

**EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO, DE EXPOSICIÓN Y GENOTÓXICO
ASOCIADO AL CÁNCER DE MAMA Y EL INDUCIDO POR LA
QUIMIOTERAPIA**

**LORENA BOLAÑOS
INGRID YESENIA REYES CARVAJAL**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Biólogas**

**Director
Mg. SILVIO M. CARVAJAL V.**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
UNIDAD DE TOXICOLOGÍA GENÉTICA Y CITOGENÉTICA
POPAYÁN
2004**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO, DE EXPOSICIÓN Y GENOTÓXICO
ASOCIADO AL CÁNCER DE MAMA Y EL INDUCIDO POR LA
QUIMIOTERAPIA**

**LORENA BOLAÑOS
INGRID YESENIA REYES CARVAJAL**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
UNIDAD DE TOXICOLOGÍA GENÉTICA Y CITOGÉNÉTICA
POPAYÁN
2004**

NOTA DE ACEPTACIÓN:

DIRECTOR:

Mg. SILVIO MARINO CARVAJAL

JURADO:

Mg. EDNA LOURDES OROZCO

JURADO:

Ph.D. CARLOS HERNAN SIERRA

Fecha de sustentación: Popayán, 1 de Junio de 2004.

AGRADECIMIENTOS

La presente investigación fue realizada gracias a DIOS y al apoyo moral, educativo, logístico y económico de las siguientes personas e instituciones:

NUESTROS PADRES: por sus desvelos, esfuerzos, dedicación y entrega hacia sus hijas, en cada uno de los momentos de alegría y desilusión.

NUESTROS HERMANOS: amigos y confidentes en las buenas y en las malas, por su tolerancia, afecto y cariño, que nos expresan en los ratos de tristeza y felicidad, por hacer llevadera la convivencia en nuestro hogar.

NUESTROS TÍOS: por su apoyo incondicional y ayuda en nuestra formación personal y profesional.

NUESTRA FAMILIA: personas que depositaron su confianza en la realización de otra etapa más en nuestras vidas.

NUESTROS AMIGOS Y COMPAÑEROS: por su apoyo incondicional en nuestra vida estudiantil, en especial a DIANA MILENA MUÑOZ y a NANCY YADIRA GUERRERO, como también a todas las personas que hacen parte de nuestro Grupo de Toxicología Genética y Citogenética.

Director Mg. SILVIO CARVAJAL: persona que nos apoyó en la elaboración, consecución y culminación de esta investigación, como también por su entrega profesional, aportándonos sus conocimientos, esfuerzos y calidad humana, convirtiéndose así, en un confidente y amigo incondicional.

GRUPO DE TOXICOLOGÍA GENÉTICA Y CITOGÉNICA: por su colaboración y apoyo logístico en el desarrollo de esta investigación, en especial a la Mg. LUZ STELLA HOYOS por su enseñanza, empuje y tolerancia, motivación hacia la búsqueda de la excelencia. A la Ph.D. NOHELIA CAJAS, coordinadora de este grupo de investigación.

A LA POBLACIÓN DE ESTUDIO: por su participación voluntaria en el estudio, porque gracias a cada una de estas personas logramos llevarlo a cabo.

Doctor LUIS ARTURO ADRADA y enfermera jefe DORIS ADRIANA PINO: porque gracias a ellos se hizo la consecución de las personas objeto de estudio, por los conocimientos médicos aportados que permitieron aclarar conceptos y dudas en la elaboración del estudio.

UNIVERSIDAD DEL CAUCA: gracias a esta Institución nos desarrollamos personal y profesionalmente, al **DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA** por su aporte

logístico y económico en la realización de esta investigación y la UNIDAD DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA, por su apoyo logístico.

Instituciones de salud, HOSPITAL SUSANA LÓPEZ DE VALENCIA, CLÍNICA COMSALUD Y A LA UNIDAD ONCOLÓGICA DEL CAUCA: por su aporte logístico, recepción donde se realizó la consecución de la población de estudio.

A DIOS, fuerza divina que nos a mantenido con fe y esperanza, a lo largo de nuestras vidas.

La realización de este trabajo es el resultado del esfuerzo y dedicación de:

Nuestros Padres “ MARÍA RAQUEL BOLAÑOS e ILDE BOLAÑOS” y “RUTH GRACIELA CARVAJAL y JAIME REYES”.

Nuestros hermanos “ SANDRA MILENA, EDILSON Y ANA YULECNY ORDÓÑEZ BOLAÑOS” y “JULIÁN ALEJANDRO, JAIME ANDRÉS, ANGELO ALBANO y RUTH ANGELIC REYES CARVAJAL”.

Profesores, en especial a SILVIO MARINO CARVAJAL y a LUZ STELLA HOYOS, que de una u otra forma dejaron huella en nuestro caminar estudiantil.

Al apoyo sincero e incondicional de WILSON ORDÓÑEZ y EDWIN YINEIVER CORREA.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	17
1. ANTECEDENTES	19
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. OBJETIVOS	25
4.1 OBJETIVO GENERAL	25
4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	25
5. MARCO TEÓRICO	26
5.1 CÁNCER DE MAMA	26
5.1.1 Causas y diagnóstico del cáncer de mama	26
5.1.2 Tipos de cáncer de mama	27
5.1.3 Estadios del cáncer de mama	28
5.2 FACTORES DE RIESGO DEL CÁNCER DE MAMA	29

5.3 SÍNTOMAS	30
5.4 TRATAMIENTO	31
5.5 QUIMIOTERAPIA	32
5.6 PRUEBAS CITOGENÉTICAS	33
5.6.1 Biomarcador de Citotoxicidad	33
5.6.2 Biomarcador de exposición	33
5.6.3 Biomarcador de efecto	34
5.6.4 Utilidad de las pruebas citogenéticas	34
5.7 LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA	34
5.8 PRUEBA DE ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN CELULAR	34
5.9 PRUEBA DE LOS INTERCAMBIOS DE CROMÁTIDAS HERMANAS	35
5.9.1 Efecto del BrdU	37
5.10 PRUEBA DE MICRONÚCLEOS CON CITOCALASINA-B	37
6. METODOLOGÍA	39
6.1 TIPO DE ESTUDIO	39
6.2 POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO	39

6.3 TOMA DE LA MUESTRA DE SANGRE, SIEMBRA Y COSECHA DE LINFOCITOS	39
7. DISEÑO EXPERIMENTAL	42
7.1 PERSONAS CON CÁNCER DE MAMA Y SUS CONTROLES	42
7.1.1 Análisis estadístico	43
7.2 PERSONAS CON CÁNCER DE MAMA ANTES Y DESPUÉS DE LA QUIMIOTERAPIA	43
7.2.1 Análisis estadístico	43
8. RESULTADO	44
8.1 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	44
8.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO EN LAS PERSONAS CON CÁNCER DE MAMA	44
8.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE EXPOSICIÓN EN LAS PERSONAS CON CÁNCER DE MAMA	47
8.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO EN LAS PERSONAS CON CÁNCER DE MAMA	48
8.5 CONCENTRACIÓN DE LAS SUSTANCIAS UTILIZADAS EN LA QUIMIOTERAPIA	50
8.6 EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO INDUCIDO POR LA QUIMIOTERAPIA, EN LAS PERSONAS CON CÁNCER DE MAMA	50
8.7 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE EXPOSICIÓN INDUCIDO POR LA QUIMIOTERAPIA, EN LAS PERSONAS CON CÁNCER DE MAMA	52

8.7 EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO INDUCIDO POR LA QUIMIOTERAPIA, EN LAS PERSONAS CON CÁNCER DE MAMA	53
9. DISCUSIÓN	60
9.1 PERSONAS CON CÁNCER DE MAMA Y SUS CONTROLES	60
9.2 PPERSONAS CON CÁNCER DE MAMA ANTES Y DESPUÉS DE LA QUIMIOTERAPIA	61
10. CONCLUSIONES	63
11. RECOMENDACIONES	65
12. IMPACTO	66
13. BIBLIOGRAFÍA	67
ANEXOS	73

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Protocolo para las pruebas de IP e ICHs	40
Figura 2. Protocolo para la prueba de MNs	41
Figura 3. Índice de proliferación celular en las personas con cáncer de mama respecto a las personas sin cáncer.	46
Figura 4. Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas en las personas con cáncer de mama respecto a las personas sin cáncer.	48
Figura 5. Número total de micronúcleos en las personas con cáncer de mama respecto a las personas sin cáncer.	49
Figura 6. Linfocitos en metafase de primer ciclo (M_1), aumento de 100X	54
Figura 7. Linfocitos en metafase de segundo ciclo (M_2), aumento de 100X	54
Figura 8. Linfocitos en metafase de tercer ciclo (M_3), aumento de 100X	55
Figura 9. Panorámica de linfocitos, aumento de 10X	55
Figura 10. Intercambios de cromátidas hermana (ICHs), en metafase de segundo ciclo (M_2), aumento de 100X	56
Figura 11. Célula binucleada, aumento de 60X	56
Figura 12. Micronúcleos (MNs) en célula binucleada, aumento de 60X	57

Figura 13. Panorámica de células binucleadas, aumento de 10X	57
Figura 14. Puente cromosómico en célula binucleada, aumento de 60X	58
Figura 15. Intercambios de cromátidas hermana (ICHs), en metafase de segundo ciclo (M_2) antes y después de la quimioterapia, aumento de 100X	58
Figura 16. Micronúcleos (MNs) en célula binucleada después de la quimioterapia, aumento de 60X.	59

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Características socio-morfológicas de las personas en estudio	45
Tabla 2. Resultados del efecto citotóxico de las personas con cáncer de mama respecto a sus controles.	46
Tabla 3. Resultados del efecto de exposición de las personas con cáncer de mama respecto a sus controles.	47
Tabla 4. Resultados del efecto genotóxico de las personas con cáncer de mama respecto a sus controles.	49
Tabla 5. Régimen de tratamiento utilizado en la quimioterapia del cáncer de mama	50
Tabla 6. Resultados del efecto citotóxico inducido por la quimioterapia en las personas con cáncer de mama.	51
Tabla 7. Resultados del efecto de exposición inducido por la quimioterapia en las personas con cáncer de mama.	52
Tabla 8. Resultados del efecto genotóxico inducido por la quimioterapia en las personas con cáncer de mama.	53

TABLA DE ANEXOS

	pág.
ANEXO A. ENCUESTA PARA LA POBLACIÓN DEL PROYECTO DE CÁNCER DE MAMA	73
ANEXO B. CONSENTIMIENTO INFORMADO	75
ANEXO C. REGISTROS	78

RESUMEN

El cáncer de mama es un problema de salud debido a que se ha incrementado su incidencia. La quimioterapia (Ciclofosfamida, Metrotexate y 5-Fluorouracilo (CMF) y Ciclofosfamida-Doxirubicina (CD)), que controla la proliferación de células cancerosas, causan efectos colaterales en otro tipo de células diferentes a las del tejido blanco. El objetivo de la investigación fue evaluar el efecto citotóxico (índice de proliferación (IP)), de exposición (Intercambios de cromátidas hermanas (ICHs)) y genotóxico (Micronúcleos (MNs)), asociado al cáncer de mama y el inducido por la quimioterapia. Se realizaron cultivos de linfocitos de sangre periférica de 20 personas con cáncer de mama, de las cuales se evaluaron a 10 personas antes y 28-30 días después de recibir quimioterapia, y 22 personas sin cáncer de mama.

Resultados. En las personas con cáncer de mama, el IP fue de 1.5293 ± 0.0456 ciclos y en el grupo control de 1.9336 ± 0.03936 ciclos, durante 72 horas de cultivo, indicando que los linfocitos de estas personas son más lentos, recorriendo $1\frac{1}{2}$ ciclo de división celular en el grupo control (efecto citotóxico) y 2 ciclos en los del grupo control. La frecuencia de ICHs/célula se incrementó en un 75.5%, de igual forma se incrementó en un 126% el número total de MNs/4000 células binucleadas, indicando que fue estadísticamente significativo ($P = 0.000$) entre las personas con cáncer de mama respecto del grupo control (efecto de exposición y genotóxico). De acuerdo a lo anterior se puede hipotetizar que las personas con cáncer son más propensas a desarrollar alteraciones a lo largo del ciclo celular y en su ADN.

Después de la quimioterapia de las personas con cáncer de mama; se registro un incremento del 54% en la frecuencia de ICHs/célula y un 72.12% en el número de MNs/4000 células binucleadas, respecto al observado antes de dicho tratamiento. El incremento fue estadísticamente significativo ($P = 0.000$). En consecuencia la quimioterapia, probablemente esta interviniendo con la molécula del ADN causándole daño, pero no interfiere en la proliferación celular.

INTRODUCCIÓN

Es importante tener en cuenta que el desarrollo del cáncer de mama se debe a factores hereditarios (5%), debido a mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2, responsables del desarrollo de este tipo de cáncer, y con mayor frecuencia (90-95%) ocurre de forma espontánea (Peto, *et.al*, 1999), asociado a factores de riesgo como la edad, menarquia temprana (<12 años) o menopausia tardía (>55 años), nuliparidad, consumo de alcohol, cigarrillo, anticonceptivos u hormonas postmenopáusicas, al estado socio-económico y educativo de la población (Ruso, *et.al*, 2002), lo cual indica que existe una alta probabilidad de prevenir la enfermedad. Se sabe también que, este tipo de cáncer afecta con mayor probabilidad al sexo femenino (99%) y en menor proporción (1%) a la población masculina (American Cancer Society, 2000).

En la actualidad, el cáncer de mama constituye uno de los principales problemas sociales, debido a que se incrementó en un 9%, indicando un aumento progresivo en el número de personas que lo padecen (Gori, 2002; Menascha, 1997), considerándose así, el tercer tipo de cáncer más común en la población mundial y el segundo en la población femenina, donde una de cada 9 mujeres puede desarrollarlo. En la mujer americana, se reportaron 192.200 casos con este tipo de cáncer, con una mortalidad del 21% (American Cancer Society, 2001). En España, se considera la primera causa de muerte por cáncer, aún por encima del cáncer de pulmón, cada año se diagnostican 15.000 nuevos casos en mujeres entre los 45 a 55 años de edad (Unidad Oncológica de España, 2001).

De igual manera, en Colombia esta enfermedad ocupa el segundo lugar después del cáncer cérvico uterino, de los casos atendidos en el sexo femenino. Durante el año 2001, su frecuencia se incrementó en un 40% en relación con el año 2000, representando un aumento de 310 nuevos casos de cáncer de mama (211 a 521 casos), según el registro institucional de cáncer (Instituto Nacional de Cancerología, 2001; Rojas, *et.al.*, 1992)

Por ende, la comunidad científica se ha interesado en realizar diferentes estudios de tipo caso-control, a nivel epidemiológico, genético y molecular en personas con esta enfermedad, concluyendo que esta población es más susceptible a desarrollar daños genéticos, debido a que presentan daños acumulativos en su molécula de ADN (Trenz, *et.al.*, 2002; Rothfuss, *et.al.*, 2000; Livingston, *et.al.* 1983).

En la población Colombiana se han llevado a cabo estudios epidemiológicos en mujeres con cáncer de mama, que evidencian daño en el ADN asociado a diferentes factores de riesgo, como el consumo de alcohol y la exposición a

compuestos organoclorados (Alvir, *et.al.*, 1999; Olaya, *et.al.*, 1998), pero no se han realizado estudios a nivel citogenético.

Por esta razón, este estudio se basa en la aplicación de pruebas citogenéticas en una población de personas con cáncer de mama (casos) respecto a personas sin cáncer (controles), para indicar si este tipo de cáncer, causa efecto citotóxico (índice de proliferación celular (IP)), de exposición (intercambios de cromátidas hermanas (ICHs)) y genotóxico (micronúcleos (MNs)) en sus linfocitos de sangre periférica. También se determina si la quimioterapia induce efecto citotóxico, de exposición y genotóxico en los linfocitos de estas personas con cáncer de mama. Teniendo en cuenta que, estudios anteriores indican que las sustancias anticancerígenas, empleadas en la quimioterapia, como la Ciclofosfamida, Metrotexate y 5-Fluorouracilo (CMF) además de controlar las células cancerosas, atacan a otro tipo de células que se encuentran en etapa proliferativa, como las del cabello, médula ósea y las del revestimiento bucal e intestinal (Oliver, *et.al.*, 2002).

La corroboración de los anteriores planteamientos fue relevante, debido a que se confirma el posible efecto citotóxico, de exposición y genotóxico asociado al cáncer de mama y el inducido por la quimioterapia, en los linfocitos de sangre periférica, lo cual hace pensar que la población Caucana con esta enfermedad y que recibe quimioterapia está tan expuesta a desarrollar nuevos daños en su material genético que la población de otras partes del mundo.

La socialización de los resultados obtenidos, mediante esta investigación, permiten de alguna forma que la población en general tome conciencia de que la prevención hacia la exposición a diferentes agentes tóxicos, es la verdadera medida de protección de salud, aún más, para las personas que ya han desarrollado cáncer, debido a que tienen daño genético acumulado, ocasionando que su ADN sea más vulnerable a nuevas alteraciones.

1. ANTECEDENTES

De acuerdo a la revisión Bibliográfica sobre el cáncer de mama y la aplicación de la quimioterapia se encontró que, este tema ha sido muy bien estudiado por la comunidad científica, en diferentes poblaciones femeninas del mundo mediante investigaciones a nivel epidemiológico, citogenético y molecular, tales como:

El grupo de Baeyens y Colaboradores, en la población de Bélgica, en el año 2002, encontraron que, las personas con cáncer de mama hereditario tienen una proporción del 43% más de radiosensibilidad cromosomal que las personas saludables. En esta misma población se realizó un estudio sobre la actividad genotóxica de lípidos y leche materna, donde se evidenció un incremento significativo de daño en la molécula de ADN (Phillips, *et.al.*, 2002).

De igual forma, estudios en la población Alemana, indican que existe una relación íntima entre la presencia de una mutación en los genes BRCA1 y BRCA2 con la sensibilidad de inducir micronúcleos (MNs), después de que los linfocitos de sangre periférica de mujeres con cáncer de mama hereditario eran irradiados con rayos gamma, debido a que las proteínas BRCA parecen estar involucradas en los procesos de reparación de daños en el ADN (Trenz, *et.al.*, 2002). En esta misma población, Fischer y Colaboradores, en el año 2001, encontraron un aumento en la formación de MNs y un efecto citotóxico asociado al cáncer de mama y al estradiol, concluyendo que esta hormona es carcinogénica.

Por otra parte, en Sao Paulo (Brasil), Silva y Colaboradores, en el año 2002, reportan que la quimioterapia, entre ciclos, reduce la frecuencia de Aberraciones cromosómicas (AC) e intercambios de cromátidas hermanas (ICHs) y que no alteró el índice mitótico y la proliferación celular de linfocitos de personas con cáncer de mama.

En contraste a lo anterior, en una población de Finlandia, Erselcan y Colaboradores, en el año 2000, concluyeron que las dosis acumulativas de quimioterapia causan efecto tóxico en las células del tejido cardíaco. Así también, estudios realizados por Venkatachalam y Colaboradores, en el año 1999, demuestran que, tanto la radioterapia como la quimioterapia inducen un incremento en el número de MNs, en linfocitos de sangre periférica de personas con cáncer de mama.

Continuando con la búsqueda de estudios referentes al tema, se encontró que los linfocitos de personas con cáncer de mama presentan un incremento estadísticamente significativo ($P < 0.001$) en la frecuencia de ICHs y en el número de MNs, en comparación al registrado en una población saludable (Duffaud, *et.al.*, 1997; Dhillon, *et.al.*, 1995; Adhvaryu, *et.al.*, 1988).

Respecto a la quimioterapia, los estudios reportan que la inducción, acumulación y persistencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICHs), en linfocitos de sangre periférica de mujeres con cáncer de mama, presentan diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.001$) respecto a la de una población no expuesta a esta terapia (Tucker, *et.al.*, 1990; Clare, *et.al.*, 1983).

Teniendo en cuenta los estudios anteriores, se puede observar que para la población Colombiana no hay un soporte científico que nos indique el posible efecto citotóxico, de exposición y genotóxico asociado al cáncer de mama y el inducido por la quimioterapia. Por ende, el propósito de esta investigación es la de determinar el índice de proliferación celular (IP), la frecuencia de ICHs y MNs, en los linfocitos de sangre periférica de personas con y sin cáncer de mama, como también, el de personas con cáncer de mama, después de la quimioterapia.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS

En Colombia se acepta ampliamente que el cáncer de mama constituye un problema importante de salud pública, ya que ocupa un segundo lugar entre los cánceres más frecuentes, desarrollados en esta población, reportándose de 27 a 30 casos entre 100.000 habitantes (Instituto Nacional de Cancerología, 2001). De igual forma, en el Departamento del Cauca, en década de 1990 a 1999, los casos de cáncer de mama se incrementaron de 589 a 1370 y su mortalidad de 17 a 28 casos, considerándose el tercer tipo de cáncer más frecuente presente en esta población, según estadísticas de la Secretaría de Salud Pública del Departamento del Cauca, del año 2002.

Por lo cual, es de gran interés profundizar en la investigación sobre este tipo de cáncer, a nivel Nacional y del Departamento del Cauca, ya que a nivel mundial se han realizado diferentes estudios citogenéticos que demuestran una relación entre esta enfermedad y el daño en el material genético (ADN), ocasionado tanto por factores genéticos como por factores externos o ambientales (Baeyens, *et.al.*, 2002), mientras que en nuestra población aún se encuentra este vacío, impidiendo apropiarse de la importancia de este problema.

Por otra parte, en la actualidad existen terapias adecuadas para el tratamiento del cáncer de mama, tales como la quimioterapia y la radioterapia. En la Quimioterapia se emplean compuestos como la Ciclofosfamida-Doxirubicina (CD) y la Ciclofosfamida, Metrotexate y 5-fluorouracilo (CMF), que actúan a nivel sistémico, atacando a células en proliferación celular, además de combatir las células cancerígenas, también interactúan con moléculas como el ADN o con estructuras celulares relacionadas con la proliferación celular de otros tipos de células (linfocitos), causándoles daños, que se fijan como mutación o induciendo el bloqueo de su síntesis (Hu, *et. al.*, 2002). En consecuencia, estos daños con el tiempo incrementan el riesgo de padecer nuevas enfermedades (nuevos cánceres), debido a que en su ADN existe acumulación de daño (mutación en sus genes BRCA1 y BRCA2) que los hace más susceptibles.

Por lo antes expuesto, fue importante identificar el posible efecto citotóxico, de exposición y genotóxico asociado al cáncer de mama y el inducido por la quimioterapia, respondiendo a los siguientes interrogantes:

¿En las personas con cáncer de mama, sus linfocitos son más propensos a experimentar daños genéticos, que los de las personas sin cáncer?.

¿La quimioterapia tiene efecto depresor de la proliferación celular e incrementa la frecuencia del daño en el material genético?.

En consecuencia, en esta investigación, se sometieron a prueba las siguientes hipótesis:

Si los linfocitos de sangre periférica de las personas con cáncer de mama son más propensos a experimentar daños genéticos, se espera que el índice de proliferación celular (IP) sea menor y la frecuencia de Intercambios de cromátidas hermanas (ICHs) y micronúcleos (MNs) sea mayor que el observado en los linfocitos de las personas sin cáncer (H_1), de lo contrario será igual o incluso opuesto (H_0).

Si la quimioterapia tiene efecto depresor de la proliferación celular e incrementa la frecuencia del daño en el material genético, se esperar que el IP sea menor y la frecuencia de ICHs y MNs sea mayor, después de este tratamiento (H_1), de lo contrario, el efecto será igual o incluso opuesto (H_0).

3. JUSTIFICACIÓN

En Colombia y específicamente en la población del Cauca no se han realizado estudios científicos a nivel citogenético que indiquen el posible efecto citotóxico, de exposición y genotóxico asociado al cáncer de mama y el inducido por la quimioterapia, como lo demuestran las diferentes investigaciones realizadas en otros lugares del mundo.

Por lo cual, esta investigación se llevó a cabo en una población de personas con cáncer de mama (casos) y personas sin cáncer de mama (controles), como primera parte del estudio; de igual forma, se tuvo en cuenta a personas con cáncer de mama, que por primera vez fueran tratadas con quimioterapia, teniendo en cuenta que recibieran un solo ciclo de exposición a este tratamiento, punto que determinó la segunda parte del trabajo.

Para la evaluación del efecto citotóxico, de exposición y genotóxico, se emplearon pruebas citogenéticas o biomarcadores biológicos de citotoxicidad y genotoxicidad (exposición y efecto), como el índice de proliferación celular (IP), los intercambios de cromátidas hermanas (ICHs) y Micronúcleos (MNs), en linfocitos de sangre periférica de personas con cáncer de mama, antes y después de la quimioterapia y de personas sin cáncer (población de estudio), pruebas que permiten determinar el efecto citotóxico, exposición y genotóxico inducido por agentes mutagénicos, teratogénicos y carcinogénicos, en grupos expuestos (Au, 1991).

Los resultados obtenidos mediante esta investigación, demuestran que la población Caucana, en estudio, presenta efecto citotóxico, de exposición y genotóxico asociado al cáncer de mama. Lo cual indica que, esta población está más propensa a desarrollar nuevas alteraciones en su material genético que la población sin cáncer, como consecuencia de posibles alteraciones en sus genes BRCA1 y BRCA2, responsables del cáncer de mama, y/o deberse a la exposición ambiental, que tuvieron a lo largo de su vida o a la que aún están expuestas, ya sea por su estilo de vida o por su ocupación laboral.

Estos resultados son registros iniciales que llevan al planteamiento de nuevos interrogantes, que permitan aclarar de manera específica las causas por las cuales la población de estudio presenta un mayor efecto citotóxico, de exposición y genotóxico en sus linfocitos. De tal forma que, estas causas se puedan identificar para ejecutar una estrategia de prevención, que evite el desarrollo de nuevas enfermedades o problemas de salud.

Por otra parte, este estudio permitió identificar un posible efecto de exposición y genotóxico asociado a la quimioterapia, generando también una serie de interrogantes, en cuanto a las sustancias utilizadas en este tratamiento, que

determinen cuáles sustancias y qué concentraciones de éstas son las más favorables para el control de las células cancerosas, de dicha enfermedad, pero que disminuyan los efectos colaterales y las alteraciones en el material genético (ADN).

En general, se puede observar que los resultados arrojados por esta investigación insentivan al desarrollo y ejecución de nuevas investigaciones acerca de este problema de salud (cáncer de mama) y del tratamiento utilizado para su control (quimioterapia), debido a que es muy preocupante ver que las personas con cáncer siguen siendo afectadas por nuevos problemas de salud, que se pueden prevenir con una adecuada educación y formación en la prevención.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL:

- Identificar el efecto citotóxico, de exposición y genotóxico asociado al cáncer de mama y el inducido por la quimioterapia, empleando biomarcadores como el índice de proliferación celular (IP), Intercambios de cromátidas hermanas (ICHs) y Micronúcleos (MNs), en linfocitos de sangre periférica.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Cuantificar el IP, para identificar el efecto citotóxico, en linfocitos de personas con y sin cáncer de mama.
- Determinar los ICHs, para evaluar el efecto de exposición, en linfocitos de personas con cáncer de mama, respecto al de las personas sin cáncer.
- Evaluar el efecto genotóxico en linfocitos de personas con cáncer de mama, respecto de un grupo sin cáncer, mediante la prueba de MNs.
- Cuantificar el IP y determinar la frecuencia de ICHs y MNs en linfocitos de personas con cáncer de mama, antes y después de la quimioterapia.

5. MARCO TEÓRICO

5.1 CÁNCER DE MAMA

Actualmente se asume que el cáncer es el resultado de alteraciones en una célula, que modifica su potencial de crecimiento, la respuesta a los mecanismos de control y función, estos cambios pueden implicar mutaciones en uno o más genes, anormalidades cromosómicas graves o anomalías en la transcripción genética que conducen a la diferenciación y alteración de las propiedades de crecimiento de la célula, que se caracteriza por una proliferación celular desordenada y sin control, originando masas o bultos de tejido extra llamado tumor. Así, el cáncer de mama, es una enfermedad que afecta el tejido mamario, formado por varios racimos de lóbulos y lobulillos, en los que se desarrollan células cancerosas, ocasionando el cáncer ductal (más frecuente) y el cáncer de tipo lobular.

La mayoría de los tumores que se producen en la mama son benignos, no cancerosos, relacionados con factores genéticos, que se caracterizan por formaciones fibroquísticas. Estos tumores presentan síntomas como dolor e inflamación.

El tumor maligno mamario o cáncer de mama puede ser metastásico o no, ya que puede invadir y dañar los tejidos cercanos, circulando por el torrente sanguíneo o por el sistema linfático y formar un tumor secundario en otra parte del cuerpo.

5.1.1 Causas y diagnóstico del cáncer de mama. Existe una predisposición familiar del 5% al 10%, que se trasmite a través de alteraciones en los genes BRCA 1 y BRCA2, localizados en los cromosomas 17 y 13 respectivamente. Otra causa que da origen al cáncer de mama, son los factores ambientales en un 90-95% (Pulsomed S.A, 2002).

La prevención más eficaz del cáncer de mama es la detección precoz, por ello es fundamental la autoexploración de las mamas de forma periódica; por otra parte, después de los 40 años se debe realizar una mamografía cada año, este examen médico, detecta pequeños tumores que pueden pasar desapercibidos en la autoexploración.

La aparición de algún nódulo sospechoso exige la realización de una biopsia del mismo, que consiste en tomar un pequeño trozo del nódulo y analizarlo al

microscopio para determinar la presencia de células cancerosas. Normalmente, la toma de la muestra se realiza mediante una aguja que se introduce en el tejido mamario y por aspiración se recoge parte del tejido sospechoso, para realizarle el respectivo análisis clínico. La curación del cáncer de mama depende del estadio y la extensión del tumor, así como del estado general de salud de la persona afectada (Cura, 2000).

5.1.2. Tipos de cáncer de mama. Los tipos más comunes de cáncer de mama son los siguientes:

- ❖ Carcinoma ductal *in situ*. Se origina en las células de las paredes de los conductos mamarios, es un cáncer muy localizado que no se extiende a otras zonas, por este motivo puede extirparse fácilmente. La cifra de curación en las mujeres que presentan este tipo de cáncer está en un 100%. Este tipo de tumor se puede detectar a través de una mamografía.
- ❖ Carcinoma ductal infiltrante (o invasivo). Es el que se inicia en el conducto mamario pero logra atravesarlo y pasa al tejido adiposo de la mama y luego puede extenderse a otras partes del cuerpo, es el más frecuente de los carcinomas de mama, se da en el 80% de los casos.
- ❖ Carcinoma lobular *in situ*. Se origina en las glándulas mamarias (lóbulos), no es un cáncer verdadero, aumenta el riesgo de que la mujer pueda desarrollar un cáncer en el futuro. Se suele dar antes de la menopausia. Una vez que es detectado, es importante que la mujer se realice una mamografía de control al año y varios exámenes clínicos para vigilar el posible desarrollo de este tipo de cáncer.
- ❖ Carcinoma lobular infiltrante (invasivo). Comienza en las glándulas mamarias pero se puede extender y distribuir a otros tejidos del cuerpo. Entre el 10% y el 15% de los tumores de mama son de este tipo. Este carcinoma es más difícil detectarlo a través de una mamografía.
- ❖ Carcinoma inflamatorio de la mama. Es un cáncer poco común, tan sólo se presenta en un 1% del total de los tumores cancerosos de la mama, es agresivo y de crecimiento rápido, presenta enrojecimiento de la piel de la mama, aumentando su temperatura, la apariencia de la piel se vuelve gruesa y ahuecada, como la de una naranja, pueden aparecer arrugas y protuberancias en ella. Estos síntomas son debidos al bloqueo que producen las células cancerosas sobre los vasos linfáticos.
- ❖ Cáncer Recurrente. Cuando el cáncer se ha tratado y vuelven a aparecer células cancerosas en la mama, en la pared torácica o en otras partes del cuerpo.

5.1.3 Estadios del cáncer de mama. Existen seis etapas principales del cáncer de mama:

- Etapa 0 (*in situ*). Las células cancerosas sólo se extienden por parte del tejido ductal o lobular de la mama. El cáncer lobular *in situ*, no es un verdadero cáncer, pero existe una predisposición a desarrollarlo, a diferencia del cáncer ductal *in situ*, que sí es un verdadero cáncer (Pulsomed S.A, 2002).
- Etapa I. El tamaño del nódulo canceroso es menos de 2 centímetros y sin extensión a otros tejidos.
- Etapa II. Si el tamaño del cáncer es menor de 2 cm y tiene una extensión a los nódulos linfáticos debajo del brazo o cuando el nódulo canceroso esta entre 2 y 5 cm, con o sin diseminación a los ganglios de la axila.
- Etapa III A. El nódulo canceroso es menor de 5 cm. y se ha extendido a los ganglios de la axila, se encuentran abigarrados y pegados entre sí o a otras estructuras, o bien, si el nódulo es mayor de 5 cm. con diseminación axilar.
- La etapa III B. El nódulo canceroso se extiende por los tejidos cercanos a la mama, como la piel, las costillas, los músculos del tórax o a los ganglios linfáticos de la pared torácica, cerca del esternón.
- Etapa IV. Cuando las células cancerosas se han diseminado a otros tejidos del cuerpo (huesos, pulmones, hígado o cerebro), también a la piel y a los ganglios linfáticos del cuello y clavícula.

Los índices de supervivencia del cáncer de mama, al menos durante 5 años, son los siguientes:

- I - 98%.
- IIA - 88%.
- IIB - 76%.
- IIIA - 56%.
- IIIB - 49%.
- IV - 16%.

5.2 FACTORES DE RIESGO DEL CÁNCER DE MAMA

No se sabe la causa del cáncer de mama, pero sí se conocen algunos factores de riesgo, considerándose factor de riesgo aquella situación que aumenta la probabilidad de padecer la enfermedad. Estudios realizados en esta población demuestran que los siguientes factores, aumentan la posibilidad de que una persona desarrolle cáncer de mama:

- **Sexo:** el cáncer de mama se da principalmente en la mujer aunque también puede afectar a los hombres, con una relación de uno en cien (1%), con una probabilidad mucho menor que la de las mujeres.
- **Edad:** el cáncer de mama aumenta conforme la mujer envejece, siendo muy raro en mujeres menores de 35 años y más frecuente en mujeres mayores de 40 años.
- **Historia personal de cáncer de mama:** una enfermedad mamaria benigna previa, parece aumentar el riesgo en aquellas mujeres que tienen un gran número de conductos mamarios, también algunos resultados anormales de biopsia de mama, pueden estar relacionados con un riesgo ligeramente elevado de padecerlo. Por otra parte, el riesgo de desarrollar cáncer en la otra mama es diferente de la recurrencia o reaparición del primer cáncer.
- **Raza:** las mujeres blancas son más propensas a padecer esta enfermedad que las de raza negra, aunque la mortalidad en estas últimas es mayor. Las que tienen menor riesgo de padecerlo son las mujeres asiáticas e hispanas.
- **Períodos Menstruales:** cuanto antes se comienza con la menstruación (menor a 12 años) el riesgo de padecer cáncer de mama, es de dos a cuatro veces mayor, si se compara con aquellas que comienzan más tarde su periodo menstrual (mayor a 14 años), lo mismo ocurre en la menopausia, las mujeres con una menopausia tardía (mayor a 55 años) tienen mayor riesgo que las mujeres que inician su menopausia temprana (45 a 48 años). El embarazo después de los 30 años también es un riesgo de padecer cáncer de mama.
- **Historia familiar:** el riesgo a desarrollar cáncer de mama aumenta si lo ha padecido la madre, hermana, hija, o si dos o más parientes cercanos como las primas, tías y abuelas.
- **Terapia de reposición estrogénica:** esta terapia se utiliza para aliviar los síntomas de la menopausia, parece incrementar el riesgo de sufrir cáncer de mama a largo plazo (mayor a 10 años) .

- Dieta: se ha discutido y escrito mucho respecto a la influencia de la dieta en el desarrollo del cáncer de mama, aunque se carece de datos concluyentes, parece que la reducción en la ingesta de grasas y el incremento del consumo de frutas, verduras (carotenos) y de aceite de oliva reduciría el riesgo de padecer esta enfermedad.
- Alcohol y tabaco: el consumo elevado de alcohol, incrementa en un 50% el riesgo de padecer cáncer de mama y respecto al tabaco, los datos son contradictorios, algunos estudios relacionan el incremento de padecer cáncer de mama en fumadoras pasivas, mientras que otros estudios no lo relacionan (Ayubero, 2002).
- El exceso de peso: parece estar relacionado con un riesgo más alto de tener esta enfermedad.
- Ciertos cambios de mama: el haber tenido un diagnóstico de hiperplasia atípica o de Carcinoma Lobular *In Situ* (CLIS) puede aumentar el riesgo de desarrollar el cáncer de mama.
- Genes: existen dos genes identificados el BRCA1 y BRCA2 que cuando mutan elevan la probabilidad de desarrollar el cáncer de mama.
- Estrógeno: estudios sugieren que cuanto más expuesta esta una mujer al consumo de estrógenos existe una mayor probabilidad de que desarrolle cáncer de mama, por ejemplo, las mujeres que inician el consumo de anticonceptivos estrogénicos a temprana edad o por largos períodos de tiempo, al igual que las mujeres que toman terapias de reemplazo de hormonas (Colditz, *et. al.*, 1995).

5.3 SÍNTOMAS

En los estadios iniciales del cáncer de mama la mujer no suele presentar síntomas, aun que sienta dolor de sus mamas, este no es un síntoma de cáncer. El primer signo suele ser una masa que al tacto se nota diferente del tejido mamario que lo rodea, suele ser de bordes irregulares, duro y no duele al tocarlo, en ocasiones aparecen cambios de color y tirantez, en la piel de la zona afectada, aunque no todos los tumores malignos presentan estas características, algunos tienen bordes regulares y son suaves al tacto. En las primeras fases, la masa bajo la piel se puede desplazar con los dedos, y en fases más avanzadas el tumor no se desplaza, ya que está adherido a la pared torácica o a la piel que lo recubre. Otros signos que pueden aparecer son: dolor o retracción del pezón, irritación o hendiduras de la piel, inflamación de una parte del seno,

enrojecimiento o descamación de la piel o del pezón y secreción por el pezón, que no es leche materna.

5.4 TRATAMIENTO

El tratamiento se determina por el tamaño del tumor y según la extensión a los ganglios u otras zonas del cuerpo. Por lo general, cuando el tumor es menor de 1.5 centímetros (cm) de diámetro, la cirugía es suficiente para terminar con el cáncer y no se precisa de quimioterapia; si el tumor mide más de 6 cm. se suele administrar quimioterapia después de la cirugía y cuando el tumor es mayor de 9 cm. puede administrarse quimioterapia antes de la cirugía, para intentar reducir el tamaño.

En el tratamiento del cáncer de mama se utilizan cuatro tipos:

- Cirugía.
- Radioterapia.
- Terapia hormonal.
- Quimioterapia.

Pero también se están realizando estudios clínicos con terapia biológica y con el trasplante de médula ósea.

En primer lugar, se utiliza la cirugía para extraer el nódulo canceroso de la mama y los ganglios linfáticos axilares, los cuales se analizan en el microscopio para detectar la extensión de células cancerosas, permitiendo el control local de la enfermedad.

Radioterapia. Es un tratamiento local que se administra después de la cirugía, consistiendo en el empleo de rayos de alta energía, como rayos X, para destruir o disminuir el número de células cancerosas.

Terapia hormonal. Consiste en la administración de fármacos que bloquean la acción de las hormonas que estimulan el crecimiento de las células cancerosas, se les suministra a pacientes que tienen receptores hormonales positivos, siendo el 60-70% del total de las pacientes diagnosticadas con cáncer de mama.

Como la quimioterapia es el tratamiento de interés, en la presente investigación, a continuación se profundiza en dicho tema.

5.5 QUIMIOTERAPIA

Consiste en la administración de medicamentos anticancerígenos, que destruyen las células cancerosas, para evitar el crecimiento del tumor y la aparición de éste en otras partes del cuerpo, también disminuyen el dolor de la mama afectada. Tratamiento con éxito limitado en el control del cáncer, en etapa avanzada, pero puede usarse cuando el cáncer se ha diseminado o en combinación con otras terapias (American Cancer Society, 2002). Existen dos tipos de quimioterapia, la neoadyuvante y la adyuvante.

Quimioterapia neoadyuvante: es aquella que se realiza antes de la cirugía y sólo en algunos casos; se realiza para reducir el tamaño del tumor y facilitar la extracción en su totalidad, sin necesidad de extirpar más tejido mamario, en el caso de que no haya afectación ganglionar.

Quimioterapia adyuvante: se realiza después de la cirugía para eliminar las posibles células cancerosas, que hayan quedado en cantidades microscópicas e impedir su crecimiento. Solo hay un 10% de todas las pacientes que no reciben tratamiento postoperatorio, son aquellas que tienen afectados los ganglios y el tumor es menor de 1cm. o los receptores hormonales son positivos.

La duración total del tratamiento varía en función de la quimioterapia que precise la paciente, esta terapia se suministra entre tres y ocho meses. Existen varias vías de administración como la vía oral y la vía intravenosa. Se utilizan con frecuencia varios medicamentos combinados que se administran a modo de ciclos, con un período de recuperación entre cada uno.

Los medicamentos anticancerígenos más utilizados son:

- Ciclofosfamida, adriamicina y 5-fluorouracilo (CAF).
- Ciclofosfamida-Doxirubicina (CD).
- Ciclofosfamida, Metrotexate y 5-fluorouracilo (CMF).
- Adriamicina y Ciclofosfamida (AC), con o sin taxol.
- Adriamicina seguida por la serie CMF.

Estos medicamentos eliminan las células anormales que crecen y se reproducen sin control, son sustancias quimioterapéuticas que atacan selectivamente a este tipo de células. Algunas células normales que también se encuentran en etapa proliferativa, en ocasiones son afectadas transitoriamente por la quimioterapia, entre ellas están las células de la médula ósea (la fábrica de los glóbulos rojos,

blancos y plaquetas), las que forman el pelo y las que revisten la mucosa de la boca y el intestino (Oliver, *et. al*, 2002).

Efectos secundarios de la quimioterapia. Se presentan debido a que los medicamentos utilizados en esta terapia son muy fuertes, resultando muy molestos para el paciente, por lo cual se administran junto con ellos otros fármacos para disminuir dichos efectos. Los efectos secundarios más frecuentes son:

- Náuseas y vómitos.
- Caída del cabello.
- Pérdida de apetito.
- Anemia.
- Cansancio.
- Disminución en la capacidad de coagulación de la sangre.
- Llagas en la boca.
- Aumento de las probabilidades de desarrollar infecciones por la disminución de los glóbulos blancos.
- Fatiga.
- Cambios en el ciclo menstrual.
- Hematomas.

5.6 PRUEBAS CITOGÉNÉTICAS

Las pruebas citogenéticas en células somáticas de animales o de humanos, son las más aceptadas para evaluar efectos citotóxicos y genotóxicos, causados por exposición a agentes tóxicos conocidos como potencialmente mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos. Las pruebas citogenéticas más empleadas en la evaluación de efectos genotóxicos de sustancias dañinas, son la prueba de aberraciones cromosómicas (AC), los intercambios de cromátidas hermanas (ICHs) y la de micronúcleos (MNs), en cultivos de linfocitos de sangre periférica (Au, 1991).

5.6.1 Biomarcador de Citotoxicidad. Este biomarcador permite evaluar sustancias con efecto depresor del tiempo de proliferación celular, que en los linfocitos de sangre periférica de humano, tiene una duración promedio de 24 horas. Las pruebas de citotoxicidad más utilizadas son: el índice mitótico (IM) y el índice de proliferación celular (IP).

5.6.2 Biomarcadores de exposición. Los biomarcadores de exposición permiten identificar sustancias extrañas (xenobióticos) o sus metabolitos en un organismo, los cuales se adhieren e interactúan con algunas macromoléculas (ADN, ARN y proteínas), estas sustancias se pueden detectar, identificar y cuantificar en orina, aire aspirado, pelo, sangre, otros fluidos y tejidos corporales

(Hoyos, 1998). Ejemplos de biomarcadores de exposición son la prueba de ICHs y el método de inmunohistoquímica

5.6.3 Biomarcadores de efecto. Estos reflejan cambios fisiológicos, bioquímicos o cualquier alteración identificable en un ser vivo, permitiendo evaluar las alteraciones genéticas como daños cromosómicos, inducidos por exposición a agentes mutagénicos o carcinogénicos, de los cuales se obtienen datos de gran valor, que alertan sobre problemas potenciales de salud. Para la identificación de los efectos genotóxicos se utilizan las pruebas de Micronúcleos (MNs) y aberraciones cromosómicas (AC) (Hoyos, 1998).

5.6.4 Utilidad de las pruebas citogenéticas. Las pruebas cortas (*In vitro e in vivo*) y el monitoreo de personas ocupacionalmente expuestas son necesarias para identificar sustancias en el ambiente que pueden ser potencialmente mutagénicas o carcinogénicas que desarrollan problemas de salud como el cáncer y defectos de nacimiento (Hoyos, 1998).

5.7 LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA

Los linfocitos son células sanguíneas que circulan a través del cuerpo, se encuentran en un estadio no proliferativo (etapa G₀), tienen una vida media aproximada de 4 meses y pueden acumular daños por exposición repetida. Es un tipo de célula ideal para detectar daño por exposición crónica a bajas dosis de agentes dañinos (Au, 1991).

5.8 PRUEBA DE ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN CELULAR

El tiempo promedio de generación celular (TPGC) es el tiempo que tarda una población celular en duplicarse, es decir, producir una nueva descendencia. Para determinarlo se cuantifica el número de células en primer ciclo (M₁), en segundo ciclo (M₂) y en tercer ciclo de división celular (M₃), según el patrón de incorporación de BrdU y se determina por medio de la aplicación de las fórmulas (Lindblad y Lambert, 1981):

$$IP = \frac{1 M_1 + 2 M_2 + 3 M_3}{\text{Total células metafásicas}}$$

$$TPGC = \frac{\text{Tiempo en BrdU}}{IP}$$

Por lo tanto, el índice de proliferación celular (IP), es el número promedio de ciclos o generaciones celulares que completa una población celular en un determinado tiempo de cultivo; en promedio, los linfocitos humanos recorren dos ciclos de división celular, en 72 horas de cultivo.

Una de las técnicas para determinar el tiempo promedio de generación celular (TPGC) es mediante la incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU). El BrdU es un análogo de la timidina. Cuando las células se hacen crecer en presencia de este compuesto, a una determinada concentración, lo incorporan al ADN durante su replicación. La cantidad de BrdU incorporado en el ADN depende de los ciclos de replicación que experimente la célula en su presencia. La incorporación de BrdU en el ADN celular se detecta tiñendo las células mediante la técnica de coloración diferencial, tal como la *fluorocromo-photólisis-Gimsa* (FPG) o con modificaciones de la misma (Wolf y Perry, 1974).

Un ciclo de replicación en presencia de BrdU, origina cromosomas con cromátidas cuyas moléculas de ADN son unifilarmente sustituidas, que mediante la técnica FPG, adopta coloración intensa (oscura). En cambio, la incorporación de BrdU durante el segundo ciclo de replicación, produce cromosomas con una cromátida cuyo ADN es monofilarmente sustituido (coloración oscura) y con la otra cromátida con el ADN bifilarmente sustituido, que presenta coloración pálida o menos intensa. En la tercera generación, en presencia de BrdU, se obtienen, en su gran mayoría, cromosomas con sus dos cromátidas cuyo ADN es bifilarmente sustituido, presenta una coloración pálida o menos intensa, característica principal para identificar a M_3 (Tice, *et.al.*, 1976).

5.9 PRUEBA DE INTERCAMBIOS DE CROMÁTIDAS HERMANAS

Los intercambios de cromátidas hermanas (ICHs) son las manifestaciones de intercambios en el material cromosómico entre cromátidas de un mismo cromosoma o cromátidas hermanas, a nivel citogenético. Es decir, son el resultado de procesos de recombinaciones ocurridos entre moléculas idénticas de ADN, con igual polaridad, aparentemente en loci homólogos de cromosomas interfásicos, durante su replicación (Kato, 1973). Los ICHs son espontáneos y variables en células de tejidos diferentes, son eventos celulares normales que se presentan con una frecuencia basal relativamente baja de 4.23 ± 1.81 ICHs/célula (Carrano, *et.al.*, 1980), la exposición a agentes genotóxicos incrementa su frecuencia (Wolff, 1974).

La primera visualización directa de los ICHs fue realizada por Taylor y Cols, en el año 1957, mediante marcaje de las células con timidina tritiada y el empleo de técnicas autorradiográficas. El desarrollo de técnicas basadas en la incorporación

de bromodesoxiuridina (BrdU) en el material genético de las células eucarióticas ha permitido estudiar el proceso de formación de ICHs con mayor resolución.

Zkharov y Egolina, en el año 1972, encontraron que por medio de la incorporación de BrdU en el material genético de las células tienen un mayor grado de descompensación de las cromátidas, donde mayor cantidad de BrdU era incorporada y por ello una menor afinidad con el colorante Giemsa.

Latt, en el año 1973, mejoró la técnica mediante la tinción de los cromosomas bromosustituídos, con el fluorocromo Hoescht 33258, ya que fueron fácilmente observados al microscopio de fluorescencia. La presencia de BrdU producía una disminución de la fluorescencia, diferenciándose así, los ICHs. Sin embargo la fluorescencia se extinguía rápidamente.

Perry y Wolf, en el año 1974, utilizaron primero Hoechst 33258 y después Giemsa, obteniendo cromosomas teñidos en dos tonos, siendo clara la cromátida más bromosustituída y oscura la menos bromosustituída.

Aunque no se conoce con exactitud el mecanismo molecular de la formación de ICHs, se cree que se inducen por daños causados en el ADN, por compuestos mutagénicos o agentes que afectan su replicación.

La frecuencia de ICHs aumenta incluso a concentraciones más bajas de las normalmente requeridas para aumentar la tasa de aberraciones cromosómicas (ACs). Dada la buena correlación entre tratamiento con mutágenos y aumento de ICHs, este biomarcador es usado como prueba citogenética para evaluar el daño potencialmente causado por agentes mutagénicos o carcinogénicos (Murli, 1998). Pero hasta el momento se desconoce el significado biológico de los ICHs y la naturaleza de las lesiones que los generan.

La prueba de ICHs se lleva a cabo cultivando a las células durante dos rondas de replicación sucesivas, en presencia de BrdU, obteniendo cromosomas con una cromátida cuyo ADN es bifilarmente sustituido con BrdU (aparece débilmente teñida con Giemsa) y otra monofilarmente sustituida (fuertemente teñida), en la segunda mitosis (M_2).

También se puede obtener tinción diferencial cultivando las células en presencia de BrdU durante una sola ronda de replicación, seguida de otra en ausencia del BrdU. Estos métodos se conocen en general como protocolos de segunda generación (M_2). En ambos protocolos, la tasa de ICHs observada en M_2 es la suma de éstos, ocurridos en ambos ciclos de división celular y por tanto no se pueden distinguir los ocurridos en cada uno (Morgan, *et.al.*, 1983).

Se ha propuesto que los ICHs pueden ser inducidos tanto por la cantidad de BrdU incorporada al ADN como por su presencia en el medio de cultivo. Por ello es

necesario controlar el grado de bromosustitución y la cantidad de BrdU en el medio.

5.9.1 Efecto del BrdU: La 5-Bromodesoxiuridina es un análogo de la timidina que posee un átomo de Bromo en la posición 5 del anillo de pirimidina.

Se ha sugerido que, al menos hay dos mecanismos por los cuales el BrdU induce ICHs:

- Uno es dependiente de la concentración del mismo en el medio, que puede ejercer su efecto por desequilibrios en el *pool* de nucleótidos, provocando malos apareamientos durante la replicación, al subir las relaciones dGTP/dATP y dTTP/dCTP, lo que se favorece ciertos tipos transicionales como Adenina–Timina (A–T) por Guanina–Citosina (G–C). La producción de malos apareamientos susceptibles de reparación aumenta la frecuencia de ICHs (Carrano, *et. al.*, 1980; Lambert, *et.al.*, 1983).
- El otro mecanismo se debe a que el BrdU incorporado en el ADN produce distorsiones en la doble hélice, produciendo ICHs, de forma proporcional a la incorporación del mismo.

5.10 PRUEBA DE MICRONÚCLEOS CON CITOCALASINA-B

La prueba de micronúcleos (MNs) es una modificación de la prueba de aberraciones cromosómicas, fue desarrollada en células de médula ósea, por Schmid, en el año 1976, en eritrocitos de sangre periférica. Los MNs se originan de fragmentos cromosómicos acéntricos, cromosomas quebrados o cromosomas enteros que no son incorporados dentro del núcleo de la célula hija, durante la división mitótica (Fenech, 2.000), también se pueden observar translocaciones de cromosomas, como los cromosomas dicéntricos que aparecen formando un puente nucleoplásmico. Durante la telofase, a estos cromosomas o fragmentos se les forma una envoltura que les da la forma de un núcleo más pequeño, puede ser redondo o medianamente ovalado, permitiéndoles ser detectados fácilmente (Bonassi, 2001). Esta técnica se usa ampliamente para detectar agentes mutagénicos o carcinogénicos que inducen la formación de quiebres en los cromosomas o alteraciones en el aparato del huso mitótico. Para observar micronúcleos es necesario que ocurra una sola división celular, para ésto, se bloquea a la célula en división con Citocalasina B, la cual inhibe la citocinesis, logrando obtener células binucleadas.

Fueron Fenech y Morley, en el año 1985, quienes utilizaron Citocalasina B para obtener células binucleadas en primer ciclo. La Citocalasina B por sí sola no induce MNs, es una sustancia que inhibe la polimerización de la actina, requerida para que se formen microfilamentos que constriñen el citoplasma entre los núcleos de las células hijas (Fenech, 1998)..

Una de las grandes ventajas de la prueba de MNs es que una técnica muy fácil de realizar, ya que utiliza un método sencillo, estadísticamente es más preciso que los análisis tradicionales, como Aberraciones cromosómicas e Intercambios de cromátidas hermanas, debido a que se contabiliza un número mayor de células (Sayer, 1988).

La frecuencia promedio de MNs en una persona sana es de 16.4 ± 2.6 MNs, en 2000 células. Las células que se registran son las que han pasado por una sola división celular, debido a que, en un segundo ciclo existe la probabilidad de que el daño sea reparado (Venkatachalam, *et.al.*, 1998).

La Significancia biológica de los MNs se debe a que permite observar defectos producidos en los cromosomas, que a largo plazo pueden desarrollar cáncer, defectos de nacimientos o enfermedades genéticas (Au, 1991). Las anomalías cromosómicas han sido asociadas a diversos tipos de cáncer como Leucemia y Retinoblastoma, a enfermedades congénitas, como el Síndrome de Bloom y Ataxia Telangiectasia. Existe una fuerte correlación entre la carcinogenicidad y la genotoxicidad para algunos agentes potencialmente tóxicos que aumentan la frecuencia de MNs, en humanos y animales. Se ha considerado que los MNs además de marcadores de efecto son indicadores de respuesta biológica potencial a agentes genotóxicos.

6. METODOLOGÍA

6.1 TIPO DE ESTUDIO

Este estudio fue conducido mediante el diseño caso-control, utilizando las pruebas citogenéticas como el índice de proliferación celular (IP), intercambios de cromátidas hermanas (ICHs) y micronúcleos (MNs), en linfocitos de sangre periférica de 20 personas con previo diagnóstico clínico de cáncer de mama (casos) y de 22 personas sin cáncer (controles), provenientes del Departamento del Cauca. Por otra parte, de las 20 personas con cáncer de mama, se tuvieron en cuenta a 10 personas que recibieran un ciclo (28-30 días) de quimioterapia.

6.2 POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO

En la sección de consulta externa del área de Oncología del Hospital Susana López de Valencia, Clínica Comsalud y la Unidad Oncológica del Cauca, se contactó la población de estudio, quienes recibieron motivación, acerca de la importancia de la investigación llevada a cabo, luego las personas que voluntariamente aceptaban participar en el estudio, firmaron el consentimiento informado, que contiene las ventajas y desventajas a que el participante se expone, después realizaron el diligenciamiento de una encuesta, que resalta sus principales características socio-demográficas, como sexo, edad, grupo étnico, estado civil, ocupación, edad de la menarquia y menopausia, número de embarazos, edad del primer parto, abortos, lactancia, obesidad, consumo de anticonceptivos, si fuma, si ingiere alcohol y tipo de combustible que utiliza (gas, leña o electricidad), las cuales permitieron la conformación de parejas caso-control.

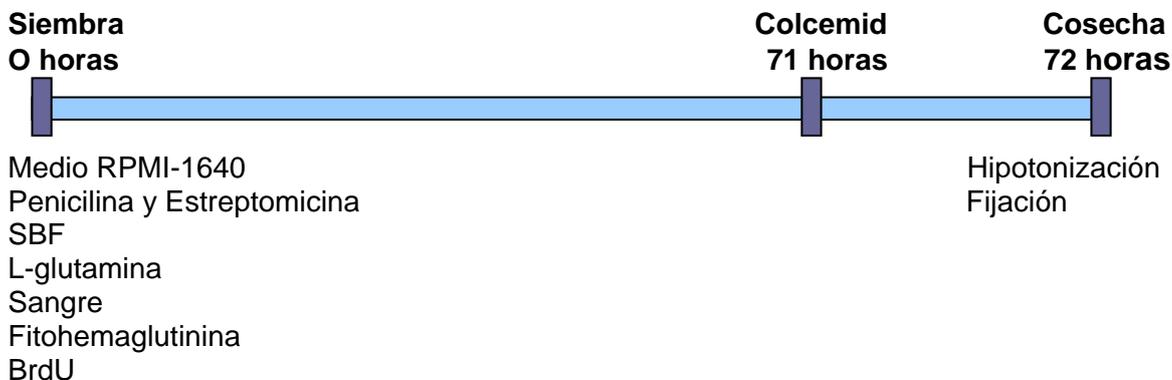
La población de estudio debía cumplir ciertos parámetros como tener una edad mayor de 18 años y ser provenientes del Departamento de Cauca. Para el grupo de casos se tuvo en cuenta como criterio de inclusión que las personas llegaran por primera vez a consulta oncológica y se les diagnosticara cáncer de mama y como criterios de exclusión, si se encontraban en la sección de urgencias de los centros de salud, que estuvieran en etapa terminal o que el cáncer fuera metastásico y que hubieran padecido algún tipo de enfermedad infecciosa como Hepatitis o Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), mientras que para el grupo de controles el criterio de inclusión fue que no tuvieran cáncer.

6.3 TOMA DE LA MUESTRA DE SANGRE, SIEMBRA Y COSECHA DE LINFOCITOS

A cada una de las personas objeto de estudio se les tomó una muestra de 2 mL de sangre periférica, con jeringa de 10 mL, previamente heparinizada. Este procedimiento se realizó teniendo en cuenta las normas de bioseguridad (utilización de guantes y jeringas estériles, correcta desinfección, con alcohol antiséptico y algodón, en el área de donde se toma la muestra de sangre) y por una persona especializada. Para las personas con quimioterapia, se tomó una muestra de sangre antes de iniciar el tratamiento, como patrón de control y una muestra después del primer ciclo (28-30 días).

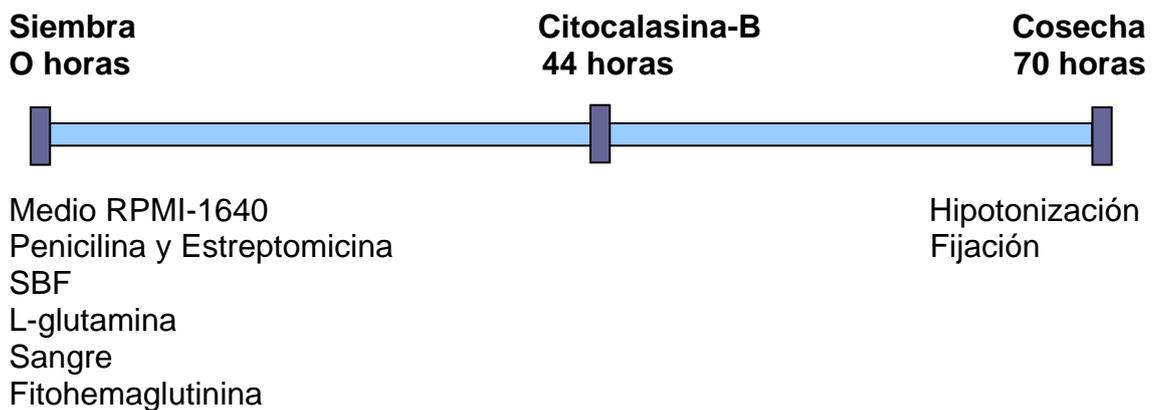
Después de colectada la muestra, fue llevada al laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca, donde se realizó la siembra de linfocitos humanos, que consiste en adicionar 0.5 mL de sangre periférica a 4.5 mL de medio de cultivo RPMI-1640 con penicilina-estreptomicina a una concentración final de 100 µg/ml, suero bovino fetal (0.5%), L-glutamina a 2mM y fitohemaglutinina (10 µg/mL). Al finalizar la siembra (hora cero), se les adicionó BrdU (6.5×10^{-5} M) a los cultivos para las pruebas de intercambios de cromátidas hermanas (ICHs) e índice de proliferación celular (IP), con el fin de marcar el ADN. Los cultivos se incubaron a 37°C por 71 horas, pasado este tiempo se les adicionó colcemid (1 µg/mL), para detener el ciclo celular en metafase, obteniendo un gran número de éstas en segundo ciclo (M2), los cultivos se regresan a la incubadora (37°C) por 1 hora más, pasado este tiempo se procedió a la cosecha de linfocitos, mediante el proceso de hipotonización y fijación, un día después se realizaron las preparaciones citogenéticas, en portaobjetos limpios que permanecieron en ácido acético frío al 60%, estos extendidos se secaron en la plancha a 45 °C y tres días después, estas preparaciones se colorearon con tinción diferencial. Las placas obtenidas se montaron permanentemente y se les realizó un doble ciego, para evitar sesgar los resultados a la hora de su lectura en el microscopio (objetivo de 100X) (Hoyos, *et.al.*, 2002) (ver figura 1).

Figura 1. Protocolo para las pruebas de IP e ICHs.



Para la prueba de MNs, la siembra de linfocitos se realizó de igual forma que la anterior, a diferencia que a los cultivos no se les adicionó BrdU, pero sí Citocalasina-B (6 $\mu\text{g/mL}$), a las 44 horas después de la siembra y a las 70 horas de cultivo se cosechó así: los cultivos se centrifugaron durante 5 minutos a 1000 revoluciones por minuto (1000 rpm), luego se procedió a la hipotonización por 1-3 minutos e inmediatamente se realizó el proceso de prefijación con fijador carnoy (1:3 ácido acético:metanol), en este paso, el botón celular se remueve con mucho cuidado y se vuelve a centrifugar de igual manera, después se realizaron tres fijaciones más, para finalmente realizar los extendidos citogenéticos en portaobjetos limpios y fríos, se secan en la plancha a 45 °C, al día siguiente se colorean con tinción directa (Gimsa al 10%) por 3 minutos. El registro de MNs se hizo en células binucleadas, mediante la observación al microscopio (objetivo de 40X). A las placas obtenidas se les realizó un doble ciego para evitar sesgar los resultados (Hoyos, *et.al.*, 2002) (ver figura 2).

Figura 2. Protocolo para la prueba de MNs.



7. DISEÑO EXPERIMENTAL

En esta investigación se trabajó con dos variables independientes y con tres variables dependientes, tales como:

El cáncer de mama, como la primer variable independiente, con las categorías: personas con cáncer de mama y personas sin cáncer. El tratamiento del cáncer de mama con quimioterapia, como la segunda variable independiente, con las categorías: cáncer de mama tratado con quimioterapia y cáncer de mama sin quimioterapia.

Las variables dependientes son: el efecto citotóxico (índice de proliferación celular (IP)), de exposición (intercambios de cromátidas hermanas (ICHs)) y genotóxico (micronúcleos (MNs)).

7.1 PERSONAS CON Y SIN CÁNCER DE MAMA

Por cada persona se tomó una muestra de sangre periférica de 2 mL, con la que se realizaron 4 cultivos de linfocitos: dos de ellos para el registro del IP e ICHs y los dos restantes para la evaluación de MNs. Por cultivo se obtubieron 3 placas o sea 6 placas por prueba y 12 por persona. Para ICHs, en cada placa se analizaron 17 metafases de segundo ciclo (M_2), para un total de 50 M_2 por cultivo y 100 M_2 por persona; para el IP se analizaron aproximadamente 33 metafases por placa, para un total de 100 metafases por cultivo y 200 metafases por persona, y para el registro de MNs se analizaron aproximadamente 700 células binucleadas por placa, 2000 por cultivo y 4000 células por persona.

Los ICHs se registraron como el número promedio por célula en M_2 (frecuencia de ICHs/célula) en cada cultivo, registrando 100 M_2 por persona. Calculado mediante la fórmula:

$$\text{Frecuencia de ICHs/célula} = \frac{\text{No. Total de ICHs}}{\text{Total de células } M_2}$$

Para el IP se trabajó con el número promedio de ciclos, en primer ciclo (M_1), segundo ciclo (M_2) y tercer ciclo (M_3), en 200 células metafásicas por persona, mediante la utilización de las fórmulas:

$$IP = \frac{1 M_1 + 2 M_2 + 3 M_3}{\text{Total células metafásicas}}$$

$$TPGC = \frac{\text{Tiempo en BrdU}}{IP}$$

7.1.1 Análisis estadístico. El análisis de los resultados se realizó mediante la prueba paramétrica t-student para varianzas iguales y desiguales, la no paramétrica de Mann-Whitney, la de Chi-cuadrado y la prueba exacta de Fisher, según el paquete estadístico SPSS, teniendo en cuenta un nivel de significancia estadística de 0.05.

7.2 PERSONAS CON CÁNCER DE MAMA, ANTES Y DESPUÉS DE LA QUIMIOTERAPIA

Para el grupo de personas que recibieron quimioterapia, se tomó una muestra de sangre antes del tratamiento y otra después de éste. De cada una se realizaron 4 cultivos de linfocitos para las mismas pruebas y diseño descrito en el numeral 7.1.

7.2.1 Análisis estadístico. El análisis de los resultados se realizó mediante la prueba paramétrica t-student, para muestras dependientes y la prueba no paramétrica de Wilcoxon para datos pareados, según el paquete estadístico SPSS, teniendo en cuenta un nivel de significancia estadística de 0.05.

8. RESULTADOS

8.1 CARÁCTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Como se observa en la Tabla 1, en el análisis estadístico de las características socio-demográficas no se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$) entre el grupo de controles y de casos, lo cual indica que fueron muy semejantes entre sí, permitiendo la conformación de parejas caso-control, en el momento de la selección de la población de estudio, permitiendo disminuir el sesgo de los resultados obtenidos mediante la evaluación de las diferentes pruebas citogenéticas utilizadas en esta investigación. No obstante, este estudio es de carácter observacional o *postfacto* y aún es posible que permanezcan factores o variables incontrolables.

8.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO EN LAS PERSONAS CON CÁNCER DE MAMA

En la Tabla 2 y Figura 3, se observa que el índice de proliferación celular (IP) para las personas con cáncer de mama es de 1.5293 ± 0.04559 ciclos, siendo estadísticamente significativo ($P < 0.000$) en comparación al registrado en las personas sin cáncer (1.9336 ± 0.03936 ciclos). Es decir que el tiempo promedio de generación celular (TPGC) de los linfocitos de las personas con cáncer de mama fue de 32 horas, ya que sólo completan un ciclo y medio de división celular, durante las 72 horas de cultivo, respecto a los linfocitos de las personas sin cáncer, que recorrieron aproximadamente dos ciclos de división celular, en el mismo tiempo de cultivo, con un TPGC de 25 horas (ver figuras 6,7,8 y 9).

Lo anteriormente planteado muestra que el cáncer de mama posiblemente tiene efecto citotóxico en los linfocitos de sangre periférica de las personas con esta enfermedad, influyendo en su avance a lo largo del ciclo celular, lo que ocasiona que éstos sean más lentos respecto a los de las personas sin cáncer.

Tabla 1. Características socio-demográficas de la población de estudio.

Características	Casos % (N)	Controles % (N)	Significancia <i>P</i>
Estado civil			
Casada	70 (14)	77.3 (17)	0.844 ^a
Viuda	10 (2)	9.1 (2)	
Soltera	20 (4)	13.6 (3)	
Ocupación			
Ama de casa	60 (12)	50 (11)	0.622
Educativa	15 (3)	27.3 (6)	
Servicios generales	25 (5)	2.7 (5)	
Sexo			
Femenino	95 (19)	95 (21)	0.430
Masculino	5 (1)	5 (1)	
Grupo étnico			
Mestizo	90 (18)	90 (20)	0.920
Negro	10 (2)	10 (2)	
Abortos			
Si	30 (6)	27.3 (6)	0.845
No	70 (14)	72.7 (16)	
Lactancia			
Si	75 (15)	72.7 (16)	0.867
No	25 (5)	27.3 (6)	
Obesidad			
Si	55 (11)	68.2 (15)	0.380
No	45 (9)	31.8 (7)	
Anticonceptivos			
Si	45 (9)	40.9 (9)	0.789
No	55 (11)	59.1 (13)	
Fumador (a)			
Si	10 (2)	9.1 (2)	0.920
No	90 (18)	90.9 (20)	
Ingiere alcohol			
Si	10 (2)	4.5 (1)	0.490
No	90 (18)	95.5 (21)	
Cocina con			
Gas	55 (11)	81.8 (18)	0.082
Leña	15 (3)	-----	
Electricidad	30 (6)	18.2 (4)	
	$\bar{X} \pm \epsilon \epsilon$	$\bar{X} \pm \epsilon \epsilon$	<i>P</i>
Edad (Años)	55 ± 2.1885 (20)	50 ± 2.3933 (22)	0.155 ^b
Edad de la menarquia	13.95 ± 0.44 (19)	13.38 ± 0.34 (21)	0.308
Edad de la menopausia	49.80 ± 0.18 (8)	47.63 ± 0.84 (10)	0.173
Edad del primer parto	21.18 ± 0.87 (17)	23 ± 1.53 (18)	0.314
Número de embarazos	2.85 ± 0.47 (18)	3.05 ± 0.45 (20)	0.765

X: Media aritmética; $\epsilon \epsilon$: Error estándar.

N: Número de personas.

^a: Significancia estadística (*P*) calculada mediante la prueba de Chi-cuadrado y la prueba exacta de Fisher.

^b: Significancia estadística (*P*) calculada mediante la prueba t-student.

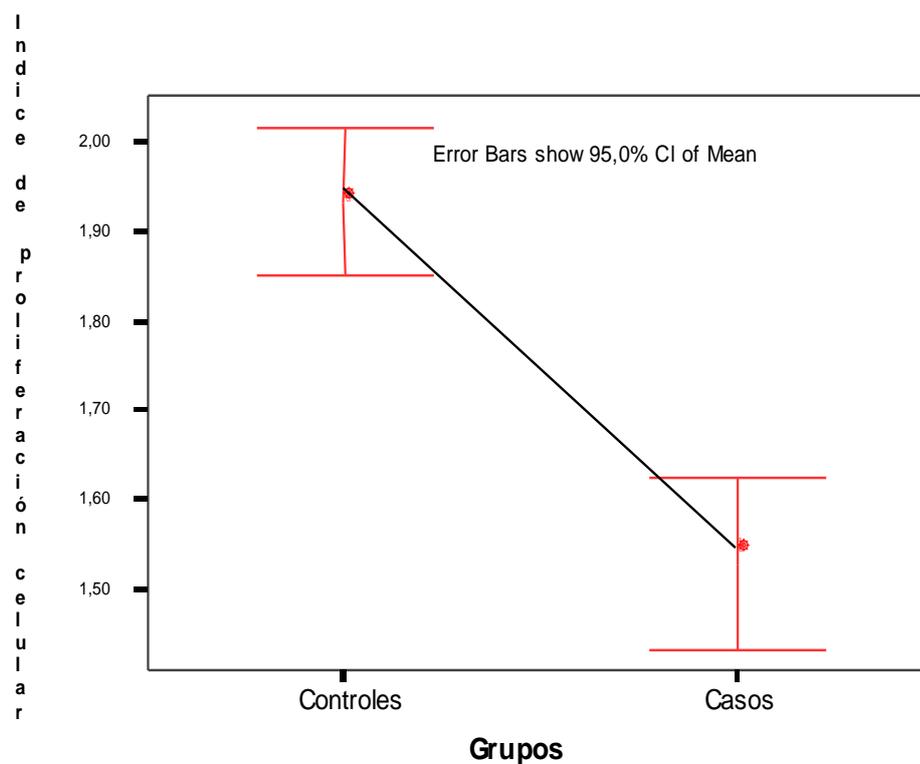
Tabla 2. Resultados del efecto citotóxico en personas con cáncer de mama respecto a sus controles.

Grupo	IP $X \pm \varepsilon \varepsilon (n)$	N	S
Casos	$1.5293 \pm 0.04559 (200)$	20	0.20389
Controles	$1.9336 \pm 0.03936 (200)$	22	0.18460
Significancia			
<i>P</i>	0.000 ^a		

X: Media aritmética; $\varepsilon \varepsilon$: Error estándar; n: número de células analizadas por persona; N: número de personas; S: desviación estándar.

^a: Significancia estadística (*P*) calculada mediante la prueba t-student para varianzas iguales y la prueba no paramétrica de Mann-whitney.

Figura 3. Índice de proliferación celular en personas con cáncer de mama respecto a sus controles.



8.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE EXPOSICIÓN EN PERSONAS CON CÁNCER DE MAMA

En la Tabla 3 y Figura 4, se observa que la frecuencia de los intercambios de cromáticas hermanas (ICHs) por célula (frecuencia ICHs/célula) en las personas con cáncer de mama fue de 5.8415 ± 0.46584 ICHs/célula, siendo estadísticamente significativo ($P < 0.000$) en comparación a la encontrada en las personas sin cáncer (3.3277 ± 0.18807 ICHs/célula). Indicando que la frecuencia de ICHs se incrementó en un 75.5 % respecto a la de las personas sin cáncer.

Resultados que muestran un posible efecto de exposición en los linfocitos de sangre periférica de las personas con cáncer de mama, expresándose como alteraciones en la molécula de ADN (ver figura 10).

Tabla 3. Resultados del efecto de exposición en personas con cáncer de mama respecto a sus controles.

Grupo	ICHs $X \pm \varepsilon \varepsilon$ (n)	N	S
Casos	5.8415 ± 0.46584 (100)	20	2.08328
Controles	3.3277 ± 0.18807 (100)	22	0.88212
Significancia			
<i>P</i>	0.000 ^a		

X: Media aritmética

$\varepsilon \varepsilon$: Error estándar

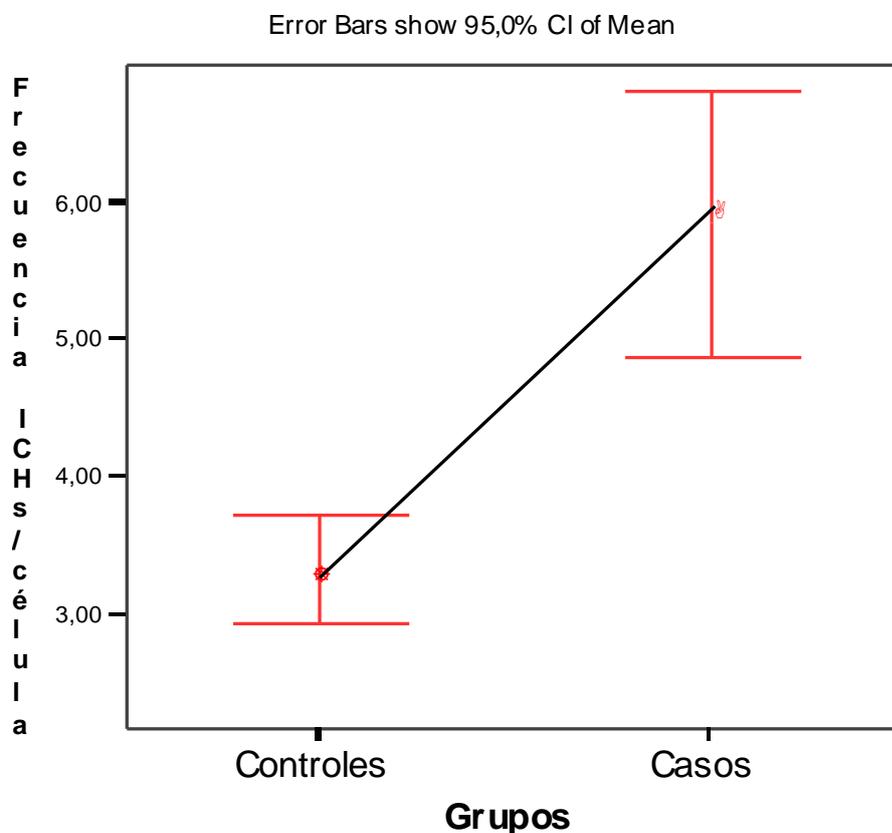
n: Número de células analizadas por persona

N: Número de personas

S: Desviación estándar.

^a: Significancia estadística (*P*) calculada mediante la prueba t-student para varianzas desiguales.

Figura 4. Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas en personas con cáncer de mama respecto a sus controles.



8.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO EN PERSONAS CON CÁNCER DE MAMA

En la Tabla 4 y Figura 5, se puede observar que el número total de micronúcleos (MNs) en 4000 células binucleadas (N° total MNs/4000 células) fue de 90.700 ± 8.60266 MNs/4000 células en los linfocitos de las personas con cáncer de mama, siendo estadísticamente significativo ($P < 0.000$) en relación al presentado por las personas sin cáncer (40.1364 ± 2.99154 MNs/4000 células). En el registro de MNs se encontró la formación de puentes cromosómicos, que por su baja frecuencia no se realizó su análisis estadístico (ver figuras 11, 12, 13 y 14).

Los resultados obtenidos permiten inferir que en los linfocitos de las personas con cáncer de mama se expresa un mayor efecto genotóxico (120%), indicando que probablemente son más afectados por agentes tóxicos que causan daño en la molécula de ADN.

Tabla 4. Resultados del efecto genotóxico en personas con cáncer de mama respecto a sus controles

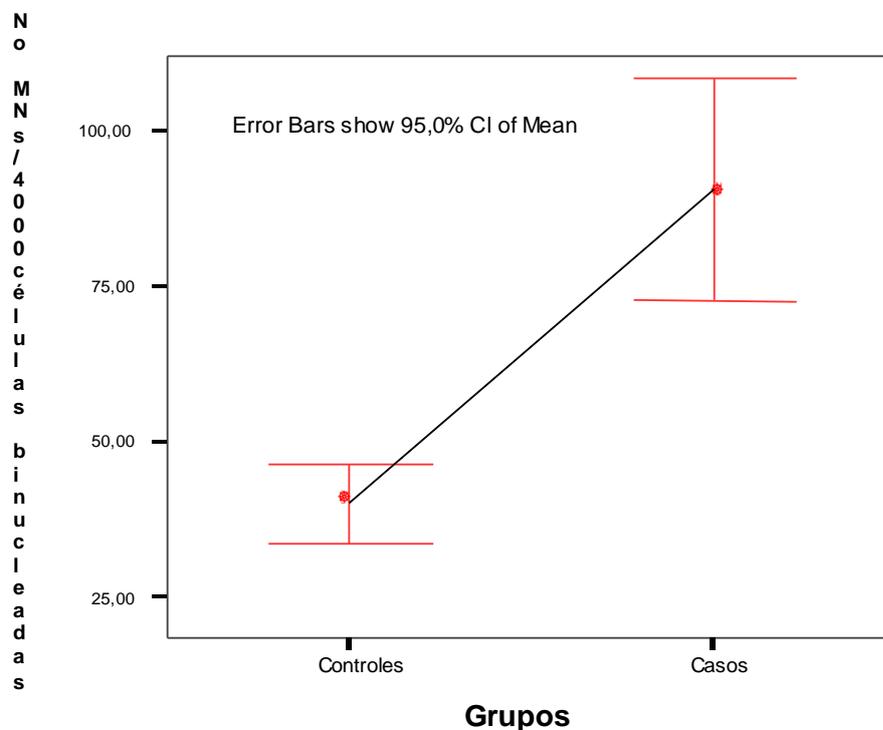
Grupo	MNs $X \pm \varepsilon \varepsilon (n)$	N	S
Casos	90.700 \pm 8.60266 (4000)	20	38.47227
Controles	40.1364 \pm 2.99154 (4000)	22	14.03158

Significancia			
<i>P</i>	0.000 ^a		

X: Media aritmética; $\varepsilon \varepsilon$: Error estándar; n: número de células analizadas por persona; N: número de personas; S: desviación estándar.

^a: Significancia estadística (*P*) calculada mediante la prueba t-student para varianzas desiguales.

Figura 5. Número total de micronúcleos en personas con cáncer de mama respecto a sus controles.



8.5 CONCENTRACIÓN DE LAS SUSTANCIAS UTILIZADAS EN LA QUIMIOTERAPIA.

En la Tabla 5, se reporta el número de personas incluidas en el estudio, el estadio del cáncer de mama y el régimen de tratamiento que se les suministró durante la quimioterapia. Mediante análisis de correlación de Spearman se logró establecer que no existe asociación o dependencia ($P > 0.05$) entre las concentraciones de las mezclas de sustancias Ciclofosfamida, Metrotexate y 5-fluorouracilo (CMF) y de la Ciclofosfamida-Doxirubicina (CD), con el efecto citotóxico, de exposición y genotóxico, posiblemente porque las cantidades suministradas fueron semejantes entre si. Por lo anterior, se agrupó en tratamiento 1, a las 7 personas que recibieron la mezcla CMF y como tratamiento 2, a las 3 personas que recibieron la mezcla CD, para poder determinar una relación entre la mezcla de estas sustancias y el posible daño en el material genético.

Tabla 5. Régimen de tratamiento utilizado en la quimioterapia del cáncer de mama.

N	MEZCLA DE SUSTANCIAS					TOTAL [mg/mL]
	Ciclofosfamida [mg/mL]	Metrotexate [mg/mL]	5-Fluorouracilo [mg/mL]	Ciclofosfamida [mg/mL]	Doxirubicina [mg/mL]	
3	800	60	800			1660
3	1000	60	1000			2060
1	800	70	800			1670
1				1000	80	1080
1				900	80	980
1				1000	90	1090

8.6 EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO INDUCIDO POR LA QUIMIOTERAPIA, EN PERSONAS CON CÁNCER DE MAMA

En la Tabla 6, se observa que el índice de proliferación celular (IP) de los linfocitos de las personas con cáncer de mama, antes de ser expuestos a la quimioterapia con CMF y CD (1.5960 ± 0.07971 ciclos), no fue estadísticamente

significativo ($P=0.673$) en relación al encontrado después de esta terapia (1.6540 ± 0.08622 ciclos). Teniendo en cuenta cada una de las mezclas de sustancias utilizadas en la quimioterapia, se observó que el índice de proliferación celular (IP) antes de suministrarse Ciclofosfamida, Metrotexate y 5-fluorouracilo (CMF) es de 1.57 ± 0.099 ciclos, no presentó diferencia estadísticamente significativa ($P=0.87$) en comparación al encontrado después de este tratamiento (1.63 ± 0.29 ciclos), de igual manera, para el tratamiento con Ciclofosfamida-Doxirubicina (CD) no se observó diferencia estadísticamente significativa ($P=0.593$) entre el IP registrado antes (1.66 ± 0.50 ciclos) y después de éste (1.70 ± 0.27 ciclos). Por otra parte, se observó que entre los tratamientos CMF y CD no existió diferencia estadísticamente significativa ($P=0.489$).

Estos resultados indican que la mezcla de sustancias utilizadas en la quimioterapia (CMF y CD) del cáncer de mama posiblemente no tienen efecto citotóxico que ocasione un bloqueo o dificultad a lo largo del ciclo celular de los linfocitos de las personas con esta enfermedad, ya que sus linfocitos recorren en promedio un ciclo y medio de división celular, durante las 72 horas de cultivo.

Tabla 6. Resultados del efecto citotóxico inducido por la quimioterapia en las personas con cáncer de mama.

Quimioterapia	IP X \pm S (N)		
	CMF	CD ^b	Total
Antes	1.57 \pm 0.099 (7)	1.66 \pm 0.50 (3)	1.5960 \pm 0.07971 (10)
Después	1.63 \pm 0.29 (7)	1.70 \pm 0.27 (3)	1.6540 \pm 0.08622 (10)
Significancia <i>P</i>	0.87 ^a	0.593	0.673

X: Media aritmética

S: Desviación estándar

N: Número de personas

^a: Significancia estadística (P) evaluada mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon para datos pareados.

^b: No presenta diferencia estadísticamente significativa ($P=0.489$) respecto al tratamiento CMF, evaluada mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon para datos pareados.

8.7 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE EXPOSICIÓN INDUCIDO POR LA QUIMIOTERAPIA, EN LAS PERSONAS CON CÁNCER DE MAMA

En la Tabla 7, se observa que la frecuencia de intercambios de cromáticas hermanas (ICHs) por célula (frecuencia ICHs/célula) antes de la quimioterapia con la Ciclofosfamida, Metrotexate y 5-Fluorouracilo (CMF) y la Ciclofosfamida-Doxirubicina (CD) es de 6.1280 ± 0.6729 ICHs/célula, siendo estadísticamente significativa ($P = 0.000$) respecto a la registrada después de este tratamiento (9.4290 ± 0.2436 ICHs/célula). En cada uno de los tratamientos de la quimioterapia, se observó que la frecuencia de ICHs antes de la CMF es de 7.01 ± 0.82 ICHs/célula, siendo estadísticamente significativa ($P = 0.018$) en comparación a la encontrada después de este tratamiento (9.39 ± 0.93 ICHs/célula), mientras que en el tratamiento con CD no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.109$) entre la frecuencia de ICHs registrada antes (4.06 ± 1.16 ICHs/célula) y después de éste (9.52 ± 0.20 ICHs/célula). Por otra parte, se observó que entre los tratamientos CMF y CD no existió una diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.06$).

El incremento significativo (54 %) en la frecuencia de ICHs por célula indica que las sustancias CMF y CD empleadas en la quimioterapia del cáncer de mama posiblemente están interactuando con el ADN, exponiéndolo a situaciones adversas, que de alguna manera inducen la formación de ICHs (ver figura 15).

Tabla 7. Resultados del efecto de exposición inducido por la quimioterapia en las personas con cáncer de mama.

Quimioterapia	ICHs		
	CMF	CD ^b	Total
Antes	7.01 ± 0.82 (7)	4.06 ± 1.16 (3)	6.1280 ± 0.6729 (10)
Después	9.39 ± 0.93 (7)	9.52 ± 0.20 (3)	9.4290 ± 0.2436 (10)
Significancia			
<i>P</i>	0.018 ^a	0.008	0.000

X: Media aritmética S: Desviación estándar

N: Número de personas

^a: Significancia estadística (*P*) evaluada mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon para datos pareados.

^b: No presenta diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.06$) respecto al tratamiento CMF, evaluada mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon para datos pareados.

8.8 EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO INDUCIDO POR LA QUIMIOTERAPIA, EN LAS PERSONAS CON CÁNCER DE MAMA

En la Tabla 8, se observa que el número total de micronúcleos (MNs) en 4000 células binucleadas (N° total MNs/4000 células), antes de la quimioterapia con la Ciclofosfamida, Metrotexate y 5-fluorouracilo (CMF) y la Ciclofosfamida-Doxirubicina (CD) fue de 80.70 ± 9.8737 MNs/4000 células, presentó diferencia estadísticamente significativo ($P = 0.000$) en comparación al encontrado después de este tratamiento (138.90 ± 8.8950 MNs/4000 células). Teniendo en cuenta cada uno de los tratamientos de la quimioterapia, se observó que el número total de MNs registrado antes de la CMF fue de 85 ± 32.53 MNs/4000 células, siendo estadísticamente significativo ($P = 0.018$) en relación al encontrado después de este tratamiento (145.86 ± 25.50 MNs/4000 células), por otra parte, en el tratamiento con CD no fue estadísticamente significativo ($P = 0.109$), entre el número total de MNs registrado antes de suministrarse CD (70.67 ± 31.56 MNs/4000 células) y después de éste (122.67 ± 32.33 MNs/4000 células). Por otra parte, se observó que entre los tratamientos CMF y CD no existió diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.391$).

Así, las sustancias CMF y CD utilizadas en la quimioterapia posiblemente actúan a nivel de la molécula de ADN, ocasionando un incremento del 72.12% en el número promedio de MNs en los linfocitos de las personas con cáncer de mama, respecto al encontrado antes de este tratamiento (ver figura 16).

Tabla 8. Resultados del efecto genotóxico inducido por la quimioterapia en las personas con cáncer de mama.

Quimioterapia	MNs		
	X \pm S (N)		
	CMF	CD ^b	Total
Antes	85.00 \pm 32.53 (7)	70.67 \pm 31.56 (3)	80.70 \pm 9.8737 (10)
Después	145.86 \pm 25.50 (7)	122.67 \pm 32.33 (3)	138.90 \pm 8.8950 (10)
Significancia			
<i>P</i>	0.018 ^a	0.109	0.000

X: Media aritmética S: Desviación estándar N: Número de personas
^a: Significancia estadística (*P*) evaluada mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon para datos pareados.

^b: No presenta diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.391$) respecto al tratamiento CMF, evaluada mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon para datos pareados.

Figura 6. Linfocitos en metafase de primer ciclo (M_1), aumento de 100X.

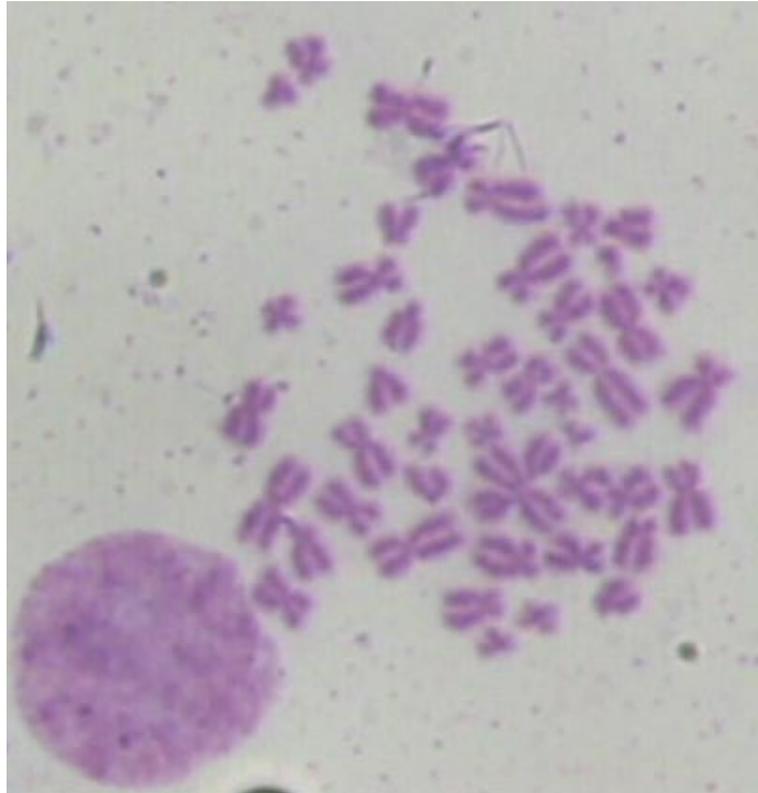


Figura 7. Linfocitos en metafase de segundo ciclo (M_2), aumento de 100X.

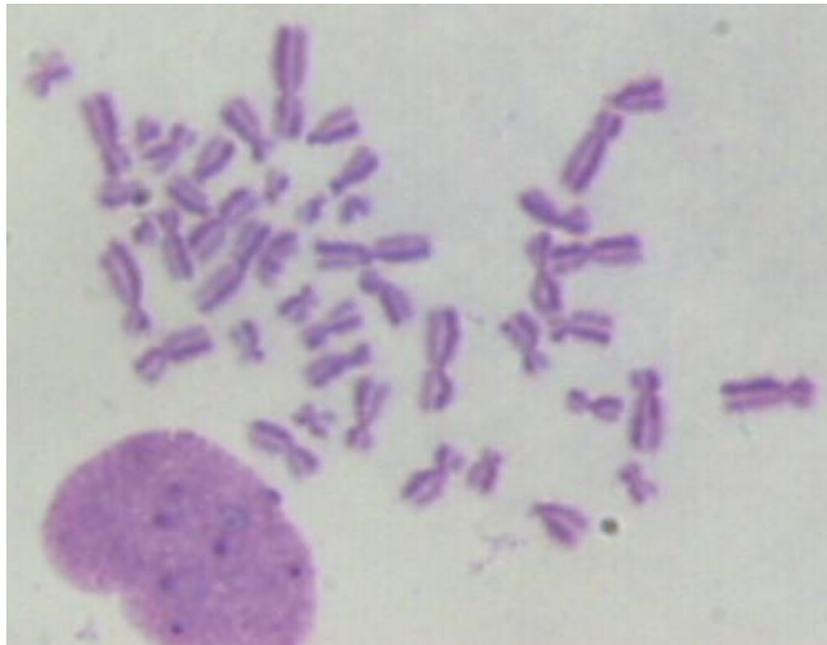


Figura 8. Linfocitos en metafase de tercer ciclo (M_3), aumento de 100X.

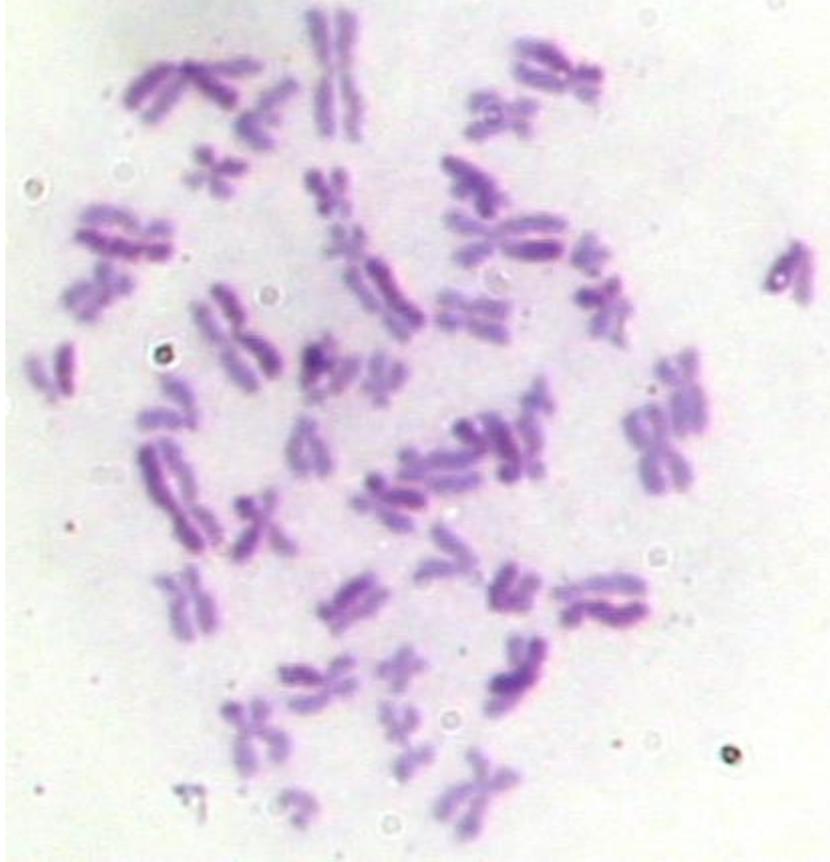


Figura 9. Panorámica de linfocitos, en aumento de 10X.

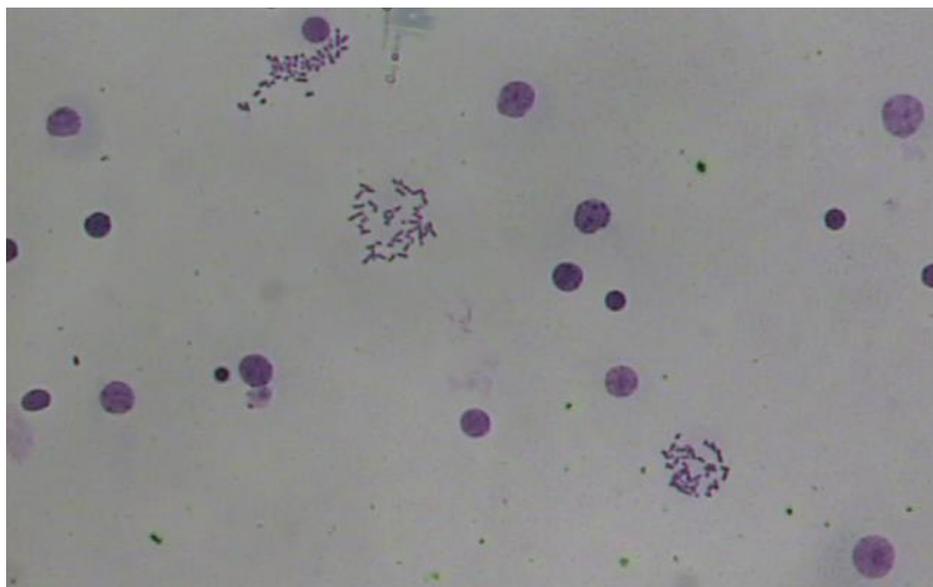


Figura 10. Intercambios de cromátidas hermanas (ICHs) en metafase de segundo ciclo (M_2), aumento de 100X.

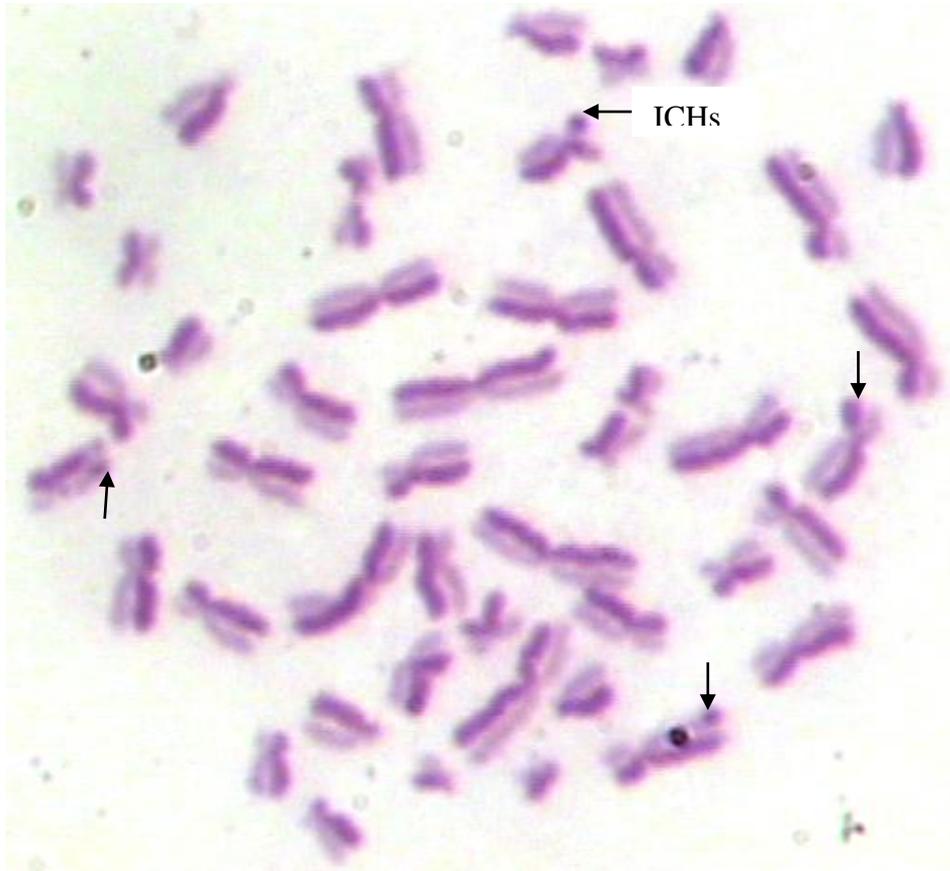


Figura 11. Célula binucleada, aumento de 60X.

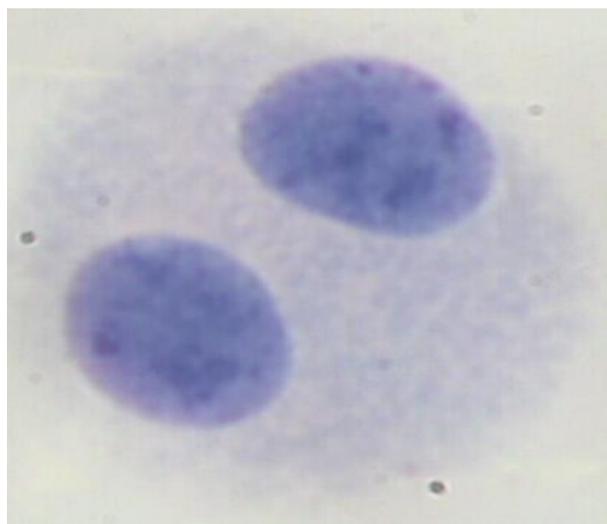


Figura 12. Micronúcleos (MNs) en célula binucleada, aumento de 60X.

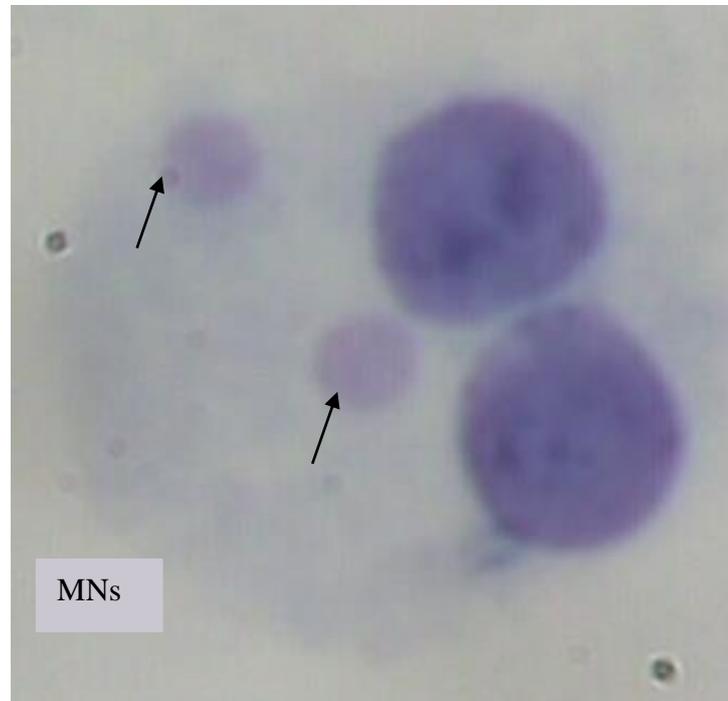


Figura 13. Panorámica de células binucleadas, aumento de 10X.

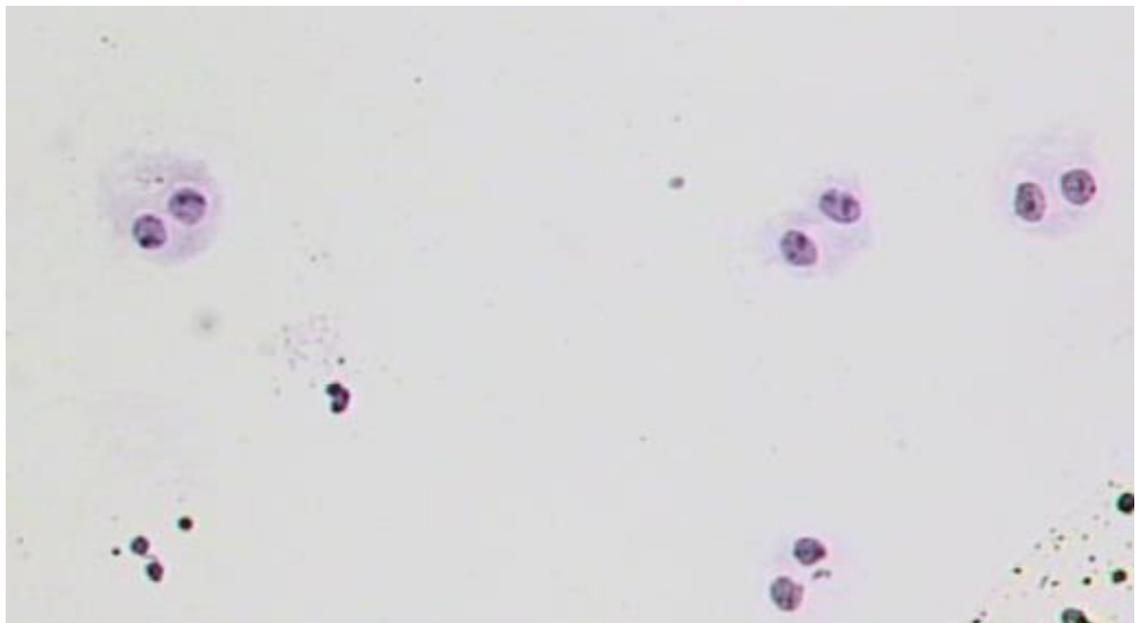


Figura 14. Puente cromosómico en célula binucleada, aumento de 60X.

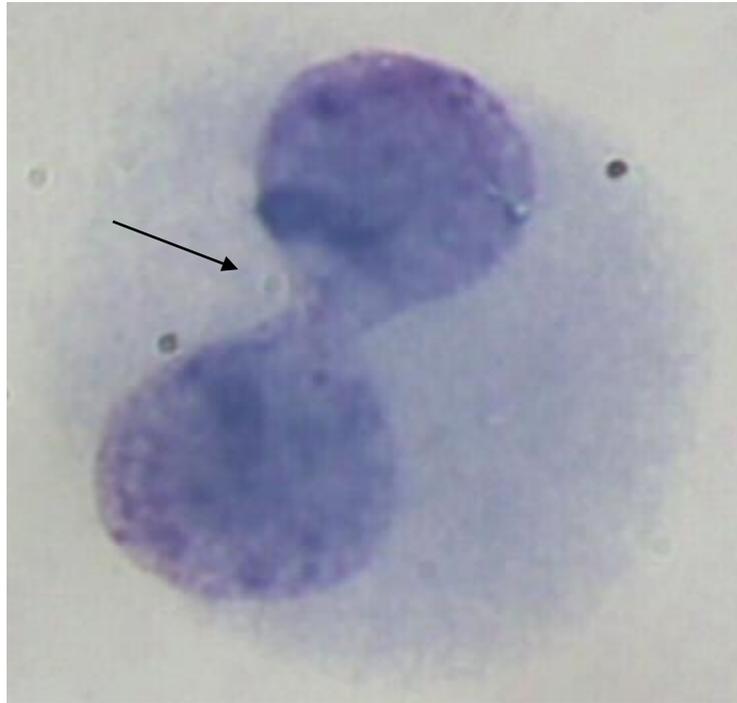


Figura 15. Intercambios de cromátidas hermanas (ICHs) en metafase de segundo ciclo (M_2) antes y después de la quimioterapia, aumento de 100X.

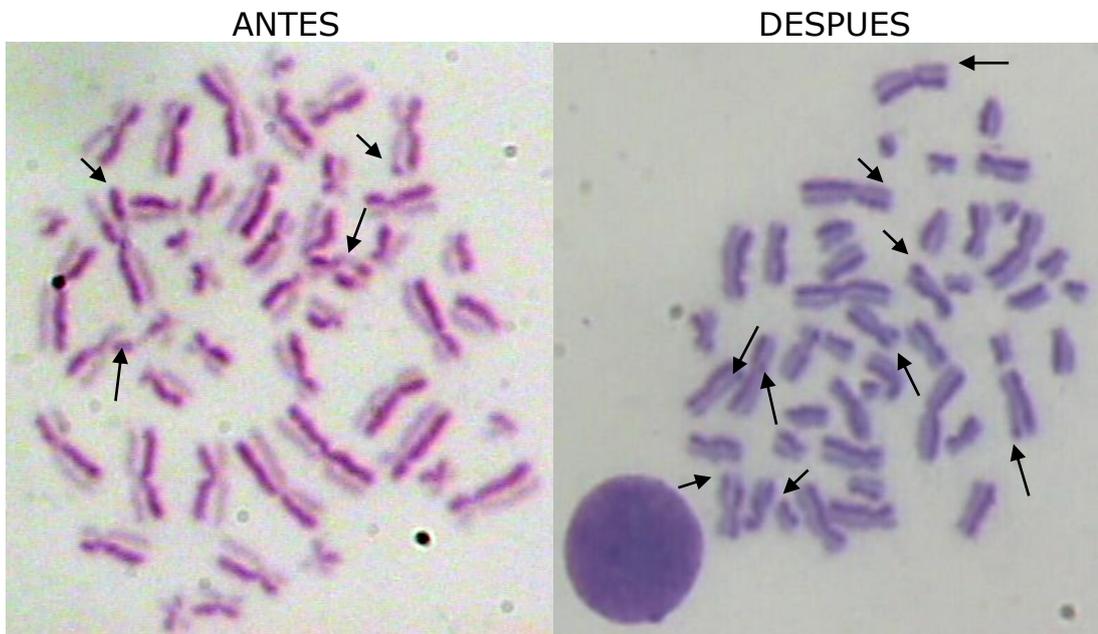
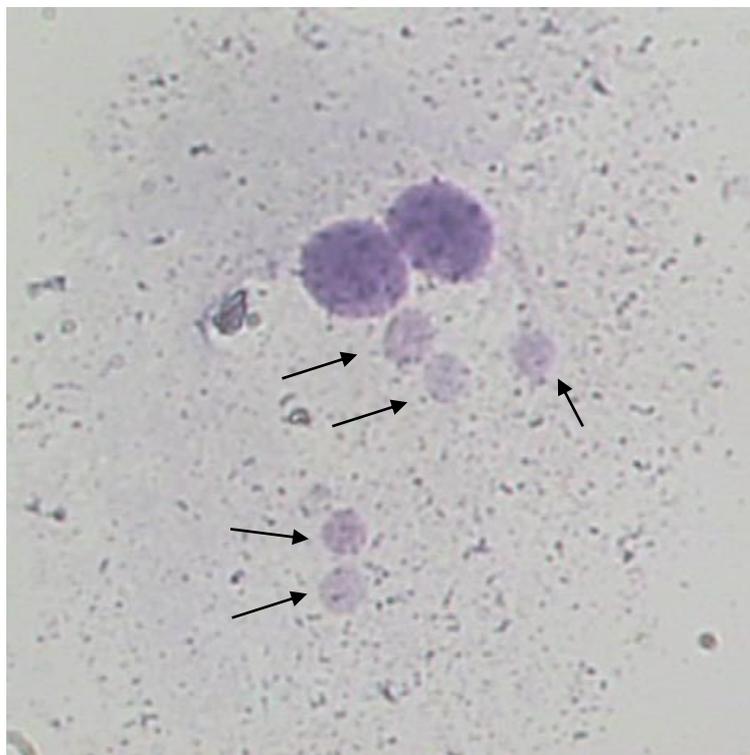


Figura 16. Micronúcleos (MNs) en célula binucleada después de la quimioterapia, aumento de 60X.



9. DISCUSIÓN

9.1 PERSONAS CON CÁNCER DE MAMA Y SUS CONTROLES

Las personas con cáncer son aquellas que han desarrollado alteraciones en su material genético (Mutación), por lo que su ADN es más susceptible a experimentar nuevos daños que conllevan a padecer nuevas enfermedades o nuevos cánceres. Diferentes estudios han demostrado que las personas con cáncer de mama que tienen mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 son más susceptibles a la inducción de daños en el ADN, porque se disminuye la capacidad de reparación en el proceso de transcripción (Trenz, *et.al.*, 2002).

El presente estudio indica que las personas con cáncer de mama tienen un mayor daño genético que las personas sin cáncer de mama, ya que presentan alta frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICHs) y micronúcleos (MNs) en sus linfocitos de sangre periférica. Estudios en la India reportan que existe diferencia estadísticamente significativa en la frecuencia de ICHs entre pacientes con cáncer de mama y sus controles (Dhillon, *et.al.*, 1995). También en México, estudios realizados en pacientes con cáncer cérvico uterino demuestran que tienen una alta incidencia de MNs respecto a las personas sin cáncer (Elva, *et.al.*, 2001).

En este estudio también se observa que las personas con cáncer de mama posiblemente tienen efecto citotóxico en sus linfocitos, ya que en las personas con cáncer de mama éstos recorren en promedio un ciclo y medio de división celular (32 horas), en las 72 horas de cultivo, en comparación a los linfocitos de las personas sin cáncer que en promedio recorren dos ciclos de división celular (25 horas), en el mismo tiempo de cultivo. Estudios realizados por Fischer y Colaboradores en Alemania, en el año 2001, encontraron efecto citotóxico en las células de las personas con cáncer de mama, ocasionando un incremento en el tiempo promedio de proliferación celular respecto a sus controles.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación, se observa que los linfocitos de personas con cáncer de mama, incrementan en un 75.5 % la frecuencia de ICHs por célula, respecto al encontrado en los de las personas sin cáncer. El incremento de ICHs posiblemente se debe a que la molécula del ADN sufrió alteraciones o rupturas durante su replicación en sus loci homólogos, que por su proximidad generan rearrreglos incorrectos (Sonoda, *et.al.*, 1999 ; Morgan, *et.al.*, 1983). Estos resultados son comparables con los obtenidos por Adhvaryu y Colaboradores, en el año 1988, en la población de Ahmedabad (India), donde encontraron que la frecuencia de ICHs por célula en los linfocitos de las personas con cáncer de mama era estadísticamente significativa ($P < 0.001$) respecto a la encontrada en el grupo control.

En los linfocitos de sangre periférica de los pacientes con cáncer de mama se observó un incremento del 126% en el número de micronúcleos (MNs) totales en 4000 células, analizadas respecto al encontrado en las personas sin cáncer, lo cual se debe a un posible efecto genotóxico en la molécula del ADN, durante las fases (G₀, G₁, S o G₂), anteriores a la mitosis, debido a que los linfocitos de las personas con cáncer de mama son más propensos a desarrollar nuevos daños cromosómicos. Duffaud y Colaboradores, en el año 1997, encontraron que el número de MNs se incremento en un 20% en personas con cáncer de mama respecto a las personas sin cáncer. Otros estudios reportan que los linfocitos de personas con cáncer de mama son más radiosensitivos que los de las personas sin cáncer, debido a que existe un incremento del 75–78% en el número de MNs en 1000 células, respecto al registrado en las personas sin cáncer de mama (Burrill, *et.al.*, 2000; Barbero, *et.al.*, 2000).

Estos resultados son un aporte inicial que lleva al planteamiento de nuevos interrogantes, que permitan aclarar de manera específica las causas por las cuales la población de estudio presenta un mayor efecto citotóxico, de exposición y genotóxico en su material genético. De tal forma que, estas causas se puedan identificar, para ejecutar una estrategia de prevención que evite el desarrollo de nuevas enfermedades o problemas de salud en las personas con cáncer.

9.2 PERSONAS CON CÁNCER DE MAMA, ANTES Y DEPUÉS DE LA QUIMIOTERAPIA

En el tratamiento del cáncer de mama existen diferentes terapias entre ellas la quimioterapia, que utiliza sustancias tales como la Ciclofosfamida, Metrotexate y 5-Fluorouracilo (CMF) y la Ciclofosfamida-Doxirubicina (CD), que actúan sobre la proliferación celular de las células cancerosas, evitando que proliferen de forma descontrolada e incluso inducir las a muerte celular; también se sabe que estas sustancias afectan las células germinales y algunas células somáticas como las del cabello y las de la médula ósea, que se encuentran en actividad proliferativa. Posiblemente éstas están interviniendo a nivel de fases importantes durante el ciclo celular, donde actúan como veneno (por ejemplo, el Metrotexate) del uso acromático o en la etapa de síntesis, bloqueando principalmente la replicación del ADN o incluso interactuar con esta molécula, causándole daños.

En esta investigación se emplearon linfocitos de sangre periférica de personas con cáncer de mama que recibieron quimioterapia, para determinar si este tratamiento induce efecto citotóxico, de exposición y genotóxico. Estudios realizados en pacientes con cáncer de mama expuestos a la quimioterapia con CMF, demuestran que ésta causa efecto tóxico en las células del tejido cardiaco (Erselcan, *et.al.*, 2000).

En este estudio se observó que la quimioterapia con la Ciclofosfamida, Metrotexate y 5-Fluorouracilo (CMF) y la Ciclofosfamida-Doxirubicina (CD), no altera el índice de proliferación celular (IP), debido a que éste no presentó diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.673$) entre el registrado antes y después de suministrarse este tratamiento. De igual manera no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.489$) entre la CMF y la CD. Silva y Colaboradores, en el año 2002, encontraron que el índice mitótico y el índice de proliferación celular no eran afectados por la quimioterapia de personas con cáncer de mama, estudio realizado en la población de Sao Pablo (Brasil).

En contraste al resultado anterior, se observa que la molécula del ADN sufre efecto de exposición causado posiblemente por las sustancias CMF y CD utilizadas en la quimioterapia, haciendo que se incremente en un 54% la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICHs) por célula, en las personas con cáncer de mama después de recibir este tratamiento. De igual manera, la frecuencia de ICHs con la CMF se incrementó en un 34% y para la CD se incrementó en un 134%, aunque la frecuencia de ICHs registrada antes y después de suministrarse CD no presentó diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.109$), posiblemente se debe a que el tamaño de la muestra poblacional es muy reducido (3 personas) y la sensibilidad de las pruebas estadísticas no permiten detectar la diferencia. Mientras que al hacer la comparación entre la CMF y la CD no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.06$). En un estudio realizado en la población de California (Estados Unidos), en personas con cáncer de mama expuestas a quimioterapia con CMF, se encontró un incremento en la frecuencia de ICHs por célula, estadísticamente significativa ($P < 0.0001$) en comparación a la encontrada antes este tratamiento (Tucker, *et.al.*, 1990). Clare y Colaboradores, en el año 1983, encontraron una correlación positiva entre las dosis administradas de sustancias anticancerígenas, utilizadas en la quimioterapia y la frecuencia de ICHs en pacientes con cáncer de mama.

De igual forma, la quimioterapia con CMF y CD, incrementó en un 72.12% el número de micronúcleos (MNs) en 4000 células respecto al encontrado antes de este tratamiento. De igual manera, el número de MNs con CMF se incrementó en un 72% y para la CD, en un 74%; aunque el número de MNs registrado antes y después de suministrarse CD, no presentó diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.109$), posiblemente se debe a que el tamaño de la muestra poblacional es muy reducido (3 personas) y la sensibilidad de las pruebas estadísticas no permiten detectar la diferencia. Mientras que al hacer la comparación entre la CMF y la CD no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.391$). Sin embargo, estos resultados hacen pensar que posiblemente la quimioterapia con estas sustancias está interactuando con la molécula de ADN, de los linfocitos de las personas con cáncer de mama.

10. CONCLUSIONES

Mediante la evaluación del índice de proliferación celular (IP) se observó que las personas con cáncer de mama recorren en promedio un ciclo y medio de división celular (32 horas) respecto al encontrado en las personas sin cáncer de mama, que es de dos ciclos de división (25 horas), en 72 horas de cultivo, lo cual indica que sus linfocitos de sangre periférica de personas con cáncer de mama posiblemente tienen efecto citotóxico, que esta ocasionando un retardo en el avance del ciclo celular.

En las personas con cáncer de mama se encontró que la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICHs) se incrementó en un 75.5% por célula, indicando que sus linfocitos posiblemente son más sensibles a agentes de exposición, en comparación al de las personas sin cáncer.

El número de micronúcleos (MNs) se incrementó en un 126% en los linfocitos de las personas con cáncer de mama, demostrando que posiblemente son más propensos a desarrollar daños en la molécula de ADN, debido a agentes tóxicos que de forma directa o indirecta están actuando sobre ésta.

La quimioterapia con Ciclofosfamida, Metrotexate y 5-Fluorouracilo (CMF) y la Ciclofosfamida-Doxirubicina (CD), no tiene efecto citotóxico que ocasione un bloqueo o dificultad a lo largo del ciclo de división, de los linfocitos de las personas con cáncer de mama, debido a que el IP no tuvo diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.673$) antes y después de la exposición a este tratamiento. De igual manera no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.489$) entre la CMF y la CD.

La exposición de las personas con cáncer de mama a la quimioterapia con CMF y CD, causa un incremento del 54% en la frecuencia de ICHs por célula, ya que estas sustancias posiblemente están interactuando con la molécula de ADN, exponiéndola a situaciones adversas que inducen la formación de ICHs.

La CMF incrementó la frecuencia de ICHs en un 34% y la CD en un 134%, aunque la frecuencia de ICHs registrada antes y después de suministrarse CD no presentó diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.109$) y en la comparación de la CMF y la CD no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.06$).

La quimioterapia con CMF y CD, posiblemente está actuando sobre la molécula de ADN, causándole daño, reflejado en el número de MNs que se incrementó en un 72.12% en las personas con cáncer de mama que recibieron este tratamiento.

La Ciclofosfamida, Metrotexate y 5-Fluorouracilo (CMF) incrementó el número de MNs en un 72% y la Ciclofosfamida-Doxirubicina (CD) en un 74%, aunque el número de MNs registrado antes y después de suministrarse CD no presentó diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.109$) y al comparar la CMF y la CD no registró diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.391$).

11. RECOMENDACIONES

Se sugiere continuar con el estudio sobre la evaluación del efecto citotóxico, de exposición y genotóxico inducido por la quimioterapia, debido a que las sustancias Ciclofosfamida, Metrotexate y 5-Fluorouracilo (CMF) y la Ciclofosfamida-Doxirubicina (CD), empleadas en este tratamiento, no sólo afectan la proliferación de las células cancerosas si no también a otro tipo de células, como los linfocitos de sangre periférica y la molécula del ADN, de las personas con cáncer de mama expuestas a esta terapia, lo cual se observó en este estudio preliminar.

Es de gran importancia ampliar la muestra poblacional de las personas en estudio, para obtener resultados más confiables y precisos que indiquen cuales sustancias y en que concentraciones son más favorables para el control del cáncer de mama, sin que produzcan daños colaterales en las personas expuestas a la quimioterapia.

En general, se puede observar que los resultados arrojados por esta investigación insentivan al desarrollo y ejecución de nuevas investigaciones acerca de este problema de salud, cáncer de mama, y del tratamiento utilizado para su control, quimioterapia. Debido a que es muy preocupante ver que las personas con cáncer sigan siendo afectadas por nuevos problemas de salud, que se pueden prevenir con una adecuada educación y formación en la prevención.

12. IMPACTO

El estudio sobre la evaluación del efecto citotóxico, de exposición y genotóxico asociado al cáncer de mama y el inducido por la quimioterapia, tiene impacto científico, médico y social. Con mayor relevancia hacia la población objeto de estudio (personas con cáncer y sin cáncer de mama), como para las personas a cargo de la investigación (estudiantes de la unidad de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca).

Para la población objeto de estudio, el impacto fue a nivel socio-educativo, ya que con los resultados de este estudio se puede explicar que las personas con cáncer, están más propensas a desarrollar nuevos daños en su material genético que conllevan a la generación de nuevas enfermedades, respecto a la población en general.

A nivel médico, se plantea una evaluación científica en cuanto al régimen de las mezclas de sustancias utilizadas en la quimioterapia, que conlleve al mejoramiento de los efectos colaterales producidos por este tratamiento, evitando así, que la persona caiga en un estado de depresión psicológica y otros problemas de salud, como la caída del cabello, náuseas, cefaleas, anemia, llagas en la boca, infecciones, cansancio y hemorragias.

Para la Unidad de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca, se realizó un registro de datos en cuanto al índice de proliferación celular (IP), las frecuencias promedio de intercambios de cromáticas hermanas (ICHs) y Micronúcleos (MNs), determinado por el efecto citotóxico, de exposición y genotóxico asociado al cáncer de mama y el inducido por la quimioterapia, el cual servirá como base para el desarrollo de nuevas investigaciones en el tema.

13. BIBLIOGRAFIA

- ABAÚNZA, H. Cáncer Mamario. Feder Latinoam Cirug FELAC.1987: 3. p 19-32
- ADHVARYU, SG., *et.al.* Increased frequency of sister chromatid exchanges in lymphocytes of breast cancer patients. *Int. J. Cancer*:1988;Mar 15;41(3). p 394-398.
- ALVIR,J. *et.al.* Ingesta de alcohol y riesgo de cáncer de mama. Un estudio de casos y controles en Cali, Colombia. *Revista Colombia medica*: 1999; Jun 33(3). p. 237-245.
- AU, W. Monitoring human populations for effects of radiation and chemical exposures using cytogenetic techniques,1991: 6 (4).
- _____. Citogenetic assays in monitoring human exposure and prediction of risk. *Environmental Mutagens, Carcinogens and Teratogens*. 1991. p 236-245.
- _____. Abnormal chromosome repair and risk of developing cancer. *Environmental Health Perspectives Supplements*. 1993: 101. p 303-308.
- BAEYENS, A., *et.al.* Chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients with a known or putative genetic predisposition. *Breast Journal Cancer*. 2002: Dec 2; 87(12). p 1379-1385.
- BARBER, JB., *et.al.* Relationship between in vitro chromosomal radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes and the expression of normal tissue damage following radiotherapy for breast cancer. *Radiother Oncol*. 2000: May;55(2). p. 179-186.
- BONASSI, S., *et. al.* Mutation Research. Analysis of correlated data in human biomonitoring studies. The case of high sister chromatid exchange frequency cells. 1999: 438. p. 13 – 21.
- _____. *et. al.* Human micronucleus project: International database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2001: 37. p 31-45.
- BURRILL, W., *et.al.* Heritability of chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients: a pilot study with the lymphocyte micronucleus assay. *Int. J. Radiat Biol*. 2000:Dec;76(12). p. 1617-1619.
- CARRANO, *et.al.* Variation in the baseline sister chromatid exchange frequency in human lymphocytes, *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 1980: 2. p 325-337.

CHANNARAYAPA, N. y ONG, T. Micronuclei assay in cytokineses-blocked binucleated and conventional mononucleated methods in human peripheral lymphocytes. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*. 1990: 10. p 273-279.

CLARE, MG., *et.al.* The quantitation of sister chromatid exchanges in lymphocytes of cancer patients at intervals after cytotoxic chemotherapy. *Eur. J. Cancer. Clin. Oncol.* 1983: Nov; 19 (11). p 1509-1515.

COLDITZ, GA., *et.al.* The use of estrogens and progestins and the risk of breast cancer in postmenopausal women. *Engl. J. Med.* 1995: Jun 15; 332(24). p 1589-1593.

COUNTRYMAN, P. y HEDDLE, J. The production of micronuclei from chromosome aberration in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation Research*. 1987: 41. p 321-332.

CURA, J. Prevención del cáncer de mama. 2000. available from internet: < www.arcrde.edu.ar>.

DHILLON, VS., *et.al.* Sister chromatid exchange (SCE) studies in breast cancer patients: a follow-up study. *Cancer Genet Cytogenet*: 1995; Apr; 80(2). p 115-117.

DUFFOUD, F., *et. al.* Micronucleated lymphocyte rates from head and neck cancer patients. *Mutation Research*.1999: Feb 19;439(2). p 259-266.

ELVA, I., *et al.* Micronúcleos en exudado cervical y en linfocitos de sangre periférica de mujeres con cáncer cervico uterino V. reunion delegacional de Investigación Médica. Monterrey, N.L. 2002: Feb.

ERSELCAN, T., *et.al.* Subclinical cardiotoxicity following adjuvant dose-escalated FEC, high-dose chemotherapy, or CMF in breast cancer. *Breast Journal Cancer*: 2000: Feb; 82(4). p 777-781.

FENECH, M. Important variables that influence base- line micronucleus frequency in cytokinesis- blocked lymphocytes –a biomarker for ADN damage in human populations. *Mutation Research*. 1998: 404. p 155-165.

_____. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*. 2000: 455. p 81 - 95.

FISCHER, WH., *et.al.* Increased formation of micronuclei after hormonal stimulation of cell proliferation in human breast cancer cells. *Mutagenesis*. 2001: May; 16(3). p 209-212.

HEDDLE, J. *et. al.* Sensitivity tóxica five mutagens in Fanconi's anemia as measured by the micronucleus method. *Cancer Research*. 1978: 38. p 2983-2988.

HOYOS, L. Genotoxicidad de los plaguicidas mutagenicidad, carcinogenicidad y teratogenicidad. En: CORDOBA Dario. *Toxicología*. Medellín Colombia.1994. p 169-184.

_____. *Monitoreo, Susceptibilidad y Cáncer*. Popayán: Universidad del Cauca. 2002. p 7-19.

_____, *et.al.* *Manual de Citogenética: Linfocitos humanos*. 2002.

HU, J., *et. al.* Genetic Regulation of Ionizing Radiation Sensitivity and Breast Cancer Risk. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2002: 39. p 208-215.

JIA, F., CHEN y YUE. JL. *Cytobios*. Improved light sources for induction of sister chromatid differentiation. *U. S. A.*. 1985: 44. p. 73 – 87.

KATO, H. Induction of sister-chromatid-exchange by UV light and its inhibition by caffeine. *Exp. Cell. Res.* 1973: 82. p 383-390.

LAMBERT, L., *et.al.* Cell kinetics and sister-chromatid-exchange frequency in human lymphocytes. *Mutation Research*. 1983: 20. p 193-199.

LATT, S. Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1973: 70. p 3395-3399.

LEGAL, JD. Chromosomal aberrations induced by chemotherapy and radiotherapy in lymphocytes from patients with breast carcinoma. 2001.

LINDBLAD, A. y LAMBERT. Relation between sister-chromatid-exchange, cell proliferation and proportion of B and T cells in human lymphocytes cultures. *Hum. Genet.* 1981: 57. p 31-34.

LIVINGSTON, GK., *et.al.* Sister chromatid exchange: variation by age, sex, smoking, and breast cancer status. *Cancer Genet Cytogenet.* 1983: Jul; 9(3). p 289 –299.

MENASCHA. World Cancer Research Fund in Association with American Institute for Cancer. *Research. Breast. In Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective.*; BANTA Book Group; 1997.

MICHAEL A., *et. al.* *Mutation Research*. Chromosomal aberration and sister – chromatid exchange frequencies in peripheral blood lymphocytes of a large human population sample. 1988: 204. p 421 – 433.

MORGAN, WF., *et.al.* Effect of 3-aminobenzamide on sister-chromatid-exchange frequency in X-irradiated cells. *Radiat. Res.* 1983: 93. p 567-571.

MURLI, H., *et. al.* Mutation Research. Repair of sister – chromatid exchange – inducing lesions in mutagen – treated cultures of human whole blood and purified fresh or frozen lymphocytes. 1998: 202. p. 125 –132.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. U.S. National library of medicine. ADAM 2002.

ODAGIRI, Y., *et.al.* Human micronucleus project: International database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 2001: 37. p 31-45.

OLAYA, C., *et.al.* Organochlorine exposure and breast cancer risk in Colombian women. *Instituto Nacional de Salud Publica de México.* 1998:14 (3). p. 125-132.

OLIVER, C., *et. al.* Guía informativa para el tratamiento quimioterapeutico de pacientes. 2002.

PÉREZ, HN. , CEBALLOS, JM. y PINTO, ED. *Rev. Biomed.* Prevalencia de intercambio de cromátides hermanas en una población libre de exposición a agentes clastogénicos. 1999: 10(2). p.71-76.

PERRY, P. y WOLF, S. New giemsa method for the differential staining of sister-chromatids. *Nature.* 1974: 251. p 156-158.

PETO, J., *et. al.* Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutation in patients with early-onset breast cancer. *Journal National Cancer Institute.* 1999: 91. p 943-949.

PULSOMED S.A., C/ Colón de Larreategui 26, 3 J. 48009. BILBAO. 2002. Available from internet:<pubmed@pulsomed.com.>.

RINCON J., *et. al.* Ciencia y desarrollo, CONACYT. 1999: 25 (145). p. 9-15.

ROJAS, R.J., *et al:* Registro Institucional de Cáncer. Hospital Universitario del Valle "Evaristo García". Primer Quinquenio.1992: Nov. p 1987-1991.

RUSO, J., *et. al.* Neoplastic Transformation of Human Breast Epithelial Cells by Estrogens and Chemical Carcinogens. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 2002: 39. p 254-263.

SAYER, A.M., *et.al.* Dose response parameters for X-ray induced micronuclei in cytokinesis-blocked human lymphocytes. *Environ. Mole. Mutag.* 1988: 11. p 91.

SILVA, LM., *et.al.* Study of chromosome in patients with breast cancer treated by two antineoplastic treatments. *Teratog Carcinog Mutagen*: 2002;22(4). p 257-269.

SONADA, E., *et.al.* SCE are mediated by homologous recombination in vertebrate cells. *Molecular Cell Biology*: 1999; 19. p 5166-5169.

TAYLOR, JH. Sister-chromatid-exchanges in tritium labeled chromosomes. *Genetics*. 1957: 43. p 515-529.

TICE, R., *et.al.* The utilization of bromodeoxyuridine incorporation into DNA for the analysis of cellular kinetics. *Experimental cell research*. 1976: 102. p 232-236.

TRENZ, K., *et.al.* Mutagen sensitivity of peripheral blood from women carrying a BRCA1 or BRCA2 mutation. *Mutat Research*. 2002: Mar 20; 500(1-2). p 89 –96.

TUCKER, JD., *et.al.* Induction, accumulation, and persistence of sister chromatid exchanges in women with breast cancer receiving cyclophosphamide, adriamycin, and 5-fluorouracil chemotherapy. *Cancer Research*. 1990: Aug 15;50(16). p 4951-4960.

UNIDAD ONCOLÓGICA DE ESPAÑA. 2001. Available from internet: <<http://Oncologia.roche.es/cancer.htm>>.

VENKATACHALAM P., *et. al.* Higher frequency of dicentrics and micronuclei in peripheral blood lymphocytes of cancer patients. 1999. p. 1-8.

WOLFF, S., *et.al.* Sister-chromatid-exchange induced in chinese hamster cells by UV irradiation of different stages of the cell cycle: the necessity for cells to pass through. *Mut. Research*. 1974: 25. p 73-81.

WORLD CANCER RESEARCH FUND IN ASSOCIATION WITH AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER. *Research. Breast. In Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective*. Menasha; BANTA Book Group. 1997.

YUBERO, A. *Mujer de riesgo para cáncer de mama: prevención y manejo*. 2002. Available from internet: <ayubero@hopl.insalud.es>.

ZAKHAROV, AF y EGOLINA, NA. Differential spiralisation along mammalian mitotic chromosomes. 1, BrdU-revealed differentiation in chinese hamster chromosomes. *Cromosoma* . 1972: 38. p 341-345.

**ANEXO A. ENCUESTA PARA LA POBLACIÓN DE PROYECTO DE CÁNCER
DE MAMA**

Unidad de Toxicología Genética y Citogenética
Departamento de Biología.
Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la educación.

Nombre: _____ Estado Civil: Casada _____
 Edad: _____ Viuda _____
 Ocupación: _____ Soltera _____
 Dirección: _____ Teléfono: _____

Grupo Étnico: Blanco _____ Mestizo _____ Otro _____
 Procedencia: Popayán _____ Urbano _____ Rural _____

HISTORIA GINECOOBSTÉTRICA.

Edad de la Menarquia _____ Edad de la Menopausia _____
 Número de Embarazos _____ Edad del primer parto _____
 Abortos Si _____ No _____ Edad _____
 Acostumbró a la lactancia Si _____ No _____ Tiempo _____
 Obesidad Si _____ No _____
 Exposición a anticonceptivos Si _____ No _____ Cúal? _____ Tiempo _____
 Hormonas postmenopáusicas Si _____ No _____ Cúal? _____ Tiempo _____
 Consume medicamentos Si _____ No _____ Cúal? _____ Tiempo _____
 Enfermedades que ha padecido _____
 Tipo de alimentación que consume _____
 Fuma Si _____ No _____ Tiempo _____
 Alcohol Si _____ No _____ Tiempo _____
 Combustible que utiliza Gas _____ Leña _____ Electricidad _____

HISTORIA MÉDICA

Diagnóstico Clínico _____ Fecha _____
 Diagnóstico histopatológico _____ Fecha _____
 Mama Comprometida: Izquierda _____ Derecha _____

Cuadrante: Súpero Interno _____ Inferior Interno _____ Areolar _____
 Súpero Externo _____ Inferior Externo _____ Pezón _____

Tipo de cáncer Sporádico _____ Hereditario _____

HISTORIA FAMILIAR

Familiares	CA mama	CA ovario	CA otros
Abuela			
Abuelo			
Madre			
Padre			

Hijo(s)
Hija(s)
Hermano
Hermana
Tía
Tío
Otro _____

Familiar de Referencia:

Nombre _____ Dirección _____
Teléfono _____

ANEXO C. CONSENTIMIENTO INFORMADO

UNIVERSIDAD DEL CAUCA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES,

UNIDAD DE TOXICOLOGÍA

**CONSENTIMIENTO INFORMADO
MONITOREO BIOLÓGICO EN PERSONAS CON CÁNCER DE MAMA Y
EXPUESTAS A QUIMIOTERAPIA**

YO _____, mayor de edad. He sido informado por los estudiantes del grupo de TOXICOLOGÍA GENÉTICA Y CITOGENÉTICA de la Universidad del Cauca, que realizarán el estudio **“EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO, DE EXPOSICIÓN Y GENOTÓXICO ASOCIADO AL CÁNCER DE MAMA Y EL INDUCIDO POR LA QUIMIOTERAPIA”** en Popayán. Se me ha solicitado participar voluntariamente como sujeto de estudio.

OBJETIVO Y PROPÓSITO DEL ESTUDIO

Identificar el efecto citotóxico y genotóxico asociado al cáncer de mama y el inducido por la quimioterapia, empleando biomarcadores como el índice de proliferación celular (IP), Intercambio de cromátidas hermanas (ICHs) y Micronúcleos (MNs) en linfocitos de sangre periférica.

Los resultados de este estudio son de gran utilidad para motivar a la población en general, sobre estrategias de prevenir el desarrollo de problemas de salud, específicamente el cáncer de mama, ya que en la actualidad esta enfermedad se ha incrementado de forma acelerada, debido a los factores de riesgo que no son tenidos en cuenta en el aspecto laboral (trabajo) y el personal (estilo de vida). Por otro lado, los tratamientos que se utilizan en esta enfermedad.

YO HE SIDO INFORMADO SOBRE LOS OBJETIVOS, PROPÓSITOS, JUSTIFICACIÓN, METODOLOGÍA, RIESGOS Y BENEFICIOS DEL ESTUDIO.

En este estudio serán seleccionadas aproximadamente 20 personas con cáncer de mama y 20 sin cáncer, como grupo control y 10 personas con cáncer expuestas a la quimioterapia. El propósito de esta investigación tiene relevancia Social y Científica y obedece a una problemática de salud pública. Participar en este estudio supone un mínimo riesgo especial contra mi salud.

Sobre la competencia, formación integral y calidad de los estudiantes responsables de la Universidad del Cauca.

Los resultados del estudio son confidenciales y serán informados y explicados de manera personal y confidencial al grupo objeto de estudio en forma anónima por parte de los estudiantes.

REQUERIMIENTOS. Yo en pleno uso de mis facultades mentales, libre y consiente, estoy de acuerdo en participar en este estudio y entiendo que éste requiere de mí, lo siguiente: contestar un cuestionario de aproximadamente 10 minutos, para suministrar información personal, referente a mi edad, estado de salud, estilo de vida, historia

ocupacional y familiar. Si soy seleccionado para el estudio debo donar 2 mL de sangre periférica a las personas encargadas de la investigación. A las personas que reciban quimioterapia se les tomarán 2 muestras de sangre de 2 ml cada una, antes del tratamiento y 28-30 días después del tratamiento. La sangre se tomará en el brazo, para ser procesada en el laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca, mediante las pruebas de índice de proliferación celular, intercambios de cromátidas hermanas y micronúcleos.

RIESGO DE PARTICIPACIÓN: Los riesgos de participación en el estudio son: el sangrado e infección en el sitio de la toma de la muestra, los cuales serán controlados por un profesional experto en la toma de la muestra de sangre del brazo, y el empleo de técnicas médicamente aceptadas y jeringas estériles nuevas.

Para garantizar la confiabilidad de la información suministrada, los resultados de las pruebas serán codificados y se dará a conocer en forma grupal, más no individual.

BENEFICIOS PARA EL PARTICIPANTE: Motivación hacia el cambio de actitud para la prevención de problemas de salud, principalmente el desarrollo del cáncer y la exposición a la quimioterapia.

YO ENTIENDO QUE

Mi participación es completamente voluntaria y puedo rehusarme a responder cualquier pregunta, si así lo deseo o puedo tomar la decisión de finalizar mi participación en este monitoreo, en cualquier momento sin que ello represente perjuicios de índole legal con mi trabajo.

La información recolectada, será tratada de manera confidencial y mis respuestas serán reunidas con las de los otros participantes, para obtener resultados grupales.

La Universidad del Cauca se compromete a vigilar que las muestras de sangre serán reunidas por un profesional experto y autorizado, en forma aséptica para evitar complicaciones.

Puedo preguntar cualquier interrogante o duda que tenga, durante o después del estudio, a los estudiantes de la Universidad del Cauca, responsables del estudio, en el Laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética, en la carrera 2° No 1 A 25, Barrio Caldas, Popayán. En el teléfono: 8209800 Ext, 2614.

Los procedimientos alternativos principales, incluyendo procedimientos experimentales en este estudio, me han sido explicados en un lenguaje claro que yo he podido entender.

Los riesgos y molestias que puedan presentarse, me han sido explicados claramente.

Los resultados de este estudio podrán ser divulgados y/o publicados en revistas científicas, en forma grupal, sin que se de a conocer nombres.

He leído este consentimiento, he entendido en que consiste el estudio y también me fueron aclaradas las dudas al respecto, en consecuencia voluntariamente, acepto participar como sujeto de estudio en el monitoreo biológico **“EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO, DE EXPOSICIÓN Y GENOTÓXICO ASOCIADO AL CÁNCER DE MAMA Y EL INDUCIDO POR LA QUIMIOTERAPIA”**

Nombre del participante

Firma del Participante

Nombre del testigo

Firma del testigo

Firmado en la Ciudad de Popayán a los _____ días del mes de _____ de 2003

ANEXO C. REGISTROS

UNIVERSIDAD DEL CAUCA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN

PROGRAMA DE BIOLOGÍA

EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO, DE EXPOSICIÓN Y GENOTÓXICO ASOCIADO AL CÁNCER DE MAMA Y EL INDUCIDO POR LA QUIMIOTERAPIA.

REGISTRO DE INTERCAMBIOS DE CROMÁTIDAS HERMANAS													
Paciente N°		Tratamiento				Placa				Registrador			
N° Célula	N° Cromosomas	N° de ICHs por Célula										Total ICHs	Coordenadas
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1													

M 1	M 2	M 3	TOTAL METAFASES

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO, DE EXPOSICIÓN Y GENOTÓXICO ASOCIADO AL
CÁNCER DE MAMA Y EL INDUCIDO POR LA QUIMIOTERAPIA

REGISTRO DE MICRONUCLEOS			
Paciente N°	Tratamiento	Placa N°	Registrador
N° DE CELULAS BINUCLEADAS		N° DE MICRONÚCLEOS	PUESTES C.