



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN INTRATUMORAL DEL CITOCROMO  
P450 EN SARCOMAS INFANTILES.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestra en Ciencias

PRESENTA:  
Q. F. B. CARMEN ARACELI TORRES ZÁRATE

Tutor principal  
DR. JESÚS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE

[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

Comité tutor  
DRA. GEORGINA GARZA-RAMOS      DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT

[Facultad de Medicina](#)

[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO. Octubre, 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## FÉ DE ERRATAS

Parte de este proyecto de tesis fue desarrollado con recursos y equipo disponible en el Laboratorio de Toxicología Genética del Instituto Nacional de Pediatría bajo la asesoría de la Dra. Araceli Vences Mejía y la Dra. María Dora Molina Ortiz.

Este estudio fue aprobado por los Comités de Investigación y de Ética del Instituto Nacional de Pediatría bajo el número de registro: 053/2015. Las muestras biológicas utilizadas en este proyecto fueron obtenidas bajo consentimiento del padre o tutor y/o bajo asentimiento del mismo paciente. En este trabajo se garantizó el anonimato de los pacientes y la protección de sus datos personales.

Parte importante de este proyecto de tesis fue realizado con apoyo financiero de los recursos fiscales 2014-2016 del Laboratorio de Toxicología Genética del Instituto Nacional de Pediatría y con recursos FOSISS 2015-2/CONACYT No. 262423.

Página 46

-Criterios de inclusión-

Dice: 4. Pacientes que hayan recibido tratamiento previo a la toma de muestra.

Debe de decir: 4. Pacientes que no hayan recibido tratamiento previo a la toma de muestra.

## ÍNDICE GENERAL

	<u>Página</u>
Índice de cuadros y figuras	3
Abreviaturas	6
Resumen	7
Introducción	
-Sarcomas de Tejido Blando No Rabdomiosarcomas	10
-Quimioresistencia	30
-Citocromo P450	31
Antecedentes	40
Antecedentes directos	43
Justificación	44
Hipótesis	45
Objetivos	46
Metodología	43
Resultados	55
Discusión de Resultados	80
Conclusiones	87
Referencias bibliográficas	88
Anexo I	94

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<u>Título</u>	<u>Página</u>
Figura 1	<b>Principales grupos diagnóstico según la Clasificación Internacional del Cáncer Infantil (ICCC).</b>	11
Figura 2	<b>Distribución de subtipos histológicos de STBNR estratificados en tumores metastásicos y no metastásicos.</b>	12
Figura 3	<b>Los sarcomas de tejido blando se forman en los tejidos blandos del cuerpo, como músculos, tendones, grasa, vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervios y el tejido que rodea las articulaciones.</b>	13
Figura 4	<b>Distribución de sitios de Tumores primarios para STBNR estratificados como metastásicos y no metastásicos</b>	14
Figura 5	<b>Sistema de Estratificación Histológica del Grupo de Oncología Pediátrica</b>	23
Figura 6	<b>Clasificación TNM para STBNR</b>	24
Figura 7	<b>Agrupación por etapas</b>	25
Figura 8	<b>Antineoplásicos utilizados en el tratamiento de los STBNR en el Instituto Nacional de Pediatría</b>	29
Figura 9	<b>Ciclo catalítico consenso para la activación de oxígeno y transferencia por el Citocromo P450.</b>	32
Figura 10	<b>Reacciones de activación o inactivación mediada por enzimas del CYP.</b>	33
Figura 11	<b>Características de algunas Isoenzimas del Citocromo P450</b>	41
Figura 12	<b>Isoenzimas del CYP450 que metabolizan a los antineoplásicos utilizados en el tratamiento de STBNR.</b>	42
Figura 13	<b>Integridad del RNA total extraído.</b>	50
Figura 14	<b>Localización del Tumor Primario.</b>	55
Figura 15	<b>Frecuencia de los subtipos histológicos en los 19 pacientes con STB.</b>	55
Figura 16	<b>Características de los pacientes reclutados.</b>	56
Figura 17	<b>Clasificación de los pacientes de acuerdo a su grupo clínico</b>	57
Figura 18	<b>La expresión génica relativa de CYP1B1 es mayor en el tejido tumoral en pacientes con STBNR.</b>	58
Figura 19	<b>No existe diferencia en la sobrevida sin enfermedad activa y expresión de CYP1B1.</b>	59

Figura 20	<b>Expresión proteica de la isoforma CYP1B1.</b>	60
Figura 21	<b>La expresión génica relativa de CYP2E1 es mayor en el tejido tumoral en 12 pacientes con STBNR y en todas las recaídas</b>	61
Figura 22	<b>No existe diferencia en la supervivencia sin enfermedad activa y expresión de CYP2E1.</b>	62
Figura 23	<b>La abundancia proteica de la isoforma CYP2E1 es mayor en las muestras de tejido tumoral que en las muestras adyacentes.</b>	63
Figura 24	<b>La expresión génica relativa de CYP2W1 es mayor en el tejido tumoral en 13 pacientes con STBNR y en la mayoría de las recaídas.</b>	64
Figura 25	<b>Supervivencia sin enfermedad activa y expresión de CYP2W1.</b>	65
Figura 26	<b>Expresión proteica de la isoforma CYP2W1.</b>	65
Figura 27	<b>La expresión génica relativa de CYP3A4 es mayor en el tejido tumoral en 12 pacientes con STBNR y en la mayoría de las recaídas.</b>	67
Figura 28	<b>No existen diferencias en la supervivencia sin enfermedad activa y expresión de CYP3A4.</b>	67
Figura 29	<b>La expresión proteica de la isoforma CYP3A4 es mayor en tejido tumoral.</b>	68
Figura 30	<b>La expresión génica relativa de CYP3A5 es mayor en el tejido tumoral en 9 pacientes con STBNR y en la mitad de las recaídas.</b>	69
Figura 31	<b>No existen diferencias en la supervivencia sin enfermedad activa y expresión de CYP3A5.</b>	70
Figura 32	<b>No existen diferencias significativas en la expresión proteica de la isoforma CYP3A5.</b>	70
Figura 33	<b>Valores de CT para cada isoforma del CYP normalizados con <math>\beta</math>-actina.</b>	71
Figura 34	<b>No se encuentran diferencias entre la asociación de la expresión génica y la abundancia proteica de CYP1B1 y el género femenino y masculino.</b>	72
Figura 35	<b>No se encuentran diferencias entre la asociación de la expresión génica y la abundancia proteica de CYP2E1 y los géneros masculino y femenino.</b>	73
Figura 36	<b>La abundancia proteica de CYP2W1 es mayor en el género femenino que en el masculino.</b>	73
Figura 37	<b>La abundancia proteica de CYP3A4 es mayor en el género femenino que en el masculino.</b>	74
Figura 38	<b>No se encuentran diferencias entre la asociación de la expresión génica y la abundancia proteica de CYP3A5 y los géneros masculino y femenino.</b>	74

Figura 39	<b>No se encuentran diferencias entre la asociación de la expresión génica y la abundancia proteica de CYP1B1 y la edad de los pacientes.</b>	75
Figura 40	<b>No se encuentran diferencias entre la asociación de la expresión génica y la abundancia proteica de CYP2E1 y la edad de los pacientes.</b>	75
Figura 41	<b>La abundancia proteica de CYP2W1 es mayor en los pacientes mayores de 9 años.</b>	76
Figura 42	<b>No se encuentran diferencias entre la asociación de la expresión génica y la abundancia proteica de CYP3A4 y la edad de los pacientes.</b>	76
Figura 43	<b>No se encuentran diferencias entre la asociación de la expresión génica y la abundancia proteica de CYP3A5 y la edad de los pacientes.</b>	77
Figura 44	<b>No se encuentran diferencias entre la asociación de la expresión génica y la abundancia proteica de CYP1B1 y el grupo clínico de los pacientes.</b>	77
Figura 45	<b>No se encuentran diferencias entre la asociación de la expresión génica y la abundancia proteica de CYP2E1 y el grupo clínico de los pacientes.</b>	78
Figura 46	<b>La abundancia proteica de CYP2W1 es mayor en los pacientes del grupo clínico IV.</b>	78
Figura 47	<b>La abundancia proteica de CYP3A4 es mayor en los pacientes del grupo clínico IV.</b>	79
Figura 48	<b>No se encuentran diferencias entre la asociación de la expresión génica y la abundancia proteica de CYP3A5 y el grupo clínico de los pacientes.</b>	

## ABREVIATURAS

AhR	Receptor Aril hidrocarburo
ARNT	Traslador nuclear del receptor de arilos.
cDNA	Ácido Desoxiribonucleico complementario
CYP	Citocromo P450
FTO	Fuera de Tratamiento Oncológico
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GTPasa	Guanosina Trifosfatasa
HAHs	Hidrocarburos Aromáticos Halogenados
HPA	Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos
ICCC	Clasificación Internacional del Cáncer en la Infancia
INP	Instituto Nacional de Pediatría
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF-1	Neurofibromatosis tipo I
OMS	Organización Mundial de la Salud
PVC	Policloruro de Vinilo
PXR	Receptor X Pregnano
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RMS	Rabdomiosarcoma
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Especies Reactivas del Oxígeno
RT	Reverso Transcripción
RXR $\alpha$	Receptor X Retinoide $\alpha$
SEER	Vigilancia, Epidemiología y Resultados Finales
ssDNA	Ácido desoxirribonucleico de cadena sencilla
STB	Sarcomas de Tejido Blando
STNBR	Sarcomas de Tejido Blando No Rabdomiosarcoma
TBS	Buffer Tris Salino
TMNVP	Tumor maligno del Nervio de la Vaina Periférico
TNEP	Tumor Neuroectodérmico Primario
TNM	Sistema de clasificación: Tumor, Nódulos Linfáticos, Metástasis
TSNC	Tumores del Sistema Nervioso Central
XREs	Elementos de Respuesta a Xenobióticos



## RESUMEN

Los sarcomas de tejido blando no rhabdomyosarcoma infantiles (STBNR) constituyen un grupo de tumores malignos que se originan en el tejido primitivo mesenquimatoso y representan el 7% de todos los tumores infantiles; en México estos tumores ocupan la décima causa de cáncer pediátrico. El tratamiento de STBNR abarca tanto una estrategia combinada de control local (mediante cirugía y/o radioterapia) como sistémico con quimioterapia, aunque en general los STBNR son poco quimiosensibles. Los antineoplásicos utilizados en la quimioterapia son metabolizados principalmente por el sistema enzimático del Citocromo P450 (CYP), el cual por su acción generalmente forma metabolitos intermedios con poca o nula actividad citotóxica. Recientemente se ha evidenciado la sobre-expresión intratumoral de enzimas CYPs en distintos tumores sólidos, lo cual no solamente podría participar en el fenómeno de quimioresistencia sino también en el proceso de carcinogénesis química. Por lo que el tipo, cantidad y distribución de isoenzimas CYP dentro del tumor podría ser determinantes no sólo para el desarrollo del mismo sino también como factor pronóstico de tratamiento. Por lo cual el objetivo del presente trabajo fue determinar el perfil de expresión génica y proteica de las isoenzimas CYP1B1, CYP2E1, CYP2W1, CYP3A4 y CYP3A5 en tejido tumoral y tejido adyacente de pacientes con STBNR. Métodos: De un total de 19 pacientes con diagnóstico de STBNR sin tratamiento previo con quimioterapia se obtuvieron biopsias tanto del foco tumoral como de tejido adyacente, los cuales fueron preservados en RNA later®. Posteriormente de cada muestra se obtuvo el RNA y las proteínas mediante la técnica de extracción con Trizol. La expresión de los genes CYP de nuestro interés de cada biopsia se determinó mediante la técnica de q-PCR, usando  $\beta$ -actina como control endógeno. Mientras que la determinación proteica de las enzimas CYP se realizó mediante ensayos de Western blot, y posteriormente se hicieron los análisis densitométricos correspondientes. Resultados: Se detectaron mayores niveles de expresión génica y proteica en las isoformas CYP1B1, CYP2E1, CYP3A4 y CYP3A5 en biopsias de tumor. En cuanto a CYP2W1 se detectó su expresión únicamente en biopsias tumorales. Conclusiones: Estos resultados coinciden con previos trabajos en donde han encontrado sobre-

expresión de enzimas CYP en otras neoplasias sólidas. En particular la sobre-expresión de las enzimas CYP3A4 y CYP3A5 en STBNR podría asociarse con el fenómeno de quimioresistencia encontrada en nuestros pacientes. Por otro lado, la expresión tumor-específica de CYP2W1 encontrada en STBNR podría ser un blanco terapéutico ideal para el desarrollo de pro-fármacos que sólo puedan ser activadas por este CYP intratumoralmente, y con ello minimizar la toxicidad sistémica.

## ABSTRACT

Soft tissue sarcomas (STS) are a heterogeneous group of solid tumors of mesenchymal origin and represent 7% of all childhood tumors. It can vary in their progression and response to treatment. Such treatment includes a combined strategies like surgery, radiotherapy and systemic chemotherapy, although in general the STS aren't chemosensitive. Chemoresistance have been related to intrinsic or acquired properties in cancer cells including overexpression of metabolizing enzymes known as cytochrome P450 (CYP). This overexpression may affect the therapeutic response to antineoplastic because the enzymes CYP metabolize more than 70% of the drugs used, generating intermediate metabolites with poor cytotoxic activity.

Assessed the expression of 5 representative CYPs (e.g. CYP1B1, CYP2E1, CYP2W1, CYP3A4, and CYP3A5) in cancer and adjacent paired tissues from pediatric STS patients and correlated it with clinical parameters.

From biopsies of 19 patients with STS diagnostic without previous chemotherapy, was obtained RNA and protein by Trizol extraction technique. Using real time quantitative RT-PCR, the gene expression pattern of CYP1B1, CYP2E1, CYP2W1, CYP3A4, and CYP3A5 were analyzed, protein expression was determined by Western blot.

The CYP2W1 expression was detected only in tumor tissues for that it can be considered specific-tumor. Higher levels of expression of CYP1B1, CYP2E1, CYP3A4 and CYP3A5 were detected in tumor tissue. The overexpression of CYP3A4 and CYP3A5 in tumor tissue was associated with increased chemoresistance.

These results accord with previous studies where found overexpression of CYP in other solid tumors. In particular, the overexpression of CYP3A4 and CYP3A5 in STS may be associated with the phenomenon of chemoresistance. The specific tumor expression of CYP2W1 in STS could be ideal for the development of pro-drugs that can only be activated by this CYP intratumoral, thereby minimizing systemic toxicity.

## INTRODUCCIÓN

### SARCOMAS DE TEJIDO BLANDO NO RABDOMIOSARCOMA

Cáncer es el nombre que se le da a un conjunto de enfermedades relacionadas que pueden afectar cualquier parte del organismo y cuya característica principal es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos (Instituto Nacional del Cáncer, 2016).

En la actualidad, el cáncer representa una de las más frecuentes causas de muerte en el mundo, con cerca de 6 millones de casos por año. De acuerdo al Informe Mundial del Cáncer de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2012 se registraron 14 millones de nuevos casos y 8.2 millones de muertes relacionadas con el cáncer; en México, particularmente en el año 2012 se registraron 147,985 casos de cáncer. Se estima que aumentarán los casos a 22 millones anuales en las próximas dos décadas. (Nota descriptiva 2015, OMS; Ervik, M et al 2016). Se prevé que su incidencia se incremente cada año debido al crecimiento de la población y a la creciente industrialización que favorece una mayor exposición a agentes carcinogénicos (Herrera-Torres et al. 2014). En México, es un problema de salud pública muy importante ya que desde el año 2010, el cáncer ocupa la segunda causa de mortalidad en niños entre los 4 a 15 años de edad (Adullaev et al. 2001).

El cáncer en niños difiere al de los adultos. En general, los principales tipos de cáncer son leucemias, linfomas y sarcomas, mientras que en adultos los principales son los carcinomas. Por esta razón, la manera de agruparlos es diferente. De acuerdo a la Clasificación Internacional de Cáncer en la Infancia 2008 (ICCC, por sus siglas en inglés) las neoplasias infantiles se clasifican según su morfología y sitio de presentación, agrupándolas en 12 grupos principales (Figura 1) (Fajardo-Gutiérrez et al. 2007)

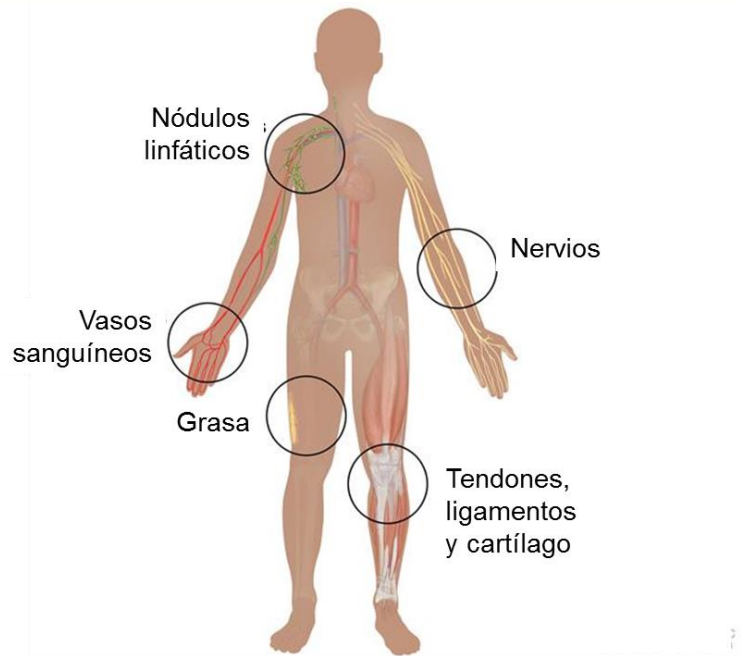
**Figura 1. Principales grupos diagnóstico según la Clasificación Internacional del Cáncer Infantil (ICCC).**

I	Leucemias, enfermedades mieloproliferativas y mielodisplásicas
II	Linfomas y neoplasias reticuloendoteliales
III <sup>a</sup>	Tumores del sistema nervioso central (TSNC) y neoplasias intracraneales misceláneas e intraespinales
IV	Neuroblastoma y otros tumores nerviosos periféricos
V	Retinoblastoma
VI	Tumores renales
VII	Tumores Hepáticos
VIII	Tumores de hueso malignos
IX	Sarcomas de tejido blando y extraóseos
X <sup>a</sup>	Tumores de células germinales, trofoblásticas y otras células gonadales
XI	Otras neoplasias epiteliales y melanomas malignos
XII	Otras neoplasias malignas inespecíficas
<sup>a</sup> Estos grupos incluyen ciertos tumores no malignos intracraneales e intraespinales	

La OMS prevé que para el 2030, las cifras de nuevos casos de cáncer incrementarán a 26.4 millones de y las defunciones relacionadas al cáncer aumentarán a 17 millones, como resultado del crecimiento demográfico y el envejecimiento de la población, afectando aproximadamente al 3% de la población infantil. Cada año, más de 160 000 menores de 20 años son diagnosticados con cáncer. En países desarrollados, 3 de cada 4 niños sobreviven al menos 5 años después de iniciar su tratamiento, a diferencia de los países en vías de desarrollo, donde más de la mitad (60%) mueren. México no es la excepción, aproximadamente cada año, 7000 niños presentan la enfermedad (Wang, et al, 2013), siendo la segunda causa de muerte en niños de 5 a 14 años de edad, encontrándose por debajo de las muertes accidentales. En general, la incidencia de cáncer es mayor en el grupo de niños menores de 5 años, disminuye en el grupo de 5 a 9 años y aumenta nuevamente en el grupo de 10 a 20 años (Cuevas -Urióstegui et al. 2003; Escamilla-Santiago et al. 2012).



Los STBNR, como su nombre lo indica afectan principalmente a los tejidos blandos del organismo que sirven para conectar, sostener y rodear otras partes y órganos del cuerpo. En la Figura 3 podemos observar los principales tejidos afectados por este padecimiento.



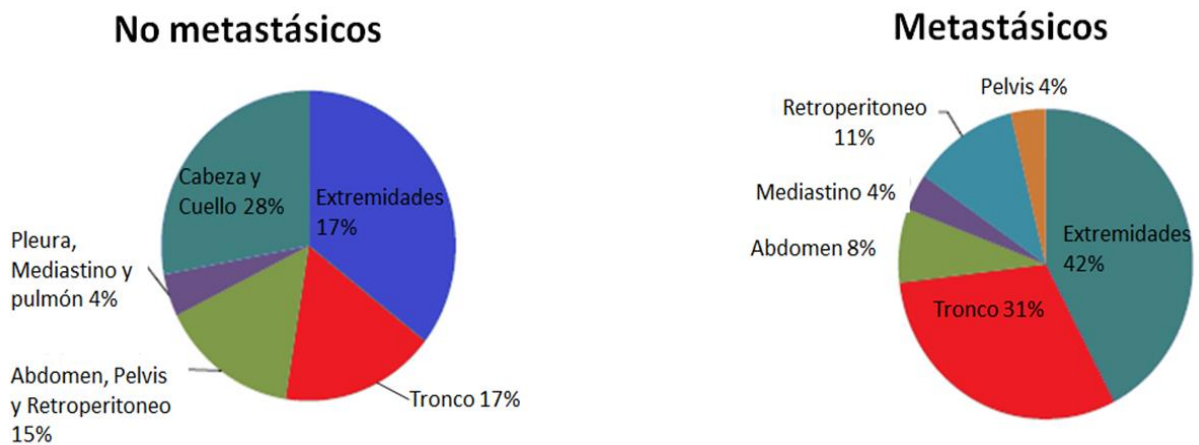
**Figura 3. Distribución Anatómica de STBNR.** Los sarcomas de tejido blando se forman en los tejidos blandos del cuerpo, como músculos, tendones, grasa, vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervios y el tejido que rodea las articulaciones. Tomado y modificado de Teresa Winslow, LLC 2015

Los sitios de origen primario de STBNR están ampliamente distribuidos. Los tumores primarios de STBNR se localizan principalmente en extremidades (59%), tronco (19%), retroperitoneo (15%) y en la cabeza o cuello (9%), sin embargo, el 60% de los niños que presentan tumoraciones no resecables, no metastásicos tienen como sitio primario una extremidad o la cabeza y cuello (Figura 4) (HaDuong et al. 2015).

## EPIDEMIOLOGÍA

Los STBNR de acuerdo a datos obtenidos por el Programa de Vigilancia, Epidemiología y Resultados Finales (SEER, por sus siglas en inglés) del Instituto Nacional de Cáncer, sugieren que este tipo de tumores representan entre el 4 - 7% de todos los cánceres en pacientes menores de 20 años, con cerca de 500 casos

reportados anualmente en Estados Unidos (Meyer & Spunt 2004). En México particularmente de enero de 2007 a enero de 2012 se registraron 14,178 pacientes de 0 a 18 años de edad con cáncer, de los cuales, hubo una prevalencia de 624 casos de STBNR (aproximadamente 110 nuevos casos por año). Según datos de la Dirección General de Epidemiología del Centro Nacional para la Salud de la Infancia y la Adolescencia, los STB ocupan el 4.4% de ocurrencia en menores de 18 años a nivel nacional (Rivera-Luna et al. 2014). En particular, se sabe que en el Instituto Nacional de Pediatría (INP) ocupan el séptimo lugar del total de las neoplasias malignas (Rivera R, 2010). Los STB comprenden aproximadamente el 8% de todos los cánceres infantiles y casi la mitad de los pacientes al momento del diagnóstico son menores de 5 años de edad y se estima que la relación Hombre:Mujer es 1.2:1 (Philip & Poplack, 2011).



**Figura 4. Distribución de sitios de Tumores primarios para STBNR clasificados como metastásicos y no metastásicos.** Tomado y modificado de HaDuong et al, 2015.

## ETIOLOGÍA

La mayoría de los STBNR son etiológicamente indeterminados, sin embargo, varios factores han sido identificados y pueden ser divididos en factores medioambientales y consideraciones hospedero/genéticas.



## FACTORES MEDIOAMBIENTALES:

- Exposición a radiación

Se ha comprobado que la exposición a la radiación induce sarcomas, estimaciones actuales sugieren que los sarcomas inducidos por radioterapia representan aproximadamente del 0.5 hasta el 5.5% de todos los sarcomas. Existe una correlación dosis-respuesta entre la dosis de radiación y el desarrollo de sarcoma con un riesgo muy bajo para individuos que se hayan expuesto a menos de 10 Gy (Lahat et al. 2008; Meyer & Spunt 2004; Pastore et al. 2006).

- Exposición a sustancias químicas:

Los STBNR también se han asociado con la exposición a ciertos tipos de agentes químicos. La exposición a policloruro de vinilo (PVC), thorostrast (suspensión coloidal de dióxido de torio, utilizado en la angiografía), la exposición a arsénico inorgánico y el tratamiento con esteroides anabólicos androgénicos han sido asociados con el desarrollo de angiosarcomas (Lahat et al. 2008).

Estudios en animales sugieren que varios fármacos o compuestos químicos pueden originar sarcomas. En ratones, el metilcolantreno induce reproduciblemente fibrosarcomas (Thomas & Ballinger 2015).

## FACTORES GENÉTICOS:

Los STBNR rara vez aparecen como parte de síndromes o malformaciones congénitas. Sin embargo, hay una pequeña proporción de enfermedades hereditarias que aumentan el riesgo de padecer algún tipo de sarcoma durante el desarrollo del individuo al presentar síndrome de Li-Fraumeni, neurofibromatosis tipo I y otros síndromes familiares raros (Meyer & Spunt 2004).

- Neurofibromatosis Tipo I (NF-1)

Los pacientes con éste desorden genético autosómico dominante debido a anomalías a lo largo del brazo del cromosoma 17q11.2, tienen un alto riesgo de desarrollar Tumor maligno de la vaina del nervio periférico (TMNVP) el cual surge a menudo en el sitio de un neurofibroma anterior. La neurofibromina, producto del gen

NF-1, en condiciones normales actúa como supresor de tumores por la estimulación de la actividad GTPasa del protooncogen Ras. La pérdida de la neurofibroma contribuye a la sobre-regulación de la vía Ras, esta actividad incrementada se asocia con un incremento en la secreción del factor de crecimiento endotelial vascular. Además, mutaciones en p53 vistas en TMNVP, permiten incrementar la supervivencia celular incrementando la progresión tumoral (Meyer & Spunt 2004; Lahat et al. 2008).

- Síndrome de Li-Fraumeni

El síndrome de Li-Fraumeni es un síndrome que predispone a cáncer y se asocia con el desarrollo de los siguientes tipos tumorales: sarcomas de tejido blando, osteosarcoma, cáncer de mama pre-menopáusico, tumores cerebrales, carcinoma adrenocortical y leucemias. Las mutaciones germinales en el gen supresor de tumores p53 se observan en este síndrome, estas mutaciones somáticas se observan en un 30 a 60% de los STB. Se ha estimado que los portadores de dicha mutación, tienen un riesgo estimado del 57% de presentar una segunda neoplasia. La proteína p53 es un factor transcripcional que normalmente inhibe el crecimiento celular y estimula la muerte celular cuando es inducida por estrés (Lahat et al. 2008; Thomas & Ballinger 2015; Hayashi et al. 2015).

- Retinoblastoma

Los sobrevivientes de retinoblastoma bilateral hereditario (neoplasia maligna embrionaria infantil en ojo) tienen un significativo riesgo a presentar STBNR, mientras que los sobrevivientes que no tienen retinoblastoma hereditario no son propensos a desarrollar este tipo de tumores. Los STBNR son particularmente frecuentes después de recibir radioterapia, como tratamiento a dicha enfermedad, sugiriendo que el locus del gen *Rb* es importante en la patogénesis en algunos casos de STBNR. El retinoblastoma es causado por mutaciones en la línea germinal de uno de los alelos del gen supresor de tumores *Rb1*, la pérdida de este gen es comúnmente encontrada en algunos casos de STBNR (Hayashi et al. 2015; Meyer & Spunt 2004).

- Otras asociaciones genéticas

También, algunos tipos específicos de STBNR se han asociado con cambios somáticos característicos. Los STBNR pueden también presentarse como una segunda neoplasia seguida de terapia con radiación con o sin quimioterapia como tratamiento de una primera neoplasia (Pastore et al. 2006; Meyer & Spunt 2004).

Recientemente se ha encontrado una traslocación entre el gen *TEL* en el cromosoma 12p12 y el gen *TRK C* en el cromosoma 15 (también referida como fusión de gen ETV6-NTRK3) asociada a fibrosarcoma infantil. Este tipo de tumores se comportan de una manera más benigna que sus contrapartes “adultas”.

En el Sarcoma sinovial, t(X;18)(p11;q11) fusiona con el gen SYT en 18q11 con los genes SSX1, SSX2 o SSX4 localizados en Xp11; los datos preliminares sugieren que la fusión específica puede ser un pronóstico importante. Los pacientes con una fusión SYT-SSX1 tienen un pronóstico menos favorable que aquellos que presentan una fusión SYT-SSX2 (Meyer & Spunt 2004).

Respecto al Tumor Desmoide se ha encontrado una relación del 10 – 20% de los pacientes que sufren dicho padecimiento con Poliposis Adenomatosa Familiar, que es una condición hereditaria transmitida de manera autosómica dominante y que es caracterizada por la aparición de numerosos pólipos adenomatosos en el colon. Esta condición resulta de una mutación del gen APC (Righetti et al. 2011).

Asimismo se ha observado Leiomiomas tanto en niños inmunosuprimidos, como en aquellos que presentan una infección con Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) además de virus de Epstein-Barr (Meyer & Spunt 2004).

## **CLASIFICACIÓN DE SARCOMAS DE TEJIDO BLANDO NO RABDOMIOSARCOMA**

Dependiendo del tejido al cual se asemejan, los STBNR pueden dividirse en grupos dependiendo del sitio de localización: tejido conectivo (fibroso y adiposo), vascular (vasos sanguíneos y linfáticos), sinovial o del sistema nervioso periférico (Enzinger & Weiss, 2008).

### Tumores de Tejido Graso

- Liposarcoma. La mayoría de liposarcomas en niños y adolescentes son de grado bajo (propensos a crecer y diseminarse lentamente). El tipo más común es el liposarcoma mixoide, sin embargo, el tipo liposarcoma pleomórfico es, con frecuencia de grado alto (propenso a crecer y diseminarse rápidamente). Este tipo de sarcoma pueden cualquier parte del cuerpo, aunque los sitios más comunes son el muslo y el retroperitoneo.

### Tumores óseos y cartilagosos

- Condrosarcoma Esquelético. Incluye al condrosarcoma mesenquimatoso, el cual, crece rápidamente, con frecuencia, se disemina a los pulmones. Más de dos terceras partes se localizan en las extremidades.
- Osteosarcoma extraesquelético. Es una neoplasia muy poco frecuente. Se considera de grado alto por lo que es propenso a crecer y a diseminarse rápidamente.

### Tumores de Tejido Fibroso

- Dermatofibrosarcoma protuberante. Es un tumor poco frecuente de la dermis y subdermis. Microscópicamente consta de células dispuestas en fascículos radiados pequeños, brindándoles un aspecto de rueda de carreta. Es una neoplasia considerada de bajo grado. Puede ocurrir en cualquier parte del cuerpo, pero más del 40% se localizan en el tronco, cabeza y cuello y 40% en extremidades.
- Tumor desmoide (también conocido como fibromatosis agresiva). Este tipo de tumor es de grado bajo por lo que es propenso a crecer lentamente, pero puede invadir tejidos cercanos. Frecuentemente, no se disemina a partes distantes del cuerpo, por lo que su principal ubicación es abdominal, extra-abdominal y mesentérica. El género no tiene influencia en la incidencia.
- Fibrosarcoma. También conocido como Fibrosarcoma congénito. Se encuentra en niños de 4 años o menos. La mayoría de las veces se presenta en lactantes.

A menudo este tumor es grande y de crecimiento rápido pero, con muy poca frecuencia, se disemina a sitios distantes del cuerpo.

- Tumor miofibroblástico inflamatorio. Este tumor de tejido fibroso es propenso a la reincidencia, pero con muy poca frecuencia se disemina a otras partes del cuerpo.
- Sarcoma fibromixioide de bajo grado. Los pacientes pueden presentar recaídas muchos años después del tratamiento, y es propenso a diseminarse a los pulmones y al revestimiento de la cavidad torácica.

### Sarcomas de Músculo Liso

El músculo liso reviste el interior de los vasos sanguíneos y de los órganos huecos internos, como el estómago, intestinos, vejiga y el útero.

- Leiomiosarcoma. Aunque puede aparecer en cualquiera de los lugares anteriormente mencionados, más de la mitad están localizados en sitios retroperitoneales o intrabdominales. La mayoría de los sarcomas viscerales son de este tipo. Los leiomiosarcomas profundos en extremidades surgen con más frecuencia en muslo en asociación con venas medianas y grandes. Aunque son menos comunes, los leiomiosarcomas pueden surgir en estructuras vasculares grandes y su síntoma principal es la obstrucción al flujo normal de la sangre, siendo el más común el de la arteria pulmonar. Este tumor de músculo liso se ha relacionado con el virus de Epstein – Barr en niños con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida. También puede presentarse como un segundo cáncer en los sobrevivientes de retinoblastoma heredado, incluso muchos años después del tratamiento.

### Sarcomas Fibrohistiocíticos

Este tipo de sarcomas puede ocurrir en pacientes de cualquier edad. Patológicamente, consisten en células fibroblásticas elongadas arregladas en un patrón de crecimiento vesiculado.

- Tumor fibrohistiocítico plexiforme. Este tumor inicia, con frecuencia como un crecimiento indoloro debajo de la piel de los brazos, las manos o las muñecas. En raras ocasiones se disemina a los ganglios linfáticos cercanos o a pulmones.
- Sarcoma pleomórfico indiferenciado. Este tipo de tumor puede formarse en partes del cuerpo en las que los pacientes recibieron radioterapia o como un segundo cáncer en niños con retinoblastoma. Se localiza principalmente en las extremidades inferiores o superiores y se puede diseminar a otras partes del cuerpo.

### Sarcomas de Tejido Sinovial

- Sarcoma sinovial. Es un tipo común de sarcoma de tejido blando en niños y adolescentes, ocasionalmente doloroso. El sarcoma sinovial, a menudo, se forma en los tejidos alrededor de las articulaciones de los brazos o las piernas, pero también se puede formar en el tronco, la cabeza o el cuello. Los tumores más grandes tienen un riesgo más alto de diseminarse a otras partes del cuerpo, como los pulmones. Los niños menores de 10 años y aquellos cuyo tumor mide cinco centímetros o menos tienen un mejor pronóstico.

### Sarcoma de Tejido Vascular (vasos sanguíneos y linfáticos)

- Hemangiopericitoma. Su localización es principalmente en las extremidades inferiores aunque, también se ha encontrado en pelvis y retroperitoneo. Este tumor de tejido blando se caracteriza por contar con muchos vasos sanguíneos. Los niños menores de 1 año tienen un mejor pronóstico. En los pacientes mayores de 1 año, este tumor es más propenso a diseminarse a tejidos distantes, como los ganglios linfáticos y los pulmones.
- Hemangioendotelioma epiteloide. En los lactantes, estos tumores se suelen formar en el hígado, pero también se pueden formar en otras partes del cuerpo, como los pulmones. En niños menores de 1 año, el tumor puede desaparecer sin necesidad de tratamiento. Los lactantes con hemangiomas se deben examinar regularmente mediante ecografías y se deben tratar con trasplante de hígado si los tumores son benignos. En algunos casos, el tumor benigno se puede volver

maligno y diseminar a los pulmones, los ganglios linfáticos, los huesos, el abdomen o la pelvis.

- Angiosarcoma (profundo). Los angiosarcomas se pueden formar dentro de los vasos sanguíneos o los vasos linfáticos. Este tipo de tumor suele crecer rápidamente.

### Sarcomas del Sistema Nervioso Periférico

- Tumor Maligno de la Vaina del Nervio Periférico (TMNVP). Este es un tumor que se forma en la cubierta protectora de los nervios. Su localización es principalmente extremidades bajas y el retroperitoneo, pero puede aparecer en cualquier parte del cuerpo. Algunos niños con este tumor presentan una afección genética poco frecuente llamada neurofibromatosis tipo 1 (NF-1). Este tumor puede ser de grado bajo o de grado alto. También es conocido como Tumor Tritón Maligno, neurofibrosarcoma, schwannoma maligno o sarcoma neurogénico.

### Tumores de Origen Desconocido

- Sarcoma Alveolar de Partes Blandas. Este es un tumor poco frecuente del tejido conjuntivo blando que conecta y rodea órganos y otros tejidos. Puede crecer lentamente y, con frecuencia, se disemina a otras partes del cuerpo al momento del diagnóstico. Tiene un mejor pronóstico cuando el tumor mide cinco centímetros o menos, o cuando se extirpa por completo mediante cirugía.
- Tumor desmoplástico de células pequeñas redondas. Este tumor afecta, en la mayoría de los casos, a niños varones y se puede formar y diseminar en el abdomen y la pelvis o en los tejidos que rodean los testículos. El tumor desmoplástico de células pequeñas redondas también se puede diseminar a los pulmones y a otras partes del cuerpo.
- Sarcoma de células claras de tejido blando. Este es un tumor de tejido blando que comienza en un tendón (tejido duro, fibroso, en forma de cuerda, que conecta los músculos con los huesos o con otras partes del cuerpo). El sarcoma de células claras se puede diseminar a los ganglios linfáticos cercanos.

- Sarcoma epiteloide. Este es un sarcoma poco frecuente que a menudo, aparece en la parte profunda del tejido blando como una masa firme de crecimiento lento y se puede diseminar a los ganglios linfáticos, siendo el pulmón el sitio más común de metástasis.
- Tumores neuroectodérmicos primitivo (TNEP). Estos tumores comienzan en las células primitivas (inmaduras) del sistema nervioso central llamadas células neuroectodérmicas. Alrededor de 1 de cada 5 tumores cerebrales en los niños son TNEP (Instituto Nacional del Cáncer, 2016; DeVita et al, 2014)

### CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LOS STBNR

La clasificación de los sarcomas está basada en el grado de malignidad y en la posibilidad de metástasis y por lo tanto, es un indicador pronóstico. Por medio de estudios patológicos se evalúa el grado del tumor en base a la tasa mitótica, necrosis, el grado de diferenciación y tipo histológico. Actualmente existen varios sistemas de clasificación o estadificación (Spunt et al. 2008); la mayoría de los sistemas incluyen información acerca de:

- Ubicación del tumor en el cuerpo
- Tipo celular
- Tamaño tumoral
- Invasión del cáncer a ganglios linfáticos cercanos
- Invasión del cáncer a otras partes del cuerpo (Instituto Nacional de Cáncer, 2016).

Uno de los sistemas propone que los STBNR pediátricos se pueden clasificar en tres categorías diferentes: grado bajo, grado intermedio y grado alto de acuerdo al Sistema de Clasificación de Tumores adaptado a STBNR y que reconoce características únicas de este padecimiento en pacientes pediátricos realizado por el Grupo de Oncología Pediátrica, el cual es una coalición de varias Instituciones Internacionales dedicadas a la investigación en cáncer. La figura 5 muestra los detalles de esta clasificación (Parham, Webber, Jenkins III, Cantor, & Maurer, 1995).



El grado histológico es un factor altamente predictivo en la sobrevida del paciente, es decir, los pacientes con tumores de grados altos sustancialmente tienen mayor riesgo de una recurrencia de la enfermedad y una sobrevida menor que aquellos con tumores de grados bajos (HaDuong et al. 2015).

En análisis retrospectivos de niños y adolescentes con STBNR sugieren que otros factores con un impacto no favorable en la sobrevida incluyen un tamaño tumoral >5cm, tumor irreseccable, (es decir, que no se puede extirpar mediante cirugía) o reseccado con márgenes positivos al microscopio y sitio primario intra-abdominal (Meyer & Spunt 2004).

Figura 5. Sistema de Estratificación Histológica del Grupo de Oncología Pediátrica:

GRADO	DESCRIPCIÓN	SOBREVIDA
1	Liposarcoma mixoide bien diferenciado. Fibrosarcoma bien diferenciado o infantil (Edad menor o igual a 4 años) Hemangiopericitoma bien diferenciado o infantil (Edad menor o igual a 4 años) Tumor maligno de la vaina del nervio periférico bien diferenciado. Histiocitoma fibroso maligno angiomatoso. Dermatofibrosarcoma protuberans profundo Condrosarcoma mixoide	Superior al 85 %
2	Sarcomas de tejidos blandos con: Área de necrosis menor al 15% Número de mitosis menor a 5/10 campos de alto poder utilizando un objetivo de 40X. Atipia celular poco marcada. Tumor sin marcada celularidad.	Aproximadamente del 50%
3	Tumores con los siguientes diagnósticos: Liposarcoma pleomórfico o de células redondas Condrosarcoma mesenquimatoso Sarcoma osteogénico extraesquelético Tumor Tritón maligno Sarcoma alveolar de partes blandas Cualquier otro sarcoma que no pertenezca al grupo 1, con más del 15% de necrosis e igual a 5 mitosis/10 campos de alto poder utilizando un objetivo de 40X	Menor al 10 % a 5 años después del diagnóstico inicial.

\*Tomado y modificado de Parham et al, 1995 y Meyer et al 2004.

El sistema TNM es el más utilizado actualmente, ya que la mayoría de los hospitales y centros médicos usan el sistema TNM en sus informes. En este sistema:

- La T se refiere al tamaño y extensión del tumor principal o primario.
- La N se refiere a la extensión del cáncer que se ha diseminado en los ganglios (o nódulos linfáticos cercanos).

- La M se refiere a si el cáncer se ha metastatizado; es decir, si el cáncer se ha diseminado desde el tumor primario a otras partes del cuerpo.

De esta manera, en el figura 6 se describe la clasificación clínica y patológica TNM para los STBNR.

Figura 6. Clasificación TNM para STBNR

<i>Tumor primario</i>	
<i>TX</i>	Tumor primario que no puede evaluarse
<i>T0</i>	No hay evidencia de tumor primario
<i>T1</i>	Tumor ≤5 cm en su diámetro mayor T1a Tumor superficial T1b Tumor profundo
<i>T2</i>	Tumor >5 cm en su diámetro mayor T2a tumor superficial T2b tumor profundo
<i>Nódulos linfáticos regionales</i>	
<i>Nx</i>	Nódulos linfáticos regionales no pueden evaluarse
<i>N0</i>	Sin metástasis en nódulos linfáticos regionales
<i>N1</i>	Metástasis en nódulos linfáticos regionales
<i>Metástasis a distancia</i>	
<i>M0</i>	Sin metástasis a distancia
<i>M1</i>	Metástasis a distancia

\*Tomado y modificado de (García Del Muro et al. 2011)

Sin embargo, para asignar una etapa, la información del tumor como: su grado, los ganglios linfáticos y metástasis se combina por un proceso llamado *agrupación por etapas*. La etapa se describe mediante números romanos del I al IV y las letras A o B como se puede observar en la figura 7.

Esta clasificación es útil en la selección de tratamiento.

Figura 7 Agrupación por etapas.

<i>Etapa</i>	<i>Descripción</i>
<i>IA</i>	T1, N0, M0, G1 o GX: El tumor no mide más de 5 cm, no se ha diseminado a ganglios linfáticos ni a sitios distantes. Es grado 1.
<i>IB</i>	T2, N0, M0, G1 o GX: El tumor mide más de 5 cm, no se ha diseminado a ganglios linfáticos ni a sitios distantes. Es grado 1.
<i>IIA</i>	T1, N0, M0, G2 o G3: El tumor no es mayor de 5 cm, no se ha diseminado a ganglios linfáticos ni a sitios distantes. Es grado 2 o 3.
<i>IIB</i>	T2, N0, M0, G2: El tumor mide más de 5 cm, no se ha se diseminado a ganglios linfáticos, ni a sitios distantes. El cáncer es grado 2.
<i>III</i>	T2, N0, M0, G3: El tumor mide más de 5 cm, no se ha diseminado a los ganglios linfáticos ni a sitios distantes. El cáncer es grado 3 o Cualquier T, N1, M0, cualquier G. El cáncer puede ser de cualquier tamaño y cualquier grado. Se ha propagado a los ganglios linfáticos. No se ha propagado a sitios distantes.
<i>IV</i>	Cualquier T, cualquier N, M, cualquier G: El cáncer puede ser de cualquier tamaño y grado. Se ha propagado a los ganglios linfáticos cerca del tumor o lugares distantes.

\*Tomado y modificado de American Cancer Society, 2016.

## PRONÓSTICO

Los pacientes que se encuentran en el grupo de bajo riesgo incluyen aquellos con tumores resecables de bajo grado y tumores de alto grado de tamaño pequeño. Estos pacientes tienen una sobrevida a largo plazo superior al 85% en 5 años. La extirpación quirúrgica es la base del tratamiento para este grupo. Cuando células tumorales remanentes permanecen después de la cirugía, la radioterapia adyuvante es indicada por lo general.

El grupo intermedio incluye aquellos pacientes con tumores de alto grado y aquellos con tumores no resecables. Estos pacientes tienen una sobrevida a largo plazo del 50% en 5 años. El enfoque de tratamiento para este grupo aún no se ha optimizado. A pesar de que los pacientes con STBNR de alto grado y de tamaño grande tienen un alto riesgo de desarrollar metástasis, la experiencia sugiere que estos tumores en adultos que los regímenes quimioterapéuticos actualmente disponibles sólo

tienen una influencia modesta en prevenir la metástasis a distancia y la muerte por diseminación del tumor.

Los niños y adolescentes con STBNR metastásicos comprenden el grupo de alto riesgo. Estos pacientes tienen un pronóstico de supervivencia deplorable de aproximadamente 6 meses y poco menos del 10% permanecen vivos a 5 años a partir del diagnóstico inicial. La aplicación de nuevas terapias y enfoques de tratamiento son necesarios para este grupo de pacientes (Meyer & Spunt 2004).

## **DIAGNÓSTICO**

Al igual que en otros tumores la evaluación inicial contempla la exploración física completa y la realización de exámenes de laboratorio y estudios de imagen. Dependiendo de su localización, los estudios de imagen deben incluir placas de rayos X simples, tomografía computarizada y resonancia magnética, ésta última es especialmente útil en los tumores de tejidos blandos en extremidades.

Una vez determinada la presencia de un tumor debe establecerse el diagnóstico preciso mediante el estudio histopatológico. La muestra debe someterse a distintos procedimientos para su análisis.

### ⌘ Microscopía de luz e Inmunohistoquímica

La mayoría de los SBTNR pueden ser diagnosticados mediante biopsias teñidas con hematoxilina y eosina por un patólogo experimentado (Evans, 1995).

### ⌘ Microscopía electrónica

Puede proveer detalles celulares de relevancia diagnóstica que no son discernibles con microscopía de luz como es el reconocimiento ultraestructural.

### ⌘ Estudio citogenético

En los tejidos blandos y particularmente en tumores malignos de tejidos blandos son frecuentemente encontradas aberraciones cromosómicas. Algunas de estas alteraciones son típicas de ciertas variedades histológicas y puede proporcionar el diagnóstico definitivo de un caso particular (Sanati et al. 2007).

Un diagnóstico apropiado depende de estudios clínicos, radiológicos y patológicos, siendo también muy importante la experiencia de los especialistas en cada una de estas áreas. Este enfoque multidisciplinario es esencial para poder emitir un diagnóstico certero y así, definir un tratamiento apropiado (Ferrari et al. 2012).

La obtención de una muestra tumoral es esencial para establecer un diagnóstico apropiado. Una biopsia incisional es preferible, sin embargo, también puede realizarse una aspiración con aguja fina para realizar posteriormente una evaluación histológica e inmunohistoquímica, así como estudios patológicos moleculares (Meyer & Spunt 2004).

## **TRATAMIENTO**

El cuidado del paciente niño o adolescente con STBNR requiere de un tratamiento multidisciplinario; el objetivo principal es controlar la enfermedad localmente con resección quirúrgica y/o terapia de radiación. Para controlar la metástasis distante típicamente se utiliza quimioterapia sistémica (HaDuong et al. 2015).

Los protocolos establecidos se basan en esquemas de tratamiento que se individualizan para cada paciente según el sitio primario, la etapa TNM y grupo clínico. Tanto la intensidad como la duración del tratamiento deben ser estratificados de acuerdo al grupo de riesgo, para proveer la mejor posibilidad de cura y reducir al mínimo su toxicidad. La quimioterapia involucra el uso de agentes antineoplásicos citotóxicos como la ifosfamida, doxorubicina, vincristina, ciclofosfamida, verapamilo, y actinomicina D, su objetivo es influir sobre el crecimiento de las células tumorales o destruirlas por completo. La actividad de los antineoplásicos se basa principalmente en la alteración de mecanismos de síntesis de ácidos nucleicos actuando sobre la replicación o sobre la transcripción y síntesis de proteínas. La indicación para aplicar quimioterapia antineoplásica como monoterapia o en combinación con otros medicamentos depende de las características biológicas y la etapa clínica del STBNR, la dosis y la administración, dependerán del esquema de tratamiento establecido. STBNR son un tipo de cáncer que es resistente a la quimioterapia citotóxica. La resección quirúrgica del tumor primario representa un elemento clave para una terapia efectiva. La sobrevivencia de los pacientes con un

STBNR localizado es dramáticamente mucho mayor en comparación con la supervivencia de aquellos con un tumor irreseccable (.80% vs .40%, respectivamente a 5 años). La terapia de radiación posoperativa puede ayudar a complementar el control del tumor primario en casos donde la resección quirúrgica no pudo ser completa. La amputación solo se reserva para aquellos pacientes en los cuales el tumor no puede ser resecado de otra forma o el tumor ha comprometido la funcionalidad de la extremidad (el resultado funcional puede ser pobre después de la cirugía para salvar un miembro) (Ferrari et al. 2010).

El esquema de quimioterapia que al parecer produce mejores resultados es ifosfamida y doxorubicina, resultando en un intervalo de efectividad del 40 al 50%, aproximadamente un 10% de los pacientes presentan remisión completa al utilizar este régimen combinado (Lehnhardt et al. 2005). Mientras que la Red Nacional Comprensiva de Cáncer y la Sociedad Europea de Oncología Médica recomiendan antraciclinas (solas o en combinación con otros agentes) como primera línea de tratamiento en la mayoría de los casos de pacientes con STBNR metastásico (Wagner et al. 2015). En la figura 8 se muestra el esquema de tratamiento utilizado en el Instituto Nacional de Pediatría.

En cuanto al tratamiento quirúrgico para STBNR, éste varía dependiendo de la localización del tumor y de la función. Debe de ser realizado por cirujanos oncólogos pediatras que tengan amplio conocimiento de la biología y las opciones terapéuticas de este tumor. Se debe intentar una resección cuando es posible extirpar el tumor sin ocasionar una deformidad inaceptable o bien una pérdida de la función. Cuando existe metástasis, el tratamiento quirúrgico puede estar indicado en aquellas instancias en el que la o las metástasis sean únicamente pulmonares y la enfermedad primaria esté controlada. De no ser así, la cirugía para reseca la enfermedad metastásica sólo añade morbilidad y no mejora la supervivencia (Rivera, 2009). A pesar de los resultados favorables en niños y adolescentes con STBNR resecados, una proporción significativa de pacientes experimentan recurrencia o progresión de la enfermedad con presencia de metástasis al momento del diagnóstico o la presentan en el curso de su tratamiento, este grupo de pacientes

tienen un pronóstico muy malo y se cree que pueden beneficiarse del uso de quimioterapia neoadyuvante (tratamiento que se administra como primer paso, para reducir el tamaño del tumor antes de la cirugía) ó adyuvante (tratamiento adicional que se administra después del tratamiento primario, para disminuir el riesgo de que se presente una recurrencia) (Lehnhardt et al. 2005). La radioterapia (RT), es una opción de tratamiento para pacientes con enfermedad residual microscópica y macroscópica, donde se requiere lograr el control local-regional de los STBNR, con o sin cirugía, pero siempre en conjunto con la quimioterapia, sin interferir una con otra (Rivera, 2009).

Dentro de las características asociadas con el incremento de fallas del tratamiento después de una resección quirúrgica son el volumen tumoral, el tipo histológico, las localizaciones de difícil acceso quirúrgico y la presencia de metástasis. (Cormier & Pollock 2004).

**Figura 8. Antineoplásicos utilizados en el tratamiento de los STBNR en el Instituto Nacional de Pediatría**

<b>Fármaco</b>	<b>Mecanismo de acción</b>	<b>Dosis</b>
<b>Ifosfamida</b>	Agente alquilante	3 g/m <sup>2</sup> /día, 3 días trisemanal por 6 ciclos.
<b>Doxorrubicina</b>	Antibiótico citotóxico	75 mg/m <sup>2</sup> total, infusión continua 2 días, trisemanal por 6 ciclos.
<b>Vincristina</b>	Inhibidor de la tubulina	1.5 mg/m <sup>2</sup> /dosis (Max 2 mg). Bolo semanal 12 semanas, posterior bolo trisemanal hasta 32-52 semanas.
<b>Ciclofosfamida</b>	Agente alquilante	2.2 g/m <sup>2</sup> /dosis, 1 día trisemanal hasta 52 semanas.

\*Tomado y modificado de Rivera, 2010.

En general, los STBNR son un grupo heterogéneo de neoplasias que en conjunto representan el 4% de todos los casos de cáncer en pacientes pediátricos. A pesar

de la variabilidad de subtipos histológicos, los STBNR tienen muchas características clínicas y patológicas en común. Por ejemplo, el comportamiento clínico de la mayoría de los STBNR es similar y, están categorizados por el mismo sistema de clasificación, el cual se basa en su localización anatómica, grado y tamaño del tumor (Cormier & Pollock 2004; Spunt et al. 2008).

## QUIMIORESISTENCIA

Se sabe que el 30-50% de los pacientes con STBNR fallecerá en el plazo de 5 años por la enfermedad, lo anterior derivado de presencia de metástasis al momento del diagnóstico y de falla de respuesta al tratamiento o quimioresistencia (Lehnhardt et al. 2005). Actualmente, el tratamiento del cáncer sigue siendo un reto, ya que los antineoplásicos que se utilizan son caros, tienen graves efectos no deseados, además, la resistencia a los medicamentos es común en STBNR, especialmente en casos metastásicos (Nwabo et al. 2014). La quimioresistencia o resistencia a la quimioterapia, independientemente de los mecanismos que la produzcan, puede ser innata o adquirida. La resistencia innata es aquella que se presenta en el tumor sin contacto previo a los antineoplásicos, mientras que la adquirida es la que aparece tras el contacto con uno o varios de ellos (Zheng et al. 2014). Varios factores pueden estar involucrados en el fenómeno de quimioresistencia, los cuales son clasificados como factores intra y extracelulares. Entre los factores extracelulares se encuentran, la dosis insuficiente del fármaco, vascularización alterada en el sitio del tumor y la presencia de barreras fisiológicas. Mientras que dentro de los factores intracelulares se encuentran: 1) exclusión de fármaco desde la célula tumoral, 2) fallo en la activación del profármaco hacia su forma activa, 3) mecanismos de desintoxicación aumentados, 4) alteraciones en la diana del fármaco, 5) aumento en la capacidad de reparación después de la lesión celular y 6) insuficiencia para acoplarse a una respuesta apropiada que conduzca a la célula dañada a apoptosis. El fenómeno de exclusión del fármaco se encuentra estrechamente relacionado con la presencia de proteínas transportadoras de membrana, mientras que los fenómenos de fallo en la activación de profármacos hacia su forma activa y los mecanismos de desintoxicación aumentados se encuentran relacionados con el proceso de



biotransformación enzimática de fase I y fase II, en donde el fármaco puede ser inactivado principalmente por reacciones de oxidación mediadas por enzimas del citocromo P450 (Lourda et al. 2006).

## CITOCROMO P450

Desde 1960, las enzimas del citocromo P450 (CYP) han sido descritas como hemoenzimas predominantemente localizadas en el hígado, las cuales metabolizan fármacos y otros xenobióticos. Actualmente se conoce que estas enzimas también están involucradas en las funciones celulares como el metabolismo de eicosanoides, la biosíntesis de colesterol y ácidos biliares, síntesis y metabolismo de esteroides, en la síntesis y degradación de aminas biogénicas, vitamina D, síntesis y metabolismo y la hidroxilación de ácido retinoico.

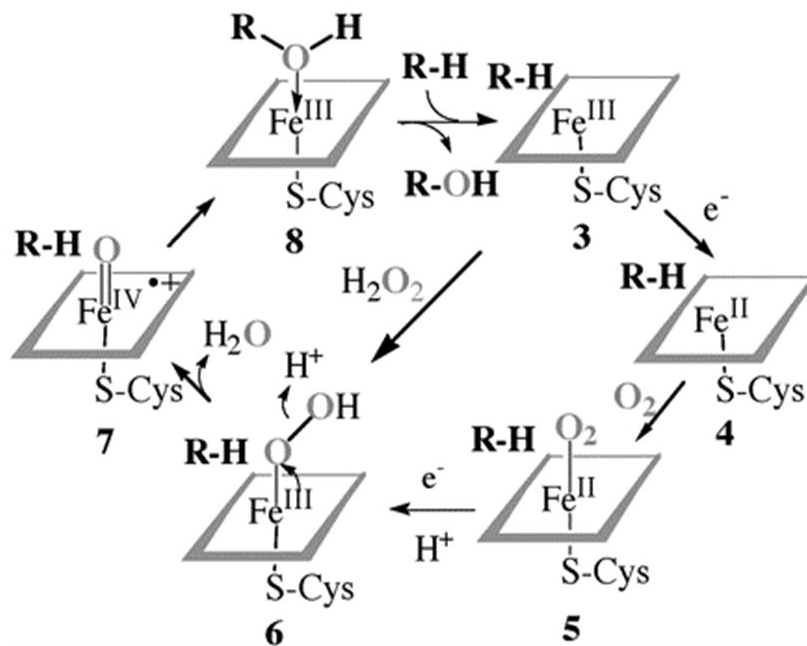
En los mamíferos, las enzimas CYP se encuentran unidos a membranas, la mayoría se encuentran en retículo endoplásmico aunque algunas de ellas se localizan en las mitocondrias.

La estructura común de todas las enzimas CYP es un motivo de péptidos conservados, Phe-X<sub>(6-9)</sub>-Cys-X-Gly donde la X denota algún aminoácido, cerca del extremo Carboxilo; esta cisteína une al hierro del grupo octaédrico hemo en la quinta posición y participa en la transferencia de un átomo de oxígeno atmosférico dentro del sustrato. La formación de productos oxigenados es seguida de su liberación; el producto puede ser muy inestable durante unos milisegundos antes de convertirse en un compuesto hidroxilado estable (pobrementemente reactivo), o en un producto que puede ser relativamente inestable (especies reactivas de oxígeno) capaces de realizar uniones covalentes intracelulares (Guengerich, 2003).

Las principales características del mecanismo consenso del CYP se resumen en la figura 9.

- i. La unión del sustrato a la enzima, a veces acompañada por un cambio de spin en el hierro para proporcionar un aducto enzima – sustrato (3).
- ii. Reducción del CYP férrico por una reductasa asociada con un electrón derivado de NADPH (4).

- iii. La unión de oxígeno molecular al grupo hemo para producir un complejo CYP ferroso – dioxígeno (5).
- iv. Una segunda reducción de un electrón y protonación llega al complejo Fe (III) – Hidroxiperóxido (6).
- v. La protonación y la escisión heterolítica del enlace O – O (6) con la producción simultánea de una molécula de agua para formar un intermediario oxo-hierro reactivo (7)
- vi. Y, finalmente, la transferencia de un átomo de oxígeno de este complejo oxo-hierro (7) al enlace del sustrato para formar el producto oxigenado. (8) La disociación del producto completa el ciclo (Ortiz de Montellano 2004).



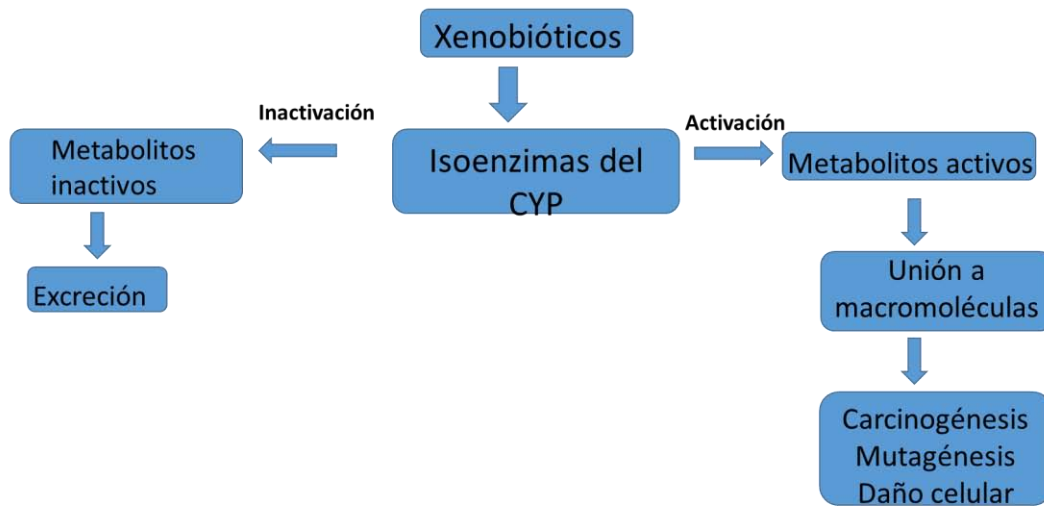
**Figura 9. Ciclo catalítico consenso para la activación de oxígeno y transferencia por el Citocromo P450.** Tomado y modificado de Ortiz de Montellano, 2004.

Con el fin de eliminar los xenobióticos del organismo, se producen reacciones de Biotransformación, encaminadas a incrementar la hidrofilia de estas moléculas para facilitar su rápida excreción. Estas reacciones se pueden diferenciar en reacciones de Fase I y Fase II. En las primeras, se produce una modificación del xenobiótico por oxidación, reducción o hidrólisis, dando lugar a la aparición de grupos polares en la molécula, lo que se traduce en un aumento de su hidrosolubilidad y por tanto

una mayor facilidad para su excreción. En las de Fase II, el sustrato, que puede tratarse tanto de un xenobiótico como un metabolito proveniente de una reacción de fase I, se conjuga con una sustancia endógena, lo que facilita su transporte en el organismo y su posterior excreción.

Las enzimas del citocromo P450 realizan del 70-80% de todas las reacciones de fase I (Guengerich 2003).

Aunque la función principal del CYP es participar en reacciones de detoxificación transformando compuestos farmacológicamente activos en inactivos y excretarlos por la orina, también participa en procesos de activación metabólica, de manera que compuestos inertes y poco reactivos son convertidos en otros de gran reactividad química y que son tóxicos para el organismo (Figura 10) (Orellana & Guajardo 2004).



**Figura 10. Reacciones de activación o inactivación mediada por enzimas del CYP.** Aunque la principal función de las enzimas CYP es participar en las reacciones de detoxificación, también participa en procesos de activación metabólica. Tomado y modificado Orellana & Guajardo, 2004.

Al momento, se conoce que el genoma humano contiene 57 genes que codifican para proteínas CYP. Además, existe una clasificación sistemática que las agrupa en familias y subfamilias. La secuencia proteínica dentro de una familia es idéntica al menos en un 40% y las secuencias proteínicas dentro de una misma subfamilia son similares aproximadamente en un 55%.

Las enzimas que se expresan predominantemente en hígado pertenecen a las familias del Citocromo P450: 1, 2 y 3. Sin embargo, algunas isoenzimas de estas familias como son: CYP1A1, CYP1A2, CYP2C8, CYP2E1, CYP2J2 y CYP3A4 se encuentran localizadas en órganos diferentes como son: pulmones, riñones, tejido gastrointestinal, etc. (Guengerich, 2003).

## **FAMILIAS DEL CYP**

### Familia CYP1

Esta familia incluye 3 proteínas: CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1. En humanos, CYP1A1, es localizado principalmente en tejidos extrahepáticos al igual que la isoforma CYP1B1. La expresión de la isoforma CYP1A2 es principalmente hepática. La transcripción de la familia CYP1 está regulada a través del receptor de aril hidrocarburo (AhR), el cual es responsable de la regulación de la actividad de esta familia así como del factor de transcripción activado por ligando. Xenobióticos como 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD), hidrocarburos aromáticos halogenados (HAHs), benzo ( $\alpha$ ) pireno (BaP) e hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA), son ligandos de AhR. En caso de unión con esos ligandos (xenobióticos), AhR regula la activación transcripcional de CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1 quienes están involucrados en la bioactivación de compuestos pro-carcinógenos a carcinógenos derivados y en el metabolismo de fármacos. Las acciones biológicas mediadas por AhR son el resultado de un proceso de múltiples pasos para la transducción de señal. En este proceso, el ligando unido a AhR se trasloca desde el citoplasma hacia el núcleo y forma un complejo por dimerización con el traslocador del receptor nuclear (ARNT). Este complejo se une entonces a los elementos de respuesta a xenobióticos (XREs) y modula la expresión de varios genes incluyendo los miembros de la familia CYP1. Consecuentemente, los niveles de expresión de CYP1A1 y CYP1B1 pueden reflejar HAHs o HPA que pueden inducir inmunotoxicidad, estrés oxidativo y activación de carcinógenos ambientales (Go et al. 2015).

## ⌘ CYP1B1

Fue identificado por un análisis de linaje genético y estudios de mutación como gen causante de glaucoma congénito primario, la cual es una enfermedad neurodegenerativa que ocasiona ceguera. Es un miembro interesante de la familia CYP450 ya que se encuentra involucrado en el metabolismo tanto de xenobióticos como de compuestos endógenos. CYP1B1 constituye también una fracción importante del citocromo P450 extrahepático, con expresión en casi todos los tejidos como son: riñón, próstata, timo, bazo, pulmón, intestino delgado, colón, glándulas mamarias y ovarios; también es la enzima más abundante expresada en piel. Muchos de esos tejidos son de particular interés por los tumores que pueden desarrollarse ahí. Esta enzima, activa varios mutágenos medioambientales, por ejemplo hidrocarburos policíclicos aromáticos, aminas heterocíclicas y aminas aromáticas. CYP1B1 también cataliza la 4-hidroxilación de estrógenos considerado como un paso importante en la carcinogénesis hormonal (Ortiz de Montellano, 2004).

La proteína humana CYP1B1 fue detectada en una variedad de tumores pero no fue detectada en tejido adyacente o tejido normal, donde sólo el mRNA fue detectado. Esto sugiere que CYP1B1 puede activar agentes anticancerígenos específicos particularmente en células cancerígenas (Piotrowska & Kucinska 2013). El CYP1B1 ha demostrado recientemente ser fisiológicamente importante en el desarrollo fetal, ya que mutaciones del CYP1B1 están vinculadas con una forma de glaucoma congénito primario. Además, hay algunos estudios que plantean que determinados polimorfismos del CYP1B1 se asocian a una mayor susceptibilidad a presentar cáncer de mama (CYP1B13/3), urogenital (CYP1B1-4B1) y de cabeza y cuello (CYP1B3/3). El intervalo de estrategias terapéuticas incluyen a pro-fármacos activados por CYP1B1 como inhibidores de éste mismo (Deeni et al. 2013; Zanger & Schwab 2013).

## Familia CYP2

La familia es la más grande y diversa, metaboliza diversas sustancias como xenobióticos, fármacos y al ácido araquidónico, comprende al menos 5 subfamilias: CYP2A, CYP2B, CYP2C, CYP2D, CYP2E. La expresión de esta familia se encuentra representada en la mayoría de los tejidos, especialmente en el hígado. Recientemente, se han encontrado asociaciones génicas y funcionales de los miembros de esta familia con varias enfermedades como: hígado graso no hepático y cáncer del tracto digestivo superior. Entre los miembros de esta familia podemos encontrar a CYP2C9, CYP219 y 2D6 son conocidas por metabolizar tanto fármacos como sustancias endógenas. En el caso de CYP2A6, 2B6, 2C8 y 2E1 se considera que también son responsables de la activación metabólica de procarcinógenos (Kim et al. 2014).

### ⌘ CYP2E1

La subfamilia CYP2E comprende a un único miembro, la isoenzima CYP2E1, la cual toma una relevancia importante por su participación en la activación de agentes químicos a productos citotóxicos o carcinogénicos y por su participación activa en el metabolismo del etanol, originando hepatotoxicidad. CYP2E1 biotransforma un amplio intervalo de compuestos químicos, en particular compuestos hidrofóbicos y pequeños, oxida el etanol y otros alcoholes primarios. También está involucrado en la oxidación de compuestos de bajo peso molecular (peso molecular <100), muchos de los cuales son solventes orgánicos y aditivos químicos de significancia toxicológica y carcinogénica: nitrosaminas, benceno, estireno, CCl<sub>4</sub>, entre otros. También varios anestésicos halogenados como: halotano, sevoflorano, enflurano, isoflurano y fármacos como: acetaminofén, clorzoxazona, trimetadiona son principalmente metabolizados por CYP2E1. Asimismo, tiene la capacidad de reducir al oxígeno molecular a radicales oxido-reactivos, iniciando la peroxidación de membranas lipídicas, también se relaciona con la toxicidad por la producción de radicales libres y, por lo tanto, al estrés oxidativo. La expresión de esta isoenzima constituye el 7% de la actividad total en el hígado, aunque también se ha encontrado

expresión en menores cantidades en riñón, mucosa nasal, pulmón, testículos, ovarios, intestino delgado, colon, células endoteliales de la vena umbilical y linfocitos, así como en cerebro, específicamente en hipocampo y corteza. Además, el mRNA de CYP2E1 ha sido detectado en sistema nervioso central de humano. El tratamiento con etanol induce la expresión de esta enzima en linfocitos y en el intestino grueso, principalmente en colon; en cuanto a su actividad, ésta puede ser afectada por algunas condiciones fisiopatológicas como lo son diabetes, inanición y obesidad (Orellana & Guajardo 2004; Tanaka et al. 2000).

### ⌘ CYP2W1

Es uno de los nuevos miembros de la familia del CYP450. Su expresión genética en colon e intestino delgado comienza en etapas tempranas durante el desarrollo embrionario y es completamente silenciada poco después del nacimiento. Se ha encontrado que en tejidos no transformados de adultos hay una expresión de mRNA prácticamente indetectable, mientras que la expresión en los tumores y en tejidos de cáncer colorectal en particular fue significativamente alta. Se ha encontrado en alrededor del 30% de las muestras de cáncer colorectal humano una alta expresión de CYP2W1, recientemente también se ha encontrado en cáncer de hígado, con una expresión mayor en las metástasis en comparación con el tumor primario en un mismo paciente. En ambos tipos de cáncer la prognosis de sobrevivida es peor en pacientes en cuyos tumores existen altos niveles de CYP2W1. También se han encontrado bajos niveles de CYP2W1 en otro tipo de tumores como de glándula adrenal, gástricos y de pulmón. En cáncer colorectal, la alta expresión de CYP2W1 está asociada con un incremento en la desmetilación de la isla CpG en la unión del exón 1/intrón 1. Esto implica paralelismos entre los mecanismos de regulación del cáncer y de desarrollo, expresión que también se ha encontrado superpuesta en muchos genes oncofetales. Existen estudios que sugieren la posibilidad de utilizar la expresión de CYP2W1 como factor pronóstico, marcador de malignidad y sobrevivida en cáncer colorectal (Gomez et al. 2010; Choong et al. 2015).

## Familia CYP3

Los miembros de esta familia son las enzimas más abundantes expresadas en hígado e intestino humano y son las responsables del metabolismo de aproximadamente 50% de los fármacos utilizados en la clínica. En humanos, esta familia consta de 4 miembros: CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 y CYP3A43, codificados en el cromosoma 7q22.1. Sin embargo, un gran número de xenobióticos incluyendo pesticidas, suplementos herbales vitaminas y fármacos pueden activar a los miembros de esta familia. El receptor X Pregnano (PXR, por sus siglas en inglés) es el principal regulador de la expresión génica de esta familia y se une como heterodímero con el receptor X Retinoide  $\alpha$  (RXR $\alpha$ ), subsecuentemente PXR se une a elementos de respuesta en la región promotora de varios genes blanco. PXR es activado por un número de ligandos estructural y químicamente diversos como: fármacos (rifampicina, clorotrimazol), pesticidas (endosulfán, piributicarb), esteroides naturales y sintéticos (dexametasona), ácidos biliares y medicinas herbales (hierba de San Juan, *Ginkgo biloba*) (Riffel et al. 2009; Kumagai et al. 2012; Robbins & Chen 2014).

### ⌘ CYP3A4 y CYP3A5

Tanto CYP3A4 como CYP3A5 constituyen de manera significativa casi el total de la forma CYP3A hepática. Las enzimas de la subfamilia CYP3A tienen una muy amplia especificidad de sustrato para un número extremadamente grande de agentes químicos estructuralmente diversos que son metabolizados por diferentes vías. Se ha estimado que CYP3A4 metaboliza más del 50% de los medicamentos prescritos, por lo que es evidente que la subfamilia CYP3A es de gran importancia en la farmacocinética clínica. Los inductores de esta subfamilia tienden a disminuir las concentraciones en plasma de los sustratos de CYP3A lo que resulta en una eficacia reducida del sustrato.

CYP3A4 es la enzima más abundantemente expresada en hígado e intestino, sin embargo recientemente se ha identificado la expresión de CYP3A4 en el cerebro.



Datos recientes señalan que CYP3A5 puede representar más del 50% del CYP3A total en algunos individuos. Cabe señalar que los fetos no expresan CYP3A4 en su tejido hepático, sino más bien CYP3A7, que actúa sobre una gama similar de sustratos. CYP3A4 está ausente en el hígado fetal, pero aumenta a aproximadamente el 40% de los niveles de los adultos en el cuarto mes de vida y 72% a los 12 meses (Williams et al. 2002).

## ANTECEDENTES

### PARTICIPACIÓN DE LAS ISOENZIMAS DEL CITOCROMO P450 EN CÁNCER

Dos de las principales vías en la investigación sobre CYP450 son acerca de su habilidad de activar pro-carcinógenos y su capacidad de metabolizar a los fármacos utilizados en el tratamiento de dicha enfermedad. Modelos experimentales han dejado claramente mostrado que la modulación de la expresión de CYP450 puede modificar la susceptibilidad a desarrollar cáncer en animales. Sin embargo, la relevancia de la modulación de CYP450 en riesgo de desarrollar cáncer en humanos aún no ha sido establecida. No obstante, estudios *in vitro* han demostrado que CYP450 humano puede activar a la mayoría de los carcinógenos. Las principales enzimas CYP450 involucradas en la activación de carcinógenos parecen ser: CYP1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2E1 y 3A4, con pequeñas contribuciones de CYP4B1 y CYP2A13.

Algunos de los principales y más recurrentes candidatos CYP450 involucrados en cáncer son CYP1A2 (involucrado en incrementar el riesgo de padecer cáncer de colón) y CYP2A6 (altamente expresado en tejido tumoral de cabeza y cuello). Otros dos candidatos posiblemente conectados con cáncer son: CYP1B1 expresado en varios órganos y tejidos (mama, próstata y ovario) y activa numerosos carcinógenos *in vitro*; y CYP2A13, que es similar a CYP2A6.

Cabe señalar que la quimioterapia involucra el uso de agentes antineoplásicos citotóxicos; las enzimas CYP450 son las principales metabolizadoras de fármacos y juegan un rol importante en la farmacocinética y la disposición general del agente antineoplásico en el organismo hospedero. Esto contribuye a: 1) la toxicidad producida por agentes antineoplásicos en tejidos normales del hospedero y 2) el delicado balance entre la sensibilidad y la resistencia mostrada por las células tumorales blanco (Nebert & Dalton 2006).

Por otro lado, un polimorfismo frecuente y funcional del CYP3A5 que es una transición de A a G, fue asociado con la producción de proteína y actividad enzimática y se ha sugerido que dicho polimorfismo juega un papel importante en

determinar la susceptibilidad individual de padecer cáncer en próstata, hígado, cáncer esofágico, gástrico, colorectal, leucemia entre otros (B. Wang et al. 2013).

En cuanto a CYP2E1 se refiere, se han descrito varios polimorfismos genéticos que afectan al gen CYP2E1; el primero de ellos se localiza en la región anterior del extremo 5', dando lugar a dos alelos, uno frecuente que se le conoce como c1 y otro raro llamado c2. El alelo mutante c2 tiene una tasa transcripcional mayor que el alelo c1, lo que parece estar relacionado con el desarrollo de determinados tipos de cáncer. Sin embargo, parece que es el genotipo c1/c1 el factor que confiere la susceptibilidad para desarrollar cáncer pulmonar, con una aparente asociación al hábito de fumar, y en el tracto aerodigestivo en alcohólicos crónicos (Santiago & Gómez-gallego 2002). Consistente con esto, la isoenzima CYP2E1 ha sido implicada en otros tipos de cáncer como resultado de su capacidad de producir altos niveles de ROS (Caro & Cederbaum 2004). En la figura 11 se enlistan algunas características de las enzimas CYP que se evaluarán en el presente trabajo.

**Figura 11. Características de algunas Isoenzimas del Citocromo P450**

Isoenzima CYP	Expresión en tejidos sanos	Sobreexpresión en cáncer	Referencia
<b>1B1</b>	-Riñón -Próstata -Glándulas mamarias -Ovarios -Piel	Cáncer de mama, endometrial, Sarcoma de Ewing, pulmón, renal, próstata y colon.  Participación en la activación de agentes químicos a productos citotóxicos o carcinogénicos.	(Patel et al. 2012; Karlgreen et al. 2006; Mcfadyen et al. 2001)
<b>2E1</b>	-Hígado -Riñón -Mucosa nasal -Pulmones -Testículos, ovarios -Aparato digestivo -Linfocitos -Cerebro	Carcinoma hepatocelular. Cáncer mama  Participación en la activación de agentes químicos a productos citotóxicos o carcinogénicos.	(Vaclavikova et al. 2007; Daly 2015)
<b>2W1</b>	Se expresa durante el desarrollo fetal y se silencia después del nacimiento	Cáncer de colon, mama, rabdomiosarcoma.	(Molina-Ortiz et al. 2014; Gomez et al. 2010; Karlgreen et al. 2006)
<b>3A4</b>	-Hígado -Sistema Digestivo	Cáncer en próstata, hígado, cáncer esofágico, gástrico, colorectal, leucemia, rabdomiosarcoma.	(Molina-Ortiz et al. 2014; Z. Wang et al. 2013)
<b>3A5</b>	-Hígado -Sistema Digestivo	Cáncer de mama, colon, rabdomiosarcoma.	(Molina-Ortiz et al. 2014; Gomez et al. 2010; Karlgreen et al. 2006)

**Figura 12. Isoenzimas del CYP450 que metabolizan a los antineoplásicos utilizados en el tratamiento de STBNR.**

<b>Fármaco Antineoplásico</b>	<b>Isoenzima del Citocromo P450 que lo metabolismo</b>
<b>Doxorubicina</b>	CYP 2D6
<b>Ifosfamida</b>	CYP3A4 y CYP3A5
<b>Ciclofosfamida</b>	CYP3A4, CYP2D6
<b>Verapamilo</b>	CYP3A4, CYP3A5 y CYP2C8
<b>Vincristina</b>	CYP3A4 y CYP3A5

Tomado y modificado de The Flockhart Table. Indiana University.

## ANTECEDENTES DIRECTOS

En un trabajo previo realizado en el laboratorio de Toxicología Genética del Instituto Nacional de Pediatría se evaluó la expresión proteica y génica de diferentes isoformas del CYP450: 1A1, 1A2, 1B1, 3E1, 2W1, 3A4 y 3A5 en trece muestras de pacientes pediátricos con RMS y de tejido adyacente con el propósito de comparar dicha expresión intra-individualmente.

Se encontró que los genes CYP1B1 y CYP2E1 fueron detectados en el 100% de los tejidos tumorales y adyacentes analizados. En cambio el gen CYP2W1 en tejido adyacente no tumoral sólo se detectó en la muestra proveniente del paciente de menor edad (5 meses), mientras que en tejido tumoral fue detectado en 8 de las 13 muestras. Los niveles de expresión génica de CYP3A4 y CYP3A5 fueron mayores en tejido tumoral versus tejido adyacente sano en la mayoría de las muestras analizadas.

Los niveles de expresión génica de cada CYP mostraron una estrecha correlación con los niveles proteicos, a excepción de la proteína CYP2E1 que no fue detectada en ninguna de las muestras analizadas. La proteína CYP2W1 sólo fue detectada intratumoralmente en particular en muestras de RMS de tipo embrionario. También se detectó una mayor concentración de proteínas CYP3A4/3A5 en tejido tumoral versus tejido adyacente sano.

Estos resultados sugieren que el patrón de expresión de las isoformas CYP afectadas por RMS podría tener un papel importante no sólo en la progresión del cáncer a través de CYP1B1, sino también en la quimioresistencia observada en esta neoplasia en particular por la inducción intratumoral de los CYP3A4 y CYP3A5. CYP2W1 presentó un comportamiento de expresión tumor-específica, por lo que podría considerarse como excelente blanco terapéutico en el tratamiento de RMS (Molina-Ortiz et al. 2014).

## JUSTIFICACIÓN

Los Sarcomas de Tejido Blando no Rbdomiosarcoma son un grupo heterogéneo de neoplasias derivadas de células presentes en tejidos extra-esqueléticos que incluyen más de 50 subtipos histológicos, su tratamiento abarca tanto una estrategia combinada de control local (mediante cirugía y/o radioterapia) como sistémico con quimioterapia, sin embargo frecuentemente los STB son quimioresistentes al tratamiento.

Los antineoplásicos utilizados en la quimioterapia son metabolizados principalmente por el sistema enzimático CYP, el cual por su acción generalmente forma metabolitos intermedios con poca o nula actividad citotóxica. Además se ha evidenciado la sobre-expresión intratumoral de enzimas CYPs en distintos tumores sólidos, lo cual no solamente podría participar en el fenómeno de quimioresistencia sino también en el proceso de carcinogénesis química. Por lo que el tipo, cantidad y distribución de isoenzimas CYP dentro del tumor podrían ser determinantes no sólo para el desarrollo del mismo sino también como factor pronóstico de tratamiento. En el campo de nuestra investigación los STBNR pueden considerarse un excelente modelo para el estudio del fenómeno de quimioresistencia en el sitio tumoral.

El conocimiento del tipo de subfamilia del CYP expresada en el sitio tumoral permitirá aportar nueva información que nos ayude a comprender el desarrollo y la patogenia de este tipo de cáncer.

## **HIPÓTESIS**

Existirá una sobreexpresión de las isoenzimas CYP1B1, CYP2E1, CYP2W1, CYP3A4 y CYP3A5 en las biopsias de tejido tumoral derivadas de sarcomas en comparación con las muestras de tejido normal adyacente.

## **OBJETIVOS**

Determinar si existe expresión diferencial génica y proteica de isoenzimas del CYP1B1, CYP2E1, CYP2W1, CYP3A4 y CYP3A5 en el tejido tumoral en comparación con el tejido normal.

### **Objetivos particulares**

- Correlacionar la supervivencia sin enfermedad activa con el grado de expresión génica de las isoenzimas CYP en tejido tumoral.
- Determinar la asociación entre la expresión génica y proteica de las isoenzimas CYP con el género, edad y grupo clínico de los pacientes reclutados para el presente estudio.

# METODOLOGÍA

## UNIVERSO DE TRABAJO

Se trabajaron muestras de Tejido Tumoral y Tejido Adyacente de pacientes que fueron tratados por el Servicio de Cirugía Oncológica del Instituto Nacional de Pediatría, que requirieron la realización de una biopsia en el Quirófano Central por presentar tumoración sólida de partes blandas, sin tratamiento antineoplásico previo, y que su diagnóstico fue STBNR.

En caso de ser pacientes elegibles, se les preguntó a sus padres y/o tutores si accedían participar en el estudio y previo consentimiento informado (Anexo I). Se nos proporcionó una muestra derivada de la biopsia obtenida como parte del procedimiento médico habitual para el diagnóstico de los pacientes con cáncer.

## CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y DE EXCLUSIÓN

-Criterios de inclusión-

1. Pacientes de 0 a 18 años de edad con diagnóstico de sarcoma de tejido blando no rhabdomyosarcoma.
2. Consentimiento informado por escrito del padre o tutor y asentimiento del paciente (si es mayor a 8 años de edad).
3. Ausencia de antecedentes de primeras neoplasias.
4. Pacientes que hayan recibido tratamiento previo a la toma de muestra.

-Criterios de exclusión-

1. Pacientes con neoplasias agregadas.
2. Pacientes que reciban radioterapia antes de la toma de muestras.



3. Desviaciones en la técnica de la toma de biopsias, traslado y almacenamiento del tejido.

## **CONSIDERACIONES ÉTICAS**

Las muestras de tejido maligno y sano que se consideraron para este estudio son parte del procedimiento médico habitual en estos pacientes para diagnóstico y/o tratamiento, por lo que no se tomaron muestras independientes e innecesarias para los fines clínicos establecidos. Este estudio cuenta con los permisos correspondientes de los Comités de Investigación y Ética del Instituto Nacional de Pediatría.

## **PROCEDIMIENTOS**

### **⌘ Reactivos y Materiales**

Solución de RNA later® y RNA Zap®, fueron adquiridos de Ambion (Masachussets, EUA); Cloruro de sodio, Trizol, Cloroformo, Alcohol Isopropílico, Tetrametiletilendiamina, Tween-20 y Etanol, de Sigma Chemical Co (St. Luis MO, EUA); Agua libre de nucleasas de Excelleron (Daigger, Vernon Hills IL, EUA); Agarosa y Bis-Acrilamida de Invitrogen (Masachussets, EUA); bromuro de etidio de Promega (Madison WI, EUA); Glicina y Acrilamida de Bio-Rad (Hercules California, EUA); Tris-HCl de Roche (D. F., México); Luminol y Peroxidasa para revelado por Quimioluminiscencia de GE Healthcare (Amersham Place, UK), Metanol de Merck-Millipore (Estado de México, México).

Kit para reverso transcripción, Master Mix y Sondas TaqMan para las isoformas del Citocromo P450 de CYP1B1, CYP2E1, CYP2W1, CYP3A4, CYP3A5,  $\beta$ -actina, de Applied Biosystems (Masachussets, EUA).

Anticuerpos policlonales elaborados en conejo para CYP1B1, CYP2W1; Anticuerpos monoclonales en ratón para CYP2E1 y Anticuerpos monoclonales CYP3A4, CYP3A5 de Abcam (Cambridge MA, USA); Supersomas (microsomas obtenidos de sistemas de sobreexpresión en células de insecto infectadas con

Baculovirus) de CYP2E1, CYP3A4 y CYP3A5, de humano, son de Corning (Corning, EUA).

Las membranas de PVDF fueron adquiridas de Merck-Millipore (Estado de México, México), las placas de 96 pozos para los ensayos de qPCR fueron adquiridas de Applied Biosystems (Masachussets, EUA).

#### ⌘ Toma de Biopsias

Se tomaron en cuenta las siguientes consideraciones:

- a) Se consideró primeramente, que el material obtenido fuera suficiente para hacer el diagnóstico histopatológico y su mejor pronóstico.
- b) Las muestras para el estudio se tomaron sólo durante la biopsia o resección inicial del tumor y antes de iniciar el tratamiento con quimioterapia.
- c) El tipo de toma de biopsia: las biopsias se tomaron de manera incisional o excisional, dependiendo de la factibilidad de resección completa inicial, sin realizar cirugías mutilantes de inicio. Durante el mismo procedimiento, se tomaron biopsias del tejido sano adyacente, que macroscópicamente no mostraron signo de cáncer, localizadas de 1 a 3 cm de los límites del sitio tumoral.
- d) Las muestras se etiquetaron, mencionando el sitio exacto de la toma de biopsia y de la localización de la muestra en el tumor. Se enviaron al laboratorio por separado (tejido tumoral y tejido adyacente) y se rotularon adecuadamente.
- e) Inmediatamente después de la toma de biopsia, las muestras se suspendieron en solución de RNA later®, se seccionaron y se almacenaron a - 80°C hasta su análisis.

#### ⌘ Obtención de RNA total de Muestras de Tejido Tumoral y Adyacente

El RNA de los tejidos tumoral y adyacente se extrajo mediante el reactivo Trizol®, siguiendo el protocolo establecido por el fabricante (Invitrogen):

- a) Homogenización

Aproximadamente 100 mg de tejido se resuspendieron en 1 ml de Trizol, el tejido se homogeneizó a 4°C con ayuda de un homogenizador mecánico (marca Fisherbrand).

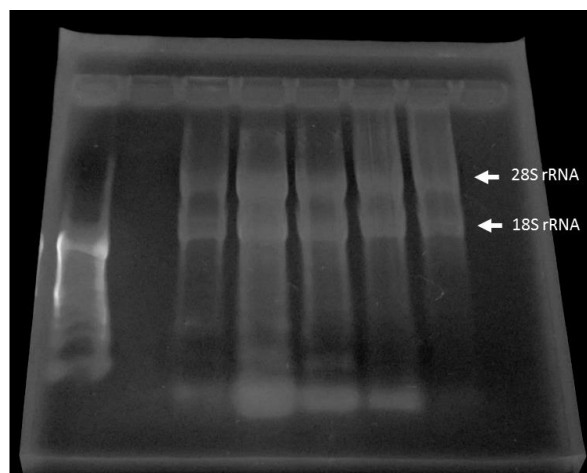
#### b) Separación, precipitación y lavado del RNA

Al homogenado se le adicionaron 200µl de cloroformo, se agitó y se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, la muestra se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Al término, se recuperó la fase acuosa, a la cual se le adicionaron 500 µl de alcohol isopropílico, se agitó nuevamente y se dejó precipitar durante toda la noche a -20°C. Al día siguiente el precipitado se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El botón de RNA obtenido después de centrifugar, se lavó con 1 ml de etanol al 75% y se centrifugó a 7,500rpm durante 5 minutos a 4°C. El etanol se decantó y se dejó secar el botón a temperatura ambiente. El RNA obtenido se resuspendió en 40µl de H<sub>2</sub>O libre de RNasas, se determinó su concentración y se verificó su integridad mediante un gel de agarosa al 1.5%. La concentración del RNA extraído se determinó con lecturas de 260 y 280nm en un espectrofotómetro NanoDrop V3.5, lo que nos permitió calcular la relación de absorbancias de 260/280 para garantizar la pureza del RNA extraído, rangos de 1.8 a 2.0 en la relación de dichas absorbancias fueron aceptados. La integridad del RNA obtenido se evaluó mediante electroforesis en cámara horizontal Mini-Sub® Cell GT marca Bio-Rad en geles de agarosa al 1.5%, los cuales fueron teñidos con Bromuro de Etidio. Los geles fueron visualizados mediante un transiluminador UVT-22 marca Herolab. La visualización de las bandas 28S y 18S confirman la integridad del RNA obtenido. En la figura 13 se muestran los resultados del corrimiento electroforético de 5 muestras. El RNA se almacenó a -70°C hasta el momento de su análisis.

#### ⌘ Obtención de Proteína total de Muestras de Tejido Tumoral y Adyacente

La proteína de los tejidos tumoral y adyacente se extrajo mediante el reactivo Trizol®, siguiendo el protocolo establecido por el fabricante (Invitrogen):

- a) La fase orgánica que se obtuvo a en la etapa de separación de RNA se precipitó con 1.5 ml de isopropanol, se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugó a 12,000 rpm diez minutos a 4°C.
- b) Al término se removió la fase acuosa, se lavó el botón 3 veces con una solución de cloruro de guanidina 0.3M en etanol al 95%. Posterior a cada lavado, se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos y se centrifugó a 7,500 rpm 5 minutos a 4°C. Se desechó en cada lavado el sobrenadante y el botón se resuspendió en 2 mL de etanol al 100%, después se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos y se centrifugó a 7,500 rpm 5 minutos a 4°C.
- c) Se desechó el sobrenadante y la proteína se disolvió en 50 - 100  $\mu$ l de solución de urea 10 mM y Ditiotreitól 150 mM, la mezcla se incubó 1 hr a temperatura ambiente.
- d) Posteriormente, la muestra se hirvió en baño María durante 3 minutos y se sonicó hasta solubilizar el botón.
- e) La concentración de la muestra fue determinada por el método de Lowry.
- ⌘ Análisis de expresión de los CYP1B1, CYP2E1, CYP2W1, CYP3A4 y CYP3A5, en muestras de tejido tumoral y adyacente.



**Figura 13. Integridad del RNA total extraído.** Se muestra un gel de agarosa al 1.5% representativo. Se cargaron 2  $\mu$ L de RNA total extraído de las muestras de los pacientes con STBNR. Se presentan las bandas 28S y 18S de 5 muestras.

## -EXPRESIÓN GÉNICA

### a) Reverso Transcripción

A partir 2 µg de RNA total extraído tanto de tejido tumoral como adyacente, se llevó a cabo la reacción de reverso transcripción, para lo cual se utilizó el kit TaqMan Reverse Transcription Reagents ® de Applied Biosystems en un termociclador TC9610 marca Labnet. El RNA total se mezcló con 10µl de buffer TaqMan RT 10X (1X), 22 µl de cloruro de magnesio 25 mM (5.5 M), 2 µl de mezcla de dNTPs (500 µM c/u), 5 µl de random hexamer primers (2.5 M), 2 µl de inhibidor de RNasas y 2.5 µl de la enzima reverso transcriptasa “MultiScribe” (50U/µl) y se llevó a un volumen final de 100µl, el cual se ajustó con H<sub>2</sub>O libre de RNasas. El cDNA se obtuvo incubando la mezcla de reacción 10 minutos a 25° C, posteriormente, 30 minutos a 48° C y finalmente, 5 minutos a 95°C. La concentración de cDNA se determinó en el NanoDrop V3.5, tomando como base el valor de una densidad óptica para ssDNA de 33 µg/µl.

### b) Reacción de la polimerasa en cadena cuantitativa (qPCR)

Para analizar la expresión génica de los CYP1B1, CYP2E1, CYP2W1, CYP3A4 y CYP3A5 y del control endógeno β-actina se utilizaron sondas TaqMan® Applied Biosystems. Se realizaron curvas estándar analizando la expresión de las isoenzimas del CYP, para ello se utilizaron diferentes concentraciones de cDNA (25, 50, 100, 125, 250, 500, 750 y 1000 ng). A la par, en cada curva también se analizó la expresión de los controles endógenos β-actina, ciclofilina P y GAPDH.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se trabajó bajo las siguientes condiciones: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C y 42 ciclos de 15 segundos a 95° y 1 minuto a 60°C, en el sistema detector ABI PRISM 7700 de Applied Biosystems.

Posteriormente, identificado el rango dinámico, todos los ensayos se llevaron a cabo con 750 ng de cDNA, cantidad obtenida mediante el rango dinámico, en las mismas condiciones en las que se realizaron las curvas estándar. La expresión relativa del mRNA de las subfamilias del CYP en tejido tumoral, se normalizó con la expresión

del gen endógeno elegido,  $\beta$ -actina, cuya expresión se detectó de manera constante en todas las muestras. El análisis de expresión génica se realizó bajo el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen 2001).

En el PCR tiempo real se mide la detección de una señal fluorescente producida proporcionalmente durante la amplificación del cDNA producido después de un número fijo de ciclos. El valor de CT es el ciclo en el cual la señal fluorescente cruza el umbral de detección. El método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  es un modelo matemático comparativo en el cual se contrastan los valores de Ct obtenido en la muestra experimental (previamente normalizados con el Ct del gen endógeno), contra los valores de Ct obtenidos en la muestra control (Rodríguez et al, 20; Yilmaz et al, 2012).

Para evaluar la expresión génica de las isoformas CYP en nuestras muestras, se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$\Delta Ct_1 = (Ct \text{ CYP evaluado} - Ct \text{ gen endógeno})_{\text{tejido tumoral}}$$

$$\Delta Ct_2 = (Ct \text{ CYP evaluado} - Ct \text{ gen endógeno})_{\text{tejido adyacente}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_1 - \Delta Ct_2$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Lo que nos habla de las veces que se expresa el CYP evaluado en el tejido tumoral en comparación con el tejido adyacente.

#### -ABUNDANCIA PROTEICA

Los western blot se realizaron en cámaras Mini-PROTEAN tetra Cell marca BioRad. Se realizaron geles de poliacrilamida (PAGE) en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS - PAGE) al 7.5%, y con 100  $\mu$ g de proteína total. Las electroforesis se corrieron a 4 °C y a voltaje constante de 190 V. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF a un voltaje constante de 100 V durante 1 hora. Para asegurar la transferencia de las proteínas a las membranas y una carga de muestra similar en los carriles, las membranas fueron teñidas con rojo de Ponceau.

Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% en buffer Tris – Salino (TBS) durante una hora, al término se realizaron tres lavados con TBS-Tween 20 (0.05%) y se incubaron las membranas con los anticuerpos primarios anti-humano: CYP1B1, CYP2E1, CYP2W1, CYP3A4, CYP3A5, por separado durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, las membranas se lavaron tres veces con TBS-Tween 20 (0.05%) y posteriormente, se incubaron con inmunoglobulinas de cerdo anti-conejo y de conejo anti-ratón unidas a peroxidasa, las bandas se visualizaron por medio de una reacción de fluorescencia con el reactivo luminol en el Sistema ChemiDoc XRS de Bio – Rad®. Una vez obtenida la imagen a cada una de las membranas se les realizó “Stripping”, el cual se basa en la remoción del anticuerpo primario y secundario. Cada membrana se lavó dos veces con Buffer de Stripping durante 10 minutos, posteriormente se lavaron 2 veces con buffer TBS durante 10 minutos y después se realizaron dos últimos lavados con TBS-Tween durante 10 minutos. Las membranas se volvieron a bloquear con leche descremada al 5% en TBS durante 1 hora y se procedió a incubarlas con el anticuerpo primario para  $\beta$ -actina durante toda la noche. Al día siguiente, la incubación fue con el anticuerpo secundario anti-ratón y después las membranas fueron visualizadas nuevamente. A cada una de las membranas reveladas se les realizó densitometría con el mismo sistema de visualización y con el software de análisis Quantity One (versión 4.6.9 para Windows)

Para realizar este análisis, se seleccionaron cada una de las bandas obtenidas y visualizadas en la membrana, se realizó una corrección para eliminar el fondo y se utilizó el valor de volumen para realizar el análisis. Cada una de las bandas obtenidas para cada una de las isoformas CYP en cada uno de los tejidos de los pacientes con STBNR se normalizaron con su correspondiente banda de  $\beta$ -actina.

#### ⌘ Análisis estadístico

De los valores obtenidos en Expresión Génica como en Abundancia Proteica, se obtuvo la media de los experimentos realizados. Para realizar el análisis de la expresión proteica en particular, la información se procesó y se realizó el análisis estadístico prueba t de Welch, ya que los tamaños de muestra no eran iguales para

las isoformas CYP2E1, CYP2W1, CYP3A4 y CYP3A5 por medio del programa estadístico GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software, San Diego CA).

Para el análisis de la expresión proteica de CYP1B1 la información se procesó y se realizó el análisis estadístico prueba t, en el mismo programa estadístico, ya que la muestra poblacional era semejante.

De igual manera, se utilizó la prueba t de Welch para las asociaciones de la expresión génica y abundancia proteica con las características clínico-patológicas de los pacientes reclutados para el presente estudio. Los valores utilizados en éste análisis fueron los promedios de los ensayos realizados.

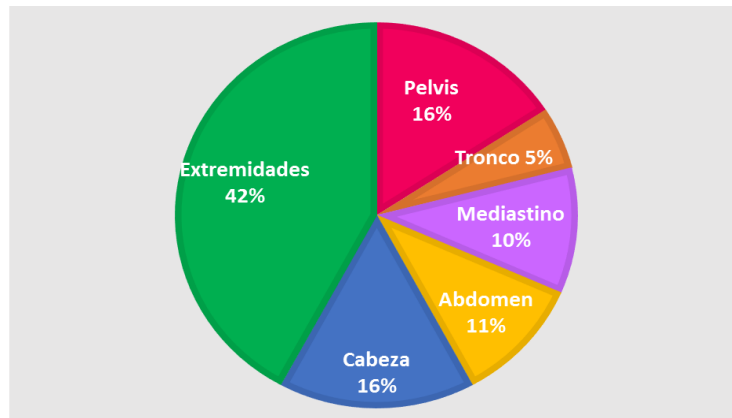
Todos los gráficos de expresión de resultados de expresión génica y abundancia proteica se realizaron en el software GraphPad Prism.



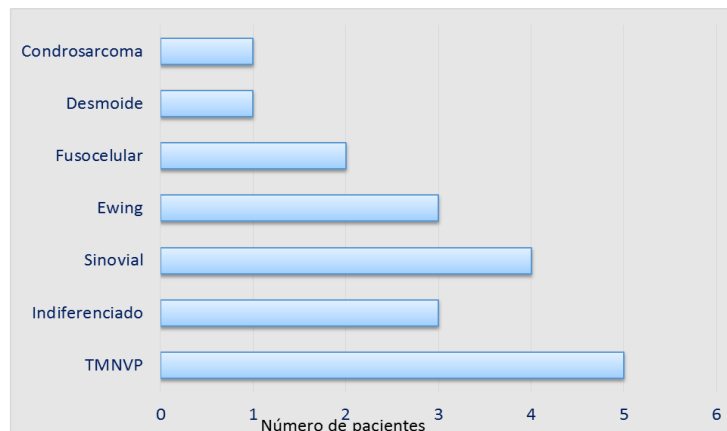
## RESULTADOS

### I. RECLUTAMIENTO Y CARACTERÍSTICAS DE PACIENTES

Se reclutaron 19 pacientes admitidos al Servicio de Cirugía Oncológica del Instituto Nacional de Pediatría con diagnóstico de STBNR en un periodo de 5 años (julio de 2010 a julio de 2015), de ellos 12 niños (63.15%) y 7 niñas (36.85%), con una relación Hombre : Mujer igual a 1.7 y con un promedio de edad de 9.23 años. En la figura 16 se describen sus características clínicas, conjuntamente se encuentran acomodados de acuerdo al subtipo histológico. En cuanto a la localización del Tumor, el sitio con mayor incidencia fueron las extremidades con 10 casos (40%), seguido de Pelvis y Cabeza, Mediastino y Abdomen y Tronco (Figura 14). También se obtuvieron 7 subtipos histológicos, de los cuales, el TMNVP tuvo una mayor frecuencia con 5 casos (Figura 15).



**Figura 14. Localización del Tumor Primario.** Se muestra la incidencia de los 19 pacientes con diagnóstico de STBNR.



**Figura 15. Frecuencia de los subtipos histológicos en los 19 pacientes con STBNR.**

Figura 16. Características de los pacientes reclutados.

No. ID	Género	Edad (al diagnóstico)	Tipo de sarcoma	Localización	Tratamiento	Estado actual	Años de sobrevida
1	F	15 años	Sarcoma de nervios periféricos	Extremidad sup derecha	Quimioterapia, Radioterapia.	Finado/FTO	1 año
2	M	6 años	Sarcoma de nervios periféricos	Extremidad inf derecha	Radioterapia.	Vivo	4 años
3	M	6 años	Sarcoma de nervios periféricos	Extremidad sup derecha	Quimioterapia, Radioterapia.	Vivo (en tratamiento)	5 meses
4	M	7 años	Sarcoma de nervios periféricos	Abdomen	Quimioterapia.	Finado/FTO	3 años
5	M	11 años	Sarcoma de nervios periféricos	Mediastino	Quimioterapia, Radioterapia.	Finado/FTO	1 año
6	F	2 años	Sarcoma indiferenciado	Cabeza	Quimioterapia, Radioterapia.	Finado/FTO	1 año
7	M	15 años	Sarcoma indiferenciado	Extremidad inf izquierda	Quimioterapia	Finado/FTO	2 años
8	M	15 años	Sarcoma indiferenciado	Mediastino	Quimioterapia	Finado/FTO	2 años
9	F	3 años	Sarcoma de tejido sinovial	Abdomen	Quimioterapia, Radioterapia.	Vivo	4 años
10	F	13 años	Sarcoma de tejido sinovial	Pelvis	Quimioterapia.	Vivo	2 años
11	M	17 años	Sarcoma de tejido sinovial	Cabeza	No	Finado/FTO	1 mes
12	M	5 meses	Sarcoma de tejido sinovial	Extremidad inf derecha	Quimioterapia.	Vivo (en tratamiento)	2 meses
13	F	4 años	Sarcoma de Ewing extra-óseo	Pubis	Quimioterapia, Radioterapia.	Vivo	3 años
14	M	10 años	Sarcoma de Ewing extra-óseo	Tronco	Quimioterapia.	Vivo	8 años
15	M	10 años	Sarcoma de Ewing extra-óseo	Pelvis	Quimioterapia.	Finado/FTO	2 años
16	F	3 años	Sarcoma Fusocelular	Cabeza	No	Finado/FTO	1 año
17	M	16 años	Sarcoma Fusocelular	Extremidad inf derecha	Quimioterapia, Radioterapia.	Vivo (en tratamiento)	5 meses
18	M	14 años	Sarcoma Desmoide	Extremidad inf derecha	Quimioterapia, Radioterapia.	Vivo	4 años
19	F	8 años	Condrosarcoma	Extremidad inf izquierda	Quimioterapia, Radioterapia.	Finado/FTO	1 año

F: Femenino, M: Masculino, inf: inferior, sup: superior, FTO: Fuera de Tratamiento Oncológico

Cabe señalar que los pacientes que se encuentran Fuera del Tratamiento Oncológico (FTO), es decir, aquéllos pacientes que abandonaron el tratamiento oncológico o recibieron tratamiento paliativo, se consideran dentro del grupo de fracaso clínico al igual que los pacientes finados.

De acuerdo al grupo clínico, la mayoría de los pacientes se encuentran en el grupo clínico IV, como se puede observar en el figura 17.

Figura 17. Clasificación de los pacientes de acuerdo a su grupo clínico

<i>Etapa clínica</i>	<i>Pacientes: No. de paciente (grupo clínico)</i>
<i>Grupo I</i>	18 (IB)
<i>Grupo II</i>	2 (IIA), 3 (IIA), 10 (IIB), 12 (IIA), 17 (IIB)
<i>Grupo III</i>	14 (III), 16 (III), 19 (III)
<i>Grupo IV</i>	1 (IV), 4 (IV), 5 (IV), 6 (IV), 7 (IV), 8 (IV), 9 (IV), 11 (IV), 13 (IV), 15 (IV)

#### -EVALUACIÓN Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CYP1B1

En lo que se refiere a la evaluación de la expresión génica de la isoforma CYP1B1 ésta fue detectada en todas las muestras de tejido tumoral y en la mayoría de las muestras de tejido adyacente (94%).

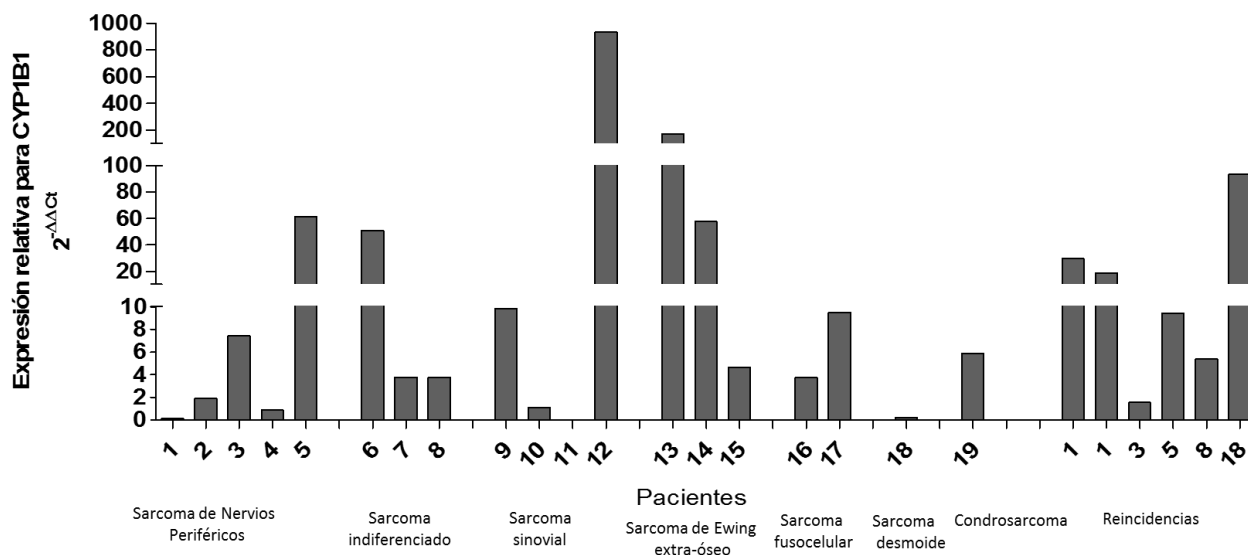
También se evaluaron 6 muestras de pacientes que presentaron recaídas, de las cuales se pudo obtener muestras de tejido adyacente y tumoral en cada una de las intervenciones quirúrgicas, siendo éstas procesadas y analizadas. Su análisis se realizó con fines comparativos únicamente. Los pacientes 1 (este paciente presentó 2 recaídas), 3 y 5 con diagnóstico de Sarcoma de Nervios Periféricos, el paciente 8 con diagnóstico de Sarcoma Indiferenciado y el paciente 18 con diagnóstico de Sarcoma Desmoide recaidieron en la enfermedad. Los resultados de cada una de ellas se muestran en el mismo gráfico pero como un grupo separado.

Recordando que el análisis  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  se realizó con la expresión de cada isoforma CYP en tejido tumoral en comparación con el tejido adyacente, y que el resultado está dado en veces de cambio de la expresión, para esta isoforma en particular se encontró que en 15 pacientes (pacientes 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17

y 19), la expresión de la isoforma CYP1B1 en tejido tumoral fue mayor que la mostrada en el tejido adyacente. En particular el paciente 12, con diagnóstico de sarcoma sinovial y el paciente 13 con diagnóstico de sarcoma de Ewing extra-óseo, la expresión de esta isoforma es considerablemente mayor en el tejido tumoral (935 y 172 veces de cambio, respectivamente).

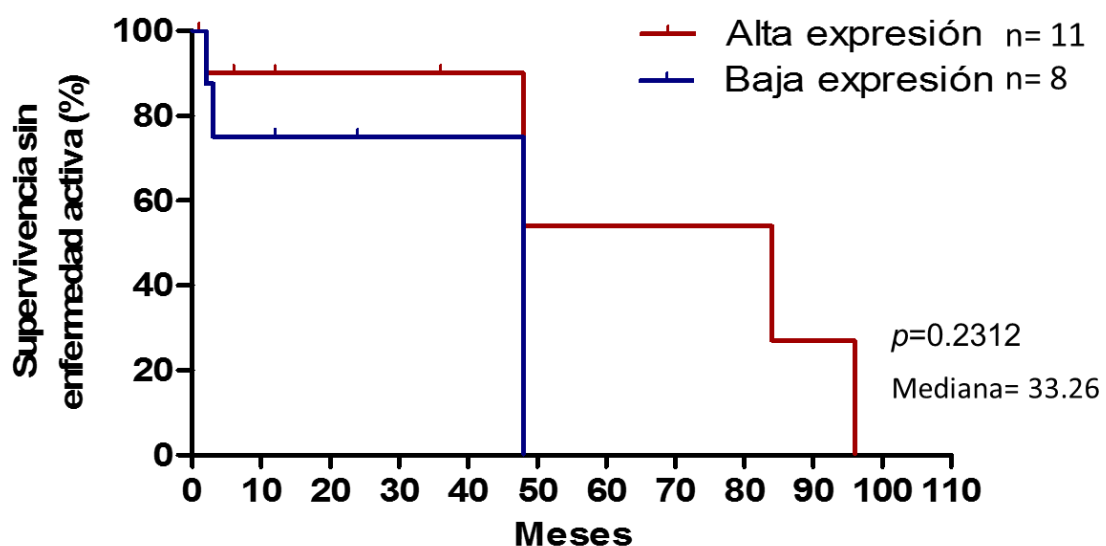
Para los pacientes 1, 4, 11 y 18, la expresión de la isoforma CYP1B1 fue mayor en el tejido adyacente en comparación con el tejido tumoral, razón por la cual el resultado del análisis  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  es menor a 1.

En cuanto al grupo de recaídas, es importante destacar que todas las muestras evaluadas tuvieron una mayor expresión de ésta isoforma en tejido tumoral en comparación con el tejido adyacente. En particular, las muestras de recaídas del paciente 1 muestran importantes veces de cambio en comparación con la muestra inicial (29 y 18 veces de cambio), al igual que en la recaída del paciente 18 (93 veces de cambio), en comparación de la muestra inicial, en la que la expresión de esta isoforma es mayor en el tejido adyacente. Estos resultados se pueden observar en la figura 18.



**Figura 18. La expresión génica relativa de CYP1B1 es mayor en el tejido tumoral en pacientes con STBNR.** Cada una de las barras muestran las veces de cambio en la expresión génica de CYP1B1 del tejido tumoral en comparación del tejido adyacente. Los pacientes se encuentran agrupados de acuerdo al subtipo histológico. Los números en el grupo de recaídas corresponden al número asignado del paciente cuando se analizó por primera vez.

Para la curva de sobrevivencia o Kaplan –Mayer, se utilizaron los valores de expresión génica para cada una de las isoformas evaluadas. Esta sobrevivencia está dada a un periodo de 5 años, durante los cuales se realizó el seguimiento de todos los pacientes. Se tomó en cuenta la supervivencia sin enfermedad activa de cada uno de los pacientes y como evento de falla al tratamiento la reincidencia, abandono del tratamiento, indicaciones terapéuticas paliativas y fallecimiento del paciente. En la figura 19 se observa que no se encontró diferencia estadística significativa en la sobrevivencia general de los pacientes y los valores de expresión altos y bajos para esta isoforma. Cabe señalar que el valor de mediana de la expresión obtenido en la población de muestras tumorales, fue utilizado como valor de corte para expresión alta y expresión baja.

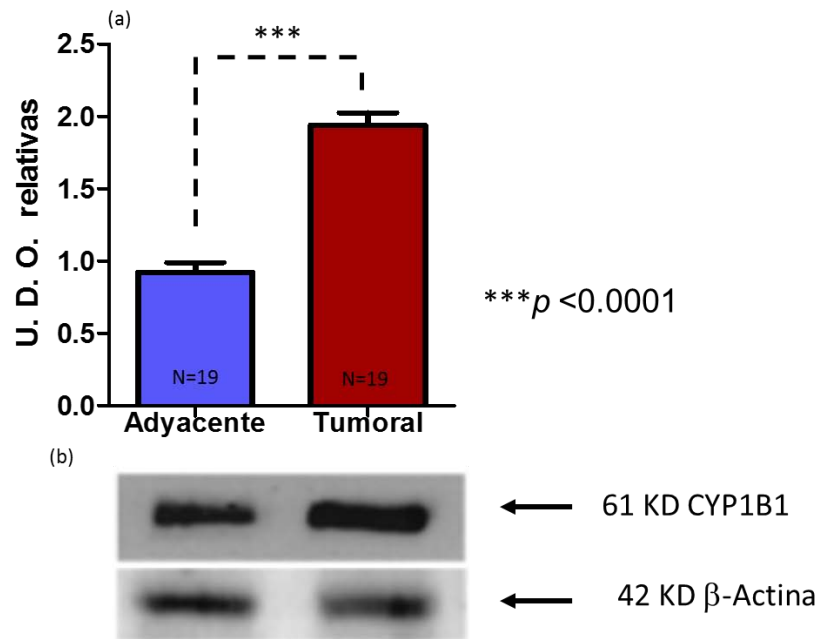


**Figura 19. No existe diferencia en la sobrevivencia sin enfermedad activa y expresión de CYP1B1.** La curva de Kaplan Meyer se construyó utilizando el valor de la mediana de la expresión génica como valor de corte entre expresión alta y baja.

También se realizó la evaluación de la abundancia proteica de CYP1B1 en las muestras de tejido adyacente y de tejido tumoral. La isoforma CYP1B1 fue detectada en ambos tipos de tejidos de todos los pacientes evaluados, excluyendo al grupo de las reincidencias. En el análisis mostrado en la figura 20, se encontró que existe una mayor abundancia proteica de CYP1B1 en tejidos tumorales en

comparación con tejidos adyacentes derivados de los pacientes diagnosticados con STBNR.

Cabe señalar que se emplearon las Unidades Densitométricas Ópticas (U. D. O.) derivadas del análisis densitométrico realizado con ayuda del software Quantity One.



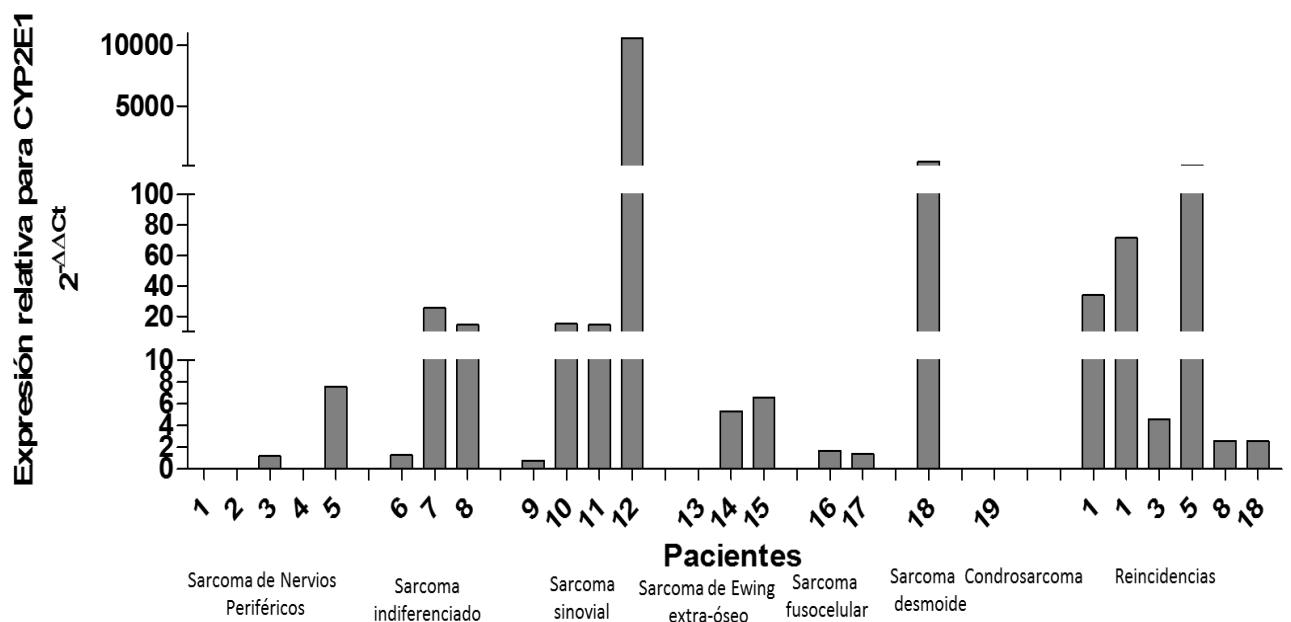
**Figura 20. Abundancia proteica de la isoforma CYP1B1.** (a) Se muestran las U. D. O. relativas del análisis densitométrico de las membranas obtenidas por los ensayos de Western Blot. El número de pacientes evaluados por grupo se encuentra dentro de las barras. (b) Se muestra una imagen representativa de una membrana con su correspondiente  $\beta$ -actina como control de carga.

## -EVALUACIÓN Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CYP2E1

Se realizó la evaluación de la expresión génica de CYP2E1 en las muestras de tejido adyacente y tejido tumoral a partir del mRNA obtenido de cada una de ellas. La expresión de esta isoforma se detectó en 16 muestras de tejido tumoral (84%) y en 14 muestras de tejido adyacente (73%). En el caso del grupo de recaídas, se detectó expresión de esta isoforma en todas las muestras tumorales y en 5 de las 6 muestras de tejido adyacente.

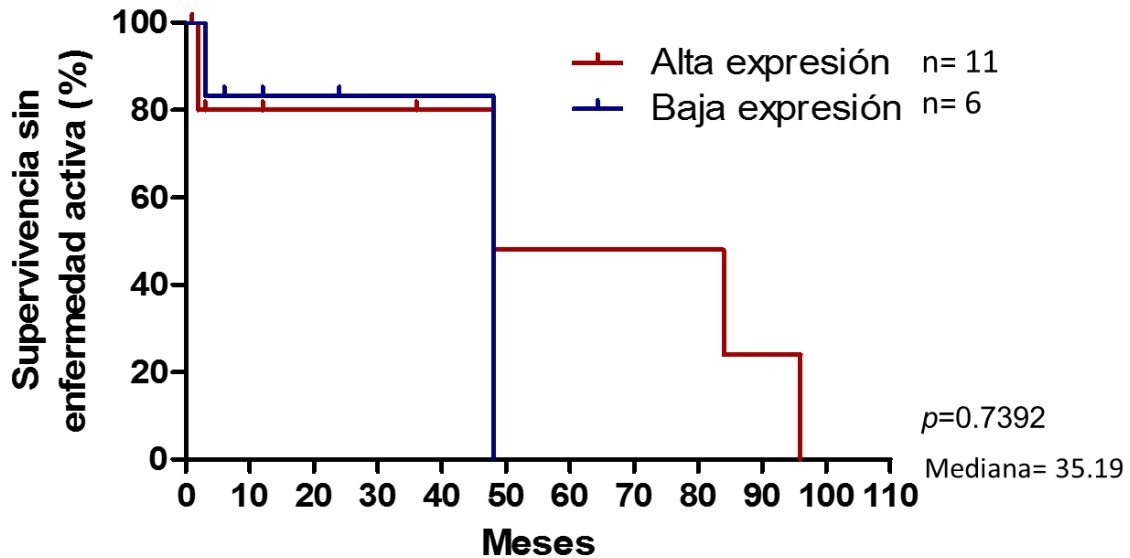
Al realizar el análisis  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  se observó que la expresión de esta isoforma en tejido tumoral es mayor en 13 pacientes (pacientes 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17 y 18). En el caso de los pacientes 1, 2, 9 y 19 se detectó una mayor cantidad de expresión génica en los tejidos adyacentes en comparación con el tejido tumoral. En los pacientes 4 y 13 no se detectó expresión de esta isoforma bajo el procedimiento realizado.

En cuanto al grupo de recaídas, se detectó en el paciente 1 mayor expresión del tejido tumoral (33 y 71 veces de cambio respectivamente), la recaída del paciente 3 mostró 4.5 veces de cambio con respecto a la muestra original y la del paciente 5 mostró 151 veces de cambio en dicha expresión. En el caso de los pacientes 8 y 18 el nivel de detección de esta isoforma fue menor en las recaídas al que se observó en la muestra original. La figura 21 muestra el resultado de dicho análisis.



**Figura 21. La expresión génica relativa de CYP2E1 es mayor en el tejido tumoral en 12 pacientes con STBNR y en todas las recaídas.** Cada una de las barras muestran las veces de cambio en la expresión génica de CYP2E1 del tejido tumoral en comparación del tejido adyacente. Los pacientes se encuentran agrupados de acuerdo al subtipo histológico. Los números en el grupo de recaídas corresponden al número asignado del paciente cuando se analizó por primera vez.

De acuerdo al análisis de sobrevida no se encontró diferencia estadística significativa entre los valores de expresión génica altos y bajos para esta isoforma. Cabe señalar que para este análisis sólo se realizó con 17 pacientes, debido a que en dos de ellos no se pudo detectar la expresión génica de esta isoforma.

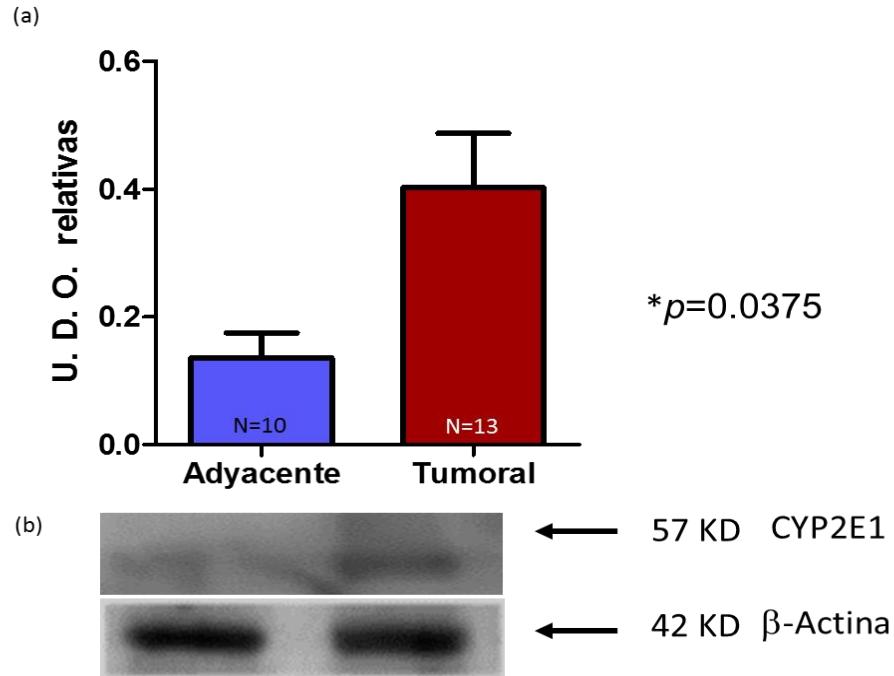


**Figura 22. No existe diferencia en la sobrevida sin enfermedad activa y expresión de CYP2E1.** La curva de Kaplan Meyer se construyó utilizando el valor de la mediana de la expresión génica como valor de corte entre expresión alta y baja.

También se realizó el análisis de los resultados de la evaluación de la abundancia proteica de CYP2E1 en muestras de tejido tumoral y adyacente de pacientes con diagnóstico de STBNR. En esta evaluación sólo se pudo evidenciar esta isoforma en 13 de las muestras de tejido tumoral y en 10 de las muestras de tejido adyacente.

El análisis reveló que existe una mayor abundancia de la isoforma CYP2E1 en muestras de tejido tumoral en comparación con muestras de tejido adyacente como puede observarse en la figura 23.



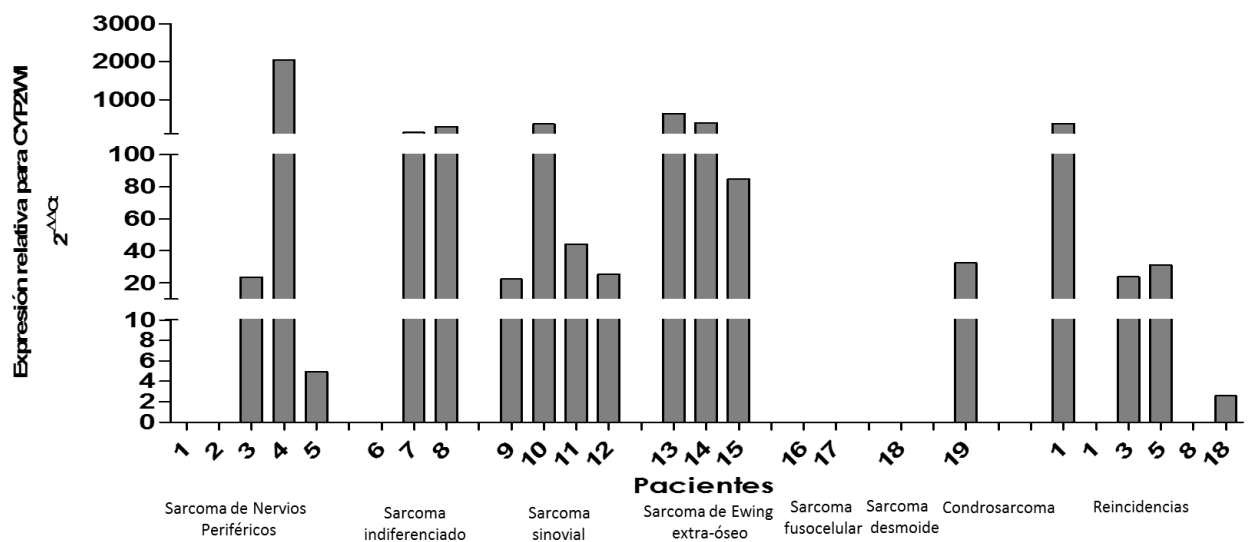


**Figura 23. La abundancia proteica de la isoforma CYP2E1 es mayor en las muestras de tejido tumoral que en las muestras adyacentes.** (a) Se muestran las U. D. O. relativas del análisis densitométrico de las membranas obtenidas por los ensayos de Western Blot. El número de pacientes evaluados por grupo se encuentra dentro de las barras. (b) se muestra una imagen representativa de una membrana con su correspondiente  $\beta$ -actina como control de carga.

## -EVALUACIÓN Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CYP2W1

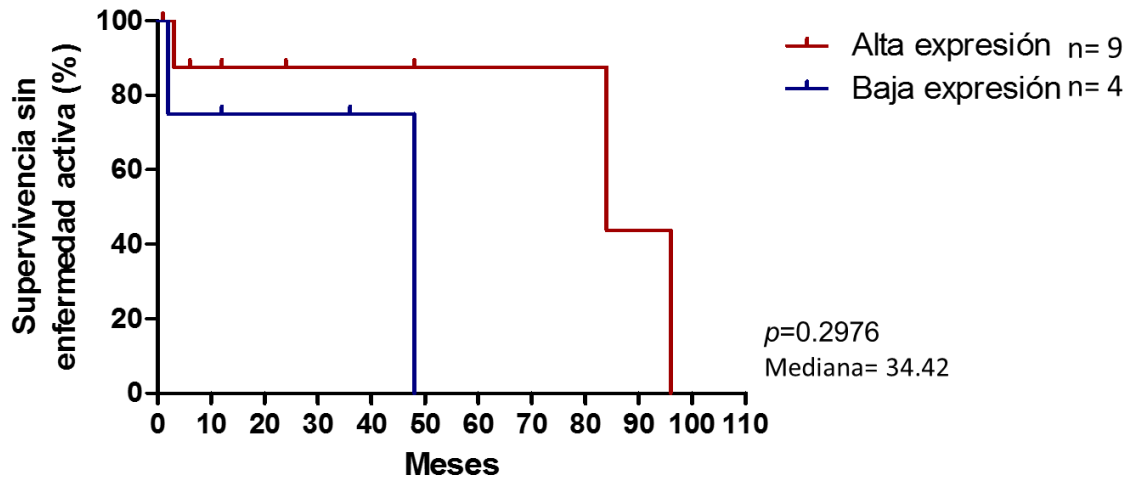
Para evaluar la expresión génica de la isoforma CYP2W1 tanto en muestras de tejido tumoral como de tejido adyacente se realizaron ensayos de qPCR, en los cuales se detectó expresión génica del CYP2W1 en 13 muestras de tejidos tumorales (pacientes 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 19) y solamente en una muestra de tejido adyacente (paciente 6), en la cual no se detectó expresión génica en el tejido adyacente y que pertenece al grupo con diagnóstico de Sarcoma Indiferenciado. Lo anterior queda destacado en el análisis  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Cabe señalar que ninguno de los pacientes con Sarcoma fusocelular (pacientes 16 y 17) y Sarcoma desmoide (paciente 18) se detectó expresión de esta isoforma en ninguno de los tejidos.

En el grupo de las recaídas, el paciente 1 presenta 372 veces de cambio la expresión de esta isoforma en comparación con el tejido adyacente en la primera recaída, sin embargo, en la segunda recaída, este fenómeno ya no se observa. En la recaída del paciente 3 las veces de cambio se mantienen constantes a lo observado en la muestra original, mientras que en el paciente 5, la expresión de esta isoforma aumenta en la recaída (31 veces de cambio) en comparación con lo que se observó en la muestra original. Para el paciente 8, ésta expresión disminuyó en la recaída y en el paciente 18 contrario a lo observado en la muestra original dicha expresión aumentó (2.6 veces de cambio). Los resultados de este análisis pueden observarse en la figura 24.



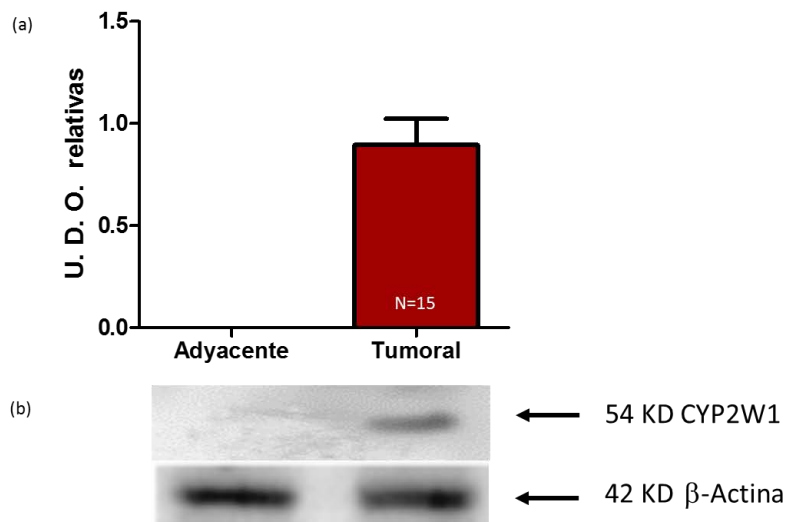
**Figura 24. La expresión génica relativa de CYP2W1 es mayor en el tejido tumoral en 13 pacientes con STBNR y en la mayoría de las recaídas.** Cada una de las barras muestran las veces de cambio en la expresión génica de CYP2W1 del tejido tumoral en comparación del tejido adyacente. Los pacientes se encuentran agrupados de acuerdo al subtipo histológico. Los números en el grupo de recaídas corresponden al número asignado del paciente cuando se analizó por primera vez.

En la construcción de la curva Kaplan-Meier para evaluar la sobrevida de los pacientes con diagnóstico de STBNR, sólo se tomaron en cuenta a los pacientes que en los que se detectó expresión génica de la isoforma CYP2W1, utilizando el valor de la mediana como punto de corte entre la expresión alta y baja, de esta manera solo 9 pacientes se encuentran en el grupo de alta expresión y 4 pacientes en el grupo de baja expresión. A pesar que se observan diferencias en la sobrevida de los pacientes con alta y baja expresión génica del CYP2W1, éstas no son significativas, como puede observarse en la figura 25.



**Figura 25. Sobrevida sin enfermedad activa y expresión de CYP2W1.** La curva de Kaplan Meyer se construyó utilizando el valor de la mediana como valor de corte entre expresión génica alta y baja.

En cuanto a la evaluación de la abundancia proteica de la isoforma CYP2W1 en muestras de tejido adyacente y tumoral, hubo detección de esta proteína en 15 muestras de tejido tumoral sin observarse detección en ninguna de las muestras de tejido adyacente. Lo anterior queda ejemplificado en la figura 26.



**Figura 26. Abundancia proteica de la isoforma CYP2W1.** (a) Se muestran las U. D. O. relativas del análisis densitométrico de las membranas obtenidas por los ensayos de Western Blot. El número de pacientes evaluados por grupo se encuentra dentro de la barra. (b) Se muestra una imagen representativa de una membrana con su correspondiente  $\beta$ -actina como control de carga.

## .-EVALUACIÓN Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CYP3A4

La evaluación de la expresión génica de la isoforma CYP3A4 se detectó a través de ensayos de qPCR, los cuales, evidenciaron que hubo detección de la expresión de CYP3A4 en 17 de las muestras de tejido tumoral y tejido adyacente (89%). En los pacientes 12 (Sarcoma sinovial) y 17 (Sarcoma fusocelular) no se detectó expresión de esta isoforma en ninguno de los tejidos analizados. En cuanto a las recaídas se refiere, no se pudo detectar dicha expresión génica únicamente en las muestras de los pacientes 8 y 18.

Al realizar el análisis  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  se observa que en 11 individuos (pacientes 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14 y 18) es mayor la expresión en tejido tumoral en comparación con el tejido adyacente (58%), mientras que en 6 sujetos (pacientes 1, 2, 11, 15, 16 y 19) la expresión de esta isoforma fue mayor en tejido adyacente.

En cuanto a las recaídas se refiere, el paciente 1 presentó mayor expresión a lo largo del tiempo, en comparación con la muestra original (23 y 116 veces de cambio, respectivamente), lo que sucede de manera similar con la muestra de recaída del paciente 3. No obstante, en la recaída del paciente 5 ocurre lo contrario, al disminuir la expresión en tejido tumoral. En las recaídas de los pacientes 8 y 18 no se detectó expresión génica de esta isoforma. Este análisis se encuentra representado en la figura 27.

La figura 28 muestra que no existen diferencias significativas entre la supervivencia de los pacientes con STBNR que presentan una alta expresión de CYP3A4 y los pacientes que presentan una baja expresión de esta isoforma.

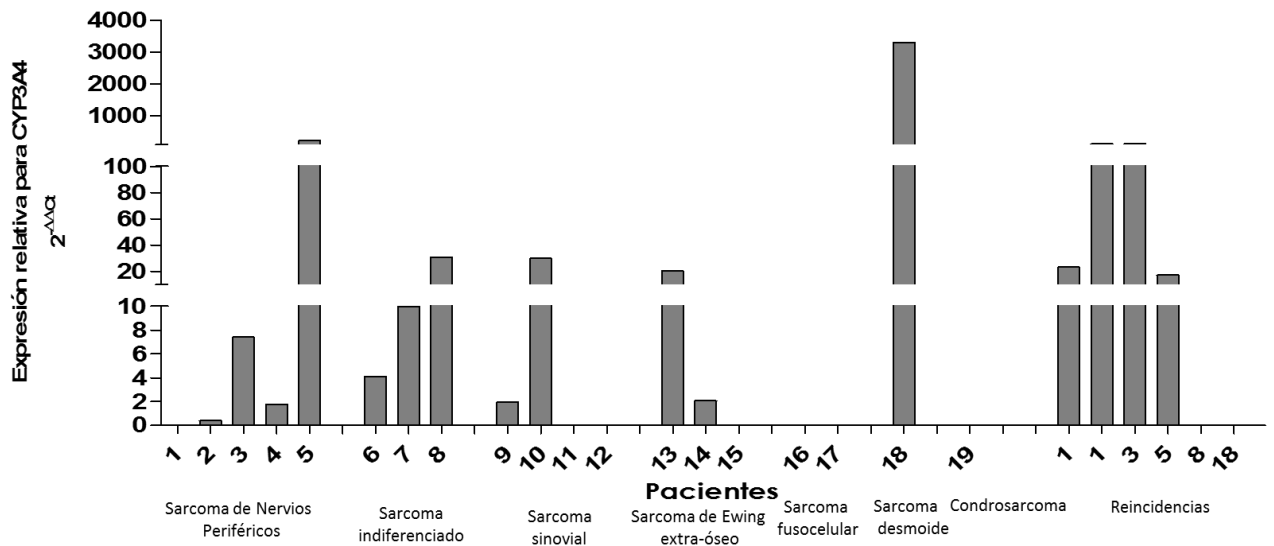


Figura 27. La expresión génica relativa de CYP3A4 es mayor en el tejido tumoral en 12 pacientes con STBNR y en la mayoría de las recaídas. Cada una de las barras muestran las veces de cambio en la expresión génica de CYP3A4 del tejido tumoral en comparación del tejido adyacente. Los pacientes se encuentran agrupados de acuerdo al subtipo histológico. Los números en el grupo de recaídas corresponden al número asignado del paciente cuando se analizó por primera vez.

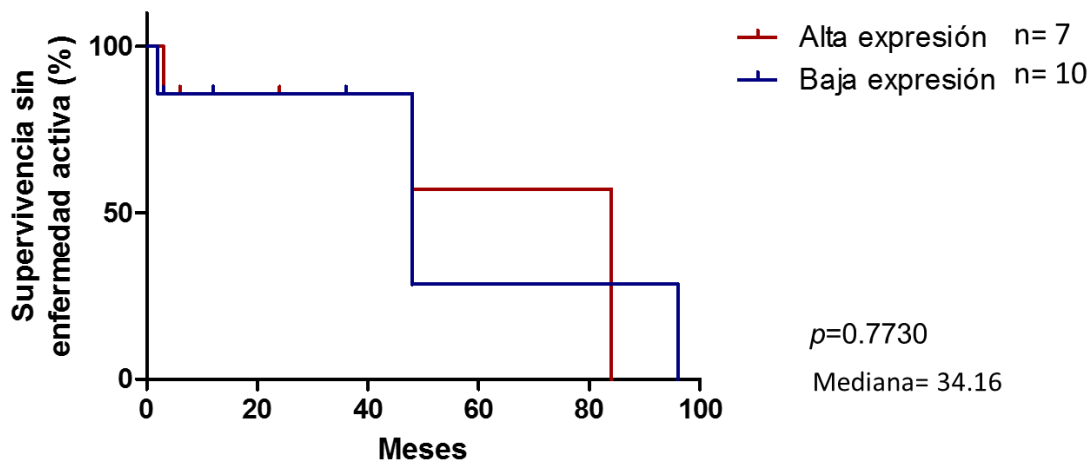
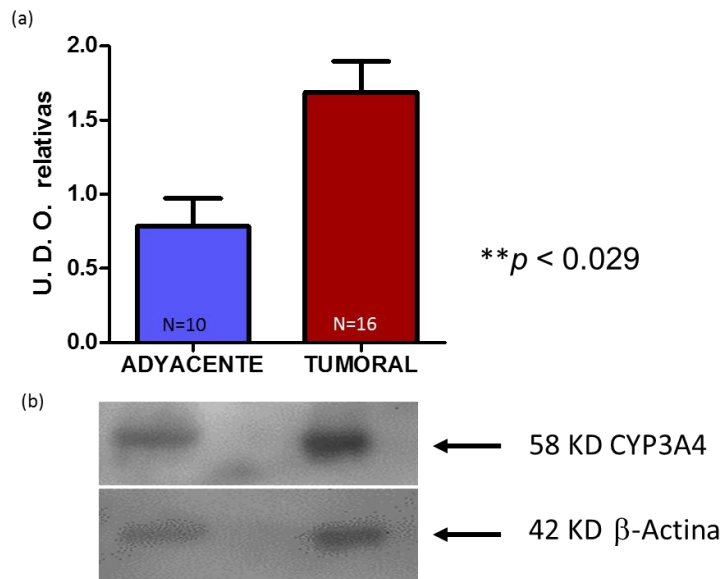


Figura 28. No existen diferencias en la supervivencia sin enfermedad activa y expresión de CYP3A4. La curva de Kaplan Meyer se construyó utilizando la mediana como valor de corte entre expresión alta y baja.

La evaluación de la abundancia proteica de CYP3A4 se realizó a través de ensayos de Western Blot en las muestras de tejido tumoral y adyacente de pacientes con diagnóstico de STBNR. La abundancia de esta isoforma pudo ser detectada en 16

muestras de tejido tumoral y en 10 muestras de tejido adyacente. El análisis de los valores obtenidos por esta evaluación muestra que es mayor la abundancia de CYP3A4 en muestras de tejidos tumorales en comparación con las muestras de tejidos adyacentes, tal como se puede observar en la figura 29.



**Figura 29. La expresión proteica de la isoforma CYP3A4 es mayor en tejido tumoral.** (a) Se muestran las U. D. O. relativas del análisis densitométrico de las membranas obtenidas por los ensayos de Western Blot. El número de pacientes evaluados por grupo se encuentra dentro de la barra. (b) Se muestra una imagen representativa de una membrana con su correspondiente  $\beta$ -actina como control de carga.

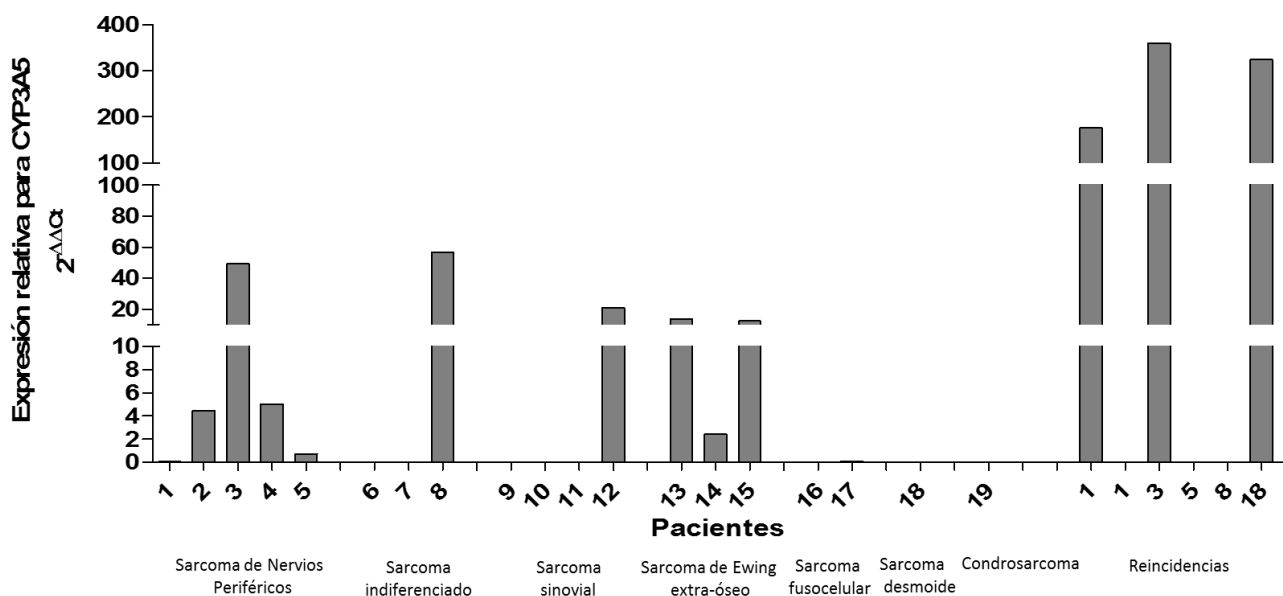
## -EVALUACIÓN Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CYP3A5

La evaluación de la expresión génica de CYP3A5 en muestras de tejido tumoral y tejido adyacente se realizó por medio de ensayos de qPCR.

Estos ensayos nos permitieron detectar a la isoforma CYP3A5 en 15 muestras de tejidos tumorales y adyacentes de los pacientes evaluados en este estudio. En los pacientes 6, 10, 11 y 18 no se detectó la expresión de esta isoforma.

Al elaborar el análisis  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , se detectó sólo en 8 individuos (pacientes 2, 3, 4, 8, 12, 13, 14 y 15) mayor expresión génica en la muestra de tejido tumoral en comparación con tejido adyacente. Lo contrario sucedió en 7 individuos (pacientes 1, 5, 7, 9, 16, 17 y 19), en donde se detectó una mayor expresión de esta isoforma en tejido adyacente en comparación con el tejido tumoral.

En cuanto a las recaídas, el paciente 1 muestra una mayor expresión en el tejido tumoral únicamente en la primera recaída, en comparación con la muestra original, lo mismo que sucede con el paciente 3 y el paciente 18. En las muestras de recaída de los pacientes 5 y 8 no hubo detección en ninguno de los dos tejidos. Este análisis se muestra en la figura 30.



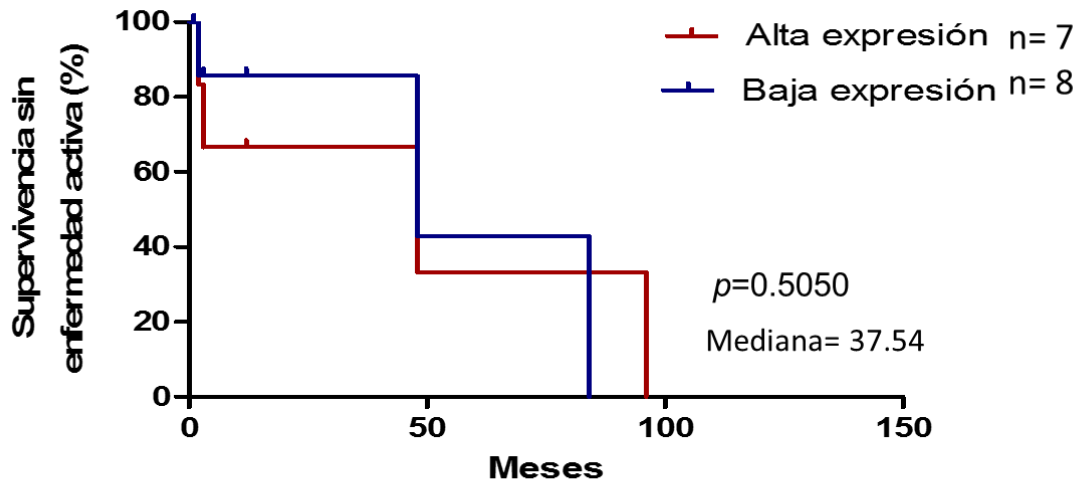
**Figura 30. La expresión génica relativa de CYP3A5 es mayor en el tejido tumoral en 9 pacientes con STBNR y en la mitad de las recaídas.** Cada una de las barras muestran las veces de cambio en la expresión génica de CYP3A5 del tejido tumoral en comparación del tejido adyacente. Los pacientes se encuentran agrupados de acuerdo al subtipo histológico. Los números en el grupo de recaídas corresponden al número asignado del paciente cuando se analizó por primera vez.

Al realizar el análisis de supervivencia sólo se tomaron en cuenta los pacientes en los que se detectó la expresión de dicha isoforma, quedando 7 pacientes en el grupo de alta expresión y 8 pacientes en el grupo de baja expresión, sin embargo, no se encontraron diferencias entre estos grupos de expresión génica para la isoforma CYP3A5, tal como puede observarse en la figura 31.

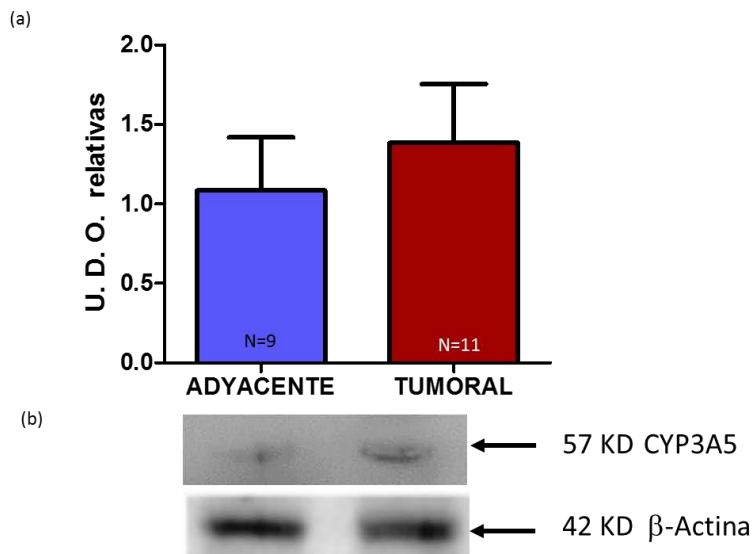
La abundancia proteica de CYP3A5 en las muestras de tejido tumoral y adyacente se pudo evidenciar gracias a la técnica de Western Blot.

El análisis de los valores obtenidos en dicha evaluación indica que existe una sutil tendencia de mayor abundancia de CYP3A5 en las muestras de tejido tumoral en

comparación con las muestras de tejido adyacente, sin embargo, dicha diferencia no es estadísticamente diferente (figura 32).



**Figura 31. No existen diferencias en la sobrevida sin enfermedad activa y expresión de CYP3A5.** La curva de Kaplan Meyer se construyó utilizando la mediana como valor de corte entre expresión alta y baja.



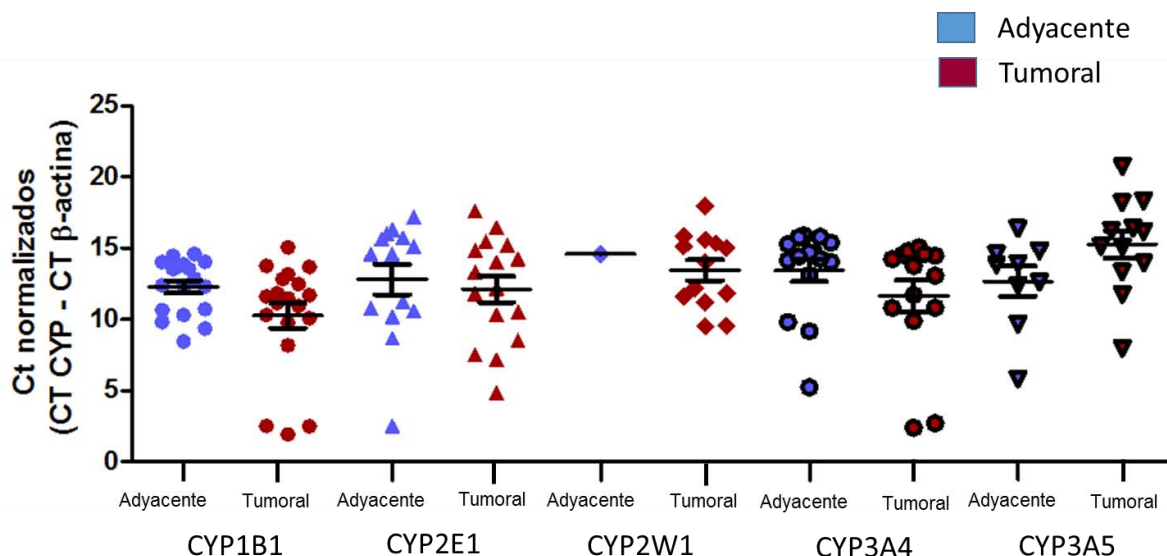
**Figura 32. No existen diferencias significativas en la abundancia proteica de la isoforma CYP3A5.** (a) Se muestran las U. D. O. relativas del análisis densitométrico de las membranas obtenidas por los ensayos de Western Blot. (b) se muestra una imagen representativa de una membrana con su correspondiente β-actina como control de carga.



## -EXPRESIÓN GÉNICA INTERINDIVIDUAL EN LAS ISOFORMAS EVALUADAS

En la figura 33 se pueden observar los valores de Ct normalizados con el valor correspondiente del control endógeno,  $\beta$ -actina, en todas las muestras tanto de tejido tumoral como de tejido adyacente agrupadas para cada una de las isoformas evaluadas.

Cabe señalar que en la isoforma CYP2W1 sólo se detectó expresión en 1 muestra de tejido adyacente, en el resto de las isoformas se detectó expresión tanto en muestras de tejido tumoral como en muestras de tejido adyacente evaluadas, siendo en la mayoría de las isoformas, excepto en CYP3A5, que la expresión de éstas es mayor en tejido tumoral en comparación con tejido adyacente y recordando que se graficaron valores de CT, los cuales son inversamente proporcionales a la cantidad observada.



**Figura 33. Valores de CT para cada isoforma del CYP normalizados con  $\beta$ -actina.**

Los valores de CT obtenidos para CYP en cada muestra fueron normalizados con el correspondiente valor de CT de  $\beta$ -actina. Cada símbolo representa el promedio de 3 ensayos realizados por muestra.

## -ASOCIACIÓN DE LAS ISOFORMAS EVALUADAS CON LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES.

Los resultados de expresión génica y abundancia proteica fueron agrupados por género (femenino: 7 pacientes, masculino: 12 pacientes), también los resultados

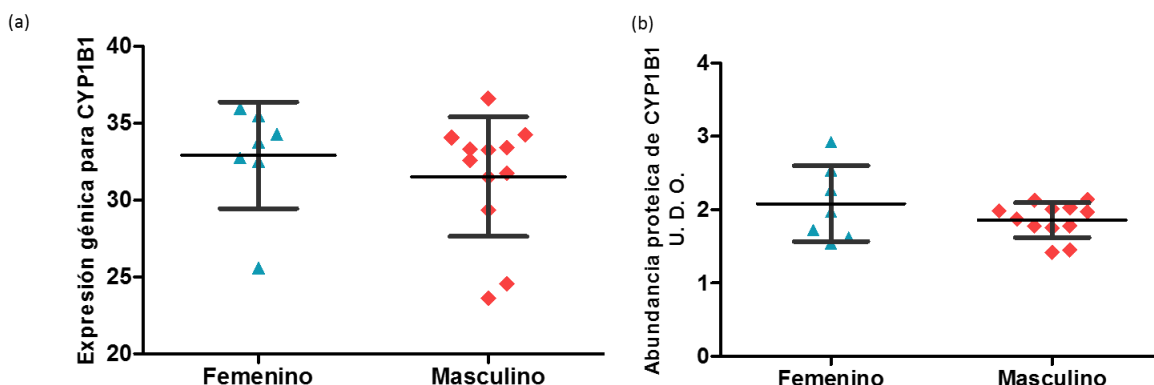
fueron clasificados en dos grupos por edad, 9 años fue el valor de corte entre ambos grupos (menores de 9 años: 9 pacientes, mayores de 9 años: 10 pacientes). Del mismo modo, dichos resultados fueron agrupados de acuerdo al grupo clínico al que fueron catalogados cada uno de los pacientes evaluados en este estudio por parte del grupo de Oncólogos adscritos al Servicio de Oncología del Instituto Nacional de Pediatría.

Cabe señalar, que los pacientes fueron clasificados de acuerdo al sistema de “agrupación por etapas”, en la cual existen 4 grupos principales.

Debido a la baja frecuencia de algunos de los grupos se consideró hacer solo 2 conjuntos: Grupo I, II y II, Grupo IV, en el primer grupo se clasificaron a 9 pacientes mientras que en el segundo grupo están clasificados 10 pacientes.

⌘ Asociaciones con el género:

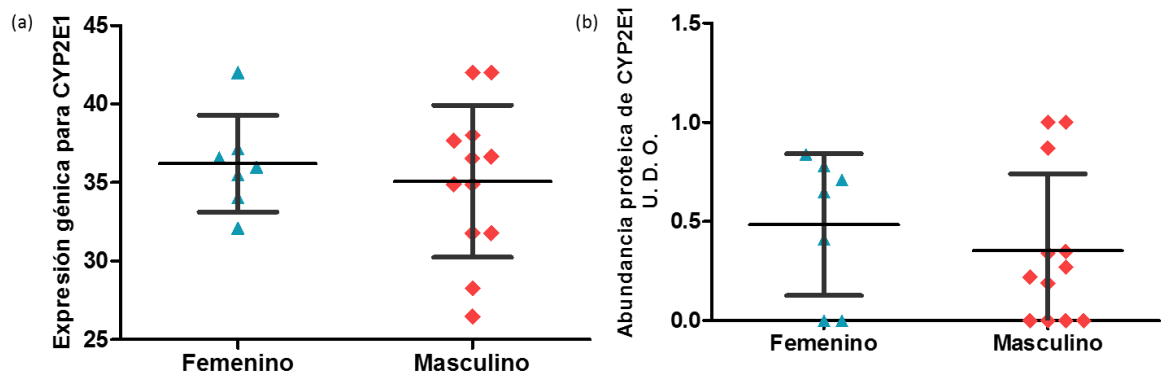
La figura 34 muestra las asociaciones para la isoforma CYP1B1 y el género de los pacientes, en la que se puede observar que la expresión génica y abundancia proteica es ligeramente mayor en el grupo de pacientes femenino en comparación con los pacientes masculinos.



**Figura 34. No se encuentran diferencias entre la asociación de la expresión génica y la abundancia proteica de CYP1B1 y el género femenino y masculino.**

(a) Los resultados de cada pacientes en expresión génica y (b) en abundancia proteica se agruparon en los géneros femenino y masculino. Los valores de  $p$  fueron: 0.4344 y 0.3150 en cada caso correspondiente.

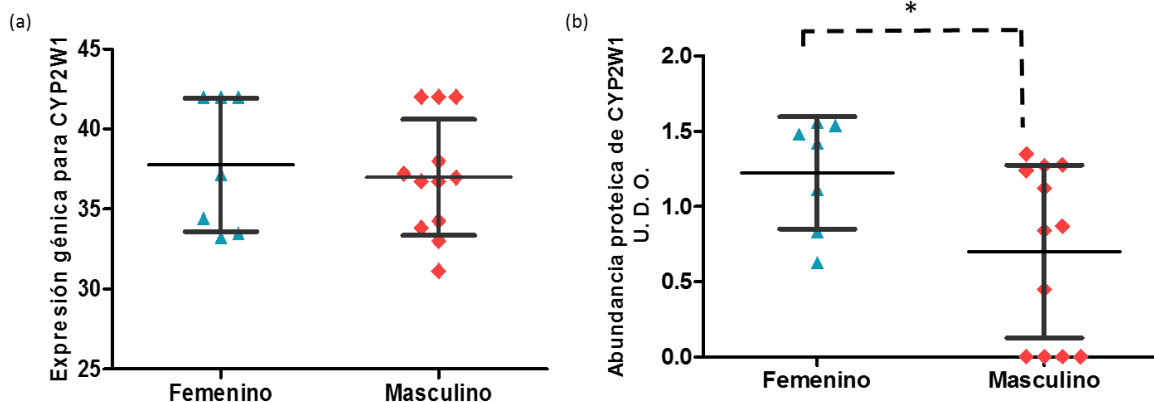
Para la isoforma CYP2E1, tanto la expresión génica y abundancia proteica es ligeramente mayor en el grupo del género femenino, sin ser significativamente diferente, tal como se muestra en la figura 35.



**Figura 35. No se encuentran diferencias entre la asociación de la expresión génica y la abundancia proteica de CYP2E1 y los géneros masculino y femenino.**

(a) Los resultados de expresión génica y (b) los de abundancia proteica se agruparon en los géneros femenino y masculino. Los valores de  $p$  fueron: 0.5453 y 0.4648 en cada caso correspondiente

La figura 36 nos muestra las asociaciones con los resultados de expresión génica y abundancia proteica para la isoforma CYP2W1, siendo mayor la abundancia proteica en el grupo femenino. En cuanto a la expresión génica, al igual que en las isoformas anteriores solo se observa ligeramente superior la expresión en el grupo femenino, sin observarse diferencia estadística.

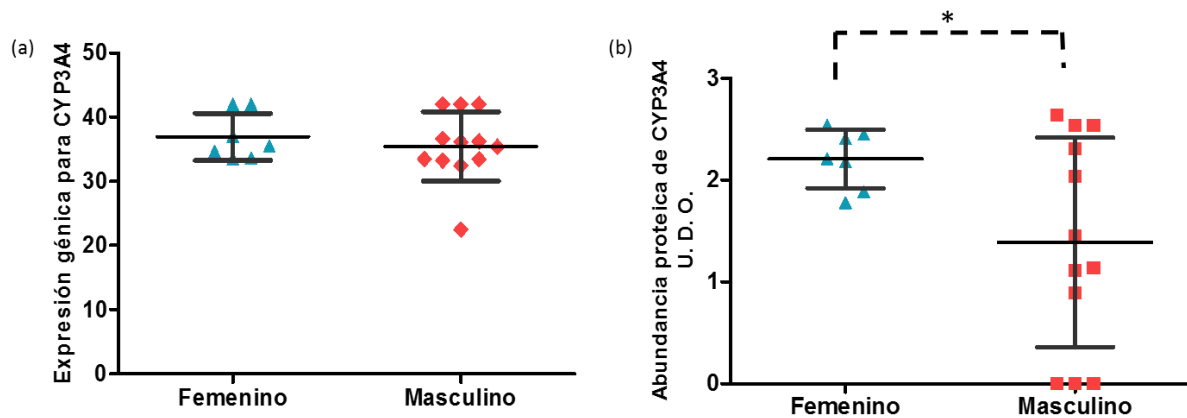


**Figura 36. La abundancia proteica de CYP2W1 es mayor en el género femenino que en el masculino.**

(a) Los resultados de expresión génica y (b) los de abundancia proteica se agruparon en los géneros femenino y masculino. Los valores de  $p$  fueron: 0.6908 y 0.0289 en cada caso correspondiente. \* $p < 0.05$

Para los resultados de la isoforma CYP3A4 agrupados por género se puede observar que hay una mayor abundancia proteica en el grupo de pacientes femenino

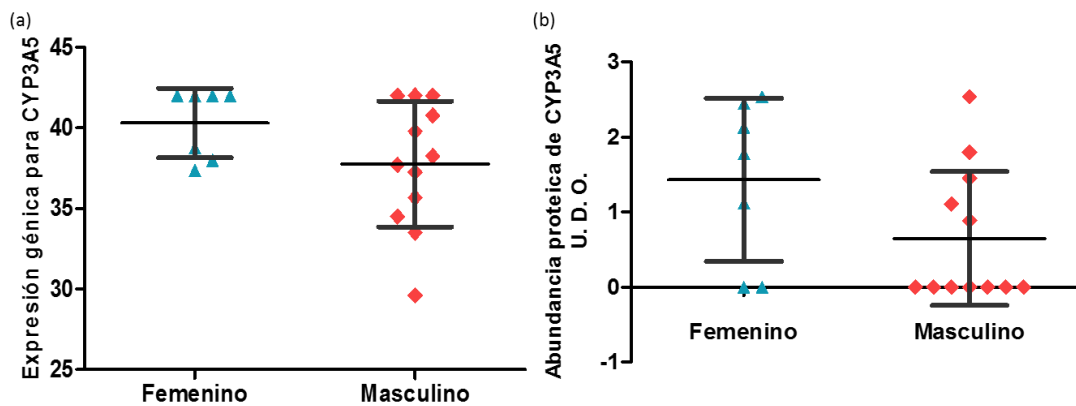
en comparación con el grupo masculino. En cuanto a la expresión génica sólo se observa una tendencia ligeramente mayor también en el grupo femenino (figura 37).



**Figura 37. La abundancia proteica de CYP3A4 es mayor en el género femenino que en el masculino.**

(a) Los resultados de expresión génica y (b) los de abundancia proteica se agruparon en los géneros femenino y masculino. Los valores de  $p$  fueron: 0.4921 y 0.0224 en cada caso correspondiente. \* $p < 0.05$

La expresión de la isoforma CYP3A5 repite el mismo patrón observado en las isoformas anteriores sin ser una diferencia estadísticamente significativa. La figura 38 representa dichas asociaciones.

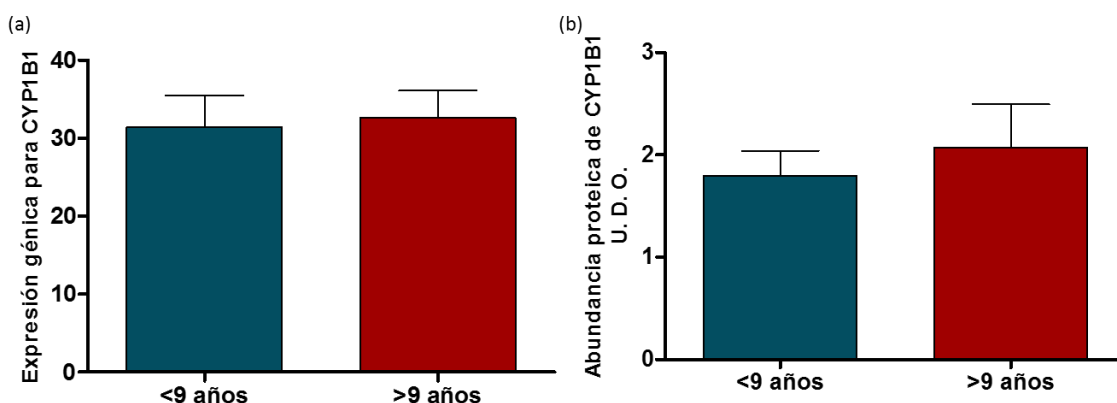


**Figura 38. No se encuentran diferencias entre la asociación de la expresión génica y la abundancia proteica de CYP3A5 y los géneros masculino y femenino.**

(a) Los resultados de expresión génica y (b) los de abundancia proteica se agruparon en los géneros femenino y masculino. Los valores de  $p$  fueron: 0.0844 y 0.1375 en cada caso correspondiente

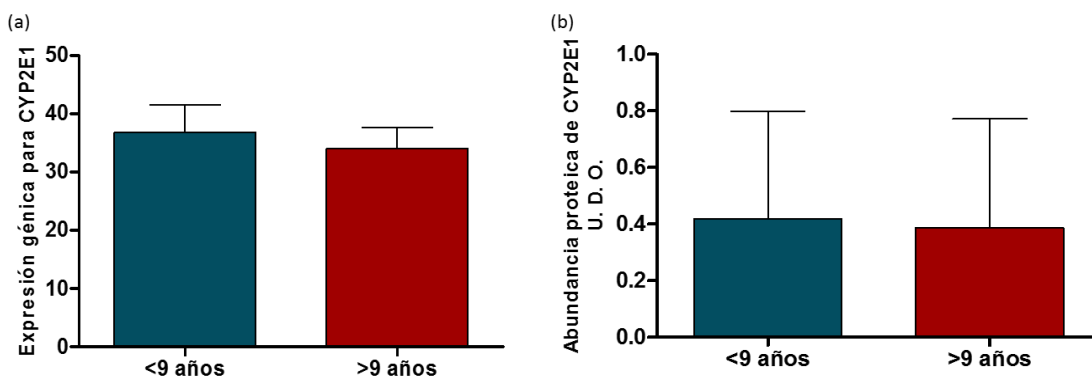
### ⌘ Asociaciones con edad:

En cuanto a las asociaciones de la isoforma CYP1B1 con la edad de los pacientes, en la figura 39, sólo se observa una abundancia proteica levemente mayor en el grupo de pacientes mayores a 9 años, mientras que en la expresión génica no se observan diferencias en ambos grupos.



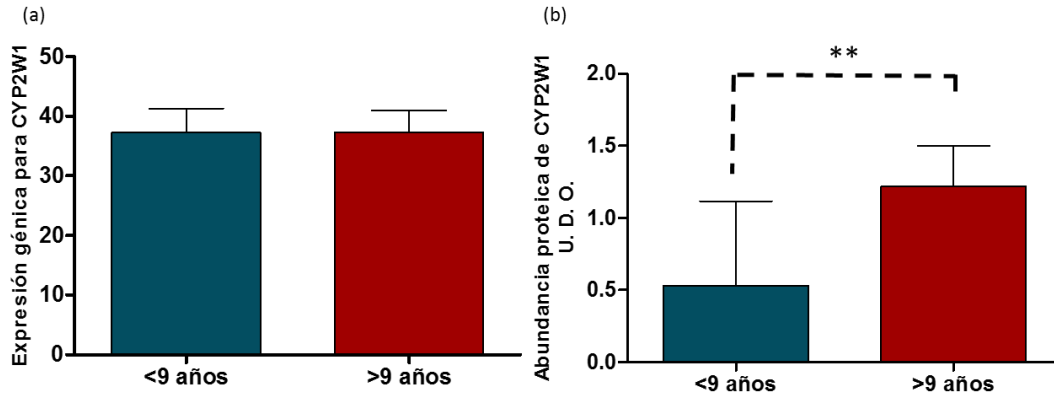
**Figura 39. No se encuentran diferencias entre la asociación de la expresión génica y la abundancia proteica de CYP1B1 y la edad de los pacientes.** (a) Los resultados de expresión génica y (b) los de abundancia proteica se agruparon en dos grupos: pacientes menores de 9 años y pacientes mayores a dicha edad. Los valores de  $p$  fueron: 0.0844 y 0.0998 en cada caso correspondiente

Mientras que para la isoforma CYP2E1 sucede lo contrario a la isoforma antes mencionada, tanto para la expresión génica como para la abundancia proteica se observan ligeras tendencias mayores en los grupos de pacientes menores de 9 años (figura 40).



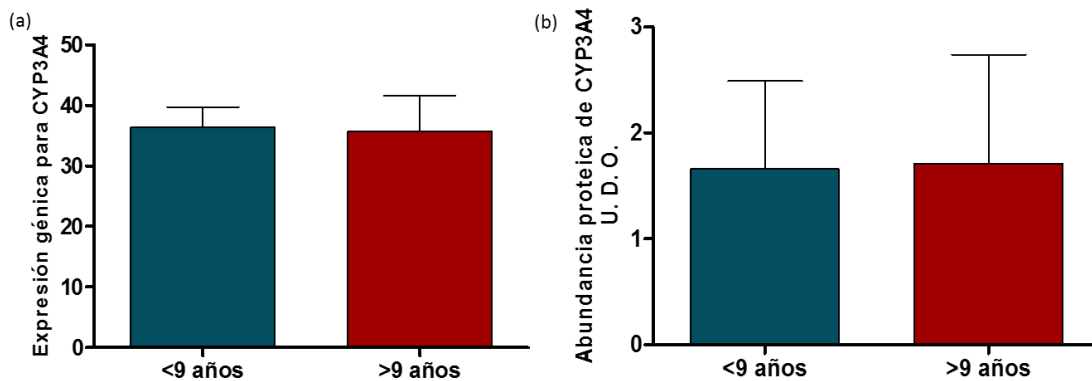
**Figura 40. No se encuentran diferencias entre la asociación de la expresión génica y la abundancia proteica de CYP2E1 y la edad de los pacientes.** (a) Los resultados de expresión génica y (b) los de abundancia proteica se agruparon en dos grupos: pacientes menores de 9 años y pacientes mayores a dicha edad. Los valores de  $p$  fueron: 0.1741 y 0.8632 en cada caso correspondiente.

En la figura 41, la expresión génica de la isoforma CYP2W1 se observa de manera similar en ambos grupos de edad, mientras que para la abundancia proteica es mayor para el grupo de pacientes mayores a 9 años.



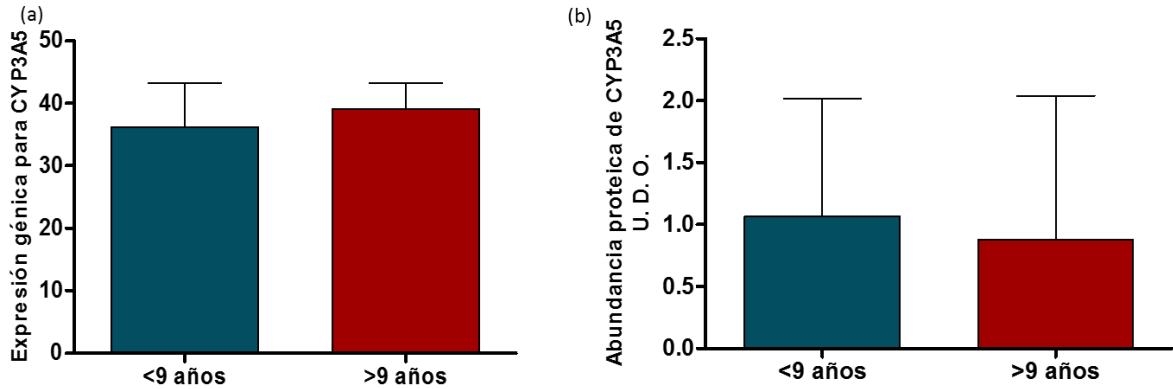
**Figura 41. La abundancia proteica de CYP2W1 es mayor en los pacientes mayores de 9 años.** (a) Los resultados de expresión génica y (b) los de abundancia proteica se agruparon en dos grupos: pacientes menores de 9 años y pacientes mayores a dicha edad. Los valores de  $p$  fueron: 0.9799 y 0.0082 en cada caso correspondiente.  $**p<0.01$

Mientras que para la isoforma CYP3A4, tanto en la expresión génica como la abundancia proteica es similar en ambos grupos de edad (figura 42).



**Figura 42. No se encuentran diferencias entre la asociación de la expresión génica y la abundancia proteica de CYP3A4 y la edad de los pacientes.** (a) Los resultados de expresión génica y (b) los de abundancia proteica se agruparon en dos grupos: pacientes menores de 9 años y pacientes mayores a dicha edad. Los valores de  $p$  fueron: 0.7569 y 0.9064 en cada caso correspondiente.

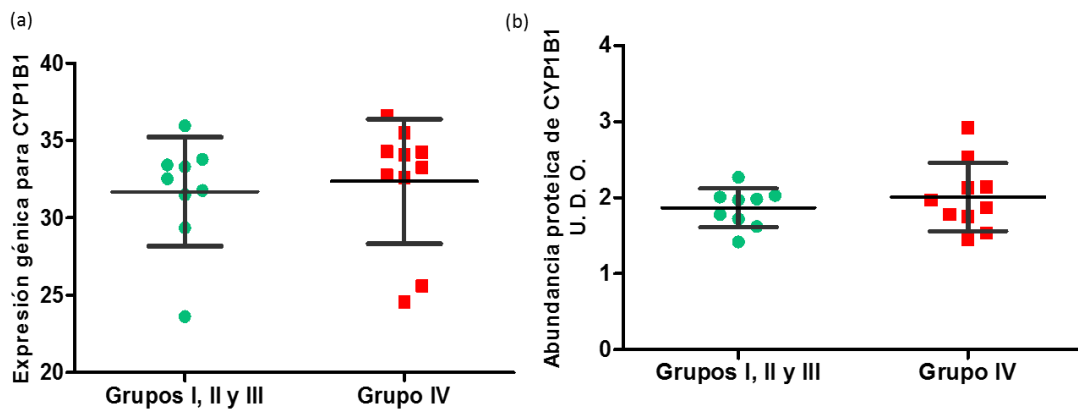
Finalmente en la figura 43, en la asociación de la expresión génica se observa ligeramente mayor dicha expresión en el grupo de pacientes mayores a 9 años, mientras que en la abundancia proteica se observa la tendencia contraria.



**Figura 43. No se encuentran diferencias entre la asociación de la expresión génica y la abundancia proteica de CYP3A5 y la edad de los pacientes.** (a) Los resultados de expresión génica y (b) los abundancia proteica se agruparon en dos grupos: pacientes menores de 9 años y pacientes mayores a dicha edad. Los valores de  $p$  fueron: 0.3087 y 0.7038 en cada caso correspondiente.

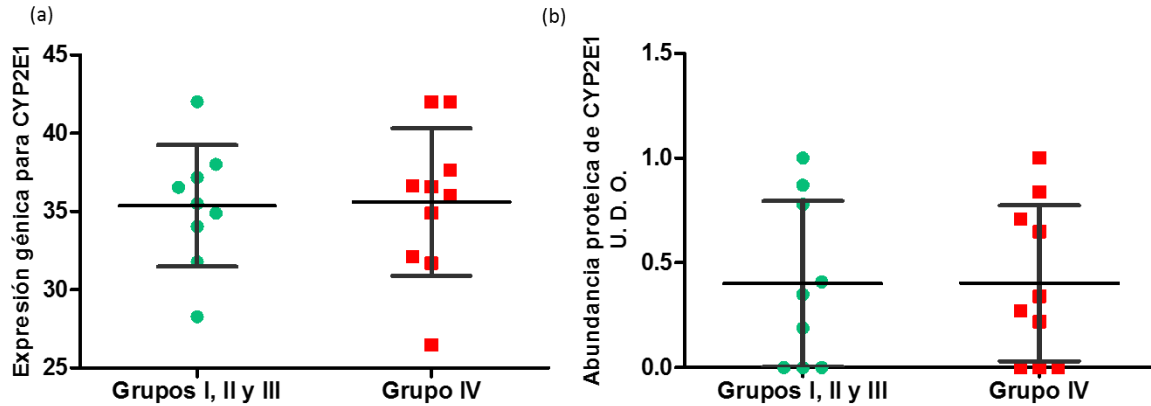
⌘ Asociaciones con grupo clínico:

En la asociación de la expresión génica y abundancia proteica de la isoforma CYP1B1 se encuentran niveles semejantes en ambos grupos (figura 44).



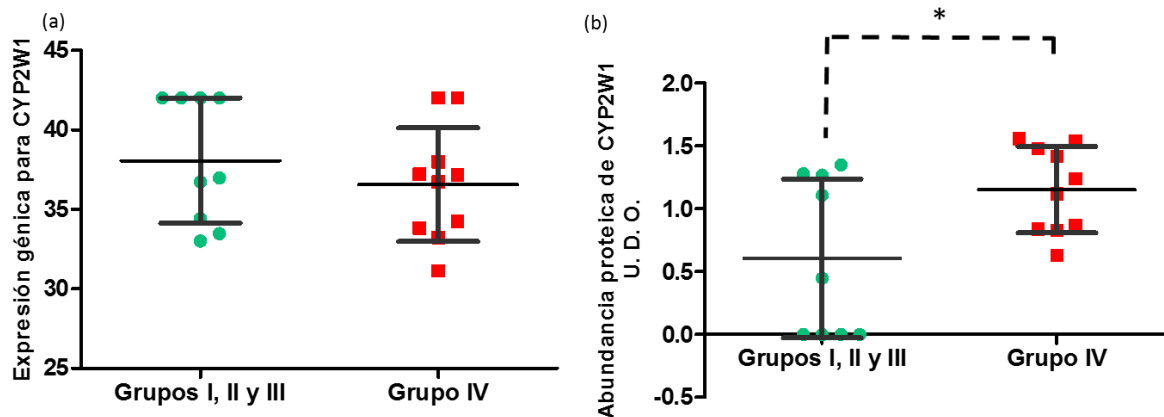
**Figura 44. No se encuentran diferencias entre la asociación de la expresión génica y la abundancia proteica de CYP1B1 y el grupo clínico de los pacientes.** (a) Los resultados de expresión génica y (b) los de abundancia proteica se agruparon en dos grupos: pacientes en grupos clínicos I, II y III y pacientes en grupos clínicos IV. Los valores de  $p$  fueron: 0.7089 y 0.4047 en cada caso correspondiente.

De la misma manera sucede en la isoforma CYP2E1, lo que se ve ilustrado en la figura 45.



**Figura 45. No se encuentran diferencias entre la asociación de la expresión génica y la abundancia proteica de CYP2E1 y el grupo clínico de los pacientes.** (a) Los resultados de expresión génica y (b) los de abundancia proteica se agruparon en dos grupos: pacientes en grupos clínicos I, II y III y pacientes en grupos clínicos IV. Los valores de  $p$  fueron: 0.9030 y 0.9867 en cada caso correspondiente.

Sin embargo, para la isoforma CYP2W1 se observa una mayor abundancia proteica en los pacientes que pertenecen al grupo IV, con respecto a los otros grupos clínicos. En cambio, se observa una ligera tendencia mayor en los grupos clínicos I, II y III con respecto al grupo clínico IV en la expresión génica, sin llegar a ser estadísticamente diferente (figura 46).

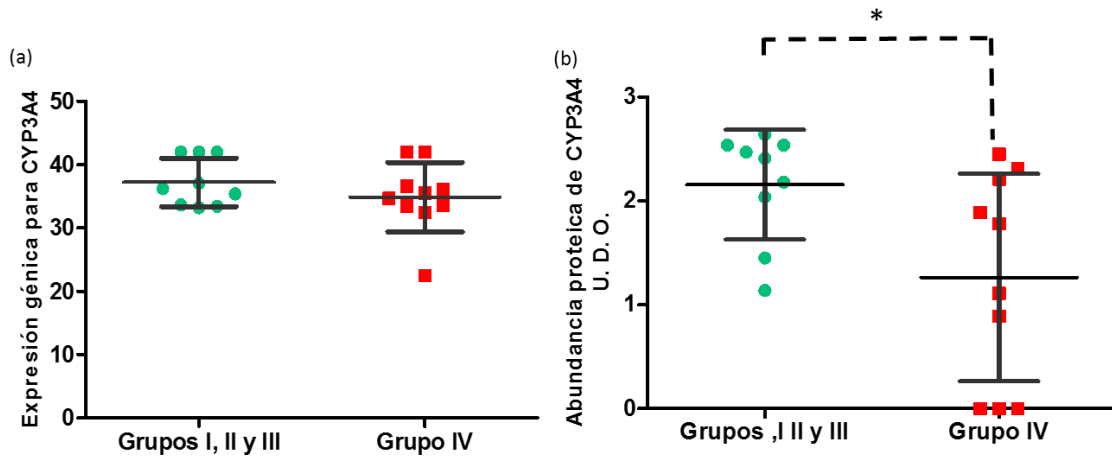


**Figura 46. La abundancia proteica de CYP2W1 es mayor en los pacientes del grupo clínico IV.** (a) Los resultados de expresión génica y (b) los de abundancia proteica se agruparon en dos grupos: pacientes en grupos clínicos I, II y III y pacientes en grupos clínicos IV. Los valores de  $p$  fueron: 0.3960 y 0.0398 en cada caso correspondiente. \* $p < 0.05$

Para la isoforma CYP3A4 también se observa una mayor abundancia proteica en los pacientes que pertenecen a los grupos clínicos I, II y III con respecto al grupo

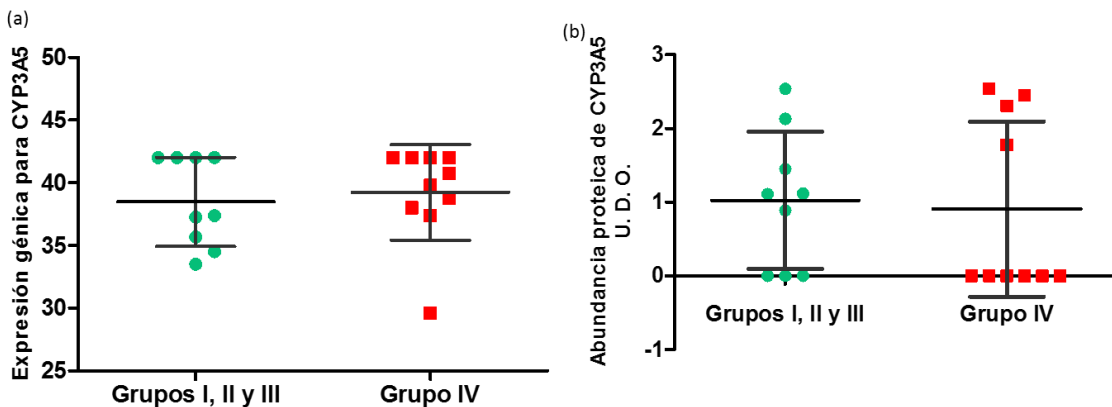


IV, y de igual forma se observa una ligera tendencia mayor en los pacientes del primer grupo en lo que se refiere a la expresión génica (figura 47).



**Figura 47. La abundancia proteica de CYP3A4 es mayor en los pacientes del grupo clínico IV.** (a) Los resultados de expresión génica y (b) los de abundancia proteica se agruparon en dos grupos: pacientes en grupos clínicos I, II y III y pacientes en grupos clínicos IV. Los valores de  $p$  fueron: 0.2945 y 0.0284 en cada caso correspondiente. \* $p < 0.05$

Por último, para la isoforma CYP3A5 no se observan diferencias significativas para ambos grupos en la expresión génica y en la abundancia proteica como puede observarse en la figura 48.



**Figura 48. No se encuentran diferencias entre la asociación de la expresión génica y la abundancia proteica de CYP3A5 y el grupo clínico de los pacientes.** (a) Los resultados de expresión génica y (b) los de abundancia proteica se agruparon en dos grupos: pacientes en grupos clínicos I, II y III y pacientes en grupos clínicos IV. Los valores de  $p$  fueron: 0.6614 y 0.8105 en cada caso correspondiente.

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la expresión génica y abundancia proteica de las isoformas del CYP: CYP1B1, CYP2E1, CYP2W1, CYP3A4 y CYP3A5 en biopsias de pacientes con diagnóstico de STBNR, para lo cual se reclutaron 19 pacientes y de ellos se obtuvieron biopsias de tejido tumoral y de tejido adyacente al sitio tumoral, libre de células neoplásicas.

El patrón de expresión de los genes del CYP puede jugar un papel muy importante en la progresión del cáncer y en el metabolismo de fármacos antineoplásicos. Aunque los niveles de mRNA de CYP detectados en este estudio no necesariamente reflejen la concentración de sus correspondientes proteínas activas, éstos pueden ser utilizados para predecir la abundancia final de dichas proteínas.

Algunos de los motivos para evaluar la expresión de los genes de las isoformas CYP2E1, CYP3A4 y CYP3A5 fueron: son secuencias altamente conservadas, tienen una cantidad reducida de polimorfismos y la mayoría de ellos no son funcionales de manera importante y son muy activas en el metabolismo de procarcinógenos y fármacos, mientras que las isoformas CYP1B1 y CYP2W1 fueron integradas debido a que se ha determinado su sobreexpresión en varios tipos de cáncer sólido (Ingelman-Sundberg et al. 2007; Karlgreen et al. 2006; Gomez et al. 2010).

También se incluyeron en el estudio 6 muestras de pacientes que presentaron una o varias recaídas o reincidencias. De éstas dos reincidencias fueron correspondientes al paciente 1, y una reincidencia de los pacientes 3, 5, 8, 18 respectivamente. Cabe señalar que el subtipo histológico en el que más reincidencias hubo fue el de Sarcoma de Nervios Periféricos, también conocido como TNMVP.

Los perfiles de expresión de las isoformas CYP evaluadas en este estudio fueron variados, aunque cabe destacar que en la mayoría de dichos perfiles se observó una tendencia de mayor expresión en los tejidos tumorales en comparación con lo observado en tejidos adyacentes.

En particular, la expresión del mRNA de CYP1B1 estuvo presente en todos los pacientes tanto en tejido tumoral como en tejido adyacente, sin embargo cabe destacar que los niveles de expresión fueron más altos en 15 de las 19 muestras de tejido tumoral en comparación con las muestras de tejido adyacente, tal como lo muestran tanto los resultados del análisis  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Estos resultados concuerdan con lo observado en la evaluación proteica de CYP1B1, ya que, se detectó a esta isoforma en todos los tejidos evaluados, siendo mayor la abundancia en las muestras de tejido tumoral.

El análisis de supervivencia sin enfermedad activa nos mostró que no existe diferencia entre la expresión alta y la expresión baja de esta isoforma.

Las asociaciones de expresión de esta isoforma con el género de los pacientes nos mostró que los niveles de detección son mayores en muestras derivadas de pacientes femeninos, mientras que al asociar dichos resultados con la edad de los pacientes la expresión de esta isoforma mostró tendencia a ser mayor en los grupos de pacientes mayores a 9 años.

Al asociar los resultados de la expresión génica en muestras de tejido tumoral con el grupo clínico se observó que tanto los pacientes del Grupo clínico I, II y III presentan valores de Ct y niveles de proteína semejantes en comparación con el grupo clínico IV. No obstante al agrupar los valores de Ct de acuerdo al subtipo histológico se advirtió una distribución variable sin llegar a observarse alguna tendencia por subtipo. Lo anterior puede estar influido por el escaso número de casos en algunos subtipos histológicos en este estudio.

Existen numerosos reportes en la literatura que evidencian la expresión extra-hepática de CYP1B1, sin embargo, también se le ha encontrado presente en una gran variedad de tumores (Patel et al. 2012; Karlgreen et al. 2006; Mcfadyen et al. 2001), lo cual correlaciona con lo demostrado en este estudio.

CYP1B1 tiene un papel importante en la activación de pro-carcinógenos ambientales y en la biotransformación del estradiol en su metabolito carcinogénico 4-hidroxiestradiol (Murray et al. 2001). En células cancerosas, CYP1B1 puede

inducir cambios en la respuesta a fármacos debido a la activación de profármacos, como lo es el resveratrol y la inactivación de otros fármacos como el tamoxifén y docetaxel (Potter et al. 2002; Rochat et al. 2001). Por ello, los niveles de expresión de CYP1B1 en tejidos tumorales y adyacentes de pacientes con STBNR mostrados en este estudio pueden alterar la respuesta *in situ* a fármacos que son sustratos de CYP1B1 y pueden afectar el metabolismo del estrógeno o la activación de contaminantes carcinógenos.

En cuanto a la expresión génica de CYP2E1, ésta pudo ser detectada en la mayoría de las muestras tumorales y adyacentes, siendo mayor su expresión en el tejido tumoral de 12 pacientes. Algunos de los resultados de esta expresión concuerdan con lo observado en la abundancia proteica de esta isoforma, puesto que no se pudo detectar expresión en todas las muestras de tejido tumoral o adyacente. Al examinar los datos obtenidos por el análisis densitométrico se encontró que los niveles de abundancia proteica fueron relativamente bajos para ambos tipos de tejido, no obstante, la detección en las muestras de tejido tumoral fue doblemente mayor en comparación con la expresión en muestras de tejido adyacente. El análisis de supervivencia no mostró diferencia alguna entre los niveles de expresión génica de esta isoforma.

Al asociar los resultados de la expresión génica y abundancia proteica de esta isoforma con el género de los pacientes, se pudo observar que fueron mayores los niveles de detección en los pacientes femeninos, sin llegar a ser estadísticamente diferentes. Cuando fueron asociados con la edad de los pacientes se encontraron mayores niveles de detección en las muestras derivadas de pacientes menores de 9 años. Finalmente cuando se realizó la asociación con los grupos clínicos correspondientes, se encontraron niveles semejantes en los Grupos I, II y III y el Grupo IV.

La presencia de CYP2E1 en células cancerosas puede tener un impacto en la eficacia de algunos fármacos y en la toxicidad, así como en la susceptibilidad a tóxicos medioambientales, debido a que esta isoforma del CYP es importante para el metabolismo oxidativo de varios terapéuticos, así como en la bioactivación de

numerosos tóxicos (como etanol, benceno, tolueno y nitrosaminas) y en la producción de radicales libres (Tanaka et al. 2000). Más aún, la presencia de interleucinas proinflamatorias como IL-6 presente como su nombre lo dice, en enfermedades inflamatorias como el cáncer, se ha demostrado que participa en la sobreexpresión de CYP1B1 y CYP2E1, incrementado así la participación de éstas isoformas en la progresión del cáncer (Patel et al. 2014).

La expresión génica de CYP2W1 se detectó en la mayoría de las muestras de tejido tumoral (13/19). En contraste, la detección de la proteína CYP2W1 no se observó en ninguna de las muestras adyacentes, detectándose únicamente en muestras tumorales (15/19).

De manera importante se encontró que los niveles de expresión génica y abundancia proteica fueron mayores en el grupo de pacientes femeninas, siendo este último análisis estadísticamente diferente. También se encontró que los pacientes mayores a 9 años tenían niveles de detección génica y proteica superiores a los pacientes menores de dicha edad, siendo estadísticamente diferente también en la asociación con los resultados de abundancia proteica. En cuanto a las asociaciones con los grupos clínicos, los resultados de la expresión génica nos muestran una leve tendencia de mayor nivel en los grupos clínicos I, II y III, mientras que la asociación con los resultados de abundancia proteica fue mayor la expresión en el Grupo clínico IV, siendo significativamente diferente.

En este trabajo se evidenció que la expresión de CYP2W1 está sobre-regulada en los niveles de mRNA y proteína en los tejidos tumorales de pacientes con STBNR, lo que puede sugerir que CYP2W1 es una isoforma tumor-específica con una potencial importancia como blanco terapéutico en este padecimiento; sin embargo, se requiere un mayor número de muestras para lograr aseverar dicho papel.

Con respecto a la expresión de CYP2W1 en una muestra de tejido adyacente, esta muestra corresponde a un paciente femenino de 2 años con diagnóstico de Sarcoma indiferenciado.

Similar a lo encontrado en este trabajo, reportes previos han determinado que la expresión de CYP2W1 posnatal ocurre solamente en tejido tumoral. Esta expresión se encuentra asociada con una pérdida de control epigenético. La unión del exón 1 / intrón 1 del CYP2W1 alberga una isla CpG, que se encuentra metilada en células normales, silenciando así la expresión de dicho gen después del nacimiento. En células cancerosas, esta marca epigenética se pierde, lo que conlleva a su sobreexpresión (Choong et al. 2015).

Por lo tanto, con la confirmación de la presencia de esta proteína, los pacientes podrían beneficiarse potencialmente de una terapia dirigida a CYP2W1. De hecho, la activación de un profármaco por esta isoforma, genera un metabolito activo que podría inducir la muerte de células neoplásicas. Un agente que podría ser de interés es AQ4N (Banoxantrona), una alquilaminoantraquinona, que es un inhibidor tanto de la topoisomerasa I como de la topoisomerasa II. Este compuesto es activado por CYP2W1. En condiciones hipóxicas como lo es un ambiente tumoral sólido, este compuesto produce un metabolito citotóxico de alta potencia, sin embargo, en condiciones normóxicas encontradas en tejidos normales, este compuesto no induce citotoxicidad. Este profármaco se encuentra actualmente en evaluación clínica en tres estudios de fase I. Como agente único, AQ4N fue bien tolerado a una dosis máxima de 768 mg/m<sup>2</sup> (administrado intravenosamente por 30 minutos con infusión los días 1, 8, 15 de un ciclo de 28 días (Trédan et al. 2009; Nishida et al. 2010; Phillips 2016).

En general, en este estudio se evidenció que los niveles de mRNA de CYP3A4 (11 pacientes) y CYP3A5 (8 pacientes) fueron mayores en los tejidos tumorales en comparación con los tejidos adyacentes. En cuanto a la abundancia proteica de CYP3A4 también se encontró dicha diferencia de expresión en los tejidos tumorales. En cambio, en la expresión proteica de CYP3A5 sólo se observó una tendencia de mayor expresión en los tejidos tumorales sin que esta diferencia llegara a ser significativa.

En el análisis de supervivencia tampoco se encontraron diferencias entre los niveles de expresión alto y bajo en ninguna de estas dos isoformas.

Cuando se realizaron las asociaciones de expresión génica y abundancia proteica con el género de estos pacientes, se encontró que al igual que en las isoformas anteriores, los niveles de detección eran mayores en el grupo de pacientes femenino. Sin embargo, para la asociación de la isoforma CYP3A4 con la edad, en la expresión génica los niveles fueron mayores en los pacientes menores de 9 años mientras que, para la abundancia proteica fueron mayores los niveles en los niños mayores de 9 años. Tendencias opuestas se observan en las asociaciones con la isoforma CYP3A5.

En lo que se refiere a la asociación con los grupos clínicos tanto la expresión génica como la abundancia proteica fueron mayores los niveles de detección en los grupos clínicos I, II y III, siendo esta diferencia estadísticamente significativa en la asociación de la abundancia proteica. Mientras que para la isoforma CYP3A5 ambos niveles de detección fueron muy similares en ambos grupos.

Tanto CYP3A4 como CYP3A5 habían sido identificados en varios tipos de tumores, incluyendo STB y osteosarcoma, dicha expresión ha sido correlacionada con un pobre resultado del paciente, así como con el desarrollo de metástasis (Dhaini et al. 2003; Mir et al. 2007).

Las principales implicaciones clínicas de los niveles de expresión de las isoformas de la familia CYP3A se derivan del uso de antineoplásicos como terapia para STBNR que sean sustrato de esta isoforma. Si la proteína detectada en tejido tumoral es enzimáticamente activa puede permitir a las células cancerosas metabolizar sustratos, como lo son la ciclofosfamida y la ifosfamida, las cuales son activadas por esta familia. A su vez, la expresión de las isoformas CYP3A activas podrían inactivar antineoplásicos ampliamente utilizados como paclitaxel y docetaxel y alcaloides de la vinca en células tumorales. Este metabolismo puede permitir a las células tumorales evadir los efectos de estos antineoplásicos mientras se permite la progresión tumoral (Martínez et al. 2002; Zia et al. 2015).

También es posible que las isoformas CYP3A4/5 puede estar involucrada en la regulación del crecimiento a través del metabolismo de factores regulatorios endógenos del crecimiento (Dhaini et al. 2003).

Por ello, la expresión local de las isoformas CYP3A en tejidos tumorales puede contribuir a la quimioresistencia a fármacos intrínseca o a la toxicidad observada en este tipo de tumor.

A pesar de que se ha correlacionado a la sobreexpresión intratumoral de CYP3A4/5 con un pobre resultado en pacientes con cáncer de mama, por ejemplo, en este estudio al realizar el análisis de sobrevida no se encontró diferencia significativa entre la expresión génica alta y baja en ninguna de las isoformas previamente mencionadas. Sin embargo, cuando se asocia la expresión proteica de dichas isoformas, en ambas se observa una mayor expresión en los grupos clínicos más avanzados, lo que puede sugerir cierto pronóstico desfavorable (Mir et al. 2007).



## CONCLUSIONES

- ⌘ Se encontró mayor expresión génica de las isoformas CYP analizadas: CYP1B1, CYP2E1, CYP2W1, CYP3A4 y CYP3A5 en tejidos tumorales de pacientes con Sarcomas de Tejido Blando No Rabdomiosarcoma.
- ⌘ De manera general, también se detectó una mayor abundancia de proteínas CYP evaluadas en tejido tumoral en comparación con tejido adyacente de pacientes con Sarcomas de Tejido Blando No Rabdomiosarcoma.
- ⌘ Al ser específica la expresión de CYP2W1 en tejido tumoral, ésta podría servir como un potencial blanco terapéutico en la terapia para Sarcomas de Tejido Blando No Rabdomiosarcoma.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

### ARTÍCULOS DE REVISTAS CIENTÍFICAS

- Adullaev, F.I. et al., 2001. Pattern of Childhood Cancer Mortality in Mexico. , 31(2000), pp.526–531.
- Caro, A.A. & Cederbaum, A.I., 2004. OXIDATIVE STRESS , TOXICOLOGY , AND PHARMACOLOGY OF CYP2E1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 44, pp.27–42.
- Cheung, M.C. et al., 2010. Incidence and Outcomes of Extremity Soft-Tissue Sarcomas in Children. *Journal of Surgical Research*, 163, pp.282–289.
- Choong, E. et al., 2015. Developmental Regulation and Induction of Cytochrome P450 2W1 , an Enzyme Expressed in Colon Tumors. *Plos One*, pp.1–17.
- Cormier, J.N. & Pollock, R.E., 2004. Soft Tissue Sarcomas. *CA CANCER JOURNAL CLINICIANS*, 54(2), pp.94–109.
- Cuevas -Urióstegui, M., Villasis-Keever, M. & Fajardo-Gutiérrez, A., 2003. Epidemiología del cáncer en adolescentes. *Salud Pública de México*, 45, pp.115–123.
- Daly, A.K., 2015. *Polymorphic Variants of Cytochrome P450 : Relevance to Cancer and Other Diseases* 1st ed., Elsevier Inc. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.apha.2015.03.001>.
- Deeni, Y.Y. et al., 2013. Cytochrome P450 CYP1B1 Interacts with 8-Methoxypsoralen ( 8-MOP ) and Influences Psoralen- Ultraviolet A ( PUVA ) Sensitivity. *Plos One*, 8(9), pp.1–7.
- Dhaini, H. et al., 2003. Cytochrome P450 CYP3A4/5 Expression as a Biomarker of Outcome in Osteosarcoma. *Journal of Clinical Oncology*, 21(13), pp.2481–2485.
- Escamilla-Santiago, R.A. et al., 2012. Tendencia de la mortalidad por cáncer en niños y adolescentes según grado de marginación en México ( 1990-2009 ). *Salud Pública de México*, 54(6), pp.587–594.
- Fajardo-Gutiérrez, A. et al., 2007. Incidence of cancer in children residing in ten jurisdictions of the Mexican Republic : importance of the Cancer registry ( a population-based study ). *BioMed Central Cancer*, 7(68), pp.1–15.
- Ferrari, A. et al., 2012. Neonatal soft tissue sarcomas. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 17(4), pp.231–238. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.siny.2012.05.003>.
- Ferrari, A. et al., 2010. Non-metastatic unresected paediatric non-rhabdomyosarcoma soft tissue sarcomas : Results of a pooled analysis from United States and European groups. *European Journal of Cancer*, 47(5), pp.724–731. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2010.11.013>.
- García Del Muro, X. et al., 2011. [Soft tissue sarcomas: clinical practice guidelines]. *Medicina clínica*, 136(9), p.408.e1-8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21411112>.

- Go, R.E., Hwang, K.A. & Choi, K.C., 2015. Cytochrome P450 1 family and cancers. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 147, pp.24–30. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.11.003>.
- Gomez, A. et al., 2010. Colorectal Cancer-Specific Cytochrome P450 2W1 : Intracellular Localization , Glycosylation , and Catalytic Activity □. *Molecular Pharmacology*, 78(6), pp.1004–1011.
- Guengerich, F.P., 2003. Cytochromes P450, Drugs and Diseases. *Molecular Interventions*, 3(4), pp.194–204.
- HaDuong, J.H. et al., 2015. Sarcomas. *Pediatric Clinics of North America*, 62(1), pp.179–200. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031395514001916>.
- Hayashi, T. et al., 2015. Biological characterization of soft tissue sarcomas. *Annals of Translational Medicine*, 3(22), pp.368–372.
- Herrera-Torres, A. et al., 2014. Frecuencia de cáncer en un hospital de tercer nivel de la Ciudad de México . Implicaciones detección oportuna Frequency of cancer in a specialty hospital in Mexico City . Implications for the development of early detection methods. *Cirugía y Cirujanos*, 82(1), pp.28–37.
- Ingelman-Sundberg, M. et al., 2007. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies : Pharmacogenetic , pharmacoeigenetic and clinical aspects. *Pharmacology and Therapeutics*, 116, pp.496–526.
- Karlgreen, M. et al., 2006. Tumor-specific expression of the novel cytochrome P450 enzyme, CYP2W1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 341, pp.451–458.
- Kim, J.H. et al., 2014. Direct sequencing and comprehensive screening of genetic polymorphisms on CYP2 family genes (CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, and CYP2E1) in five ethnic populations. *Archives of Pharmacal Research*, pp.115–128.
- Kumagai, T. et al., 2012. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Activate CYP3A4 Gene Transcription through Human Pregnane X Receptor. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 27(2), pp.200–206. Available at: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/dmpk/DMPK-11-RG-094?from=CrossRef>.
- Lahat, G., Lazar, A. & Lev, D., 2008. Sarcoma Epidemiology and Etiology : Potential Environmental and Genetic Factors. *Surgical Clinics of North America*, 88, pp.451–481.
- Lehnhardt, M. et al., 2005. Feasibility of chemosensitivity testing in soft tissue sarcomas. *World Journal of Surgical Oncology*, 12(3), pp.1–12.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> Method. *Methods*, 408(25), pp.402–408.
- Lourda, M., Trougakos, I.P. & Gonos, E.S., 2006. Development of resistance to chemotherapeutic drugs in human osteosarcoma cell lines largely depends on up-regulation of Clusterin / Apolipoprotein J. *International Journal Cancer*, 120,

pp.611–622.

- Martínez, C. et al., 2002. Expression of paclitaxel-inactivating CYP3A activity in human colorectal cancer : implications for drug therapy. *British Journal of Cancer*, 87, pp.681–686.
- Mcfadyen, M.C.E. et al., 2001. Cytochrome P450 CYP1B1 over-expression in primary and metastatic ovarian cancer. *British Journal of Cancer*, 85(2), pp.242–246.
- Meyer, W.H. & Spunt, S.L., 2004. Soft tissue sarcomas of childhood. *CANCER TREATMENT REVIEWS*, 30, pp.269–280.
- Mir, O. et al., 2007. CYP3A4 / 5 and pharmacogenetics in patients with sarcoma. *The Lancet Oncology*, 8, pp.667–668.
- Molina-Ortiz, D. et al., 2014. Differential Expression of Cytochrome P450 Enzymes in Normal and Tumor Tissues from Childhood Rhabdomyosarcoma. *Plos One*, 9(4), pp.1–9.
- Murray, G.I. et al., 2001. REGULATION , FUNCTION , AND TISSUE -SPECIFIC EXPRESSION OF CYTOCHROME P450 CYP1B1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 41, pp.297–316.
- Nebert, D.W. & Dalton, T.P., 2006. The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nature Reviews*, 6(December), pp.947–961.
- Nishida, C.R., Lee, M. & Montellano, P.R.O. De, 2010. Efficient Hypoxic Activation of the Anticancer Agent AQ4N by. *Molecular Pharmacology*, 78(3), pp.497–502.
- Nwabo, A. et al., 2014. New targeted therapies for breast cancer: A focus on tumor microenviromental signals and chemoresistant breast cancers. *Word Journal of Clinical Cases*, 2(12), pp.769–787.
- Orellana, M. & Guajardo, V., 2004. Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. *Rev Med Chile*, 132, pp.85–94.
- Ortiz de Montellano, P., 2004. Cytochrome P450. , p.702.
- Parham, David; Webber, Bruce; Jenkins III, Jesse; Cantor, Alan; Maurer, H., 1995. Nonrhabdomyosarcomatous Soft Tissue Sarcomas of Childhood: Formulation of a Simplified System for Grading. *Modern Pathology*, 8(7), pp.705–710.
- Pastore, G. et al., 2006. Childhood soft tissue sarcomas incidence and survival in European children ( 1978 – 1997 ): Report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *European Journal of Cancer*, 42, pp.2136–2149.
- Patel, N. et al., 2012. DNA Methylation and Gene Expression Profiling of Ewing Sarcoma Primary Tumors Reveal Genes That Are Potential Targets of Epigenetic Inactivation. *Sarcoma*, 2012, pp.1–11.
- Patel, S. et al., 2014. Interleukin-6 mediated upregulation of CYP1B1 and CYP2E1 in colorectal cancer involves DNA methylation, miR27b and STAT3. *British*

- journal of cancer*, 111(12), pp.2287–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25333344>.
- Phillips, R.M., 2016. Targeting the hypoxic fraction of tumours using hypoxia-activated prodrugs Cytotoxic Reviews Godefridus J. Peters and Eric Raymond. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 77(3), pp.441–457. Available at: "<http://dx.doi.org/10.1007/s00280-015-2920-7>."
- Piotrowska, H. & Kucinska, M., 2013. Expression of CYP1A1 , CYP1B1 and MnSOD in a panel of human cancer cell lines. *Mol Cell Biochem*, 383, pp.95–102.
- Potter, G.A. et al., 2002. The cancer preventative agent resveratrol is converted to the anticancer agent piceatannol by the cytochrome P450 enzyme CYP1B1. *British Journal of Cancer*, 86, pp.774–778.
- Riffel, A.K., Schuenemann, E. & Vyhldal, C.A., 2009. Regulation of the CYP3A4 and CYP3A7 promoters by members of the nuclear factor I transcription factor family. *Molecular pharmacology*, 76(5), pp.1104–14. Available at: <http://molpharm.aspetjournals.org/cgi/content/abstract/76/5/1104>.
- Righetti, A. et al., 2011. Familial adenomatous polyposis and desmoid tumors. *Clinics*, 66(10), pp.1839–1842.
- Rivera-Luna, R. et al., 2014. Descriptive Epidemiology in Mexican children with cancer under an open national public health insurance program. *BMC Cancer*, 14(790), pp.1–8.
- Robbins, D. & Chen, T., 2014. Tissue-specific regulation of pregnane X receptor in cancer development and therapy. *Cell & bioscience*, 4(1), p.17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24690092>.
- Rochat, B. et al., 2001. Human CYP1B1 and Anticancer Agent Metabolism : Mechanism for Tumor-Specific Drug Inactivation ? *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 296(2), pp.537–541.
- Sanati, S. et al., 2007. Cytologic Diagnosis of Ewing Sarcoma / Peripheral Neuroectodermal Tumor With Paired Prospective. *Cancer Citopathology*, 111(3), pp.192–199.
- Santiago, C. & Gómez-gallego, F.B.F., 2002. Polimorfismos de citocromo p450: papel como marcador biológico. *Medicina del Trabajo*, 11(3), pp.130–140.
- Spunt, S.L., Skapek, S.X. & Coffin, C.M., 2008. Pediatric Nonrhabdomyosarcoma Soft Tissue Sarcomas. *The Oncologist*, 13(6), pp.668–678. Available at: <http://theoncologist.alphamedpress.org/cgi/doi/10.1634/theoncologist.2007-0182>.
- Tanaka, E., Terada, M. & Misawa, S., 2000. Cytochrome P450 2E1 : its clinical and toxicological role. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 25, pp.165–175.
- Thomas, D.M. & Ballinger, M.L., 2015. Etiologic, environmental and inherited risk factors in sarcomas. *Journal of Surgical Oncology*, 111(5), pp.490–495.
- Trédan, O. et al., 2009. The Hypoxia-Activated ProDrug AQ4N Penetrates Deeply

in Tumor Tissues and Complements the Limited Distribution of Mitoxantrone. *Cancer Research*, 69(3), pp.940–948.

- Vaclavikova, R. et al., 2007. RNA Expression of Cytochrome P450 in Breast Cancer Patients. *Anticancer Research*, 27, pp.4443–4450.
- Wagner, M.J. et al., 2015. A retrospective chart review of drug treatment patterns and clinical outcomes among patients with metastatic or recurrent soft tissue sarcoma refractory to one or more prior chemotherapy treatments. *BioMed Central*, 15(175), pp.1–8.
- Wang, B., Liu, Z. & Sun, S., 2013. CYP3A5\*3 polymorphism and cancer risk: a meta-analysis and meta-regression. *Tumour biology*, 34(4), pp.2357–2366.
- Wang, Z. et al., 2013. Regular Article and CYP3A5 Genetic Polymorphisms on the Pharmacokinetics of Silodosin in Healthy Chinese Volunteers. *Drug Metabolism Pharmacokinetics*, 28(6), pp.239–243.
- Williams, J.A. et al., 2002. COMPARATIVE METABOLIC CAPABILITIES OF CYP3A4 , CYP3A5 , AND CYP3A7 ABSTRACT : *Drug Metabolism and Disposition*, 30(8), pp.883–891.
- Zanger, U.M. & Schwab, M., 2013. Pharmacology & Therapeutics Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism : Regulation of gene expression , enzyme activities , and impact of genetic variation. *Pharmacology and Therapeutics*, 138(1), pp.103–141. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>.
- Zheng, Y., Zhou, J. & Tong, Y., 2014. Gene signatures of drug resistance predict patient survival in colorectal cancer. *The Pharmacogenomics Journal*, 15(2), pp.135–143. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/tpj.2014.45>.
- Zia, H. et al., 2015. CYP3A isoforms in Ewing’s sarcoma tumours: An immunohistochemical study with clinical correlation. *International Journal of Experimental Pathology*, 96(2), pp.81–86.

## LIBROS

- DeVita V, et al. (2014) *Cancer: Principles & Practice Oncology*. 10 Edición LLW Health Library. Estados Unidos. PP: 1324 – 1328.
- Enzinger and Weiss (2008) *Soft Tissue Tumors*. 5ta Edición. Mosby. Estados Unidos.
- Evans H. (1995) *Classification and Grading of Soft Tissue Sarcomas*. 1era Edición. Hematology Oncology Clinical in North America. Estados Unidos.
- Ortiz de Montellano P. (2004) *Cytochrome P450: structure, mechanism and biochemistry*. 3era Edición. Kluwer Academic/Plenum Publishers. Estados Unidos.

Rivera Luna R, et al. (2010) Protocolos Técnicos Cáncer en Niños. Consejo Nacional para la Prevención y el Tratamiento del Cáncer en la Infancia y Adolescencia. Edamsa Impresiones, México. Pp: 5, 251 – 280.

Rivera R (2006) Hemato-oncología Pediátrica. 1ª. Edición. Editores de Textos Mexicanos. México, D.F.

Rodríguez M, et al (2006) PCR en tiempo real. Métodos físico-químicos en Biotecnología (2006-II). Instituto de Investigación Biotecnológica, UNAM. México.

Yilmaz A, et al. (2012). Real-Time PCR for Gene Expression Analysis. INTECH Open Access Publisher. Estados Unidos.

## **PÁGINAS DE INTERNET**

Instituto Nacional del Cáncer, actualizado Septiembre 2015. <https://medlineplus.gov/cancer.html> [Visitado 30 de junio 2016]

Nota descriptiva No. 297 Cancer, Febrero 2015 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/> [Visitado 10 de abril 2016]

M. Ervik, F. Lam, J. Ferlay, L. Mery, I. Soerjomataram, F. Bray (2016). Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Cancer Today. Available from: <http://gco.iarc.fr/today>, [Visitado 26 de julio 2016].

Childhood Soft Tissue Sarcoma Treatment (PDQ ®) en: <http://www.cancer.gov/types/soft-tissue-sarcoma/patient/child-soft-tissue-treatment-pdq> [Visitado 16 abril 2016].

American Cancer Society, actualizado en Marzo 2015. <http://www.cancer.org/treatment/understandingyourdiagnosis/staging> [Visitado el 18 de abril 2016]

The Flockhart Table, 2016. The Trustees of Indiana University. <http://medicine.iupui.edu/clinpharm/ddis/main-table> [Visitado el 23 de mayo 2016]

## ANEXO I

### **Apartado A. FORMATO DE CONSENTIMIENTO BAJO INFORMACION**

Nombre del estudio: ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN INTRATUMORAL DE TRANSPORTADORES DE MEMBRANA E ISOENZIMAS DEL CITOCROMO P450 EN SARCOMAS DE TEJIDO BLANDO, DEL TIPO NO RABDOMIOSARCOMA EN POBLACIÓN INFANTIL.

Protocolo No.

Responsables del Estudio: QFB María Dora Molina Ortiz

Teléfono: 10840900 exts: 1410 y 1448. Laboratorio de Toxicología Genética. Instituto Nacional de Pediatría (INP).

Médico Responsable: Dr. Daniel Hernández. Adscrito al Servicio de Cirugía Oncológica. INP, SSA.

Se invita a su hijo (a) a participar en un estudio de investigación. Esta carta de consentimiento tiene datos que le ayudará a decidir si desea que su hijo (a) participe en el mismo. Tómese el tiempo que necesite; lea cuidadosamente este formato y haga las preguntas que tenga al médico o personal del estudio.

#### **a) Naturaleza y objetivos del estudio**

El propósito de este estudio es conocer si el tumor que tiene su hijo/a produce algunas sustancias que pudieran disminuir la respuesta del tumor a la quimioterapia que se piensa aplicar.

Pueden existir razones por las que su hijo(a) no se le permitirá participar en este estudio. Algunas de ellas son:

- 1.- Su hijo/a tenga un diagnóstico diferente a sarcoma de tejido blando de tipo no rabdomiosarcoma (STBNR).
- 2.- La toma de biopsia no sea adecuada, o que surjan problemas en el traslado y almacenamiento del tejido.

El médico o personal del estudio discutirá estos puntos con usted, así como cualquier otra razón por la cual probablemente su hijo (a) no pueda participar en el estudio.

Aproximadamente se pretende incluir 30 niños en el estudio.

Su hijo(a) permanecerá en el estudio hasta que el médico responsable, tome la decisión de darlo de alta o admitirlo (a) en el hospital o clínica para un tratamiento adicional



### **b) ¿Qué se le pedirá a mi hijo(a) que haga?**

Si su hijo (a) participa en el estudio, durante la toma de biopsia del tumor, que se hace para tener el diagnóstico preciso; se tomará además, un fragmento de tumor y otro de tejido adyacente al tumor.

En todo momento, sabremos cual es el tejido de su hijo, y podrá disponer, si así lo desea de estas muestras en el momento que lo requiera.

Cada una de las dos muestras tomadas, para fines de este estudio, serán divididas en dos fracciones.

1) Un segmento será criopreservado, para **POSIBLES** estudios posteriores. En caso de que así sea, usted será informado y se le solicitará un nuevo consentimiento.

2) Un segmento será para el análisis de la actividad del gen que produce estas sustancias y además, para ver la actividad de la sustancia que se produjo.

Adicionalmente, su hijo (a) recibirá el tratamiento establecido en cualquier paciente que es sometido a una biopsia diagnóstica. Este tratamiento puede incluir uno o más medicamentos, según lo determine el su cirujano. El médico o personal del estudio discutirá con usted los riesgos asociados a este procedimiento.

### **c) ¿Qué sucederá con las biopsias que le tomaron a su hijo?**

El fragmento principal, forma parte de estudio que identifica el tipo de tumor, y de esa manera poder establecer un tratamiento.

Los fragmentos motivo de estudio que utilizará para el análisis de la actividad del gen y la sustancias, si existieran excedentes de tejido será congelado durante la vigencia del proyecto (4 años). Posterior a este lapso serán desechados de acuerdo a los procedimientos de nuestro Instituto.

### **d) ¿Qué efecto podría ocasionar estas pruebas en su hijo (a)?**

La toma de biopsia es un procedimiento fundamental requerido por el equipo médico para el diagnóstico de su hijo, por lo que se realiza independientemente de si usted decide que su hijo participe en el estudio o no.

El fragmento extra de tumor y de tejido sano que se pretende obtener, no interfiere en la evolución de la enfermedad, condiciones posoperatorias ni incrementa el dolor de su hijo.

### **Información Adicional que Necesita Saber**

Si el diagnóstico de su hijo no es STBNR, las tomas de tejido obtenido serán enviadas al departamento de patología, para que forman parte de su expediente clínico. Su paciente no formará parte del estudio.

### **e) ¿Qué beneficio se podría esperar por participar en el estudio?**

Es posible que los resultados que se obtengan en este proyecto de investigación no tengan un beneficio directo para su hijo/a, pero si logramos identificar las sustancias que ayudan al tumor a resistir la quimioterapia, en el futuro podríamos contribuir en la mejora del tratamiento para otros pacientes con cáncer.

**f) ¿Cuáles son mis opciones si mi hijo (a) no participa en el estudio?**

Las mismas que recibiría, cualquier paciente con el diagnóstico de STBNR, que ingresa al Instituto Nacional de Pediatría.

El médico del estudio puede discutir con usted estas opciones.

**g) ¿De qué manera se protegerá la privacidad de mi hijo(a)?**

Si usted decide participar en este estudio, el médico y el equipo de investigación del estudio utilizarán la información de la salud de su hijo(a) sólo para realizar el presente estudio. Las muestras serán codificadas por lo que no se usaran datos personales que puedan identificarlo.

En este estudio, el equipo de investigación sólo compartirá la información sobre la salud de su hijo(a) con agencias de gobierno y comités de ética que supervisan la investigación, de acuerdo a lo estipulado en el Título Segundo “De los Aspectos de la Investigación en Seres Humanos”, Capítulo I, Artículo 20, de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.

**h) Derecho de salir del estudio cuando lo deseen, sin perjuicio terapéutico presente ni futuro**

Usted puede retirar su permiso para usar y compartir la información sobre la salud de su hijo(a), en cualquier momento, solicitándolo por escrito al médico del estudio. En caso que usted procediera de esta manera, es decisión de Usted el resguardo de las muestras obtenidas. Después de esa fecha, no se recopilará nueva información sobre la salud de su hijo(a) que lo pudiera identificar.

Cuando el estudio concluya, usted puede escribirle al médico del estudio para solicitarle la información sobre la salud de su hijo(a) que se recopiló durante el estudio.

**i) ¿Se me pagará?**

Usted no recibirá pago alguno por participar en este estudio.

**j) ¿Hay algún costo involucrado con el estudio?**

No se le cobrará por los gastos derivados de los estudios y preservación de las muestras obtenidas. Los gastos derivados de la atención clínica, serán ajustados de acuerdo a los tabuladores vigentes para el Instituto Nacional de Pediatría.

**k) ¿A quién debo llamar si tengo preguntas acerca del estudio?**

Q.F.B. Dora Molina Ortiz

Teléfono: 10840900 ext. 1410 y 1448.

**l) ¿Dónde y durante cuánto tiempo serán preservadas las muestras?**

Las muestras estarán preservadas en un contenedor con nitrógeno líquido hasta su análisis en el Laboratorio de Toxicología Genética Torre de Investigación 8° piso del Instituto Nacional de Pediatría. Los excedentes de muestras permanecerán resguardados en el laboratorio durante los 4 años que dura el proyecto de investigación por si se requiriera completar o duplicar un ensayo, de lo contrario al término de dicho periodo será esterilizado y desechado bajo los procedimientos de deshechos de material biológico de nuestro Instituto.

**Al firmar a continuación, acepto que:**

- He leído este formato de consentimiento.
- He tenido la oportunidad de hacer preguntas y éstas han sido contestadas.
- Entiendo que la participación en este estudio es voluntaria.
- Doy permiso para que se use y comparta la información sobre mi salud, tal como se describe en este formato.
- Puedo elegir que mi hijo(a) no participe en el estudio o que lo abandone en cualquier momento, comunicándoselo al médico del estudio. Mi hijo(a) no será sancionado ni perderá ningún beneficio que, de otra manera, le corresponde.
- Las muestras de tejido, serán criopreservadas y congeladas durante el tratamiento médico de mi hijo, posteriormente serán eliminadas.
- En caso de requerirse nuevos estudios, en donde las muestras preservadas sean nuevamente requeridas para un estudio independiente, se informará de esto bajo nuevo consentimiento.

## a) Apartado B. Carta de consentimiento

Nombre del estudio: ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN INTRATUMORAL DE TRANSPORTADORES DE MEMBRANA E ISOENZIMAS DEL CITOCROMO P450 EN SARCOMAS DE TEJIDO BLANDO, DEL TIPO NO RABDOMIOSARCOMA EN POBLACIÓN INFANTIL.

### TEXTO DECLARATORIO

YO \_\_\_\_\_

(Nombre del Paciente)

Fecha de nacimiento y edad:

Declaramos libremente que estamos de acuerdo en que participe nuestro hijo (cuyo nombre aparece arriba) en esta investigación cuyo objetivo, procedimientos, beneficios, y riesgos se especifican en el Apartado A de este documento.

Es de nuestro conocimiento que los investigadores nos han ofrecido aclarar cualquier duda o contestar cualquier pregunta que, al momento de firmar la presente, no hubiese expresado o que surja durante el desarrollo de la investigación.

Se nos ha manifestado que podemos retirar nuestro consentimiento de que nuestro hijo(a) participe en cualquier momento sin que ello signifique que la atención médica que se le proporcione, se vea afectada por este hecho.

Se nos ha informado que el participar en este estudio no repercutirá en el costo de la atención médica que se le deba brindar a mi hijo (a) y que toda la información que se otorgue sobre mí hijo(a) (su) identidad y participación será confidencial, excepto cuando yo lo autorice.

Para los fines que se estime conveniente, firmamos la presente junto al investigador que me informó y dos testigos, conservando una copia de 1) Información proporcionada para obtener mi autorización (apartado A y 2) Consentimiento informado (apartado B).

Nombre y firma del Paciente: \_\_\_\_\_

Nombre y firma de la madre: \_\_\_\_\_

Nombre y firma del padre: \_\_\_\_\_

### **En caso de que sea imposible obtener la firma de uno de los padres:**

Nombre y firma del padre, madre o tutor: \_\_\_\_\_

Razón por la que el otro padre no puede firmar este formato: \_\_\_\_\_

Nombre del Testigo \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Relación que tiene con el paciente \_\_\_\_\_

Nombre del Testigo \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Relación que tiene con el paciente \_\_\_\_\_

Nombre y firma de la persona que obtiene el consentimiento:

\_\_\_\_\_

México D.F. a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201\_ .