



Construcción de un modelo de regresión multivariante predictivo de cáncer de cuello uterino

María Correnti ¹.

Héctor Finol ².

José H. Chourio ³.

Ivis J. Graterol ⁴.

¹Laboratorio de Hematología y Oncología del Ministerio para el Poder Popular para la Salud (MPPPS).

²Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela

³Departamento de Informática .Facultad de Educación .Universidad de Carabobo, Valencia

⁴Departamento de Morfología Normal y Patológica, Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela de Medicina, Universidad de Carabobo, sede Aragua
ivis957@hotmail.com

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 19 de Octubre del 2012 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

RESUMEN

Las características microscópicas predictivas de cáncer se han sintetizado en la presencia de necrosis coagulativa de células tumorales, que es un sólido predictor de malignidad, otras son

formas no convencionales de las células tumorales y núcleos degenerados, hiperchromáticos y pleomórficos. Objetivo de la investigación: identificar las variables ultraestructurales de las células malignas y premalignas de mayor fortaleza predictiva de cáncer. Metodología: se tomaron 52 biopsias con diagnóstico de lesiones premalignas de cuello uterino y 13 con cáncer invasor. Las muestras fueron tratadas con técnicas convencionales para estudio de microscopía electrónica de transmisión, la data fue procesada con programa SPSS18. Resultados y conclusiones: En células premalignas se encontraron linfocitos(I), fibras musculares lisas alteradas(X), membrana plasmática discontinua (L), vasos capilares degenerados(H), citoplasma vacuolizado(C), fibroblastos con abundantes retículo endoplásmico rugoso(O), mitocondrias degeneradas(K), núcleos de contornos irregulares(D), ausencia de desmosomas(Y). Estos elementos fueron igualmente encontrados en muestras de cáncer invasivo, estos resultados permitieron el diseño de la ecuación: Cancer = 0,674 + 1,241 * I + 0,645 * X + 0,439 * L + 0,426 * H + 0,275 * C + 0,242 * O + 0,227 * K + 0,223 * D - 0,397 * Y

PALABRAS CLAVE: Modelo de regresión, Variables Predictivas, Ultraestructura, Cáncer

CONSTRUCTION OF A MULTIVARIATE REGRESSION MODEL PREDICTIVE OF CERVICAL CANCER

SUMMARY

The microscopic characteristics predictive of cancer have been synthesized in the presence of coagulative necrosis of tumor cells, which is a strong predictor of malignancy, other features are the unconventional forms of tumor cells and degenerate hyperchromatic pleomorphic nuclei .This research tried to identify ultrastructural variables in premalignant and malignant cells which could have greater predictive strength. Methods: 52 biopsies were taken from patients with premalignant cervical cancer and 13 with invasive cancer, samples were treated with conventional techniques for transmission electron microscopy, and data was processed with the program SPSS18®. Results and conclusions: in tissues with premalignant cells were found lymphocytes (I), altered smooth muscle fibers (X), plasma membrane discontinuous cells (L), degenerate capillaries (H), vacuolated cytoplasm (C), fibroblasts with abundant rough endoplasmic reticulum (O), mitochondria degenerate (K), nuclei with irregular contours (D), absence of desmosomes (Y). These elements were also found in invasive cancer samples, based on these results, the following equation was constructed: Cancer $\geq 0,674+1,241*I+0,645*X+0,439*L+0,426*H+0,275*C+0,242*O+0,227*K+0,223*D-0,397*Y$

KEY WORDS: Regression model, predictors, ultrastructure, Cancer

CONSTRUCCIÓN DE UN MODELO DE REGRESIÓN MULTIVARIANTE PREDICTIVO DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO

INTRODUCCIÓN

Histológicamente, el cuello uterino presenta el exocervix que está tapizado por epitelio escamoso, estratificado no queratinizado y el conducto endocervical, presenta un epitelio simple cilíndrico, mucosecretor alto. A la altura del orificio cervical externo ocurre una transición de epitelio escamoso estratificado a epitelio simple cilíndrico. Esta zona donde

confluyen ambos epitelios se denomina la unión escamocilíndrica del cérvix, considerada una zona de constantes cambios epiteliales y por lo tanto, vulnerable a transformaciones malignas. La citología exfoliativa y el estudio histopatológico han proporcionado terminologías y criterios de diagnóstico que permiten la lectura del frotis cérvico-uterino, siendo uno de los métodos que mayormente ha abierto el campo para estandarizar el tratamiento de las enfermedades cérvico-uterinas el sistema de Bethesda^(1,2). Cuando aparecen cambios atípicos en las capas basales del epitelio escamoso con predilección de las células espinosas y queratinizadas, esto marca el avance de la lesión. La atipia celular identificada en estas etapas se caracteriza por una marcada alteración de la relación núcleo-citoplasma, variación en el tamaño de los núcleos, pérdida de la polaridad, aumentos de las figuras mitóticas, mitosis anormales e hipercromasia, dándole todos estos cambios características de malignidad celular y entran en los límites de las lesiones tipo NIC II, que generalmente están asociadas a infección con los virus del papiloma humano de alto riesgo y son considerados cambios precoces asociados a los oncogenes virales. A medida que avanza la infección, se presenta una pérdida progresiva de la diferenciación celular que afecta a capas profundas del epitelio hasta quedar totalmente sustituidas por células atípicas inmaduras que no muestran diferenciación en la superficie, siendo diagnosticado como una lesión tipo NIC III. Landson y Press⁽³⁾ al estudiar ultraestructuralmente los carcinomas de células escamosas, observaron un número variable de tonofibrillas (agregación densa de tonofilamentos) que estaban presentes en el citoplasma. Por su parte, Kurman⁽⁴⁾ determinó ultrastructuralmente que la sustitución nuclear por figuras mitóticas morfológicamente anormales de las neoplasias intraepiteliales cervicales son compatibles con una progresiva deficiencia en la diferenciación normal, que se traduce en una disminución del glucógeno celular, alteración de los tonofilamentos, aumento del número de desmosomas y de los sitios de unión e incremento de la diferenciación celular, todo ello correlacionado con un aumento en la adhesión de las células y la aparición de seudópodos básales. Este autor señala que la superficie ultraestructural de los precursores del cáncer cervical, también difiere en la arquitectura normal, caracterizada por la presencia de "microaristas" y abundantes microvellosidades. Por otra parte, Ghadially⁽⁵⁾ reportó la presencia de desmosomas intracitoplasmáticos en una variedad de tumores epiteliales más que en otros estados patológicos, sin embargo, la ocurrencia de ellos no solo indica fusión celular, ya que ha sido visto en otras células multinucleadas. Se han reportado desmosomas intacitoplasmáticos en carcinoma de células escamosas, en células de queratoma palmo plantar y en queratinocitos de melanoma maligno. Estos desmosomas se han encontrado en varios epitelios incluyendo los escamosos, durante el proceso de neoplasia en donde muchos de ellos disminuyen en número o son digeridos (desmosomas intracitoplasmáticos), en otros casos aparece la mitad formado y la otra parte no está presente^(3,5,6). La combinación de la atipia nuclear y de la cavitación citoplasmática constituyen cambios coilocíticos y su sobre diagnóstico es un gran problema. Esta característica morfológica sola no es criterio para establecer una infección por VPH, ya que puede ser observada en las degeneraciones vacuolares que están relacionadas con la atrofia y la infección⁽⁷⁾. En el Estado Aragua, el reporte de casos negativos para VPH y neoplasia intraepitelial cervical (NIC) disminuyó considerablemente para el período 2008-2010, pero los casos de carcinoma invasivo aumentaron de manera alarmante, evidencia de ello es la presencia de 64 mujeres referidas al centro de radioterapia para su inicio de tratamiento⁽⁸⁾, además, se evidenció que la

procedencia de estas pacientes con cáncer atendidos en el centro de radioterapia y medicina nuclear "Dr. Alexis Humberto Trujillo Hernández" del Hospital Central de Maracay durante el periodo de 2008-2010, en el 77,82 por ciento de los casos provenían del estado Aragua.

La detección temprana del cáncer se dificulta dado que al inicio de la transformaciones neoplásicas, no puede ser detectada con claridad la presencia de células cancerosas, sin embargo el tejido ya ha sufrido una serie de alteraciones que son poco perceptibles mediante el microscopio óptico. Por consiguiente, no es posible la identificación de las alteraciones hasta las siguientes etapas de la enfermedad, donde las células cancerosas presentan una serie de alteraciones mayores, tanto en su función como en su morfología. En el caso de las células que sufren transformaciones neoplásicas, se presentan cambios que afectan la naturaleza fosfolipídica de la bicapa, como resultado de la actividad aumentada de las enzimas proteolíticas secretadas hacia el medio, aunado al hecho de que las células transformadas generalmente poseen nuevas proteínas en la superficie celular, generando importantes cambios estructurales en las membrana neoplásicas⁽⁹⁾. Se piensa, que los casos de NIC progresan por estos estados antes de desarrollar un cáncer^(10,11,12). Sin embargo, si bien es cierto que los cánceres cervicouterinos, en especial los invasores de células escamosas, vienen precedidos por una fase de enfermedades pre invasoras de largo tiempo, existen evidencias que el cáncer de cuello uterino, puede ocurrir sin que haya una detectable progresión a lo largo de los tres estadios y que una neoplasia intraepitelial de alto grado puede ocurrir sin que primero haya existido como una lesión de bajo grado^(13,14). Los estudios ultraestructurales y sus técnicas constituyen una herramienta que permitiría profundizar en el estudio de estas patologías^(8,15,16), sobre todo considerando la frecuencia de la neoplasia intraepitelial cervical en nuestro medio y la importancia que tiene en el diagnóstico precoz del cáncer cérvico-uterino, su aporte permitiría corroborar el diagnóstico anatomo-patológico. Utilizando las técnicas ultraestructurales y apoyados en técnicas morfométricas computarizadas, es posible identificar alteraciones de las células que tengan un valor predictivo mayor que solo el supuesto de infección de VPH^(17,18). Esto complementaría los estudios histopatológicos y moleculares de la lesión. Por otra parte, las características morfológicas que identifican a las lesiones intraepiteliales han llegado a estar enredadas en una trama de investigadores que las describen, causando diferencias importantes en la terminología y conduciendo al clínico a tratar de darle sentido a una serie de definiciones que significan algo diferente para cada investigador^(19,20,21). Un enfoque ultraestructural de la neoplasia intraepitelial unificaría el criterio diagnóstico, siendo más confiable para el médico la aplicación de las pautas de tratamiento establecidas⁽¹⁵⁾.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron muestras de tejido cérvico-uterino a las pacientes escogidas, previa firma de un documento de consentimiento informado para la toma de las muestras y demás aspectos Bioéticos necesarios. De las 53 muestras tomadas, para el estudio histopatológico, se obtuvo una porción del material para la evaluación ultraestructural. El estudio histopatológico se

realizó por la corporación de Salud del Estado Aragua. Este material se colocó en formol buffer tamponado al 10% y posteriormente fue incluido en parafina, se realizaron cortes de 3 micrómetros y fueron coloreados con hematoxilina- eosina.

Estudio ultraestructural: Se siguieron las técnicas de preparación de muestras conocidas como técnica del corte fino, la cual incluye la fijación, deshidratación, infiltración e inclusión del material. El proceso se inicia con la muestra hidratada y finaliza cuando la misma, libre de agua y preservada es inmersa en una matriz de resina plástica, penetrando en el interior de las células sustituyendo el agua y con ello, dándole firmeza para la obtención de los cortes finos (60-90 nm) .El traslado de las muestras se realizó en tubos estériles con buffer de traslado y colocados en hielo seco hasta llegar a los centros de estudios. En el caso de las muestras que serán estudiadas con microscopio electrónico de transmisión, se colocaron directamente en glutaraldehido y se prepararon las muestra para la observación de microscopio electrónico de transmisión, siguiendo el protocolo del Centro de Microscopía de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, se procedió a cortar con el ultramicrótomo y luego la tinción con acetato de uranilo y con citrato de plomo. Finalmente se procedió a la observación en el Microscopio Electrónico de Transmisión y a la toma de microfotografías de las muestras procesadas. De un total de 166 microfotografías de muestras de neoplasias intraepiteliales grado I,II,III de cuello uterino, de cuello sano y de cáncer invasor, se escogieron 145 para el estudio ultraestructural. La base de datos elaborada fue vaciada en una base nueva con las variables ultraestructurales , definidas con las letras del abecedario, estas variables fueron denominadas variables independientes. La variable dependiente fue el cáncer. Se determinó el valor y el significado del coeficiente de correlación de Pearson entre las variables dependientes y el cáncer, obtenidas mediante estudio ultraestructural y como salida se obtuvo una matriz de correlaciones. Se realizó Análisis de Regresión Múltiple, que es una técnica estadística utilizada para predecir o pronosticar una variable en función de otra. En este caso conocida una variable denominada dependiente (cáncer), se pronostica a través de varias variables denominadas como independientes o predictivas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 1

Variables ultraestructurales

| |
|---------------------------------------|
| A.-Necrosis celular, restos nucleares |
| B.-Cromatina desnaturizada |
| C.-Citoplasma vacuolizado |
| |

D.-Núcleos de contorno irregular o discontinuo

E.-Núcleo hipercromáticos

F.-Ausencia de organelas

G.-Eritrocitos deformados

H.-Capilares degenerados, endotelio engrosado,

I.- Presencia de Linfocitos

J.-Presencia de Mastocitos, células plasmáticas

K.-Mitocondrias degeneradas, edematizadas.

L.- Membrana Plasmática discontinua.

M.- Presencia de figuras mielínicas.

N.-Queratina dispersa en grumos y filamentos

O.-Fibroblastos con abundante Retículo ER.

P.-presencia de lipofuscina

Q.-Alteraciones del colágeno, desnaturalización.

R.-Ausencia de placas densas.

S.-Presencia de Macrófagos, vacuolas esofágicas y lisosomas.

T.- Desmosoma separados, escasos filamentos de queratina

W.-Neutrofilos, Granulocitos

X.-Fibras musculares lisas degeneradas.

Y.- Desmosomas ausentes.

Z.-Restos de adipositos.

U.-No hay presencia de membrana basal.

V.-Vasos con abundante ribosomas, sin caveolas, ni vesículas pinocíticas.

Fuente: Muestras recopiladas en pacientes del Ambulatorio María Teresa Toro. Aragua, Venezuela, por Graterol (2011).

Tabla 2

| ANOVA ^b | | | | | | |
|--------------------|-----------|-------------------|-----|------------------|-------|-------------------|
| Modelo | | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
| 1 | Regresión | 21,238 | 26 | ,817 | 3,434 | ,000 ^a |
| | Residual | 28,072 | 118 | ,238 | | |
| | Total | 49,310 | 144 | | | |

a. Variables predictoras: (Constante), Z, T, P, I, X, W, V, L, F, N, A, VPH, U, O, M, E, S, Q, G, H, B, D, J, C, K, Y

b. Variable dependiente: CíENCER

ANOVA: Prueba de hipótesis del modelo de regresión lineal multiples.

H₀: El modelo adaptado no es significativo al nivel de riesgo $\alpha = 0,05$

H₁: El modelo adoptado es significativo al nivel de riesgo $\alpha = 0,05$

Regla de Decisión:

- $Pv < \alpha$, Se rechaza H_0 - $Pv \geq \alpha$, No se rechaza H_0

Decisión: $Pv = 0.000 < \alpha = 0,005$, rechazar

Tabla. Variables predictoras

Tabla 3**Resumen de las variables predictivas de mejor calidad**

| Modelo Constante | Coeficiente B | Sig. = Pv. |
|--------------------------------|----------------------|-------------------|
| 1 | 0,674 | 0,000 |
| C | 0,275 | 024 |
| D | 0,223 | 040 |
| H | 0,426 | 021 |
| I | 1,241 | 001 |
| K | 0,227 | 008 |
| L | 0,439 | 005 |
| O | 0,242 | 013 |
| X | 0,645 | 016 |
| Y | -0,397 | 006 |
| . Variable dependiente: CÍNCER | | |

Fuente: Muestras recopiladas en pacientes del Ambulatorio María Teresa Toro. Aragua, Venezuela, por Graterol (2011).

Los resultados anteriores muestran que las variables predictoras de mejor calidad obtenidas a partir del presente estudio fueron las identificadas con las letras C,D,H,I,K,L,O,X,Y. Estas variables resultantes permiten elaborar una ecuación de regresión de la probabilidad asociada al mayor riesgo de cáncer.

Tabla 4. Variables ultraestructurales de mayor fortaleza

| |
|--------------------------|
| Aditivos |
| +1,241 I |
| +0,645 X |
| +0,223-----0,275 D,K,O,C |
| +0,426-0,439 H,L |
| Sustrativo |
| -0,397 Y |

Fuente: Muestras recopiladas en pacientes del Ambulatorio María Teresa Toro.Aragua, Venezuela, por Graterol (2011).

El análisis de las alteraciones ultraestructurales vistas en las células epiteliales malignas pre invasivas y comparadas con las invasivas, permitió caracterizar las etapas malignas preinvasivas asociadas o no a la infección del virus del papiloma humano en función de las variables de mayor fortaleza predictiva de cáncer. A partir de esto se formuló una ecuación de Regresión con las variables aditivas: presencia de linfocitos,fibras musculares lisas degeneradas, membrana plasmática discontinua, capilares degenerados, citoplasma vacuolizado fibroblastos con abundante retículo endoplásmico rugoso, mitocondrias degeneradas, núcleos de contornos irregulares y una variable sustractiva, la ausencia de desmosoma. La versión final de la ecuación se muestra de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} \widehat{\text{Cancer}} = & 0,674 + 1,241 * I + 0,645 * X + 0,439 * L + 0,426 * H + 0,275 * C + 0,242 \\ & * O + 0,227 * K + 0,223 * D - 0,397 * Y \end{aligned}$$

REFERENCIAS

- 1.-Manos, M. Michele, et al. "Identifying women with cervical neoplasia."JAMA: the journal of the American Medical Association281.17 1999: 1605-1610.
- 2.-Lorincze A, Reid R Cl?nicas de Ginecología y Obstetricia. Temas Actuales. Virus del papiloma humano. 1996. Mc Graw-Hill M?xico, D.F.pp. 3-4.
- 3.-Abramovici, Luigia C., German C. Steiner, and Fiona Bonar. "Myxoid chondrosarcoma of soft

- tissue and bone: a retrospective study of 11 cases."Human pathology 26.11 1995: 1215-1220.
- 4.-Kurman R Precancerous Lesion of the Cervix. Blaustein?S Pathology of the Female Genital Tract. 1994.4th ed. Verlag: Editorial Springer
- 5.-Ghadially Feroz N. Ultrastructural Pathology of the cell and Matrix. 1997; Fourth edition. Vol 2. Boston, Oxford.
- 6.-Russo J.,Larry T.,Russo I.Current Basis for the Ultrastructural Clinical.Diagnosis of Tumors: A Review. Journal of Electron Microscopy Technique.1985; 2:305-351.
- 7.-García de Barriola Anatomía Patológica de las Lesiones Premalignas y C?ncer de Cuello Uterino. 2002; Red de Sociedades Científicas M?dicas Venezolanas.IV Ponencia. Caracas, Venezuela.
- 8.-Antánez G. Sasha J,Herrera O.Juliana A,Leal G. Jedinso , Caracterización de los pacientes atendidos en el Centro de Radioterapia y Medicina Nuclear "Dr. Alexis Humberto Trujillo Hernández" del Hospital Central de Maracay. 2008-2010. Octubre de 2011. 2011, Tesis s/p Trabajo Especial de Grado para optar al T?tulo de M?dico Cirujano. Universidad de Carabobo.
- 9.-Cascales A.,élvarez-G?mez j. Metaloprote?nas, matriz extracelular y cáncer,An R.Acad. Nac. Farm 2010; 76(1):59-84
- 10.-Carreras, Xercavins,Checa.Virus del papilloma humano y C?ncer de cuello de útero. 2007; Editorial M?dica Panamericana.Venezuela.
- 11.-Cede?o F.B, H?ctor J. Finol Algunas consideraciones sobre la patología ultraestructural de los queratinocitos en leucoplasia.Acta odontol. venez, 2006, vol.43, no.1, p.14-18. ISSN 0001-6365.
- 12.-S?nchez SocarrísV .Papel de la Angiogénesis en el crecimiento Tumoral. Rev. Cubana Invest.Biomed 2001, 20(3): 223-30
- 13.-Ochoa, T.; Segu?, M. y Díaz, P. Morfometría de la Neoplasia Intraepitelial Cervical. Caracterización de las biopsias por ponche. 1997; Comunicación 061. WWW.conganat.org/iicongreso/comunic/061/
- 14.-Myers ER, McCrory DC, Nanda K, Bastian L, Matchar DB. Mathematical model for the natural history of human papillomavirus infection and cervical carcinogenesis. American Journal of Epidemiology 2000; 151(12):1158-1171
- 15.-Andrade R , Roschman-Gonzalez A., I Graterol y H. Finol. Morfometría Ultraestructural y Estad?stica Multivariante como M?todo Alternativo en el Diagnóstico de C?ncer de Cuello.Jornadas de Investigación y Extensión.Facultad de Ciencias 2010;.Salud 196.p465. Libro de res?menes On-line: www.coordinv.ciens.ucv.ve/jornadas.../Libro_resumenes_JIE10.pdf.Salud 196.p465.
- 16.-Hanahan d, Folkman J . Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell 1996; 86; 353-364.

17.-Marrero,González,Finol y Boada, Alteraciones mitocondriales en tejido tumoral y peritumoral de pacientes con cáncer colorrectal. *Acta odontol. venez*, 2009; 03 de Diciembre, vol.47, no.4. ISSN 0001-6365.

18.-Martánez-Diez Marta Mitocondrias y cáncer. 2008, Universidad Autonoma de Madrid.España. Tesis Doctoral inédita leída en la Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología Molecular. Fecha de consulta: 12-05-2012

19.-Cornejo, U. R. Análisis morfológico y ultraestructural de componentes asociados a síntesis proteica en células mamarias normales y transformadas. *Int. J. Morphol.*, 2004; 22(3):221-224.

20.-Craterol Ivis J.,Hector. J. Finol, Maria Correnti and Maira Vila .Ultrastructural changes in premalignant and malignant lesions of the uterine cervix with papillomavirus infection. *Journal of Cancer Research and Experimental Oncology* 2010; Vol. 1(2), Available online <http://www.academicjournals.org/JCREO> ISSN 2141-2243 ©2010 Academic Journals

21.-Tapia T.M., Ramón G.E., Batina N., , Nanoestructura y propiedades de la membrana plasmática de células HeLa por microscopía de fuerza atómica (AFM).*Respyn-Revista Salud Pública y Nutrición*, 2007; 7, 1-11.

22.-Chourio josé Hugo .Estadística aplicada a la investigación educativa. 2011 Primera edición Valencia.