

11242  
50



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA  
INCan

**T E S I S   D E   G R A D O**

**PREVIA OPCION TITULO  
RADIO-ONCOLOGIA Y ONCOLOGIA CLINICA**

**"LA APOPTOSIS EN CANCER  
CERVICO UTERINO"**

**DRA. LESBIA   MARIA   RIVERA   RUBI**

ASESOR: DR. ALFONSO DUENAS GONZALEZ

TESIS CON  
FALLA DE CUBRIR

PROMOCION 1997-2000

2003



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## DEDICATORIA

A DIOS: Por darme la fortaleza y la oportunidad de estar en la mejor escuela de Oncología de latino América.

A LAS AUTORIDADES DEL INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA: Por la oportunidad de entrar al programa de Residencia de Radio-oncología, Dr. Jaime de La Garza, Dr. Ernesto Gómez, Dr. Alberto Guadarrama, y la Dra. Aída Mota.

A MIS HIJOS: Andrés Fernando, Carlos Javier, y Oscar Mauricio, por su amor, apoyo y demostración de perseverancia, paciencia y humildad.

A MIS PADRES: Fausto Rivera y María Rubí, y mis hermanas: Libia, Mirian, Julia y Nohelia, y Judith, a mi hermano Jamil, mis sobrinos, (as), cuñados por su apoyo constante.

A MIS MAESTROS, COMPAÑEROS,(AS), MIS AMIGOS Y AMIGAS: Por su apoyo, solidaridad y amistad. Especial agradecimiento a la Lic. Angela María Camacho Kempis, Lic. María Luisa Zimbrón, Lic. Luz Elena Baños Rivas, Licda. María de La Luz Muñoz, Dr. Enrique Flores Conde, Dr. Williams Rodríguez, Dr. Carlomagno Castillero, Dr. Ricardo Almaguer, Dr. Juan Carlos León, Sra. María Antonieta Mazier y Matbía Castro.

AL NOBLE PUEBLO MEXICANO ETERNO AGRADECIMIENTO.

➤ ESTA TESIS CORRESPONDE A LOS ESTUDIOS REALIZADOS CON UNA BECA OTORGADA POR EL GOBIERNO DE MEXICO, A TRAVES DE LA SECRETARIA DE RELACIONES EXTERIORES"

Aprobado por la Comisión de Residencia en Oncología de la  
UNAM y otorgado por el Gobierno de México, a través de la  
Secretaría de Relaciones Exteriores.  
NOMBRE: Lesbia María  
Rivera Rubí  
CUC: 05-18-03  
FIRMA: [Firma]

TESIS CON  
FALLA DE CUBIERTA

## INDICE

○ DEFINICION DEL PROBLEMA	2
○ ANTECEDENTES	12
○ JUSTIFICACIÓN	17
○ HIPOTESIS	18
○ OBJETIVO GENERAL	18
○ OBJETIVOS ESPECIFICOS	18
○ MATERIAL Y METODOS	19
○ CRITERIOS DE INCLUSIÓN	21
○ ANALISIS ESTADÍSTICO	22
○ ORGANIZACIÓN DE LA INVESTIGACION	22,23
○ RECURSOS HUMANOS Y MATERIALES	23
○ RESULTADOS	24,25
○ DISCUSIÓN	26
○ CONCLUSIONES	27
○ BIBLIOGRAFÍA	27,28,29

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## APOPTOSIS EN CANCER CERVICO-UTERINO

Rivera-Rubí L.M., Dueñas-González A., Gómez-González E., Guadarrama Fleites A., Mota-García A., Florentino R., Aguilar-Ponce J.L., Poitevin Chacón A., López-Granell C., Gonzalez Enciso A., Chanona J., Trejo Becerril C.

### I. MARCO TEORICO

#### I.a. Definición del problema.

El cáncer Cérvico-Uterino(CACU) constituye uno de los principales problemas en salud pública en los países en vías de desarrollo. En México en el año de 1995 se notificó al cáncer de cervix uterino en el primer lugar de incidencia de neoplasias malignas, correspondiendo ésta tasa al 21.5% por topografía general, la tasa de mortalidad en la República mexicana ha permanecido estable e incluso en algunos grupos de edad, se perfila un incremento.<sup>(1)</sup>

Los hallazgos clínicos tradicionales para evaluar el pronóstico en cáncer de cervix, han sido basados en la extensión de la enfermedad: estadio clínico, tipo histológico y grado. En la última década, han habido hipótesis que respaldan que la proliferación celular del tumor es una importante causa de falla en la Radioterapia (RT) del cáncer de cervix (34). La proliferación del tumor durante la Radioterapia se ha inferido por la observación que el tiempo prolongado de tratamiento fue asociado con pobre control pélvico.

Existe sin embargo una variación en la respuesta de los tumores a la radiación <sup>(9)</sup>; el problema lo constituyen los cánceres refractarios al tratamiento, debido a factores fisiológicos del tumor y factores biológicos, bioquímicos como respuestas mediadas por el huésped.<sup>(3,6)</sup>

Los factores fisiológicos, incluyen: Hipoxia y angiogénesis.

Entre los factores Biológicos en primera instancia está: la Clonalidad desconocida (con diferentes susceptibilidades a la terapia), reducido PH intracelular dado por la Glicólisis anaeróbica. Mecanismos de resistencia dada por propiedades intrínsecas celulares que incluyen incremento del Glutation y enzimas metabolizando así como Peroxidasa GSH y de la Catalasa en la inactivación de los radicales libres, producidos por la radioterapia <sup>(3,8,13)</sup>.

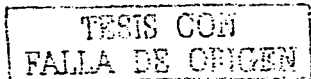
Múltiples mecanismos contribuyen a la resistencia a la Radioterapia y a la Quimioterapia; por ejemplo: Incremento de la actividad de Transferasa GSH, reducida actividad de Topoisomerasa II, Glicoproteína P, o la emergencia de células más resistentes a la terapia. Además la incapacidad para pasar de un ciclo a otro, de G2/M, lo que puede promover la entrada de las células a la apoptosis. <sup>(13)</sup>

Existen datos clínicos que muestran correlación entre algunos factores intrínsecos del tumor y los resultados del tratamiento de la radioterapia, uno de éstos factores intrínsecos del tumor es la Apoptosis (muerte Celular Programada).

Hoy día existe un creciente interés en la oncología por la Apoptosis, por sus implicaciones en la salud y en la enfermedad.

#### Apoptosis y cáncer

La Apoptosis ó muerte celular programada, como también se designa a ésta función celular, se refiere al suicidio celular activo, es un fenómeno distinto a la necrosis, descrito por primera vez en 1972 por Kerr y cols. <sup>(2, 3, 15)</sup> y revisado el concepto por Horvitz y Cols. En 1994 y Jacobson en 1997(27); El término de Apoptosis se ha propuesto hasta ahora por un pequeño mecanismo de detección celular controlada, el cual parece jugar un papel complementario, pero opuesto a la mitosis en la regulación de la población celular animal. La muerte es un proceso inherente a la vida. Todos los organismos necesitan de los mecanismos apropiados para eliminar células anormales,



asi como aquellos que han cumplido su función, cuando esto no sucede, se pierde el equilibrio, con el subsecuente desarrollo de las enfermedades, incluyendo las malignas.

La Apoptosis es un proceso celular genéticamente programado esencial para mantener el desarrollo normal y la homeostasis, es muy distinto a Necrosis, los mecanismos celulares involucrados y la apariencia morfológica de la célula también es diferente.

Es modulado por oncogenes, genes supresores y citoquinas, es probable que la combinación de estos factores es incluida dentro de los cambios fenotípicos, así como patrones alterados de metástasis, angiogénesis y radioresistencia.

El papel fisiológico de la Apoptosis es múltiple: es necesario en el desarrollo embrionario, en el recambio tisular normal de los organismos que han completado su desarrollo, en la eliminación de los neutrófilos, así como en el desarrollo y la regulación del sistema inmune.

Además la Apoptosis interviene en la destrucción de células alteradas en su estructura génica por diferentes mecanismos, el fallo en destruir tales células puede originar las neoplasias.

Factores que modulan positiva ó negativamente el proceso de Apoptosis:

Factores fisiológicos	Factores Farmacológicos ó Físicos	Factores Patológicos
Factores de crecimiento	Esteroides	Productos virales
Citocinas	Antineoplásicos	
Hormonas	Radioterapia	
Interacciones celulares	Hipertermia	
	Toxinas, Anticuerpos monoclonales	

Desde hace años, se ha reconocido que la pérdida espontanea de las células es un parámetro importante en el crecimiento neoplásico. ( Iversen 1967, Refsum y Berdal 1967, Steel 1967, Frindel, Malaise y Tubiana 1968, Laird 1969, Clifton y Yatvin 1970, Weinstein y Frost 1970, Lala 1971 , 1972). Sin embargo poco se conocia acerca de los mecanismos implicados en la pérdida celular, reconociendo tácitamente que podría ser la pérdida continua de los tejidos normales para balancear la división celular que es realmente demostrable y la pérdida celular que acompaña a la atrofia e involución fisiológica de los tejidos.

El término Necrobiosis es algunas veces usado para definir la "Muerte Celular Fisiológica", pero los hallazgos morfológicos que se describieron en 1972 no eran claramente definidos, posteriormente el descubrimiento de un modo diferente de muerte celular con hallazgos ultra-estructurales consistentes de un fenómeno activo y complejo, controlado inherentemente y que explicaría la regulación del número de células en una variedad de tejidos y en condiciones patológicas, que puede ser detectada en neoplasias malignas no tratadas (Kerr y Searle, 1972) y participa en la regresión posterior a algunas terapias (Currie, Kerr 1972) .

Debido a su importancia en significacía cinética celular Willie, Kerr y Currie tomaron el término de Apoptosis del profesor James Cormack quien les sugirió la palabra describiendo "caída de los pétalos de las flores ó las hojas de los arboles".

Es un proceso complejo altamente regulado y un proceso celular activo. Tres fases pueden discernirse en la

Apoptosis:

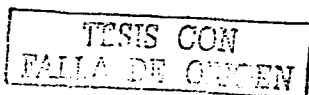
1. Fase de Iniciación
2. Fase Efectora
3. Fase de degradación

Fase de Iniciación: Las células reciben un estímulo provocando el proceso apoptoico.

Fase Efectora: La maquinaria apoptoica es activada pero el proceso es aún reversible.

Fase de degradación: No se alcanza un punto de retorno después de que la célula se desintegra.

La duración del proceso de la muerte celular depende del estímulo y el tipo celular, pero usualmente toma de 12 a 24 horas.



### **Apoptosis y Necrosis**

La necrosis en contraste con la Apoptosis se considera que es un evento pasivo, vagamente regulado, la naturaleza del proceso está definido más por el trabajo interno de la célula, la en la misma área, la diferencia más obvia es que además la necrosis conduce a la destrucción de un grupo de células en la misma área, en la Apoptosis solamente se involucran un determinado grupo de células, quizá la diferencia más importante de Apoptosis y necrosis es que en la Necrosis debido al daño de la membrana hay inflamamiento del citoplasma y explosión de la célula, lo cual conduce a la liberación de enzimas lisosomales y a la reacción inflamatoria.

También hay diferencias en la morfología celular que se describen a continuación.

### **La Morfología de la Apoptosis**

Apoptosis característicamente afecta las células particularmente esparcidas y son manifestados histológicamente por la formación de pequeños fragmentos ovoides, cuerpos apoptóticos, algunos de los cuales contienen remanentes del núcleo. Con microscopio electrónico se ven los cambios de la Apoptosis en 2 estados:

El primero comprende la formación de los cuerpos apoptóticos, el segundo su fagocitosis y degradación por otras células.

La formación de los cuerpos apoptóticos involucra condensación marcada del núcleo y citoplasma, condensación de la cromatina y fragmentación de la membrana celular, las enzimas lisosomales sin duda juegan un rol muy importante en la degradación de los cuerpos apoptóticos se incrementan la síntesis de hidrolasas, el proceso es económico en términos de reutilización de los componentes celulares, lo más notorio es que NO hay Inflamación. Además todos los hallazgos contrastan con los de necrosis los cuales incluyen: inflamación celular, disfunción de los organelos, colapso mitocondrial y ultimadamente desintegración celular, la liberación del contenido celular durante la necrosis produce una respuesta inflamatoria fuerte. Además la Apoptosis produce una pequeña ó ninguna activación del sistema inmune.

### **Mecanismos moleculares de la Apoptosis**

Estos mecanismos moleculares y la regulación de la Apoptosis vienen de estudios en caenorhabditis elegans, el proceso es regulado principalmente por tres genes: CED3, CED4 y CED9 de las cuales CED3 y CED4 son reguladoras positivas de la Apoptosis y CED9 es antiapoptótica, las otras proteínas que juegan un rol muy importante son las Caspasas y ApaF-1 que inducen Apoptosis y corresponden a CED3 y CED4 respectivamente. Además Bcl2 bien conocido como antiapoptótico que corresponde a CED9.

### **Genes del cáncer y Apoptosis**

Una faceta que une a la Apoptosis con el cáncer es el compromiso de muchos oncogenes y productos de genes supresores en la regulación y ejecución de Apoptosis, algunos de ellos son p53, Rb ras, raf y myc.

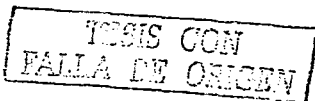
El p53 debido a su función en la Apoptosis se ha ganado el nombre de "Guardián del Genoma", monitorea el estado del DNA y si ocurre daño al DNA, demora el ciclo celular, através de la inducción de CIP/Wafl/p21, una proteína que previene la fosforilación de las quinasas ciclin dependientes, también conocidos como reguladores positivos del ciclo celular.

En ausencia de las quinasas ciclin-dependientes, el gen Rb se mantiene inactivo, (no fosforilado) y por lo tanto el ciclo celular se detiene, todo esto conlleva a la activación de la maquinaria de reparación del DNA, si falla la reparación del DNA, el p53 toma el mando e induce la Apoptosis.

El p53 también activa las killer/DR5, un nuevo miembro inductor de la Apoptosis de 45 kd de la familia del receptor de necrosis tumoral. Análogos al sistema receptor Apo-1/Fas/CD95 activan las Caspasas através de las proteínas FLICE.

Los proto-oncogenes myc y ras son también parte de la maquinaria apoptótica, el rol de myc es caprichoso, debido a que depende gravemente en como la célula es condicionada por otros factores. Así la presencia de factores de crecimiento inducen la proliferación y en su ausencia actúan como apoptóticos.

La sobreexpresión de ras puede llevar al incremento ó disminución de la Apoptosis, es negativamente regulado por bcl-2, la fosforilación del bcl-2, sin embargo invalida su capacidad para proteger a las células a la acción apoptótica inducida por ras.



**La Proteína Bax.** Es promotora de la Apoptosis y actúa en oposición a bel-2. Bax y bel2 forman homo y heterodímeros in vivo y la expresión relativa de estas proteínas así como el punto de control de Apoptosis depende del nivel o predominancia de cada una de ellas; si predomina bel-2 habrá mayor supervivencia celular, y se predomina los homodímeros Bax se promueve la muerte celular.<sup>(28)(15)</sup>  
Otras proteínas adicionales entre ellas: la familia CED-9, han sido implicados en la regulación de la Apoptosis, varias de estas con actividad similar a bel-2, además las citoquinas como ligandinas FAS (FASL) y las TNF son potentes inductores de Apoptosis. Se ha visto que la activación de FAS por exposición a la radiación y quimioterapia incrementa los niveles endógenos de Ceramida en un 200 a 300 por ciento y activa las fosfatasa y proteína quinasas, ciertas evidencias indican que proteasas ICE/CED-3 también son componentes esenciales en la Apoptosis radio inducida.<sup>(21)(24)</sup>

El gen Rb, es un regulador negativo del crecimiento celular y probablemente su inactivación por el VPH 16 la oncoproteína E7 promueve la Apoptosis en respuesta al daño al DNA por la radiación. También se ha establecido que p21 es un mediador crítico del p53 actuando en la respuesta de arresto de la fase G1 del ciclo celular.<sup>(21)</sup>

#### **La Regulación genética de la Apoptosis**

Actualmente se ha visto que el p53 está involucrado en la regulación genética de la Apoptosis. Este gen, que está situado en el cromosoma 17 del genoma humano, codifica para una fosfoproteína nuclear de 53kd que en nuestra especie tiene 393 aminoácidos.

Fue identificada por primera vez unida al antígeno T del virus SV40, p53, posteriormente se encontró que el Adenovirus E1B, 55K y la proteína E6 de VPH están asociadas al p53. Se pensó que era una proteína oncogénica por que lograba inmortalizar células primarias en cultivo y cooperaba con ras para transformarlas, exactamente las características de lo que hoy conocemos como una proteína oncogénica. Mas tarde se reconoció a p53 como un gen supresor cuya función desaparece al ser secuestrada su proteína por otra procedente de un virus oncogénico.

La proteína p53 tiene capacidad de unión específica al ADN, así también capacidad de activar la transcripción de genes "reporteros" adyacentes a su sitio de unión al ADN, siendo su forma de reconocimiento a ésta molécula la de un tetramero. Entre los indicios existentes que apuntan al carácter supresor del gen p53 en estado silvestre (p53+), están los siguientes:

En ensayos de cooperación entre p53 mutado (p53-) y ras, la transfección con p53 silvestre (p53+) suprime la transformación.

p53 también suprime la cooperación entre cmyc y ras.

Las mutaciones en el gen p53 constituyen la alteración genética más común en los cánceres humanos. Más del 50% de éstos tienen mutaciones en éste gen.-La proteína p53 silvestre también interactúa con el gen celular MDM2. Este gen se identificó inicialmente por su amplificación espontánea en una línea de ratón (murine double minute,MDM).

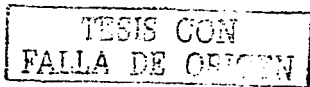
El homólogo humano de éste gen, que también se conoce como MDM2, su sobreexpresión interfiere con la función del p53+.

La expresión de p53+ puede perderse por mutaciones de diferentes tipos en el gen p53, por unión a proteínas virales ó por unión a proteínas celulares como la MDM2. Es interesante señalar que en los cánceres por infección del virus Papiloma Humano (V.P.H.), como en los de Cérvix Uterino, las mutaciones en el gen p53 son raras.

#### **Función del p53**

La proteína p53+, de manera semejante a la proteína Rb, es una proteína reguladora del proceso de la proliferación celular. El modelo general que explica la función de p53+, postula que ésta proteína se une a sitios específicos en el ADN que la reconocen en forma de tetramero, estimulando la transcripción de determinados genes, que se saben realizan parte de las funciones dependientes de p53 en una célula. Recientemente se han identificado algunos de estos genes: Se trata, por ejemplo, de p21 (también llamado WAF1 óCip 1, cuya proteína inhibe ciertas cinasas dependientes de ciclinas, al unirse a éstas, así como al PCNA- Antígeno nuclear de células en proliferación y es capaz de detener el ciclo celular).

MDM2 ( Producto de un oncogen, inactiva la transcripción mediada por p53 y regula la actividad de ésta proteína), GaDD45(Inducido por daño celular, se une al PCNA y puede detener el ciclo celular, estando directamente





involucrado en la reparación del tipo de excisión del ADN), Bax ( miembro de la familia Bcl2 relacionada con la Apoptosis, es antagonista de Bcl2, promoviendo la Apoptosis inducida por p53). Sugiriéndose que el p53 actúa como el "guardián molecular", monitoreando la integridad del genoma. (1) (2). El siguiente es uno de los modelos propuestos de función del p53:

1. En células normales, no hacen falta p53 para regular la división.

2. Cuando ocurre el daño a nivel del ADN en células normales, con p53 intacto, aumentan los niveles de ésta proteína nativa, y la célula se detiene en G1. En la respuesta de una célula normal al daño del ADN, se induce la función de "Guardián del genoma" de p53+. Al detenerse la proliferación, hay tiempo para que ocurra la reparación del ADN.

De fallar la reparación, entonces p53 desencadena la Apoptosis ó muerte celular programada, y la célula induce la desintegración de su genoma con su muerte consiguiente.

3. Cuando ocurre daño al ADN en células tumorales, no se induce p53+(por que el gen está inactivado por mutación, unión a proteínas virales ó celulares), entonces no se produce detención del ciclo en G1, y si ocurre división celular con daño (lo cual determina fijación de la mutación, aneuploidia ó inestabilidad genómica creciente).

A diferencia del gen Rb, que es un supresor que actúa en condiciones normales de vida para la célula, p53 parece ser el gen supresor que actúa sobre todo en condiciones de estrés.

El bcl-2, el cual, emerge como un nuevo tipo de proto-oncogen que suprime la muerte celular más que la proliferación, sin embargo no es en todas las circunstancias que inhibe la Apoptosis. La actividad antiapoptótica de bcl-2 fue primeramente demostrada en células B inmaduras dependiente de interleucina 3 (IL3).

Mecanismos inhibitorios de expresión del proto-oncogen bcl-2 se han mostrado en varios tumores a una variedad de tratamientos como Radioterapia y Quimioterapia, puede estar implicado en el desarrollo de resistencia de los tumores a la radiación ó a los agentes químio-terapéuticos, éstos mecanismos pueden también contribuir a la supervivencia inapropiada de células con anomalías del DNA<sup>(26)</sup>

Es así como la exposición a Rayos Gamma ó a drogas citostáticas hacen que las células normales aumenten la expresión de p53 y detengan el ciclo celular hasta que el daño se repare. En cambio las células con p53 mutado, continúan dividiéndose. Un tumor en pleno desarrollo tiene sus células en estrés, ya que éstas experimentan anoxia (Falta de oxigenación) y aneuploidia. La inducción de p53 +en células "estresadas", pero no mutadas, provocaría una limitación a su crecimiento. En cambio, células "estresadas" con p53 mutado, expresarían la proteína mutada, carente de la acción supresora de la proliferación, lo cual permitiría al tumor su futura expansión. Ello explica por qué mutaciones en p53 se seleccionan de forma tardía en la progresión tumoral: El estrés da ventaja selectiva a células con p53 mutado. En otras palabras las células con p53 mutado aunque estén en estrés "fisiológico" que impone el tumor, actúan como si no lo percibieran y continúan dividiéndose.

Normalmente en una célula, la proteína p53 se mantiene a bajas concentraciones, debido a su relativamente corta vida media (alrededor de 20 minutos).

Las señales que parecen activar el aumento de la expresión de p53 están todas relacionadas con algún tipo de estrés para las células. Frente a éstas señales, se incrementa el tiempo de vida media de ésta proteína, probablemente a partir de un aumento en su fosforilación, así como en un incremento en la velocidad de iniciación de su traducción (ó síntesis proteica a partir de su ARN mensajero específico).

Hoy se han identificado algunas de las señales de peligro, entre las cuales figuran la ocurrencia de diferentes tipos de daños al ADN, la aparición de hipoxia, así como la depleción del pool de ribonucleósidos trifosfatos por debajo de un umbral crítico en la célula.

Actualmente se conoce que p53 gobierna la ocurrencia de dos vías principales en la célula con estrés: LA DETENCIÓN DEL CICLO CELULAR Y LA APOPTOSIS.

6

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El hecho de que la célula se decida por uno u otro camino depende de diversos factores.

Existen evidencias experimentales que el p53 puede actuar como regulador negativo del ciclo celular en sus tres puntos de control: en G1/S, en G2/M, y en G0-G1-S, tanto como factor de transcripción de genes necesarios en diversas etapas de éste ciclo celular, como a través de señales directas de interacción proteína-proteína. En la regulación del ciclo celular en momentos de estrés, el gen p53 es inducido, lo cual activa la transcripción de genes como p21, el cual a su vez bloquea la actividad de las cinasas fosforiladoras de Rb. La ausencia de fosforilación de pRb, como ya sabemos, retiene a E2F secuestrado por parte de pRb, cuya consecuencia es la permanencia de la función supresora de ésta proteína y el consiguiente detenimiento del ciclo celular.

p53 inducido por estrés es también responsable de la activación de genes como GADD45, activador de la reparación en el ADN dañado.

El compromiso de p53+ en el punto de control G2/M lo hace también responsable de la regulación de la ploidia adecuada en la célula que está a punto de entrar en mitosis. Todos estos controles se pierden en los tumores en los que el gen p53 se encuentra mutado, lo que les permite escapar de estos mecanismos de control al estrés celular, evadiendo el detenimiento de la proliferación celular ó mejor aún la muerte.

#### El Papel del p53 en el Tratamiento de las Neoplasias Malignas

El tratamiento del cáncer con Quimioterapia y Radioterapia produce daño extenso en el ADN celular, así como las correspondientes señales para la inducción de p53 en esas células. Hoy sospechamos que la Apoptosis dependiente del p53 es la moduladora de gran parte de la respuesta efectiva a estos tratamientos. Se ha observado que los tumores portadores de un gen p53 intacto (silvestre), al inducir la Apoptosis en sus células como respuesta a la agresión del tratamiento, responden mejor al mismo que aquellos tumores con p53 mutado, precisamente por que inducen la muerte de sus células malignas. Cuando los tumores recidivan y se hacen resistentes a la terapia contra ellos, éste hecho se correlaciona generalmente con la adquisición de mutaciones en p53. Aquellos tumores que responden pobremente a Radioterapia y Quimioterapia, tienen generalmente mutaciones en el p53. Ello explica por qué tumores con mutaciones en p53 se asocian con intervalos libres de enfermedad más cortos y menor supervivencia total en éstas pacientes. Sin embargo, la realidad clínica es más compleja que éstas observaciones, y no siempre se da una correlación tan clara entre el status del gen p53 y la respuesta a estos tratamientos antineoplásicos, pues como es de esperarse, de estas respuestas es difícil excluir el aporte de otros genes involucrados, así como lo que significa el cambio de ambiente celular que también se produce como resultado de tratamientos tan agresivos como estos, y otros muchos factores aún desconocidos.<sup>(41)</sup>

#### Inducción de la Apoptosis

Un gran número de estímulos puede inducir la Apoptosis en una célula de una manera independiente. Los inductores generalmente actúan en muchos tipos de células incluyen:

Varios agentes quimioterapéuticos, radiación ultravioleta y radiación gamma, imbalance osmótico, altos niveles de calcio, corticosteroides, ablación hormonal y factores de crecimiento.

Dependiendo del factor estimulador y de la célula hay múltiples señales que pueden activar la maquinaria apoptótica. La Apoptosis inducida por linfocitos citotóxicos está mediada por un inductor ligando, no secretorio y mediado por un receptor ó por una perforina secretoria.

En el caso de daño al DNA la Apoptosis es iniciada por la activación de mediadores del p53, así como Bax y Killer/DRS. Los cambios en el composición de los fosfolípidos pueden también iniciar la Apoptosis.

La radiación como efecto directo en la célula actúa al nivel de DNA, provoca la activación de la esfingomielina resultando en la degradación de la esfingomielina hasta ceramida.

La Apoptosis mediada por ceramida también es comenzada por varios factores así como la privación sérica, interleucina1. Factor de necrosis tumoral alfa, D3, 1,25 dihidroxi-colecalciferol y la supresión del factor del crecimiento del nervio.

Una de las vías apoptóticas mejor conocida es la que emana del receptor APO-1/FAS/CD95, que corresponde a la familia de proteínas receptoras relacionada al factor de necrosis y es una ligandina presente en las células citotóxicas.



**APO1 y FADD/MORT-1**, juntas estas dos proteínas forman un complejo de señal inductor de Apoptosis, también **FLICE**, que además es un miembro de una gran familia de proteínas Caspasas.

Estas Caspasas que hace unos pocos años han sido extensamente estudiadas en su rol en la Apoptosis, se identifican como una vía final común de la iniciación de la Apoptosis con sistemas altamente divergentes.

Las Caspasas son proteínas cisteína que divide sus proteínas blanco como ácido aspártico en un contexto de secuencias definida. Actualmente se han reconocido 12 Caspasas, son activadas como en cascada, involucran la división de la molécula hasta 10 y 20 subunidades kd, las cuales pueden heterodimerizar y asociar tetrameros, que son las enzimas activas.

Las proteínas blanco No Caspasas incluyen proteínas del sistema de reparación del DNA, proteínas del citoesqueleto ó de la estructura y oncoproteínas.

Algunas de las enzimas de reparación del DNA son polirribosa ADP-polimerasa.

Las oncoproteínas mejor conocidas, degradadas por las Caspasas son la proteína de Retinoblastoma Rb y mdm2.

La familia bcl-2 es otro grupo de proteínas estrechamente relacionada a la Apoptosis, incluye inhibición de la muerte celular, los miembros de ésta familia incluyen: bcl-xl, bcl-w, bfl-1, brag-1, mcl-1 y A1. Y de los miembros promotores de Apoptosis son: bax, bak, bcl-xS, bad, bid, bik, Hrk. Su acción prevalente dependerá del exceso de los miembros que haya, así si predomina los homodímeros bax, todo estará a favor de la Apoptosis.

A1 contrario con un exceso de heterodímeros bcl-2, bcl/bax, lo cual estará a favor de la inhibición de la Apoptosis.

Bcl-2 personifica el al gen anti-apoptico, contra-actúa en las señales de inducción de Apoptosis, dados por estimuladores como: Agentes quimioterapéuticos, estrés oxidativo, infecciones virales, p53, corticosteroides y factor de crecimiento.

Bcl-2 y bcl-xl son inductores negativos de la Apoptosis ligando Apaf-1, previniendo la activación procaspasa-3, CED3, que es inductora de Apoptosis.

Bcl-2 se descubrió en una traslocación (t(14,18) en el Linfoma Folicular, y ha sido considerado por su función como un oncogene.

#### **La Ocurrencia e Implicaciones de la Apoptosis**

El tamaño de la población de células neoplásicas depende del balance entre la producción celular y pérdida celular, en 1972 cuando se describió la Apoptosis poca atención se dio a la detección celular controlada. Hace unos pocos años se han hecho avances en la comprensión del control de la apoptosis, aumentándose su significancia oncológica mas que la mera explicación de la detección celular tumoral.

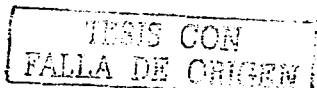
Se ha visto que la Apoptosis es también importante en teratógenesis, en la patogénesis de las malformaciones congénitas afectando la reducción neta de células, al contrario de lo que ocurre en las neoplasias malignas en las que el número de células se incrementan progresivamente, Kerr, Willie y Currie también encontraron que la Apoptosis juega una parte significativa en algunos tipos de atrofia e involución.

En algunas neoplasias malignas la proliferación celular no es mayor cuando se compara frente a la contraparte normal. Algunas células se dividen con mayor lentitud, sin embargo, la población de células malignas tiene un índice de mayor crecimiento a consecuencia de una supervivencia celular prolongada, lo que sugiere una alteración en el fenómeno de la Apoptosis.

El descubrimiento de los mecanismos que hacen fallar la maquinaria normal de la muerte celular programada podría significar un gran avance no solo en relación con los aspectos terapéuticos, sino en los mecanismos inherentes de la carcinogénesis.

La terapéutica actual para las neoplasias malignas se basa en la cirugía, en la quimioterapia y en la Radioterapia, pero la resistencia tumoral a éstas formas de tratamiento es el mayor impedimento para el éxito terapéutico.

Debido a que la Radioterapia y la mayoría de los fármacos Antineoplásicos actúan induciendo alteraciones genéticas en las células proliferantes, la tumoricidad específica por ambas modalidades terapéuticas es atribuida a éste daño. Sin embargo en varios de los casos, las alteraciones genéticas no son suficientes para explicar la citotoxicidad observada. En particular el proceso de la apoptosis puede ser regulada por la producción de ciertos protooncogenes,



el gen supresor del tumor el p53, citoquinas y factores de crecimiento que juegan un rol en la promoción ó reducción de la apoptosis inducida por la radiación<sup>(15)</sup>.

En un modelo experimental, se demostró que el gen p53 es determinante para que la apoptosis se lleve a cabo, y que la pérdida de su función aumenta la resistencia a diferentes agentes quimioterapéuticos. Estos resultados tienen una buena correlación con algunos ejemplos clínicos<sup>(16)</sup>.

1. Algunos de los tumores con marcada quimiorresistencia, como el Melanoma y el Carcinoma de Pulmón, presentan un alto porcentaje de mutación del p53, otras neoplasias como los Sarcomas, sin tener necesariamente mutaciones, expresan anormalmente el gen mdm2 que codifica la proteína p90 que neutraliza la función del gen p53.
2. Es notorio que neoplasias con baja frecuencia de mutación del gen p53, como el carcinoma de testículo y la leucemia linfoblástica aguda en niños, sean altamente quimiosensibles y curables con tratamiento convencional.
3. En la leucemia linfoblástica aguda en recaída ó refractaria a reinducción, se ha demostrado la presencia de mutaciones del gen p53.

Lo anterior podría explicar, por lo menos en parte el pobre pronostico de numerosas neoplasias con alteración del p53.

En el 85% de los casos de Linfomas foliculares se ha demostrado aumento en la expresión de Bcl-2, la actividad antiapoptoica de éste gen se ha comprobado en varios modelos experimentales.

#### **Estrategias terapéuticas potenciales derivadas del conocimiento de la Apoptosis**

Existen ahora, técnicas bien desarrolladas para medir la proliferación del tumor antes del tratamiento y esto ayuda a seleccionar pacientes para predecir resultados al tratamiento con radioterapia tanto en la practica médica diaria como en investigaciones clínicas<sup>(17)</sup>. Hay evidencias no concluyentes en relación al pronostico del cáncer cervical tomando en consideración la medición de la proliferación tumoral.( Dixon et al 1977, Strang et al., 1987; Naus y Zimmerman, 1991; Cole et al., 1992; Zanetta et al 1992; Tsang et al. 1995)<sup>(18)</sup>

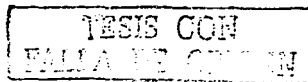
Se necesitan varios estudios epidemiológicos y clínicos para contestar las preguntas aún sin respuesta, generara hipótesis adicionales y guiar otros puntos de la aplicación de la Radioterapia en el tratamiento del cáncer Cérvico Uterino.

El que la resistencia a la radioterapia ó Quimioterapia dependa al menos parcialmente, del estado del gen p53 y el hecho que éste gen se encuentre alterado en una proporción importante de casos ó en casi todos los tumores, sugieren que la terapéutica encaminada a restablecer su función podría tener éxito. Esto se podría lograr con la terapia génica cuando se sobrepasen los obstáculos para transfectar eficientemente a las células tumorales ó lograr que la proteína normal alcance su sitio de acción.

Al parecer, las mutaciones y las deleciones no son los únicos mecanismos de alteración del gen p53, su acción también puede afectarse al interactuar con proteínas virales, como la E6 del papiloma virus ó la proteína codificada por el gen mdm2. El desarrollo de agentes capaces de bloquear estas proteínas inhibitoras es, por lo tanto, otra alternativa de tratamiento.<sup>(19)</sup>

Es importante definir si el gen Bcl2 se encuentra expresado en neoplasias diferentes a los linfomas. En la actualidad se sabe que se expresa en mayor cantidad preferentemente en carcinomas gastrointestinales poco diferenciados. El reciente descubrimiento de la proteína codificada por el gen Bax y su capacidad para formar dímeros con la proteína Bcl2 sugiere que podría utilizarse como agente antiapoptoico, esto también puede señalarse para la proteína codificada por el gen Bclx-S cuando se llegue a definir mejor su mecanismo de acción.

El descubrimiento de los mecanismos que hacen fallar la maquinaria normal de la muerte celular programada podría significar un avance no solo en relación con los aspectos terapéuticos, sino en el conocimiento de los mecanismos inherentes de la carcinogénesis.<sup>(19)</sup>



La Apoptosis de hecho puede ser un marcador de agresividad biológica del tumor en el cáncer Cérvico Uterino, por lo tanto necesitamos valorarla como un predictor potencial de respuesta en tumores tratados con Radioterapia.<sup>(9)</sup>

#### **Detección Morfológica de la Apoptosis**

Se puede detectar a través del microscopio de luz ó electrónico su morfología, a través de la incorporación enzimática de nucleótidos marcados a fragmentos de ADN en su extremo 3', ó por citometría de Flujo

#### **Índice Apoptoico**

El índice apoptoico es usado como una medida de la extensión de la Apoptosis. A menudo se define como el porcentaje de células apoptoicas y cuerpos apoptoicos por todas las células tumorales. Algunos autores, sin embargo usan la denotación de número de células por 1,000 células tumorales. Además en otras investigaciones han medido la Apoptosis miden el número de células apoptoicas por 10x campos de alto poder.

Realmente es aparente que hay una amplia variación en la extensión de la Apoptosis no solamente entre los diferentes tumores, pero aún en el mismo tumor. Por ejemplo en los Linfomas de Alto Grado el promedio del índice apoptoico varía entre 1.4 y 8.8% y en el Carcinoma de Células Pequeñas de Pulmón entre 0.1 y 10.9%, aún en el mismo grupo de tumores pueden haber variaciones, debido probablemente a las diferencias en grado histológico.

Existe ciertos factores técnicos y metodológicos que influyen la determinación del índice apoptoico como ser: Fijador usado, Concentración del fijador, lavado del tejido, tiempo largo de fijación más de 3 semanas, retraso en la fijación.

#### **Ocurrencia de Apoptosis en los tejidos normales**

La Apoptosis juega un rol esencial en desarrollo normal de los vertebrados. En los mamíferos adultos, la Apoptosis ocurre continuamente en las poblaciones celulares de lento crecimiento, así como el epitelio del hígado, próstata, y corteza adrenal y en las poblaciones celulares de rápido crecimiento así como el epitelio del tracto intestinal y de la espermatoogonia. Hay evidencias que la Apoptosis es regulada por la mitosis, factores de crecimiento y hormonas tróficas.<sup>(5)</sup>

#### **Ocurrencia de la Apoptosis en Tumores Humanos**

Las circunstancias de ocurrencia de Apoptosis caen dentro de varias categorías. Acontece por la delección de las células que ocurre en los tejidos normales, y es observada en ciertos contextos patológicos específicos, remarcando su diferencia con la necrosis que siempre es patológica, resultado del daño catastrófico a la célula y no tiene la función homeostásica de la Apoptosis.<sup>(5)</sup>

Los factores responsables para la ocurrencia de Apoptosis espontánea en los tumores son diversos. El factor de necrosis tumoral alfa se ha demostrado que induce la Apoptosis en algunas líneas celulares in vitro, así algunas de las Apoptosis observada en tumores in vivo puede ser atribuida a la liberación de ésta citokina por los macrófagos. En otras instancias la Apoptosis puede ser resultado del ataque a las células por linfocitos T citotóxicos.

Finalmente la Apoptosis incrementada en los tumores puede resultar de un proceso intrínseco de las células tumorales.<sup>(5)</sup>

#### **Linfomas**

Los Linfomas No Hodgkin de Alto Grado muestran un índice significativamente alto que en los Linfomas de Bajo Grado. Esto se correlaciona con la ocurrencia del gen bcl-2 antiapoptoico, el cual se sobre-expresa en los Linfomas de Bajo Grado. De hecho hay una asociación inversa entre la expresión bioquímica de bcl-2 y el índice apoptoico. También otros miembros del grupo bcl-2, así como los promotores de Apoptosis Bax, e inhibidores mcl-1 también son expresados en los Linfomas.

#### **Carcinomas de Mama**

En el cáncer de mama, una extensa Apoptosis se asocia con pobre pronóstico, y a más alto grado, más Apoptosis. Esto es probablemente dado por una pérdida de receptores para hormonas que actúan como factores de sobrevida. Interesantemente en los carcinomas de mama con receptores de estrógeno y progesterona positivos, también pueden tener bcl-2 positivo. La expresión de bcl-2 en general se encuentra en un 70% de los carcinomas de mama, y ésta expresión es inversamente asociada con el índice Apoptoico y con mejor pronóstico.

### **Carcinomas Endometriales**

La Apoptosis está incrementada en Adenocarcinomas endometriales y se incrementa en los tumores con patrón sólido. Para algunos la extensión se correlaciona inversamente con la expresión del bcl-2, el cual es fuertemente expresado en las células epiteliales del endometrio normal pero reducido en las Hiperplasias Atípicas y carcinomas. La expresión del bcl-2 se asocia con baja Apoptosis.

### **Carcinoma de Próstata**

Bcl-2 y mcl-1 se expresan altos en los tumores de alto grado, así como en mama, las hormonas, como Androgeno, actúan como factores de sobrevida. La Apoptosis incrementada se asocia con niveles altos de bcl-2, mcl-1 y con pobre pronostico.

### **Carcinomas Gastrointestinales**

En carcinomas pancreáticos y Hepatocelulares no tienen asociación entre Apoptosis y el grado del tumor ó sobrevida de los pacientes.

### **Carcinomas de Pulmón**

En los cánceres de pulmón de células No Pequeñas no se les encuentra asociación entre Apoptosis y Sobrevida ó estadio avanzado, la expresión del bcl-2 se le encuentra en 8-30% y en Carcinomas de Pulmón de células Pequeñas está presente en un 90%.

### **Otros Tumores**

Otros tumores han sido menos extensamente estudiados, en tumores de cerebro, se ve más Apoptosis en los Gliomas Grado II comparado con lasa lesiones grado III, sugiriendo que la Apoptosis, contribuye a un mejor pronostico. Los Glioblastomas tienen un alto índice apoptoico que en los tumores bien diferenciados.

La Apoptosis en Sarcomas se ha estudiado muy poco en cuanto a significación en pronostico y supervivencia.

### **Por Qué hay Apoptosis incrementada en el Cáncer**

Es obvio que las consideraciones acerca de la Apoptosis están generalmente incrementada en el cáncer. De hecho hay solamente unos pocos tumores, así como los Linfomas Foliculares de células B en las cuales la inhibición de Apoptosis, se ha demostrado convincentemente y juega un rol decisivo en el desarrollo de las neoplasias.

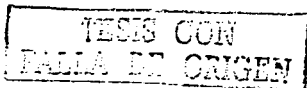
Por otro lado la ocurrencia de la Apoptosis no muestra una regla en particular en relación con el estadio del tumor, grado ó progresión, además hay una gran variabilidad dependiente del tumor.

Para contestar la pregunta del por qué la Apoptosis está incrementada en los tumores, parte de la explicación probablemente sale de la activación de oncogenes en el proceso de desarrollo de las neoplasias, algunos de los cuales también influncian la Apoptosis.

En todos los casos la Apoptosis es dada ya sea por factores internos de la maquinaria de muerte celular, ó por factores externos así como: Las células T activada mediada por FAS, pérdida de la adhesión celular, importante en este sentido son las integrinas y cadherinas.

Otro factor externo estimulador es la hipoxia que predomina en los tumores.

Un punto muy importante es la relación entre Apoptosis y Proliferación, ya que son mecanísticamente parecidas, un punto de enlace es el hecho que aunque la Apoptosis puede ser iniciada en cualquier fase del ciclo celular, la mayoría de las células que sufren Apoptosis están principalmente en la fase G1 del ciclo celular.<sup>(43)</sup>



## I.b. Antecedentes.

Los últimos veinte años han sido muy importantes para la comprensión de la epidemiología del cáncer de cervix y de los factores pronósticos que afectan la supervivencia. Su prevalencia y la accesibilidad para la observación unidas al universal y sencillo sistema citológico para su detección precoz, han proporcionado datos histológicos tan detallados como para que la enfermedad pueda conocerse ampliamente.

Aparte con las nuevas técnicas de biología molecular se podrán contestar múltiples preguntas sobre su producción, desarrollo, comportamiento clínico y factores pronósticos.

La Radioterapia como principal modalidad de tratamiento para cáncer Cérvico-Uterino desde 1913, en dos modalidades Radioterapia externa ó teleterapia que se usa para tratar toda la pelvis, los parametrios y las cadenas ganglionares; la segunda modalidad de tratamiento, es la Braquiterapia que consiste en el uso de técnicas intracavitarias (Colpostatos, cilindros vaginales y agujas), el isótopo mas usado es el cesio 137 en baja tasa de dosis y el Iridium 192 usado en alta tasa de dosis. Se ha visto que los niveles de recurrencia muestran considerable variación en base al estadio clínico (EC) de presentación, va de 3-6% en el EC I, hasta 45% para el EC III, y aproximadamente 30% de todas las pacientes en todos los estadios tendrán falla pélvica loco regional ó persistencia tumoral después del tratamiento primario adecuados.(7).

La capacidad para identificar éstas pacientes con alta probabilidad de recurrencia podría permitir seguir tratamientos estándares sencillos, para ser utilizados en aquellas y la selección de otras pacientes para técnicas de Radioterapia alternativas, técnicas combinadas, ó estudios de tratamientos adyuvantes.<sup>(18)</sup> Muchos son los factores que han sido considerados como posibles indicadores pronósticos en pacientes con carcinoma Cérvico-uterino entre ellos: Estadío, volumen tumoral y estatus ganglionar.<sup>(9)</sup>

Otros factores que afectan el pronostico de éstas pacientes son:

- La hemoglobina con valores menores a 10g/dl, el uso de transfusiones sanguíneas mejora la respuesta a la radioterapia.
- Hipertensión Arterial, Jenkin y Strinker observaron una alta incidencia de recurrencias pélvicas en pacientes con presión diastólica de 110mm de Hg.
- Tumores en forma de barril, Fletcher, Eifel y colaboradores, Pérez y colaboradores reportan gran incidencia de metástasis linfáticas y metástasis a distancia en éste tipo de tumores.

La radioterapia es una importante modalidad en el manejo curativo del Cáncer de Cervix, sin embargo continua evolucionando en términos de integración con otras modalidades de tratamiento (Cirugía y quimioterapia).

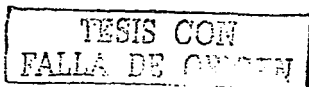
Los resultados en control local y supervivencia han mejorado y por ser la población afectada por cáncer cérvico-uterino tan importante en magnitud, el impacto en salud pública.

Datos retrospectivos sugieren que la Radioterapia pélvica adyuvante mejora significativamente el control pélvico pero no impacta en la supervivencia de las pacientes, con factores de riesgo de recurrencia y a quienes se les ha realizado una cirugía radical.

Varios procedimientos han sido implementados para incrementar el control loco regional de la radioterapia en Cáncer Cérvico Uterino, esquemas de fraccionamiento no estándar, combinación de tratamientos con cirugía, radiosensibilizadores y quimioterapia. Resultados recientes de cada uno de los cinco estudios aleatorizados, reportados por el National Cancer Institute (NCI), muestran beneficios en la supervivencia global empleando tratamiento de Cisplatino mas Radioterapia concomitante para estadios IB2 hasta IVA, el riesgo de muerte se disminuyó del 30% hasta 50%.

Técnicamente los dos tratamientos, Quimioterapia y Radioterapia podrían tener un efecto sinérgico, por ejemplo la Quimioterapia incrementaría la sensibilidad del tumor a la radiación. Inhibiendo la reparación del daño radio-inducido, promoviendo la sincronización de las células a que entren en las fases sensibles a la radiación, G2 y M, y reduciendo la fracción de células hipóxicas que son resistentes a la radiación.

Desde los años 80 muchos estudios Fase I y II han establecido que el tratamiento con Cisplatino y 5 Fluoracilo y Mitomicina pueden ser combinados sin problemas durante la radiación pélvica.



A pesar que la tasa de respuesta completa con Radioterapia sola es alta, de todos modos, parece que hay un incremento en el beneficio de agregar Quimioterapia, la respuesta a ésta pregunta viene a ser el objetivo para estudios fase III.<sup>(1,36)</sup>

Actualmente también se buscan factores predictores de respuesta a los tratamientos en cáncer Cérvico Uterino, por ser una de las patologías que causa la mayor tasa de mortalidad materna, uno de estos factores que ha despertado interés, es el posible rol de la Apoptosis. Se ha encontrado también una correlación entre los niveles espontáneos de Apoptosis en tumores no irradiados y la extensión de la Apoptosis radio-inducida ó quimio-inducida. En el campo de la Radiobiología y Oncología, la Apoptosis es reconocida como un indicador importante de radiosensibilidad, así la evaluación de la radiosensibilidad del tumor por la valoración de Apoptosis espontánea ó la Apoptosis puede ser útil en la determinación de tratamiento apropiado y quizá con un rol importante otros parámetros relacionados con la Apoptosis son el índice de proliferación y el índice de crecimiento.

#### La Apoptosis y la Radiación.

La biología molecular moderna está proveyendo grandes oportunidades para incrementar el efecto y la especificidad de la radiación, todo esto ha abierto una excitante avenida para futuras investigaciones.

Hace más de 20 años se sugirió que la Apoptosis acontece al estudiar la cinética celular, se ha identificado una amplia gama de factores (Fisiológicos, farmacológicos y patológicos) que modulan positiva ó negativamente el proceso de Apoptosis que ocurre en varios tumores y está claro que éste proceso se incrementa en tratamientos como la Radioterapia, quimioterapia y ablación hormonal.<sup>(1,2,6,8,11,13)</sup>

La Apoptosis es un mecanismo de pérdida celular en tumores no tratados y se ha sugerido que la radiación ionizante incrementa éste proceso<sup>(2,5)</sup>.

Hay un creciente interés en el posible rol de la Apoptosis como un indicador de respuesta a Radioterapia.

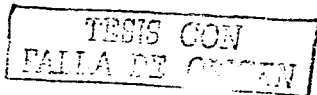
Se ha encontrado una correlación entre los niveles espontáneos de Apoptosis en tumores no irradiados y la extensión de la Apoptosis radio-inducida. La Apoptosis radio-inducida ha sido estudiada en varios tumores animales y radiosensibles como linfomas y leucemia<sup>(13)</sup>.

Puede ser que el rol de la Apoptosis difiere entre los tipos histológicos. Además una revisión de Potten sugiere que puede ser de valor considerar el radio de los índices de Apoptosis y Proliferación. Muchos estudios han mostrado relación estrecha entre Apoptosis y proliferación. Actualmente se está investigando la radiosensibilidad y supervivencia de las pacientes en relación con la respuesta apoptoica.

Se ha demostrado que los tumores con índice apoptoico relativamente alto son más radiosensibles y por tanto tienen una mejor supervivencia. Al contrario, esto sugiere que la resistencia a los efectos citotóxicos de la Radioterapia está predeterminada por el nivel genético y por la expresión de los miembros de la familia de genes apoptoicos. Hay 2 implicaciones para esta afirmación:

1. La radiosensibilidad se puede predecir con una biopsia antes del tratamiento, examinando el índice apoptoico y la expresión de genes apoptoicos, permitiendo así la identificación de pacientes con tumores que serán resistentes a la Radioterapia y además se les evitará una terapia sin beneficios y además los posibles efectos secundarios de la terapia.
2. Una vez que son identificados resistentes por estos métodos, se podría sensibilizar al tumor para Apoptosis radioinducida (através de la restauración de la vía apoptoica, reintroducción del p53 normal ó sobreexpresión de Bax con técnicas de terapia génica.).

La radioterapia hasta ahora como la principal modalidad de tratamiento curativa y paliativa en cáncer Cérvico-uterino, dada en dosis pequeñas y/o moderadas, incrementa importantemente la Apoptosis sin producir necrosis. Este fenómeno puede verse antes y después del tratamiento con radioterapia, evidenciando que la radioterapia "per se" puede inducir la Apoptosis celular, lo que también ha sido demostrado con tumores experimentales. Se ha reportado que la respuesta apoptoica aguda después de la irradiación, puede ser un hallazgo de radiosensibilidad.<sup>(2)</sup>





La respuesta celular es iniciada por la deposición de la energía en forma de radiación ionizante sobre blancos celulares sensitivos y con la consiguiente formación de macromoléculas dañadas y radicales libres, no es simplemente un proceso físico-químico pasivo.

El daño de la radiación es reconocido por moléculas receptoras intracelulares y las señales son posteriormente traducidas a través de la movilización de proteínas de la célula involucrada, en muchos tipos de células la respuesta a menudo hay un intento para reparar el daño, ocurriendo arrestos transitorios y muerte celular. Este ha sido el pensamiento tradicional, sin embargo estudios recientes han demostrado un amplio rango de efectos intracelulares de la radiación, incluyendo alteraciones en la membrana celular, estimulación de señales específicas, de vías de transducción, activación de las vías de estrés oxidativo y produciendo la expresión de genes.

El mecanismo por el cual la radiación induce muerte celular ó Apoptosis varía entre los tipos celulares y puede tener implicaciones terapéuticas, aunque estas no han sido evaluadas completamente. <sup>(14)</sup>

La vía en la cual la radiación desencadena la cascada apoptótica en células normales y neoplásicas ha sido completamente desconocida hasta ahora recientemente. Hasta ahora parece posible que el p53, gen supresor del tumor está involucrado en el proceso <sup>(15)</sup>. Parece que algunas células pueden experimentar división celular en particular posterior a la exposición de dosis citotóxicas de radiación a esto se le ha llamado "Apoptosis secundaria".

La composición genética de las células y la sensibilidad resultante a la Apoptosis son tan imparciales como críticas así como en la Apoptosis inducida por Quimioterapia. Las líneas celulares que se sobreexpresan de Bcl2 son menos sensitivas a los efectos citotóxicos de la radiación, similarmente a las células que les hace falta el gen p53 intacto ó silvestre pueden ser más resistentes a la Apoptosis radio-inducida. Estos datos demuestran que la sensibilidad a la radiación in vitro es determinada por la composición genética de las células con respecto a la existencia de genes de la familia apoptoica.

Finalmente parece que la respuesta apoptoica es independiente del agente inductor, las células que son resistentes a la inducción de Apoptosis por radiación, son también resistentes a los agentes quimioterapéuticos.

En células normales, la irradiación, drogas alquilantes y otros agentes dañan el DNA, incrementan la expresión del p53 en un tejido de manera específica, además se activan otros genes como p21, GADD45, Proteína Bax., al poner en función la vía del p53 tiene por lo menos 2 posibles resultados celulares posibles:

#### 1. Arresto del ciclo celular

#### 2. Apoptosis

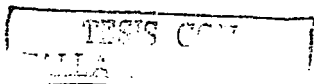
Las vías independientes del p53 tienen al menos los mismos resultados, las células que tienen mutado el p53 posterior a la irradiación disminuyen en el arresto y tienen menos tendencia a la Apoptosis <sup>(16, 21)</sup>

Probablemente la Radioterapia provoca daño al DNA ó daño a las moléculas involucradas en la señal de traducción así como lípidos y kinasas, el resultado final es la respuesta celular coordinada que puede variar en el tejido celular, según dosis y calidad de la radiación, éstas respuestas moleculares pueden ocurrir en cuestión de minutos a horas después de la radioterapia y el RNA mensajero y la abundancia de la proteína puede ser alterado por mecanismos de transcripción. <sup>(3)</sup>

La radiación puede reorganizar la expresión de muchos genes celulares además del p53, también la biosíntesis de algunas proteínas, algunas se disminuyen y otras aumentan.

Probablemente la radiación provoque daño al DNA ó daño a las moléculas involucradas en la señal de la transducción así como lípidos y kinasas. El resultado final en la respuesta celular puede variar según: el tejido, tipo celular, dosis y calidad de la radiación. Estas respuestas moleculares pueden ocurrir en cuestión de minutos a horas después de la radiación y el RNA mensajero puede ser alterado por mecanismos de transcripción ó posttranscripción, las respuestas más rápidas las da el c-myc y c-fos, otra parte de la respuesta involucra inducción de secreción de varias moléculas así como las citokinas, proteasas y antiproteasas, que regulan la reacción aguda del tejido y provocan subsecuente remodelación del tejido.

Las respuestas moleculares radioinducidas parecen primariamente involucradas en la detección del daño al DNA y la provocación de Apoptosis y el mantenimiento de la integridad del tejido. <sup>(3)</sup>



Debido a que el grado de Apoptosis varía en los diferentes tumores experimentales, se plantea la posibilidad que los niveles pre-tratamiento predicen la respuesta de la paciente a la Radioterapia.<sup>(2)</sup> Dewey y colaboradores publicaron una revisión de Apoptosis inducida por la radiación, éste punto es de gran relevancia en radioterapia especialmente en el tratamiento de cáncer Cervico uterino.<sup>(6)</sup>

Para investigar el rol potencial de Apoptosis en tumores humanos como predictor de respuesta a la radiación, un estudio retrospectivo de 44 pacientes con Adenocarcinoma de cervix estadio IB, en el Centro de Cáncer MD Anderson, por Wheeler y cols encontrándose que el nivel basal Apoptosis valor medio de 2% predijo mejor supervivencia en éstas pacientes, elevados niveles de Apoptosis se correlacionaron con mejor período libre de enfermedad y supervivencia causa específica.<sup>(6)</sup> Los resultados obtenidos por Levine han sido contrarios en cuanto a niveles bajos de Apoptosis se correlacionaron con mejor supervivencia, el tipo de pacientes fue diferente, es decir diferente tipo histológico Epidermoide, y con estadios clínicos más avanzados, por tanto Apoptosis en cáncer cérvico-uterino hasta el momento no se puede concluir correlacionándose como factor pronostico.

#### **Quimioterapia y Apoptosis**

La Quimioterapia ha sido un componente esencial en el tratamiento de los tumores sólidos. Es usada cuando se presume enfermedad micrometastásica ó como adyuvante en el caso de enfermedad macrometastásica. Está claro que muchos, sino todos los agentes quimioterapéuticos inducen muerte celular a través de la estimulación de la vía apoptoica.

El proceso citotóxico posterior a la exposición a agentes quimioterapéuticos puede ser separado en 4 estadios:

En el primer estadio: Los agentes rompen la homeostasis celular a través de una interacción específica con un blanco intracelular, así como RNA, DNA ó microtúbulos. Esta interacción resulta en disfunción de la estructura del blanco. El segundo estadio es el reconocimiento por la célula de la ruptura de la homeostasis, lo cual en daño del DNA involucra el p53 y presumiblemente otras proteínas.

En el tercer estadio: la célula descifra la severidad del daño y marca una decisión para buscar la reparación al daño ó proceder a la muerte apoptoica.

Finalmente en el cuarto estadio: Es la iniciación de la Apoptosis con la activación secuencial de la maquinaria celular produciendo la muerte celular. Aunque estos mecanismos son pobremente definidos actualmente.

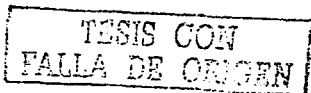
La resistencia a la Quimioterapia puede ser por deficiencias ó disfunción de las células tumorales para completar los pasos ya mencionados. Alteraciones en los genes esenciales de la vía apoptoica, también podrían conferir la resistencia a los regimenes estándar. La sobreexpresión del bcl2 se ha correlacionado con resistencia a la Quimioterapia en pacientes con LLC(Leucemia Linfocítica Crónica)<sup>(36)</sup> Además la mutación ó delección del gen Bax pro-apoptoico también se asocia con resistencia en los pacientes con cáncer de colon.

Claramente se ve pues que la comprensión del rol de Quimioterapia y la Apoptosis evitaría regimenes inefectivos, así como ver la posibilidad e incremento de la eficacia a través de la modulación de la vía apoptoica con terapia génica.

Una variedad de agentes quimioterapéuticos han demostrado una Apoptosis extensa en poblaciones celulares normales rápidamente proliferantes, tejido linfoido y tumores. Así la Apoptosis incrementada es la responsable de muchos efectos adversos de la Quimioterapia y de la regresión del tumor. La vía en la cual la Quimioterapia induce la Apoptosis no está del todo clara.<sup>(4)</sup> Hay evidencias que la estimulación de algunas líneas celulares por citokinas tróficas ó el incremento de la expresión del gen bcl-2 puede hacer aparecer resistencia a la inducción de Apoptosis por los agentes quimioterapéuticos.<sup>(3)</sup>

#### **Inducción de la Apoptosis por Hipertermia Leve**

En tejidos susceptibles de calentamiento hasta 43 °C por 30 minutos induce Apoptosis extensa, y el calentamiento a temperaturas mayor de 46°C por períodos similares induce la necrosis. El espectro de la susceptibilidad del tejido a la inducción de la Apoptosis es esencialmente similar al descrito previamente para radiación y quimioterapia.<sup>(9)</sup>



#### **Inducción de la Apoptosis por anticuerpos del APO-1 ó del antígeno FAS**

El antígeno APO-1 fue definido durante estudios para anticuerpos monoclonales contra los linfocitos B humanos. Uno de los anticuerpos que se encontró que induce la Apoptosis de los linfocitos T y B humanos y de las células de una variedad de líneas celulares derivadas de tumores linfoides humanos.

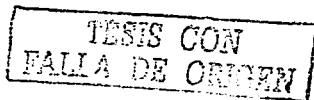
El antígeno de la membrana celular para el cual el anticuerpo ataca fue designado como APO-1.

El antígeno Fas, definido como un segundo anticuerpo monoclonal desarrollado por un grupo de trabajadores, se ha encontrado idéntico al antígeno APO-1.

La inyección de anticuerpos monoclonales anti-APO1 causa rápida regresión de las líneas celulares linfoides humanas que expresan APO-1-, con la regresión además viene la Apoptosis incrementada.<sup>(3)</sup>

#### **Inducción de la Apoptosis por Linfocitos citotóxicos.**

In vitro se ha demostrado que el blanco para la muerte celular es inducido por células T, Células K y células NK. La detección de las células infectadas por el virus por linfocitos T citotóxicos juega un rol esencial en la eliminación de virus del cuerpo, el involucro de Apoptosis en ésta detección ejemplifica claramente la función homeostática. La Apoptosis inducida por linfocitos T citotóxicos no es bloqueada por la síntesis de proteínas inhibitoras ó por la expresión del bcl-2.<sup>(4)</sup>



## 1 e. JUSTIFICACION

Considerando el gran impacto que en México tiene el problema del cáncer Cérvico uterino al nivel de los costos económicos en los Servicios de Salud, el costo social y en la calidad de vida de la mujer, resulta por lo tanto de mucha importancia estudiar algunos de los mecanismos del comportamiento tumoral que están íntimamente relacionados con su pronóstico.

El cáncer de cérvix posee dos características que lo hacen especialmente atractivo para entender los avances en diagnóstico y tratamiento del cáncer, lo primero es el conocimiento amplio de las causas que lo producen y por otro lado es un tumor en el cual la detección selectiva se ha mostrado favorable, sabiendo que es el único cáncer que se podría prevenir completamente.

En los últimos tiempos ha habido gran avance en el conocimiento de los factores etiológicos, así como de la biología tumoral del cáncer cérvico-uterino, se han identificado factores del tumor y del huésped relacionados con la respuesta al tratamiento particularmente con Radioterapia, este es el caso de la Apoptosis.

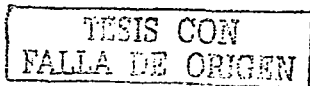
En las pasadas dos décadas ha habido un creciente interés en la pérdida celular individual, calificándose la Apoptosis como un proceso biológico fundamental que se encuentra en el desarrollo embrionario normal y en algunos tejidos como una respuesta al estrés químico y físico.

La correlación de la respuesta del tumor a la radiación y el nivel de Apoptosis visto en los sistemas murinos aumenta la posibilidad del desarrollo de ensayos de Apoptosis para predecir la respuesta al tratamiento en las pacientes con cáncer. El nivel espontáneo de Apoptosis, así como el índice de crecimiento, se ha medido en tumores humanos, viéndose que aquellas pacientes con biopsias pre-tratamiento con altos niveles de Apoptosis podrían tener mejor respuesta al tratamiento que aquellos tumores con bajos niveles de Apoptosis.

A la fecha son muy pocos estudios sobre Apoptosis en los cánceres humanos, los resultados en correlación como factor predictivo de respuesta no es concluyente sobre todo en Cérvix Uterino. También se desea correlacionar la Apoptosis en el tumor primario como en el suero con una Técnica como ELISA.

Los resultados además servirán para generar conocimientos que deberán ser tomados en cuenta para el tratamiento, control, conocimiento de biología tumoral y prevención de este problema de salud, Finalmente generar Hipótesis que deberán ser investigadas en tiempos futuros.

Para la realización del presente estudio contamos con la colaboración y participación de Médicos, enfermeras, Biólogos, y pacientes de los Servicios de Ginecología, Radioterapia e Investigación Básica.



## II. HIPOTESIS

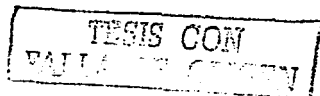
- El índice de crecimiento más que la Apoptosis ó proliferación de manera aislada podría predecir la respuesta al tratamiento y pronostico.
- La Apoptosis se puede detectar con el método de ELISA tanto en los tumores como en el suero de las pacientes con carcinoma cérvico-uterino.
- El nivel de Apoptosis en el tumor se correlaciona con el nivel de Apoptosis en el suero.

## III. OBJETIVO GENERAL

Evaluar en el cáncer de Cérvix Uterino las aplicaciones potenciales del método de ELISA para determinar la Apoptosis en el tumor y en el suero.

## IV. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar el nivel de Apoptosis Pre- tratamiento en el tumor primario.
- Determinar el nivel de Apoptosis pre-tratamiento en el suero.
- Determinar la correlación entre los niveles de Apoptosis del tumor primario y el suero.
- Determinar la proliferación tumoral mediante la expresión inmunohistoquímica de PCNA.
- Determinar el índice de crecimiento tumoral tomando en cuenta la Apoptosis y proliferación.
- Investigar si el índice de crecimiento tumoral se relaciona con la respuesta inicial al tratamiento.



## V. MATERIAL Y METODOS

### V.a. Diseño del estudio

Se trata de un estudio de investigación clínica, observacional y prospectivo en pacientes con diagnóstico histológico de cáncer Cérvico- Uterino del Servicio de Ginecología y Radioterapia del Instituto Nacional de Cancerología de la Secretaría de Salud y Asistencia en la ciudad de México en el periodo comprendido de Abril a Noviembre de 1999.

### V.b Muestra

#### Pacientes

Se tomó una muestra de 25 pacientes con diagnóstico confirmado histológico de cáncer Cérvico- Uterino: Adenocarcinoma, células escamosas o Adenoescamoso, con estadios clínicos de IB, IIA, IIB, IIIA, y IIIB vistas por primera vez en el Servicio de Ginecología y posteriormente en conjunto en los Servicios de Radioterapia y Oncología Médica. A cada paciente se le tomó historia clínica, examen físico y valoración inicial con los siguientes estudios: Rayos X de tórax, Urografía Excretora, Cistoscopia, Biometría Hemática completa, Química Sanguínea con Pruebas de Función renal y Hepática. Las pacientes incluidas estuvieron bien informadas del estudio A cada paciente se le tomaron 4 biopsias punch representativas del tejido tumoral, y muestras del suero pre-tratamiento.

La técnica de ELISA para las muestras se realizó en la División de Investigación Básica del INCAN, y las biopsias iniciales para la inmunohistoquímica, determinando índice de proliferación con PCNA (Antígeno nuclear de proliferación celular) se realizó en la División de Patología del INCAN.

14 pacientes tratadas con Radioterapia(Teleterapia en equipos de cobalto y en acelerador lineal de 8Mv más Braquiterapia con cesio137 con baja tasa de dosis).

10 pacientes tratadas con Quimioterapia Neoadyuvante (3 ciclos de platino/Gemzar) , seguido de Cirugía con ó sin Radioterapia/Quimioterapia postoperatoria ó Quimioterapia Neoadyuvante seguido de Quimioterapia/Radioterapia en las No Operables.

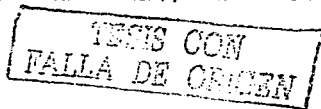
En las pacientes tratadas con Radioterapia, la respuesta clínica al tratamiento se valoró 4 semanas después de completar la Braquiterapia. La respuesta inicial se valoró a las 2 semanas de iniciada la Radioterapia, catalogándose como buena y mala (basándose en la reducción del tamaño, sangrado y ulceración).

Las pacientes con progresión ó persistencia de la enfermedad tratadas inicialmente con Radioterapia ó Quimioterapia no candidatas a Cirugía pasaron a quimioterapia Radioterapia concomitante con cisplatino 40 mg/m2 semanal más Radioterapia.

La respuesta al tratamiento de las pacientes tratadas con Quimioterapia se valoró clínicamente al termino del tratamiento locoregional. La respuesta inicial se catalogó como buena ó mala si se encontró Respuesta parcial antes de iniciar el segundo ciclo.

#### DETERMINACION DE APOPTOSIS

El tejido de 3 biopsias punch, se refrigeró a -70°C, posteriormente homogeneizadas, y con una concentración celular de 1,000 en cada caso, centrifugadas y el sobrenadante con el Kit de ELISA, para detectar las células Apoptóticas.



### EVALUACION DE APOPTOSIS

Establecimos una escala de calificación según los hallazgos así como:

<2.5UA= 1  
2.51 a 3 UA=2  
3.1 a 3.5UA =3  
>3.5UA =4

### Descripción de la técnica de ELISA

La técnica de Elisa es usada para medir Apoptosis, el principio del examen en un principio cuantitativo de inmunoensayo de "sándwich de enzimas" usando anticuerpos monoclonales de rata dirigidos contra el DNA e histonas con la determinación específica de mono y oligonucleosomas en la fracción citoplásmica de las células lisadas. Las muestras son incubadas con biotín- histona y anti- DNA peroxidasa,

La sensibilidad de la técnica de ELISA es alta ya que la detección exacta de las células muertas en una muestra en particular depende fuertemente en la cinética de muerte celular, del agente citotóxico en éste caso de la radiación, quimioterapia y de la cantidad de células afectadas en la población celular total.

Especificidad, es alta también, en la que las anti-histonas reaccionan La con las histonas H1, H2A, H2B,H3 Y H4 de varias especies ejemplo hombre ratón, rata, hámster, caballo, además el ELISA permite la detección de mono y oligonucleosomas de varias especies y puede ser aplicada para medir apoptosis en diferentes sistemas celulares. El complejo DNA-Histona sirve de control positivo. El tiempo del ensayo es de 3-4 horas.

Por técnica de ELISA y usando un substrato que da un color verde se demostró la positividad para la presencia de nucleosomas en la fracción citoplásmica de los tejidos tumorales, lo cual nos da una medida indirecta de la Apoptosis en los tejidos. Los resultados se expresan en unidades de absorción.

### Inmunohistoquímica

Se utilizó la técnica de Inmunohistoquímica por marcaje indirecto (ABC), para determinar el antígeno de proliferación celular PCNA una vez que el tejido estaba fijado en xilano, con técnica indirecta y usando un cromogeno que da un precipitado color café, el cual demuestra positividad para la presencia de PCNA.

### DETERMINACION DE PROLIFERACION

Inmunohistoquímica: 5 laminillas de cada caso desparafinadas y fijadas en xilano, se usó anticuerpos del Antígeno nuclear de Proliferación celular (PCNA).

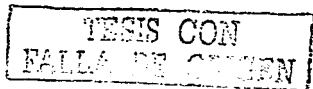
### EVALUACION DE PROLIFERACION PCNA

Establecimos una escala siguiente:

<25% de células =1  
>25-50% de células =2  
>50-75% de células =3  
>75% de células =4

### DETERMINACION DEL INDICE DE CRECIMIENTO

Se determinó el Índice de Crecimiento, según la fórmula siguiente:  
Valor de PCNA-Valor de la Apoptosis.



## Teleterapia

Modalidad de tratamiento de radioterapia en la que la radiación se administra en forma externa.

Se utilizaron aparatos de Cobalto Co60, y Acelerador lineal de 8Mv., (Rayos Gamma y Rayos x respectivamente), con técnica de caja 4 campos, isocéntrica, administrándose 5 sesiones de tratamiento por semana, dosis diaria convencional es de 180-200cGy, la dosis total a aplicar en teleterapia para Cáncer Cérico- Uterino Invasor estadios IB2, IIA, IIB, IIIA, Y IIIB , rangos de 46 Gy hasta 56 Gy.

La región irradiada es pelvis total, para tratar el primario y áreas ganglionares, ésta región incluye los siguientes límites: Para los campos anterior y posterior: Superior: L4-L5, inferior borde inferior de agujeros obturadores, límites laterales: 1cm-1.5cm de pelvis ósea, hacia fuera del hueso pélvico. Para los campos lateral derecho e izquierdo: mismos límites superior e inferior y el anterior a 1cm de la sínfisis del pubis y el posterior se tomará 1 cm de recto.

A cada paciente se le valoró durante el tratamiento cada 2,000cGy, se le solicitaba biometría hemática, esto con la principal finalidad de incrementar la radiosensibilidad y la apoptosis, evitando la hipoxia, factor desfavorable en el tratamiento.

En caso de infección ulceración del tumor se agregó al tratamiento doble esquema de antibiocioterapia, para Gram negativos y anaerobios.

Se interrumpió el tratamiento de teleterapia en caso de morbilidad gastroentérica ó genitourinaria, (diarrea, colitis, proctitis, cistitis), se manejó médicamente, tratando de que la protracción no se prolongara excesivamente que permitiera repoblación celular.

## BRAQUITERAPIA

Es la otra modalidad de radioterapia usando radioisotopo intracavitario, con el objetivo de aplicar altas dosis en un pequeño volumen.

Se usó únicamente baja tasa de dosis, 6 Gy/hora Cesio 137. Siguiendo normas del ICRU. (Comité Internacional de Unidades internacionales). Se reportó en base al Sistema de Manchester, dosis a :Punto A, Punto B, Vejiga y Recto. Las pacientes recibieron por lo menos 85 Gy. al punto A, la dosis máxima a la vejiga, recto 75, 70 Gy. Respectivamente. A cada paciente se le valoró 3 días después de su egreso hospitalario, fijándose cita en 3 semanas para valorar la respuesta a la radioterapia.

Posteriormente las valoraciones fueron cada 4 semanas, la toma de la citología de control se les realizó a las 12 semanas posteriores a la radioterapia.

## V.d. Criterios de inclusión

Radioterapia:

1. la muestra se integró por mujeres con diagnostico histopatológico confirmado de **CARCINOMA CERVICO-UTERINO** atendidas en el Servicio de Ginecología y Radioterapia del Instituto Nacional de Cancerología y que reúnan las siguientes características:

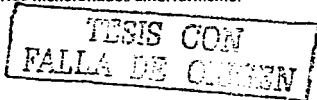
- a. Pacientes de primera vez y que no hubieran recibido ningún tratamiento previo a su admisión a nuestro Instituto.
- b. Mujeres Con diagnostico histológico de Cáncer Cervico-Uterino Invasor estadios clínicos: IB, IIA, IIB, IIIA, y IIIB.
- c. Mujeres con Cáncer cérvico-uterino en los estadios clínicos anteriormente mencionados de cualquier edad, raza, religión, lugar de procedencia, ocupación, antecedentes gineco-obstétricos y nivel socioeconómico.

Quimioterapia:

- a. Estadios clínicos IB2 a IIIB
- b. Incluidas en el protocolo de Quimioterapia neoadyuvante con platino/ Gemzar.

## V.e. Criterios de exclusión

Se excluirán del estudio aquellas mujeres que no cumplan con los criterios mencionados anteriormente.





#### V.f. Instrumentos de recolección de Información

La información necesaria para éste estudio fue de dos tipos: Una laboratorial y otra clínica.

Laboratorial se obtuvo del reporte cualitativo de Patología del índice de proliferación midiendo PCNA con técnica de Inmunoquímica y del reporte cuantitativo de Apoptosis con la Técnica de ELISA.

La información clínica comprende: Valoración clínica, examen físico, con estadificación clínica información obtenida del expediente clínico.

#### V.g. Análisis Estadístico de los Datos.

En primer lugar Análisis Univariado obteniendo frecuencias, proporciones y porcentajes de variables como: Edad, sexo, estadio clínico, tipo histológico, tipo de tratamiento, índice de Apoptosis, índice de proliferación índice de crecimiento.

Seguidamente hicimos análisis bi-variado, (Regresión Lineal) para ver la asociación entre cada una de las variables independientes con la variable dependiente detectando las posibles interacciones que pueden ocurrir entre las variables.

- Para el análisis descriptivo de la información nos apoyamos con medidas de tendencia central como de dispersión y gráficas que mejor ilustren la situación.

La correlación entre el índice de crecimiento con tamaño del tumor y respuesta inicial se realizó con la prueba exacta de Fisher.

La correlación entre el índice de crecimiento con tamaño tumoral así como entre los niveles de Apoptosis en tumor y en el suero se realizaron mediante análisis de Regresión simple.

#### ORGANIZACIÓN DE LA INVESTIGACION

Cronograma de Actividades

Actividad	Marzo 1999	Abril 1999	Mayo 1999	Junio 1999	Julio 1999	Agosto 1999	Sept. 1999	Oct. 1999	Nov. 1999
Elaboración del protocolo	XX	XX							
Identificación Y Adquisición de Técnicas de medición de Apoptosis ELISA	XX								
Toma de muestra					XX				
Tratamiento de Radioterapia ó Quimioterapia					XX	XX			
Valoración y análisis de la apoptosis y asociados Pre - tratamiento							XX	XX	

TESIS CON  
FALLA DE QUEMEN

Valoración clínica de Respuesta. Radiosensibilidad y Quimiosen.				XX			XX	
Análisis e elaboración de Informe Final								XX

#### RECURSOS HUMANOS

Para la realización del siguiente estudio participarán Médicos del Servicio de Radioterapia, Ginecología, Patología y de la Unidad de Investigación Básica del Instituto Nacional de Cancerología a saber:

**DRA. LESBLA M. RIVERA RUBI.**

Médico Residente III año.

Investigador Principal.

#### ASESOR:

**DR. ALFONSO DUEÑAS GONZALEZ**

Subdirector de Investigación Básica

#### INVESTIGADORES ASOCIADOS:

**DR. ERNESTO GOMEZ GONZALEZ.**

Subdirector Servicio de Radioterapia

**DR ALBERTO GUADARRAMA FLEITES**

Jefe del Servicio de Braquiterapia

**DRA. AIDA MOTA GARCIA**

Jefe del Servicio de Teleterapia

**DR. RAUL FLORENTINO**

Médico adscrito de Radioterapia

**DRA. ADELA POITEVIN CHACON**

Médico adscrito de Radioterapia

**DR. CARLOS LOPEZ GRANIEL**

Médico adscrito de Ginecología

Jefe del depto de Posgrado y Educ. Médica Continua

**DR. JOSE LUIS AGUILAR PONCE**

Subdirector Enseñanza INCan

**LIC. CATALINA TREJO BECERRIL**

Bióloga de la División de Investigación Básica

**DR. JOSE CHANONA**

Médico Adscrito de Patología

#### RECURSOS MATERIALES

Se usaron los expedientes clínicos. se tomaron las biopsias del tumor pre-tratamiento.

Para la determinación de células apoptóticas la técnica de ELISA, su kit consta de :

Anti-Biotin-histona (clona H11-4)

1. Anti- DNA POD (clona MCA-33)

2. Control Positivo

3. Amortiguador de Incubación

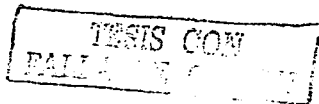
4. Amortiguador de Lisis

5. Substrato Amortiguador

6. Tableta ABTS Amortiguador

7. Láminas de microtitulos

8. Láminas adhesivas para cubrir hojas.



Los tratamientos de radioterapia se darán en 2 aparatos de cobalto Co60 ( Theratron 1,000, Phoenix) y en un acelerador lineal de 8 Mv (Linac) del Servicio de Radioterapia del INCAN.  
Para la Braquiterapia, tratamiento de fuentes intracavitarias. Se usaron colpostatos y sondas intrauterinas Fletcher, más equipo de histerómetros, y dilatadores.

## RESULTADOS

Fueron 24 pacientes evaluables en el estudio, la mediana de edad fue de 43 años (rango de 33 a 80 años), el 60% (15) pacientes tuvieron estadio clínico >FIGO IIB, la histología predominante fue Epidermoide de Células Grandes No Queratinizante 92% y el 8% correspondió al Adenoescamoso.

13 de 14 pacientes tratadas con Radioterapia obtuvieron respuesta completa y 7 de 10 pacientes tratadas con Quimioterapia Neoadyuvante fueron evaluables y todas presentaron respuesta completa. El porcentaje global de Respuesta completa fue de 95%.

1 de 14 pacientes tratadas con Radioterapia se le documentó enfermedad en retroperitoneo por TAC abdominal, las 13 restantes tuvieron Respuesta clínica completa.

1 de las 10 pacientes tratadas con QiNeoadyuvante no se operó por arritmia y 6/10 tuvieron Respuesta Clínica completa antes de la Cirugía y 2/10, tuvieron persistencia de la enfermedad por lo que pasaron a Quimiorradioterapia concomitante.

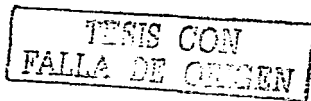
El rango del índice de Apoptosis en el tejido tumoral fue de 1.9-3.0 UA, el promedio fue de 2.98, la desviación estándar de 0.54.

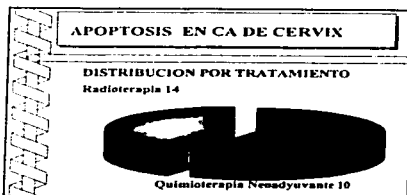
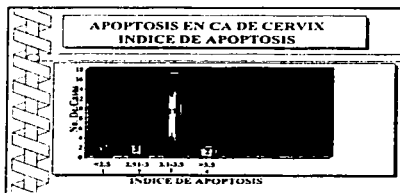
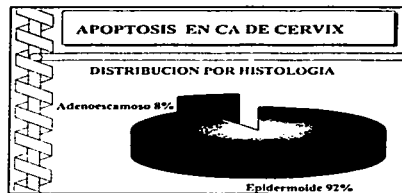
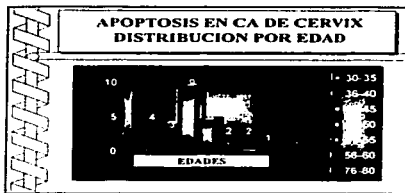
El rango del índice de Apoptosis en el suero fue de 0.95 a 1.75, el promedio fue de 0.19 y la desviación estándar de 0.14.

Los valores de PCNA tuvieron un rango de 1 a 4 con una mediana de 4, promedio de 2.68 y desviación estándar de 1.2.

El índice de crecimiento su rango fue de 3 a +2, la mediana de 0, el promedio de 0.36 y la desviación estandar de 1.38.

El tamaño del tumor la mediana de 5x5cm, el promedio de 3.12





TESIS CON  
FALLA DE ORLEN

## DISCUSION

La Apoptosis espontanea ocurre en ciertos tumores humanos, conocimiento que se tiene desde hace algún tiempo.<sup>(14,5)</sup> El crecimiento del tumor es el resultado del balance entre el incremento en el número de células, resultando de una división celular y la disminución através de varios métodos de pérdida celular, así como la muerte por hipoxia, muerte mitótica, muerte inmunológica, exfoliación ó metástasis.

La pérdida celular por Apoptosis puede ser importante probablemente, aún cuando la fracción de cuerpos apoptoicos sea una pequeña fracción de las células.<sup>(14)</sup> La Apoptosis es un mecanismo de pérdida celular en los tumores no tratados y se sugiere que la radiación y la Quimioterapia probablemente incrementen éste proceso.<sup>(2)</sup>

El gen bcl-2 por otro lado bloquea la Apoptosis, la pérdida del gen p53 normal es importante en la tumorigénesis, además de un p53 intacto puede inducir la Apoptosis, esto ha venido a ser algo excitante para futuras investigaciones.<sup>(14,5)</sup>

La Apoptosis puede ser encontrada virtualmente en todos los tumores malignos no tratados, aunque hay pocos estudios precisos<sup>(9)</sup>. Sin embargo está claro que la extensión de la Apoptosis inducida por la radiación varía enormemente de un tumor a otro.<sup>(1,3,5)</sup> De hecho puede ser un marcador de agresividad biológica del tumor en cáncer Cérvico-Uterino.

Existen sorprendentemente pocos estudios de Apoptosis en tumores irradiados, sin embargo está claro que la extensión de la Apoptosis inducida por la radiación varía enormemente de un tumor a otro. Datos preliminares sugieren que puede haber una correlación entre la magnitud de la respuesta apoptoica inmediata y radiocurabilidad, pero se necesitan más estudios para examinar éste punto.

Datos preliminares sugieren que hay una correlación entre la magnitud de la respuesta apoptoica inmediata y radiosensibilidad, pero se necesitan más estudios para examinar ésta relación<sup>(2,3,6,15)</sup>

la Apoptosis espontánea se ha visto que varía en los diferentes tumores experimentales, esto aumenta la posibilidad que los niveles pre-tratamiento podrían predecir la respuesta del tumor a la Radioterapia ó Quimioterapia.<sup>(2,3)</sup>

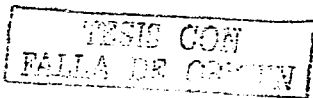
La relación entre Apoptosis del tumor y resultados del tratamiento ha sido investigada en varios cánceres incluyendo: Cérvix, Vejiga, Próstata, Mama y Linfoma de Hodgkin, estos resultados han resultado conflictivos algunos estudios han mostrado que el alto índice apoptoico se correlaciona con pobre pronóstico, otros muestran correlación de buen pronostico. De particular interés son dos estudios de tumores cervicales, en los cuales se midió la Apoptosis espontánea en biopsias pre- tratamiento. En un estudio de 66 pacientes con cáncer Cérvico Uterino de Células Escamosas I-III tratados con Radioterapia sola, Levine encontró que aquellas pacientes con bajos niveles de Apoptosis espontánea tuvieron mejores resultados al tratamiento que aquellas con niveles más altos. Contrariamente un estudio por Wheeler y cols en el MD Anderson quienes examinaron 44 pacientes con Adenocarcinoma de Cérvix estadio Ib encontró que pacientes con alto nivel de Apoptosis tuvo mejor supervivencia.

En el caso de Cáncer Cérvico-Uterino los resultados a la fecha no son concluyentes por lo que quizá sea factible mas investigaciones con un grupo mayor y homogéneo de pacientes, ya que en los 2 estudios mencionados anteriormente son histología diferente y estadios clínicos diferentes, además se necesita de un seguimiento mayor.

Por todo lo anterior la pregunta formulada, es que conociendo los niveles de Apoptosis pre- tratamiento, tanto en el tumor primario como en el suero, sea posible seleccionar el grupo de pacientes con mala respuesta al tratamiento con radioterapia y que sean candidatas a otras terapias adyuvantes.

La Apoptosis como el índice de Proliferación como fenómenos aislados no predicen las respuesta al tratamiento ni se relacionan con el tamaño tumoral.El índice de Crecimiento determinado por la Apoptosis y proliferación puede ser de utilidad para predecir la respuesta al tratamiento y la supervivencia, aquellos tumores con mayor crecimiento serán más radiosensibles, quimiosensibles, con mejores tasas de supervivencia.

La técnica de ELISA al parecer es un buen método, sencillo, altamente sensible para medir Apoptosis, y para determinar la Morfología de la Apoptosis y más específico sería comparándolo con la Técnica TUNEL.



## CONCLUSIONES:

La Apoptosis ó Proliferación como fenómenos aislados no predicen la respuesta al tratamiento ni se relacionan con el tamaño tumoral.

El índice de crecimiento determinado por la Apoptosis y Proliferación puede ser de utilidad para predecir la respuesta y posiblemente la supervivencia de las pacientes con cáncer Cérvico-Uterino.

Se necesita evaluar a un grupo mayor y homogéneo de pacientes largo plazo para comprobar nuestros resultados preliminares.

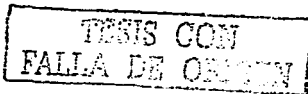
La técnica de ELISA puede aplicarse para determinar Apoptosis en tanto en el tumor primario como en el suero.

Los niveles de Apoptosis en suero se correlacionan con los niveles en el tumor primario.

La determinación de Apoptosis en el suero podría ser un método muy sencillo, sensible y aplicable a todos los pacientes con enfermedades malignas para evaluar de manera muy temprana la respuesta al tratamiento.

## BIBLIOGRAFIA.

1. Lazcano Eduardo, Mortality from cervical carcinoma in México, Acta citologica Vol. 40 No. 3 Mayo 1996 pp 506-512.
2. Tsang Richard W. et als. Tumour Proliferation and apoptosis in human uterine cervix carcinoma II: Corelations with clinical outcome. Radiotherapy and Oncology 50 (1999) 93 – 101.
3. Levine EL, Davidson SE and Cols. Apoptosis as predictor of response to radiotherapy in cervical carcinoma. The lancet, 344 agosto 13 1994, pp472.
4. Dueñas Gonzalez et als, Apoptosis y Cancer , Instituto nacional de Cancerología, vol.40, #4, Oct.-Dic.1992, pp190-194.
5. Nippon Rinsho Apoptosis and cells growth. Fraction in normal displastic and neoplastics squamous epithelium of uterine cervix.
6. Kerr John FR, and Cols. Apoptosis, ITS Significance in cancer and cancer therapy. Cancer april 15, 1994 vol 7 (8) PP 2013-2026.



7. Astro Research Fellowship: Apoptosis as predictor of tumor response to Radiation in Stage 1B cervical Carcinoma Int. J. Radiation Oncology and Biology Phys vol 32(5) 1995 pp 1487-1493
8. González Barón. Cáncer cervical. Oncología Clínica, 5ta. Ed. 1994.
9. Crompton Nigel EA. Programmed cellular response in Radiation Oncology. Acta oncológica Vol. 37 1998. Supl. 11 pp 1-41
10. Sheets EE and Cols. The role of apoptosis in gynaecological Malignancies . Ann Med 1997, april 29 (2): 121- 6
11. Bel-2 Protein expression associated with resistance to apoptosis in adenocarcinoma expressing wild type P53 Ann Surg. Oncol 1998 Sep, 5 (6) 544-7
12. Saito Yoshihiro and cols. Effect of Radiation and Paclitaxel on P53 Expression in Murine tumors sensitive or resistant to apoptosis induction, Int. J. Radiation Oncology and Phys, 38(3):623-631 .
13. Mein Raymond E. and cols ,Programmed Cell Death in Normal Development and disease. The Cancer Bulletin Vol. 46, No. 2, 1994,
14. Anderson K.M.and cols ,Potential applications of apoptosis in modifying the Biological behavior pf Therapeutically refractory Cancers. Medical Hypotheses (1994) 43, 207-213.
15. Nishioka Shi L. et al ,Premature P34cdc2 activation required for apoptosis Science 1994; 263: 1143 – 1145.
16. Tatsuya Ohno, Takashy Nakano et als. Bax Protein expression correlates with Radiation Induced apoptosis in radiation therapy for cervical carcinoma. Cancer July 1998; 83 (1) pp 103 - 110.
17. Cell Death Detection ELISA. Cathalog. Bohringer pp 244 – 245.
18. Mesner Peter W,et als. Methods utilized in the Study of apoptosis advances in Pharmacology textbook 1997.
19. CML West et als. Intrinsic Radiosensitivity and prediction of patient response to radiotherapy for carcinoma of the cervix. Br. J. Cancer (1993), 68 pp. 819 – 823.
20. Tjoung – Won Park et als. Molecular Biology of Cervical and ITS precursors. Cancer Supplments Nov. 15 1995; 76 (10) pp 1902 – 1912.
21. Zakeri et als. Cell Death and Differentiation, Vol 2, 87 – 96; April 95.
22. Cannon Christine E., Kastan B. Michael. Role of P53 in Apoptosis advances in pharmacology. Vol. 41 1997 pp 35 –53.
23. Surge Desmayer Michael O. Hergartner Genetics of Apoptosis. Advances in pharmacology, Vol 41 1997 pp 35 – 53.
24. Thorberry Nancy A. et als. Control of Apoptosis by proteasas advances in pharmacology. Vol 41 pp 133 – 151.
25. Smith Miriam J. et als. Ceramide: A novel lipid mediator of apoptosis . Advances in Pharmacology. Vol 41. pp 107 – 131.
26. Eischen Cristine M, et als. The fast Patway in apoptosis. Advances in pharmacology vol 41; pp 107 – 131.
27. Johnson Stephanie et als. Apoptosis: Overview of the process and its relevance in disease pp 3 –29.
28. Li Peng et al,Cytochrome C and d ATP, dependent, formation of APAF- 1 / Caspase – 9 com'plex initiates an Apoptotic Protease cascade cell.– vol 91, pp 479-489. Nov. 1997 .



29. Bartner Carl D. et als. The role of DNA Fragmentation in apoptosis trends in cell Biology, Vol 5, Jan 1995 pp21 - 25.
30. Walker Roy et als. Degradation of Cromatin in Apoptotics cells, cell death and diferentiation Vol 2, 97 - 104 , Abril 1995.
31. Levine EL, et al. Apoptosis intrinsic radio sensitivity and prediction of radiotherapy response in Cervical Carcinoma. Radiother Oncol 1995, Oct. 37 (1): pp 1-9.
32. West CM, et als. The Intrinsic radio sensitivity of cervical carcinoma correlation with Clinical Data. Int. J. Radiat. Oncol Biol Phys 1995 Feb 15; 31 (4): 841 - 6.
33. Zamulaeva, et al. Prognostic significance of S- Phase fraction detected by antithymide antibodies in epidermoid cervix carcinoma. Int. J. Radiat Oncol. Biol Phys 1996 Oct; 1; 36 (3):685 - 8.
34. Fyles A.W, et als. Oxigenation predicts radiation response and survival in patiens with Cervix Cancer. Radiotherapy Oncol. 1998. Aug. 48 (2): 149 - 156.
35. Bolger BS, et als . Prediction of Radiotherapy Response of Cervical carcinoma through measurements of Cell proliferation rate.Stockton Press 1996. pp 1223 - 1226.
36. Bold R. Et als Apoptosis, Cancer and Cancer Therapy, Surgical Oncology, vol 6, #3, pp 133-142, 1997
  
37. Bold Richard J. Et als. Apoptosis, Cancer and Cancer Therapy, Surgical Oncology, Vol6, N3, pp133-142 1997.
38. Perez CA, Brady Luthcer Apoptosis, principles and Practice in Radiation oncology, 3° ed. 1997
39. Magno G.,Joris I. Apoptosis, Oncosis , and necrosis, American Journal of Pathology, vol.146, N1 Jan. 1995, pp3-15
40. Kerr J.F.R. et als Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, British J. Cancer, 26, 239, 1972 pp 239-254.
41. Stefan Holdenrieder et als, Apoptosis in Serum of Patients with Solid Tumours, Anticancer Research 19: 2721-2724 1999.
42. Eun Ji chung et als, Spontaneous Apoptosis as a Predictor Of Radiotherapy in Patients with Stage IIB Squamous Cell Carcinoma Of The Uterine cervix, Acta Oncologica, vol 38, N.4, pp449-454, 1999.
43. Torroella Kouri M., Villa Treviño S. Bases Genéticas del Cáncer, instituto Nacional de Cancerología, 1° ed. 1998.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN



**INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA**

**LA APOPTOSIS COMO PREDICTOR DE RESPUESTA A LA RADIOTERAPIA EN EL TRATAMIENTO DEL CANCER CERVICO-UTERINO.**

Folio:.....

Fecha: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ día \_\_\_\_\_ mes \_\_\_\_\_ año

**I. DATOS GENERALES**

Nombre:.....

# de Expediente:.....

Edad:..... años      Fecha de 1ª Consulta:...../...../.....

**III: DIAGNOSTICO**

**DX. HISTOLOGICO:**.....

**DX CLINICO:** IB2 ( )    IIA ( )    IIB ( )    IIIA ( )    IIIB ( )  
UE ( )    TT ( )    BIOPSIA ( )

**IV. TRATAMIENTO**

**FECHA DE INICIO DE RT**...../...../.....

**TELETERAPIA**

**DOSIS TUMOR:**    40-45 Gy ( )    46-50 Gy ( )    50-55 Gy ( )

**Región:**.....      **PROTRACCION:**.....DÍAS

**TECNICA USADA:**

**PELVIS TOTAL:** ( )      **SOBREDOSIS** ( )  
**PARAMETRIAL** ( )

**BRAQUITERAPIA**

**BAJA TASA DE DOSIS**    CESIO 137 ( )      **ALTA TASA DE DOSIS** Ir 192 ( )

**DOSIS DE BRAQUITERAPIA**

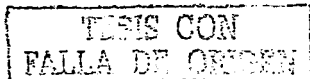
**PUNTO A:**.....      **PUNTO B:**.....      **VEJIGA:**.....      **RECTO:**.....

**V. RESPUESTA, 3 SEMANAS POST-RT**

**RESPUESTA PARCIAL** ( )      **RESPUESTA COMPLETA** ( )

**PROGRESION** ( )

**VI. COMPLICACIONES**



PROCTITIS ( )  
CISTITIS ( )

DURANTE RT: ( )  
DURANTE RT ( )

POST RT:  
POST.RT.....

**VII. APOPTOSIS, PROLIFERACION E INDICE DE CRECIMIENTO:**

**INDICE DE APOPTOSIS PRETRATAMIENTO**

**INDICE DE PROLIFERACION PCNA**

**INDICE DE CRECIMIENTO**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN