

ANÁLISIS GENÓMICO COMPARATIVO ENTRE MUESTRAS DE PAPANICOLAU Y SANGRE PARA EL MINISATÉLITE UBICADO EN LA REGIÓN 5Q21

Ariel E. Cariaga Martínez, Selva Rosiello, Pedro D. Zapata.

GENOMIC COMPARATIVE ANALYSIS BETWEEN PAPANICOLAU AND BLOOD SAMPLES FOR 5Q21 REGION MINISATELLITE

ABSTRACT

Papanicolaou is a bloodless technique that shows phenotypic changes related to tisular organization and differentiation.

In this study we evaluated the relation between genomic instability of 5q21-5q22 minisatellite and the Papanicolaou. DNA of Papanicolaou and blood samples from 69 women were isolated and amplified. No genetic changes in pre-malignant lesions were found. However, one allelic change was observed on DNA from cervix carcinoma. These findings may be related to a late change in the carcinogenesis process. The population analyzed was polymorphic showing 6 allelic forms (8-13) with heterozygosity rate of 0.33.

KEY WORDS: cervix carcinoma, exfoliative cytology, VNTR, 5q21 minisatellite.

RESUMEN

El Papanicolau es una de técnica incruenta que puede correlacionarse con el grado de organización y diferenciación tisular basándose en hallazgos fenotípicos.

Este trabajo evalúa la relación entre la inestabilidad genómica de una secuencia minisatélite ubicada en la región 5q21-5q22 y las observaciones del Papanicolau en una población constituida por 69 mujeres. Para ello se amplificó la región minisatélite a partir de DNA proveniente de muestras para Papanicolau y se comparó con el proveniente de muestras sanguíneas. El análisis genómico comparativo reveló la presencia de una alteración compatible con la pérdida de una unidad de repetición en una muestra de carcinoma invasor de cuello uterino sin observarse cambios en muestras con lesiones premalignas. Este hallazgo podría indicar que las alteraciones genómicas en la región analizada son acontecimientos tardíos en la evolución tumoral.

Se proponen los siguientes intervalos de referencia: sodio sérico (135-146 mMol/l), potasio sérico (3.4-5.0 mMol/l), sodio urinario (68-330 mMol/24 h) y potasio urinario (19-76 mMol/24 h).

La población analizada fue polimórfica observándose 6 alelos (8-13) con una frecuencia de heterocigocidad de 0,33.

PALABRAS CLAVE: Cáncer de cuello de útero, citología exfoliativa, VNTR, minisatélite 5q21.

INTRODUCCIÓN

La citología exfoliativa ha sido tradicionalmente utilizada para evaluar el grado de organización tisular durante un determinado plazo de tiempo. Es especialmente útil para la vigilancia preventiva de tejidos a los que se tiene acceso de manera relativamente incruenta, como son las cavidades mucosas y la piel. Estos estudios se basan en la observación directa de células mediante raspado mecánico. Entre los parámetros a analizar se encuentran el estado de diferenciación celular, la presencia de agentes infecciosos, reacción inflamatoria del tejido y, de acuerdo a la muestra, el grado de organización tisular.

El Papanicolau, es una de estas técnicas citológicas, en la que se analiza el epitelio escamoso estratificado que recubre el cuello del útero. Esta técnica es altamente efectiva y, realizada de una manera rutinaria aumenta de

manera significativa los hallazgos precoces de carcinomas de cuello de útero. A pesar de la gran expectativa preventiva que despierta esta técnica, en muchos de los tumores se sabe que las lesiones comienzan a acumularse en la célula mucho antes de manifestarse visiblemente en su fenotipo. En este sentido, Wistuba *et al.* 1999 [1], describen una frecuencia relativamente alta de anormalidades relacionadas con secuencias repetitivas del genoma que parecerían acumularse de manera precoz antes de ser detectados los primeros cambios citológicos.

El genoma eucariota posee una organización particular que asegura una baja tasa de mutación génica manteniendo una alta tasa de diversidad genética. Esto se manifiesta en la porción no codificante del genoma, que en humanos alcanza casi al 97%. Dentro de esta podemos encontrar DNA repetido en tándem, distribuido por todo el genoma. Se trata de unidades de longitud variable que se repiten

una a continuación de la otra y que pueden clasificarse en minisatélites y microsatélites de acuerdo al tamaño de la unidad de repetición y de acuerdo al número de repeticiones. Los minisatélites (*variable number tandem repeats*, VNTR) poseen unidades de repetición mayores, de más de 13 pb, mientras que los microsatélites (*short tandem repeats*, STR) suelen poseer unidades pequeñas de 1–13 pb que se repiten abundantemente [2, 3].

Una propiedad importante de este tipo de secuencias radica en su inestabilidad genómica, tendiendo a aumentar o disminuir el número de unidades de repetición. Esto depende de numerosos parámetros entre los que se encuentra la capacidad de los sistemas de reparación celulares. Existen dos mecanismos por los que se producirían estos cambios, uno de ellos es la recombinación y otro es la replicación redundante o fallida en la que se produce un deslizamiento en falso de la polimerasa o *slippage* [4]. Se trata de secuencias altamente polimórficas, con una gran cantidad de alelos, que facilitan su utilización como marcadores genéticos, ya sea en estudios de diversidad, poblacionales o biomédicos [5].

Desde el punto de vista biomédico, los cambios en este tipo de secuencias han sido observados en diferentes tipos de patologías, pero no se puede afirmar si se trata de un cambio que predisponga a desarrollar la patología o únicamente de una consecuencia del desarrollo de esta última. Desde inicios de la década del 90, la asociación entre secuencias repetitivas con enfermedades humanas ha provocado gran impacto [6]. Las primeras observaciones en cáncer estaban relacionadas con cáncer de colon y recto, aunque actualmente se dispone de pruebas que lo relacionan con casi todos los tipos de tumores, incluido en carcinoma de cuello de útero [7–10]. Por ello no es raro que los hallazgos publicados por diferentes autores a veces se presenten como contradictorios. Así Nishimura *et al.* [7], tratando de dilucidar el rol de la inestabilidad genética y la pérdida de la heterocigocidad de locus, concluyen que la inestabilidad de secuencias repetidas es un evento tardío de la carcinogénesis del cáncer de cérvix, pero que sí se halla asociado con la conversión de neoplasias cervicales intraepiteliales hacia un fenotipo invasivo.

Wistuba *et al.* [1], estudiando las anomalías moleculares incluidas en la patogénesis de tumores de cérvix, a través de más de 9 marcadores génicos y de locus, llegan a concluir que los tumores de cérvix tienen diferentes características respecto a la inestabilidad de minisatélites, hallándose principalmente implicado el virus del papiloma humano (HPV). Estos autores también estudian la región 5q21–5q22/MCC–APC, a cuya pérdida alélica le atribuyen una “relativa infrecuencia”, aunque se halle como prueba presente en el 30% de los casos.

Por otra parte Sakamoto *et al.* [8], al evaluar la inestabilidad de microsatélites en la patogénesis del cáncer de cérvix uterino, hallan resultados que sugieren que la inestabilidad generalizada en microsatélites puede ser una

manifestación molecular en tumores endometriales. Aún así concluyen con cautela exponiendo que sus resultados solamente sugieren la presencia de múltiples subconjuntos de mutaciones que actúan de modo complementario en el desarrollo del cáncer de endometrio.

Tsuda *et al.* [11], reportan diferentes patrones de pérdida de la heterocigocidad entre adenocarcinomas de tipo endocervical y de tipo endometroide, hallando mayor frecuencia para pérdida de heterocigocidad en las regiones 5q y 10q.

Finalmente, Bugert *et al.* [12] describieron una repetición microsatélite de 33 pb (VNTR) corriente arriba del gen MCC (*mutated in colon cancer*) ubicada en el locus 5q21 que presenta entre 5 y 11 repeticiones con una heterocigocidad de 0,56. Estos autores demostraron que a pesar de que el minisatélite no se exprese como parte de una unidad de transcripción génica, puede ser utilizado como una herramienta para la detección de cambios alélicos en 5q21, utilizando geles de agarosa.

La inestabilidad de secuencias repetidas se halla claramente implicada en el desarrollo y progresión de tumores en cérvix uterino, pero a pesar de ello aún se requieren mayores estudios para valorar su utilidad para la detección precoz y podría servir de apoyo diagnóstico en personas en situación de riesgo.

El objetivo del presente trabajo es evaluar la relación que existe entre la inestabilidad genómica de la secuencia minisatélite de 33pb ubicada en la región 5q21 y la citología exfoliativa en epitelio de cuello de útero, a través de la amplificación selectiva de esta región por medio de la reacción PCR, en muestras de sangre y células provenientes de cérvix uterino en mujeres mayores de 14 años que concurren al Servicio de Citología Exfoliativa del Hospital SAMIC de Leandro N. Alem, para controles rutinarios.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras utilizadas

Este estudio fue realizado sobre 69 mujeres que asisten al Servicio de Citología Exfoliativa del Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Público SAMIC de la localidad de Leandro N. Alem, ubicada en la zona centro de la Provincia de Misiones, Argentina. Las mujeres que colaboraron en el estudio concurren a controles rutinarios y su participación fue voluntaria siendo todas ellas mayores de 14 años, pero debido a que se trata de un estudio biomédico, se tomaron los recaudos éticos y legales pidiendo la autorización conforme a cada paciente que se integró al estudio, luego de explicarle los alcances del proyecto en cuestión (según lo establecen las reglamentaciones vigentes). Se contó, además, con la autorización de la Dirección del Hospital y de la Dirección del Laboratorio de Análisis Clínicos.

A cada paciente se le tomó una muestra de células de mucosa cervical utilizando una espátula de Ayre y una

muestra de sangre venosa recogida sobre el anticoagulante EDTA 0,5 M.

Citología exfoliativa

Se realizó de acuerdo a la modificación de la técnica de hematoxilina–eosina según papanicolau para coloración de muestras obtenidas de cérvix uterino.

La observación microscópica de los extendidos y su clasificación se realizaron según criterios de BETHESDA, que diferencian células anómalas y se basan en la observación del núcleo y del citoplasma cuyos cambios también complementan el diagnóstico (13).

Extracción de DNA a partir de muestras de sangre

Se trabajó con sangre entera anticoagulada con EDTA 0,5 M obtenida por punción venosa, recogida en microtubos de 1,5 mL estériles y libres de DNAsas. Las muestras fueron congeladas hasta el momento de su procesamiento.

El DNA fue extraído utilizando una modificación de la técnica descrita por Miller–Dykes, 1988 (14), analizado por electroforesis en geles de agarosa al 1%, resuspendido en agua y almacenado a -20°C hasta su utilización.

Extracción de DNA de muestras de mucosa cervical

Para obtener DNA de mucosa cervical se utilizaron células exfoliadas por raspado con espátula de Ayre o hisopo estéril. Las células se lavaron con ClNa 0,9% y se lisaron con tampón Tris HCl 50 mM, EDTA 1 mM y 0,5% de Tween 20 en presencia de 1 mg/mL Proteinasa K a 55°C durante toda la noche. Luego de la incubación las muestras así tratadas se calentaron a 90°C por 10 min y se centrifugaron a 12000 rpm por 5 min. El sobrenadante (DNA) fue analizado por electroforesis en geles de agarosa al 1% y almacenado a -20°C hasta su utilización [15].

Amplificación de la región minisatélite

Para la amplificación por PCR se utilizaron los cebadores descritos por Bugert *et al.* (12), que amplifican una región minisatélite de 33pb ubicada en el locus 5q21: 5qrep–F1 (5^{\prime} –gTA gTT Tgg CAT TAT TCC Agg g– 3^{\prime}) y el 5qrep–R1 (5^{\prime} –TgA TCT TgC CTC ACC CAT C– 3^{\prime}).

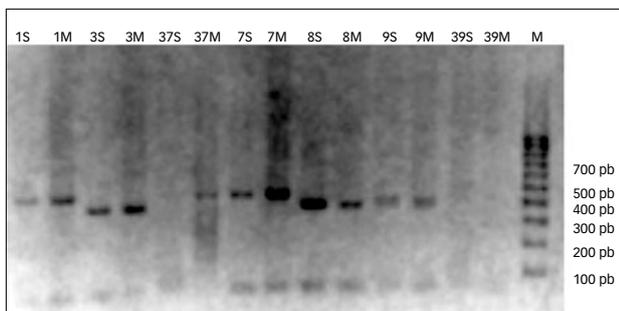


FIGURA 1. Amplificación del minisatélite mediante PCR. Se trata de muestras apareadas. La abreviatura superior indica el número de muestra seguido de una sigla que denota el origen del DNA: S para sangre y M para mucosa. M: marcador de peso molecular.

La reacción de PCR fue llevada a cabo en un volumen final de 25 μL , utilizando buffer con KCl, 1 mM Cl₂Mg, 200 mM de dNTP's; 5 pmoles de cada cebador (OPERON Biotechnology), 0,5 unidades de Taq DNA polimerasa (Fermentas) y 1 μL de DNA como matriz [17].

La amplificación se llevó a cabo mediante 2 ciclos de 2 min a 94°C seguidos de 20 ciclos constituidos por 3 segmentos: 94°C por 30 s, 55°C por 40 s, 72°C por 60 s. Con esta metodología se logró aumentar el rendimiento de la reacción de PCR [17, 19].

Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 2% a 120v durante 30 minutos, fijados con etanol 10% y ácido acético glacial 0.75%, teñidos con nitrato de plata 0,3% y revelados por inmersión en una solución de hidróxido de sodio 3% y formaldehído 0,3% (18). Una vez teñidos los geles fueron digitalizados mediante escaneo y procesados con el programa Corel PhotoPaint 8 para establecer el tamaño de las bandas (Copyright© 1997 Corel Corporation y Corel Corporation Limited).

Cálculo del tamaño y frecuencia alélica porcentaje de heterocigocidad

Para el cálculo de la frecuencia alélica y porcentaje de heterocigocidad primeramente se corroboraron los tamaños alélicos mediante la realización de 2 amplificaciones para la cada muestra y 2 corridas electroforéticas para cada amplificación.

RESULTADOS

Citología exfoliativa

Se estudiaron 69 pacientes con una edad promedio de 32,47 años y una mediana de 31 años. En la Tabla 1 se recogen los resultados de los exámenes citológicos de las pacientes incluidas en el estudio.

Análisis genómico del minisatélite 5q21

Con el fin de evaluar la inestabilidad genómica del minisatélite 5q21 se aisló DNA genómico a partir de muestras de sangre y mucosa vaginal y se amplificaron 69

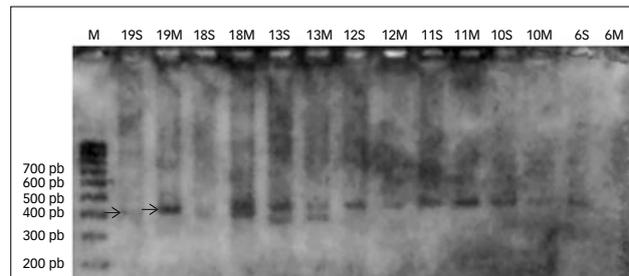


FIGURA 2. Amplificación del minisatélite mediante PCR. Se trata de muestras apareadas. La abreviatura superior indica el número de muestra seguido de una sigla que denota el origen del DNA: S para sangre y M para mucosa. M: marcador de peso molecular. La flecha indica la muestra una ligera variación en el tamaño de bandas y corresponde a un carcinoma invasor de cuello uterino.

Tabla 1. Resultados del Papanicolau de los casos analizados.

Muestra Nº	Edad	Informe	Muestra Nº	Edad	Informe
1	24 años	Inflamatorio	36	20 años	Inflamatorio intenso, DIU, Actinomices y G. vaginalis
2	52 años	Inflamatorio	37	39 años	Inflamatorio
3	29 años	Inflamatorio	38	49 años	Muestra hipocelular
4	19 años	Inflamatorio	39	22 años	Cervicitis
5	56 años	Muestra hipocelular	40	26 años	Inflamatorio, candidiasis
6	24 años	Cervicitis	41	32 años	Células metaplásicas, cervicitis
7	44 años	Inflamatorio	42	23 años	Inflamatorio
8	28 años	Inflamatorio	46	40 años	Células metaplásicas activas, cervicitis
9	24 años	Inflamatorio	44	22 años	Inflamatorio intenso
10	20 años	Células metaplásicas y cervicitis	45	31 años	Inflamatorio
11	40 años	Hemorrágico (se sugiere repetir)	46	27 años	Inflamatorio
12	38 años	HPV más LIE de alto grado	47	52 años	Inflamatorio intenso
13	33 años	Inflamatorio	48	38 años	Células metaplásicas, inflamatorio
14	25 años	Inflamatorio	49	24 años	Inflamatorio, candidiasis
15	23 años	Inflamatorio	50	51 años	Inflamatorio
16	35 años	Células metaplásicas activas, descartar HPV	51	33 años	Cervicitis
17	26 años	Cervicitis (DIU, Cándida y Actinomices)	52	22 años	Células metaplásicas activas, descartar HPV
18	29 años	Cervicitis	53	48 años	Inflamatorio
19	36 años	Biopsia Carcinoma invasor	54	33 años	Cervicitis. Un año atrás, la paciente presentó HPV más LIE de alto grado, HPV Cepa no oncogénica
20	44 años	Cervicitis	55	21 años	Cervicitis
21	18 años	Inflamatorio intenso	56	53 años	Inflamatorio
22	22 años	Cervicitis	57	22 años	Inflamatorio
23	17 años	Inflamatorio	58	34 años	Inflamatorio intenso con trichomoniasis
24	45 años	Inflamatorio	59	21 años	Inflamatorio intenso
25	25 años	Inflamatorio	60	29 años	Cervicitis
26	33 años	Inflamatorio intenso	61	21 años	HPV más LIE de bajo grado (CIN I)
27	42 años	Inflamatorio	62	52 años	Inflamatorio
28	29 años	Clase indeterminada por trichomoniasis	63	44 años	Inflamatorio
29	31 años	Cervicitis	64	31 años	Inflamatorio
30	21 años	Inflamatorio	65	31 años	Inflamatorio
31	27 años	Inflamatorio	66	40 años	Inflamatorio intenso
32	25 años	Inflamatorio	67	43 años	Sin diagnóstico
33	24 años	Inflamatorio	68	34 años	Cervicitis
34	44 años	Inflamatorio intenso	69	39 años	Células metaplásicas, cervicitis
35	42 años	Células metaplásicas activas			

muestras de sangre con sus respectivas mucosas (Figuras 1 y 3). Únicamente para la muestra 19 se observó variación genotípica entre sangre y mucosa (Figura 2). Este producto de amplificación correspondió a una muestra de carcinoma invasor y se visualizó un aumento en el número de repeticiones.

Porcentaje de heterocigocidad y frecuencia alélica

Sobre un total de 69 casos estudiados, se obtuvo producto de amplificación a partir de matriz proveniente de sangre y de mucosa en 54 casos; de estos 36 fueron homocigotos (0,67) y 18 fueron heterocigotos (0,33).

Se realizó el cálculo de la frecuencia de los distintos alelos hallados en la población estudiada observándose con mayor frecuencia el alelo que presenta 12 unidades de repetición de 33 pb cada una. (Tabla 2).

Tabla 2. Frecuencia de alelos.

Alelo	Número de repeticiones	Frecuencia	Tamaño del producto (pb)
A1	13	0,19	488
A2	12	0,35	455
A3	11	0,19	422
A4	10	0,22	389
A5	9	0,03	356
A6	8	0,03	323

DISCUSIÓN

Este estudio busca establecer alguna relación entre la inestabilidad de la región minisatélite y los resultados de citología exfoliativa por esta razón se comparó el resultado de la amplificación de las muestras de genoma sanguíneo y de mucosa cervical para cada caso. Sin embargo, las muestras que presentaban lesiones intraepiteliales (LIE), tanto de alto como de bajo grado, lesiones metaplásicas o bien lesiones derivadas de la presencia del virus del papiloma humano (HPV) no presentaron variaciones genómicas. Únicamente se encontraron diferencias genotípicas en una muestra proveniente de una paciente con un carcinoma invasor. En este caso se denotó la pérdida de una repetición en el tamaño del minisatélite en la muestra 19 y podría ser debido a la inestabilidad genómica generada durante el proceso tumoral, que puede provocarse por una falla en los sistemas de reparación, favoreciendo la fijación de algunas mutaciones generadas por el *slipage* de la DNA polimerasa durante la replicación [20, 21]. No obstante, debería verificarse, analizando un mayor número de casos, la frecuencia de esta alteración en tumores avanzados, dado que podría tratarse de un evento tardío en la génesis del cáncer de cérvix uterino, tal como propone

Nishimura *et al.* [7] al analizar la inestabilidad de minisatélites y microsátélites en general, y en concordancia con lo observado en tumores de origen renal para la misma región minisatélite [12].

La pérdida de la heterocidocidad es otro acontecimiento que debe ser evaluado durante el desarrollo tumoral [9]. En este trabajo encontramos una frecuencia de heterocidocidad de 0,33, que difiere notablemente de la descripta por Bugert *et al.* [12], trabajando en una población europea germánica, y de los valores descriptos por Tajara *et al.* [22], trabajando en una población brasilera. También difieren las frecuencias y el número de repeticiones hallados en los diferentes alelos. Sin embargo, para el alelo correspondiente a 10 repeticiones, la frecuencia hallada (0,22) coincide con las publicadas por Bugert *et al.* [12] y Tajara *et al.* [22], de 0,20.

En este trabajo se observaron cambios genómicos en la región minisatélite 5q21 únicamente en tumores avanzados. Sin embargo, al no hallarse variaciones de este minisatélite en las muestras con lesiones premalignas, el análisis del perfil genético de esta región no sería de utilidad para el diagnóstico temprano de este tipo de lesiones, pero podría utilizarse como marcador de malignidad en tumores avanzados y aplicarlo a la caracterización de distintos subtipos histológicos de lesiones, precancerígenas o cancerígenas [4, 8, 10].

Debe destacarse que muchas muestras cervicales son hipocelulares, razón por la cual se hace conveniente obtener amplificación sin necesidad de mucha muestra. Esto pone de manifiesto la utilidad de las técnicas moleculares en algunos casos en los que se obtuvo un perfil de la región minisatélite 5q21/22, aunque no pudieron ser procesadas según la coloración de Papanicolaou.

CONCLUSIONES

El análisis genómico comparativo entre muestras de sangre y muestras de mucosa cervical para el minisatélite de 33 pb ubicado en 5q21 realizado reveló la presencia de una alteración compatible con la pérdida de una unidad de repetición en una muestra de carcinoma invasor de cuello uterino sin observarse cambios en muestras con lesiones premalignas.

La población analizada mostró una frecuencia de heterocidocidad de 0,33 siendo el alelo más frecuente el de 12 repeticiones, seguido de los de 10, 11 y 13 repeticiones.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la colaboración de los profesionales y técnicos del Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Público SAMIC, de la localidad de Leandro N. Alem.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Wistuba, I.; Thomas, B.; Behrens, C.; Oniki, N.; Lindberg, G.; Albores-Saavedra, J.; Gazdar, A.** Molecular abnormalities associated with endocrine tumors of the uterine cervix. *Gynecol. Oncol.* 72: p. 3–9. 1999.
2. **Luque, J.; Herráez, A.** *Biología Molecular e Ingeniería Genética.* Editorial Harcourt, Madrid. 2001.
3. **Cox, R.; Mirkin, M. S.** Characteristic enrichment of DNA repeats in different genomes; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:5237–5242. 1997.
4. **Debrauwere, H.; Gendrel, C. G.; Lechat, S.; Dutreix, M.** Differences and similarities between various tandem repeat sequences: minisatellites and microsatellite; *Biochem.* 79: p. 577–586. 1997.
5. **Jeffreys, A. J.; Wilson, V.; Thein, S. I.** Hypervariable minisatellite regions in human DNA; *Nature.* 314: p. 67–73. 1985.
6. **Bois, P.** Hypermutable minisatellites, a human affair? *Genomics* 81: p. 349–355, 2003.
7. **Nishimura, M.; Furumoto, H.; Kato, T.; Kamada, M.; Aono, T.** Microsatellite instability is a late event in the carcinogenesis of uterine cervical cancer; *Gynecol. Oncol.* 79: p. 201–206. 2000.
8. **Sakamoto, T.; Murase, T.; Urushibata, H.; Kato, K.; Takada, H.; Imamura, T.; Mori, H.; Wake, N.** Microsatellite instability and somatic mutations in endometrial carcinomas; *Gynecol. Oncol.* 71: p. 53–58. 1998.
9. **Miyai, K.; Furugen, Y.; Matsumoto, T.; Iwabuchi, K.; Hirose, S.; Kinoshita, K.; Fujii, H.** Loss of heterozygosity analysis in uterine cervical adenocarcinoma; *Gynecol. Oncol.* 94: p. 115–120. 2004.
10. **Tibiletti, M. G.; Furlan, D.; Taborelli, M.; Facco, C.; Riva, C.; Franchi, M.; Cossu, A.; Trubia, M.; Taramelli, R.; Capella, C.** Microsatellite instability in endometrial cancer: relation to histological subtypes; *Gynecol. Oncol.* 73: p. 247–252. 1999.
11. **Tsuda, H.; Takarabe, T.; Okada, S.; Uchida, H.; Kasamatsu, T.; Yamada, T., et al.** Different pattern of loss of heterozygosity among endocervical-type adenocarcinoma, endometrioid-type adenocarcinoma and adenoma malignum of the uterine cervix; *Int. J. Cancer.* 98: p. 713–717. 2002.
12. **Bugert, P.; Keneck, C.; Kovacs G.** A 33 pb minisatellite repeat upstream of the “mutated in colon cancer” gene at chromosome 5q21. *Electrophoresis* 19: p. 1362–1365. 1998.
13. The 1988 Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytological diagnosis; *Hum. Pathol.*; 1990; 21: 704–708.
14. **Miller, S.A.; Dykes, D. D.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells; *Nuc. Ac. Res.*; 1988; vol 16, num. 3.

15. Ausubel, F. M.; Brent, R; Kingston R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J. G.; Smith, J. A. Struhl, K.
Current Protocols in Molecular Biology. Boston, John Wiley & Sons, 1994–1997.

16. Howard Hughes Medical Institute and National Institutes of Health, National Human Genome Research Institute: http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi.

17. Sambrook & Russell

Molecular Cloning. A laboratory manual; NY, Cold Spring Harbor; 3rd ed. 2001.

18. Bassan, B. J.; Caetano-Anollés, G.

Silver staining of ADN in polyacrylamide gels; Appl Biochem Biotechnol; 1993; 42: 181–188.

19. Claros-Díaz; M.; Avila-Saez, C.

Bioquímica Aplicada; Septem Ediciones, España. 2001.

20. Varmus, H.

Genes and Biology of cancer; Scientific American Library; 1993.

21. Handt, O.; Sutherland, G. R.; Richards, R.

Fragile sites and microsatellite repeat instability; Mol. Genet. Metab. 70: p. 99–105. 2000

22. Tajara H.; Curi, P.

The chromosome 5q21 band minisatellite and head and neck cancer.; Cancer Gen Cytogen. 147: p. 87–88. 2003.

1- Cátedra de Biología Celular y Molecular (Bioquímica), Módulo de Bioquímica y Farmacia, Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales, UNaM. Av. Mariano Moreno 1375 (3300). Posadas, Misiones, Argentina. bcmb@fceqyn.unam.edu.ar.

2- Servicio de Citología Exfoliativa, Hospital Público SAMIC Alem de Autogestión, L.N. Alem, Misiones, Argentina.

Recibido: 24/08/07.

Aprobado: 22/04/08.

• Ariel Cariaga Martínez¹

Bioquímico graduado en la UNaM y Doctorando en el programa Biomedicina de la Universidad de Alcalá de Henares (España). Condecorado con la medalla al mejor promedio de la Carrera de Bioquímica durante el año 2006. Beneficiado por becas de la Fundación Carolina y por la Comunidad de Castilla la Mancha. Actualmente JTP Ad-Honorem de la Cátedra de Biología Celular y Molecular (Bioquímica). Dirige trabajos de tesis de graduación y de becarios del CEDIT.

• Selva Rosiello²

Bioquímica graduada en la UNaM. Actualmente Profesional del Hospital de Gestión Pública SAMIC situado en la ciudad de Eldorado.

• Pedro D. Zapata¹

Es Doctor por la Universidad de Alcalá de Henares, en el programa Biomedicina. Actualmente Profesor Regular Adjunto en las Cátedras de Biología Celular y Molecular (Bioquímica), Genética Molecular (Lic. en Genética), Biología Celular (Lic. en Genética) y Biotecnología Molecular (Ingeniería Química, Bioquímica y Farmacia). Categoría III en el Sistema Nacional de Incentivos a los Docentes-Investigadores. En Biomedicina beneficiario de un subsidio de la ANPCyT (PICT 05-15058) y Director de proyectos acreditados en el CIDET.

(pdr_dario@yahoo.com).