

SOCIEDAD MEXICANA DE ONCOLOGÍA, A.C.

# GACETA MEXICANA DE ONCOLOGÍA

VOLUMEN 7, NÚM. 3, MAYO-JUNIO 2008

ISSN: 1665-9201

## EDITORIAL

Es necesario incrementar y organizar la investigación nacional en cáncer

## ARTÍCULOS ORIGINALES

Uso de la eritropoyetina para el tratamiento de la anemia en pacientes con cáncer cervical: riesgos y beneficios

La baja infiltración de células de la respuesta inmune en el tumor y la DNA-aneuploidía de las clonas tumorales están asociados a la recurrencia tumoral en el cáncer cervicouterino en etapas tempranas

Mecanismos epigenéticos celulares y sus alteraciones en cáncer

Mortalidad temprana en niños con leucemia linfoblástica aguda en un país en vías de desarrollo; factores asociados con el pronóstico



PERIODICA-UNAM • INBIOMED • ARTEMISA • LILACS

**SMeO**

Sociedad Mexicana de Oncología, A.C.

[www.smeo.org.mx](http://www.smeo.org.mx)

# GACETA MEXICANA DE ONCOLOGÍA

Publicación Oficial de la Sociedad Mexicana de Oncología

mayo - junio 2008, Vol. 7, Núm. 3

## Editora en jefe

**Dra. Guadalupe Cervantes Sánchez**

Jefe de Oncología Clínica, Centro Médico "20 de Noviembre", ISSSTE, México, D.F.

## Coeditor

**Dr. Francisco J. Ochoa Carrillo**  
Instituto Nacional de Cancerología

## Editor invitado

**Dr. Víctor Valdespino**  
Universidad Autónoma Metropolitana-Campus Xochimilco



### Mesa directiva 2008-2009

**Dr. Pedro M. Escudero de los Ríos**  
Presidente  
**Dr. Rogelio Martínez Macías**  
Vicepresidente  
**Dra. Ana Myryam Silva Uribe**  
Secretaría  
**Dra. Patricia Cortés Esteban**  
Tesorera

### Vocales

**Dr. Adolfo Fuentes Alburo**  
**Dra. Sandra Sánchez Félix**  
**Dr. Gregorio Quintero Beuló**

### Coordinador de capítulos

**Dr. Daniel Capdeville García**

### Consejeros

**Dr. Rolando Ocampo Le Royal**  
**Dr. Francisco Javier Ochoa Carrillo**

### Asistente editorial:

**Marisela Melchor Melchor**



**ELSEVIER**

### Editado por:

**Masson Doyma México, S.A.**  
Av. Insurgentes Sur 1388 Piso 8,  
Col. Actipan, C.P. 03230,  
Del. Benito Juárez, México D.F.  
Tels. 55 34 85 59, 55 24 10 69

### Director General:

**Alejandro González Peña**

### Director Editorial:

**Julio Cabiedes H.**

### Directora Comercial:

**Ma. del Carmen Solórzano**

### Editores asociados

**DR. ROLANDO OCAMPO LE ROYAL**  
Consejero de la Sociedad Mexicana de Oncología  
**DRA. AURA A. ERAZO VALLE SOLÍS**  
Jefe de División de Padecimientos Neoplásicos  
y Proliferativos CMN "20 de Noviembre" ISSSTE  
**DR. PEDRO M. ESCUDERO DE LOS RÍOS**  
Director del Hospital de Oncología, CMN "Siglo XXI", IMSS  
**DR. HUGO FEDERICO RIVERA MÁRQUEZ**  
Jefe del Servicio de Oncología, Hospital de Pediatría, CMN "Siglo XXI", IMSS  
**DR. ÉDGAR ROMÁN BASSAURE**  
Jefe del Servicio de Oncología, Hospital General de México, OD  
**DRA. AURORA MEDINA SANSÓN**  
Jefe de la Unidad de Oncología, Hospital Infantil de México "Federico Gómez"  
**DRA. ROCÍO CÁRDENAS CARDOS**  
Jefe de la Unidad de Oncología, Instituto Nacional de Pediatría  
**DR. ALEJANDRO MOHAR BETANCOURT**  
Director General del Instituto Nacional de Cancerología  
**DR. EUCARIO LEÓN RODRÍGUEZ**  
Coordinador del departamento de Hematología y Oncología,  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"  
**DR. FRANCISCO MARIO GARCÍA RODRÍGUEZ**  
Jefe de la Unidad de Oncología, Hospital Juárez de México  
**DR. JOSÉ ANTONIO OCEGUERA VILLANUEVA**  
Profesor Titular del Curso de Cirugía Oncológica, Hospital Civil de Guadalajara  
**DR. RAMIRO JESÚS SANDOVAL**  
Secretario de Servicios a la Comunidad UNAM.  
**DR. RAÚL CASTELLANOS ALEJANDRE**  
Jefe de Especialidad de Oncología, Hospital Central Norte  
de Alta Especialidad, Petróleos Mexicanos  
**DR. GILBERTO SOLORZA LUNA**  
Ex-Presidente del Consejo Mexicano de Oncología

### Sociedad Mexicana de Oncología, A.C.

Tuxpan 59 PH, Col. Roma, México, D.F., C.P. 06760  
Tel. 55 74 14 54 / Fax 55 84 12 73  
[smeo@prodigy.net.mx](mailto:smeo@prodigy.net.mx)  
[www.smeo.org.mx](http://www.smeo.org.mx)

Dirigida a: Especialistas en oncología  
y miembros de la Sociedad Mexicana de Oncología  
Suscripción: \$ 1,000.00  
Registro Núm.: 04-2003-090317145700102  
Periodicidad: Seis números al año

La SMEO no garantiza, ni directa ni indirectamente, la calidad ni eficacia de ninguno de los productos o servicios descritos en los anuncios u otro material de carácter comercial contenido en este número.

### Comité editorial

**DR. SALVADOR ALVARADO AGUILAR**  
Psicooncología  
**DRA. ROSALVA BARRA MARTÍNEZ**  
Sarcomas y partes blandas y óseas  
**DRA. MA. ELENA CRUZ RAMOS**  
Prótesis maxilofacial  
**DR. JOSÉ FRANCISCO GALLEGOS HERNÁNDEZ**  
Tumores de cabeza y cuello  
**DR. MARCOS GUTIÉRREZ DE LA BARRERA**  
Biología molecular  
**DR. JAVIER KELLY GARCÍA**  
Tumores de tórax y mediastino  
**DR. PEDRO LUNA PÉREZ**  
Tumores de colon, recto y ano  
**DR. HÉCTOR MARTÍNEZ SAÍD**  
Piel y melanoma  
**DR. ARMANDO FERNÁNDEZ OROZCO**  
Coordinador Comité Científico  
**DR. ALFONSO JORGE OJEDA ORTIZ**  
Colposcopia  
**DR. MARTHA AGUILAR MARTÍNEZ**  
Oncología pediátrica  
**DR. SINUHE BARROSO BRAVO**  
Tumores mamarios  
**DR. GILBERTO MORGAN VILLELA**  
Oncología médica  
**DR. PEDRO SOBREVILLA CALVO**  
Linfomas  
**DR. ALFONSO TORRES LOBATÓN**  
Tumores ginecológicos  
**DR. SERGIO TORRES VARGAS**  
Tubo digestivo alto y hepatobiliopancreático  
**DRA. LAURA TORRECILLAS TORRES**  
Cuidados Paliativos  
**DR. HUGO MANZANILLA GARCÍA**  
Tumores urológicos  
**DRA. AÍDA MOTTA GARCÍA**  
Radioterapia

# GACETA MEXICANA DE ONCOLOGÍA

## Contenido

### Editorial

Es necesario incrementar y organizar la investigación nacional en cáncer

*Dr. Víctor Valdespino*

63

### Artículos originales

Uso de la eritropoyetina para el tratamiento de la anemia en pacientes con cáncer cervical: riesgos y beneficios

*Rocha-Zavaleta L y López Pérez TV*

65

La baja infiltración de células de la respuesta inmune en el tumor y la DNA-aneuploidía de las clonas tumorales están asociados a la recurrencia tumoral en el cáncer cervicouterino en etapas tempranas

*Valdespino V, Mantilla A, Rosales GV, Valdespino Castillo P, Ortiz R*

70

Mecanismos epigenéticos celulares y sus alteraciones en cáncer

*Valdespino V, Valdespino Castillo P*

80

Mortalidad temprana en niños con leucemia linfoblástica aguda en un país en vías de desarrollo; factores asociados con el pronóstico

*López Facundo NA, Talavera Piña JO, Tejocote Romero I*

93

## Contents

### Editorial

*Increase and organize the national cancer research is necessary*

*Dr. Víctor Valdespino*

63

### Original articles

*Erythropoietin use to treat cervical cancer-associated anaemia: risk and benefits*

*Rocha-Zavaleta L y López Pérez TV*

65

*Low density tumor-infiltrating immune cells and tumor-DNA-aneuploidy clones are associated for recurrence in early cervical cancer*

*Valdespino V, Mantilla A, Rosales García V, Valdespino Castillo P, Ortiz R*

70

*Epigenetic cellular mechanisms and cancer abnormalities*

*Valdespino V, Valdespino Castillo P*

80

*Early mortality in children with acute lymphoblastic leukemia in a developing country: Factors associated with prognosis*

*López Facundo NA, Talavera Piña JO, Tejocote Romero I*

93

## Es necesario incrementar y organizar la investigación nacional en cáncer

Dr. Víctor Valdespino

Este suplemento de la *Gaceta Mexicana de Oncología* está dedicado a difundir los trabajos de investigación premiados en el XXV Congreso Nacional de Oncología en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, celebrado en octubre de 2007. Asimismo, está dedicado a comentar algunos indicadores situacionales diagnósticos de la Investigación en Oncología en México y proponer a partir de ellos, una estrategia integradora a cargo de la Sociedad Mexicana de Oncología que permita incrementar y organizar la investigación nacional en cáncer.

El cuerpo del suplemento está conformado por el artículo del trabajo ganador del Premio Nacional “Dr. Guillermo Montaña Islas” 2007, y por el artículo del trabajo ganador del Premio Nacional de Investigación en el área de Oncología Pediátrica, junto con dos artículos de revisión de temas de actualidad en la investigación transnacional en cáncer. Los otros dos trabajos premiados en el XXV Congreso Nacional, el del área de Cirugía Oncológica y el otorgado a médicos residentes, no fueron publicados en este suplemento porque los manuscritos no fueron enviados. Similar condición sucedió con manuscritos invitados de otros investigadores biomédicos en cáncer.

En relación con la investigación médica en cáncer, la iniciativa de la Sociedad Mexicana de Oncología de organizar las convocatorias del Premio Nacional “Dr. Guillermo Montaña Islas” y más recientemente de los Premios Nacionales de Investigación en las diferentes áreas, aunado a la evaluación objetiva de los trabajos de investigación participantes por parte de evaluadores designados por el Consejo Mexicano de Oncología, han

estimulado a la comunidad de oncólogos a realizar investigaciones biomédicas básicas y clínicas. Aunque esta iniciativa es trascendente a favor del desarrollo de la Investigación Nacional en Cáncer, sólo corresponde a los primeros pasos encaminados a su mejoramiento y logro de un nivel competitivo en ella.

Otra iniciativa importante y reciente de la Sociedad Mexicana de Oncología, ha sido tomar a su cargo la *Gaceta Mexicana de Oncología*, la cual funciona como órgano de difusión científica. Su adecuada administración permite la oportunidad equitativa de todos los socios y los no socios interesados, en publicar artículos científicos. Aunque la *Gaceta Mexicana de Oncología* ha logrado en corto tiempo su registro en las bases nacionales bibliográficas PERIÓDICA-UNAM, IMBIOMED, ARTEMISA, LILACS, es conveniente que todos los socios sumemos esfuerzos para que en corto plazo esta revista logre su registro en bases internacionales.

Opinar sobre la situación que guarda la investigación biomédica y clínica del cáncer en México, implica realizar un análisis cuanti-cualitativo de los productos generados por esta actividad. Una búsqueda de los artículos publicados de cáncer o relacionados al cáncer de autores nacionales en la base bibliográfica MEDLINE (la estrategia de búsqueda fue *mexican cancer 2007* o *cancer mexican 2007*), identificó 82 referencias de artículos publicados en revistas nacionales e internacionales indizadas entre los años 1998 al 2007 (predominaron los artículos publicados en revistas nacionales). En esta serie, no se identificaron artículos publicados en revistas de elevado impacto bibliométrico. Sin embargo, aunque el

número de artículos publicados por autores nacionales no corresponde a la cantidad real, refleja a un acercamiento/aproximación de la escasa producción global de los investigadores biomédicos y clínicos nacionales en cáncer.

No existe en México un registro nacional de artículos publicados en revistas indizadas al respecto. Así empleamos otra estrategia, con la finalidad obtener otra imagen de aproximación de la Investigación en Oncología en México. Ésta consistió en enlistar algunos indicadores situacionales de investigación en cáncer de países con reconocimiento internacional y compararlos con los correspondientes nacionales. A partir de ello, identificamos múltiples grandes diferencias: En México no contamos con Centros Interdisciplinarios de investigación biomédica/clínica, no hemos generado productos valiosos de investigación (artículos con numerosas citas), no hemos patentado algún producto biotecnológico en el área de cáncer, no contamos con industrias farmacéuticas nacionales en apoyo a la investigación y no formamos grupos cooperativos de investigación con las industrias biotecnológicas/farmacéuticas transnacionales, no contamos con programas académicos para formar investigadores en cáncer, no hemos editado una revista especializada indizada en bases bibliográficas internacionales, no somos competitivos internacionalmente ni contamos con líderes científicos en las diferentes áreas de investigación.

#### **SOMOS DEPENDIENTES DE LA INVESTIGACIÓN EN CÁNCER QUE SE REALIZA EN OTROS PAÍSES DEL MUNDO**

Así, la investigación biomédica/clínica mexicana en la Oncología está retrasada varias décadas particularmente porque, en parte, no estamos coordinados en este tipo de actividades. Las diferentes Instituciones de Educación Superior y del Sector Salud no han diseñado ni ejecutado las políticas necesarias para lograr una investigación competitiva en las enfermedades cancerosas, y esto se

deba probablemente porque no cuentan con los grupos interdisciplinarios colaborativos al interior de sus organizaciones. La Sociedad Mexicana de Oncología A.C., sí cuenta con un numeroso grupo de oncólogos interdisciplinarios investigadores y con el interés particular de incrementar y organizar la investigación del cáncer como uno de sus objetivos primordiales. En diciembre de 2007, uno de nosotros le propuso al Presidente de la Sociedad Mexicana de Oncología (2008-2009), Dr. Pedro Escudero de los Ríos, la iniciativa de conformar un Comité Científico de Investigación Oncológica (biomédica básica y clínica), independiente a los 17 Comités Científicos establecidos previamente. Las funciones de este Comité serían el de apoyar a los oncólogos investigadores en el diseño y ejecución de protocolos biomédicos y clínicos de investigación competitivos a nivel internacional. El financiamiento requerido para esta función podría obtenerse predominantemente a partir de un fondo económico otorgado por la Industria Farmacéutica Oncológica en México y por los fondos de la Sociedad Mexicana de Oncología A.C. Este Comité Científico de Investigación Oncológica, podría conformarse por los oncólogos cuyos trabajos de investigación han sido reconocidos con el Premio Nacional “Dr. Guillermo Montaña Islas” en los últimos años, junto con investigadores biomédicos en cáncer invitados de Instituciones de Educación Superior. El Comité Científico de Investigación Oncológica coordinaría y administraría el otorgamiento de financiamiento a los grupos de investigadores que presentaran protocolos competitivos de investigación a nivel internacional.

Es una gran oportunidad y responsabilidad para la comunidad de oncólogos mexicanos y particularmente para la nueva administración de la Sociedad Mexicana de Oncología A.C., incrementar y organizar la investigación nacional en cáncer, y trabajar para lograr la competitividad y reconocimiento científico a nivel internacional en esta área. Nuestros logros deberán trascender en beneficio de la Sociedad Mexicana.

# Uso de la eritropoyetina para el tratamiento de la anemia en pacientes con cáncer cervical: riesgos y beneficios

## *Erythropoietin use to treat cervical cancer-associated anaemia: risk and benefits*

Rocha-Zavaleta L y López Pérez TV.\*

### ▷ RESUMEN

La anemia se presenta con frecuencia en pacientes con cáncer cervical, reduciendo significativamente la calidad de vida y la respuesta a quimiorradioterapia. La eritropoyetina es un factor que se está empleando para tratar la anemia en pacientes oncológicos. La presente es una revisión de las pruebas realizadas en humanos y en líneas celulares para estudiar los efectos de la administración de la misma. Los resultados publicados, indican que su administración incrementa los niveles de hemoglobina y mejora la respuesta a quimio-radioterapia, pero aumenta ligeramente el riesgo de eventos tromboembólicos. Los datos de estudios *in vitro* apuntan a la posibilidad de que la eritropoyetina induzca la proliferación, sobrevivencia y migración de células de tumores cervicales. Sin embargo, estos estudios son aún controversiales, por lo que se necesita mayor evidencia experimental para determinar el verdadero potencial de la eritropoyetina.

**Palabras clave:** eritropoyetina, cáncer cervical, anemia.

### ▷ SUMMARY

*Anaemia frequently occurs in patients with cervical cancer. Anaemia impacts significantly on quality of life and reduces the response to chemo-radiotherapy. Erythropoietin is an agent which is used to treat cancer-associated anaemia. This review discusses data from clinical trials and in vitro studies on the effect of erythropoietin administration. Published results show that administration of erythropoietin increases the level of hemoglobin and improves the response to chemo-radiotherapy, but also induces a slight increment of thrombotic events. In vitro studies suggest that erythropoietin might induce proliferation, survival and migration of cells derived from cervical tumors. However, these studies are still controversial, thus more specific experimental data are needed to determine the risk-benefit of erythropoietin as a treatment for cancer-related anaemia.*

**Key words:** erythropoietin, cervical cancer, anaemia.

\* Departamento de Biología Molecular y Biotecnología. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Correspondencia: Dra. Leticia Rocha-Zavaleta. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Departamento de Biología Molecular y Biotec-

nología, UNAM. Circuito Escolar s/n, Ciudad Universitaria, México D.F., C.P. 04510. México. Tel.: (55) 56 22 92 18, fax.: (55) 56 22 92 12. Correo electrónico: lrochaz@correo.biomedicas.unam.mx

## ▷ INTRODUCCIÓN

La anemia se presenta con frecuencia en pacientes con cáncer.<sup>1</sup> Una alternativa para su tratamiento es la administración de eritropoyetina recombinante humana. El objetivo de la presente revisión es presentar las evidencias experimentales que muestran los efectos, tanto benéficos como adversos, del uso de la eritropoyetina para el tratamiento de la anemia asociada al cáncer cervical.

## ▷ ANEMIA Y CÁNCER CERVICAL

En pacientes con cáncer cervical, la frecuencia de anemia está correlacionada directamente con la etapa clínica del tumor, presentándose en un promedio de 25% de pacientes en etapa I, 33% en etapa II y hasta 40% de pacientes en etapa III.<sup>2</sup> En un estudio realizado en el Instituto Nacional de Cancerología se detectó que 37% de pacientes con cáncer cervical se presenta con niveles menores a 12 g/dL de hemoglobina.<sup>3</sup>

La anemia tiene consecuencias severas en la calidad de vida de las pacientes,<sup>4</sup> e incide negativamente en el control local de la enfermedad y la sobrevida.<sup>5-7</sup> Tradicionalmente, la anemia ha sido tratada mediante transfusiones sanguíneas. Sin embargo, las transfusiones presentan riesgos importantes,<sup>8</sup> por lo que ha sido necesario desarrollar nuevas alternativas para el tratamiento de la anemia. Una de estas alternativas es la eritropoyetina recombinante humana.<sup>9</sup>

## ▷ ERITROPOYETINA

La eritropoyetina (Epo) es una hormona que controla la producción de eritrocitos<sup>10</sup> regulando la proliferación, diferenciación y sobrevivencia de los progenitores eritroides a través de la interacción con su receptor de membrana (EpoR).<sup>11</sup> La Epo recombinante humana, también conocida como epoetina  $\alpha$ , es utilizada para incrementar los niveles de hemoglobina y reducir el uso de transfusiones sanguíneas en pacientes con anemia severa.<sup>12-14</sup>

Más de un centenar de estudios relacionados con la administración de Epo en pacientes oncológicos anémicos, han sido realizados en los últimos 10 años. En conjunto estos estudios han mostrado evidencias de un impacto positivo sobre los niveles de hemoglobina y hematocrito, lo cual ayuda a reducir la hipoxia local en los tumores,<sup>15</sup> produciendo una mejor respuesta a la radioterapia y a quimiofármacos, sobre todo aquellos cuya función es dependiente de oxígeno, como la ciclofosfamida, carboplatino y doxorubicina.<sup>16</sup> Asimismo, se ha observado que los requerimientos de transfusiones sanguíneas se reducen

significativamente con la terapia eritropoyética, y la calidad de vida de los pacientes experimenta un aumento significativo. Desafortunadamente, aún no hay suficientes datos para determinar el efecto del tratamiento con Epo en la sobrevida de los pacientes oncológicos. A pesar de los beneficios reportados, el tratamiento con Epo también presenta efectos adversos, ya que se ha detectado un ligero incremento del riesgo de eventos tromboembólicos e hipertensión en pacientes que reciben Epo.<sup>17</sup>

En el caso particular del cáncer cervical los estudios del efecto de la Epo en pacientes anémicas son escasos. En 1994 Dusenbery y cols., evaluaron la eficiencia de la Epo para revertir la anemia en pacientes con cáncer cervical que eran tratadas con radiación y cisplatino. En este estudio, se determinó que la Epo era bien tolerada y elevaba el nivel de hemoglobina.<sup>18</sup> En un estudio fase II, que incluyó 53 pacientes de 26 instituciones diferentes, se estudió el efecto de la administración de Epo y hierro oral en pacientes con tumores cervicales en etapas IIB-IVA tratadas con radiación pélvica y cisplatino, seguido de braquiterapia intracavitaria. Los autores observaron que la administración de Epo y hierro oral incrementan gradualmente los niveles de hemoglobina en mujeres anémicas durante su tratamiento con quimiorradioterapia. Sin embargo, también detectaron una incidencia mayor de trombosis venosa profunda en estas pacientes.<sup>19</sup> Resultados similares fueron obtenidos en un estudio retrospectivo en el que se incluyeron 147 pacientes con tumores en etapas IB-IVA tratadas con quimiorradioterapia, en las que se observó una incidencia incrementada de trombosis venosa sintomática cuando recibieron Epo.<sup>20</sup> Recientemente, se llevó a cabo un estudio clínico fase III para evaluar el efecto de mantener los niveles de hemoglobina  $\geq 12$  g/dL mediante la administración de Epo en pacientes anémicas con cáncer cervical tratadas con cisplatino y radiación. Desafortunadamente, este estudio se dio por terminado prematuramente por el riesgo de eventos tromboembólicos, por lo que no pudo ser definido el impacto potencial de la Epo en la sobrevivencia total y sobrevida libre de enfermedad de las pacientes.<sup>21</sup> Los datos reportados indican una prevalencia de trombosis en 2.7-7.7% de pacientes en tratamiento con quimio y/o radioterapia, mientras que la frecuencia aumenta a 13-22% en mujeres que además reciben Epo.

## ▷ EXPRESIÓN DE EPOR EN CÁNCER CERVICAL Y SUS CONSECUENCIAS

Resultados como los descritos han despertado un gran interés en el estudio de los mecanismos celulares y moleculares activados por la Epo en las células de tumores

**Tabla 1.**

Expresión de Epo y EpoR en diferentes tipos de tumores humanos.

Tipo de tumor	EpoR	Epo	Referencia
Cáncer de Mama	+	+	22-24
Glioma	+	-	38
Cáncer cervical	+	+	38
Carcinoma de ovario	+	-	25
Carcinoma renal	+	+	26
Neuroblastoma	+	-	27
Cáncer de próstata	+	-	28
Glioblastoma	+	+	29
Cáncer gástrico	+	+	29
Coriocarcinoma de estómago	+	+	29
Cáncer de pulmón	+	+	29
Cáncer pancreático	+	+	29
Carcinoma de cabeza y cuello	+	+	30
Tumor hepático	+	+	31

EpoR: Receptor para eritropoyetina.

Epo: Eritropoyetina.

+: Indica la expresión positiva de Epo o EpoR.

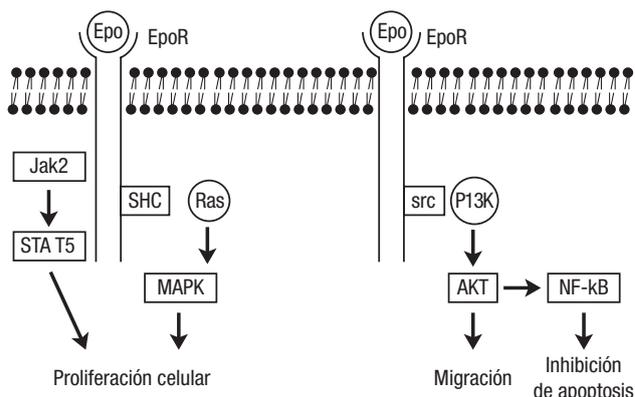
-: Indica que la expresión de Epo o EpoR no ha sido detectada.

cervicales. Hoy se sabe que las células de los tumores humanos expresan el EpoR<sup>22-31</sup> (tabla 1), y que las células derivadas de tumores cervicales además producen eritropoyetina,<sup>32-34</sup> lo cual sugiere la existencia de un sistema autócrino de estimulación y abre la posibilidad de que sean capaces de responder a la presencia de Epo exógena. La unión de la Epo a su receptor en la membrana induce la activación de cascadas de señalización que estimulan la proliferación, sobrevivencia y migración celular (figura 1). Por tanto, es importante estudiar si estos efectos se producen también en células tumorales que expresan el EpoR. Algunos estudios han reportado incrementos en la proliferación de líneas celulares derivadas de tumores de próstata,<sup>28</sup> riñón<sup>26</sup> y glándula mamaria.<sup>22</sup> Sin embargo, otros estudios muestran resultados contrarios, incluso utilizando las mismas líneas celulares derivadas de cáncer de mama y riñón.<sup>35-37</sup> Hasta el momento no se ha estudiado el efecto que la Epo podría ejercer en células derivadas de cáncer cervical.

La administración de Epo en pacientes anémicas parece tener un impacto en la regulación de la hipoxia tumoral, mejorando la respuesta a quimio y radioterapia. Sin embargo, Belenkov (2004), observó que la adición de 30 U/mL de Epo al medio de cultivo de células derivadas de cáncer cervical induce resistencia al tratamiento con radiación y cisplatino.<sup>38</sup> En un estudio independiente, se reportó que la combinación de cisplatino

**Figura 1.**

Vías de señalización activadas por la eritropoyetina. La unión de la eritropoyetina (EPO) a su receptor (EpoR) en la membrana celular, activa diferentes vías de señalización que inducen diferentes procesos fisiológicos. Las vías de JAK2-STAT5 y SHC-Ras-MAPK han sido involucradas en la inducción de proliferación. La vía src-PI3K-AKT puede inducir la migración celular, mientras que si activa al factor transcripcional NF-kB puede inhibir la apoptosis o muerte celular.



y Epo incrementa la sobrevivencia de células derivadas de un tumor cervical.<sup>32</sup>

Por otro lado, se ha observado que la Epo puede actuar como un quimioatrayente de células de tumores cervicales. Usando sistemas de migración *in vitro*, Hamadmad y Hohl (2008), demostraron que la Epo incrementa el potencial migratorio de las células tumorales en una forma dependiente de la concentración y el tiempo.<sup>39</sup> Estas observaciones podrían tener implicaciones en la capacidad metastásica de las células tumorales.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

A pesar de que el uso de Epo en pacientes con cáncer se remonta a más de una década, aún prevalecen dudas acerca de la conveniencia de su utilización. Los beneficios observados en las pacientes estudiadas, incluyendo la reversión de la anemia y el incremento en la calidad de vida, son claros y contrastan con lo observado en estudio con líneas celulares. En este sentido es muy importante considerar las diferencias en los sistemas experimentales. Se sabe que los niveles farmacológicos de Epo en el suero son de aproximadamente 1 U/mL después de la administración subcutánea de una sola dosis de 600 U/kg, lo cual corresponde a la dosis terapéutica máxima recomendada, por lo que es muy probable que las concentraciones reales del factor que pueden alcanzar y ser incorporadas por las células tumorales sean mucho más

bajas que aquellas que se utilizan en los ensayos con líneas celulares *in vitro*.

Otro factor a considerar es el microambiente que prevalece en una masa tumoral. Es ampliamente conocido que los tumores humanos desarrollan zonas hipóxicas, en las cuales la oxigenación es pobre. Algunas células tumorales son capaces de adaptar su metabolismo a esta condición y sobrevivir. Este fenómeno está asociado con el desarrollo de resistencia a fármacos y radiaciones ionizantes. La ausencia misma de oxígeno es un factor que desfavorece el tratamiento con algunos agentes quimioterapéuticos, cuya acción farmacológica depende de la presencia de moléculas de oxígeno. Por lo tanto, el aumento en el aporte de oxígeno como consecuencia del incremento del hematocrito por la administración de Epo, tendrá un efecto favorable en el tratamiento con quimiorradioterapia. En contraste, los experimentos realizados con células derivadas de cáncer cervical se llevan a cabo en condiciones normóxicas, o bien, en condiciones de hipoxia inducida sobre cultivos en monocapas. Estos sistemas están constituidos por un microambiente celular altamente artificial, por lo que poseen un valor predictivo limitado.

Finalmente, y tomando en cuenta lo anteriormente expuesto, podemos concluir que los estudios realizados hasta hoy proveen un panorama parcial de los posibles efectos de la administración de Epo en pacientes anémicas con cáncer cervical. Las evidencias experimentales parecen soportar con mayor fuerza el efecto benéfico de la Epo, sin embargo, es necesario realizar más y mejores experimentos *in vitro* que nos permitan entender en su debida magnitud los posibles efectos adversos que este factor eritropoyético podría tener en las células tumorales que expresan el EpoR.

## Bibliografía

- Auclerc G, Meric JB, Pommeyrol A, Rixie O, Khayat D. Anemia in cancer patients before treatment. *Bull Cancer* 2003;90:S128-S132.
- Marchal C, Rangedard L, Brunaud C. Anemia impact on treatments of cervical carcinomas. *Cancer Radiother* 2005;9:87-95.
- Candelaria M, Cetina L, Dueñas-Gonzalez A. Anemia in cervical cancer patients. *Med Oncol* 2005;22:1-8.
- Cella D, Kallich J, McDermott A, Xu X. The longitudinal relationship of hemoglobin, fatigue and quality of life in anemic cancer patients: results from five randomized clinical trials. *Ann Oncol* 2004;15:979-986.
- Vigario G, Kurohara SS, George FW. Association of hemoglobin levels before and during radiotherapy with prognosis in uterine cervix cancer. *Radiology* 1973;106:649-652.
- Kapp DS, Fischer D, Gutierrez E, Kohorn EI, Schwartz PE. Pretreatment prognostic factors in carcinoma of the uterine cervix: a multivariate analysis of the effect of age, stage, histology and blood counts on survival. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1983;9:445-455.
- Girinski T, Pejovic-Lenfant MH, Bourhis J, Campana F, Cosset JM, Petit C *et al*. Prognostic value of hemoglobin concentrations and blood transfusions in advanced carcinoma of the cervix treated by radiation therapy: results of a retrospective study of 386 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989;16:37-42.
- Goodnough LT. Risks of blood transfusion. *Crit Care Med* 2003;31 (Suppl 12):S678-S686.
- Blackwell KL, Kirkpatrick JP, Zinder SA, Broadwater G, Farell F, Jolliffe L *et al*. Human recombinant erythropoietin significantly improves tumor oxygenation independent of its effect on hemoglobin. *Cancer Res* 2003;63:6162-6165.
- Lacombe C, Mayeux P. Biology of erythropoietin. *Haematologica* 1998;83:724-732.
- Tilbrook PA, Klinken SP. Erythropoietin and erythropoietin receptor. *Growth Factors* 1999;17:25-35.
- Henry DH, Bowers P, Romano MT, Provenzano R. Epoetin alfa. Clinical evolution of a pleiotropic cytokine. *Arch Intern Med* 2004;164:262-276.
- Rodgers GM 3rd, Cella D, Chanan-Khan A, Chesney C, Cleeland C, Coocia PF *et al*. Cancer and treatment-related anemia. *J Natl Compr Canc Netw* 2005;3:772-789.
- Rizzo JD, Lichtin AE, Wolf SH, Seidenfeld J, Bennett CL, Cella D *et al*. Use of epoetin in patients with cancer: evidence-based clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology and the American Society of Hematology. *J Clin Oncol* 2002;20:4083-4107.
- Vaupel P, Thews O, Hoeckel M. Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. *Med Oncol* 2001;18:243-259.
- Harrison L, Blackwell K. Hypoxia and anemia: factors in decreased sensitivity to radiation therapy and chemotherapy? *The Oncologist* 2004;9(Suppl 5):31-40.
- Bokemeyer C, Aapro MS, Courdi A, Foubert J, Link H, Osterborg A *et al*. EORTC guidelines for the use of erythropoietin proteins in anaemic patients with cancer. *Eur J Cancer* 2004;40:2201-2216.
- Dusenbery KE, McGuire WA, Holt PJ, Carson LF, Fowler JM, Potish RA. Erythropoietin increases hemoglobin during radiation therapy for cervical cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994;29:1079-1084.
- Lavey RS, Liu PY, Greer BE, Robinson WR 3rd, Chang PC, Wynn RB, *et al*. Recombinant human erythropoietin as an adjunct to radiation therapy and cisplatin for stage IIB-IVA carcinoma of the cervix: a Southwest Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 2004;95:145-151.
- Wun T, Law L, Harvey D, Sieracki B, Scudder SA, Ryu JK. Increased incidence of symptomatic venous thrombosis in patients with cervical carcinoma treated with concurrent chemotherapy, radiation, and erythropoietin. *Cancer* 2003;98:1514-1520.
- Thomas G, Ali S, Hoebbers FJ, Darcy KM, Rodgers WH, Patel M *et al*. Phase III trial to evaluate the efficacy of maintaining hemoglobin levels above 12.0 g/dL with erythropoietin vs above 10.0 g/dL without erythropoietin in anemic patients receiving concurrent radiation and cisplatin for cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2007;108:317-325.
- Acs G, Acs P, Beckwith SM, Pitts RL, Clements E, Wong K *et al*. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer. *Cancer Res* 2001;61:3561-3565.
- Acs G, Zhang PJ, Rebbeck TR, Acs P, Verma A. Immunohistochemical expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in breast carcinoma. *Cancer* 2002;95:969-981.
- Arcasoy MO, Amin K, Karayal AF, Chou SC, Raleigh JA, Varia MA *et al*. Functional significance of erythropoietin receptor expression in breast cancer. *Lab Invest* 2002;82:911-918.
- McBroom JW, Acs G, Rose GS, Krivak TC, Mohyeldin A, Verma A. Erythropoietin receptor function and expression in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2005;99:571-577.
- Westenfelder C, Baranowski RL. Erythropoietin stimulates proliferation of human renal carcinoma cells. *Kidney Int* 2000;58:647-657.
- Wollman Y, Westphal G, Blum M, Simantov R, Blumberg S, Peer G *et al*. The effect of human recombinant erythropoietin on the growth of a human neuroblastoma cell line. *Life Sci* 1996;59:315-322.
- Feldman L, Wang Y, Rhim JS, Bhattacharya N, Loda M, Sytkowski AJ. Erythropoietin stimulates growth and STAT5 phosphorylation in human prostate epithelial and prostate cancer cells. *Prostate* 2006;66:135-145.
- Yasuda Y, Fujita Y, Matsuo T, Koinuma S, Hara S, Tazaki A *et al*. Erythropoietin regulates tumour growth of human malignancies. *Carcinogenesis* 2003;24:1021-1029.
- Lai SY, Childs EE, Xi S, Coppelli FM, Gooding WE, Wells A *et al*. Erythropoietin-mediated activation of JAK-STAT signaling contributes to cellular invasion in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* 2005;24:4442-4449.
- Nakamatsu K, Nishimura Y, Suzuki M, Kanamori S, Maenishi O, Yasuda Y. Erythropoietin/erythropoietin-receptor system as an angiogenic factor in chemically induced murine hepatic tumors. *Int J Clin Oncol* 2004;9:184-188.
- Acs G, Zhang PJ, McGrath CM, Acs P, McBroom J, Mohyeldin A *et al*. Hypoxia-inducible erythropoietin signaling in squamous dysplasia and squamous cell carcinoma of the uterine cervix and its potential role in cervical carcinogenesis and tumor progression. *Am J Pathol* 2003;162:1789-1806.

33. Shenouda G, Mehio A, Souhami L, Duclos M, Portelance L, Belenkov A *et al.* Erythropoietin receptor expression in biopsy specimens from patients with uterine cervix squamous cell carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2006;16:752-756.
34. Leo C, Horn L-C, Rauscher C, Hentschel B, Liebmann A, Hildebrandt G *et al.* Expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in cervical cancer and relationship to survival, hypoxia, and apoptosis. *Clin Cancer Res* 2006;12:6894-6900.
35. Mundt D, Berger MR, Bode G. Effect of recombinant human erythropoietin on the growth of human tumor cell lines in vitro. Micro-titer-tetrazolium assay. *Arzneimittelforschung* 1992;42:92-95.
36. Rosti V, Pedrazzoli P, Ponchio L, Zibera C, Novella A, Lucotti C *et al.* Effect of recombinant human erythropoietin on hematopoietic and non-hematopoietic malignant cell growth in vitro. *Haematologica* 1993;78:208-212.
37. Liu WM, Powles T, Shamash J, Propper D, Oliver T, Joel S. Effect of haemopoietic growth factors on cancer cell lines and their role in chemosensitivity. *Oncogene* 2004;23:981-990.
38. Belenkov AI, Shenouda G, Rizhevskaya E, Courmoyer D, Belzile J-P, Souhami L *et al.* Erythropoietin induces cancer cell resistance to ionizing radiation and to cisplatin. *Mol Cancer Ther* 2004;3:1525-1532.
39. Hamadmad SN, Hohl RJ. Erythropoietin stimulates cancer cell migration and activates RhoA protein through a MAPK/Erk-dependent mechanism. [en prensa] *J Pharmacol Exp Ther*.

# La baja infiltración de células de la respuesta inmune en el tumor y la DNA-aneuploidía de las clonas tumorales están asociados a la recurrencia tumoral en el cáncer cervicouterino en etapas tempranas

*Low density tumor-infiltrating immune cells and tumor-DNA-aneuploidy clones are associated for recurrence in early cervical cancer*

Valdespino V<sup>1</sup>, Mantilla A<sup>2</sup>, Rosales García V<sup>3</sup>, Valdespino Castillo P<sup>4</sup>, Ortiz R<sup>5</sup>.

## ▷ RESUMEN

**Introducción:** En las pacientes tratadas de cáncer cervicouterino (CC) y con riesgo bajo de recaída, no es infrecuente que presenten tasas de recurrencia tumoral altas. El identificar marcadores pronósticos en el microambiente tumoral, es importante para predecir este grupo.

**Material y métodos:** Cuarenta y dos pacientes con CC escamoso, tratadas convencionalmente, fueron estudiadas retrospectivamente. Treinta muestras del grupo con CC controlado y 12 muestras con CC recurrente en un periodo de seguimiento de 5 años, fueron comparados. Las muestras de material tumoral fijado en parafina fueron valoradas mediante un método histopatológico no clásico, parámetros de DNA-ploidía y de expresión de Ki-67 y PCNA, empleando respectivamente tinción con

## ▷ SUMMARY

**Background and objectives:** Sporadically, early cervical cancer (CC)-conventionally treated patients with low classical relapse factors shows a high-ranking relapse. The elucidation of other microenvironment tumor prognosis markers is therefore important to predict them.

**Methods:** Forty two early stage squamous cell CC-conventionally treated patients were studied retrospectively. Samples of a CC group with controlled disease and other with recurrence in the disease-free interval of 5 years (DFS) were compared. Archival paraffin-embedded tissue samples were assessed with histological grading system, DNA ploidy parameters and Ki-67 and PCNA expression, using hematoxylin-eosin staining, flow cytometry studies, and immunohistochemical staining, respectively.

<sup>1</sup>Universidad Autónoma Metropolitana-Campus Xochimilco, México, D.F., México. <sup>2</sup>UMAE de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D.F., México. <sup>3</sup>Unidad de Citometría de Flujo, CINVESTAV, Instituto Politécnico Nacional, México, D.F., México. <sup>4</sup>Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México. <sup>5</sup>Universidad Autónoma Metropolitana-Campus Iztapalapa, México, D.F., México.

*Instituciones donde se realizó el estudio:* UMAE de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, y Unidad de Citometría de Flujo, CINVESTAV, Instituto Politécnico Nacional, México, D.F., México.

*Correspondencia:* Víctor Valdespino MD PhD. Dir: Ángel Urraza Núm. 517, Colonia del Valle, C.P. 03100. México, D.F. Tel: (55) 55597768. *Correo electrónico:* valdespinov@yahoo.com

hematoxilina-eosina, citometría de flujo e inmunohistoquímica.

**Resultados:** A través de un análisis estadístico univariado, la densidad de la infiltración de las células de la respuesta inmunológica en el tumor (ICRIT) y la tasa de DNA-aneuploidía de las clonas del tumor demostraron ser estadísticamente significativas como predictores de recurrencia tumoral. La baja ICRIT ( $p = 0.002$ ; Mann-Whitney Rank Sum Test) y la DNA-aneuploidía de las clonas tumorales ( $p = 0.006$ ; Mann-Whitney Rank Sum Test), fueron asociados a la recurrencia tumoral en el cáncer cervicouterino en etapas tempranas, y viceversa. El grado de queratinización, polimorfismo nuclear, el patrón de invasión, la proporción de células en fase S, y la expresión de Ki-67 y PCNA, no mostraron diferencia estadística entre ambos grupos.

**Conclusiones:** La baja ICRIT y la DNA-aneuploidía de las clonas tumorales se correlacionaron con un pobre pronóstico clínico en las muestras de pacientes con CC. La identificación de estos dos marcadores de mal pronóstico, podrían incluirse en el estudio rutinario histopatológico de los especímenes de CC como parte de la evaluación integral de la paciente.

**Palabras clave:** cáncer cervicouterino, marcadores tumorales pronósticos, infiltración de las células de la respuesta inmunológica en el tumor, DNA-aneuploidía.

**Results:** In univariate statistical analysis density tumor-infiltrating immune cells (TIIC) and clonal tumor DNA-aneuploidy rates showed to be statistically significant pretreatment predictors of tumor-recurrence. Low density tumor-infiltrating immune cells ( $p = 0.002$ ; Mann-Whitney Rank Sum Test) and DNA-aneuploidy in low rates of tumor cell populations ( $p = 0.006$ , Mann-Whitney Rank Sum Test) were associated with recurrence tumor, and vice versa. The degree of keratinization, nuclear polymorphism, pattern of invasion, S-phase determinations, and Ki-67/PCNA expression showed no statistical difference in DFS between both CC-groups.

**Conclusions:** Low TIIC and tumor-DNA aneuploidy correlated with poor survival in CC-samples. The identification of these poor prognostic markers could be included in the routine histopathological variables of CC specimens as part of the integral clinical evaluation.

**Key words:** cervical cancer, tumor marker prognosis, tumor-infiltrating immune cells, DNA-aneuploidy.

## ► INTRODUCCIÓN

El cáncer cervicouterino (CC), es la neoplasia más frecuente en las mujeres en el mundo después del cáncer mamario, se han estimado 493,000 nuevos casos para 2005 y provocó 274,000 muertes en 2002. La mayoría de los casos se presentan en los países en desarrollo (83%), en donde el CC alcanza 15% en frecuencia y más de 200,000 mujeres mueren por recurrencia tumoral a pesar de los tratamientos oncológicos convencionales.<sup>1</sup> Algunos factores clínicos e histopatológicos se asocian con el riesgo de recaída, entre ellos, etapa clínica específica (de acuerdo a la Federación Internacional de Ginecólogos y Obstetras), el volumen tumoral, la profundidad de invasión, las metástasis ganglionares, la invasión linfática y vascular, el tipo histopatológico y la diferenciación tumoral.<sup>2</sup> Globalmente las pacientes presentan recurrencia tumoral proporcional, en 10-20% en etapas clínicas

tempranas, 33-45% en etapas intermedias y 58-80% en etapas avanzadas.

No es infrecuente que las pacientes tratadas con CC con riesgo bajo de recaída, presenten tasas altas de recurrencia tumoral. El identificar otros marcadores pronósticos en el microambiente tumoral, nos podría ayudar a identificar a ese grupo de pacientes.

La disregulación génica y la inestabilidad genómica son características comunes de los tumores sólidos.<sup>3</sup> Los cambios estructurales cromosómicos, tanto de medianas y pequeñas regiones de la cromatina producen cambios en el contenido tal del DNA nuclear, fenómeno comúnmente conocido como aneuploidía. Algunos tumores presentan escasas aberraciones cromosómicas, mientras que otros, presentan gran cantidad de ellas. El CC se asocia a las infecciones persistentes por virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo oncogénico. Las oncoproteínas E6 y E7 de los VPH afectan las vías de señalización

intracelular de la proliferación, supervivencia y apoptosis, lo que en parte explica su panorama de carcinogénesis y transformación tumoral.<sup>4</sup> La expresión de estos genes en las células madre epiteliales puede provocar cambios estructurales en numerosos cromosomas, con ganancias y pérdidas de sus segmentos, o los deja aparentemente intactos cuando el número de copias y pérdida de heterocigosidad (PHC) de pequeñas regiones se presenta en el genoma.<sup>5-7</sup>

La aneuploidía contribuye o coincide con el desarrollo tumoral<sup>8,9</sup> y uno de los mejores métodos para evaluarla es mediante la citometría de flujo (FC, cuyo análisis de resolución es del orden de gigabases).<sup>10</sup> El efecto de las oncoproteínas virales E6 y E7, es el de facilitar integración del VPH al DNA cromosomal, y provocar ganancia y pérdida de copias y PHC concurrentes, particularmente en pequeñas regiones cromosómicas como 3p14-22, 4p16, 5p15, 6p21-22, 11q23, 17p13.3; y amplificación de otras regiones como 3q24-28, lo cual altera la regulación de G2/M en el control del ciclo celular.<sup>5-7,11</sup> La alteración génica que regula el aparato mitótico conduce a la formación de múltiples centrosomas, lo que se asocia a mitosis multipolares, junto con otras aberraciones numéricas y estructurales.<sup>7</sup>

Globalmente, la DNA-ploidía se ha considerado como un factor pronóstico de progresión del CC en etapas avanzadas.<sup>6,11-14</sup> En los últimos 20 años, los índices de DNA-ploidía y de proliferación celular han sido estudiados en CC como factores pronósticos; sin embargo, los resultados de la determinación de estos índices han sido controversiales en su asociación a la evolución clínica de la enfermedad;<sup>11-21</sup> algunos estudios han demostrado su asociación con mal pronóstico,<sup>13-15</sup> y muchos otros no la han demostrado.<sup>16-21</sup> De igual manera, la fracción de células en fase S y la expresión de marcadores de proliferación (Ki67/PCNA) han mostrado correlación inconsistente como factores clínicos pronósticos en CC.<sup>16,22-26</sup>

Por otra parte, sólo 1-3% de las mujeres que cursan con infección persistente por VPH de alto riesgo, desarrollarán CC.<sup>27</sup> Los mecanismos de defensa que limitan la infección viral, como la respuesta inmunológica natural y adaptativa son necesarios para erradicar la infección, y evitar la carcinogénesis y la progresión tumoral.<sup>28</sup> Se han realizado muy escasos estudios que valoran la respuesta inmunológica local en CC, los cuales han sugerido que la presencia de una respuesta inflamatoria potente o una elevada infiltración de linfocitos son factores importantes relacionados con pacientes libres de tumor.<sup>16, 29-32</sup>

El objetivo de este estudio es evaluar comparativamente la relación de algunas características del microambiente tumoral, como grado de queratinización,

polimorfismo nuclear, patrón de invasión, infiltración de células de la respuesta inmune en el tumor, la DNA-aneuploidía de las clonas tumorales, fracción de células en fase S y expresión de Ki-67 y PCNA como factores pronósticos en pacientes con CC en etapas tempranas, tratados convencionalmente, con seguimiento clínico de 5 años. Este estudio aportaría información adicional en relación con los resultados controversiales previos.

## ► MATERIAL Y MÉTODOS

### Grupo de estudio

Retrospectivamente, seleccionamos los expedientes clínicos de pacientes con CC tratados y vigilados por 5 años en los Servicios de Ginecología y Radioterapia de la Unidad Médica de Alta Especialidad de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (UMAE) entre los años 2000 y 2002. Los criterios de selección de los expedientes de los pacientes con CC fueron: tipo epidermoide, bien o moderadamente diferenciado, en etapas clínicas tempranas (IB y IIA de la FIGO), tratadas con histerectomía radical tipo III y linfadenectomía pélvica (etapa histopatológica pT1b1, T2a, pN0) o radioterapia radical (dosis media 76 Gy al punto A, mediante la combinación de radioterapia externa con intracavitaria). Cuarenta y dos pacientes fueron incluidos en el análisis de este estudio (**tabla 1**), 30/42 pacientes fueron tratados con cirugía y 12/42 con radiaciones. Las pacientes fueron agrupadas en dos grupos de acuerdo a su evolución clínica en los siguientes cinco años. El primer grupo con seguimiento promedio de 59 meses (rango de 58 a 60 meses;  $n = 30$ ), cursaron con control pélvico del tumor postratamiento (CPT); el segundo grupo con seguimiento promedio de 30 meses (rango de 12 a 60 meses,  $n = 12$ ), presentaron recurrencia pélvica tumoral postratamiento (RPT).

### Material tumoral

El material tumoral fue fijado en formaldehído y conservado en bloques de parafina. Los especímenes fueron estudiados en los Departamentos de Anatomía Patológica del propio Hospital, y en la Unidad de Citometría de Flujo del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Una vez que fue identificado el bloque de tejido tumoral, se realizaron nuevos cortes que se tiñieron con hematoxilina y eosina (H&E) para su confirmación, para posteriormente valorar los parámetros histopatológicos clásicos y no clásicos<sup>16,31</sup> y obtener los cortes tumorales para los estudios de la ploidía

**Tabla 1.**

Infiltración de células de la respuesta inmune en el tumor, índice de DNA de las clonas tumorales y expresión de Ki-67 en muestras de pacientes con cáncer cervicouterino en etapas clínicas tempranas.

Pacientes con CC tratados libres de tumor en el seguimiento clínico de 5 años				
Paciente <sup>a</sup>	Etapla clínica <sup>b</sup>	Infil. cel resp inm. <sup>c</sup>	Índice-DNA <sup>d</sup>	% de Ki-67 <sup>e</sup>
P1	IB	2	1.06	40
P2	IB	1	1	60
P3	IB	3	1.12	60
P4	IIA	2	1.17	50
P5	IB	4	1.13	80
P6	IB	3	1.15	40
P7	IB	2	1	50
P8	IB	2	1	60
P9	IB	2	1	70
P10	IB	3	1	80
P11	IB	1	1	80
P12	IB	2	1	80
P13	IB	1	0.87	60
P14	IB	2	1	50
P15	IB	2	1	35
P16	IB	3	1.1	50
P17	IIA	4	1.16	0
P18	IB	2	1	35
P19	IB	2	1.12	80
P20	IB	1	1.2	0
P21	IB	2	1	50
P22	IB	2	1	80
P23	IB	2	1	40
P24	IB	3	1.1	70
P25	IB	1	1	50
P26	IB	2	1	60
P27	IIA	3	1	80
P28	IB	3	1	70
P29	IB	2	0.88	50
P30	IB	2	1.13	40
P31	IB	2	1	80
P32	IB	3	1.14	70
P33	IB	4	1	90
P34	IB	2	1	80
P35	IB	3	1	60
P36	IIA	2	1.2	50
P37	IB	4	1.15	20
P38	IB	4	1.13	80
P39	IB	4	1.14	90
P40	IB	3	1.2	70
P41	IB	2	1.24	50
P42	IB	4	1.3	90

<sup>a</sup> Todos los especímenes fueron estudiados antes de que las pacientes fueran tratadas.

<sup>b</sup> La etapa clínica fue establecida de acuerdo a la FIGO.

<sup>c</sup> La determinación de los valores fue tomado de la escala de la propuesta por Kristensen y cols. (bibliografía 31).

<sup>d</sup> Valores obtenidos empleando el citómetro FACScalibur, y el software ModFit LT.

<sup>e</sup> Valores determinados por medio de inmunohistoquímica (el anticuerpo MIB-1).

del DNA. Los estudios histopatológicos y de citometría de flujo fueron realizados respectivamente por AM y por VRG, quienes desconocieron el estado clínico de las pacientes al momento de realizarlo (estudio ciego).

### Análisis del DNA por citometría de flujo

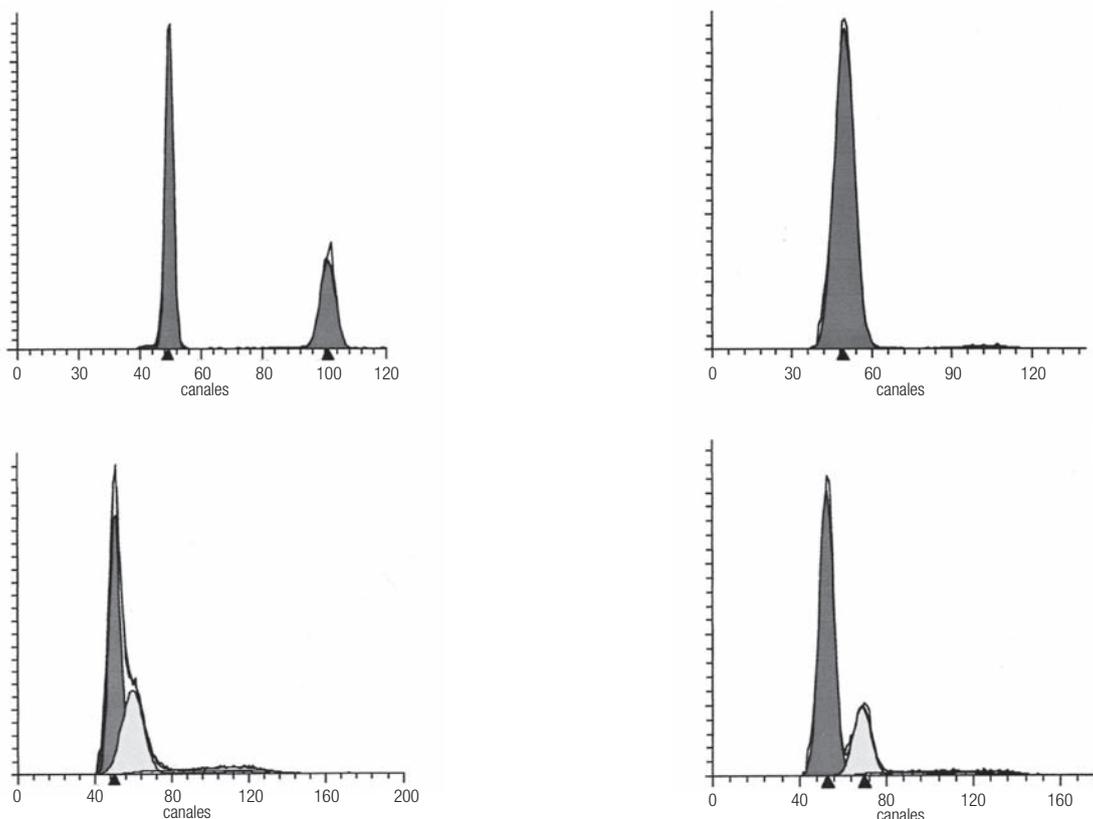
Se seleccionaron muestras que contenían más del 20% de células tumorales en los cortes histopatológicos, y se seccionaron rebanadas de 50 micras de grosor. El tejido tumoral fue desparafinado, hidratado, disgregado y digerido con pepsina, y los núcleos obtenidos fueron teñidos con yoduro de propidio (IP), de acuerdo al método de Hedley y cols.<sup>33</sup> Para eliminar el RNA y cuantificar el DNA se empleó el Kit Cycle TEST™ PLUS DNA Reagent (que contiene RNAasa y IP), bajo las indicaciones de los proveedores (Becton Dickinson USA). Los núcleos fueron analizados a través del citómetro FACScalibur (BD Biosciences, San José, CA), previamente calibrado y ajustado con partículas QC-DNA (BD Biosciences, San José, CA). Los núcleos fueron analizados a bajo flujo, en promedio de 100-300 núcleos/segundo. Fueron estudiados por lo menos 10,000 eventos en el histograma, la fracción celular de cada fase del ciclo celular y el índice de DNA fueron evaluados, mediante análisis automático y análisis manual con el software ModFit LT™ (BD Biosciences, San José, CA). El índice de DNA fue determinado de manera habitual.<sup>15,16</sup> Tres tipos de ploidías fueron identificados de acuerdo a *i)* valor del índice de DNA, *ii)* por 2 o más picos en G0-G1 distintos, o *iii)* por ambos. En la **figura 1** se muestran 2 histogramas representativos de muestras de pacientes con poblaciones tumorales aneuploides.

### Determinación del grado de queratinización, del polimorfismo nuclear, del patrón de invasión y de la infiltración de células de la respuesta inmune en el tumor

En los cortes histopatológicos de CC teñidos con H&E, fueron valorados los parámetros clásicos y no clásicos. Estos últimos fueron analizados de acuerdo a la escala propuesta por Bryne y cols., y Kristensen y cols.,<sup>31,34</sup> en cortes de 4 µm de espesor preparadas con las técnicas rutinarias para estudios histológicos y teñidas con H&E. El análisis se realizó por triplicado, en tres zonas diferentes del tumor. En cada tumor se otorgó puntuación de 1 a 4 a cada uno de los parámetros histopatológicos no clásicos. Brevemente, la puntuación empleada fue como sigue: grado de queratinización (1 = alto, 2 = moderado, 3 = mínimo, 4 = sin queratinización), polimorfismo nuclear (1 = escaso, 2 = moderado, 3 = abundante, 4 = muy abundante), patrón de invasión (1 = empujante, 2 = infiltración por

**Figura 1.**

Histogramas representativos del DNA de las poblaciones tumorales de las muestras de cáncer cervicouterino, teñidos con yoduro de propidio. El análisis fue realizado en un citómetro de tipo FACScalibur. En A, histograma de control con partículas DNA QC (Becton Dickinson); B, Histograma unimodal de una muestra diploide de CC; C y D, corresponden a dos patrones diferentes de histograma de muestras aneuploides de CC.



cordones sólidos, 3 = infiltración por cúmulos pequeños, 4 = infiltración marcada) y de la infiltración de células de la respuesta inmune en el tumor (1 = marcada, 2 = moderada, 3 = mínima, 4 = nula)<sup>31,34</sup> La puntuación individual y la puntuación sumatoria fueron determinadas.

#### **Identificación de los marcadores de proliferación Ki-67 y PCNA por inmunohistoquímica**

Cortes de 4 micras del CC fijados en parafina fueron teñidos usando el método de biotina-estreptavidina-peroxidasa (Supersensitive immunodetection system, LP-UL, Biogenex, San Ramon CA). Los cortes desparafinados fueron colocados en una solución 1 mM de EDTA con pH de 8, junto con peróxido de hidrógeno al 1% por 10 minutos,<sup>35</sup> y luego en las laminillas cubiertas de aminopropiltriethoxisileno, para posteriormente incubarlas con

los anticuerpos monoclonales durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos de ratón contra Ki-67 (MIB-1 clone, DAKO A/S, Glostrup, Denmark) y contra PCNA (PCa0, Abcam Ltd, Cambridge, UK) fueron usados. Las laminillas fueron luego incubadas con la mezcla biotina-estreptavidina-peroxidasa por 20 minutos cada una. El tejido fue teñido con 3,3'-tetrahidrocloruro de diaminobenzidina preparada en amortiguador de Tris pH de 7.6 por 5 min. Los controles positivos (tejido de amígdala palatina) fueron verificados. La expresión porcentual del marcador fue valorada en 500-1000 células de CC. Sólo las tinciones intensas o moderadas fueron consideradas como positivas. La tinción de estas proteínas en los campos microscópicos fue determinada porcentualmente en relación al número total de núcleos de células epiteliales contados. De manera convencional Ki-67 marca células

en las fases S, G2 y M, y el PCNA solamente en fase S en los estudios inmunohistoquímicos.

### Análisis estadístico

El periodo libre de enfermedad o la presentación de recurrencia tumoral a 5 años, a partir del primer tratamiento recibido por las pacientes con CC, fueron considerados como las variables de referencia para seleccionar los dos grupos.

Las puntuaciones individuales o la suma de ellas, de los diferentes parámetros histopatológicos no clásicos, los parámetros de la DNA-ploidía y la expresión de los Ki-67 y PCNA del grupo CPT y del grupo RPT de pacientes, fueron comparados usando la prueba de Mann-Whitney Rank Sum Test. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas con niveles de  $p < 0.05$ . Los datos fueron analizados en el software Sigma Stat (SPSS Inc., Chicago, IL).

## ▷ RESULTADOS

Las características de los dos grupos de pacientes, relacionadas a su etapa clínica, y las determinaciones de infiltración de células de la respuesta inmune en el tumor, de DNA-aneuploidía de las clonas tumorales y expresión de Ki-67 son presentados en la tabla 1.

### DNA-aneuploidía con bajos valores de DI, fueron encontrados en las muestras de los pacientes que cursaron con recurrencia del CC

El análisis de DNA nuclear empleando CF fue realizado en 42 muestras tumorales. El coeficiente de variación de la curva de distribución del DNA en el pico  $G_0$ - $G_1$  fue 5-8% en las muestras diploides y de 6-10% en las muestras aneuploides. En 50% (21/42) de todo el conjunto se obtuvo un histograma unimodal de  $G_0$ - $G_1$ , células tumorales diploides, con un índice de DNA (DI) = 1; 7.1% (3/42) correspondieron a muestras de CC cercanas a diploides, con DI = 0.90-1.10, y 42.8% (18/42) a las tumores aneuploides (DI = 1.11-1.30, y  $< 0.90$ ); no se encontraron tumores multiploides. Los tumores diploides y los cercanos a diploides fueron integrados en un solo grupo. Las tres muestras con DI cercano a diploide mostraron dos picos distintos de  $G_0$ - $G_1$  en el histograma, y fueron adicionados al grupo de DI-aneuploide. Por lo que, finalmente DNA-aneuploidía fue observada en 50% de los casos (21/42) de todo el conjunto.

El DI promedio en muestras del grupo de CPT fue de 1.041 (SD 0.08) con 33.3% de aneuploidía (10/30) y del grupo RPT fue de 1.125 (SD 0.103) con 66.6% de

aneuploidía (8/12) (tabla 1). Los valores de DNA-ploidía comparando los correspondientes de los grupos RPT y CPT fueron significativamente diferentes, las muestras de pacientes que cursaron con recurrencia tumoral presentaron poblaciones tumorales aneuploides ( $p = 0.006$ , Mann-Whitney Rank Sum Test; tabla 1). La figura 1 muestra histogramas de poblaciones de CC diploide y aneuploides. No hubo diferencia al comparar el porcentaje de células de la fracción S en las poblaciones tumorales de ambos grupos.

### Menor infiltración de células de la respuesta inmune en el tumor, fue encontrada en muestras de pacientes con CC recurrente al tratamiento

Encontramos que la densidad de infiltración de células de la respuesta inmune en el tumor (respuesta inmunológica del paciente) fue significativamente menor en los pacientes con RPT (valor promedio de 3.08 con SD de 0.86), comparada con el grupo con CPT (promedio de 2.20, con SD de 0.80), con  $p = 0.002$  (Mann-Whitney Rank Sum Test) (tabla 1). Estos resultados fueron obtenidos cuando los valores promedio fueron organizados en una tabla de 2 x 2, correspondiente a pacientes con CPT y con RPT *vs.* nula/mínima y moderada/marcada densidad de infiltración de células de la respuesta inmune en el tumor.

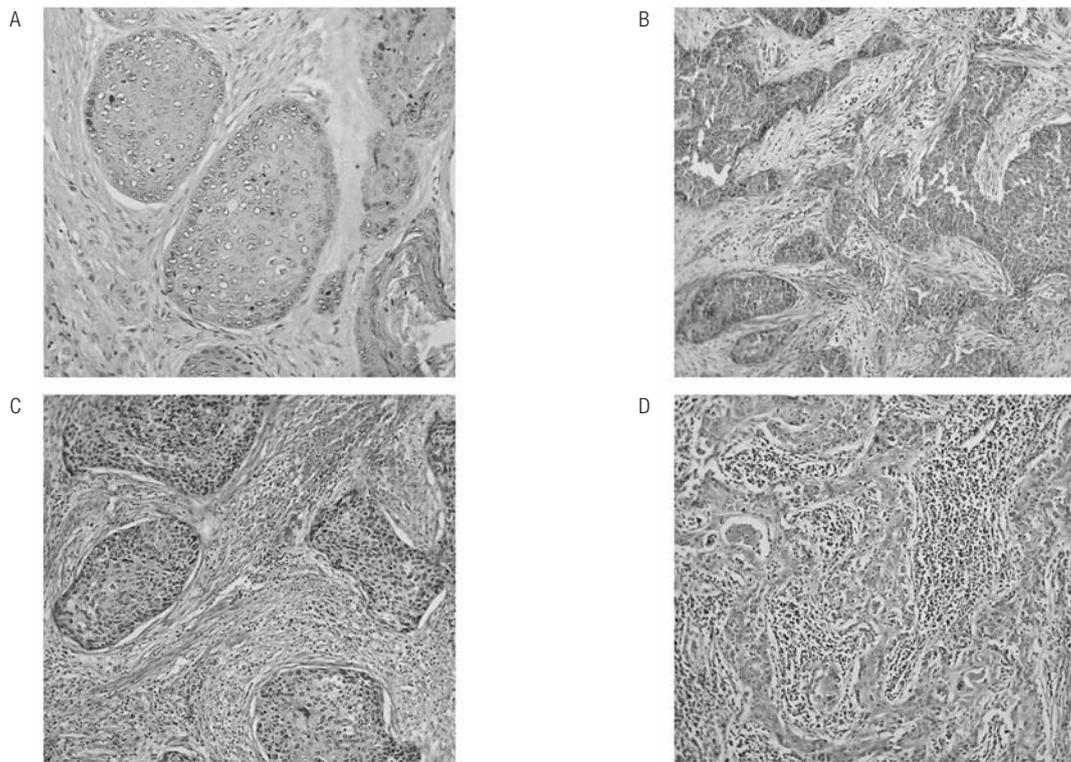
Los valores promedios comparativos entre los grupos con CC demostró que el polimorfismo nuclear y el patrón de invasión fueron parecidos, y que aunque el correspondiente al grado de queratinización demostró diferencia, ésta no fue estadísticamente significativa ( $p = 0.054$ ). Los valores promedios del grado de queratinización, polimorfismo nuclear y patrón de invasión entre los grupos CPT y RPT fueron respectivamente 3.8, 2.83 y 2.4, con una sumatoria de los cuatro parámetros de 11.33; y de 3.36, 3.09, y 2.36, con una sumatoria de 11.9. No se encontraron diferencias significativas de estas determinaciones comparando ambos grupos. Los cuatro diferentes patrones de infiltración de células de la respuesta inmune en los cortes histológicos del CC, se muestran en la **figura 2**.

### La expresión de Ki-67 y PCNA no fue significativamente diferente entre los dos grupos

Se sabe que la expresión de Ki-67 se encuentra marcadamente incrementada en las lesiones precursoras e invasoras de CC comparada con el epitelio cervical normal.<sup>35</sup> En las muestras de nuestro estudio no se encontraron diferencias significativas en la de expresión de estos marcadores de proliferación celular entre ambos grupos. Ki-67 fue mayormente expresado en muestras del grupo

**Figura 2.**

Los 4 patrones fotomicrográficos representativos de la infiltración de células de la respuesta inmune en el tumor en los cortes histológicos de CC de nuestros casos, de acuerdo a Bryne y cols. En *A*, nula infiltración de células de la respuesta inmune (ICRI); *B*, con leve ICRI; *C*, con moderada ICRI; y *D*, con marcada ICRI.



de RTP (66.8%) contra el grupo de CTP (55.7%) con  $p = 0.63$ . Los valores de expresión de PCNA y la fracción de células en fase S fueron de 80.3 y 10.32% en el grupo CTP, y de 76.4 y 8.9% en el grupo RTP.

► **DISCUSIÓN**

En este estudio, se encontraron que dos variables del microambiente de CC, la DNA-ploidía de las clonas tumorales y la densidad de infiltración de células de la respuesta inmune en el tumor se asociaron con el pronóstico clínico en pacientes con CC en etapas clínicas iniciales, tratadas convencionalmente. Aunque los valores porcentuales del grado de queratinización y de la expresión del Ki-67 fueron diferentes en los grupos comparativos, la aplicación del análisis estadístico no demostró diferencia significativa.

En los últimos años, el número de marcadores tumorales identificados con impacto de utilidad en la clínica

es sumamente pequeño. Diferentes razones podrían explicar que el valor de un mismo marcador en múltiples estudios, no sea consistente y esto conduzcan a diferentes conclusiones. Es muy probable, que variaciones técnicas en procedimientos metodológicos similares o parecidos tanto como el uso de tecnologías específicas con diferente poder de resolución para analizar un evento biológico (p.ej. valoración del DNA con metodologías con resolución de kilo-, mega- y gigabases) pueda causar las discrepancias. Aunque los diferentes aspectos metodológicos deben ser reportados cuidadosamente, algunos artículos publicados carecen de suficiente información. En una interesante revisión, McShane y cols.,<sup>36</sup> reflexionan sobre esta condición y proponen recomendaciones metodológicas para fortalecer la reproducibilidad de los hallazgos encontrados en estos tipos de estudios.

El análisis univariado (UA) del DNA celular mediante FC detecta los cambios genómicos masivos, conocidos

como aneuploidía. Debido a la simplicidad y reproducibilidad del UA empleando FC para cuantificar del contenido de DNA en los tejidos conservados en parafina (fácil acceso), este método continúa siendo el más frecuentemente utilizado en estudios clínicos.<sup>37,38</sup> Ocasionalmente, otros estudios que procesan tejido tumoral fresco y/o que realizan determinaciones multiparamétricas en la selección de poblaciones celulares tumorales, han obtenido resultados parcialmente mejorados (10%).<sup>39</sup>

La determinación de aneuploidía en los casos de CC (principalmente de tipo epidermoide), ha demostrado una correlación inconsistente como indicador clínico pronóstico. En una revisión reciente de ploidías en cánceres ginecológicos, Fox<sup>40</sup> al analizar 23 estudios de series de muestras de CC, concluyó que aunque globalmente los CC invasores muestran DNA-aneuploidía (con cifras bajas de DI-aneuploide), pocos estudios (5/23) demostraron que las pacientes con carcinomas de cuello uterino con poblaciones aneuploides cursaron con peor pronóstico, comparados con su contraparte.<sup>13-15,41</sup> La mayoría de los estudios detectaron diferencias estadísticamente no significativas de esta asociación.<sup>16-21,42.</sup>

En un estudio anecdótico de una sola paciente con CC etapa FIGO II, el DI inicial del tejido tumoral correspondió a 1, y 7 meses más tarde el análisis en tejido de metástasis demostró cambios notables de progresión hacia la aneuploidía con DI = 1.6.<sup>43</sup> Kashyap y Bhambhani,<sup>44</sup> también mostraron que la aneuploidía se incrementa con el grado de desdiferenciación tumoral en CC.

Diferentes características biológicas del CC y de su análisis metodológico, permiten entender los diversos resultados obtenidos en los estudios de su ploidía. Una característica biológica es que el CC como unidad tumoral presenta tasas bajas de aneuploidía, comparada con otros cánceres (ovario, próstata, mama, etc.).<sup>40,45,46</sup> Una de las condiciones metodológicas es que el análisis cuantitativo del DNA-nuclear ha sido mejorado gracias al mejoramiento de la instrumentación. Así los nuevos citómetros de flujo y sus softwares pueden excluir de su análisis, los núcleos aglutinados, dañados, y por ello realizan una cuantificación más eficiente del DNA.<sup>47</sup>

Al analizar las diferentes metodologías empleadas en los estudios de DNA-ploidías en CC, se encontró que los estudios (junto con el nuestro) cuyos resultados demostraron diferencias estadísticamente significativas relacionadas con el pronóstico clínico, coincidieron en la utilización de metodologías recientes, particularmente mediante el uso de citómetros de flujo de segunda generación, tanto como software modernos<sup>13-15, 41</sup> y nuestro estudio.

Muy probablemente, mientras más eficiente y analítica sea la instrumentación de la tecnología de FC, mejores

resultados podrían obtenerse en el registro del DNA en el ciclo celular. Nuevas generaciones de citómetros de flujo (Munster, BRD, FACScalibur), y de software (Cycle Multicycle, Mod Fit LT) que analizan los eventos del ciclo celular están disponibles.<sup>37</sup>

Asimismo, se podría alcanzar mayor potencial y eficiencia de estas determinaciones, combinando otras estrategias para seleccionar las poblaciones tumorales específicas de estudio, empleando análisis cuali/cuantitativo (p.ej. utilizar simultáneamente microdissección dirigida, otros colorantes adicionales al IP como DAPI, identificar la expresión de las ciclinas D, E, A y B1) y combinarlos con metodologías de alta resolución como la hibridación genómica comparativa o microarreglos de DNA).<sup>39,48-49</sup>

Aunque la proliferación celular elevada, junto con la evasión de la apoptosis son marcas intrínsecas del cáncer; y el incremento de la primera, está relacionada con el rápido crecimiento tumoral<sup>50,51</sup> nuestros resultados, como el de otros estudios quedan sin demostrar su asociación con el comportamiento clínico del CC.<sup>52,53</sup> Eventualmente, la determinación de parámetros interconectados a la proliferación celular (p.ej. índice de apoptosis),<sup>54,55</sup> ayudará a predecir la respuesta clínica.

Recientemente, se ha aceptado que la séptima marca del cáncer es evadir la vigilancia inmunológica (inmunoselección e inmunosubversión).<sup>56</sup> Sin embargo, la posibilidad de que la respuesta inmunológica adaptativa pueda controlar el crecimiento y la recurrencia en los tumores humanos es aún cuestionable. La investigación de la respuesta inmunológica de los linfocitos T en las pacientes con CC ha dirigido su atención predominantemente a explorar los linfocitos de sangre periférica, y no en el lecho tumoral. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que una infiltración intensa de células de Langerhans y de linfocitos T se asocia con un mejor pronóstico en las pacientes con CC que fueron tratadas con radioterapia.<sup>57,58</sup> El consenso de los pocos estudios que han valorado esta respuesta en el lecho tumoral de pacientes con CC, han demostrado que la alta densidad de infiltración de células de la respuesta inmunológica es un factor independiente asociado a mejores tasas de supervivencia.<sup>16,30-32,58</sup> Los resultados obtenidos en el presente estudio fueron similares a los previos reportados, donde la baja densidad de infiltración de células de la respuesta inmune en el tumor, fue asociada significativamente a los pacientes con CC que presentaron recurrencia tumoral en los siguientes 5 años después del tratamiento, y viceversa.

Se ha demostrado en el lecho tumoral del CC, que la infiltración linfocitaria corresponde predominantemente a poblaciones de linfocitos T CD8<sup>+</sup><sup>59</sup> (efectores de la respuesta inmunológica adaptativa). Teóricamente en los

casos de pacientes con CC con marcada/moderada infiltración de células de la respuesta inmune en el tumor, los antígenos asociados al tumor (AAT, frecuentemente epítopes de E6 y E7), han sido presentados (por medio de las células de Langerhans) a los linfocitos T específicos y éstos se han clonado y expandido localmente (la fase activa de la respuesta adaptativa se ha establecido). Alternativamente, en la nula o mínima respuesta de este tipo, la fase de respuesta adaptativa antitumoral no se ha establecido. Se requieren adicionales estudios que valoren la densidad, el tipo y la activación *in situ* de los linfocitos T en el microambiente del CC (esta parcial conclusión fue establecida a finales de 2006).

Recientemente Pages y cols., en dos sucesivos estudios,<sup>60,61</sup> empleando diferentes metodologías (FC, IHQ, microarreglos de tejidos) demostraron que el tipo, densidad y localización de infiltración de células de la respuesta inmune en los carcinomas colorrectales, fueron el mejor predictor de la supervivencia en estos pacientes. Muy recientemente Nedergaard y cols., en otros dos estudios seriados<sup>62,63</sup> de pacientes con CC en etapas iniciales, demostraron disminución significativa de la densidad de intra y peritumoral de linfocitos CD3+, CD4+ y CD8+, CD57+, CD1a+, CD20+, CD45RA+ y CD45RO+ en pacientes que presentaron recaída tumoral.

Bajo estos resultados, consideramos que la determinación de infiltración de las células de la respuesta inmune en el tumor es un factor útil para el pronóstico, puede llevarse a cabo fácilmente, y debería agregarse e integrarse en el estudio histopatológico rutinario en las muestras tumorales de CC.

En conclusión, en nuestro estudio comparamos algunas características del microambiente tumoral en dos grupos de pacientes homogéneos supervisados con CC, empleando análisis univariado. Encontramos que la marcada/moderada infiltración de células de la respuesta inmune en el tumor y la DNA-ploidía de las clonas tumorales se asocian a pacientes libres de tumor, seguidos por un periodo de 5 años. Por el contrario, la nula/baja infiltración de células de la respuesta inmune en el tumor y la DNA-aneuploidía de las clonas tumorales, están asociadas a pacientes con recurrencia tumoral. Estos dos marcadores son factores independientes asociados a la respuesta clínica de los pacientes con CC en etapas iniciales, tratadas convencionalmente.

El grado de queratinización, el polimorfismo nuclear, el patrón de invasión, las expresiones de Ki-67 y de PCNA, y la fracción de células en fase S, no fueron factores significativos para predecir el comportamiento clínico.

Se requieren estudios adicionales con metodologías de mayor resolución de análisis del DNA y aquellos que

valoren la densidad, el tipo y la activación *in situ* de los linfocitos T en el microambiente de la progresión tumoral del CC.

Consideramos que la determinación de la infiltración de células de la respuesta inmune en el tumor, debería agregarse en el estudio histopatológico rutinario en las muestras tumorales de CC, como parte de la evaluación integral de la paciente.

## Bibliografía

1. Parkin DM, Ferlay J. The burden of HPV-related cancers. *Vaccine* 2006;24 (Suppl 3):S11-25.
2. Eifel PJ, Berek JS, Markman MA. **Cancer of the cervix, vagina, and vulva.** En DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, Editores. *Cancer. Principles & Practice of Oncology*, 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005:1295-1341.
3. Alberton DG, Collins C, McCormick F, Gray JW. Chromosome aberrations in solid tumors. *Nature Genetics* 2003;34(4):369-376.
4. Zur Hausen H. Papillomavirus and cancer from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002;2:342-50.
5. Steenbergen RDM, de Wilde J, Wilting SM, Brink AA, Snijders PJ, Meijer CJ. **HPV-mediated transformation of the anogenital tract.** *J Clin Virol* 2005;32(Suppl 1):S25-S33.
6. Duesing S, Munger K. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int J Cancer* 2004;109:157-162.
7. Melsheimer P, Vinokurova S, Wentzensen N, Bastert G, von Knebel Doeberitz M. DNA aneuploidy and integration of human papillomavirus type 16 E6/E7 oncogenes in intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix uteri. *Clin Cancer Res* 2004;10:3059-3063.
8. Kops GJPL, Weaver BAA, Cleveland DW. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nature Rev Cancer* 2005;5:773-785.
9. Rajagopalan H, Lengauer C. Aneuploidy and cancer. *Nature* 2004;432:338-341.
10. Ormerod MG, Tribukait B, Giarretti W. Consensus report of the task force on standardisation of DNA flow cytometry in clinical pathology. *Anal Cell Pathol* 1998;17:103-110.
11. Duesing S, Munger K. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. *Cancer Res* 2002;62:7075-82.
12. Anton M, Nenutil R, Rejthar A, Kopečný J, Ptackova B, Zaloudik J. DNA flow cytometry: a predictor of a high-risk group in cervical cancer. *Cancer Detect Prev* 1997;21:242-246.
13. Grote HJ, Friedrichs N, Pomjanski N, Guhde HF, Reich O, Bocking A. Prognostic significance of DNA cytometry in carcinoma of the uterine cervix FIGO stage IB and II. *Anal Cell Pathol* 2001;23:97-105.
14. Reich O, Purstner P, Klaritsch P, P, Hass J, Labousen M, Tamussino K, Winter R. Prognostic significance of preoperative DNA flow cytometry in surgically treated cervical cancer. *Eur J Gynecol Oncol* 2003;24:13-17.
15. Wilailak S, Rochanawutanon M, Srisupundit S, Aumkhyan A, Pattanapanayast K. Flow cytometric analysis of DNA ploidy and S-phase fraction in Stage IIIB cervical carcinoma. *Eur J Gynecol* 2004;25:428-430.
16. Graflund M, Sorbe B, Bryne M, Karlsson M. The prognostic value of a histologic grading system, DNA profile and MIB-1 expression in early stages of cervical squamous cell carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2002;12:149-157.
17. Kristensen GB, Kaern J, Abeler VM, Hagmar B, Trope CG, Pettersen EO. No prognostic impact of low cytometric measured DNA ploidy and S-phase fraction in cancer of the uterine cervix: a prospective study of 465 patients. *Gynecol Oncol* 1995;57:79-85.
18. Pfisterer J, Kommos F, Sauerbrei W, Menzel D, Kiechle M, Giese E et al. DNA flow cytometry in stage IB and II cervical carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 1996;6:54-60.
19. Kaspar HG, Dinh TV, Hanningan EV. Flow cytometry in cervical adenocarcinoma: correlating DNA content with clinical picture. *J Reprod Med* 1997;42:170-172.
20. Jarrell MA, Heintz N, Howard P, Collins C, Badger G, Belinson J, Nason F. Squamous cell carcinoma of the cervix: HPV16 and DNA ploidy as predictors of survival. *Gynecol Oncol* 1992;46:361-366.
21. Zanetta GM, Katzmann JA, Keeney GL, Kinney WK, Cha SS, Podratz KC. Flow-cytometric DNA analysis of stages IB and IIA cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1992;46:13-19.

22. Oka K, Arai T. MIB1 growth fraction is not related to prognosis in cervical squamous cell carcinoma treated with radiotherapy. *Int J Gynecol Pathol* 1996;15:23-27.
23. Ho DM, Hsu CY, Chiang H. MIB-1 labelling index as a prognostic indicator for survival in patients with FIGO stage IB squamous cell carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 2000;76:97-102.
24. Garzetti GG, Ciavattini A, Lucarini G, Goteri G, de Nictolis M, Muzzioli M *et al.* MIB-1 immunostaining in stage I squamous cervical carcinoma: relationship with natural killer activity. *Gynecol Oncol* 1995;58:28-3320.
25. Konishi I, Nanbu K, Mandai M, Tsuruta Y, Kataoka N, Nagata Y, Mori T. Tumor response to neoadjuvant chemotherapy correlates with the expression of P-glycoprotein and PCNA but not GST- $\pi$  in the tumor cells of cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1998;70:365-371.
26. Zhang M, Cai S, Shi D. Prognostic value of cell proliferation and apoptosis in uterine cervical cancer treated with radiation. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 1999;21:290-292.
27. Stern P. Immune control of human papillomavirus (HPV) associated anogenital disease and potential for vaccination. *J Clin Virol* 2005;32(Suppl 1): S72-S81.
28. Kadish AS, Ho GY, Burk RD, Wang Y, Romney SL, Ledwidge R, Angeletti RH. Lymphoproliferative responses to human papillomavirus (HPV) type 16 proteins E6 and E7: outcome of HPV infection and associated neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1997;89(17):1285-1293.
29. Evans EM, Man S, Evans AS, Borysiewicz LK. Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res* 1997;57:2943-2950.
30. Kainz C, Gitsch G, Tempfer C, Heinzl H, Koelbl H, Breitecker G, Reinthaller A. Vascular space invasion and inflammatory stromal reaction as prognostic factors in patients with surgically treated cervical cancer stage IB to IIB. *Anticancer Res* 1994;14:2145-2148.
31. Kristensen GB, Abeler VM, Risberg B, Trop C, Bryne M. Tumor size, depth of invasion, and grading of the invasive tumor front are the main prognostic factors in early squamous cell cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1999;74:245-251.
32. Chao HT, Wang PH, Tseng JY, Lai CR, Chiang SC, Yuan CC. Lymphocyte-infiltrated FIGO Stage IIB squamous cell carcinoma of the cervix is a prominent factor for disease-free survival. *Eur J Gynecol Oncol* 1999;20:136-140.
33. Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, Rugg CA, Musgrove EA. Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 1983;31:1333-1335.
34. Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Kjaerheim A. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol* 1992;166:375-381.
35. Shi S-R, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1991;39(6):741-748.
36. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK). *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1180-1184.
37. Tamok A, Valet GK, Emmrich F. Systems biology and clinical cytomics: The 10<sup>th</sup> Leipzig Workshop and the 3<sup>rd</sup> International Workshop on slide-based cytometry, Leipzig, Germany, April 2005. *Cytometry A* 2006;69(1):36-40.
38. Darzynkiewicz Z, Smolewski P, Bender E. Use of flow and laser scanning cytometry to study mechanisms regulating cell cycle and controlling cell death. *Clin Lab Med* 2001;21:857-873.
39. Kimmig R, Wimberger P, Hillemanns P *et al.* Multivariate analysis of the prognostic significance of DNA-ploidy and S-phase fraction in ovarian cancer determined by flow cytometry following detection of cytokeratin-labeled tumor cells. *Gynecol Oncol* 2002;84:21-31.
40. Fox H. Ploidy in gynaecological cancers. *Histopathology* 2005;46:121-129.
41. Nagai N, Oshita T, Fujii T, Kioka H, Katsube Y, Ohama K. Prospective analysis of DNA ploidy, proliferative index and epidermal growth factor receptor as prognostic factors for pretreated uterine cancer. *Oncol Rep* 2000;7:551-559.
42. Wimberger P, Hillemanns P, Kaspner T, Hepp H, Kimming R. Evaluation of prognostic factors following flow cytometric after cytokeratin labelling. II. Cervical and endometrial cancer. *Anal Cell Pathol* 2002;24:147-158.
43. Sergi C, Magener A, Ehemann V, De Villiers EM, Sinn HP *et al.* Stage IIa cervix carcinoma with metastasis to the heart: report of a case with immunohistochemistry, flow cytometry and virology findings. *Gynecol Oncol* 2000;76:133-138.
44. Kashyap V, Bhambhani S. DNA aneuploidy in invasive carcinoma of the uterine cervix. *Indian J Pathol Microbiol* 2000;43:265-269.
45. Ormerod MG. DNA Flow cytometry. En Crocker J, Murray P, Editors. *Molecular Biology in Cellular Pathology*. Chichester: Wiley, 2003:49-60.
46. Wang N, Pan Y, Heiden T, Tribukait B. Improved method for release of cell nuclei from paraffin-embedded cell material of squamous cell carcinoma. *Cytometry* 1993;14:931-935.
47. Darzynkiewicz Z, Crissman H, Jacobberger JW. Cytometry of the cell cycle: cycling through history. *Cytometry A* 2004;58(1):21-32.
48. O'Brien PM, Millan DW, Davis JA, Campo MS. In situ isolation of immunoglobulin sequences expressed by single tumor-infiltrating B cells using laser-assisted microdissection. *Mol Biotechnol* 2005;29:101-109.
49. Pozarowski P, Darzynkiewicz Z. Analysis of cell cycle by flow cytometry. *Methods Mol Biol* 2004;281:301-311.
50. Hanaham D, Winberg R. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
51. Wang JL, Zheng BY, Li XD, Angstrom T, Lindstrom MS, Wallin KL. Predictive significance of the alterations of p16INK4A, p14ARF, p53, and proliferating cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:2407-2414.
52. Van de Putte G, Kristensen GB, Lie AK, Baekelandt M, Holm R. Cyclins and proliferation markers in early squamous cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 2004;92:40-46.
53. Branca M, Ciotti M, Giorgi C, Santini D, Di Bonito L, Costa S *et al.* Up-regulation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is closely associated with high-risk human papillomavirus (HPV) and progression of cervical intraepithelial neoplasia (CIN), but does not predict disease outcome in cervical cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2007;130(2):223-231.
54. Leung TW, Xue WC, Cheung AN, Khoo US, Ngan HY. Proliferation to apoptosis ratio as a prognostic marker in adenocarcinoma of uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2004;92:866-872.
55. Gasinska A, Urbanski K, Gruchala A, Biesaga B, Kojs Z. A ratio of apoptosis to mitosis, proliferation pattern and prediction of radiotherapy response in cervical carcinoma. *Neoplasma* 2002;49:379-386.
56. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 2006;6: 715-727.
57. Hachisuga T, Fukuda K, Kawarabayashi T. Local immune response in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Obstet Invest* 2001; 52:3-8.
58. Nakano T, Oka K, Takahashi T, Niruta S, Arai T. Roles of Langerhans' cells and T-lymphocytes infiltrating cancer tissues in patients treated by radiation therapy for cervical cancer. *Cancer* 1992;70:2839-2844.
59. Santin AD, Ravaggi A, Bellone S, Pecorelli S, Cannon M, Parham GP, Hermonat PL. Tumor-infiltrating lymphocytes contain higher numbers of type 1 cytokine expressors and DR<sup>+</sup> T cells compared with lymphocytes from tumor draining lymph nodes and peripheral blood in patients with cancer of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2001;81:424-432.
60. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovskoy A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C *et al.* Type, density and location of immune cells with human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006;313:1960-1964.
61. Pages F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molitor R *et al.* Effector memory T cells, early metastasis and survival in colorectal cancer. *N Eng J Med* 2005; 353(25):2654-2666.
62. Low density of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells is associated with increased risk of relapse in squamous cell cervical cancer. *Br J Cancer* 2007;97:1135-1138.
63. Nedergaard BS, Ladekarl M, Nyengaard JR, Nielsen K. A comparative study of the cellular immune response in patients with stage IB cervical squamous cell carcinoma. Low numbers of several immune cell subtypes are strongly associated with relapse and disease with 5 years. *Gynecol Oncol* 2008;108:106-111.

# Mecanismos epigenéticos celulares y sus alteraciones en cáncer

## *Epigenetic cellular mechanisms and cancer abnormalities*

Valdespino V<sup>1</sup>, Valdespino Castillo P<sup>2</sup>.

### ▷ RESUMEN

El dogma de la era genética está atravesando una silenciosa revolución. Estamos empezando a pensar tanto en términos de secuencias de genes y de su respuesta en el contexto ambiental.

La Epigenética ofrece la posibilidad de reprogramar el genoma sin necesidad de modificar el material genético. Este nuevo conocimiento nos da pistas para entender el crecimiento y desarrollo de las células sanas y de enfermedades como el cáncer, trastornos genéticos, síndromes pediátricos, entre otros.

La Epigenética ha evolucionado recientemente de ser una colección curiosa y desordenada de diversos fenómenos a entenderse como un campo de estudio donde la red de la expresión fenotípica del genoma y del tipo de empacamiento del ADN/cromatina se relacionan con el fenotipo funcional celular. Sin embargo, a pesar de los recientes progresos en esta área, quedan una gran cantidad de preguntas por contestarse.

El hecho de que diferentes errores epigenéticos son prevalentes en los cánceres y juegan un papel causal, ha

### ▷ SUMMARY

*The genetic field dogma is going across in a silent revolution. We are beginig to think so much in gene sequences context as how genes work at specific environment context. Epigenetics provides the possibility of genome reprogramming without structural modifications of the genetic material. This recent knowledge give us the clues to understand development and growth of healthy cells and altered cells in cancer, genetic disorders, pediatric syndromes and other diseases.*

*Epigenetics has undergone a change from a collection of diverse phenomena to a defined field of study, where molecular networks of genome expression phenotypes and chromatin/DNA packaging patterns are connected the cellular functional phenotype. Nevertheless, in spite of these recent progresses, many challenges remain.*

*The fact that epigenetic errors are prevalent in cancer and are causative factors in tumor formation and progression has lead to the development of new therapeutic approaches designed to reverse epigenetic tumor suppressor genes.*

*In this paper we discuss the main well-known epigenetic variations between healthy mamalian cells and human cancer*

<sup>1</sup>Universidad Autónoma Metropolitana–Campus Xochimilco, México, D.F., México. <sup>2</sup>Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias, México, D.F., México.

Correspondencia: Víctor Valdespino MD PhD. Dir: Ángel Urraza Núm. 517, Colonia del Valle, C.P. 03100 México, D.F. Tel: (55) 55597768. Correo electrónico: valdespinov@yahoo.com

conducido al desarrollo de nuevos ensayos terapéuticos cuya meta es el revocar el silenciamiento de genes supresores tumorales.

En esta revisión nosotros discutimos las principales variaciones epigenéticas conocidas entre las células normales de mamíferos y las células cancerosas humanas, para con ello entender la utilidad de su identificación y su potencial aplicación clínica.

En los próximos años, la identificación de los mapas topográficos del empaquetamiento del genoma que regulan la expresión de los genes relacionados con la transformación neoplásica –*epigenetic signature*– en cada uno de los 200 modelos de cáncer, será empleada para realizar nuevas estrategias de diagnóstico molecular y de tratamiento en pacientes con cáncer.

**Palabras clave:** cáncer, alteraciones epigenéticas.

*cells. The identification of these epigenetic abnormalities has potential utility in clinical applications.*

*In the next years the identification of maps of the genome topography related to neoplastic transformation-epigenetic signature- in each of the 200 cancer models, will be used in new approaches to molecular diagnosis and targeted treatment across the clinical spectrum.*

**Key words:** cancer, epigenetic abnormalities.

## ▷ INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente la investigación en cáncer se ha enfocado a la identificación de mutaciones genéticas. Hoy, nuestro conocimiento se ha incrementado al entender las alteraciones epigenéticas. Ellas corresponden a los cambios en el ADN sin alterar su secuencia y los cambios en la remodelación de la cromatina que modifican la regulación transcripcional de genes supresores tumorales y protooncogenes. El remodelamiento de la cromatina es el centro de todos los eventos epigenéticos.

Así la activación/desactivación de los genes está controlada por mandos tanto genéticos como epigenéticos, existiendo diversas formas de interconexión entre la genética y la epigenética. Se considera, por tanto, que el cáncer surge de la interacción de elementos genéticos y epigenéticos, y no es posible abordar ambos aspectos de forma independiente. Las proteínas, llamadas factores de transcripción actúan como mandos de control genéticos de genes, mientras que los mandos epigenéticos incluyen las modificaciones no estructurales del ADN, de las proteínas histonas, de la interfase proteínas/ADN en los cromosomas y en la estructura de la cromatina.

La función más importante de la cromatina es transportar los genes. Un gen es un segmento de DNA que contiene las instrucciones para sintetizar proteínas o moléculas estructurales y catalíticas de ARN. El campo de la

Epigenética intenta determinar cómo los genes son activados o desactivados a través de la metilación del ADN y cómo la modulación de la cromatina afecta la función genómica.

El dogma de la era genética está atravesando una silenciosa revolución. Estamos empezando a pensar tanto en términos de secuencias de genes como de cómo se comportan estos genes en el contexto de su ambiente. La secuencia genómica determina qué proteínas pueden producir los organismos, mientras que el código epigenético a menudo regula dónde y cuándo se fabrican tales proteínas. El campo de la Epigenética ha surgido como un puente entre las influencias genéticas y ambientales. En el viejo dilema entre herencia y ambiente, la investigación epigenética nos ha demostrado que existen mecanismos que van más allá del determinismo genético y que nos individualizan como seres vivientes. Los factores epigenéticos dirigen la interpretación del ADN dentro de cada célula viviente.

La Epigenética nos permite entender por qué el material genético puede responder a las cambiantes condiciones ambientales. El mejor ejemplo lo constituyen los gemelos genéticamente idénticos que pueden desarrollar diferentes perfiles de enfermedades y proyecciones de vida; esto es que aunque comparten los mismos genes, es posible que algunos de ellos estén activos en un gemelo y otros no en el segundo gemelo. Puede que sean idénti-

cos genéticamente, pero no epigenéticamente. Existe un fino ajuste bioquímico del genoma que determina qué genes son activados. Por tanto, somos más que la suma de nuestros genes. Es muy probable que la investigación epigenética tenga un impacto significativo en la comprensión de los valores culturales y éticos en nuestra sociedad posgenómica.

La Epigenética ofrece la posibilidad de reprogramar el genoma sin necesidad de modificar el material genético. Este nuevo conocimiento nos da pistas para entender la identidad celular (proliferación y diferenciación), la regeneración, el envejecimiento, la plasticidad y diferenciación de las células madre y de las células de la respuesta inmunológica, la tumorigénesis; y es básica en las tecnologías como la clonación y la aplicación de terapias basadas en células madre.<sup>1-3</sup>

Diferentes alteraciones epigenéticas han sido encontradas como factores causales en cáncer, trastornos genéticos, trastornos neuropsiquiátricos y síndromes pediátricos.<sup>1</sup> Así, el síndrome de inmunodeficiencia, inestabilidad centromérica y anomalías faciales (ICF), es el primer ejemplo de una enfermedad humana ligada a un defecto en la metilación del ADN.

Gran cantidad de investigadores trabajan actualmente en el campo de la Epigenética, uno de los grupos más avanzados es el denominado Red de Excelencia Europea para la investigación del epigenoma constituido por 37 grupos de investigación.<sup>4</sup> Otro de ellos es el HEP, Proyecto del Epigenoma Humano,<sup>5-7</sup> el cual tiene como objetivo identificar, catalogar e interpretar los patrones de la metilación del ADN de los genes humanos de múltiples tejidos. En sus estudios preliminares han demostrado que existe una gran heterogeneidad en el patrón de metilación del ADN en diferentes tipos celulares.

En un futuro próximo, la caracterización de los perfiles epigenéticos de los diversos tipos de cánceres, conjuntamente con el conocimiento de las mutaciones génicas, sentarán las bases para el diagnóstico molecular y el diseño del tratamiento personalizado del paciente con cáncer.

La Epigenética ha evolucionado recientemente de ser una colección curiosa y desordenada de diversos fenómenos a entenderse como una red molecular que relaciona el fenotipo molecular de la expresión del genoma y del empaquetamiento del ADN por la cromatina con el fenotipo funcional.<sup>8-9</sup> Un modelo integrador de la maquinaria molecular epigenética ha sido propuesto por Golberg y cols.<sup>10</sup> Sin embargo, a pesar de los recientes progresos en esta área, quedan por contestarse una gran cantidad de preguntas.

En esta revisión nosotros discutimos las principales variaciones epigenéticas conocidas entre las células norma-

les de eucariotes mamíferos y las células cancerosas humanas, para con ello entender la utilidad de su identificación y su aplicación clínica en el eventual intervencionismo molecular dirigido a blancos epigenéticos.

## ▷ CONCEPTO DE EPIGENÉTICA.

### FACTORES EPIGENÉTICOS QUE PARTICIPAN EN LA REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL GENOMA

Históricamente la palabra *epigenética* ha sido usada para describir los acontecimientos biológicos que no pueden explicarse por los principios genéticos. La Epigenética en sentido amplio es un puente entre el genotipo y fenotipo. Las modificaciones epigenéticas son heredables y pueden ser transmitidas a las células hijas durante las divisiones celulares. La Epigenética es mucho más dinámica que la genética.

El silenciamiento fisiológico de los genes a nivel de la cromatina es necesario para la vida de los organismos eucariotes y es clave en diferentes procesos biológicos que incluyen diferenciación, impronta génica, y silenciamiento de grandes regiones cromosómicas como sucede en el cromosoma X de las mujeres.<sup>11</sup> El identificar las diferentes enzimas que afectan los tipos de interacciones entre las proteínas histónicas y el ADN, permitiría descifrar el código epigenético (modificaciones químicas del ADN, y de las histonas que se unen al ADN). La existencia de un código epigenético amplía considerablemente el potencial de la regulación de la información del código genético.

Dado que el proceso de silenciamiento epigenético es mitóticamente heredable, esto juega un papel importante en las alteraciones genéticas que se desarrollan en el cáncer. El silenciamiento heredable de genes incluye los eventos relacionados con la metilación del ADN, con las modificaciones covalentes de las histonas y con los factores que remodelan el complejo nucleosomal. El entendimiento del control de la expresión génica en la cromatina de las células madre, ha sido clave para empezar a comprender los cambios epigenéticos en cáncer.

Las desregulaciones genéticas (p.ej. pérdida de los genes supresores tumorales) y epigenéticas (p.ej. el silenciamiento de genes supresores tumorales), cooperan para desarrollar la tumorigénesis.

### ADN y el remodelamiento del polímero cromatina

El ADN está muy plegado y compactado con las proteínas histonas y no histonas formando un polímero dinámico llamado cromatina. La cromatina no es un polímero uniforme, presenta diferentes diseños de empaquetamiento,

fibras fuertemente compactadas (llamada heterocromatina) y menos compactadas, en las cuales los genes son típicamente expresados (eucromatina). Los cambios en la estructura de la cromatina influyen en la expresión génica: los genes se encuentran inactivados cuando la cromatina está condensada (silentes) y son expresados cuando la cromatina está abierta (activos). Los estados dinámicos de la cromatina están controlados por patrones epigenéticos de metilación del ADN y de modificaciones de histonas.

Los genes humanos están constituidos por áreas de ADN codificante (exones), y áreas de ADN no codificante (intrones); la mayor proporción del ADN en los genes corresponde a zonas de intrones. Además de exones e intrones, cada gen está asociado a una secuencia de ADN reguladora, la cual es responsable de que el gen sea expresado en el nivel adecuado, en tiempo y en el tipo de célula apropiada. El ADN humano contiene grandes zonas de elementos repetitivos (52%) y de regiones no codificantes (44%). Sólo 4% del ADN humano codifica. Esta gran cantidad de regiones no codificantes y de elementos repetitivos requiere de extensos mecanismos genómicos y epigenómicos de regulación, tanto en células germinales como en células somáticas sometidas continuamente a múltiples tipos de señalamientos internos (p.ej. transcripción, replicación del ADN, segregación cromosómica) y externos (p.ej. citocinas, hormonas, daño del ADN, estrés celular).<sup>11</sup>

El ADN humano constituido por  $3.2 \times 10^9$  nucleótidos se encuentra situado en la cromatina de los 22 autosomas y los 2 cromosomas sexuales. Esta cadena que mide aproximadamente 1.5 m de longitud y 2 nm de grosor es compactada en el núcleo celular con volumen aproximado de 110 micras<sup>3</sup>. Segmentos de ADN en eucariontes están unidos estrechamente a un grupo de cuatro histonas diferentes, formando partículas denominadas nucleosomas (11 nm). El nucleosoma se compone de un núcleo octamérico de histonas que es enrollado 1.65 veces por una la doble hélice de ADN de 147 bp. La interfase entre el ADN y las histonas del nucleosoma está constituida por 142 puentes de hidrógeno y numerosas interacciones hidrofóbicas. Los nucleosomas son estructuras utilizadas para empaquetar el ADN dentro del núcleo y los conforman cuatro tipos de proteínas histonas (pares de H2A, H2B, H3 y H4). A su vez, los nucleosomas se encuentran empacados con ayuda de las histonas externas H1, en forma de fibras de 30 nm (conformación de solenoide).<sup>12</sup>

Las histonas pueden ser modificadas en sus diferentes aminoácidos añadiendo o eliminando pequeños grupos químicos, como acetilos, metilos, fosfatos, o anexos proteicos mayores como ubiquitina. El efecto de estas

modificaciones altera la naturaleza del nucleosoma de tal forma que “abre o cierra” a la cromatina para realizar la transcripción. Diferentes combinaciones específicas de modificaciones covalentes y no covalentes de las histonas, pueden leerse como un código (hipótesis del código de histonas) que puede ser iniciado por diferentes enzimas que añaden grupos químicos a las histonas (marcadoras o *writers*), los cuales pueden ser removidos por otras (borradoras o *erasers*). Las histonas marcadas pueden ser blanco interpretativo de complejos enzimáticos (efectoras o *readers*) de activación o desactivación catalítica. Estas actividades coordinadas de escribir, leer y borrar establecen el ambiente local óptimo para que la plantilla de la cromatina realice los procesos biológicos de regulación transcripcional o reparación de ADN dañado.<sup>13</sup>

Una célula diploide contiene 30 millones de nucleosomas. La estructura intermolecular del nucleosoma demuestra dominios globulares y una cola N-terminal en cada una de las ocho histonas. Las colas de las histonas ocupan un cuarto de la masa del nucleosoma, y en promedio están conformadas por 30 aa. Las colas de las cuatro histonas son blanco de diferentes tipos de modificaciones covalentes por diferentes enzimas: metil transferasas/desmetilasas, acetilasas/desacetilasas, fosforilasas/fosfatasas, etc. Dentro de las histonas, las lisinas (K) tienen carga positiva y el ADN cargado negativamente es atraído. Cuando se añade un grupo acetilo a las K, se modifica la carga positiva de la lisina, provocando que la región de la cola de la histona se una débilmente al ADN, y lo deja libre para que se pueda transcribir.

Diferentes modificaciones en las colas de las histonas (efectos *cis* y *trans*) afectan la estabilidad de las fibras de cromatina de 30 nm. Los efectos *cis* logran modificaciones *intra* e internucleosomales (p.ej. entre H3K9-me y H3S10-fosf), alteran el desdoblamiento de la cromatina al neutralizar las cargas básicas de las lisinas; los efectos *trans* involucran la unión de proteínas no histonas (p.ej. ING, HP1, PcG, ubiquitina) que conducen a consecuencias funcionales.<sup>11,12</sup>

El efecto de algunas modificaciones covalentes en los aminoácidos de las colas de las histonas es característico de algunos patrones de regulación génica (p.ej. la acetilación de la K14 en la histona H3, y de las K8 y 16 en la histona H4, se asocian con expresión génica; mientras que la desacetilación y la metilación de la K9 en la histona H3, o de la K27 en la histona H3 participan en el silenciamiento de genes).<sup>14,15</sup> La pérdida de la acetilación de la K16 y de la trimetilación en la K20 en la histona H4 es una marca frecuente en el cáncer humano.<sup>16</sup> En estudios que exploran todo el genoma se ha encontrado que los procesos de silenciamiento epigenético guardan

cierto patrón de asociación entre la metilación del ADN y la acetilación de las histonas, así la hipometilación global del ADN se asocia con alteraciones de la acetilación de histonas y viceversa.

La posición del ADN en los nucleosomas está determinada tanto por la flexibilidad del ADN como por las proteínas a las que se le unen, todo ello de modo muy dinámico, cambiando rápidamente de acuerdo con las necesidades de la célula.

La cromatina, además de los cuatro tipos de histonas usuales, contiene variantes de histonas, proteínas de remodelamiento y enzimas específicas para modificar covalente y no covalentemente a las histonas. Las modificaciones tanto de las colas como de las regiones globulares de las histonas son blanco de los complejos de remodelación y permiten que la eucromatina adquiera un estado transcripcionalmente activo. Una vez que el complejo de remodelación ha sido disociado, el nucleosoma recupera su estado original.

Diversas modificaciones bioquímicas de la cromatina, por ejemplo, metilación del ADN, acetilación, metilación o fosforilación de las histonas, ocurren en respuesta a señales ambientales y regulan los patrones de expresión de los genes que participan en la replicación y reparación del ADN. La mayoría de estas modificaciones de la cromatina son reversibles y transitorias (escritas y removidas por la acción catalítica de sistemas enzimáticos), y ocasionalmente permanentes. Las acetiltransferasas de histonas (HATs) acetilan residuos específicos de lisina y su acción reversa es por desacetiltransferasas (HDACs); la familia de las cinasas de histonas, fosforilan serinas (S) o treoninas (T) específicas y las fosfatasas (PP-Tasas) retiran los grupos fosfatos. Han sido descritas dos principales clases de enzimas que metilan las histonas, las metiltransferasas, cuyo sustrato es la arginina (R) (PR-MTs) y aquellas que metilan a la K (HKMTs). El efecto de las PRMTs es revertido por la acción de deaminasas. Dado que la metilación de la K se presenta en estado de mono-, di- y tri-metilación, diferentes desmetilasas han sido identificadas (p.ej. LSD1, JHDM1).<sup>13</sup>

Fisiológicamente, en la heterocromatina las lisinas en las histonas H3K9, H3K27 y H4K20 se encuentran trimetiladas y se asocian con represión transcripcional, mientras que en la eucromatina las lisinas metiladas de las histonas H3K4, H3K36 y H3K79 están relacionadas con la activación transcripcional. Las modificaciones de las histonas no ocurren aisladas, frecuentemente se presentan de manera combinada (p.ej. H4S1fosf, H4R3me y H4K4ac). Las evidencias actuales sugieren que el patrón de modificaciones de las histonas varía considerablemente de un organismo a otro.<sup>11</sup>

A pesar del alto grado de compactación del ADN, éste debe ser muy dinámico para permitir que los mensajeros celulares tengan acceso al ADN. En el remodelamiento de la cromatina, además de las modificaciones covalentes en las colas terminales de las cuatro histonas, se han identificado complejos de remodelamiento dependiente de ATP. Estos complejos proteicos de remodelación de la cromatina actúan a partir de realizar modificaciones postraduccionales, del intercambio dinámico de variantes de histonas en el nucleosoma, de la movilización o alteración de la estructura de los nucleosomas, y de la participación dirigida de pequeños ARN no codificantes, entre otros. Los complejos de remodelamiento de la cromatina (por hidrólisis de ATP) cambian la composición de la cromatina y el nucleosoma de forma no covalente. Estos complejos trabajan en equipo con las enzimas que modifican la cromatina para que los genes sean expresados, y son categorizados en 2 familias: la SNF2H o ISWI, que moviliza los nucleosomas a lo largo del DNA y la familia Brahma/SWI/SNF, que altera transitoriamente la estructura del nucleosoma, para que el complejo DNA/histona se desenrolle. Adicionalmente otros complejos de remodelamiento sustituyen las cuatro histonas básicas del nucleosoma por histonas variantes especializadas (p.ej. H2A.Z, H2A.X, macro-H2A, H3.3 y CenpA), las cuales facilitan la transcripción génica.<sup>17</sup>

La metilación del ADN junto con la de las histonas son importantes mecanismos epigenéticos de regulación del genoma. La metilación del ADN desempeña un papel fundamental en el desarrollo de los mamíferos, el patrón de metilación puede copiarse con exactitud en el proceso de replicación del ADN (se transmite de una generación de células a otra). Los patrones de metilación se establecen antes que un embrión se desarrolle. La metilación del ADN funciona como un regulador génico (altera el reconocimiento de los sitios de regulación transcripcional), siendo un proceso que refuerza las decisiones de la expresión génica ejercida por otros mecanismos. También participa en el proceso de la impronta genómica en los mamíferos (mecanismo que estabiliza la represión génica), en el cual la expresión de un gen depende si es heredado de la madre o del padre (p.ej. el gen factor de crecimiento 2 humano semejante a la insulina (IGF2) heredado de la madre es silente, mientras que la copia heredada del padre es activa).

La metilación del ADN es el mecanismo epigenético conocido más antiguo y más estable que se correlaciona con la represión génica. Esta modificación consiste en la adición enzimática de un grupo metilo al residuo de citosina de la cadena del ADN. Esta reacción es mediada

por las ADN-metiltransferasas (DNMTs) en la presencia del donador de metilos (S-adenosilmetionina, SAM), resultando 5-metilcitosina. En los mamíferos la metilación ocurre en los dinucleótidos CpG (citosinas que son inmediatamente seguidas de una guanina), y es proporcionalmente mayor en las regiones no codificantes. La metilación *de novo* en secuencias previamente no metiladas es catalizada por las DNMT3a y las DNMT3b, mientras que el mantenimiento de la metilación por la DNMT1. En el genoma humano existen  $2.8 \times 10^7$  dinucleótidos CG susceptibles de ser metilados y de ellos 70-80% normalmente se encuentran metilados. Los patrones globales de metilación del ADN han sido mapeados completamente en *Arabidopsis thaliana* (AT), pero son aún incompletos en el genoma humano. Las DNMTs juegan un papel importante en la regulación génica y la organización de la cromatina durante la embriogénesis y gametogénesis. Fisiológicamente se observa una densa metilación en regiones específicas cromosómicas (secuencias repetitivas inter o intragénicas, satelitales y centrosómicas) que contienen gran cantidad de dinucleótidos CG, mientras que nula metilación en las islas de CpG (zonas ricas en CG) de las secuencias de los promotores génicos. Muchos genes pueden ser inactivados en un solo tipo de cáncer a través de la metilación de los promotores.<sup>14</sup>

Así recapitulando, los cromosomas son generalmente descondensados durante la interfase, y los genes contenidos en esta forma (eucromatina) pueden ser expresados, permitiendo que la maquinaria celular pueda tener fácil acceso al ADN. Sin embargo, la eucromatina puede estar sujeta a niveles adicionales de empaquetamiento que la tornen resistente a la expresión génica. En contraparte, la heterocromatina es frecuentemente encontrada alrededor de los centrómeros y cerca de los telómeros y en otras posiciones de los cromosomas, por lo que los genes se encuentran normalmente desactivados ya que el ADN no es accesible para las proteínas requeridas para activarlos. Por lo que el balance entre las partes abiertas y cerradas del genoma facilita el adecuado patrón de expresión entre las diferentes células. El tercer elemento que participa en esta regulación es un complejo enzimático que modifica algunos aminoácidos particulares de las histonas o que revierte dichas modificaciones. Las modificaciones o marcas en las histonas interactúan con otro grupo de proteínas que se unen a ellas y son interpretadas para facilitar o inhibir la transcripción génica. La identificación de estos elementos ha permitido construir mapas lineales de los componentes principales de la cromatina a través del genoma humano.<sup>18,19</sup> Los mapas lineales relacionadas a las modificaciones de histonas mejoraran la construcción mapas genómicos topográficos compartamentales de la

cromatina.<sup>20</sup> La lista de modificaciones covalentes y no covalentes de las histonas de la cromatina humana continúa en crecimiento.

#### ▷ MECANISMOS DE REGULACIÓN EPIGENÓMICA EN LA CÉLULA DE MAMÍFEROS

Aunque los diferentes tipos de células en un organismo multicelular contienen el mismo ADN, sus diferentes tipos celulares sintetizan diferentes conjuntos de proteínas. El patrón correcto de transcripción espacial y temporal de los genes individuales es prendido o apagado en las células por proteínas reguladoras que se unen a zonas activadoras o supresoras, a partir de una amplia variedad de mecanismos genómicos y epigenómicos. Los alcances de la epigenética en humanos han tenido como antecedente una gran cantidad de estudios en organismos unicelulares, organismos eucariontes inferiores (*C. elegans*) y particularmente en moscas (*DM*) y plantas (*AT*, y *maíz*).

Durante la actividad normal de todas las células, diferentes proteínas o productos de los llamados genes de mantenimiento celular (*housekeeping*) necesitan estar disponibles y activos en forma continua y permanente. Los promotores de estos genes individuales son mantenidos en configuraciones transcripcionales abiertas (CpG no metilados) a partir de un estado balanceado que involucra diferentes rangos de activación o supresión de las modificaciones en las histonas.<sup>1,21</sup>

Sin embargo, en las células somáticas diferenciadas, los subconjuntos de genes de diferenciación celular son expresados en forma diferente y muchos de ellos son silenciados (como en las células del hígado o en las del cerebro), y esto es regulado por marcadores epigenéticos.

La herencia de genes silenciosos, se denomina impronta genómica. Se han descubierto un número considerable de genes improntados. Normalmente la impronta genómica, mediada tanto por metilación del ADN como por modificaciones de las histonas, asegura un patrón de expresión paternal determinado, un alelo es expresado y el otro es suprimido. Diferentes genes son alterados en el cáncer por pérdida de la impronta génica (LOI), así ambos alelos son expresados en el tumor. Un buen ejemplo ha sido estudiado en las lesiones precursoras del cáncer de colon, donde la expresión bialélica del gen IGF2, provoca sobreproducción de este factor de crecimiento.<sup>22</sup>

En los mamíferos la metilación del ADN participa en muchos procesos celulares que incluyen el silenciamiento de secuencias repetitivas y centroméricas, de la inactivación del cromosoma X en las hembras y en el mantenimiento de la impronta génica. Así la metilación del ADN mantiene los componentes críticos de la regulación

epigénética de forma estable y heredable. El desequilibrio en el número de copias de los genes localizados en el cromosoma X podría ser desastroso entre los organismos de diferentes sexos, afortunadamente la impronta génica ha desactivado todos los genes localizados en uno de los cromosomas X de las hembras.

Más de la mitad de nuestro genoma es silencioso, está compuesto de secuencias repetidas, sin sentido que no contienen instrucciones para fabricar proteínas. Las células parecen marcar las secuencias repetidas con grupos metilo para silenciarlas.

La complejidad epigenética del genoma humano no termina a nivel de la metilación del ADN y en las modificaciones de las histonas, implica cambios en la configuración de la cromatina, como hacer lazadas de la cromatina para formar territorios cromosómicos, que permitan la accesibilidad de las diferentes regiones para unirse a los factores de transcripción y permitir patrones de impronta y expresión génica en tiempo y espacio.

Los mecanismos no covalentes de modificación de las histonas, como el de remodelamiento de la cromatina y la incorporación de variantes especializadas de histonas, proporciona otros cambios en la conformación de la cromatina.

Otro mecanismo de regulación es la participación de las proteínas Polycomb (PcG) y Triothorax (TrxG). Los genes homeóticos (genes del plan corporal de su crecimiento y desarrollo) estudiados de la genética de *Drosophila melanogaster* (DM), son controlados a partir de complejos proteínicos del grupo PcG, en tanto que las proteínas del grupo TrxG reprimen la actividad de las proteínas Polycomb. Las proteínas Polycomb y Trithorax actúan como ayuda de memoria para las células, activando y desactivando genes específicos de “memoria celular”. Las fallas en la actividad de estos complejos producen cambios en la homeostasis y diferenciación celular.<sup>11</sup>

El proceso de diferenciación de las células madre (CM), ha permitido comprender el efecto de algunos de los factores epigenéticos. Las CM embrionarias pueden mantenerse en cultivo durante largo tiempo ya que poseen la capacidad de autorrenovación; además de esta capacidad, se ha demostrado que modificando las condiciones de su cultivo es posible provocar su diferenciación celular prácticamente a cualquier tipo celular.<sup>2</sup> Comparativamente las CM adultas tienen un potencial más restringido de diferenciación celular.

Desde la oveja Dolly, muchos organismos han sido clonados (pero muestran viabilidad reducida, alteraciones en su desarrollo y crecimiento, etc.). La clonación implica la transferencia de un núcleo de una célula adulta a un óvulo. Para que un embrión creado en esta forma se

desarrolle en un organismo completamente formado, las marcas epigenéticas presentes en la célula adulta, deben ser borradas y restablecerse otras nuevas (reprogramación epigenética). La clonación de mamíferos a partir de células adultas como donadores ha demostrado que el oocito (receptor) puede reprogramar el núcleo diferenciado a un estado embriogénico pluripotencial.<sup>23</sup> En algunos ensayos de transferencia de núcleos, empleando núcleos celulares de melanoma como donadores, implantados en fetos de ratón, demostraron el desarrollo que un espectro de células tumorales y células no tumorales, esto debido a reprogramación epigenética.<sup>24</sup>

Cada célula en el cuerpo adulto contiene exactamente el mismo ADN (los mismos genes), por tanto, la diferencia entre los tipos celulares, reside en el subconjunto particular de genes que se utilizan. Se puede pensar en la epigenética como en las modificaciones químicas del ADN que controlan esta utilización selectiva de los genes. A medida que las células se desarrollan hacia destinos específicos, ciertas regiones de sus genomas son “cerradas”, debido a varias modificaciones epigenéticas. Cada tipo de célula tiene un particular patrón de expresión génica que se mantiene a medida que las células crecen y se dividen.

#### ▷ FACTORES EPIGENÉTICOS QUE PARTICIPAN EN EL CÁNCER EN LAS FASES GENÉTICA Y EPIGENÉTICA

Algunas plantas frente a las infecciones virales (virus de ARN), han desarrollado un mecanismo de defensa llamado silenciamiento del ARN, que evita que se produzcan proteínas virales. La importancia de las moléculas de ARN en la desactivación de genes ha surgido recientemente como un área importante dentro de la biología molecular. Las moléculas pequeñas de ARN pueden silenciar genes mediante los procesos conocidos como silenciamiento transcripcional de genes (TGS) y silenciamiento postranscripcional (PTGS) de genes, esto último también llamado interferencia del ARN (ARNi o siARN). En la maquinaria de la ARNi participan varios componentes como las enzimas RISC, Dicer, Argonaute, polimerasa de ARNasa dependiente (RdRP), y varios sustratos como dsARN, siARN y el micro ARN de 22 nucleótidos (miARN). Los miARN regulan negativamente la expresión génica a través de secuencias específicas vía postranscripcional o por degradación del ARN mensajero.

El descubrimiento del ARN de interferencia (ARNi), sistema endógeno de regulación del silenciamiento de genes que emplea moléculas de ARN, ha conducido a revolucionar nuestro entendimiento en la

regulación genómica y celular. Diferentes ARNi están siendo empleados como biomarcadores y como herramientas terapéuticas.

Recientemente, se ha demostrado que los siARN participan en el control de varios mecanismos genómicos/epigenómicos (inducen metilación del DNA y de H3),<sup>25,26</sup> como en el silenciamiento de genes ROX y XIST u otras secuencias repetitivas de ADN por medio de la regulación PTGS, TGS o relacionadas a la interferencia del mRNA, respectivamente; estos ARNi actúan en conjunto con varios componentes de la cromatina y de la maquinaria de la metilación del ADN.

Los genes de los miARN están estrechamente ligados con el proceso de la tumorigénesis, algunos de ellos pueden funcionar como oncogenes y otros como supresores tumorales (regulando los procesos de proliferación y apoptosis celular) y participan en el mantenimiento de la estabilidad genómica.<sup>27,28</sup> Más del 50% de los miARN identificados se localizan en regiones genómicas de genes asociados al cáncer o en sitios frágiles de ADN. El silenciamiento de genes por la tecnología del ARNi ha generado efectos antiproliferativos y/o proapoptóticos en modelos preclínicos.<sup>29</sup>

#### ► MECANISMOS EPIGENÉTICOS IDENTIFICADOS EN LA CARCINOGENÉISIS, TRANSFORMACIÓN Y PROGRESIÓN TUMORAL EN EL CÁNCER HUMANO

Las principales características de las células cancerosas son anomalías en la función y en los patrones de expresión de algunos genes. En la transformación neoplásica se presenta proliferación celular descontrolada, pérdida del control del ciclo celular, acumulación de aberraciones cromosómicas, aneuploidías del ADN y falta de regulación en la diferenciación. Los genes supresores tumorales son silenciados y los oncogenes son activados (mutaciones dominantes o sobreexpresión de genes normales).

El silenciamiento génico/epigénico está asociado a alteraciones en la metilación del promotor génico y en la represión transcripcional (**figura 1**). El silenciamiento puede ocurrir durante las etapas iniciales en la tumorigénesis y en las etapas de la progresión y conduce a la desactivación o sobre activación de diferentes vías de señalamiento intracelular.<sup>30</sup>

El genoma de las células cancerosas muestra simultáneamente desmetilación global del genoma e hipermetilación de las islas CpG de promotores de genes supresores tumorales y otros genes relacionados al desarrollo del cáncer, junto con una pérdida global de la monoacetilación y trimetilación de la H4.<sup>31</sup> Estos cambios participan fundamentalmente en la alteración de la estructura

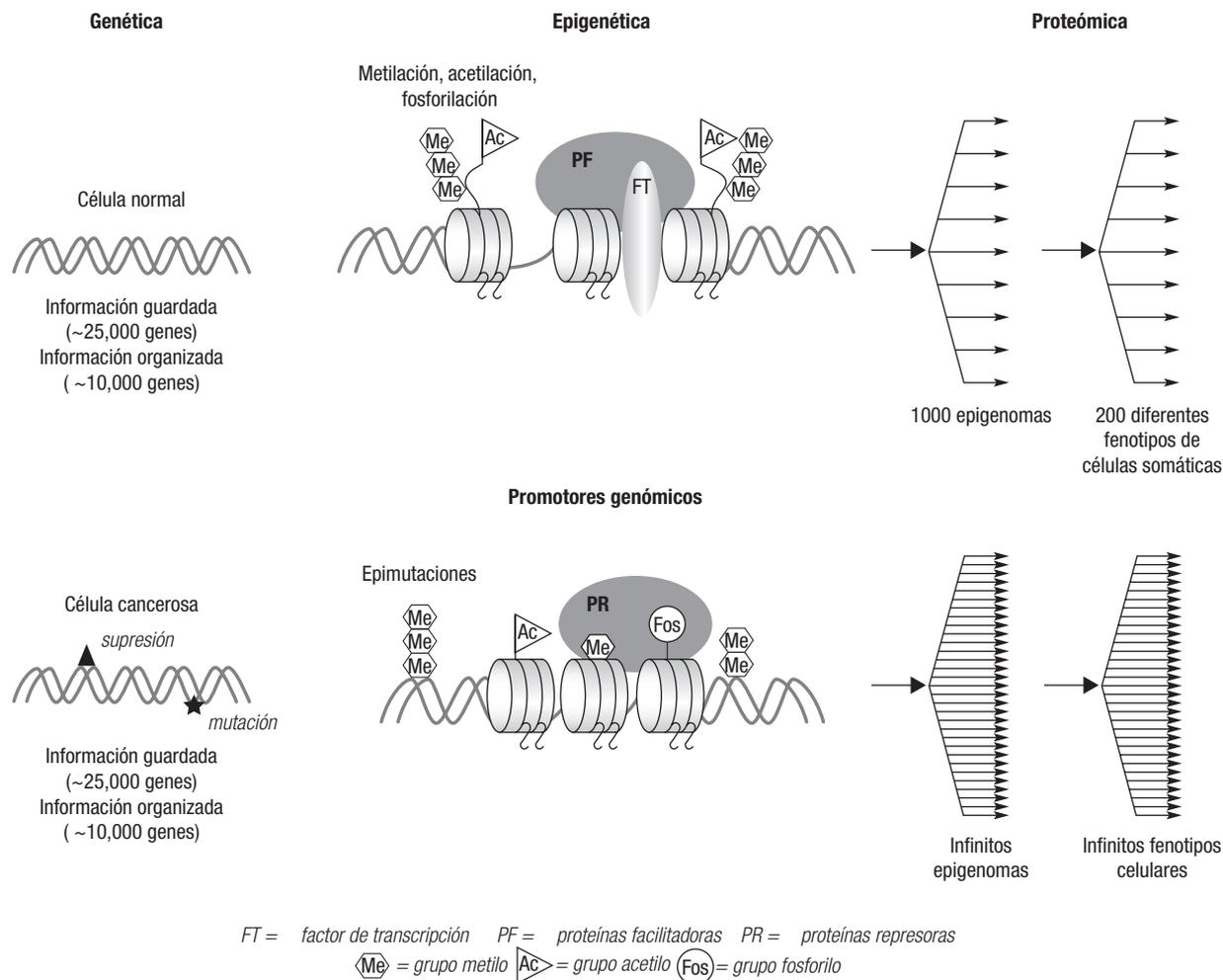
y función del DNA, provocando la transcripción no requerida de elementos repetitivos, la activación anormal de genes, predisposición a la inestabilidad genómica a través del trastorno del control de la replicación cromosómica y finalmente anormal silenciamiento de los genes individuales relacionados con la iniciación y progresión de los tumores. Estos últimos involucran genes supresores tumorales, factores transcripcionales relacionados con el desarrollo celular, genes remodeladores de tejidos, genes reparadores del DNA, genes de control del ciclo celular, genes antiapoptosis, y otros genes que favorecen las vías intracelulares para el desarrollo de los tumores.<sup>21</sup> La hipermetilación participa en el silenciamiento de la transcripción de genes supresores de tumores y de genes relacionados a los tumores en las células cancerosas. Cada subtipo de cáncer tiene grupos específicos de genes susceptibles a metilación (p.ej. el gen de la glutatión S-transferasa, GSTP1 es hipermetilado e inactivado en la mayoría de los cánceres de próstata.<sup>32,33</sup> Diferentes tipos de cáncer, como gástrico, vesical, colónico, pulmonar y leucemias ocurren con niveles elevados de DNMTs que catalizan covalentemente la adición de grupos metilo a las citosinas de las islas CpG.

La contribución de los cambios genéticos y epigenéticos (silenciamiento de genes) en la determinación del fenotipo tumoral celular ha sido demostrada en varios modelos de cáncer. En un estudio de la línea celular humana de cáncer de colon HCT116, se encontraron mutaciones en un alelo de varios genes tumorales supresores y adicionalmente por lo menos otros 14 genes estuvieron silenciados epigenéticamente.<sup>34,35</sup> Cuando fueron reactivados estos últimos mediante agentes desmetilizantes del ADN, se redujo la proliferación y se indujo senescencia o apoptosis.

Aunque en general los cambios de silenciamiento epigenético en las células tumorales suceden en cualquier etapa de la transformación neoplásica, predominan en las etapas iniciales. Una serie de genes, que muestran hipermetilación del DNA en etapas preinvasoras, secundarios a periodos crónicos de estrés o de renovación celular en algunos cánceres (p.ej. colon), han sido denominados guardianes epigenéticos (*epigenetic gatekeepers*).<sup>14</sup> Estos cambios epigenéticos y sus interacciones con otros cambios genéticos, pueden conducir a que estas células transiten particularmente en vías oncogénicas preferentes (adicción oncogénica),<sup>34,36,37</sup> como la adicción a la vía de señalización intracelular Wnt en las lesiones preinvasoras de cáncer de colon,<sup>38</sup> y de la vía de respuesta al daño del ADN en las lesiones preinvasoras de cáncer de mama.<sup>39</sup> El silenciamiento inapropiado de estos genes bloquea su activación y permite la supervivencia celular, la expansión

**Figura 1.**

Factores genéticos y epigenéticos de las células normales y células cancerosas. En este diagrama comparativo, se remarcan los cambios a nivel de los promotores genómicos de los genes supresores tumorales y su repercusión en los cambios proteómicos y del fenotipo celular.



clonal anormal e inhibe la diferenciación celular. Así las mutaciones y/o epimutaciones en los genes APC y  $\beta$ -catenina, genes guardianes en cáncer de colon, promueven la activación de la vía Wnt, lo cual conduce hacia su tumorigénesis. El gen supresor tumoral p16<sup>ink4A</sup>, es otro de los genes cuyo silenciamiento epigenético participa en las lesiones preinvasoras de cáncer de mama, colon y pulmón. Una gran cantidad de estudios recientes indican la posibilidad de que cientos de genes epigenéticamente silenciados participen en diferentes tipos de tumores.

Los cambios epigenéticos en cáncer involucran patrones alterados de la metilación de grupos de CpGs en el ADN; modificaciones covalentes y no covalentes de

aminoácidos específicos en las histonas, y modificaciones de la estructura de la cromatina. Así, la transformación neoplásica es un proceso de multietapas que involucra la activación de oncogenes y/o el silenciamiento de genes supresores a partir de eventos genómicos y epigenómicos. ¿En qué magnitud los cambios epigenéticos contribuyen en la transformación neoplásica? Aunque se presume que son significativos, la respuesta precisa queda por resolverse.

#### Alteraciones en la metilación del ADN

La alteración epigenética más estudiada en cáncer es el anormal silenciamiento de genes asociado a la hiperme-

tilación del DNA en las islas CpG de la región promotora (p.ej. hipermetilación de los genes BRCA1 en carcinoma mamario). Las alteraciones epigenéticas en cáncer incluyen tanto la pérdida como ganancia de la metilación del ADN. Diferentes patrones alterados de ganancia de metilación (hipermetilación) o de pérdida (hipometilación) del ADN están distribuidos en el genoma de células cancerosas comparados con el genoma con las células normales. La ADN-hipometilación contribuye al cáncer porque promueve la inestabilidad cromosómica, la activación de oncogenes, la activación de transposones y la pérdida de la impronta génica.<sup>1,21</sup> La metilación es el único parámetro genómico que puede cambiar la función del genoma bajo influencias exógenas; la metilación en posiciones variables (MVP), puede corresponder a marcas epigenéticas. A nivel individual de un gen, la hipometilación puede tener efectos neoplásicos debido a la activación de protooncogenes, des-supresión de genes, impronta de genes o su expresión bialélica (LOI). A nivel global del genoma, la hipometilación del ADN activa oncogenes, inicia la inestabilidad cromosómica y predispone a translocaciones cromosómicas y aneuploidía (p.ej. por mutaciones en DNMT1).<sup>40</sup> Contrariamente, las células cancerosas presentan hipermetilación de regiones CpG localizadas cerca de los sitios de inicio de la transcripción de diferentes genes supresores tumorales (que normalmente se mantienen libres de metilación de ADN). Este mecanismo de silenciamiento de la expresión de los genes tumorales supresores es alternativo al mecanismo de mutación genética de este tipo de genes. La hipermetilación (silenciamiento de la expresión de los genes supresores tumorales) y/o la hipometilación (el incremento en la transcripción de los protooncogenes), son importantes en la iniciación o progresión tumoral, permitiendo la acumulación de cambios adicionales génicos u otros epigenéticos. El silenciamiento de los genes supresores tumorales por hipermetilación del ADN es frecuentemente observado en la progresión tumoral (p.ej. silenciamiento de los genes p16 y hMLH1).<sup>41</sup> Eventualmente, los patrones de metilación del genoma pueden también emplearse como biomarcadores del tipo de tumor, para detección temprana, monitorear pronóstico y como indicadores de susceptibilidad o respuesta al tratamiento.<sup>7,42</sup> Por lo que para monitorear adecuadamente un tumor es necesario explorar tanto el genoma (mutaciones) como el epigenoma (cambios epigenéticos) de las células tumorales.

La metilación del ADN puede ser removida por la ADN-desmetilasa (proceso activo), o porque en la siguiente replicación del ADN se realice sin participación de la DNMT1 (proceso pasivo). Diferentes influencias ambientales afectan los niveles de metilación, como el

consumo de compuestos en la dieta que contengan SAM. Estudios en modelos animales que desarrollan cáncer de colon (ApcMin), han demostrado que una dieta baja en SAM (folatos) y en ausencia de DNMT1 (knockout de DNMT1) provocan hipometilación y reducen la tumorigénesis,<sup>43,44</sup> sin embargo, hay otros modelos de cáncer que presentan efectos contrarios. Por lo que se considera que el efecto del patrón de metilación de ADN en la tumorigénesis depende tanto del tipo celular como de las influencias ambientales. Las reglas que gobiernan cuáles genes son metilados en la carcinogénesis o que determina el tipo de metilación específica son cuasi-desconocidas.

Sin embargo, la metilación de genes específicos ocurre en la mayoría de los cánceres, a excepción de los tumores germinales seminomatosos. Recientemente Shames y cols.,<sup>45</sup> demostraron un patrón de hipermetilación común (*hypermethylation signature*) en las regiones promotoras de siete genes en cánceres mamario y pulmonar; cambios similares fueron también parcialmente compartidos (cuatro de estos genes) en otros tumores epiteliales originados en próstata, y colón. Estos patrones de hipermetilación común de algunos genes en diferentes tumores podrían representar blancos para su evaluación clínica o su intervención terapéutica.

#### **Alteraciones de los procesos covalentes y no covalentes del remodelamiento de la cromatina**

La disregulación de las enzimas modificadoras de la cromatina está implicada en diferentes cánceres. Esta disregulación, produce pequeños cambios moleculares de sus componentes (modificaciones de las histonas H3 y H4 por acetilación y metilación de sus residuos de lisina), y alteraciones en los complejos de su remodelación que finalmente conducen a provocar defectos en su organización topográfica, inapropiados patrones de transcripción y finalmente un fenotipo tumoral. La acumulación de errores genéticos y epigenéticos conducen a la transformación tumoral.

Las evidencias actuales sugieren que los complejos de remodelación de la cromatina que involucran a las familias de las proteínas PcG y TrxG, juegan un papel esencial en las alteraciones genética/epigenéticas del cáncer, a través de silenciar o activar a genes inapropiados relacionados con la diferenciación/proliferación celular, tanto de células madre como de células progenitoras en varios tipos de tejido,<sup>34,46,47</sup> las proteínas PcG frecuentemente están sobreexpresados en las células tumorales. Los complejos que contienen Polycomb provocan acción represiva en la expresión génica (PRCs), y se organizan en 3 grupos. El grupo PRC1 mantiene el silenciamiento de los genes en células humanas (comprenden las familias CBX, HPH,

Ring 1/1a, Ring 2/1b, BMI1, YY1); el grupo PRC2/PCRC3 inician el silenciamiento génico (las familias HKMT, las EED, las EZH y la SUZ.12); y el PRC4 es expresada tanto en cáncer como en células madre embrionarias (comprende las HKMT, EED2, EZH1,-2, SUZ.12 y SIRT1). El complejo PRC2/PCR3 incluye varios tipos de metiltransferasas de histonas como la EZH2, cuyo producto es la H3K27me. Los complejos PRC1 contienen proteínas con un dominio de cromosoma, como la familia CBX que reconocen las marcas H3K27me y de la proteína BMI1. En general niveles elevados de EZH2, BMI1 y otros miembros del complejo PcG están aumentados en cáncer.<sup>17</sup>

Hay una estrecha interdependencia entre la metilación del DNA y las modificaciones de la cromatina para el empaquetamiento del DNA. Mientras que la acetilación de las lisinas en las histonas está asociada con una transcripción activa, su metilación se asocia tanto a estados activos o reprimidos dependiendo del sitio donde la lisina es modificada. Las HDACs tipos I y II que eliminan grupos acetilos de las lisinas de histonas, se asocian a una familia de proteínas que unen metilos a la citosinas (MBDs). En la jerarquización de la colaboración entre la metilación del ADN y la deacetilación de las lisinas, la metilación parece tener el efecto dominante. El patrón global de acetilación y metilación de histonas cambia a medida que avanza la etapa clínica en el cáncer de próstata,<sup>48</sup> y es importante en mantener la metilación de promotores génicos (como el gen RASSF1A).<sup>49</sup>

Las alteraciones en las modificaciones covalentes de las histonas y la desregulación de las enzimas que funcionan como marcadoras/desmarcadoras y reconocedoras/efectoras de ellas, se encuentran relacionadas estrechamente con la oncogénesis. Los principales patrones de modificación covalentes de histonas identificados en los diferentes modelos tumorales son la pérdida de trimetilación en la H4K20me3 y la pérdida de acetilación en la H4K16Ac asociada a hipometilación del ADN en sus secuencias repetitivas.

Otras modificaciones patofisiológicas en la metilación de las histonas en las células cancerosas son: la metilación de H3K27 provocada la metiltransferasa EZH2 (perteneciente a PRC2, participa en proliferación, adhesión celular dependiente de actina y migración), así la H3K27me3 recluta a la BMI1 (perteneciente a PRC1, que actúa como efectora/protooncogén, por su cooperación con Myc); la metilación de H3K9 en la heterocromatina que se une a la HP1, ha sido identificada en diferentes tumores metastáticos; la metilación de H3K4 por la metiltransferasa MLL (del grupo TrxG) contribuye a la tumorigénesis; y las metilaciones de H3K36, H4K20,

H3K79 (realizadas por las metiltransferasas NSD1 y hDOT1L).<sup>13</sup>

El estado de acetilación de la cromatina está gobernado por los efectos oponentes de las HATs (3 familias) y de las HDACs, su alteración en el balance puede conducir a la oncogénesis. La función de las HATs pueden ser inhibida por el efecto de oncoproteínas virales (adenovirus, SV40), y/o por mutaciones bialélicas (p.ej. p300 y CBP, familias de las HATs), y aunque la pérdida de las HATs puede tender a la tumorigénesis (translocaciones cromosomales), su activación aberrante también se puede asociar. Por otra parte, la función de las 18 HDACs identificadas (organizadas en 4 clases), conducen generalmente a la represión transcripcional. Uno de los mecanismos oncogénicos de cómo participan las HDACs, es que su sobreexpresión sola o en combinación con la metilación del ADN reprime genes supresores tumorales (p.ej. APC).

Además de que el remodelamiento de la cromatina participa en la regulación de la transcripción, lo hace en otros múltiples procesos celulares por mecanismos no transcripcionales que incluyen la reparación del ADN dañado, la estabilidad cromosomal y la apoptosis. La fosforilación de las serinas en las histonas es crucial en esos tres procesos. Así, la histona variante H2A.X al ser fosforilada en S139 participa en la reparación del ADN cuando sufre rupturas y con ello mantiene la estabilidad genómica. La H3S10 fosforilada por la cinasa-auroraB, es fundamental para la adecuada condensación cromosomal y la segregación durante la mitosis. La fosforilación de la H2BS14, junto con la H2BK11Ac participan en un mecanismo proapoptótico celular.

Asimismo, las modificaciones patofisiológicas no covalentes de las histonas, y la utilización de variantes de histonas actúan de manera independiente o en concierto con las modificaciones patofisiológicas covalentes de las histonas en la regulación transcripcional durante la tumorigénesis. Algunas enzimas reconocedoras/efectoras de histonas modificadas covalentemente forman parte de los complejos de remodelación de cromatina dependientes de ATP, como por ejemplo, el factor de remodelación de nucleosomas (NURF) que interactúa con H3K4 (que es trimetilada por medio de la metiltransferasa MLL, y luego desmetilada por la JARID1).

Las enzimas que remodelan la cromatina dependientes de ATP como la SNF2 son estructuralmente parecidas a las translocasas de ADN. Estas enzimas movilizan los nucleosomas a través del ADN, intercambian histonas clásicas por histonas variantes, con lo cual, los nucleosomas pueden ser deslizados, serpenteados y enroscados, modulando la accesibilidad del ADN

independientemente del efecto de las modificaciones en las colas de las histonas. Existen 4 familias de estas ATPasas en los mamíferos: las SWI/SNF, las ISWI, las NuRD/Mi-2/ChD y las INO80. Aunque el papel fundamental de estas enzimas radica en el remodelamiento de la cromatina, participan también en la regulación transcripcional; y el resultado específico de su acción depende del contexto particular del estado de la cromatina. Las subunidades SNF5, BRG1 y BRM (pertenecientes a la familia SWI/SNF), funcionan como supresores tumorales, regulando proliferación celular, manteniendo la estabilidad cromosomal, y participando en la reparación del ADN dañado, a través de la vía de p16<sup>Ink4a</sup>-ciclina D/CDK4-pRb-E2F. El gen del complejo NuRD/Mi-2/ChD (ubicado en la región cromosómica 1p36.3) funciona como supresor tumoral y particularmente esta región se encuentra borrada en el neuroblastoma y en otros cánceres epiteliales y hematológicos.<sup>17</sup>

Actualmente, es evidente que existe un cruce significativo de información entre las diferentes vías epigenéticas. El papel preciso de cada uno de los factores que reprimen la expresión transcripcional en el inicio y mantenimiento del silenciamiento génico anormal en cáncer queda por aclararse.<sup>21</sup>

#### ▷ INTERVENCIÓN TERAPÉUTICA SOBRE LOS FACTORES EPIGENÉTICOS DEL CÁNCER HUMANO

El hecho de que los cambios epigenéticos son prevalentes en los cánceres y juegan un papel causal, ha conducido al desarrollo de nuevos ensayos terapéuticos teniendo como objetivo el revocar el silenciamiento génico. Por la naturaleza reversible de estas modificaciones, diferentes moléculas pequeñas están siendo diseñadas para modular este proceso.

El desarrollo de drogas dirigidas a inhibir la función de las enzimas que alteran la dinámica de la cromatina ha abierto un nuevo horizonte en el tratamiento del cáncer. El uso de inhibidores de las enzimas DNMT y HDAC en protocolos clínicos de pacientes en etapas avanzadas de algunos cánceres abre una nueva generación de tratamiento.

El síndrome mielodisplásico (MDS), es un desorden clonal caracterizado por alteraciones en la hematopoyesis, los pacientes con este síndrome tienen alta susceptibilidad a desarrollar leucemia mielocítica aguda.<sup>50</sup> La FDA ha aprobado el uso de dos agentes inhibidores de la metilación del ADN, la vidaza o 5-azacitidina y el decitabina o 5-aza-2'-deoxicitidina, en el tratamiento y prevención de la transformación maligna del síndrome mielodisplásico preleucémico. Más recientemente, la FDA ha aprobado

el uso del vorinostat, un inhibidor de HDAC en el tratamiento de pacientes con linfoma cutáneo primario de células T progresivo o recurrente.<sup>51</sup>

#### ▷ CONCLUSIONES

Necesitamos un mejor entendimiento molecular de los fenómenos epigenéticos en el desarrollo del cáncer. Las alteraciones de los sistemas de metilación del ADN y de la maquinaria que remodela la cromatina están involucradas en diferentes enfermedades y particularmente en el cáncer.

Existe un cruce de información y coordinación de las diferentes vías epigenéticas. La dialéctica de los mecanismos epigenéticos incluye sustratos (DNA, histonas), enzimas marcadoras/desmarcadoras y complejos identificadores/efectores activadores y represores.

En los próximos años se identificarán los mapas topográficos del empaquetamiento del genoma que regulan la expresión de los genes relacionados con la transformación neoplásica (perfil de alteraciones del patrón de modificaciones *-epigenetic signature-*) en cada uno de los 200 modelos de cáncer, los cuales serán útiles en el tamizaje, predicción, pronóstico y tratamiento de pacientes con cáncer.

A pesar de los recientes progresos en la investigación epigenética, quedan muchas grandes y fundamentales preguntas por resolver.

#### Agradecimientos

A la Sra. Adriana Medina, asistente bibliotecaria de la UMAE Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social por su valiosa colaboración en la búsqueda documental.

#### Bibliografía

1. Rodenhiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical application. *CMAJ* 2006;174:341-348.
2. Lotem J, Sachs L. Epigenetics and the plasticity of differentiation in normal and cancer stem cells. *Oncogene* 2006;25:7663-7672.
3. Kioussis D, Georgopoulos K. Epigenetic flexibility underlying lineage choices in the adaptive immune system. *Science* 2007;317:620-622.
4. ¿Epigenética? Folleto 2006. Red de excelencia para la investigación del epigenoma. [www.epigenome.eu](http://www.epigenome.eu).
5. Rakyan VK, Hildmann T, Novik KL, Lewin J, Tost J, Cox AV et al. DNA methylation profiling of the human major histocompatibility complex: a pilot study for human epigenome Project. *PLoS Biol* 2004;2, e405.
6. Eckhardt F, Lewin J, Cortese R, Rakyan VK, Attwood J, Burger M et al. DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. *Nature Genet* 2006;38:1378-1385.
7. HEP. Human Epigenome Project. [www.epigenome.org](http://www.epigenome.org).
8. Baylín SB, Schuebel K. The epigenomic era opens. *Nature* 2007;448:548-549.
9. Jing-Dong, Han J. Understanding biological functions through molecular networks. *Cell Res* 2008;18:224-237.
10. Goldberg AD, Allis D, Bernstein E. Epigenetics: A landscape takes shape. *Cell* 2007;128:635-638.

11. Allis CD, Junuwein T, Rinberg D. Overview and Concepts. En: Allis CD, Junuwein T, Rinberg D, Editors. *Epigenetics*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007;23-61.
12. DNA and chromosomes. En: Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Peter Walter P, Editors. *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science. 2002;191-234.
13. Wang GG, Allis CD, Chi P. Chromatin remodeling and cancer, part I: covalent histone modifications. *Trends Mol Med* 2007;13:363-372.
14. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007;128:683-692.
15. Jenuwein T. The epigenetic magic of histone lysine methylation. *FEBS J* 2006;273:3121-3135.
16. Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G *et al*. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet* 2005;37:391-400.
17. Wang GG, Allis CD, Chi P. Chromatin remodeling and cancer, part II: ATP-dependent chromatin remodeling. *Trends Mol Med* 2007;13:373-380.
18. Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G *et al*. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* 2007;448:553-560.
19. Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z *et al*. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 2007;129:823-837.
20. Albiez H, Cremer M, Tiberi C, Vecchio L, Schermelleh L, Dittrich S *et al*. Chromatin domains and the interchromatin compartment form structurally defined and functionally interacting nuclear networks. *Chromosome Res* 2006;14:707-733.
21. Ting AH, McGarvey KM, Baylin SB. The cancer epigenoma—components and functional correlates. *Genes Dev* 2006;20:3215-3227.
22. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 2004;4:143-153.
23. Eminli S, Jaenisch R, Hochedlinger K. Strategies to induce nuclear reprogramming. *Emst Shering Found Symp Proc* 2006;5:83-98.
24. Hochedlinger K, Blleloch R, Brennan C, Yamada Y, Kim M, Chin L, Jaenisch R. Reprogramming of a melanoma genome by nuclear transplantation. *Genes Dev* 2004;18:1875-1885.
25. Bernstein E, Allis CD. RNA meets chromatin. *Genes Dev* 2005;19:1635-1655.
26. Kawasaki H, Taira K. Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells. *Nature* 2004;431:211-217.
27. Giannakakis A, Coukos G, Hatzigeorgiou A, Sandaltzopoulos R, Zhang L. miRNA genetic alterations in human cancers. *Expert Opin Biol Ther* 2007;7:1375-1386.
28. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* 2007;302:1-12.
29. Pai SI, Lin Y-Y, Macaes B, Meneshian A, Hung C-F, Wu T-C. Prospects of RNA interference therapy for cancer. *Gene Therapy* 2006;13:464-477.
30. Baylin SB, Jones PA. Epigenetic determinants of cancer. En: Allis CD, Junuwein T, Rinberg D, Editors. *Epigenetics*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007;457-475.
31. Esteller M. The necessity of a human epigenome project. *Carcinogenesis* 2006;27:1121-1125.
32. Herman JG. Epigenetic changes in cancer and preneoplasia. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2005;70:329-333.
33. Stizaker C, Song JZ, Davidson B, Clark SJ. Transcriptional gene silencing promotes DNA hypermethylation through a sequential change in chromatin modifications in cancer cells. *Cancer Res* 2004;64:3871-3877.
34. Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer—a mechanisms for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* 2006;6:107-116.
35. Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP *et al*. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:6870-6875.
36. Weinstein IB. Cancer. Addiction to oncogenes—the Achilles heel of cancer. *Science* 2002;297:63-64.
37. Weinstein IB, Joe AK. Mechanisms of disease: Oncogen addiction—a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nat Clin Pract Oncol* 2006;3:448-457.
38. Suzuki H, Watkins DN, Jair KW, Schuebel KE, Markowitz SD, Chen WD *et al*. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nature Genet* 2004;36:417-422.
39. Fujii H, Biel MA, Zhou W, Weitzman SA, Baylin SB, Gabrielson E. Methylation of the HIC-1 candidate tumor suppressor gene in human breast cancer. *Oncogene* 1998;16:2159-2164.
40. Habano W, Sugai T, Jiao YF, Nakamura S. Novel approach for detecting global epigenetic alterations associated with tumor cell aneuploidy. *Int J Cancer* 2007;121:1487-1493.
41. McGarvey KM, Fahrner JA, Greene E, Martens J, Jenuwein T, Baylin SB. Silenced tumor suppressor genes reactivated by DNA demethylation do not return to a fully euchromatic chromatin state. *Cancer Res* 2006;66:3541-3549.
42. Karpf AR. Epigenomic reactivation screening to identify genes silenced by DNA hypermethylation in human cancer. *Curr Opin Mol Ther* 2007;9:231-241.
43. Smith LT, Otterson GA, Plass C. Unraveling the epigenetic code of cancer therapy. *Trends Genetics* 2007;23:449-456.
44. Trasler J, Deng L, Melnyk S, Pogribny I, Hiou-Tim F, Sibani S *et al*. Impact of Dnmt1 deficiency, with or without low folate diets, on tumor numbers and DNA methylation in Min mice. *Carcinogenesis* 2003;24:39-45.
45. Shames DS, Girard L, Gao B, Sto M, Lewis CM, Shivapurkar N, Jiang A *et al*. A genome-wide screen for promoter methylation in lung cancer identifies novel methylation markers for multiple malignancies. *PLoS Med* 2006;3(12):e486.
46. Schneider R, Bannister AJ, Kouzarides T. Unsafe SETs: histone lysine methyltransferases and cancer. *Trends Biochem Sci* 2002;27:396-402.
47. Valk-Lingbeek ME, Bruggeman SW, van Lohuizen M. Stem cell and cancer; the polycomb connection. *Cell* 2004;118:409-418.
48. Seligson DB, Horvath S, Shi T, Yu H, Tze S, Grunstein M, Kurdistani SK. Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. *Nature* 2005;435:1262-1266.
49. Kawamoto K, Okino ST, Place RF, Urakami S, Hirata H, Kikuno N *et al*. Epigenetic modifications of RASSF1A gene through chromatin remodeling in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:2541-2548.
50. Mihara K, Takihara Y, Kimura A. Genetic and epigenetic alterations in myelodysplastic syndrome. *Cytogenet Genome Res* 2007;118:297-303.
51. Mann BS, Johnson JR, Cohen MH, Justice R, Pazdur R. FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma. *Oncologist* 2007;12:1247-1252.

# Mortalidad temprana en niños con leucemia linfoblástica aguda en un país en vías de desarrollo; factores asociados con el pronóstico

*Early mortality in children with acute lymphoblastic leukemia in a developing country: Factors associated with prognosis*

López Facundo NA<sup>1</sup>, Talavera Piña JO<sup>2</sup>, Tejocote Romero I<sup>3</sup>.

## ▷ RESUMEN

**Objetivo:** Proponer una estratificación con valor pronóstico sobre la mortalidad temprana en niños con leucemia linfoblástica aguda (LLA), con base en características clínico-demográficas; hecho que podría ayudar a identificar al paciente con mayor riesgo de muerte temprana de esta entidad creciente en México.

**Material y métodos:** Estudiamos prospectivamente 265 niños con LLA durante un periodo de 0 a 6 meses, evaluando sus características: clínico-demográficas, resultados de laboratorio e inmunofenotipo, tratamiento quimioterapéutico y complicaciones. El análisis incluyó tres etapas, inicialmente evaluamos el riesgo de muerte de cada variable; construimos un índice, asignando una puntuación equivalente al coeficiente  $\beta$  a las variables significativas obtenidas mediante regresión binaria logística y posteriormente se aplicó este índice a todos los casos, determinando su relación con el desenlace.

## ▷ SUMMARY

**Objectives:** The early mortality in children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) in Mexico it is in increase. We propose a prognostic stratification of early mortality in these patients starting from their clinical-demographic characteristics at the time of the diagnosis.

**Material and methods:** We studied 265 children with ALL during a period of 0 to 6 months, evaluating to the entrance characteristic: clinical-demographic, findings of laboratory and immunogenetics, type of chemotherapeutic treatment. The analysis included 3 stapes, initially we evaluate the risk of death of each variable, we build an index assigning an equivalent punctuation to the coefficient  $\beta$  to the significant variables obtained by means of logistical binary regression and later on this index was applied to all the cases determining its relationship with the outcome.

**Results:** 16.6% of the patients died in early form. The associate variables were severe malnutrition ( $p < 0.001$ ), low

<sup>1</sup>Servicio de Hematología y Oncología Pediátrica. Hospital Materno Infantil del Instituto de Seguridad Social del Estado de México y Municipios. Toluca, Estado de México. <sup>2</sup>Unidad de Investigación en Epidemiología Clínica, Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social. México D. F. <sup>3</sup>Servicio de Hematología y Oncología Pediátrica. Hospital para el Niño del Instituto Materno Infantil del Estado de México. Instituto de Salud del Estado de México. Toluca, Estado de México.

Correspondencia: M en I.C. Norma Araceli López Facundo. Servicio de Oncología Pediátrica. Hospital Materno Infantil ISSEMYM. Dir.: Vía Alfredo Del Mazo esquina con Tomás Alva Edison. Toluca, Estado de México. C.P. 50010. Tel.: 01722 2726240, ext. 126. Correo electrónico: araceli2210@hotmail.com

**Resultados:** El 16.6% de los pacientes fallecieron en forma temprana. Las variables asociadas fueron desnutrición severa ( $p < 0.001$ ), nivel socioeconómico malo/pésimo ( $p < 0.001$ ), infección concomitante ( $p = 0.001$ ) y enfermedad extramedular masiva ( $p < 0.001$ ). Construimos una estratificación pronóstica con 4 niveles de riesgo de muerte temprana. De forma retrospectiva aplicamos el índice creado en todos los casos, demostrando su utilidad.

**Conclusiones:** La presencia de enfermedad extramedular masiva, nivel socioeconómico malo/pésimo, desnutrición severa, infecciones y enfermedades concomitantes se asociaron a la mortalidad temprana por LLA. Estas características deben evitarse con una atención integral oportuna.

**Palabras clave:** leucemia linfoblástica aguda, mortalidad temprana en niños.

*socioeconomic level ( $p < 0.001$ ), concomitant infection ( $p = 0.001$ ) and extramedullary massive illness ( $p < 0.001$ ). We build a prognostic stratification with 4 levels of risk of early death, applying the index created at the end of the study, demonstrating their utility.*

**Conclusions:** *The presence of extramedullary massive illness, low socioeconomic level, severe malnutrition, and concomitant infections were associated to early mortality, for what they should be considered as factors of risk of this in our means.*

**Key words:** *acute lymphoblastic leukemia, early mortality children.*

## INTRODUCCIÓN

Mientras que en países desarrollados, como Estados Unidos, las tendencias de mortalidad infantil por cáncer han descendido notablemente, considerándose a este hecho como un indicador del mejoramiento en la calidad de los servicios de salud.<sup>1,2</sup> Los datos disponibles en nuestro país reportan un incremento en estas tendencias, siendo la leucemia linfoblástica aguda (LLA) el cáncer más común en los niños, con una tasa de mortalidad de 2.66 x 100,000 niños para el año 2002.<sup>3,4</sup>

Se define como mortalidad temprana en LLA a la que ocurre antes del inicio del tratamiento, o bien, durante el tratamiento de inducción a la remisión y se reporta en cifras muy bajas (1.6-4%) en países económicamente desarrollados.<sup>1,5-12</sup> El diagnóstico temprano, la referencia oportuna a unidades de tercer nivel y los avances recientes en el tratamiento, han logrado incrementar la sobrevida de estos pacientes hasta en un 80% a 5 años en estos países, por lo que las investigaciones actuales, predominantemente se han enfocado a determinar los factores que influyen en el pronóstico de sobrevida y de recaída.<sup>7-12</sup> En estos países, la mayoría de las defunciones de pacientes con LLA ocurre en etapas subsecuentes del tratamiento inicial, por lo que los reportes de estudio de muerte temprana son limitados.<sup>13-18</sup> Sin embargo, en México, país en vías de desarrollo, se han reportado cifras de mortalidad temprana en niños con LLA de hasta 18%,

sugiriéndose una asociación de ésta con factores nutricionales inadecuados, baja tolerancia a la quimioterapia mieloablativa y por consiguiente una sobrevida más corta.<sup>19-20</sup> En estudios realizados en algunos países con nivel socioeconómico y cultural similar al nuestro, un mayor número de recaídas y menor sobrevida, se ha relacionado con la presencia de algunos indicadores de pobreza como bajo ingreso *per cápita* y bajo consumo de energía.<sup>21-29</sup> El objetivo del presente estudio es analizar las variables clínico-demográficas que se asocian a mortalidad temprana en niños con LLA y a partir de éstas, construir una estratificación pronóstica que permita identificar al paciente con mayor probabilidad de fallecer tempranamente. A mediano plazo, se podrían desarrollar estrategias que modifiquen las variables asociadas a su mortalidad temprana.

## ▷ MATERIAL Y MÉTODOS

Incluimos en un estudio de cohorte a pacientes de 1 a 16 años, de género indistinto, con reciente diagnóstico clínico de LLA, corroborado mediante el estudio morfológico de la médula ósea de acuerdo a los lineamientos del French-American-British (FAB) Cooperative Group,<sup>30</sup> sin tratamiento previo, los cuales fueron atendidos en los Servicios de Hematología y Oncología del Hospital Materno Infantil del Instituto de Seguridad Social del Estado de México y Municipios, Toluca, México, y del Hospital para el Niño del Instituto Materno Infantil del Estado de

México, Toluca, México, durante el periodo de enero-marzo de 1999 a diciembre de 2004. Los pacientes fueron seguidos clínicamente desde su ingreso hospitalario y durante un mínimo de 6 meses, o bien, hasta el momento de su defunción. El concepto de muerte temprana fue definido en los casos en que ésta ocurrió antes de inicio del tratamiento con poliquimioterapia, o durante el periodo de inducción a la remisión (4-6 semanas).

Los pacientes fueron evaluados al momento del diagnóstico, registrándose sus características clínico-demográficas incluyendo edad, género, nivel socioeconómico y cultural (NSE) medido a través un índice, previamente validado en México, que los clasifica en 5 niveles: pésimo, malo, regular, bueno y excelente, de acuerdo con las condiciones socioeconómicas de la vivienda (disponibilidad de agua potable y drenaje, material del piso, nivel de hacinamiento) y la escolaridad del jefe de familia.<sup>31</sup> En relación con la condición clínica, el estado nutricional fue medido con base al déficit de peso para la talla mediante el puntaje Z de acuerdo al número de desviaciones estándar (DE) por debajo del percentil esperado como mínimo normal; considerándose normo-nutrición <1.5 DE, desnutrición de primer grado 1.5-2.5 DE, desnutrición de segundo grado 2.5-3 DE, y desnutrición de tercer grado >3.1 DE.<sup>32</sup> Se registró la presencia de infección clínica concomitante, así como la presencia de otra enfermedad crónica previamente diagnosticada (cardiopatía congénita, síndrome de Down, Inmunodeficiencia, hipotiroidismo, entre otras) en todos los pacientes. Se evaluaron los síntomas y signos relacionados con la LLA como presencia de síndrome anémico, síndrome hemorrágico, síndrome febril. Se definió como enfermedad extramedular masiva a la presencia de adenomegalias masivas, esplenomegalia, hepatomegalia, (detectadas clínicamente); infiltración al sistema nervioso central (mediante la evaluación celular obtenido mediante el cito centrifugado de líquido cefalorraquídeo), infiltración al mediastino (mediante telerradiografía de tórax) o a piel y tegumentos, corroborada por biopsia. De los estudios de laboratorio iniciales se consignó el nivel de hemoglobina, la cuenta leucocitaria y de plaquetas, nivel de ácido úrico y de deshidrogenada láctica (DHL), así como transaminasas. El estudio del inmunofenotipo de las células leucémicas para definir estirpe celular B o T y el cariotipo en médula ósea, sólo se realizaron en 203 y 40 pacientes, respectivamente. No se incluyó el estudio molecular para identificar los diferentes tipos de translocaciones relacionadas al pronóstico dado (que la mayoría se encontraron limitados a las posibilidades de su pago económico). Una vez completado el diagnóstico clínico integral, los pacientes fueron clasificados para recibir tratamiento de inducción

a la remisión de acuerdo a los criterios de la NCI's Risk Clasificación Workshop<sup>33</sup> que propone la edad y carga leucocitaria, como principales factores para clasificar los pacientes con LLA; el riesgo estándar correspondió al grupo con edades de 1-9 años con carga leucocitaria < 50,000/mm<sup>3</sup> riesgo alto al grupo con edad > 10 años y/o con carga leucocitaria ≥ 50,000/mm<sup>3</sup>.

Los pacientes del primer grupo recibieron tratamiento de inducción a la remisión con vincristina 1.5 mg/m<sup>2</sup>/día, los días 1, 8, 15, 22; prednisona 40 mg/m<sup>2</sup>/día los días 1-28; asparaginasa 10 mil UI/m<sup>2</sup>/ días 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 17, 19 (tratamiento 1). Algunos de estos pacientes recibieron además doxorubicina 25 mg/m<sup>2</sup>/día, los días 1, 8; y citarabina más etopósido a 300 mg/m<sup>2</sup>/día cada una, los días 22, 25, 29 (tratamiento 2). Existió un tercer grupo de tratamiento en pacientes que por su condición clínica grave (hiperleucocitosis, síndrome de vena cava superior, síndrome de lisis tumoral, etc.), recibieron tratamiento adicional con ciclofosfamida 1 gr/m<sup>2</sup>/día como dosis de citorreducción en búsqueda de resolución de la urgencia oncológica y continuaron con su esquema de inducción a la remisión con el esquema anterior con dosis única de doxorubicina 30 mg/m<sup>2</sup>/día 14.

Un grupo de pacientes debido a sus condiciones hemodinámicas o metabólicas de gravedad, fallecieron antes de que fuera posible el inicio de tratamiento con quimioterapia. La causa inmediata de la muerte fue consignada en todos los casos. La respuesta al tratamiento de quimioterapia de inducción fue valorada clínicamente y por medio del estudio morfológico del aspirado de la médula ósea los días 14 y 28. Asimismo, las complicaciones presentadas por cada paciente, relacionadas o no con el tratamiento quimioterápico, fueron evaluadas.

El análisis estadístico de las variables clínico-demográficas se realizó en 4 etapas: el primer paso consistió en realizar un análisis bivariado con base en cálculo del riesgo relativo (RR); y se contrastó cada una de las variables independientes contra la presencia de vida o muerte al término de la inducción a la remisión (días 28-36). Se consideraron variables significativas, aquellas que presentaron un RR ≥ 1.5 y una  $p \leq 0.05$ . En el segundo paso se construyó una estratificación pronóstica<sup>34,35</sup>, donde fueron incluidas solo las variables significativas. Se empleó un análisis de regresión logística múltiple (RLM) al interior de cada subgrupo de las siguientes variables: 1) características demográficas y socioeconómicas, 2) condiciones clínicas del paciente, 3) síntomas generales de la enfermedad, 4) enfermedad en etapa avanzada (extramedular), 5) parámetros paraclínicos, 6) características inmunogenéticas y 7) variables relacionadas al tratamiento. Las variables que resultaron nuevamente significativas en

este análisis fueron incluidas en un segundo análisis de regresión binaria logística (RBL), empleando el método Forward Step-Wise<sup>36</sup> para determinar el peso de cada variable en el desenlace estudiado. El tercer paso consistió en asignar una puntuación equivalente a su coeficiente obtenido en la última RBL a las variables estadísticamente significativas para construir un índice pronóstico. En el cuarto paso se aplicó el índice pronóstico construido, sobre el análisis de cada paciente, con lo que se obtuvo una puntuación final y se determinó su relación con la presencia de muerte. En ambas regresiones logísticas se utilizó  $p \leq 0.05$  como valor de las variables significativas. El paquete estadístico utilizado fue el SPSS versión 10.0.

## ▷ RESULTADOS

Doscientos cincuenta y seis pacientes pediátricos fueron analizados en esta serie. Sus características se muestran en la **tabla 1**. El estudio morfológico celular de la médula ósea, de acuerdo a los lineamientos de la FAB,<sup>30</sup> mostró

que 80 % de leucemias fueron de tipo L1, 18% de tipo L2 y 2% de tipo L3. De un total de 158 pacientes clasificados como leucemias de alto riesgo, 27 presentaron condiciones clínicas correspondientes a urgencia oncológica y fueron tratados con poliquimioterapia el primer día de su ingreso. 107 pacientes fueron clasificados con leucemias de riesgo estándar y recibieron tratamiento en promedio los primeros 3 días posteriores a su ingreso.

Cuarenta y cuatro pacientes presentaron muerte temprana (16.6%). Hubo un grupo de 6 pacientes en los que por sus condiciones hemodinámicas o metabólicas al ingreso hospitalario (insuficiencia renal aguda secundaria a síndrome de lisis tumoral, choque cardiogénico, hemorragia en SNC con edema cerebral severo), no fue posible iniciar tratamiento con quimioterapia y fallecieron en las primeras 48 horas. Dieciséis pacientes que iniciaron tratamiento, fallecieron en los primeros 7 días del ingreso, debido principalmente a choque séptico, hemorragia masiva y complicaciones metabólicas. Veintidós pacientes fallecieron entre la segunda y cuarta semana, debido principalmente a choque séptico o pancreatitis.

Al realizar el análisis bivariado de los pacientes, se observó un incremento del riesgo de muerte temprana asociado a las siguientes características clínico-demográficas: género femenino RR de 1.83 (los intervalos de confianza correspondientes se muestran en la **tabla 1**), NSE malo/pésimo RR de 3.7, desnutrición de II y III grado RR de 4.31, presencia de enfermedades intercurrentes RR de 5.14, infección aguda concomitante RR de 4.03, adenomegalias masivas RR de 15.48, esplenomegalia masiva RR de 15.69, hepatomegalia masiva RR de 7.31, infiltración a piel RR de 7.53, a SNC RR de 5.84, y a mediastino RR de 4.29; así como carga leucocitaria  $>75$  mil/mm<sup>3</sup> RR de 3.15, elevación del nivel de DHL 3 o más veces de la cifra normal para cada unidad hospitalaria RR de 3.4, elevación de transaminasas 3 o más veces de la cifra normal para cada unidad hospitalaria RR de 2.78. Posteriormente, se realizó el análisis de RLM al interior de cada grupo de variables (**tabla 2**), observándose que el nivel socioeconómico malo/pésimo mostró importante influencia al obtenerse una probabilidad (OR) de 4.689 (IC95% 1.56-14.04). Del grupo de variables relacionadas con la comorbilidad se destacan el efecto de la presencia de infecciones graves o severas concomitantes, con OR 5.671 (IC2.66-12.06), de desnutrición moderada-severa (OR 4.6 IC4.21-9.85) y de enfermedades crónicas intercurrentes como cardiopatía congénita e hipotiroidismo con OR 6.03 (IC 1.12-32.28). En cuanto a las variables clínicas de enfermedad en etapas avanzadas, se detectaron como

**Tabla 1.**  
Características de 265 pacientes pediátricos con LLA con y sin desenlace fatal.

Variable	Exβ (OR)	IC 95%	p
<b>1. Características generales</b>			
a) Género (femenino)	2.165	1.05-4.23	0.024
b) Nivel socioeconómico(NSE)			
• Bueno-Excelente			
• Regular	2.175	0.631-7.498	0.219
• Malo-Pésimo	4.689	1.56-14.04	0.006
<b>2. Comorbilidad diagnóstico</b>			
a) Infección documentada	5.671	2.66-12.064	<0.0001
b) Desnutrición moderada-severa	4.606	4.21-9.85	<0.0001
c) Enfermedad concomitante <sup>a</sup>	6.036	1.128-32.288	0.036
<b>3. Condición clínica al diagnóstico</b>			
a) Adenomegalias masivas	8.829	2.77-28.05	<0.0001
b) Esplenomegalia masiva	10.40	3.61-29.95	<0.0001
c) LCR positivo	6.41	1.54-26.62	0.010
<b>4. Condición paraclínica</b>			
a) Leucocitos $\geq 75$ mil/mm <sup>3</sup>	2.059	1.34-3.144	<0.0001
b) Plaquetas $\leq 20$ mil/mm <sup>3</sup>	1.43	1.1-3.869	0.020
<b>5. Variables relacionadas al tratamiento inicial</b>			
a) Complicaciones	3.8	1.89-7.64	0.002
b) Citorreducción	3.97	1.63-9.65	<0.0001

<sup>a</sup> Cardiopatía congénita, hipotiroidismo, PCI, síndrome de Down.

<sup>1</sup> Numerador: total de pacientes que fallecieron, denominador total de paciente con la variable evaluada.

<sup>2</sup> Elevación  $\geq 3$  veces el nivel basal del laboratorio donde fue realizado el estudio.

<sup>3</sup> Se excluyeron los pacientes que fallecieron sin recibir tratamiento oncológico.

**Tabla 2.**

Resultados de la primera regresión logística múltiple realizada al interior de cada grupo de variables en pacientes pediátricos con LLA en relación con la presencia de muerte temprana.

Variable		Defunción		RR (IC95%)	P(x2)
<b>Características demográficas</b>					
Género	Masculino	18/148	12%	1	
	Femenino	26/117	22%	1.83(0.05-3.17)	0.029
Edad	0-5 años	18/100	18%	1	
	6-10 años	14/106	13.2%	0.73(0.39-1.4)	0.34
	11-16 años	12/59	20.3%	1.13(0.59-2.18)	0.71
<b>Nivel socioeconómico</b>					
	Bueno-excelente	4/63	6.3%	1	
	Regular	9/70	16.3%	2.03(0.6-6.25)	0.2
	Malo-pésimo	31/132	23.5%	3.7(1.36-10.03)	<0.0001
<b>Condiciones generales</b>					
	Sin desnutrición y grado 1	19/201	9.4%	1	
	Desnutrición grado II III	25/64	39%	4.31(2.55-7.28)	<0.0001
	Sin infección	14/186	7.5%	1	
	Con infección	30/79	37.9%	4.03(2.24-7.260)	0.001
Enfermedad concomitante	No	38/255	14.9%	1	
	Sí	6/10	60%	5.14(2.89-9.15)	<0.0001
<b>Manifestaciones clínicas</b>					
Síndrome anémico	Ausente	9/74	12%	1	
	Presente	35/191	18.3%	1.51(0.76-2.98)	0.22
Síndrome hemorrágico	Ausente	21/147	14.2%	1	
	Presente	23/118	19%	1.43(0.83-2.49)	0.19
Síndrome febril	Ausente	23/122	18.9%	1	
	Presente	21/143	14.7%	0.78(0.45-1.34)	0.36
<b>Enfermedad extramedular masiva</b>					
Adenopatías	No	4/161	2.5%	1	
	Sí	40/104	38.5%	15.48(5.7-41)	<0.0001
Hepatomegalia	Ausente	8/164	4.2%	1	
	Presente	36/101	35.6%	7.31(3.54-15.09)	<0.0001
Esplenomegalia	Ausente	5/177	2.8%	1	
	Presente	39/88	44.3%	15.69(6.41-38.4)	0.000
Infiltración a piel	Negativa	40/261	15.3%	1	
	Positiva	4/4	100%	7.53(5.6-10)	<0.0001
Infiltración a SNC	Negativa	32/249	12.9%	1	
	Positiva	12/16	75%	5.84(3.8.-8.97)	0.000
Infiltración mediastinal	Ausente	35/250	14%	1	
	Presente	9/15	60%	4.29(2.56-7.17)	<0.0001
<b>Laboratorio</b>					
HB (gr%)	10.1.o+	7/33	21%	1	
	5.1-10	24/160	15%	0.71(0.33-1.5)	0.37
	2-5.0	13/72	18%	0.85(0.37-1.9)	0.70
Leucocitos/mm <sup>3</sup>	≤25 mil	15/145	10.3%	1	
	25001-75000	14/74	18.9%	1.83(0.93-3.58)	0.07
	≥ 75.001	15/46	32.6%	3.15(1.67-5.94)	0.0003
Plaquetas/mm <sup>3</sup>	≥20,000	24/177	13%	1	
	≤19,999	20/88	22.7%	1.81(1.02-3.23)	0.045
Nivel de Ácido úrico <sup>2</sup>	Normal	15/114	13.2%	1	
	Elevado	29/151	19.2%	1.46(0.82-2.59)	0.19
Nivel DHL <sup>2</sup>	≤1500 UI	30/233	12.8%	1	
	≥1501 UI	14/32	43%	3.4(2.03-12.5)	0.0001
PFH2	Normales	27/216	12.5%	1	
	Elevadas	17/49	34.6%	2.78(1.6.-4.7)	<0.0001
<b>Inmunogenéticos</b>					
Inmunofenotipo	Estirpe B	21/155	13.5%	1	
	No tiene	12/62	19.3%	1.43(0.75-2.72)	0.28
	Estirpe T	11/48	22.9%	1.69(0.88-3.25)	0.1
Cariotipo	Normal	4/28	14%	1	
	No medible	37/225	16.4%	1.3(0.4-3.6)	0.48
	Anormal	3/12	25%	1.75(0.4-6.6)	0.34
<b>Tratamiento<sup>3</sup></b>					
Tipo de tratamiento	Estándar	8/107	6.5%	1	
	Alto riesgo	18/125	14.4%	1.93(0.87-4.25)	0.09
Alto riesgo + urgencia oncológica		12/27	44.4%	5.9(2.7-13.08)	
	Complicaciones				
	No	10/167	5.9%	1	<0.0001
	Sí	28/92	30.8%	5.9(2.7-10)	<0.0001

variables significativas la presencia de adenomegalias masivas, esplenomegalia masiva e infiltración al SNC con LCR positivo, con OR de 8.82 (IC 2.77-28), 10.4 (3.6-29.9) y 6.41 (1.54-26), respectivamente. Del grupo de variables relacionadas a la condición paraclínica, sólo la cuenta leucocitaria > 75 mil/mm<sup>3</sup> fueron significativas (OR de 2.05, IC 1.34-3.14). Al evaluar la influencia del tratamiento asociada al evento de la muerte temprana, se observó que aquellos pacientes con indicadores enfermedad grave que requirieron quimioterapia urgente a su diagnóstico debido a urgencia oncológica, tuvieron un mayor riesgo de muerte (OR de 3.97, IC 1.63-9.65). Todas estas variables fueron incluidas en un segundo análisis de RLM de tipo binomial (**tabla 3**), identificando el nivel socioeconómico malo-pésimo (OR de 10.813), las infecciones severas concomitantes (OR de 3.236), la desnutrición moderada/severa (OR de 3.75), las enfermedades crónicas intercurrentes (OR de 6.57) y la enfermedad extramedular masiva (OR de 10.45, 10.58, 18.0 para adenomegalia masiva, esplenomegalia masiva y LCR positivo, respectivamente) asociadas con la muerte temprana en pacientes pediátricos con LLA. Este segundo análisis, descartó el efecto del género de las condiciones paraclínicas y de las variables relacionadas al tratamiento inicial en el desenlace, como características significativas de asociación.

Para crear un índice y obtener una estratificación pronóstica, se asignó una puntuación ponderada para cada una de estas variables significativas, de acuerdo al valor del coeficiente  $\beta$  obtenido en esta última regresión, con rango de 0-12, de 0 en ausencia de ellas, de 12 con valores máximos del valor del coeficiente  $\beta$ , y valores intermedios de acuerdo a sus correspondientes del coeficiente  $\beta$  (**tabla 4**). Por último, se aplicó esta estratificación pronóstica de manera retrospectiva a cada

uno de los pacientes con LLA de esta serie, para estimar el riesgo de muerte temprana. Los 265 pacientes pediátricos de esta serie, se distribuyeron en 4 grupos: el primer grupo, con puntuación de 0 a 3 incluyeron a 161 pacientes de los cuales fallecieron solamente 1.2% de ellos; el segundo grupo incluyó 68 pacientes con puntuación de 3.5-6 de los cuales fallecieron 16%; el tercer grupo incluyó 27 pacientes con puntuación de 6.5-9 de los cuales fallecieron 81.4%; y el cuarto grupo incluyó nueve pacientes con puntuación de 9.5-12, de los cuales fallecieron 100% (**tabla 5**). La distribución de los pacientes con LLA que presentaron muerte temprana, se asoció con puntuaciones elevadas de este índice predictivo. Esta relación de puntuación progresiva con porcentajes progresivos de muerte temprana, demuestra su validez en la estratificación pronóstica de muerte temprana en pacientes pediátricos con LLA.

## ► DISCUSIÓN

La estratificación pronóstica surge de la necesidad del clínico para identificar grupos con la misma enfermedad, pero con distinto pronóstico. Ha sido utilizada eficazmente para predecir el pronóstico en pacientes con padecimientos neoplásicos y no neoplásicos, incorporando los diversos factores de comorbilidad que influyen en él.<sup>34,35</sup> Proponemos un índice de estratificación pronóstica de muerte temprana en pacientes pediátricos con LLA, basada principalmente en la evaluación clínica del paciente al momento del ingreso, reconociendo al paciente como un todo y no sólo como una entidad patológica. Este índice puede ser aplicado empleando los recursos disponibles en nuestro medio, con el fin de detectar los pacientes con mayor probabilidad de fallecer tempranamente. El

**Tabla 3.**

Resultados de la regresión binaria logística en pacientes con LLA, de acuerdo a las variables significativas en la regresión logística múltiple previa.

Variable	Exp $\beta$ (OR)	IC 95% (exp $\beta$ )	p	Coefficiente $\beta$
1. Nivel socioeconómico				
1.1 Nivel socioeconómico regular	1.38	1.139-8.017	0.023	0.324
Nivel socioeconómico malo-pésimo	10.813	17.66-1043	<0.0001	2.381
2. Infección	3.236	1.099-9.53	0.033	1.174
3. Desnutrición	3.752	1.784-11.893	<0.0001	1.322
4. Otra patología agregada	6.578	1.28-32.28	0.036	1.174
5. Adenomegalias masivas	10.453	2.86-38.207	<0.0001	2.347
6. Esplenomegalia masiva	10.58	2.932-38.21	<0.0001	2.359
7. LCR positivo	18.032	2.17-149.2	0.007	2.892

**Tabla 4.**

Propuesta de índice pronóstico de mortalidad temprana en pacientes pediátricos con LLA, utilizando la puntuación asignada equivalente al coeficiente  $\beta$  obtenido en la segunda regresión binaria logística.

Variable	Equivalente del coeficiente $\beta$
<b>Nivel socioeconómico</b>	
Regular	1
Malo-Pésimo	4
<b>Comorbilidad al dx</b>	
Infección	2
Desnutrición	2
Otra patología de base	2
<b>Enfermedad extramedular</b>	
Adenomegalia masiva	4
Esplenomegalia masiva	4
LCR positivo	6

índice de mortalidad en pacientes pediátricos por LLA a nivel nacional es elevado si se compara con los índices de muerte en países desarrollados.<sup>1,2,5-12</sup> Existen reportes de estudios realizados en Estados Unidos, que indican diferencias raciales en el pronóstico de pacientes con LLA y su relación con el estado socioeconómico, identificando un pobre pronóstico para aquellos de raza hispana.<sup>37-41</sup> Si bien los indicadores biológicos inherentes a la enfermedad pueden ser consideradas similares a las reportadas en la literatura, un elevado número de nuestros pacientes ingresó con enfermedad extramedular masiva y altas cargas leucocitarias, es decir, enfermedad en etapa avanzada, con alteraciones metabólicas y hemodinámicas que provocan desbalances severos de la homeostasis y son considerados como emergencias o urgencias oncológicas, incluso algunos de ellos fallecieron antes de poder iniciar el tratamiento oncológico. En otras ocasiones, este tipo de pacientes cursan también con infecciones y desnutrición severas, lo que implica que al recibir tratamientos inmediatos de quimioterapia intensa, se les coloca en condiciones de riesgo alto para las complicaciones del tratamiento, muy diferentes a las que viven pacientes similares en países desarrollados.

Estas distintas condiciones de riesgo pueden estar provocadas por múltiples factores, como el retardo en el diagnóstico y de referencia oportuna, la presencia de desnutrición y el nivel socioeconómico bajo o pésimo. Estas variables han sido estudiadas en países en vías de desarrollo en forma aislada en búsqueda de su valor pronóstico en la sobrevivida a largo plazo y presencia de recaída.<sup>19-29</sup> El retardo en el diagnóstico y referencia oportuna pueden verse influenciados por la baja disponibilidad de recursos

**Tabla 5.**

Aplicación del índice en forma retrospectiva en 265 casos de LLA y su predicción de mortalidad de acuerdo a la puntuación total obtenida con el índice creado.

Estrato (puntuación total)	Defunción <sup>a</sup>	%
I. 0-3	2/161	1.2%
II. 3.5-6	11/68	16%
III. 6.5-9	22/27	81.4
IV. 9.5-12	9/9	100%

<sup>a</sup> Numerador = pacientes que fallecieron. Denominador = total de pacientes con dicha puntuación.

humanos y materiales, incluyendo infraestructura hospitalaria inadecuada para el tratamiento especializado de pacientes con cáncer, que en nuestro país se encuentra centralizada en las grandes ciudades, las cuales ocasionalmente se localizan a 4 horas o más del domicilio del pacientes. Las características culturales propias de la población y el no contar con los recursos económicos suficientes, limitan aún más el acceso a estos servicios especializados de salud. Por otro lado, el contar con un nivel socioeconómico bueno, permite al paciente trasladarse, obtener atención médica especializada y ser beneficiados con antibióticos, factores estimulantes de colonias e incluso hemoderivados, que da como resultado un tratamiento oportuno de situaciones como la neutropenia febril, disminuir el riesgo de choque séptico y por ende de muerte. La presencia de desnutrición, por sí sola, condiciona mayor riesgo de enfermedades infecciosas y disminuye la tolerancia al tratamiento con quimioterapia, lo que incrementa el riesgo de complicaciones secundarias al mismo; además, la desnutrición puede estar asociada a un nivel socioeconómico bajo o pésimo, el cual a su vez, incrementa el riesgo de procesos infectocontagiosos.<sup>18-21,25</sup>

En nuestro estudio construimos un índice pronóstico de muerte temprana que incluye cuatro estratos según la puntuación obtenida con estas variables clínico-demográficas. Los pacientes que presentaron simultáneamente enfermedad extramedular masiva, incluyendo infiltración a SNC, desnutrición e infección concomitantes además de un nivel socioeconómico bajo, se asociaron con elevada mortalidad temprana. Identificamos dos grupos intermedios con moderada/mínima mortalidad temprana que se asociaron solamente con algunas de las características anteriormente mencionadas; y un grupo en el cual no se presentó ninguna de estas características cuyo riesgo de muerte fue relativamente bajo.

Consideramos que si bien las diferencias socioeconómicas, la desnutrición e infecciones son factores que no pueden ser modificados por nosotros al momento del diagnóstico, debemos establecer algunas estrategias específicas de tratamiento como el de iniciar terapia con corticoides neoadyuvantes en los casos de emergencia/urgencias oncológicas, junto con la aplicación de cuidados de terapia intensiva (detección y tratamiento oportuno de cualquier complicación) en pacientes con los factores de riesgo mencionados. Asimismo, es necesario incidir en la necesidad urgente de establecer políticas de salud encaminadas a fomentar el diagnóstico temprano y referencia oportuna mediante educación continua a médicos de primer y segundo nivel, un mayor acceso y cobertura de la población a los servicios de salud especializados, así como la descentralización de los mismos y asignación de recursos económicos suficientes, junto con la educación en salud de la población, con el fin de disminuir la mortalidad infantil por cáncer tanto en forma temprana como tardía.

## ► CONCLUSIÓN

La estratificación pronóstica de mortalidad temprana en niños con leucemia aguda linfoblástica que proponemos, es una herramienta para la identificación de las variables clínico-demográficas asociadas a ella. El estudio demuestra que el evento de la mortalidad temprana en pacientes pediátricos con LLA está relacionada con el retardo en el adecuado diagnóstico, bajas condiciones socioeconómicas y de educación médica de los familiares del paciente, así como con la limitada disponibilidad de recursos económicos, humanos y de infraestructura del Sector Salud.

## Agradecimientos

Al Dr. Víctor Valdespino por su valiosa colaboración en la redacción de este manuscrito.

## Bibliografía

1. La Vecchia C, Levi F, Lucchini F *et al.* Trends in childhood cancer mortality as indicators of the quality of medical care in the developed world. *Cancer* 1998;83(10):2223-7.
2. Linet M, Ries L, Smith M *et al.* Cancer surveillance series: recent trends in childhood cancer incidence and mortality in the United States. *J Natl Cancer Inst* 1999;91(12):1051-8.
3. Abdulaev Fikrat, Rivera-Luna R. Pattern of childhood Cancer mortality in Mexico. *Arch Med Res* 2000;31(5):526-31.
4. Dirección General de Epidemiología. Sistema estadístico y epidemiológico de defunciones, 1998-2002 Secretaría de Salud. Registro histopatológico de neoplasias malignas en México. Secretaría de Salud, México, 2004.
5. Hamre MR, Williams J, Chuba P. Early deaths in childhood cancer. *Med Pediatr Oncol* 2000;34(5):343-7.
6. Incidence of and mortality from acute lymphocytic leukemia, 1980-1999. *J Natl Cancer Inst* 2003;95(8):578.
7. Kunze U, Waldohr T, Haidinger G. Childhood cancer mortality in Austria 1980-1992. *Eur J Epidemiol* 1997;13(1):41-4.
8. Attarbaschi A; Mann G; Dworzak M; Urban C; Fink FM; Dieckmann K *et al.* Austrian Cooperative Study Group. Treatment results of childhood acute lymphoblastic leukemia in Austria a report of 20 years experience. *Wien Klin Wochenschr* 2002;114(4):148-57.
9. Donadieu J, Auclerc MF, Baruchel A. Prognostic study of continuous variables (white blood cell count, peripheral blast cell count, haemoglobin level, platelet count and age) in childhood lymphoblastic acute leukemia. Analysis of a population of 1545 children treated by the French Acute Lymphoblastic leukemia group. *Br J Cancer* 2000;83(12):1617-22.
10. Chin CH, Evans WE. Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl Med* 1998;339:605-15.
11. Chin-H P, Evans W. Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* 2006;354(2):166-78.
12. Gustafsson G, Shimieglow K, Forestier E *et al.* Improving outcome through two decades in childhood ALL in the Nordic Countries: the impact of high dose methotrexate in the reduction of central nervous system irradiation. *Leukemia* 2000;14:2267-75.
13. Atra A, Richards SM, Chessells JM. Remission Death in acute lymphoblastic leukemia: a changing pattern. *Arch Dis Child* 1993;69(5):550-4.
14. Wheeler K, Chessells JM, Bayley CC. Treatment related deaths during induction and first remission in acute lymphoblastic leukemia: MCR UKA-LLX. *Arch Dis Child* 1996;74:101-7.
15. Al-Asiri RH, Mott MG, Oakhill A. Causes of death in a pediatric oncology unit. *Med Pediatr Oncol* 1992;20:315-20.
16. Chessells JM, Leiper AD. Infection during remission induction in childhood leukemia. *Arch Dis Child* 1980;55:118-23.
17. Rubnitz JE, Lensing S, Zhou Y *et al.* Death during induction therapy and first remission of acute leukemia in childhood: the St Jude Experience. *Cancer* 2004;101:1677-84.
18. Hurwitz CA Silverman LB Shoring MA *et al.* Substituting dexamethasone for prednisone complicates remission induction in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 2000;88:1964-9.
19. Gómez Almaguer D, Ruiz Argüelles G. Nutritional status and socioeconomic conditions as prognostic factors in the outcome of therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Int J Hematol* 1998;11:52.
20. Lobato Mendizabal E. Ruiz Argüelles G. Leucemia y desnutrición. La magnitud de la quimioterapia de mantenimiento como factor pronóstico de supervivencia en pacientes con leucemia aguda linfoblástica de riesgo habitual. *Rev Invest Clin* 1990;42:81-7.
21. Mejía Aranguré JM, Fajardo GA, Reyes Ruiz N *et al.* Malnutrition in childhood lymphoblastic leukemia: a predictor of early mortality during the induction-to-remission phase of the treatment. *Arch Med Res* 1999(30):150-3.
22. Hussein H, Sidhom I, Naga SA *et al.* Outcome and prognostic factors of acute lymphoblastic leukemia in children at the National Cancer Institute, Egypt. *J Pediatr Hematol Oncol* 2004;26(8):507-14.
23. Regho GS, Metzke K, Lorand Metzke I. Acute leukemia in Piaui: comparison with features observed in other regions of Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2003;36(3):331-337.
24. Viana MB, Fernandes RA, de Carvalho RI. Low socioeconomic status is a strong independent predictor of relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Int J Cancer Suppl* 1998;11:56-61.
25. Viana MB; Fernandes RA; de Oliveira BM; Murao M; de Andrade Paes C; Duarte A. Nutritional and socio-economic status in the prognosis of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2001;86(2):113-20.
26. Advani S, Pai S, Venzon D, Adde M, Kurkure PK, Nair CN *et al.* Childhood acute lymphoblastic leukemia managed in tertiary care center in a developing country. Acute Lymphoblastic Leukemia in India: an analysis of prognostic factors using a single treatment regimen. *Ann Oncol* 1999;10(2):167-76.
27. Regho GS, Metzke K, Lorand Metzke I. Acute leukemia in Piaui: comparison with features observed in other regions of Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2003;36(3):331-337.
28. Viana MB, Fernandes RA, de Carvalho RI. Low socioeconomic status is a strong independent predictor of relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Int J Cancer Suppl* 1998;11:56-61.
29. Viana MB; Fernandes RA; de Oliveira BM; Murao M; de Andrade Paes C; Duarte A. Nutritional and socio-economic status in the prognosis of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2001;86(2):113-20.
30. Benet JM, Catovsky D, Daniel MT. French-American-British (FAB) Cooperative group: the morphological classification of acute lymphoblastic leukemia. Concordance among observers and clinical correlations. *Br J Haematol* 1981;47:553.

31. Bronfman M, Guiscafre H, Castro V. La medición de la desigualdad: estrategia metodológica, análisis de las características socioeconómicas de una muestra. *Arch Invest Med (Méx)* 1998;19:351-60.
32. Dibley MJ, Stachling N, Nieburg P, Towbridge L. Interpretation of z-score anthropometric indicators derived from the international growth difference. *Am J Clin Nutr* 1987;46:749-62.
33. Smith J, Arthur D, Cammita B *et al.* Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1996;14:18.
34. Feinsntein AR. Clinical epidemiology. The architecture of clinical research. Philadelphia WB. Saunders, 1985.
35. Feinstein AR. Clinical Biostatistic XIV. The purposes of prognostic stratification. *Clin Pharmacol Ther* 1972;12:285-97.
36. Peng CY, Manz BD, Keck J. Modeling categorical variables by logistic regression. *Am J Health Behav* 2001;25(3):278-84.
37. Pollock BH, DeBaun MR, Camitta BM, Shuster JJ, Ravindranath Y, Pullen DJ *et al.* Racial differences in the survival of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2000;18(4):813-23.
38. Bhatia S. Influence of race and socioeconomic status on outcome of children treated for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Curr Opin Pediatr* 2004;16(1):9-14.
39. Pui, Ching-Hon MD, Sandlund John T MD, Pei Deqing MS, Rivera Gaston K. MD. Results of Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia in Black and White Children. *JAMA* 2003;290(15):2001-2007.
40. Lowe EJ, Ching-Hon Pui, Hancock M *et al.* Early complications in children with acute lymphoblastic leukemia presenting with hyperleukocytosis. *Pediatr Blood Cancer* 2005;45(1):10-15.
41. Usmani, G. Naheed MD. Pediatric Oncology in the third world. *Curr Opin Pediatr* 2001;13(1):1-9.

# GACETA MEXICANA DE ONCOLOGÍA

## INSTRUCCIONES PARA AUTORES

Las instrucciones para someter su manuscrito pueden ser vistas en la página web:

[www.smeo.org.mx](http://www.smeo.org.mx)

La **Gaceta Mexicana de Oncología** publica trabajos originales, artículos de revisión, notas clínicas, cartas al director y otros artículos especiales que describan nuevos hallazgos de particular significado referentes a todos los aspectos de la Oncología. Los manuscritos deben elaborarse siguiendo las recomendaciones del Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas (N Engl J Med 1997;336:309-15.), también disponibles en: <http://www.icmje.org> y se ajustan a las siguientes normas:

### Remisión de trabajos

- Enviar el manuscrito de acuerdo a las instrucciones, con tres copias en un sobre a: **Gaceta Mexicana de Oncología**, Tuxpan # 59 PH, Col. Roma Sur, C.P. 06760, México, DF, y de ser posible también por correo electrónico: [smeo@infosel.net.mx](mailto:smeo@infosel.net.mx) *incluyendo*:
- Carta de presentación.
- Listado de comprobaciones formales del trabajo.
- Formulario anexo de declaración de autoría y cesión de derechos.
- Disquete informático con el texto, especificando nombre del archivo y programa utilizado.

### Carta de presentación

En ella el autor explicará, en 3-4 líneas, cuál es la aportación original del trabajo que presenta.

### Tipos de artículos

- **Originales.** Podrán referirse a trabajos de investigación básica o clínica o cualquier otra contribución original en algunos de los aspectos de la Oncología. La extensión aproximada será de 15 páginas de texto y un máximo de 10 figuras, tablas, fotografías o gráficos (uno por página). Se recomienda que el número de autores firmantes no supere los seis. Las secciones se ordenan como sigue: página del título, resumen, *summary*, introducción, métodos, resultados, discusión, bibliografía, tablas, pies de figura y figuras.
- **Trabajos de Formación Continuada-Revisiones.** Se refiere a puestas al día de temas concretos de la especialidad o bien a revisiones de tema a propósito de una casuística. La extensión será aproximadamente de 10 páginas con cinco figuras, tablas, fotografías o gráficos. El número de firmantes no será superior a seis. Las secciones se ordenan como sigue: página del título, resumen, *summary*, introducción, casuística, discusión, bibliografía, tablas, pies de figura y figuras.
- **Notas clínicas.** Referidas a la descripción de casos clínicos infrecuentes cuya presentación aporte datos al conocimiento del tema. La extensión aproximada será de cinco páginas y no más de tres figuras o tablas. El número de autores firmantes no superará los cinco. Las secciones se ordenan como sigue: página

del título, resumen, *summary*, introducción, casuística, discusión, bibliografía, tablas, pies de figura y figuras.

- **Cartas al director.** Se referirán a artículos publicados recientemente en la revista y sobre los que se harán comentarios, objeciones o aportaciones personales. La extensión será de dos páginas, admitiéndose una tabla o figura. El número de firmantes no será más de dos y la bibliografía que en ella se aporte será la mínima indispensable, nunca superior a cinco citas.
- **Crítica de libros.** La revista publicará la crítica de los libros de Oncología que lleguen a su poder.
- **Noticias.** Se podrán remitir todas aquellas informaciones, anuncios, comentarios, etcétera, que puedan ser de interés para los miembros de la sociedad.

### Manuscrito

- El autor debe enviar tres juegos completos del manuscrito, mecanografiados a doble espacio en todas sus secciones (incluidas citas bibliográficas, tablas y pies de figura). Se emplearán páginas DIN-A4 (21.5 x 29.7 cm) dejando márgenes laterales, superior e inferior de 2.5 centímetros.
- Todas las páginas irán numeradas consecutivamente, empezando por la del título.
- **Abreviaciones:** éstas deben ser evitadas, exceptuando las unidades de medida. Evite el uso de abreviaciones en el título y en el resumen. El nombre completo al que sustituye la abreviación debe proceder el empleo de ésta, a menos que sea una unidad de medida estándar. Las unidades de medida se expresarán preferentemente en Unidades del Sistema Internacional (Unidades SI). Las unidades químicas, físicas, biológicas y clínicas deberán ser siempre definidas estrictamente.

### Página del título

- Figurará el título conciso, pero informativo, un título abreviado (máximo 40 caracteres), los nombres y apellidos de los autores, nombre de (los) departamento (s) y la (s) institución (es) a las que el trabajo debe ser atribuido y el reconocimiento de cualquier beca o apoyo financiero.
- Incluir el nombre completo, número de teléfono (fax y e-mail) y la dirección postal completa del autor responsable de la correspondencia y el material. Estos datos deben figurar en el cuadrante inferior derecho de esta primera página.

### Resumen y palabras clave

- Deberán aparecer en la segunda página. Se recomienda que el resumen de los artículos originales sea estructurado, es decir, que contenga los siguientes encabezados e información: objetivo, métodos, resultados y conclusiones con no más de 200 palabras.
- En la misma hoja debe aparecer una relación con las palabras clave. Las palabras clave (de tres a diez en total) complementan el título y ayudan a identificar el trabajo en las bases de datos. Se deben emplear términos obtenidos de la lista de encabezados de materias médicas (MeSH) del Index Medicus de la NLM de Estados Unidos. Disponible en: <http://www.ncbi.nih.gov/entrez/meshbrowser.cgi>

### Abstract y key words

• Es una traducción correcta del resumen al inglés. Se escribirá en una hoja aparte, donde también figure el título del trabajo y las key words, ambos igualmente en inglés.

### Introducción

• Debe mencionarse claramente los objetivos del trabajo y resumir el fundamento del mismo sin revisar extensivamente el tema. Citar sólo aquellas referencias estrictamente necesarias.

### Sujetos y métodos

• Debe describir la selección de los sujetos estudiados detallando los métodos, aparatos y procedimientos con suficiente detalle como para permitir reproducir el estudio a otros investigadores. Alguna información detallada de gran interés puede incluirse como anexo.

• Las normas éticas seguidas por los investigadores tanto en estudios en humanos como en animales se describirán brevemente. Los estudios en humanos deben contar con la aprobación expresa del comité local de ética y de ensayos clínicos, y así debe figurar en el manuscrito.

• Exponer los métodos estadísticos empleados. Los estudios contarán con los correspondientes experimentos o grupos control; caso contrario se explicarán las medidas utilizadas para evitar los sesgos y se comentará su posible efecto sobre las conclusiones del estudio.

### Resultados

• Los resultados deben ser concisos y claros, e incluirán el mínimo necesario de tablas y figuras. Se presentarán de modo que no exista duplicación y repetición de datos en el texto y en las figuras y tablas.

### Discusión

• Enfatizar los aspectos nuevos e importantes del trabajo y sus conclusiones. No debe repetirse con detalles los resultados del apartado anterior. Debe señalarse las implicaciones de los resultados y sus limitaciones, relacionándolas con otros estudios importantes. El contenido de esta sección ha de basarse en los resultados del trabajo y deben evitarse conclusiones que no estén totalmente apoyadas por los mismos. Se comentarán los datos propios con relación a otros trabajos previos, así como las diferencias entre los resultados propios y los de otros autores.

La hipótesis y las frases especulativas deben ser claramente identificadas.

### Agradecimientos

• Podrán reconocerse: a) contribuciones que necesitan agradecimiento pero no autoría; b) agradecimiento por ayuda técnica; c) agradecimiento de apoyo material o financiero, especificando la naturaleza de dicho apoyo, y d) relaciones financieras que pueden causar conflicto de intereses.

### Bibliografía

• Las citas bibliográficas se identificarán en el texto con la correspondiente numeración correlativa mediante números arábigos, en superíndice.

• Se escribirán a doble espacio y se numerarán consecutivamente en el orden de aparición en el texto.

• Las comunicaciones personales y los datos no publicados no deben aparecer en la bibliografía (se pueden citar entre paréntesis en el texto).

• Las abreviaturas de las revistas se ajustarán a las que utiliza el Index Medicus de la National Library of Medicine. Disponible en: <http://www.ncbi.nih.gov/entrez/jrbrowser.cgi>

### Ejemplo de citas correctas

#### Revistas:

1. Artículo normal (citar los autores cuando sean seis o menos; si son siete o más, citar los seis primeros y añadir "et al"):  
Cañas R, Kilbourne E. Oil ingestion and the Toxic-Oil syndrome: results of a survey of residents of the Orcasur neighbourhood in Madrid, Spain. *Int J Epidemiol* 1987 ;1:3-6.
2. Suplemento de revista:  
Mastri Ar, Neuropathy of diabetic neurogenic bladder. *Ann Intern Med* 1980;92(suppl 2):316-8.
3. Fascículo sin volumen:  
Baumeister AA. Origins and control of stereotyped movements. *Monogr Am Assoc Ment Defici* 1978;(3):353-84.

#### Libros y otras monografías:

4. Autor (es):  
McDowell Y, Newell C. *Measuring health: a guide to rating scales and questionnaires*. New York: Oxford University Press, 1987.
5. Capítulo de un libro:  
Abramson JH. Cross-sectional studies. En: Holland WW, Detels R, Knox G, Directores. *Oxford textbook of public health, volumen 3: Investigative methods in public health*. Oxford: Oxford University Press, 1985;89-100.
6. Tesis doctorales o conferencias publicadas:  
Youssef NM. School adjustment of children with congenital Heart disease [tesis doctoral]. Pittsburgh: Universidad de Pittsburgh, 1988.

#### Otros artículos:

7. Artículos de periódico:  
Yoloi J. Frontela no logró reproducir el síndrome tóxico en monos. *El Universal*, 17 Feb. 1988,23(col 1-4).
8. Material legal:  
Toxic Substances Control Act: *Audiencia S. 776 ante el Subcomité sobre el medio ambiente del Comité sobre Comercio del Senado*, 94 cong 1. a Sesión, 343(1975).
9. Archivo de computadora:  
Renal system [programa informático]. Versión MS-DOS. Edwardsville, KS: Medisim; 1988.

#### Material no publicado:

10. En prensa:  
Lillywhite HB, Donald JA, Pulmonary blood flow regulation in an aquatic snake. [en prensa]. *Science*.
11. Citas extraídas de internet:  
Cross P, Towe K K. A guide to citing Internet source [online]. Disponible en: [http://www.bournemouth.ac.uk/services/lis/LIS\\_Pub/harvards](http://www.bournemouth.ac.uk/services/lis/LIS_Pub/harvards).

### Tablas

• Irán numeradas de manera correlativa. Escritas a doble espacio, en hojas separadas, se identifican con un número arábigo

y un título en la parte superior. Deben contener las pertinentes notas explicativas al pie.

#### **Figuras, fotografías, gráficas, dibujos y otras ilustraciones**

- Deberán ser seleccionadas cuidadosamente, de modo que contribuyan a la mayor comprensión del texto. El tamaño será de 10 x 12 y 10 x 18 cm, con la calidad necesaria para su reproducción y en número adecuado según las normas de la introducción.
- Si se presentan microfotografías deberán incluirse el método de tinción y los aumentos empleados.
- Las fotografías en tamaño postal irán numeradas al dorso mediante etiqueta adhesiva con el nombre del primer autor y título del trabajo e indicaciones de la parte superior de la misma mediante una flecha.
- Las fotografías digitales vendrán en formato jpg/jpeg en disco o CD y por correo electrónico junto al trabajo en cuestión.
- Si desea la publicación en color de alguna de la fotografías, los gastos correrán a cargo del autor, previa solicitud de presupuesto al editor.
- Las figuras no repetirán datos y escritos en el texto.
- Los pies de figura se escribirán a doble espacio y las figuras se identificarán con números arábigos que coincidan con su orden de aparición en el texto. El pie contendrá la información necesaria para interpretar correctamente la figura sin recurrir al texto.

#### **RESPONSABILIDADES ÉTICAS**

- Cuando se describen experimentos que se han realizado en seres humanos se debe indicar si los procedimientos seguidos se conforman a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable (institucional o regional) y a la Declaración de Helsinki de 1975, revisada en 1983. Disponible en: [http://www.wma.net/s/policy/17-c\\_s.html](http://www.wma.net/s/policy/17-c_s.html). No se deben utilizar nombres, iniciales o números de hospital, sobre todo en las figuras. Cuando se describen experimentos en animales se debe indicar si se han seguido las pautas de una institución o consejo de investigación internacional, o una ley nacional reguladora del cuidado y la utilización de animales de laboratorio.
- Permiso de publicación por parte de la institución que ha financiado la investigación.
- La revista no acepta material previamente publicado. Los autores son responsables de obtener los oportunos permisos para reproducir parcialmente material (texto, tablas, fotografías o figuras) de otras publicaciones. Estos permisos deben solicitarse tanto al autor como a la editorial que ha publicado dicho material.
- *Conflicto de intereses.* La revista espera que los autores declaren cualquier asociación comercial que pueda suponer un conflicto de intereses en conexión con el artículo remitido.
- *Autoría.* En la lista de autores deben figurar únicamente aquellas personas que han contribuido intelectualmente al desarrollo del trabajo. Haber ayudado en la colección de datos o haber participado en alguna técnica no son por sí mismos criterios suficientes para figurar como autor. En general, para figurar como autor se deben cumplir los siguientes requisitos:

1. Haber participado en la concepción y realización del trabajo que ha dado como resultado al artículo en cuestión.

2. Haber participado en la redacción del texto y en las posibles revisiones del mismo.
3. Haber aprobado la versión que finalmente será publicada.

La **Gaceta Mexicana de Oncología** declina cualquier responsabilidad sobre posibles conflictos derivados de la autoría de los trabajos que se publican en la Revista.

#### **Consentimiento informado**

Los autores deben mencionar en la sección de métodos que los procedimientos utilizados en los pacientes y controles han sido tras la obtención de un consentimiento informado.

#### **TRANSMISIÓN DE LOS DERECHOS DE AUTOR**

Se incluirá con el manuscrito el anexo a estas normas firmado por todos los autores.

#### **PROCESO EDITORIAL**

Una vez evaluado en primera instancia por el Comité Editorial, todo manuscrito recibido es enviado a evaluadores externos, a los autores se le notificará su aceptación, rechazo o necesidad de cambios dentro de las primeras 6 semanas de haber recibido el manuscrito. La valoración seguirá un protocolo establecido a tal efecto y será anónima.

La **Gaceta Mexicana de Oncología** se reserva el derecho de realizar cambios o introducir modificaciones en el estudio, en aras de una mejor comprensión del mismo, sin que de ello se derive un cambio en su contenido.

Los manuscritos que sean aceptados para publicación en la revista quedarán en poder permanente de la **Gaceta Mexicana de Oncología** y no podrán ser reproducidos ni total ni parcialmente sin su permiso.

#### **INFORMACIÓN ADICIONAL**

1. La **Gaceta Mexicana de Oncología** da acuse de recibo de los trabajos remitidos.
2. *Corrección de pruebas.* Se enviará una prueba de composición del artículo al autor responsable de la correspondencia. La prueba se revisará cuidadosamente y se marcarán los posibles errores, devolviendo las pruebas corregidas a la redacción de la revista en un plazo de 48 horas. El Comité de Redacción se reserva el derecho de admitir o no las correcciones efectuadas por el autor en la prueba de impresión.
3. *Política editorial.* Los juicios y opiniones expresados en los artículos y comunicaciones publicados en la Gaceta son del autor(es), y no necesariamente aquéllos del Comité Editorial.

Tanto el Comité Editorial como la empresa editora declinan cualquier responsabilidad sobre dicho material. Ni el Comité Editorial ni la empresa garantizan o apoyan ningún producto que se anuncie en la revista, ni garantizan las afirmaciones realizadas por el fabricante sobre dicho producto o servicio. **Gaceta Mexicana de Oncología.** Instrucciones para autores