

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“OBTENCIÓN DE FACTORES DE ALTO RIESGO PARA
CONTRAER CÁNCER CÉRVICO UTERINO, ASOCIANDO EL
DAÑO AL ADN CON FACTORES DE EXPOSICIÓN”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

IRENE JIMÉNEZ MUNGUÍA

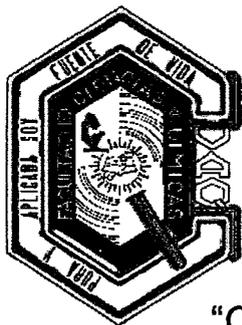
DIRIGIDA POR

M. en C. LOURDES ELVIA RUÍZ FLORES

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2005

BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

No. Adq. H 30187
No. Título _____
Clas. IS
616.99466
J 610



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“OBTENCIÓN DE FACTORES DE ALTO RIESGO PARA
CONTRAER CÁNCER CÉRVICO UTERINO, ASOCIANDO EL
DAÑO AL ADN CON FACTORES DE EXPOSICIÓN”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

IRENE JIMÉNEZ MUNGUÍA

DIRIGIDA POR

M. en C. LOURDES ELVIA RUÍZ FLORES

SINODALES

M. en C. LOURDES ELVIA RUÍZ FLORES _____
DIRECTOR

Q.B. SERGIO PACHECO HERNÁNDEZ _____
SINODAL

M. en C. LETICIA DE LA ISLA HERRERA _____
SINODAL

DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA _____
SINODAL

DEDICATORIAS

A unas personas maravillosas dedico este trabajo, a mis padres, quienes adoro tanto y agradezco que sean un gran apoyo en la construcción de mis sueños.

También quiero dedicar este proyecto a mis abuelitos; por ser un soporte y un gran ejemplo, que me ha servido de guía para tomar la dirección correcta en mi vida.

Y por último, dedico este trabajo a Irene, por mi esfuerzo, ánimo y coraje para lograr este gran reto, que me ha ayudado a crecer y a ser alguien comprometida con mi sociedad y con ganas de hacer algo por ella.

AGRADECIMIENTOS

A mis papás, que me han brindado su apoyo, enseñanzas y ayuda incondicional, a lo largo de mi vida y quienes son mi impulso para seguir adelante.

A Emi y Oscar por ser los mejores hermanos y permitirme compartir con ellos momentos inolvidables, pues es un placer crecer a lado de ellos.

Cynthia, gracias por la amistad que a pesar de la distancia existe y por todas las aventuras vividas en todo el tiempo que compartimos juntas.

Andy amiga, gracias por todos y cada uno de los momentos, los detalles, por acompañarme y ser parte de mi vida. GRACIAS !!!!

Fa, Sol, Susy: Gracias por estar conmigo, por todas las experiencias maravillosas que hemos pasado juntas, por su gran ayuda y por ser parte importante de mí.

Generación 2000 - 2004 área QFB, Gracias por ser compañeros, amigos y hermanos haciéndome tan leve la estancia por la Facultad.

Moni, gracias por ser una fuente inagotable de ideas, por tu amistad y por tu colaboración en todo momento.

A todas las personas con las que he tenido la fortuna de coincidir en éste aún corto recorrido, a mi familia y amigos Val, Luz, Dieg, Anita... Gracias

Agradezco al Centro de Estudios Académicos sobre Contaminación Ambiental (CEACA), en especial al Laboratorio de Mutagénesis Ambiental por permitirme realizar la parte experimental de este trabajo.

A la M. en C. Elvia Ruíz Flores por permitirme participar en este proyecto durante el cual trabajé arduamente para verlo concluido.

Maestro Sergio, Dra. Sandra, Maestra Lety gracias por colaborar y dedicar parte de su tiempo a este proyecto.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II. 1 Cáncer	3
II. 2 Cáncer cérvico uterino	5
II. 3 Factores de riesgo asociados a cáncer cérvico uterino	8
II. 4 Estudios citológicos	13
II. 5 Electroforesis unicelular	14
III. HIPÓTESIS	17
IV. OBJETIVOS	18
IV. 1 General	18
IV. 2 Específicos	18
V. METODOLOGÍA	19
V.1 Métodos	19
V.1.1 Llenado del cuestionario	19
V.1.2 Obtención de muestras	19
V.1.3 Electroforesis unicelular	19
V.1.3.1 Análisis estadístico	20
V.1.4 Evaluación de riesgos relativos	21
V.1.4.1 Revisión del cuestionario	21
V.1.4.2 Asociación de factores de exposición	22
V.1.4.3 Cálculo de la Proporción RM	22
V.1.4.4 Obtención de factores de alto riesgo	23
V.2 Diseño Experimental	24

VI. RESULTADOS	25
VII. DISCUSIÓN	32
VIII. CONCLUSIONES	38
IX. BIBLIOGRAFÍA	39
ANEXO 1	43

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Estadios del cáncer cérvico uterino	7
2	Tabla tetracórica	22
3	Calificación de las muestras según Papanicolaou	27
4	Calificación de las muestras obtenida por Ensayo Cometa	28
5	Factores de exposición asociados con Ensayo Cometa	29
6	Factores de exposición asociados con Papanicolaou	29
7	Independencia entre factores de riesgo y presencia de lesión	30
8	Sensibilidad y Especificidad de Ensayo Cometa	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Displasia " <i>in situ</i> " de células de epitelio cervical	6
2	Incidencia de cáncer cérvico uterino en el mundo	9
3	Factores de alto riesgo para cáncer cérvico uterino	12
4	Evaluación del daño celular	20
5	Calificación del daño del ADN	21
6	Diseño experimental	24
7	Edades de riesgo a CaCU	31

RESUMEN

El conocimiento de los factores de riesgo para contraer el cáncer cérvico uterino (CaCU), en la vida de la mujer, es una medida preventiva. En la actualidad el CaCU, es un problema nacional, por el alto índice de mortandad. La población femenina en edad adolescente con CaCU en la ciudad de Querétaro se ha incrementado; Actualmente el Papanicolaou, es la prueba de detección para el diagnóstico de CaCU, sin embargo, se ha reportado una frecuencia alta de falsos negativos. Considerando lo anterior y tomando en cuenta que el inicio de un cáncer está relacionado con alteraciones en el material genético, se justifica la búsqueda de metodologías como la Electroforesis unicelular "Ensayo Cometa", que evalúa daño al ADN previo a las alteraciones de morfología celular y complementa los resultados de Papanicolaou. Así, la asociación de ambas metodologías con algunos factores de exposición que intervienen en el desarrollo del CaCU ayudan a obtener medidas preventivas que reduzcan la morbilidad por este tipo de neoplasia.

Las muestras fueron obtenidas de mujeres que asistieron al Hospital de Especialidades del Niño y la Mujer y consultorios privados en la ciudad de Querétaro. El estudio de asociación se basa en el cálculo de riesgos relativos por medio de la razón de momios. Los resultados obtenidos a partir de la asociación de los factores de exposición con el "Ensayo Cometa" revelan un valor $RM= 1.63$ para multiparidad, un valor $RM= 1.25$ para fumar y un $RM= 2$ para la ingesta de bebidas alcohólicas; valores que indican a estos factores de exposición como factores de alto riesgo para contraer CaCU. A partir de la asociación de los mismos factores de exposición con la prueba de Papanicolaou, se obtuvo un valor $RM= 0.44$ para fumar y un $RM= 0.45$ para la ingesta de bebidas alcohólicas; siendo ambos valores menores al índice de nulidad. Se observó también que la mayor incidencia de CaCU se presenta en edades de 32.5 a 47.5 años de acuerdo a la asociación con Ensayo Cometa. Estos estudios indican que el Ensayo Cometa puede identificar con mayor facilidad factores de exposición como factores de alto riesgo, en comparación con la prueba de Papanicolaou, teniendo el Ensayo Cometa un valor de sensibilidad de 0.8.

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer cérvico uterino (CaCU) es la causa de 500 000 muertes al año en el mundo y de 4000 muertes al año en el país, es uno de los principales problemas de salud en mujeres mexicanas. En México, existe un Programa de Detección Oportuna de Cáncer Cervical que tiene como finalidad disminuir la morbilidad y mortalidad por este tipo de neoplasia; sin embargo, se ha demostrado que alrededor del 30% de las mujeres nunca se han realizado al menos una prueba citológica de detección, cuando lo recomendable es realizarse pruebas de manera periódica.

El CaCU, a pesar de ser una enfermedad que puede ser diagnosticada en forma temprana a través de la prueba del Papanicolaou persiste con una elevada incidencia. El Papanicolaou, constituye la principal prueba de tamizaje en la detección oportuna de CaCU, sin embargo, pese a la existencia de programas de detección oportuna de CaCU, el impacto sobre la mortalidad en nuestro país es deficiente debido a que con frecuencia se reportan falsos negativos por esta metodología y aunado a esto, en un porcentaje elevado se encuentra que la muestra no es adecuada debido a una mala toma, lo que revela la falta de preparación del personal encargado de las tomas de muestra. Diversos estudios han publicado factores de riesgo que predisponen a contraer el CaCU: vida sexual con múltiples parejas, inicio de la vida sexual antes de los 18 años, tabaquismo, multiparidad, edad de 25 a 64 años (actividad sexual), nunca haberse practicado el Papanicolaou con antecedentes de vida sexual, infección cervical por el virus del papiloma humano (VPH), raza, origen étnico y bajo nivel de escolaridad entre otros.

En la evolución del CaCU se han identificado diferentes etapas (hiperplasia, displasia, cáncer *in situ*, y metástasis), en las que se manifiestan alteraciones en la proliferación y transformación celular, originadas por daño al material genético. Es por esto que se considera importante utilizar metodologías que evalúen daño genético celular como la electroforesis unicelular Ensayo Cometa que puedan detectar estadios primarios en esta enfermedad, y cuyos resultados

complementen los del Papanicolaou. Dado que el Ensayo Cometa evalúa daño genético que se presenta en las primeras etapas de desarrollo de la enfermedad, al confrontarlo con los factores de exposición se tiene una mayor probabilidad de seleccionar aquellos que representen un alto riesgo. De esta manera, se justifica el establecimiento de la asociación de algunos factores de exposición con ambas metodologías para detectar aquellos factores que representen mayor riesgo a contraer CaCU y así contribuir en la disminución del índice de morbilidad y mortalidad por CaCU en el país, índice que en la actualidad se encuentra elevado, ubicando a México en uno de los primeros países a nivel mundial que presenta este tipo de neoplasia. Por lo tanto, es importante que la mujer, reconozca que algunos hábitos que considera inofensivos como el no realizarse citologías previas son factores de alto riesgo para contraer esta enfermedad.

II. ANTECEDENTES

II.1 Cáncer

El cáncer es una enfermedad en la que existen células que han sufrido un cambio en los mecanismos de control que regulan su capacidad de proliferación (Florez, 2000). En el Cáncer se produce un crecimiento celular incontrolado, el cual es el resultado de un defecto adquirido del ADN celular, que provoca una desregulación en el proceso de crecimiento. Existen diferentes mecanismos por los cuales el ADN de una célula normal se daña, resultando en malignidad; a este proceso se le llama carcinogénesis, y éste se puede deber a una mutación puntual, a la delección de un gen o a la traslocación de un cromosoma resultando una reordenación genética (González y González, 2000).

La carcinogénesis es un proceso que puede dividirse en tres fases tumorales que implican la iniciación, promoción y progresión; la fase iniciación tumoral involucra una mutación somática debida a un daño en el ADN, en la fase de promoción, una vez iniciada la célula, hay un crecimiento distinto del normal, pues el efecto de los promotores es estimular la división celular y la etapa de progresión es la que se caracteriza por la expansión de células progenitoras, iniciadas en la lesión, con producción y mantenimiento de una proliferación celular crónica (Disaia y Creasman, 1999). Las células cancerosas incluyen modificaciones en su forma y tamaño, cambios en su apariencia, alteraciones en la distribución de la cromatina, en la forma y en el número de cromosomas: copias en exceso de cromosomas (poliploidía), pérdida de cromosomas (aneuploidía) y cromosomas aberrantes, así como cambios bioquímicos, los cuales aparecen cuando ocurren alteraciones en los genes que no son corregidas por los mecanismos de reparación del material genético (Rojas, 2001) y generalmente se presentan en la etapa preinvasiva comprendida dentro de la fase de progresión final (Disaia y Creasman, 1999).

La fase de progresión continúa con la pérdida de la actividad supresora tumoral, por ejemplo mutaciones de *p53*, amplificación génica, invasión y metástasis (Disaia y Creasman, 1999), la cual implica que cuando la célula pierde su mecanismo de regulación, prolifera, generando una clona de células anormales que llegan a formar un tumor; dichas células pueden infiltrar en el tejido adyacente y desplazar a células normales, algunas células se desprenden del tumor y alcanzan circulación sanguínea y linfática, vías por las que pueden llegar a otros órganos y tejidos produciendo tumores secundarios (Rojas, 2001).

Los oncogenes y los genes de supresión tumoral (antioncogenes), son genes importantes en el desarrollo de un cáncer. Los oncogenes están presentes en una célula normal como proto-oncogenes y son necesarios para el crecimiento celular normal; sin embargo, una expresión incorrecta hace que la célula se vuelva cancerosa (González y González, 2000), pues las mutaciones en los oncogenes son sucesos que conllevan la ganancia de funciones y conducen a un incremento de la proliferación celular y a una disminución de su diferenciación (Disaia y Creasman, 1999). Algunos estudios revelan que la expresión del gen *bcl-2* ha mostrado conferir resistencia a la apoptosis en una variedad de tumores y que un aumento en la expresión de este gen, se relaciona con un incremento en el grado de lesión y carcinoma (Brychtová y col., 2000). Los antioncogenes, por su parte, tienen como función inhibir el crecimiento celular de células con lesiones y pueden inducir apoptosis; sin embargo, si mutan no realizarán la función para la cual están programados (González y González, 2000); así, la inactivación o delección de estos genes supresores tumorales implica la pérdida de función y promueve el crecimiento debido a la ausencia resultante de controles críticos que regulen la proliferación. Un único gen alterado puede ser capaz de avanzar hacia la completa malignización, pero el proceso entero sólo puede completarse cuando ocurren múltiples cambios sucesivos en distintos genes celulares (Disaia y Creasman, 1999).

II. 2 Cáncer cérvico uterino

El epitelio escamoso estratificado del cuello del uterino normal, se compone de varias capas denominadas basal, parabasal, intermedia y superficial. La capa basal consiste de una única hilera de células y se apoya sobre una delgada membrana basal, es la capa donde se producen las mitosis activas. Las capas parabasal e intermedia, juntas constituyen la capa de células espinosas, el grosor de la capa superficial varía dependiendo del grado de estimulación estrogénica y consiste de células aplanadas con tendencia a la acidofilia citoplásmica hacia la superficie (Disaia y Creasman, 1999).

A comienzos del siglo, algunos autores señalan la presencia de epitelio atípico y se introduce el término carcinoma *in situ* del cuello uterino. En el año de 1949, Papanicolaou propone la palabra displasia para indicar lesiones que no comprometen todo el espesor del epitelio y en las cuales quedaba cierto grado de estratificación normal (Di Paola, 1996).

Debido a que las células de la displasia cervical en la práctica eran idénticas a las células de un carcinoma se introdujo el término displasia intraepitelial cervical, NIC (Di Paola, 1996), la cual se agrupa a su vez en tres grados dependiendo la extensión de la aberración de la estratificación celular dentro del epitelio (Disaia y Creasman, 1999). El NIC I se caracteriza por células con alteraciones de su diferenciación que se encuentran en el tercio inferior del epitelio y corresponde a una displasia leve; NIC II se establece cuando las células de diferenciación alterada ocupan los dos tercios inferiores del estrato epitelial correspondiendo a una displasia moderada y NIC III se diagnostica cuando las células indiferenciadas ocupan el espesor del epitelio hasta una altura superior a dos tercios o todo el espesor. En el NIC I, el epitelio presenta un espesor constante ligeramente aumentado con arquitectura y polaridad celular similares al epitelio normal, entre las alteraciones que presenta la célula se da un aumento en la capacidad de tinción (hipercromasia) al que se asocian alteraciones en la maduración del núcleo, el cual se mantiene en un tamaño aumentado. En el NIC II, además, se encuentra un aumento del agrupamiento

nuclear con disminución del volumen citoplasmático, el espesor aumenta (Di Paola, 1996). Por último, en el NIC III el epitelio altera su espesor con mitosis típicas y atípicas aún a nivel de estratos superficiales (Disaia y Creasman, 1999). La Figura 1 ejemplifica el paso de un NIC I a carcinoma *"in situ"*, pues se ha supuesto que la lesión NIC pasa sucesivamente por sus diferentes grados I, II y III para convertirse posteriormente en un carcinoma invasivo (González y González, 2000).

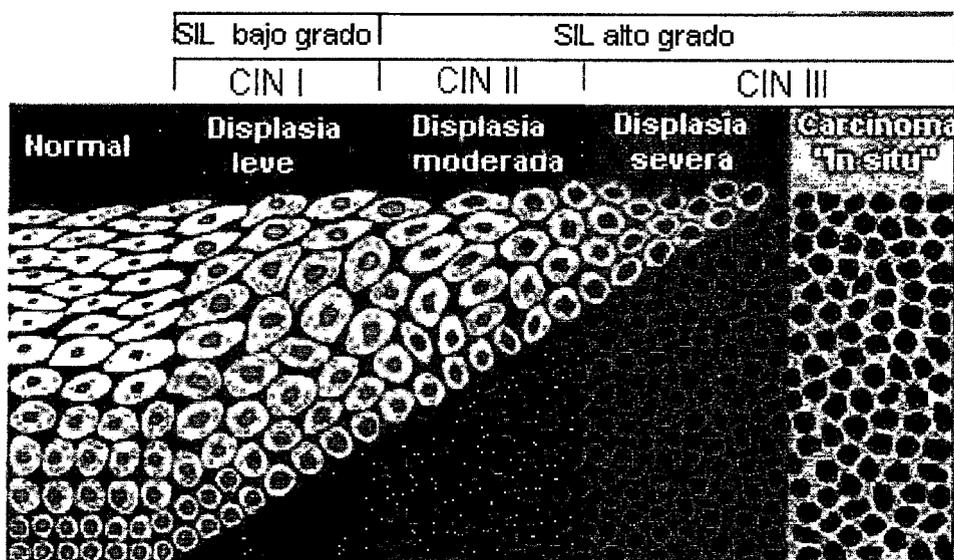


Figura 1. Displasia *"in situ"* de células de epitelio cervical

Modelos matemáticos han calculado un tiempo de 2 a 7 años para que pueda transformarse un NIC I en un NIC III y un tiempo entre 5 a 13 años para que un NIC I progrese a carcinoma invasor (González y González, 2000). El CaCU presenta diferentes etapas manifestadas por proliferación y transformación celular, originadas por un daño en el material genético (Valle, 1998) y suele crecer lentamente por un periodo de tiempo, después sus tejidos experimentan cambios y empiezan a aparecer células anormales (displasia) que son detectadas por la prueba de Papanicolaou (González y González, 2000). El CaCU, se manifiesta clínicamente por secreciones vaginales acuosas, teñidas de sangre, cuando el tumor crece, los episodios de hemorragia se hacen más frecuentes y de mayor duración (Disaia y Creasman, 1999). Las células crecen y se diseminan a las zonas más profundas en el cuello uterino (González y

González, 2000), siendo las principales vías de diseminación del CaCU hacia la mucosa vaginal, hacia los ganglios linfáticos y hacia estructuras adyacentes que puede alcanzar la pared de la pelvis, según los estadios del Cuadro 1 (Disaia y Creasman, 1999).

Cuadro 1. Estadios del Cáncer cérvico uterino

Estadio 0	Carcinoma <i>in situ</i> .
Estadio I	Carcinoma limitado al cuello uterino.
Estadio I a	Carcinoma invasivo identificado microscópicamente. Invasión con profundidad máxima de 5 mm y no más ancha de 7 mm.
Estadio I a ¹	Medida de invasión estromal no mayor a 3 mm de profundidad y no más ancha de 7 mm.
Estadio I a ²	Medida de invasión estromal de 3 - 5mm y no más ancha de 7 mm con profundidad menor a 5 mm.
Estadio I b	Lesiones clínicas limitadas al Cérvix o lesiones preclínicas mayores al estadio I a.
Estadio I b ¹	Lesiones clínicas no mayores de 4 cm de tamaño.
Estadio I b ²	Lesiones clínicas mayores de 4 cm de tamaño.
Estadio II	Afección vaginal sin llegar a las paredes laterales.
Estadio II a	Afección de la vagina sin evidencia de afectación parametrial.
Estadio II b	Afección de los parametrios sin afectación de la pared lateral.
Estadio III	Afección del tercio inferior de la vagina o extensión a la pared lateral de la pelvis.
Estadio IIIa	Afección del tercio inferior de la vagina sin llegar a la pared lateral de la pelvis.
Estadio IIIb	Extensión hacia la pared lateral de la pelvis y /o riñones.
Estadio IV	Extensión fuera de los límites del tracto reproductor.
Estadio IVa	Afección de la mucosa de la vejiga o recto.
Estadio IVb	Metástasis.

(Disaia y Creasman, 1999)

Durante el desarrollo de CaCU se presentan varios signos colposcópicos como necrosis, vasos atípicos, ulceración, epitelio acetoblanco, punteado mosaico y

queratosis. Las lesiones invasoras pueden mostrar crecimiento endofítico que conduce a ulceración o exofítico que origina una masa de forma irregular que sobresale de la superficie cervical. El cáncer cervical suele componerse de nidos de células escamosas neoplásicas que invaden el estroma subepitelial y que varían de tamaño, forma y grado de queratinización (Apgar y col., 2003). El CaCU ocupa el primer lugar de neoplasias malignas en nuestro país, es la principal causa de muertes y el segundo cáncer de mayor frecuencia en el mundo (Bekkers y col., 2004). En nuestro estado, cada 11 días se detecta un caso nuevo y muere una mujer cada 19 días por esta enfermedad (IMSS, 2002). Alrededor del 76% de los casos se diagnostican en etapas avanzadas (González y González, 2000), debido a que las mujeres no se realizan estudios citológicos o no lo hacen periódicamente, pues aproximadamente un 30% de las mujeres nunca se han sometido a una prueba de detección, siendo recomendable realizarse al menos una prueba cada tres años (SSA, 2004). La necesidad de un diagnóstico precoz es fundamental en la curación definitiva, la cual se logra fácilmente cuando el cáncer cervical es mínimo y resulta casi imposible si se ha dado tiempo al tumor para que crezca y se extienda a la pared pélvica o a las estructuras adyacentes, como la vejiga y el recto (Disaia y Creasman, 1999)

II. 3 Factores de riesgo asociados a cáncer cérvico uterino

La palabra riesgo implica la presencia de una característica o factores que aumentan la probabilidad de consecuencias adversas, constituye una medida de probabilidad estadística de que se produzca un acontecimiento no deseado (Fernández y col., 2002). Un factor de alto riesgo es cualquier característica o circunstancia detectable de una persona o grupo de personas que se sabe asociado con un aumento en la probabilidad de padecer, desarrollar o estar especialmente expuesto a un proceso mórbido; estos factores se pueden presentar aislados o en conjunto pueden producir un fenómeno de integración.

A pesar del desconocimiento de la etiología del CaCU, diversas investigaciones se han dedicado al estudio de factores de riesgo que predisponen a contraer

esta enfermedad (Cuevas y col., 2003), pues su desarrollo parece relacionarse con lesiones múltiples sufridas por el cuello uterino. La frecuencia de este tipo de neoplasias en las zonas subdesarrolladas de todo el mundo es mayor, implicando una desnutrición asociada a CaCU, hecho que se hace evidente al encontrar niveles inferiores de ácido fólico, betacarotenos y vitamina C plasmáticos medidos en pacientes con cáncer (Disaia y Creasman, 1999).

La Figura 2, muestra la incidencia de CaCU en el mundo, siendo México un país que ocupa uno de los primeros lugares del mundo con mayor índice de muertes, pues se reportan 12 casos de muerte por día, es decir, una muerte cada dos horas (Cuevas y col., 2003); y se observa en estudios reportados que la incidencia de CaCU es mayor en mujeres menores de 50 años (Serman, 2002), al igual que en mujeres blancas y México-americanas (Disaia y Creasman, 1999).

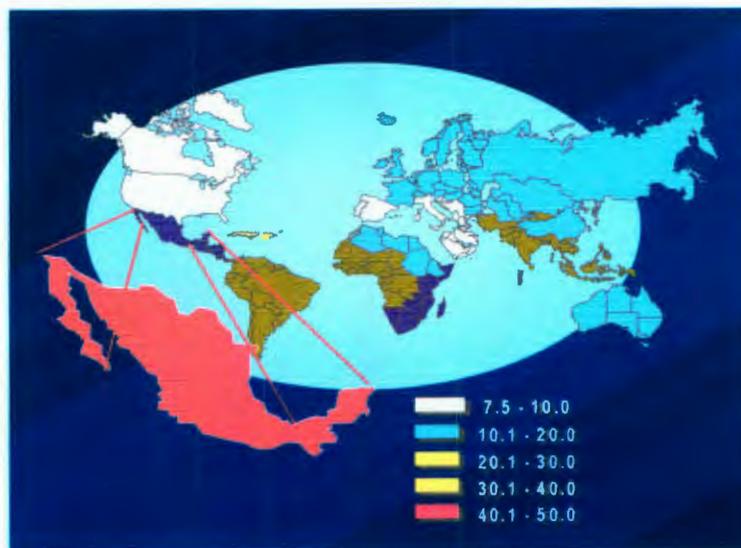


Figura 2. Incidencia de Cáncer Cérvico Uterino en el mundo.

La carga viral ayuda a predecir el riesgo de NIC, pues en un estudio realizado en Sao Paulo se obtuvo que cuando incrementa la carga viral aumenta el riesgo de incidencia de las lesiones cervicales, por lo que la medición de la carga viral puede identificar a mujeres de alto riesgo a desarrollar CaCU (Schelecht y col., 2003). El VPH, es un virus que produce una lesión plana y blanquecina identificada mediante colposcopia, que se considera precursora a la neoplasia

cervical (Disaia y Creasman, 1999); Los tipos conocidos como de bajo riesgo (6,11) se asocian a lesiones benignas como los condilomas, que raramente malignizan. Los tipos de alto riesgo (16, 18) se detectan en cánceres intraepiteliales e invasores (González y González, 2000) y si se detecta la presencia de dichos tipos en un caso de NIC leve, existe mayor probabilidad de progresión hacia un NIC más significativo o incluso a cáncer invasor.

El fumar es otro factor considerado de riesgo por varios autores (Apgar y col., 2003). Se ha demostrado que las mujeres portadoras de infección por VPH y fumadoras, tienen mayor riesgo de desarrollar un carcinoma cervical en comparación con mujeres portadoras de VPH que no fuman (Di Paola, 1996). Los componentes del humo del cigarrillo se transmiten de la sangre a los tejidos, reportándose casos en los que se encontraron estos elementos en el moco cervical de fumadoras, algunos a concentraciones muy superiores a las sanguíneas (Disaia y Creasman, 1999), por lo que el cuello del útero puede estar sometido a los efectos mutagénicos y cancerígenos de los componentes del humo del tabaco. El humo del cigarrillo está asociado a una depleción numérica de las células de Langerhans en el epitelio cervical, aunque no se sabe cuál es el componente que lo origina (Di Paola, 1996). Un estudio reciente evaluó el efecto del tabaco sobre el ADN en el epitelio cervical, mostrando que las fumadoras tenían un nivel mayor de aductos de ADN que las no fumadoras y que las mujeres con una mayor proporción de aductos son más susceptibles al CaCU (Disaia y Creasman, 1999).

La ingesta de bebidas alcohólicas se cree está relacionada con diversos tipos de cáncer, se han realizado algunos estudios en los que no se ha encontrado diferencia significativa al asociarlo con cáncer de mama y se propone ampliar el estudio aumentando la ingesta de bebida (Alvir y col., 1999). Se sabe que el efecto genotóxico de las bebidas alcohólicas se debe al metabolismo que sufre el etanol en el organismo, al ser convertido a acetaldehído, pues se ha determinado que incrementa la frecuencia de aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos (Velázquez y col., 1989). Con respecto al cáncer cérvico uterino se presupone una asociación, sin embargo, no hay evidencia suficiente

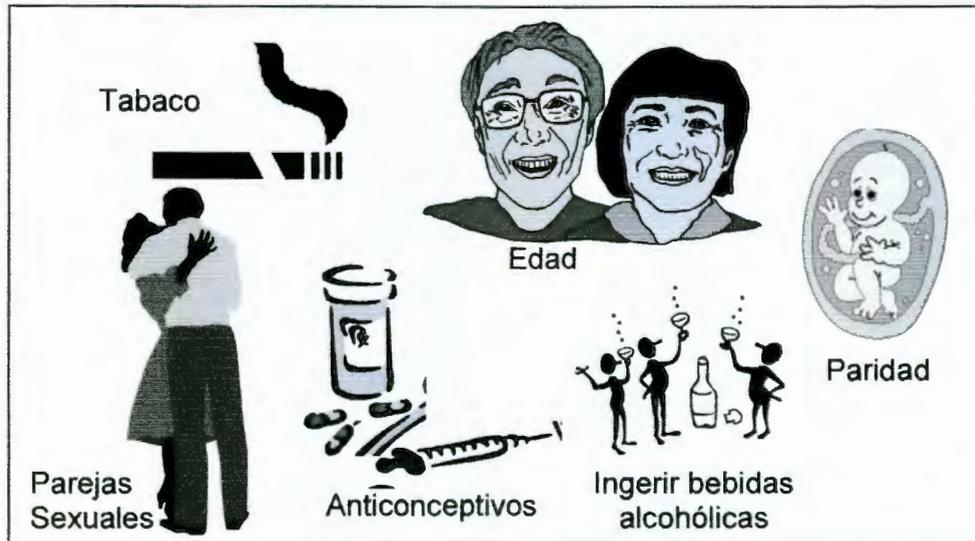


Figura 3. Factores de alto riesgo para cáncer cérvico uterino

La falta de conciencia por parte de las mujeres para asistir a una revisión periódica, así como el tiempo que pasa para la entrega de resultados de la evaluación citológica, son considerados factores de riesgo, pues el retraso en dicha entrega, es un factor que desafortunadamente acompaña al Servicio Público de Salud (Hernández y col., 2002). Otros factores considerados como factores de riesgo son la raza y origen étnico (Lazcano y col., 1993). También algunos estudios han sugerido que el CaCU es más frecuente entre las mujeres que consumen anticonceptivos orales; sin embargo, estos estudios pueden verse influidos por factores de confusión, como pueden ser el inicio precoz de la actividad sexual e historia previa de enfermedades de transmisión sexual, como lo son infecciones por espiroquetas, tricomonas (Disaia y Creasman, 1999) o infecciones por *Chlamydia* (Porterfield y col., 2003). Algunos casos de CaCU explican factores del huésped que predisponen a esta enfermedad, como lo son la genética, o una posible interacción entre trauma cervical, inmunosupresión y deficiencias nutricionales (Hernández y col., 1997)

II. 4 Estudios citológicos

Hay pruebas que demuestran que los programas de detección selectiva citológica permiten reducir de forma eficaz la mortalidad debida al carcinoma del cuello uterino (Disaia y Creasman, 1999)

El impacto del cáncer cérvico uterino se reduce a través de un examen vaginal, entre otras medidas preventivas (Hermida y col., 1994). El Papanicolaou, es una de las técnicas que en la actualidad dispone la medicina para el diagnóstico oportuno del CaCU, es una prueba citológica de tamiz que evalúa las características morfológicas de las células de descamación del epitelio y en base a ello dictamina la presencia y tipo de lesiones, así como la valoración estrogénica de la paciente y las condiciones microbiológicas de ésta (Lazcano y col., 1996). Se ha demostrado la utilidad de esta prueba en la reducción de la incidencia y la mortalidad por CaCU, dada su capacidad de detectar carcinomas y lesiones precursoras (Porterfield y col., 2003).

Una de las principales limitantes de esta prueba es la deficiencia en la calidad de la toma de muestras en instituciones tanto públicas como privadas (Lazcano y col., 1996), pues las muestras en Papanicolaou deben tomarse de la zona de transformación del cérvix, zona en la que aparentemente se originan la mayor parte de lesiones (Disaia y Creasman, 1999). El índice de calidad de obtención de las muestras de Papanicolaou evalúa el posible muestreo de la zona de transformación, zona donde inicia el proceso de carcinogénesis a nivel cervical, y reporta una mala calidad cuando los especímenes presentan ausencia de células endocervicales y metaplasia epidermoide (Lazcano y col., 1996); por lo que la mala toma de muestra se considera un factor relacionado con la existencia de un índice elevado de falsos negativos entre los frotis de Papanicolaou, pues diversos estudios han demostrado que un número significativo de pacientes son diagnosticadas de carcinoma invasor del cuello uterino tras un periodo relativamente breve después de un frotis de Papanicolaou informado como normal (Disaia y Creasman, 1999).

Estudios demográficos sugieren que el 9% de las mujeres mayores de 18 años nunca se han realizado un frotis, pues se tiene un desconocimiento en la importancia de la detección selectiva por la prueba del Papanicolaou (Disaia y Creasman, 1999). Las pruebas citológicas son útiles en la comparación de la prevalencia de infecciones de VPH en el tracto genital, por lo que fueron utilizadas en personas seropositivas y seronegativas para examinar la relación del ADN de VPH con lesiones NIC (Eckert y col., 1999).

Las mujeres que son poco colaboradoras con el programa de detección selectiva justifican su falta de colaboración por no considerarlo necesario, por la falta de recomendación del médico o por el costo; por lo que se evidencia la falta de esfuerzo educativo por parte del personal sanitario (Disaia y Creasman, 1999). Estudios realizados sugieren que se pueden prolongar los intervalos entre las pruebas de Papanicolaou a 3 años en mujeres de bajo riesgo con pruebas negativas anteriores según el modelo de Markov, el cual calcula la tasa en la que la displasia evoluciona a CaCU, pero que mujeres de alto riesgo o que no se han sometido a las pruebas, el periodo entre cada chequeo debería reducirse (Porterfield y col., 2003).

II.5 Electroforesis unicelular

La electroforesis unicelular, comúnmente llamada Ensayo Cometa, es una metodología que permite evaluar daño al material genético en cadenas rotas tanto sencillas como dobles (Verschaeve y Van Gorp, 2000). El Ensayo Cometa es una técnica introducida por Östling y Johanson en 1984 mediante un experimento que consistió en irradiar células suspendidas en una capa delgada de agarosa sobre un portaobjetos sometiéndolas a lisis, electroforesis y finalmente su tinción con un colorante fluorescente (Hartmann y col., 2003). La técnica se fundamenta en un campo eléctrico que impulsa el ADN cargado, los fragmentos rotos de ADN migran hacia al ánodo, observando que la cantidad de ADN liberado desde la cabeza del cometa durante la electroforesis está en función del daño (Klaude y col., 1995). Es así, que el mecanismo sugerido para el Ensayo Cometa que permite detectar daños al ADN (Östling y Johanson,

1984), lábiles a pH alcalino (Verschaeve y Van Gorp, 2000), se basa en la observación de la organización en estructuras superhelicoidales por un relajamiento del ADN en el momento en que sufre una ruptura, ocasionando un alargamiento cuando se somete a un campo eléctrico. Esto indica que cada nucleóide consiste de fragmentos que migran en el gel de agarosa más rápido que el ADN intacto, por lo que a mayor cantidad de daño se observa mayor longitud en las colas de los cometas (Östling y Johanson, 1984).

En 1988 Singh realiza modificaciones a la técnica, utiliza una electroforesis alcalina para analizar el daño al ADN provocado por un tratamiento con rayos X o H₂O₂ que han permitido aumentar la sensibilidad del ensayo. El Ensayo Cometa ha permitido correlacionar el daño al ADN de las células de epitelio cervical y de leucocitos de sangre periférica en pacientes con lesiones precancerosas en cérvix, esto en la versión alcalina de la metodología (Jaiswal y col., 1994). El empleo del Ensayo Cometa resulta ser un biomarcador útil para evaluar el daño al ADN por exposición a agentes mutagénicos cuando se monitorean sucesivas exposiciones con un aumento de la dosis, pero menos efectiva cuando se siguen exposiciones acumuladas (Vaghef y col., 1997). Esferoides multicelulares son expuestos a daño al ADN por agentes con el fin de determinar si el daño al ADN puede predecir la muerte celular y la resistencia a fármacos, siendo el promedio de la medida del daño al ADN utilizando el Ensayo Cometa, el que correlaciona con la muerte celular, pues es un método efectivo y cuantitativo para predecir la citotoxicidad en sistemas multicelulares complejos (Olive y Banáth, 1997). Otros estudios realizados mediante el Ensayo Cometa, revelan que linfocitos en fase G₀ a los cuales se les han aplicado mutágenos, presentan una mayor cantidad de ADN dañado que las células que fueron utilizadas como control (Kopjar y Garaj-Vrhovac, 2000).

En la actualidad, el ensayo se ha utilizado en la evaluación de líneas celulares de CaCU, así como en líneas celulares a las que se les inducen rupturas en el ADN por rayos X (Banáth y col., 2004).

El Ensayo Cometa es una metodología aplicable en células individuales, útil en la investigación de la genotoxicidad de químicos industriales, agroquímicos y

químicos farmacéuticos. Los pasos para su realización consisten, en la preparación de las camas de agarosa, lisis de las células para extraer el ADN, 20 minutos de electroforesis, tiempo óptimo para detectar los sitios lábiles en el ADN, neutralización, y en algunas ocasiones el secado de la laminilla con alcohol (Hartmann y col., 2003)

Las ventajas que presenta el Ensayo Cometa sobre otras técnicas de evaluación de daño al ADN, como el intercambio de cromátidas hermanas o la técnica de micronúcleos, son el requerir de células viables pero no en crecimiento, el ser aplicable a cualquier célula eucariota, además, se puede usar *in vivo* como en células procedentes de cultivo, es rápida y nos permite evaluar la reparación al ADN (Prieto y Llópiz, 1999), otra de las ventajas es que 50 lecturas de nucleoides, son representativas (Hartmann y col., 2003). Debido a que el CaCU inicia por el daño al material genético, el Ensayo Cometa es capaz de establecer niveles de daño celular (Prieto y Llópiz, 1999), siendo esto, una ventaja ante Papanicolaou. Además, el Ensayo Cometa puede participar a gran escala en la búsqueda de grados de displasia cervical y lesiones precancerosas y cancerosas, como método de detección temprana a CaCU (Gandhi y Singh, 2000).

III. HIPÓTESIS

Los factores de exposición en asociación con el Ensayo Cometa permiten valorar los factores de alto riesgo involucrados en la prevención de cáncer cérvico uterino.

IV. OBJETIVOS

IV. 1 General

Determinar los factores de alto riesgo para la prevención de cáncer cérvico uterino en un grupo de mujeres.

IV. 2 Específicos

- Conocer los diferentes hábitos de las pacientes sometidas a estudio para establecer los factores de exposición para CaCU.
- Asociar algunos factores de exposición de este grupo de estudio con la evaluación de daño al ADN (electroforesis unicelular).
- Asociar algunos factores de exposición de este grupo de estudio con los resultados de Papanicolaou.
- Comparar entre los factores de riesgo obtenidos para cada metodología y establecer aquellos de alto riesgo para el grupo de mujeres estudiado.

V. METODOLOGÍA

V.1 Métodos

V.1.1 Llenado del cuestionario

A la paciente se le dio una breve información sobre el presente estudio y una vez que manifestó su consentimiento informado se le concientizó de la importancia de contestar con honestidad cada una de las preguntas del cuestionario (Anexo 1)

V.1.2 Obtención de muestras

Las muestras se obtuvieron de mujeres que asistían a su revisión de rutina tanto en el Hospital del Niño y la Mujer, así como en los consultorios particulares que aceptaron participar en este estudio. El grupo control estuvo compuesto por muestras que tenían resultado Papanicolaou negativo (n= 24); mientras que el grupo problema fue de muestras que presentaron algún grado de lesión diagnosticada como Papanicolaou positivo (n= 36).

V.1.3 Electroforesis unicelular

El Ensayo Cometa es una técnica que involucra siete etapas: obtención de las células del epitelio cervical, viabilidad de las células, preparación de las camas de agarosa, lisis, electroforesis, tinción de las preparaciones y evaluación del daño al ADN. El proceso de las muestras se realizó utilizando la técnica descrita por Barrera (2003) de electroforesis en células epiteliales de cuello cervicouterino.

Las muestras se tomaron con un cytobrush recibiendo en buffer de fosfatos a pH 7.4 y se lavaron por tres veces con 1ml de la misma solución manteniéndose en refrigeración. A la muestra se le contó su viabilidad con la técnica de azul de tripano (Vaghef y col., 1997). Las camas de agarosa se prepararon con 75 μ L de agarosa de punto normal de fusión al 0.5% sobre un portaobjetos; una vez fijada la agarosa se agregaron 75 μ L de una suspensión celular mezclada con agarosa de bajo punto de fusión (0.1%), después de solidificarse se agregaron 75 μ L de

agarosa de bajo punto de fusión y se enfriaron por 5 min. Una vez solidificadas las capas se sometieron a lisis en una solución (NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM, trisma 0.1 mM, triron 100X y DMSO 0.1 ml ajustar a pH de 10) fría durante 23 horas. Pasado el tiempo de lisis, se llevó a cabo la desnaturalización, en la que los portaobjetos se colocaron en la cámara de electroforesis que se llenó con el buffer (EDTA 200 mM, NaOH 10 N ajustar a un pH de 13) hasta que se cubrieron las preparaciones y se dejaron ahí por 20 min protegidos de la luz. Se encendió la fuente de poder a 25 V, 300 mA y se corrió la electroforesis por 20 min. Una vez concluida la electroforesis, los preparaciones se lavaron con un buffer de neutralización (Tris 0.4 M pH de 7,5) 3 veces por 5 minutos cada lavado, los portaobjetos al final se fijaron con metanol por 5 minutos. Las preparaciones se colocaron a 4°C para su resguardo antes de realizar la lectura. Para realizar la lectura, a los portaobjetos se les añadió 60 µL de colorante bromuro de etidio, limpiando el exceso de colorante de la preparación, la cual se leyó en un microscopio de fluorescencia con un filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro de barrido de 590 nm, usando el objetivo de 40X. La evaluación del daño al ADN se realizó como lo muestra la Figura 4, en la que se midió la longitud de la cola (x) y la del diámetro (y) del cometa.

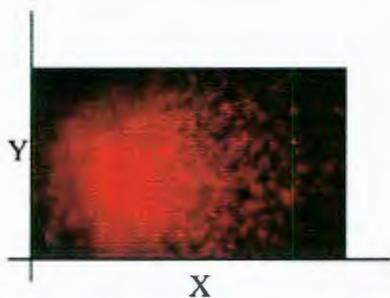


Figura 4. Evaluación del daño celular

V.1.3.1 Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico, de cada paciente se midieron 50 nucleoides y de cada nucleoide se obtuvo la relación de la longitud x/y , de igual manera, se obtuvo la media y su desviación estándar. Las frecuencias de las relaciones x/y sirvieron para calificar el daño al ADN como lo describe Trevigen (1999), que es indicativo del daño nuclear y el cual se observa en la Figura 5.

Calificación	Imagen observada
0	
1	
2	
3	
4	

Figura 5. Calificación del daño del ADN

V.1.4 Evaluación de Riesgos Relativos

La Evaluación de riesgos relativos se realizó determinando la razón de momios (RM) en base al programa estadístico SPSS versión 10.0, en el cual se registraron los datos extraídos de los cuestionarios aplicados a las pacientes.

V.1.4.1 Revisión del cuestionario

Se recogieron los cuestionarios (anexo 1) aplicados a las pacientes cuyas muestras se evaluaron por el Ensayo Cometa. De dichos cuestionarios, se seleccionaron los factores a los que las pacientes se encontraban expuestas que pudieran influir en el desarrollo de cáncer cérvico uterino.

V.1.4.2 Asociación de factores de exposición

La calificación obtenida para cada muestra, a partir de la evaluación por el Ensayo Cometa (Trevigen, 1999), se asoció con cada uno de los factores de exposición reportados que fueron seleccionados; de igual manera, estos factores de exposición se asociaron con los resultados de Papanicolaou de las mismas muestras.

V.1.4.3 Cálculo de la Proporción RM

La asociación de los factores de exposición con ambas metodologías (Ensayo Cometa y Papanicolaou), se realizó a partir de la elaboración de tablas tetracóricas, para obtener la razón de momios (RM), la cual se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$RM = ad / bc$$

El Cuadro 2 representa una tabla tetracórica, en la que se relaciona la presencia o ausencia de daño celular con la exposición a un factor.

Cuadro 2. Tabla tetracórica

VARIABLE INDEPENDIENTE (Causa)	VARIABLE DEPENDIENTE		
	Daño celular	Sin Daño celular	Total
Exposición a un factor	a	b	a+b
Sin exposición al factor	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	a+b+c+d

(Fernández y col., 2002)

Donde:

a = muestras expuestas a un factor, que presentan daño celular.

b = muestras expuestas al mismo factor que "a", que no presentan daño celular.

c = muestras que presentan daño celular que no se expusieron a un factor.

d = muestras que no presentan daño celular y que no se expusieron a un factor.

V.1.4.4 Obtención de factores de alto riesgo

Los factores de alto riesgo se determinan a partir de una escala para el valor de la proporción RM, en la que el valor de 1 significa un valor de nulidad, un valor de 0 indica un factor de protección y un valor superior a 1 que tienda a infinito positivo indica un factor de alto riesgo.

V.2 Diseño Experimental

La Figura 6, esquematiza la ruta seguida durante el experimento.

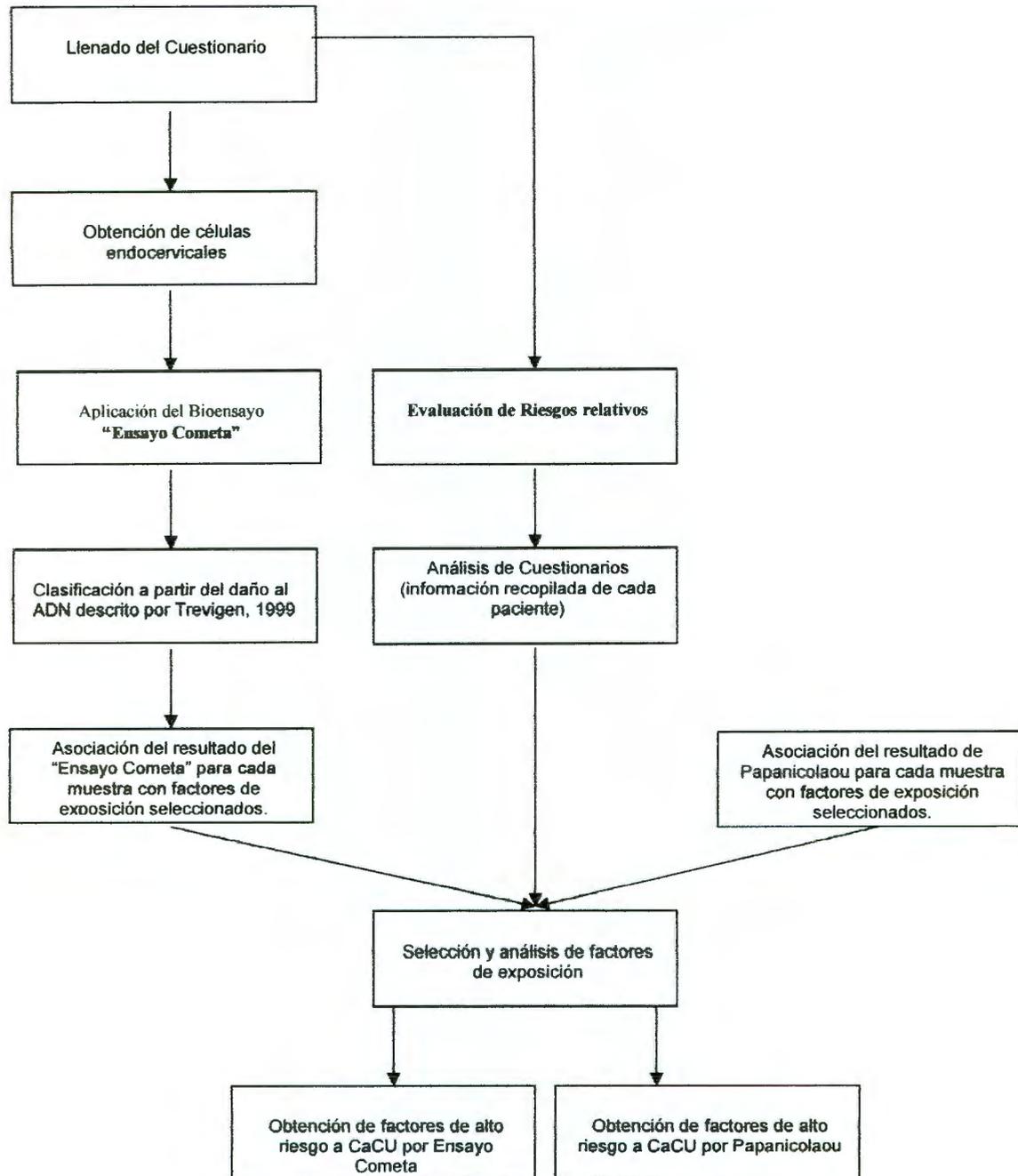


Figura 6. Diseño experimental

VI. RESULTADOS

El estudio se realizó con mujeres que asistieron a su chequeo de rutina al Hospital del Niño y la Mujer y con mujeres que asistieron a consultorios privados en la ciudad de Querétaro, Qro. De las 60 muestras obtenidas, 24 corresponden a resultados Papanicolaou negativos, mientras que 36 muestras corresponden a resultados Papanicolaou positivos según se observa en el Cuadro 3.

Las muestras recibidas clasificadas como negativas, NIC I, NIC II y NIC III según Papanicolaou, se agruparon en muestras negativas y muestras positivas (NIC I, NIC II y NIC III) a cáncer cérvico uterino (Cuadro 3).

Las muestras se sometieron al Ensayo Cometa una vez procesadas, se les determinó la longitud (x) y el diámetro (y) del cometa y de cada muestra se obtuvo la media y desviación estándar para otorgarles su calificación correspondiente, según Trevigen (1999). Las muestras se reclasificaron en base a la presencia o ausencia de daño celular, es decir, las muestras con calificación 0 conformaron el grupo de muestras negativas y las muestras con daño 1, 2, 3 y 4 integraron el grupo de muestras positivas según el resultado del Ensayo Cometa, como se muestra en el Cuadro 4.

El análisis de la información registrada en los cuestionarios correspondientes a cada muestra permitió extraer los factores a los que nuestra población de estudio estaba expuesta, dichos factores se asociaron con los resultados reportados por la prueba de Papanicolaou y con los resultados obtenidos mediante el Ensayo Cometa. La asociación se realizó mediante la elaboración de tablas tetracóricas, tanto para Ensayo Cometa como para Papanicolaou, confrontando la presencia o ausencia del factor de exposición con un resultado positivo o negativo reportado por cada una de las metodologías; en el Cuadro 5, se reportan los valores RM obtenidos para cada factor de exposición a partir de la asociación con el Ensayo Cometa, mientras que el Cuadro 6, muestra los valores RM a partir de la asociación con el Papanicolaou, destacando la presencia de factores de riesgo para nuestra población de estudio.

Una vez obtenidos los factores de alto riesgo, se procedió a establecer una asociación entre ellos para indicar su independencia en relación a la presencia de lesiones precursoras de cáncer cérvico uterino, las asociaciones se muestran en el Cuadro 7.

Otros factores que se consideraron fueron la edad, el inicio de su vida sexual y la edad a la que presentaron su menarca; La Figura 7 muestra la distribución de las edades de nuestra población de estudio, reflejando el rango de edades a la que la frecuencia aumenta tanto para el Ensayo Cometa como para Papanicolaou.

El Cuadro 8 muestra los valores de sensibilidad y especificidad para la prueba de Ensayo Cometa, los cuales fueron evaluados tomando como diagnóstico verdadero el resultado de la Prueba de Papanicolaou, al igual que los valores de sensibilidad y especificidad para la Prueba de Papanicolaou, considerando los resultados obtenidos por Ensayo Cometa, como los resultados verdaderos.

Cuadro 3. Calificación de las muestras según Papanicolaou.

Muestra	Papanicolaou
U20	Negativo (NEG)
UP70	Negativo (NEG)
UP74	Negativo (NEG)
UP78	Negativo (NEG)
UP82	Negativo (NEG)
UP86	Negativo (NEG)
M1	Positivo (NIC III)
M2	Positivo (NIC I)
M5	Positivo (NIC I)
M6	Positivo (NIC I)
M8	Positivo (NIC I)
M9	Positivo (NIC II)
M10	Positivo (NIC II)
M11	Positivo (NIC I)
M12	Positivo (NIC I)
M13	Positivo (NIC I)
M14	Positivo (NIC I)
M16	Positivo (NIC II)
M17	Positivo (NIC II)
M18	Positivo (NIC I)
M24	Positivo (NIC I)
M25	Positivo (NIC III)
M27	Positivo (NIC III)
M29	Positivo (NIC II)
M31	Positivo (NIC I)
M33	Positivo (NIC I)
M34	Positivo (NIC II)
M35	Positivo (NIC II)
M36	Positivo (NIC III)
M37	Positivo (NIC I)

Muestra	Papanicolaou
M38	Positivo (NIC I)
M47	Positivo (NIC III)
M48	Positivo (NIC I)
M49	Positivo (NIC I)
M51	Negativo (NEG)
M52	Negativo (NEG)
M57	Negativo (NEG)
M58	Negativo (NEG)
M60	Negativo (NEG)
M61	Negativo (NEG)
M62	Negativo (NEG)
M65	Negativo (NEG)
M67	Negativo (NEG)
M68	Negativo (NEG)
M72	Positivo (NIC III)
M75	Positivo (NIC III)
M80	Positivo (NIC II)
M81	Positivo (NIC II)
M82	Positivo (NIC II)
M83	Positivo (NIC III)
M86	Negativo (NEG)
M91	Positivo (NIC II)
M92	Positivo (NIC III)
M102	Negativo (NEG)
M104	Negativo (NEG)
M105	Negativo (NEG)
M106	Negativo (NEG)
M117	Negativo (NEG)
M121	Negativo (NEG)
M123	Negativo (NEG)

Cuadro 4. Calificación de las muestras obtenida por Ensayo Cometa.

Muestra	Ensayo Cometa
U20	Negativo (0)
UP70	Negativo (0)
UP74	Positivo (1)
UP78	Negativo (0)
UP82	Positivo (1)
UP86	Negativo (0)
M1	Negativo (0)
M2	Negativo (0)
M5	Negativo (0)
M6	Negativo (0)
M8	Negativo (0)
M9	Positivo (2)
M10	Positivo (2)
M11	Positivo (1)
M12	Positivo (2)
M13	Positivo (1)
M14	Positivo (2)
M16	Positivo (2)
M17	Positivo (1)
M18	Negativo (0)
M24	Positivo (4)
M25	Positivo (2)
M27	Positivo (4)
M29	Positivo (4)
M31	Positivo (1)
M33	Positivo (3)
M34	Positivo (1)
M35	Positivo (2)
M36	Positivo (4)
M37	Positivo (3)

Muestra	Ensayo Cometa
M38	Positivo (3)
M47	Positivo (3)
M48	Positivo (2)
M49	Positivo (1)
M51	Positivo (3)
M52	Positivo (4)
M57	Positivo (3)
M58	Positivo (2)
M60	Positivo (3)
M61	Positivo (4)
M62	Positivo (4)
M65	Positivo (3)
M67	Positivo (3)
M68	Positivo (1)
M72	Positivo (4)
M75	Positivo (4)
M80	Positivo (4)
M81	Positivo (4)
M82	Positivo (3)
M83	Positivo (3)
M86	Positivo (2)
M91	Positivo (3)
M92	Positivo (2)
M102	Positivo (3)
M104	Positivo (1)
M105	Positivo (3)
M106	Positivo (3)
M117	Positivo (4)
M121	Positivo (4)
M123	Negativo (0)

Cuadro 5. Factores de exposición asociados con Ensayo Cometa

Factor de Exposición	Valor RM
Múltiples parejas sexuales	0.65
Multiparidad	1.63 *
Fumar	1.25 *
Ingerir bebidas alcohólicas	2.0 *
No realizarse citologías previas	0.1
Abortos	0.68
Menarca después de los 14 años	1.5 *
Inicio de vida sexual antes de 16	1.01 *

* Factores de riesgo >1

Cuadro 6. Factores de exposición asociados con Papanicolaou

Factor de Exposición	Valor RM
Múltiples parejas sexuales	0.38
Multiparidad	10.5 *
Fumar	0.44
Ingerir bebidas alcohólicas	0.45
Enfermedad de transmisión sexual	0.41
Presencia de VPH	0.65
No realizarse colposcopias previas	6.67 *
No realizarse citologías previas	0.41
Abortos	0.56
Menarca después de los 14 años	0.75
Inicio de vida sexual antes de 16 años	1.41 *

* Factores de riesgo >1

Cuadro 7. Independencia entre factores de riesgo y presencia de lesión

Factor de alto riesgo	Factor de alto riesgo	χ^2
Ausencia de Colposcopia previa	Ausencia de Papanicolaou previo	7.234 *
Enfermedad de transmisión sexual	VPH	13.71 *
Enfermedad de transmisión sexual	Abortos	0.35
Enfermedad de transmisión sexual	Fumar	0.2
Enfermedad de transmisión sexual	Multiparidad	0.47
Enfermedad de transmisión sexual	Ingerir bebidas alcohólicas	0.52
Enfermedad de transmisión sexual	Múltiples parejas sexuales	0.68
Ingerir bebidas alcohólicas	Fumar	3.703 *
Ingerir bebidas alcohólicas	VPH	0.52
Ingerir bebidas alcohólicas	Abortos	0.2
Ingerir bebidas alcohólicas	Multiparidad	3.81 *
Ingerir bebidas alcohólicas	Múltiples parejas sexuales	0.22
Múltiples parejas sexuales	VPH	0.01
Múltiples parejas sexuales	Abortos	0.2
Múltiples parejas sexuales	Fumar	0.51
Multiparidad	Abortos	1.156
Multiparidad	VPH	0.9
Multiparidad	Fumar	8.9 *
Multiparidad	Múltiples parejas sexuales	2.74*

* Factores que en asociación elevan el riesgo a CaCU con valor $\chi^2 > \alpha$
 $\chi^2_{(0.1,1)}=2.70$

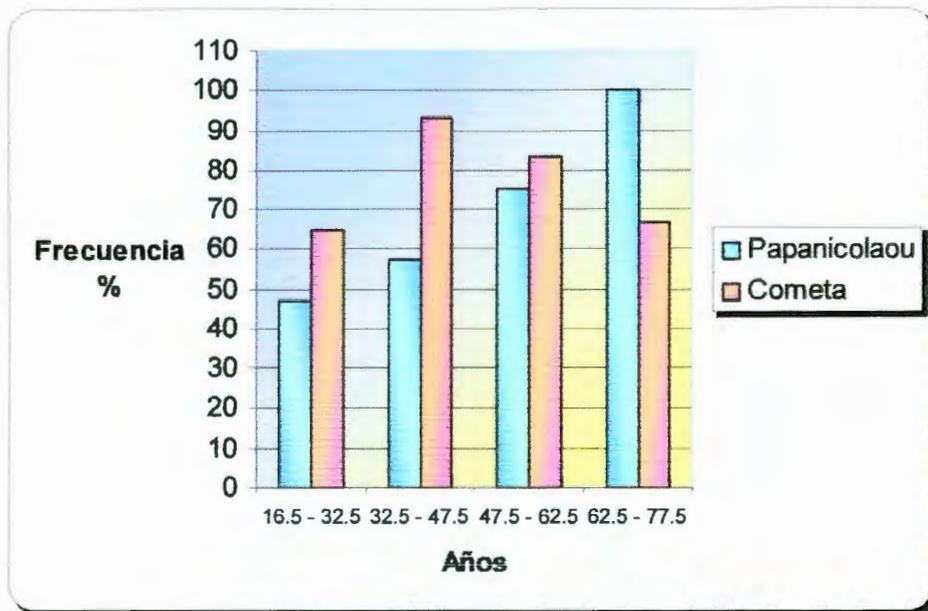


Figura 7. Edades de riesgo a CaCU

Cuadro 8. Sensibilidad y Especificidad de Ensayo Cometa

Metodología	Parámetro	Valor
Ensayo Cometa	Sensibilidad	0.83
	Especificidad	0.21

VII. DISCUSIÓN

El cáncer cérvico uterino, es considerado una enfermedad multifactorial producto de un conjunto de diversos factores, tanto psicológicos como socioculturales y biológicos (Montiel y Urquidi, 1998), que se desarrolla en el epitelio cervical, el cual es un epitelio plano escamoso compuesto por cuatro estratos, basal, parabasal, intermedio y superficial (Apgar y col., 2003). Las células escamosas observadas en una muestra citológica corresponden en su mayoría a células superficiales, aunque también se pueden observar de las capas más profundas. La prueba de Papanicolaou es empleada habitualmente en México para el estudio de lesiones escamosas preinvasoras del cérvix, pues identifica células tumorales en el flujo vaginal de mujeres con cáncer cervical (Lázaro y col., 2000), de esta manera, en un proceso de carcinogénesis se observan células con cambios nucleares que corresponden a cierto grado de displasia, las células que corresponden a la NIC I (lesión intraepitelial de bajo grado) son células con un núcleo en tamaño aumentado y halo perinuclear en el citoplasma, en un NIC II las células indiferenciadas ocupan dos tercios del estrato epitelial y en el NIC III o lesión intraepitelial de alto grado (Clasificación Bethesda) las células ocupan más de dos tercios del espesor (Flores, 1997); De esta manera se establece el diagnóstico de las muestras recibidas, según los resultados que se muestran en el Cuadro 3.

En el Cuadro 4 se observa la calificación de las muestras de estudio asignada por el Ensayo Cometa en base al cálculo de la relación longitud /diámetro de los cometas formados en la electroforesis por la diferencia en la velocidad a la que migran los fragmentos de ADN dañado hacia el ánodo pues son éstos los que forman la cauda del cometa (Östling y Johanson, 1984). Una vez obtenida dicha relación, se procede a establecer el nivel de daño celular (Trevigen, 1999), el cual se basó en los rangos calculados a partir del daño obtenido en las muestras calificadas como NIC I, NIC II y NIC III por la prueba de Papanicolaou.

La asociación de multiparidad con los resultados de Papanicolaou y del Ensayo Cometa la coloca como un factor de riesgo para nuestra población de estudio,

según lo muestra el cuadro 5, y 6; pues a mayor número de partos, el riesgo incrementa (Castañeda y col., 1998), debido a que el daño está asociado con el traumatismo ocasionado en cada parto vaginal por maniobras cervicales o postparto, pues durante un parto vaginal se producen laceraciones cervicales (Rodríguez y col., 1999); al igual que el traumatismo, la presencia excesiva de secreción cervical o las alteraciones del pH que faciliten la invasión de bacterias (Mondragón, 2000) originan una frecuente inflamación del cérvix (cervicitis) en más de un 60% de las mujeres multíparas, pues la multiparidad es un factor directamente asociado con el estado de embarazo, en el que se presenta una inmunosupresión en que la mujer se encuentra más expuesta a agentes infecciosos (Castañeda y col., 1998). Por lo tanto, la multiparidad es un factor que conlleva a la irritación mecánica e inflamación crónica del tejido, así como involucra cambios en el pH y la modificación en el equilibrio de hormonas sexuales; estos fenómenos de manera normal inducen metaplasia, la cual es la transformación que ocurre cuando un tipo de célula cilíndrica secretoria madura se transforma en un segundo tipo de célula escamosa; sin embargo la metaplasia involucra un alto potencial neoplásico (Apgar y col., 2003). El proceso comienza en las células subcilíndricas de reserva, a medida que proliferan y se diferencian aumentan las citoqueratinas que normalmente se observan en las células escamosas maduras, pero en células metaplásicas que tienen el potencial de tornarse displásicas, predominan otras citoqueratinas (6 y 16) diferentes a las presentes en una célula normal (Mondragón, 2000).

Otro factor identificado como de alto riesgo a partir de la asociación con Ensayo Cometa y Papanicolaou es el fumar, resultado que apoya a varios autores que anteriormente lo han descrito (Apgar y col., 2003), y que se muestra en los cuadros 5 y 6; pues además de estar asociado a otros tipos de cáncer como el de pulmón o laringe, los componentes del humo del cigarrillo se transmiten a través de la sangre a los órganos y tejidos distantes, de manera que el cuello uterino está sometido en forma local a los efectos mutagénicos y cancerígenos de los componentes del humo del tabaco en mujeres fumadoras, así mismo, el humo del tabaco es responsable de la disminución de las células de Langerhans por lo que contribuye al desarrollo de la neoplasia, debido a que son estas células

componentes del sistema inmunitario local y actúan como activadoras de los Linfocitos T, no olvidando que se han reportado componentes del tabaco como nicotina o cotinina encontrados en el moco cervical de fumadoras, algunos a concentraciones muy superiores a las sanguíneas (Di Paola, 1996) y sabiendo que la nicotina es la responsable de inhibir la degradación del crecimiento lisosomal, e incrementa el factor de crecimiento no degradado en la cromatina nuclear (González y González, 2000). Apgar y col. en 1993 mencionan que el cigarrillo actúa de manera sinérgica con otros factores de exposición para el desarrollo de carcinogénesis, observando en este estudio que su asociación con la ingesta de bebidas alcohólicas y con la multiparidad incrementan el riesgo a este tipo de neoplasia.

Algunos estudios han publicado que la ingesta de bebidas alcohólicas causa genotoxicidad, al ser metabolizadas a acetaldehído (Velázquez y col., 1989); sin embargo la ingesta de bebidas alcohólicas como factor de riesgo para nuestra población de estudio resulta de particular interés pues consideramos que es una respuesta al sesgo en la información al no contar con una mayor cantidad de muestras sin daño que ingieran bebidas alcohólicas o con daño que no ingieran. La asociación de ingerir bebidas alcohólicas y fumar incrementa el riesgo en nuestra población, combinación reportada anteriormente como factor de riesgo a cáncer de cavidad oral, pues el etanol es un cocarcinógeno implicado en humanos (Chun lin y col., 1989) y como se mencionó el tabaco posee componentes capaces de inhibir células del sistema inmune al encontrarse en altas concentraciones en el moco del epitelio cervical (Apgar y col., 1993).

El epitelio cervical es un área de transformación muy proliferativa durante la adolescencia y la pubertad (llamado "periodo vulnerable"), por lo que es especialmente susceptible a alteraciones (Hernández y col., 1997), las cuales pueden ser inducidas por agentes de transmisión sexual, particularmente por el VPH individual o en conjunto con alguna otra enfermedad causada por virus o bacterias (Castañeda y col., 1998), pues es durante el coito donde se producen microlaceraciones en el tejido que sirven de medio para que estos microorganismos penetren al epitelio; de esta manera es como el inicio de la

vida sexual antes de los 16 años se considera un factor de riesgo (Cuadro 5 y 6), pues el epitelio de estas mujeres se encuentra particularmente vulnerable de ser penetrado y alterado. La adquisición de alguna enfermedad de transmisión sexual refleja el comienzo de la actividad sexual en mujeres con una zona de transformación inmadura (Apgar y col., 2003). Rodríguez y colaboradores en 1999, destacan el aumento en la incidencia de cáncer cérvico uterino en mujeres que inician su vida sexual a temprana edad, pues sugieren que el cuello uterino de la adolescente es particularmente susceptible a agentes carcinógenos relacionados con el coito, coincidiendo nuestros resultados con dicha afirmación, pues para nuestra población de estudio, el inicio de las relaciones sexuales a temprana edad constituye un factor de riesgo.

En el Cuadro 7 se observa que la asociación de enfermedades de transmisión sexual con el VPH aumenta el riesgo a CaCU, debido a que el VPH penetra al epitelio infectando células basales a través de una microerosión o por contacto directo con las células, aunado a esto se encuentra el potencial oncogénico del virus que depende de la expresión de los oncogenes E6 y E7 (Sotlar y col., 2004), siendo los más oncogénicos el tipo 16 y 18 (Salinas y col., 1997). Los genes tempranos (E) del virus se expresan en las capas celulares profundas y convierten a la célula en inmortal, mientras que los tardíos se expresan en las capas superiores, por lo que el virus al penetrar al epitelio se encuentra en estado episómico y conforme la célula se diferencia (hacia la superficie) se sintetizan las proteínas de su cápside y proteínas estructurales del virus (Flores, 1997). Al igual que VPH, otras enfermedades de transmisión sexual como la causada por *Candida albicans* o *Trichomona vaginalis* aprovechan para ingresar en el epitelio mediante una abrasión ocasionada en el tejido o por pérdida traumática de epitelio, quedando las células de la capa parabasal como intermedia expuestas (Mondragón, 2000).

Otro par de factores relacionados con el riesgo a CaCU son la asociación de no realizarse colposcopias previas con la ausencia de Papanicolaou previo, esto debido a que el antecedente de haberse sometido a alguno de dichos estudios permite diagnosticar precozmente las lesiones preneoplásicas, por lo que la

ausencia de revisiones anteriores constituye un factor de riesgo, pues la colposcopia es útil en la evaluación de la extensión de la lesión, y en la orientación de una biopsia (Di Paola, 1996); desgraciadamente no es una metodología al acceso de toda mujer por el alto costo que implica. Así que los programas de detección temprana deberían estar dirigidos a las mujeres que nunca se han practicado una citología porque son las que presentan un mayor riesgo a desarrollar CaCU (Rodríguez y col., 1999) y además algunos estudios han reportado que a temprana edad, las mujeres no acuden a programas de detección oportuna de esta enfermedad (Hernández y col., 2002).

En el cuadro 7 se reporta un incremento en el riesgo a CaCU por la asociación entre multiparidad con múltiples parejas sexuales, debido que el hombre es un factor altamente influyente en la condición de la mujer tanto por su historia sexual (Disaia y Creasman, 1999) como por algunas proteínas básicas del semen (entre las que se encuentra la protamina), que tienen la capacidad de alterar células epiteliales y subepiteliales del cérvix e inducir transformación neoplásica (Serman, 2002); Sin embargo el factor de múltiples parejas sexuales se vio influenciado por sesgos en la información al ser considerado un tema tabú en el país (Castañeda y col., 1998) que se reflejó en nuestras muestras en estudio.

Con respecto a la edad de la mujer, la asociación de dicho factor con la prueba de Ensayo Cometa (Figura 7) demuestra que a la edad entre 32.5 y 47.5 años hay una incidencia incrementada de mujeres que presentan cáncer cérvico uterino, esto debido a que con el aumento de los años viene consigo una disminución en los mecanismos de defensa del organismo (Rojas, 2001), así como cambios en el epitelio estratificado del cérvix, debido a que en el estado pre y postmenopáusico, predominan células menos maduras en el estrato superficial y el exfoliado para frotis de Papanicolaou muestra que la mayoría de las células exfoliadas son principalmente parabasales e intermedias, además un examen colposcópico en mujeres de edad avanzada tiende a perder sensibilidad en la detección de lesión (Apgar y col., 2003).

El costo de la prueba de Papanicolaou hace que sea la prueba de rutina de mayor importancia en México para el estudio de displasias y carcinoma "*in situ*", y la única a la que las mujeres tienen acceso en los centros de salud pública en el estado de Querétaro, de tal manera que las mujeres que acuden a estos centros están sujetas a los parámetros establecidos, como el tiempo en la entrega de resultados, el cual regularmente es mayor a dos meses, desventaja que por desgracia acompaña a la Salud Pública del estado (SSA, 2004).

El Ensayo Cometa es una metodología capaz de detectar niveles de daño celular, que ha sido utilizada en algunos estudios que prueban fármacos, exposición a contaminantes o daño en líneas celulares de CaCU (Banáth y col., 2004), al ser evaluada por la prueba de Papanicolaou, resultó ser altamente sensible en la detección oportuna de lesiones del epitelio cervical (Barrera, 2003) según lo muestra el Cuadro 8. Todo cáncer inicia por un daño al material genético (Prieto y Llópiz, 1999), por lo que el Ensayo Cometa es una prueba que tiene la ventaja ante el Papanicolaou de detectar niveles de daño celular; sin embargo, su especificidad se ve alterada en función de que la prueba tomada como referencia fue Papanicolaou, es decir el diagnóstico considerado como correcto fue el establecido por esta metodología, la cual se sabe presenta un alto porcentaje de casos falsos negativos, aproximadamente del 50%, siendo las causas principales los errores en la interpretación de los resultados y la mala toma de muestra (Serman, 2002).

VIII. CONCLUSIONES

- El Ensayo Cometa detectó mayor número de factores de exposición como factores de riesgo que Papanicolaou.
- Los factores de exposición para nuestra población de estudio identificados fueron el fumar, ingerir bebidas alcohólicas, menarca tardía, inicio precoz de vida sexual, multiparidad, no realizarse citologías previas.
- Multiparidad es el principal factor de riesgo para nuestra población de estudio, extraído tanto por Ensayo Cometa como por Papanicolaou.
- El inicio de la vida sexual antes de los 16 años de edad es también un factor de riesgo, extraído tanto por Ensayo Cometa como por Papanicolaou, solo que en menor grado que multiparidad.
- La ingesta de bebidas alcohólicas, la multiparidad y el fumar, son factores no independientes entre sí con la presencia de lesión en epitelio cervical.
- Las mujeres entre 32.5 a 47.5 años de edad son más propensas a desarrollar CaCU.
- Ensayo Cometa en comparación con Papanicolaou presenta una mayor sensibilidad.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Alvir, J. C., Blandón, J., Londoño, A. L. 1999.** Ingesta de alcohol y riesgo de cáncer de mama, un estudio de casos y controles en Cali, Colombia. *Colombia médica*: Vol. 30: 118-122.
- Apgar, S.B., Brotzman, G.L., y Spitzer M. 2003.** Colposcopía principios y práctica. Mc Graw Hill, México: 1-16, 241-277.
- Banáth, J. P., MacPhail, S. H. y Olive, P. L. 2004.** Radiation Sensitivity, H2AX Phosphorylation, and Kinetics of Repair of DNA Strand Breaks in Irradiated Cervical Cancer Cell Lines. *Cancer Research*: Vol. 64: 7144-7149.
- Barrera S, I. 2003.** Estandarización del Ensayo Electroforesis Unicelular en Células aisladas de Epitelio Endocervical. Querétaro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo.
- Bekkers, R. L., Massuger, L. F., Bulten, J. y Melchers, W. J. 2004.** Epidemiological and clinical aspects of human papillomavirus detection in the prevention of cervical cancer. *Reviews in Medical Virology*: Vol. 14: 95-105.
- Brychtová, S., Brychta, T., Kotrsová, L., Pilka, R., Tichý, M., Tichá, V. y Kolár, Z. 2000.** Expression of Bcl-2 in dysplastic and neoplastic cervical lesions in relation to cell proliferation and HPV infection. *Neoplasma*: Vol. 47: 143-147.
- Castañeda I, M.S., Toledo C, R., y Aguilera D, M. 1998.** Factores de riesgo para cáncer cervicouterino en mujeres de Zacatecas. *Salud Pública de México*. Vol. 40: 330-338.
- Chun Lin Y., Ching H.I. y Chang Lee T. 1989.** Ethanol and acetaldehyde the clastogenicity of ultraviolet light. Methyl methanesulfonate, mitomycin C and bleomycin in Chinese hamster ovary cells. *Mutation Research*: Vol. 216: 93 – 99.
- Cuevas U, M.L., Villasís K, M.A., y Fajardo G, A. 2003.** Epidemiología de Cáncer en adolescentes. *Salud Pública de México*: Vol. 45: 115-123
- Di Paola G.R. 1996.** Colposcopía y patología del tracto genital inferior. 2da ed., Panamericana, Argentina: 287-309.
- Disaia, P. J. y Creasman W. T. 1999.** Oncología Ginecológica. 5ª ed. Harcourt Brace, España: 1-29, 51-100, 583-597.
- Eckert, L. O., Watts, D. H., Koutsky, L. A., Hawes, S. E., Stevens, C. E., Kuypers, J. y Kiviat, N. B. 1999.** A matched prospective study of human

immunodeficiency virus serostatus, human papillomavirus DNA, and cervical lesions detected by cytology and colposcopy. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*: Vol. 7: 158-164.

Fernández, S. P., Villa Alonso, M. T. y Carpena, M. J. 2002. Determinación de factores de riesgo. *Cad Aten Primaria*: Vol. 4: 75- 78.

Flores G. 1997. Patología oncológica. Mac Graw Hill, México: 162 -168.

Florez, J. 2000. Farmacología humana. 3a. ed., Masson, España: 1023-1057.

Gandhi, G. y Singh, R. 2000. The Single Cell Gel Electrophoresis Assay in Peripheral Blood Lymphocytes of Uterine Cervix Cancer Patients. *Experimental Cell Research*: 1-18.

González M, J. y González B, J. 2000. Ginecología oncológica. 2da ed., Masson, Estados Unidos: 1-15, 71-87.

Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V. y Tice, R. R. 2003. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. *Mutagenesis*: Vol. 18: 45-51.

Hermida, R.C., Ayala, D.E., López F, J.J., y Arróyave, R.J. 1994. Circannual variation in the incidence of uterine cervix cancer in northern Mexico. *Bioquímica*: Vol. 19: 91-102.

Hernández H, C.I., Girón C, J.L., Correa C, A.J., Hernández L, J.A., Esquivel A, A., y Jacobo S, A.M. 2002. Limitantes en la utilización del servicio de medicina preventiva para la DOC. *Revista de Enfermería del IMSS*: Vol. 10: 7-10.

Hernández, M., Lazcano, E. C., Berumen, J., Cruz, A. y Alonso, P. P. 1997. Human Papilloma Virus 16-18, Infection and Cervical Cancer in México: A Case-Control Study. *Archives of Medical Research*: Vol. 28: 265-271.

IMSS. 2002. Instituto Mexicano del Seguro Social. Registro Nacional Histopatológico de Neoplasias Malignas. Compendio de Mortalidad y Morbilidad.

Jaiswal, M., Anuradha, G., Rajeswari, N., Raju, K.N., Balakrishna, H., Visweswara, R., Satya, P.I., Jain, S.N. y Ahuja, Y.R. 1994. Comet assay on cervical epithelial cells and leucocytes of patients with precancerous lesions of the cervix. *Mutation Research*: 879-881.

Klaude, M., Eriksson, S., Nygren, J., y Gunnar, A. 1995. The comet assay: mechanism and technical considerations. *Mutation Research*: Vol. 95: 89-91.

- Kopjar, N. y Garaj-Vrhovac. 2000.** Application of cytogenetic endpoints and Comet assay on human lymphocytes treated with vincristine *in vitro*. *Neoplasma*: Vol. 47: 162-167.
- Lázaro M.J.M., Muniesa S.J.A. y Pardo M.A. 2000.** Citología exfoliativa cervicovaginal. Servicio de Anatomía patológica del Hospital OBISPO: 1 -12.
- Lazcano P, E.C., Rojas M, R., López A, M., López C, L., y Hernández A, M. 1993.** Factores de Riesgo Reproductivo y Cáncer Cervicouterino en la Ciudad de México. *Salud Pública de México*: Vol. 35.
- Lazcano P, E.C., Nájera A, P., Alonso R, P., Buiatti E., y Henández A, M. 1996.** Programa de Detección de Cáncer Cervical en México. *Revista del Instituto Nacional de Cancerología*: Vol. 42: 123-140.
- Mondragón, C. H. 2000.** Ginecología básica ilustrada. Trillas, México: 219 – 241.
- Montiel C, MM., y Urquidi T, L.E. 1998.** Factores de riesgo asociados a cáncer cervicouterino y de mama. *Revista Sonorense de Psicología*: Vol. 12: 30-36.
- Olive, P. L. y Banáth, J. P. 1997.** Multicell spheroid response to drugs predicted with the comet assay. *Cancer Research*: Vol. 57: 5528-5533.
- Östling, O., y Johanson, K. 1984.** Microelectroforesis study of radiation induced DNA damages in individual cells. *Res. Commun*: Vol.123: 291-298.
- Porterfield, D. S., Dutton, G. y Gizlice, Z. 2003.** Cervical cancer in North Carolina: Incidence, Mortality and risk factors. *NCMJ*: Vol. 64: 11-17.
- Prieto G, EA., Llópez J, ND. 1999.** Normalización de la electroforesis de células individuales (ensayo cometa). *Revista Cubana de Investigación Biomédica*: Vol. 18: 34-36.
- Rodríguez S, A., Echavarría A, A.A., Murlá A, S., y Vázquez G, C. 1999.** Factores de riesgo del cáncer de cérvix en el municipio de Cerro. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*: Vol. 37: 40-46.
- Rojas E, O. 2001.** Inmunología (de memoria). 2da ed., Panamericana, México: 289-331.
- Salinas M. A. M., Villareal R. E., Garza E. M. E., Fraire G. J. M., López F. J. y barboza Q. O. 1997.** Calidad del Programa de Detección Oportuna de Cáncer Cérvico Uterino en el estado de Nuevo León. *Salud Pública de Mexico*: Vol. 39: 187-194.

- Schlecht, N. F., Trevisan, A., Duarte-Franco, E., Rohan, T. E., Ferenczy, A., Villa, L. L. y Franco, E. L. 2003.** Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *International Journal of Cancer*: Vol. 103: 519-524.
- Serman, F. 2002.** Cáncer cervicouterino: epidemiología, historia natural y rol del virus papiloma humano, perspectivas en prevención y tratamiento. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*: Vol. 67: 318-323.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. y Schneider, E.L. 1988.** A simple technique for quantization of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*: Vol. 175: 194-191.
- SSA. 2004.** Secretaría de Salud. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Prevalencia de factores de riesgo para cáncer cervicouterino en mujeres que solicitan la prueba de detección oportuna de cáncer.
- Tapia, R.C., Sandoval, R.J., García, M.G., Durán, D.A., y Morales, M.O. 1998.** Cáncer cervicouterino: factores de riesgo y alteraciones asociadas en mujeres del estado de Guerrero. *Revista del Instituto Nacional de Cancerología*: Vol. 44: 19-27.
- Trevigen, I. 1999.** Comet Assay Applications, Tips and Trends. Gaithersburg: Vol. 1: 1-5.
- Vaghef, H., Nygre, P., Edling, C., Berh, J. y Hellman, B. 1997.** Alkaline single-cell gel electrophoresis and human biomonitoring for genotoxicity: a pilot study on breast cancer patients undergoing chemotherapy including cyclophosphamide. *Mutation Research*: 128-138.
- Valle, G. 1998.** Cáncer cervicouterino y enfermedades de transmisión sexual. Comité promotor por una maternidad sin riesgos en México, México: 59-69.
- Velásquez, G. N., Mendiola, C., Morales, R. P. y Madrigal- Bujaidar E. 1989.** Frecuencia del intercambio de cromátidas hermanas producidas por el acetaldehído en espermatogonias de ratón *in vivo*.
- Verschaeve, L. y Van Gorp, U. 2000.** The Comet assay. *Environmental Toxicology*: 123-130.

ANEXO 1

Código: _____

Nombre: _____
(Apellido paterno) (Apellido materno) (Nombre)

Edad: _____

Fecha de última menstruación: _____ Menarca: _____
(día) (mes) (año)

Inicio de relaciones sexuales _____ No. de parejas Sexuales: _____

Método de planificación Familiar: _____ cual _____ tiempo _____ actual _____

Lavados vaginales: _____ No. de embarazos: _____ No. de partos: _____

Partos vaginales: _____ Cesáreas: _____ Cirugía Ginecológica: _____

Enfermedades o molestias en los últimos años: _____

Exámenes previos de: Colposcopia: _____ cuantos _____ resultados _____

Papanicolaou: _____ cuantos _____ resultados _____

Papiloma virus (VPH): _____

¿Usted ha fumado alguna vez en su vida? Si () No ()

Si la respuesta es si, anote aproximadamente cuantos cigarrillos fuma al día. _____

¿Acostumbra a ingerir bebidas alcohólicas? _____

¿Qué clase de bebida y en que frecuencia? _____

Le han diagnosticado alguna enfermedad de transmisión sexual? _____

Reservado para el personal médico

Resultados actuales de Colposcopia: _____

Resultados actuales de Papanicolaou: _____