 0.57$) in the experimental design.

Various possible mechanisms have been proposed to explain the increase in SCE in patients with cervical carcinoma: the metabolic stress due to tumor growth [18], the clastogenic products released by the tumor cells [19], and the human papillomavirus integration into the cell genome produces chromosomal fragility. The presence of this virus has been observed in 90 to 95% of the preneoplastic and neoplastic lesions of the cervix [20].

In conclusion, our results suggest that SCEs are associated with cervical cancer. The inconsistency of the results with other studies might be attributable to the low statistical

Table 2

Sister chromatid exchange frequencies in women with and without carcinoma of the cervix uteri with different statistical power as reported in the literature

| Reference | Subjects | n | Mean SCE/Cell \pm SD | Statistical power |
|--------------------------|----------|----|------------------------|-------------------|
| Mitra et al. [6] | Patients | 13 | $10.05 \pm 2.35^*$ | 0.99 |
| | Control | 11 | 6.95 ± 1.53 | |
| Murty et al. [7] | Patients | 46 | $10.15 \pm 2.49^*$ | 1.00 |
| | Control | 43 | 7.55 ± 2.24 | |
| Adhvaryu et al. [12] | Patients | 13 | 9.68 ± 0.97 | 0.57 |
| | Control | 13 | 8.91 ± 1.15 | |
| Yokota et al. [10] | Patients | 35 | $10.00 \pm 1.80^*$ | 1.00 |
| | Control | 18 | 7.60 ± 0.80 | |
| Lukovic and Milassin [8] | Patients | 21 | $8.92 \pm 1.47^*$ | 0.99 |
| | Control | 19 | 6.94 ± 1.00 | |
| Dhillon et al. [9] | Patients | 14 | $9.44 \pm 1.27^*$ | 1.00 |
| | Control | 20 | 6.09 ± 1.07 | |
| Capalash and Sobti [11] | Patients | 30 | $7.18 \pm 1.23^*$ | 1.00 |
| | Control | 15 | 4.68 ± 1.82 | |

^{*} $P < 0.05$.

power in the experimental design of those studies; however, the question of usefulness of increased SCE levels as a pre-clinical marker to identify women with a high risk of developing cancer needs to be ascertained by follow-up studies on precancerous lesions with high levels of SCEs.

Acknowledgments

We are grateful to the Hospital de Ginecología y Obstetricia del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Monterrey, Nuevo Leon, Mexico, for the use of their facilities to sample and interview study participants. We also acknowledge Dr. Sara Ann Barton for her critical review of the manuscript.

References

- [1] Secretaría de Salud. Dirección General de Epidemiología, Histopatological Registry of Malignant Neoplasma, SSA Mexico, 1996
- [2] Cooke D, Allen J, Clare MG, Doré CJ, Henderson L. Statistical methods for sister chromatid exchange experiments. In: Kirkland DJ, editor. *Statistical evaluation of mutagenicity test data*. pp. 155–83. Cambridge: Cambridge University Press, 1989.
- [3] Cairano AV, Thompson LH, Lindl PA, Minkler JL. Sister chromatid exchange as an indicator of mutagenesis. *Nature* 1978;271:551–3.
- [4] Skolnick M, Livingston GK, Fineman RM, Johnson P, King MC, McLellan T, Bishop DT. Genetics of breast cancer: genealogical clusters, major genes, linkage and sister chromatid exchange as a preclinical marker. *Am J Hum Genet* 1980;32:A151.
- [5] Nurdenson I, Beckman L, Liden S, Sjönerb N. Chromosomal aberrations and cancer risk. *Hum Hered* 1984;34:76–81.
- [6] Mitra AB, Murty VV, Luthra UK. Sister chromatid exchange in leukocytes of patients with cancer of cervix uteri. *Hum Genet* 1982;60:214–5.
- [7] Murty VV, Mitra AB, Luthra UK, Singh IP. Sister chromatid exchange in patients with precancerous and cancerous lesions of cervix uteri. *Hum Genet* 1986;72:37–42.
- [8] Lukovic L, Milassin J. Sister chromatid exchanges in patients with carcinoma *in situ* of cervix uteri. *Cancer Genet Cytogenet* 1992;59:84–5.
- [9] Dhillon VS, Kjer RS, Dhillon IK. Chromosome instability and sister chromatid exchange (SCE) studies in patients with carcinoma of cervix uteri. *Cancer Genet Cytogenet* 1996;86:54–7.
- [10] Yokota K, Ueda K, Ohama K, Fujiwara A. Increased spontaneous and mitomycin C-induced sister chromatid exchanges in patients with cancer of the cervix uteri, with special reference to stage of cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 1989;43:79–97.
- [11] Capalash N, Sobti RC. Spontaneous genomic fragility and cell cycle progression in lymphocytes of patients with cervical carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1996;88:30–4.
- [12] Adhvariyu SG, Vyas RC, Dave BI, Tivedi AH, Parikh BN. Spontaneous and induced sister chromatid exchange frequencies and cell cycle progression in lymphocytes of patients with carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Genet Cytogenet* 1985;14:67–72.
- [13] Fox N, Mathers N. Empowering research: statistical power in general practice research. *Fam Pract* 1997; 4:324–9.
- [14] Sobin LH, Wittekind C. TNM classification of malignant tumours, 5th ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1997.
- [15] Cerda-Flores RM, Kshatriya GK, Barton SA, Leal-Garza CH, Garza-Chapa, Schull WJ, Chakraborty R. Genetic structure of the populations migrating from San Luis Potosí and Zacatecas to Nuevo León in Mexico. *Hum Biol* 1991;63:309–27.
- [16] Verma RS, Babu A. Human chromosomes: manual of basic techniques. New York: Pergamon Press, 1989.
- [17] Perry P, Wolff S. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 1974;261:156–8.
- [18] Banerjee R, Goldfeder A, Mitra J. High frequency of *in vivo* sister chromatid exchanges in bone-marrow cells of mice bearing mammary adenocarcinoma dbrB. *Cancer Genet Cytogenet* 1982;5:321–6.
- [19] Werkmeister J, Zaunders J, McCarby W, Hersey P. Characterization of an inhibitor of cell division released in tumour cell cultures. *Clin Exp Immunol* 1980;41:487–96.
- [20] Paz-y-Mino C, Ocampo L, Narvaez R, Narvaez L. Chromosome fragility in lymphocytes of women with cervical uterine lesions produced by human papillomavirus. *Cancer Genet Cytogenet* 1992;59:173–6.

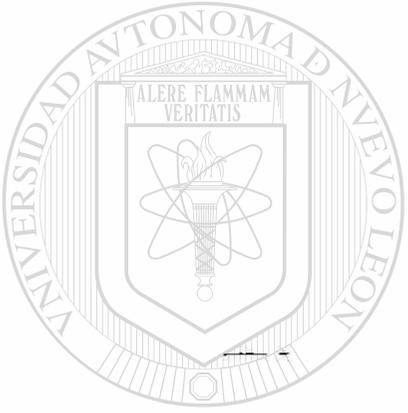
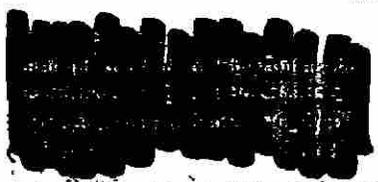
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Dr. Elva I. Cortes-Gutierrez
Centro de Investig. Biomedica del Noreste
IMSS
Administracion de correos No 4
Apartado Postal 20
CP 64720 Monterrey, N.L.
MEXICO



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

MUTATION RESEARCH
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

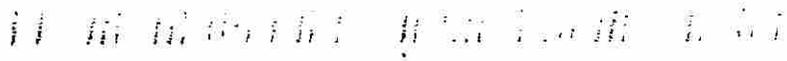
Research Triangle Park, 01/25/01

Herewith we confirm receipt of your manuscript, entitled

"Micronuclei in cervical smears and peripheral lymphocytes from women with and without cervical uterine cancer".

submitted for publication in Mutation Research.

M. D. Shelby
Managing Editor



08/28/2001

Elva I. Cortes-Gutierrez, MSc
Centro de Investigacion Biomedica del Noreste, IMSS
Administracion de correos No 4
Apartado postal 20, C.P. 64720
Monterrey, N.L.
Mexico

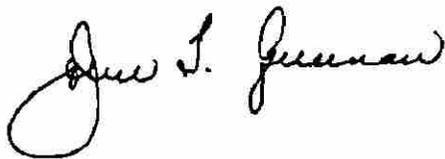
RE: Manuscript No. 01-0879
Validity of polymerase chain reaction for detecting the human papillomavirus in cervical neoplasia

Dear Cortes-Gutierrez:

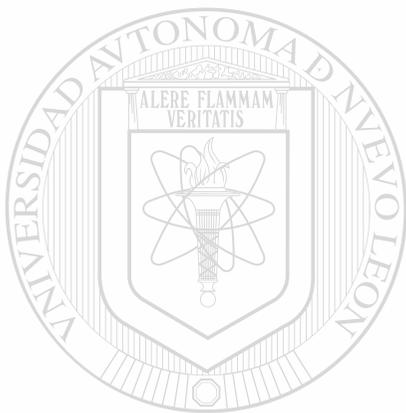
Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in *Obstetrics & Gynecology*. The manuscript has been assigned the number given above. Please refer to this number in any correspondence.

Your paper has been sent to the Editorial Board and to expert reviewers. As soon as these reviews are completed, I will contact you.

Sincerely,



John T. Queenan, MD
Deputy Editor
JTQ/yhf



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



