

## INDICADORES PRONOSTICOS DE LA RESPUESTA A LA QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE EN PACIENTES CON NEOPLASIA CERVICAL

Columnista Experto de SIIC  
Dr Silvano Costa, MD



Gynecologic Oncology Molecular Genetics Unit, Department of Obstetrics and Gynecology, St.Orsola-Malpighi University Hospital, Bologna, Italia  
*en colaboración con*

**Patricia Terzano** (MD, Gynecologic Oncology Molecular Genetics Unit, Department of Obstetrics and Gynecology, St.Orsola-Malpighi University Hospital), **Stina Syrjänen** (DDS, PhD, Department of Oral Pathology, Institute of Dentistry and MediCity Research Laboratory, Faculty of Medicine, University of Turku, Turku, Finlandia) y **Karyi Syrjänen** (MD, PhD, FIAC, National Institute of Health, Roma, Italia)

Otro trabajo publicado: Costa S, De Nuzzo M, Infante FE, Bonavita B, Marinelli M, Rubino A, Rambelli V, Santini D, Cristiani P, Bucchi L: «Disease persistence in patients with cervical intraepithelial neoplasia undergoing electrosurgical conization», *Gynecologic Oncology* 85(1):119-124, Abr 2002

Bologna, Italia (**especial para SIIC**)

Ciertos antígenos, genes asociados a neoplasias, componentes de la inmunidad celular y marcadores celulares constituyen posibles factores pronósticos de la respuesta a la terapia neoadyuvante en el cáncer cervical.

### RESUMEN

La eficacia de la quimioterapia neoadyuvante (QNA) en la neoplasia cervical está documentada con el registro de elevadas tasas de respuesta. Sin embargo, las ventajas de la QNA en términos de control local de la enfermedad y sobrevida del paciente todavía están en discusión. Para el empleo óptimo de la quimioterapia, debería existir un método que permita la identificación de los posibles efectos de la QNA en la sobrevida antes de iniciar el tratamiento, para seleccionar a los pacientes que obtendrán beneficios claros y emplear esta modalidad terapéutica sólo si es apropiada. Los mecanismos que regulan la reacción celular/resistencia a la QNA no fueron ampliamente estudiados hasta ahora. De manera óptima, esto podría realizarse en la primera biopsia diagnóstica que ofrecería un indicio más preciso de la respuesta a la QNA. Para brindar más información sobre el tema, las biopsias previas a la QNA y las muestras quirúrgicas fueron evaluadas para determinar los índices apoptótico y mitótico (IM/V-IA/V), detección del ADN-HPV, análisis inmunohistoquímico del ciclo celular y marcadores de proliferación, gen de resistencia múltiple a drogas (MDR1), así como las moléculas de adhesión celular como potenciales predictores de la respuesta a la QNA, sobrevida libre de recurrencia y sobrevida total (RQA-SLR-ST). El análisis multivariado confirmó el marcado efecto del IA/V y de la expresión de MDR1 en la SLR y recurrencia, expresión de Ki-67 luego de la QNA en la ST. En quienes responden a la QNA con índices IA/V disminuido e IM/V aumentado se espera pronóstico desfavorable. Además, CD44v6 estaría involucrado en la evolución de la enfermedad.

**Palabras claves:** neoplasia cervical, quimioterapia neoadyuvante, ciclo celular y marcadores de proliferación, moléculas de adhesión, variantes del CD44

### SUMMARY

The efficacy of neo-adjuvant chemotherapy (NAC) in cervical cancer is documented and high response rates are reported. However, the advantages of NAC in terms of local control of the disease and patient survival are still under debate. For optimal usage of chemotherapy, there should be a means to identify the possible effects of NAC on survival before starting the treatment to select the patients who will obtain distinct benefits and to apply this therapeutic modality only if appropriate. The mechanisms regulating the cellular responsiveness/resistance to NAC have not been extensively studied as yet. Optimally, this could be done in the first diagnostic biopsy providing a more precise indication of the response to NAC. To shed some light on this issue, biopsies prior to NAC and surgical specimens were subjected to counting for apoptotic and mitotic indices (MI/V-AI/V), detection of HPV-DNA, immunohistochemical analysis of cell-cycle and proliferation markers, multi-drug-resistance-gene (MDR1), as well as cell-adhesion-molecules as potential predictors of the response to NAC, recurrence-free survival and overall survival (RAC-RFS-OS). Multivariate analysis confirmed the strong effect AI/V and MDR1 expression for RFS and recurrence, Ki-67 expression after NAC for OS. NAC-responders with decreased AI/V and increased MI/V indices are expected to have poor prognosis. Furthermore, CD44v6 seems to be involved in disease outcome.

**Key words:** cervical cancer, neoadjuvant chemotherapy, cell-cycle and proliferation markers, adhesion molecules, CD44 variants

## INTRODUCCION

En los últimos años, diversos estudios clínicos demostraron el efecto positivo de la quimioterapia neoadyuvante (QNA) prequirúrgica o del uso conjunto de quimioterapia y radiación para el tratamiento del cáncer cervicovaginal.<sup>1-7</sup>

Desafortunadamente, algunos pacientes experimentan progresión de la enfermedad durante la QNA. En el grupo que no responde al tratamiento, la demora en el proceso terapéutico podría acelerar el crecimiento tumoral y la función de la médula ósea podría verse afectada con consecuencias desfavorables.<sup>8</sup> Para el empleo óptimo de la QNA, debería existir un método que permita la identificación de los posibles efectos de este tratamiento multimodal en la sobrevida antes de iniciar la quimioterapia, para seleccionar los pacientes que recibirán beneficios claros y emplear esta estrategia terapéutica sólo si es apropiado.

### 1. PRUEBAS PARA LA DETECCION DE MARCADORES TUMORALES

Los primeros estudios sobre la respuesta a la QNA estudiaron el valor clínico de las pruebas para la detección del antígeno específico del carcinoma de células escamosas (ACCE) o de diversos marcadores (CA 15.3; CA 125) en la provisión de información útil acerca de la significancia pronóstica de la QNA, controlando la respuesta clínica y los resultados especialmente en los estadios avanzados de la neoplasia cervical. De acuerdo con algunos autores,<sup>9,10</sup> la prueba del ACCE ofrece información útil en el monitoreo de la enfermedad. Además, los niveles plasmáticos de ACCE y la prueba de CA 15.3 previos a la QNA pueden ser de utilidad en la definición de la respuesta clínica a la quimioterapia, y la prueba de CA 125 parece valiosa como factor de riesgo pronóstico en estos pacientes.<sup>10</sup> Mientras tanto, otros expertos informaron que la reducción de los niveles de ACCE se correlaciona bien con el volumen del tumor residual luego de la QNA, pero no necesariamente con la evolución de la enfermedad.<sup>11</sup>

### 2. GENES ASOCIADOS A NEOPLASIAS

Más recientemente, como se informó para otras neoplasias, los genes asociados al cáncer, tales como la expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2),<sup>12</sup> fueron investigados como factores relacionados con la respuesta a la quimioterapia. El incremento en la expresión de COX-2 parece estar asociado con la resistencia a la quimioterapia y a escasa sobrevida en pacientes con neoplasia cervical localmente avanzada. La sobrevida total a 2 años es del 38% en los pacientes COX-2 positivos, valor que asciende al 85% en los COX-2 negativos.<sup>13</sup>

### 3. EXPRESION DE LA INMUNIDAD MEDIADA POR CELULAS

El impacto de la QNA en la inmunidad mediada por células en pacientes con neoplasia cervical avanzada también fue objeto de investigación. Antes de la quimioterapia neoadyuvante, y después de ella, los autores estudiaron las células asesinas naturales (natural killer, NK), la cantidad de linfocitos T CD4(+)/CD28 y CD8(+)/CD28 y la modificación de los parámetros con la adición de IL-12 in vitro.<sup>14</sup> La cantidad de células NK fue mayor, antes de la QNA, en los pacientes que desarrollaron buena respuesta clínica al tratamiento que en quienes experimentaron una escasa respuesta clínica. Además, los valores de los linfocitos T CD4(+) y CD8(+) y las células CD8(+)/CD28(+) también fueron superiores en el grupo con buena respuesta comparado con el otro grupo. Los autores llegaron a la conclusión de que la cantidad de células NK, los niveles de células T CD8(+) y de células CD8(+)/CD28(+) pueden utilizarse como factores pronósticos antes de la QNA; los pacientes con escasa respuesta presentan menor actividad lítica de las células NK y son refractarios a la estimulación con IL-12, probablemente como resultado de la expresión reducida de los receptores de IL-12 o de un defecto intracelular en el mecanismo de transducción. El trabajo enfrentó el problema de la carga terapéutica innecesaria en los pacientes que no respondieron a la QNA. De hecho, uno de los objetivos del estudio fue la identificación de algunos parámetros pronósticos antes de iniciar la quimioterapia, para seleccionar sólo a los pacientes que podrían beneficiarse de la QNA y someter a los otros a diferentes protocolos y modalidades terapéuticas (ver cuadro 1).

### 4. MARCADORES CELULARES

Es clara la necesidad de identificar los factores celulares que podrían predecir la respuesta a la QNA, para optimizar el beneficio terapéutico de este tratamiento en pacientes con neoplasia cervical. La mejor alternativa para realizarlo es en ocasión de la primera biopsia diagnóstica antes de iniciar la quimioterapia, que ofrecería un indicio más preciso de la respuesta a la QNA. Con lo anterior en mente, nos centramos en la evaluación inmunohistoquímica de las moléculas de adhesión celular (alfa-catenina,  $\beta$ -catenina, E-caderina y CD44v6), como potenciales predictores de la respuesta a la QNA, sobrevida libre de recurrencia (SLR) y sobrevida total (ST) en pacientes con neoplasia cervical localmente avanzada tratadas con 3 ciclos de un régimen basado en el cisplatino (cisplatino en infusión intravenosa, epirrubicina en bolo intravenoso, etopósido en infusión intravenosa y bleomicina en bolo intravenoso).<sup>30,31</sup> Las observaciones clave están sintetizadas en el cuadro 1.

#### 4.1. Moléculas de adhesión celular

Las moléculas de adhesión representan blancos en la búsqueda de potenciales marcadores pronósticos a nivel celular, debido a que algunos ensayos las relacionan con la progresión tumoral y metástasis.<sup>15-20</sup> Estos factores no han sido estudiados a fondo como pronosticadores de neoplasia hasta el momento.<sup>21-27</sup> Todas las moléculas de adhesión celular son glucoproteínas de transmembrana que sufren cambios estructurales luego de la unión al ligando. Pueden afectar las funciones celulares a través de otras moléculas a las que están unidas, algunas de las cuales son parte del citoesqueleto o enzimas.<sup>28,29</sup> Existen 6 familias de moléculas de adhesión: a) la superfamilia tipo inmunoglobulina, b) caderinas, c) integrinas, d) receptor de la proteína tirosina fosfatasa (RPTF), e) selectinas y f) receptores del ácido hialurónico. La mayoría de éstas son moléculas de adhesión entre células, aunque integrinas y CD44 median la adhesión entre célula y matriz. Además, CD44 también media la adhesión entre células.

Las caderinas constituyen una gran familia de moléculas de adhesión celular que median las interacciones entre células. Las caderinas-E (epitelial) y N (neuronal) son las mejor caracterizadas de todas.<sup>28</sup> La caderina-E es esencial en la formación y mantenimiento del epitelio, y la pérdida de función de la caderina-E se correlaciona con el aumento de la invasividad y metástasis de los distintos tumores del ser humano.<sup>16,19,22,27</sup> Para cumplir con su función adhesiva, la caderina-E debe formar complejos con cateninas citoplásmicas periféricas.<sup>16,22</sup> Hasta el momento, existen pocos estudios publicados sobre el papel de caderinas y cateninas en la neoplasia cervical,<sup>16,22</sup> y la información sobre el valor predictivo independiente de estos marcadores es contradictoria. Por otra parte, mayor cantidad de datos se encuentra disponible sobre estas moléculas de adhesión en los adenocarcinomas ováricos.<sup>28,29</sup> Así, existen informes de expresión intensa de la caderina-E en los adenocarcinomas ováricos, en comparación con células tumorales en la ascitis, y se observó disminución de la expresión de la caderina-E en tumores escasamente diferenciados y en metástasis.<sup>28</sup> Se encontraron mutaciones en el gen de la  $\beta$ -catenina en el cáncer de ovario tipo endometroide, aunque hasta el momento no existe información disponible sobre posibles mutaciones en las cateninas alfa y  $\beta$  en los carcinomas cervicales.

En el presente estudio, el patrón de expresión de las cateninas alfa y  $\beta$  y de la caderina-E no evidenció ningún valor predictivo en la respuesta a la QNA (RQA), sobrevida libre de recurrencia (SLR) o sobrevida total (ST). Esto contrasta con nuestras observaciones recientes en el cáncer ovárico epitelial, donde la reducción en la expresión de la alfa-catenina fue un predictor significativo de escasa sobrevida de las pacientes en estadio I de la FIGO 28. Por otra parte, se realizaron observaciones interesantes con respecto al valor predictivo de otra molécula de adhesión, CD44v6. El cluster de diferenciación-44 (CD44) es un receptor de superficie celular transmembrana ubicuo, expresado en todos los tipos celulares en su forma estándar, y también como diferentes isoformas variantes (CD44v).<sup>17,18,20</sup> Además de la adhesión celular, el CD44 participa en la transmisión de señales que median la apoptosis.<sup>24</sup> Existe abundante evidencia de que muchas de las funciones del CD44 están estrechamente asociadas a su ligando principal, el ácido hialurónico, importante componente de la matriz extracelular.<sup>29</sup> El epitelio del cuello uterino normal, las líneas celulares del cáncer cervical y las neoplasias cervicales expresan las formas estándar y variantes del CD44.<sup>23-27</sup> Los mecanismos del CD44 involucrados en la carcinogénesis y metástasis han sido principalmente asociados a sus propiedades de unión al ácido hialurónico, que facilitan la migración de la célula tumoral y la invasión a la matriz extracelular.

La expresión de CD44v6 es bien conocida como marcador útil de la progresión tumoral y pronóstico en diversos tipos de neoplasias del ser humano.<sup>15,17,18,20,23-27,29</sup> Recientemente, la expresión de isoformas del CD44 como CD44v6 mostraron su utilidad como marcadores de progresión tumoral y pronóstico de varios carcinomas.<sup>15-20</sup> El CD44 también está asociado con la proliferación celular y la angiogénesis. En una revisión reciente sobre neoplasias ováricas epiteliales, se observaron incrementos significativos de los niveles de ácido hialurónico en la matriz de tumores escasamente diferenciados y en estadios avanzados, factor pronóstico independiente en el análisis de sobrevida multivariado.<sup>29</sup> Por consiguiente, la expresión de CD44v6 estuvo significativamente asociada con la respuesta a la QNA, en las biopsias pre-QNA y post-QNA en el análisis univariado, y lo que es más importante, mantuvieron su valor predictivo independiente en el análisis multivariado en la primera y segunda muestras. Cabe destacar que la QNA podría modificar de manera significativa la expresión de CD44v6, al revertir la expresión inicialmente reducida a normal, que parece estar en paralelo con la respuesta favorable a la QNA.

Esto significa que la evaluación de la expresión del CD44v6 podría ayudar en la selección de los pacientes que probablemente se beneficien con la QNA; por ejemplo, las mujeres con reducción significativa de la expresión CD44v6 en sus tumores previo a la terapia.

#### **4.2. Factores reguladores del ciclo celular**

Como continuación de nuestros estudios previos sobre evaluación inmunohistoquímica de las moléculas de adhesión celular,<sup>30</sup> nos centramos en los factores reguladores del ciclo celular.<sup>31</sup> De hecho, a pesar de la amplia documentación clínica, los mecanismos reguladores de la respuesta/resistencia a QNA a nivel celular todavía no fueron examinados a fondo.<sup>32-34</sup> En general, los factores estudiados como reguladores de la respuesta del cáncer cervical a la terapia incluyen el gen de resistencia múltiple a drogas (MDR1), factores de crecimiento y sus receptores, proteínas del ciclo celular, oncogenes y genes supresores tumorales, y factores de proliferación celular y apoptosis.<sup>32-39</sup> Las consecuencias clínicas de la expresión de p53 en pacientes sometidos a QNA fueron estudiados en series limitadas de mujeres con cáncer cervical avanzado localmente<sup>40</sup> que sustentan la opinión de que la acción citotóxica del cisplatino podría activar la apoptosis mediada por p53. Otros informes se centraron en la potencial utilidad del índice PCNA en la predicción de la respuesta a corto plazo a la QNA en adenocarcinomas cervicales.<sup>41</sup> Además se demostró que la evaluación de la expresión de P-glicoproteína y PCNA podría ser de utilidad en la predicción de la respuesta tumoral a la QNA.<sup>32</sup> En otros estudios analizamos, a nivel celular, la respuesta a la QNA en muestras de carcinoma cervicales antes

de la quimioterapia neoadyuvante y después de ella, mediante el cálculo de los índices de actividad apoptótica (IA/V; índice de apoptosis corregido por volumen) y mitótico (IM/V; índice mitótico corregido por volumen), evaluando los niveles de proteínas del ciclo celular (p53, pRb, p21, bcl-2), marcadores de proliferación celular (Ki-67 y PCNA), expresión del gen de resistencia múltiple a drogas (MDR1) y detección del ADN del virus del papiloma humano (HPV) como asociados a la respuesta a frente a la QNA y a la evolución de la enfermedad.

#### 4.2.1. p21/p53/pRb

Comenzando por las proteínas del ciclo celular, el incremento de la expresión de p21/WAF1 en la muestra quirúrgica estuvo significativamente relacionado a la respuesta a la QNA en el análisis univariado al igual que la expresión de pRb en las muestras pre-QNA y post-QNA. Esto es posible frente al hecho de que todos los tumores contenían ADN HPV, y pudo explicarse por los efectos de la proteína HPV E7.<sup>42</sup> Lo anterior coincide con información reciente derivada de estudios in vivo e in vitro, en los que se detectaron aumentos de los niveles de p21, indicativos de la importancia de esta proteína en la patogénesis del cáncer cervical<sup>43-45</sup> Por consiguiente, el gen p21 es un regulador importante no sólo del ciclo celular, sino de la diferenciación celular y de las respuestas al estrés genotóxico.<sup>46</sup> Sin embargo, recientemente se demostró que, frente al estrés tóxico, la expresión de p21 no está exclusivamente vinculada con la presencia intracelular de p53 sino que puede ser estrechamente dependiente del ambiente celular individual y encontrarse en presencia de antagonistas de p53, como HPV E6<sup>42-44</sup> Así, en la primera biopsia de quienes respondieron a la QNA, la expresión de p53 estuvo inversamente asociada a los valores de IA/V mientras que la apoptosis aumentó linealmente con la expresión de p21. Este tipo de patrón de expresión de p21 podría explicarse por la inducción de la regulación ascendente de la proteína E7 del HPV.<sup>42-46</sup> Por otra parte, la primera biopsia de quienes no respondieron a la QNA mostró expresión reducida de p21 y p53, en paralelo con bajos índices IA/V, de acuerdo con una actividad p53 normal residual y sugestivo de que la HPV E6 expresada en estas células de carcinoma cervical es proporcional a la inhibición de la actividad p53.

La sobreexpresión de p21/WAF1, particularmente en las muestras post-QNA, parece constituir un claro indicio de respuesta exitosa a la QNA a nivel celular.<sup>47</sup>

#### 4.2.2. Ki-67/PCNA

La proliferación celular es un importante factor que se correlaciona con la biología de muchos tumores del ser humano, incluida la neoplasia cervical.<sup>32</sup> Los presentes estudios confirmaron el valor significativo del IM/V en la predicción de la SLR y ST en análisis univariado. De los marcadores de proliferación celular, Ki-67 en la muestra post-QNA evidenció cierta significancia como predictor de RQA. Igualmente, PCNA pronosticó RQA en el análisis univariado no así en el multivariado. El PCNA está involucrado en la reparación del ADN aunque no es actualmente considerado como un marcador de proliferación confiable. Si la célula escapa al control del ciclo celular normal, las expresiones de Ki-67 y PCNA aumentan, pero, lo que es importante, la expresión de p21 (inducida por HPV E7 o wt p53) puede interferir con PCNA.

#### 4.2.3. bcl-2

La apoptosis y la necrosis son las 2 principales formas de muerte celular.<sup>48</sup> De acuerdo con los conceptos actuales, la extensión clonal de los tumores malignos se puede producir como un evento premaligno resultado de la supresión de la apoptosis, secundaria a mutaciones en los oncogenes reguladores, tales como bcl-2, en adición al regulador clave p53. Bcl-2 protege a las células de la susceptibilidad a la apoptosis, que podría ocasionar rápida proliferación celular. En el presente estudio, la expresión de bcl-2 se encontró significativamente relacionada a la de Ki-67; la expresión elevada del gen supresor de apoptosis (bcl-2) conduce a proliferación celular significativa (regulación ascendente de Ki-67). Pillai y colaboradores<sup>36</sup> demostraron recientemente que la expresión de bcl-2 estaba asociada con la respuesta del tumor a la radioterapia. Este no fue el caso en la respuesta a la QNA; sin embargo, debido a que bcl-2 como marcador único no tuvo ningún valor predictivo en la respuesta a la QNA, SLR o ST en el presente estudio.

#### 4.3. Gen de resistencia múltiple a drogas (MDR1)

De especial interés en este estudio fue la evaluación del papel del gen de resistencia múltiple drogas (MDR1) en la regulación de la respuesta a la QNA y evolución de la enfermedad.<sup>39</sup> La expresión de MDR1 en la primera biopsia mostró correlación con la RQA. Cabe destacar que la expresión de MDR1 en la muestra post-QNA fue un predictor altamente significativo de la ST en el análisis univariado. Así, el 70% de los no sobrevivientes y el 43% de quienes sobrevivieron eran MDR1-positivos (RR = 1.6). El hecho de ser negativo para MDR1 fue un predictor independiente de SLR, sólo el 28% de los casos recurrentes y el 57% de los no recurrentes eran MDR1 negativos (RR = 2.04).<sup>39</sup> El pronóstico relativamente desfavorable de los pacientes con neoplasia cervical en estadios tempranos (I y II) podría mejorarse mediante la QNA inicial.

Desafortunadamente, no todos los pacientes responden a la QNA, fenómeno que constituye una limitación significativa al empleo de este tratamiento; ello conduce al retraso del tratamiento total e incluso al crecimiento tumoral acelerado.<sup>49</sup> Por lo tanto, hay necesidad urgente de identificar los predictores precisos de la respuesta a la QNA (RQA). Nuestros estudios fueron realizados para identificar un grupo de marcadores celulares como posibles predictores de RQA, SLR y ST. La expresión de varios factores involucrados en la regulación del ciclo celular y proliferación celular se encontró alterada como respuesta a la QNA que parece estar regulada por una compleja interacción de mecanismos celulares que involucran entre otros la expresión de p21, pRb, PCNA y Ki-67, así como la del gen MDR1. Aunque importante como método inicial en la reducción de la carga tumoral, la RQN por sí misma no fue un predictor independiente



significativo de la evolución de la enfermedad, sin embargo, determinada por otros factores.

#### 4.4. Índice de apoptosis corregido por volumen (IA/V); índice mitótico corregido por volumen (IM/V)

Los índices apoptótico y mitótico parecen ser los indicadores más confiables de SLR, mientras que de las proteínas del ciclo celular p21, p53 y PCNA son importantes.<sup>50</sup> Es esperable un pronóstico desfavorable en quienes responden a la QNA con disminución de los índices IA/V (índice de apoptosis corregido por volumen) e incremento de los índices IM/V (índice mitótico corregido por volumen).<sup>51</sup> Un denominador común en estos eventos del ciclo celular a nivel molecular podría estar dado por la expresión de los oncogenes E6 y E7 del HPV, de quienes se sospecha que cumplen un papel regulador importante (a través de p21, p53 y pRb) en la respuesta a la QNA y, en parte, como predictores de la evolución de la enfermedad también.

También la evaluación de las moléculas de adhesión celular, como la expresión de CD44v6, podría proporcionar posibles blancos en la búsqueda de potenciales marcadores pronósticos a nivel celular y ayudar en la selección de los pacientes propensos a beneficiarse con la QNA; por ejemplo, las mujeres con expresión de CD44v6 significativamente reducida en sus tumores antes de la terapia.

Debido al hecho de que los presentes resultados derivaron de series con cantidad limitada de pacientes, la evaluación de estos marcadores se beneficiaría claramente con una muestra de mayor tamaño. El desarrollo de nuevos estudios está claramente justificado para elucidar los factores que podrían ayudar en la selección más precisa de los pacientes que se beneficiarían en mayor medida con la QNA. Esto podría finalmente aumentar el valor de esta modalidad terapéutica como uno de los principales determinantes de la sobrevida total.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue sustentado mediante una subvención de investigación del Consejo Médico, Academia de Finlandia (Dr. Stina Syrjänen) y por la subvención 53/99 del Regione Emilia Romagna, Proyecto de Pesquisa del Cáncer Cervical, Bolonia, Italia

#### BIBLIOGRAFIA

1. Eddy GL, Manetta A, Alvarez RD, Williams L and Creasman WT. Neoadjuvant chemotherapy with Vincristine and Cisplatin followed by radical hysterectomy and pelvic lymphadenectomy for FIGO stage IB bulky cervical cancer: a Gynecology Oncology Group pilot study. *Gynecol Oncol* 57:412-416, 1995
2. Serur E, Mathews RP, Gates J, Levine P, Maiman M and Remy JC. Neoadjuvant chemotherapy in stage IB2 squamous cell carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 65:348-356, 1997
3. Sardi JE, Giaroli A, Sananes C, et al. Long-term follow-up of the first randomized trial using neoadjuvant chemotherapy in stage Ib squamous carcinoma of the cervix: the final results *Gynecol Oncol* 1997;67:61-9
4. Sugiyama T, Nishida T, Kumagai S, et al. Combination therapy with irinotecan and cisplatin as neoadjuvant chemotherapy in locally advanced cervical cancer *Br J Cancer* 1999;81:95-8
5. Chang TC, Lai CH, Hong JH, et al. Randomized trial of neoadjuvant cisplatin, vincristine, bleomycin, and radical hysterectomy versus radiation therapy for bulky stage IB and IIA cervical cancer. *J Clin Oncol* 2000;18:1740-7
6. Benedetti-Panici P, Landoni F, Greggi S, et al. Neoadjuvant chemotherapy (NACT) and radical surgery (RS) vs. exclusive radiotherapy (RT) in locally advanced squamous cell cervical cancer (LASCCC). Results from the Italian Multicenter Randomized Study. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1999;18:357.
7. Aoki Y, Sato T, Watanabe M, Sasaki M, Tsuneki I, Tanaka K. Neoadjuvant chemotherapy using low-dose consecutive intra-arterial infusion of cisplatin combined with 5-FU for locally advanced cervical adenocarcinoma. *Gynecol Oncol* 2001;81:496-499
8. Levenback C. Cervical Cancer. In: Barakat RR, Bevers MW, Gershenson DM, Hoskins WJ, *Handbook of Gynecologic Oncology*, 231-248, Martin Dunitz Ed., second Edition, London, 2002.
9. Scambia G, Benedetti-Panici P, Foti E. Squamous cell carcinoma antigen: prognostic significance and role in the monitoring of neoadjuvant chemotherapy response in cervical cancer. *J Clin Oncol*, 1994;12:2309-2316
10. Scambia G, Benedetti-Panici P, Foti. Multiple tumor marker assays in advanced cervical cancer: relationship to chemotherapy response and clinical outcome. *Eur J Cancer*, 1996;32A:259-263
11. Kim BG, Kim JH, Park SY. Relationship between squamous cell carcinoma antigen levels and tumor volumes in patients with cervical carcinomas undergoing neoadjuvant chemotherapy. *Gynecol Oncol*. 1996;63:105-113
12. Kishimoto Y, Morisawa T, Hosoda A, Shiota G, Kawasaki H, Hasegawa J. Molecular changes in the early stage of colon carcinogenesis in rats treated with azoxymethane. *J Clin Cancer Res*, 2002; 21:203-11
13. Ferrandina G, Lauriola L, Distefano MG, Zannoni GF, Gessi M, Legge F, Maggiano N, Mancuso S, Capelli A, Scambia G, Ranelletti FO. Increased cyclooxygenase-2 (COX-2) expression is associated with chemotherapy resistance and poor survival in locally advanced cervical cancer patients. *J Clin Oncol*, 2002; 20: 973- 81
14. Cosiski Marana HR, Santana da Silva J, Moreira de Andrade J. NK cell activity in the presence of IL-12 is a prognostic assay to neoadjuvant chemotherapy in cervical cancer. *Gynecol Oncol*, 2000; 78:318-23
15. Yamane N, Tsujitani S, Makino M, Maeta M, Kaibara N. Soluble CD44 variant 6 as a prognostic indicator in patients with colorectal carcinoma. *Oncology* 56:232- 238, 1999.
16. Bankfalvi A, Terpe HJ, Breukelmann D, Bier B, Rempe D, Pschadka G, Krech R, Lelle RJ, Boecker W. Immunophenotypic and prognostic analysis of E-cadherin and beta-catenin expression during breast carcinogenesis and tumour progression: a comparative study with CD44. *Histopathology* 34:25-34, 1999.

17. Masuda M, Takano Y, Iki M, Makiyama K, Noguchi S, Hosaka M. Expression and prognostic value of CD44 isoforms in transition cell carcinoma of renal pelvis and ureter. *J Urol* 161:805-808, 1999.
18. Lipponen P, Aaltomaa S, Kosma VM, Ala-Opas M, Eskelinen. Expression of CD44 standard and variant-v6 protein in transitional cell bladder tumours and their relation to prognosis during a long-term follow-up. *J Pathol* 186:157-164, 1998.
19. De-Boer CJ, van-Dorst E, van-Krieken H, Jansen-van-Rhijn CM, Warnaar SO, Fleuren GJ, Litvinov SV. Changing roles of cadherins and catenins during progression of squamous intraepithelial lesions in the uterine cervix. *Am J Pathol* 155:505-515, 1999.
20. Sakai K, Kaku T, Kamura T, Kinukawa N, Amada S, Shigemitsu T, Hirakawa T, Kobayashi H, Ariyoshi K, Nakano H. Comparison of p53, Ki-67 and CD44v6 expression between primary and matched metastatic lesions of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 72:360-366, 1999.
21. Davidson B, Goldberg I, Gotlieb WH, Ben Baruch G, Kopolovic J. CD44 expression in uterine cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. *Eur J Gynaecol Oncol* 19:46-49, 1998.
22. Jeffers MD, Paxton J, Bolger B, Richmond JA, Kennedy JH, McNicol AM. E-cadherin and integrin cell adhesion molecule expression in invasive and in situ carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 64:481-486, 1997.
23. Tokumo K, Kodama J, Seki N, Miyagi Y, Yoshinouchi M, Kudo T. CD44 exon v6 correlates with cellular differentiation but not with progression and metastasis of cervical cancer. *Eur J Cancer* 34:2107-2111, 1998.
24. Saegusa M, Hashimura M, Machida D, Okayasu I. Down-regulation of CD44 standard and variant isoforms during the development and progression of uterine cervical tumours. *J Pathol* 187:173-183, 1999.
25. Speiser P, Wanner C, Tempfer C, Mittelbock M, Hanzal E, Bancher-Todesca D, Gitsch G, Reinthaller A, Kainz C. CD44 is an independent prognostic factor in early-stage cervical cancer. *Int J Cancer* 74:185-188, 1997.
26. Shimabukuro K, Toyama-Sorimachi N, Ozaki Y, Goi T, Furukawa K, Miyasaka M, Aso T, Toyama-Sorimachi N. The expression patterns of standard and variant CD44 molecules in normal uterine cervix and cervical cancer. *Gynecol Oncol* 64:26-34, 1997.
27. Kainz C, Tempfer C, Kohlberger P, Janisch S, Koelbl H, Gitsch G, Breitenecker G. Immunohistochemical detection of adhesion molecule CD44 splice variants in lymph node metastases of cervical cancer. *Int J Cancer* 69:170-173, 1996.
28. Anttila M, Kosma V-M, Ji H, Weiling X, Puolakka J, Juhola M, Saarikoski S, Syrjänen K. Clinical significance of a-catenin, collagen IV and Ki-67 expression in epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 16:2591-2600, 1998.
29. Anttila MA, Tammi RH, Tammi MI, Syrjänen KJ, Saarikoski SV, Kosma V-M. High levels of stromal hyaluronan predict poor disease outcome in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 60:150-155, 2000.
30. Costa S, Terzano P, Bovicelli A, Santini D, Angelelli B, Martoni A, De Nuzzo M, Lipponen P, Syrjänen S, Syrjänen K. CD44 Isoform 6 (CD44v6) is a prognostic indicator of the response to neoadjuvant chemotherapy in cervical carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2001;80:67-73
31. Costa S, Terzano P, Santini D, Ceccarelli C, Martoni A, Angelelli B, Panetta A, Bovicelli A, Cristiani P, Lipponen P, Erzen M, Syrjänen S, Syrjänen K. Neoadjuvant chemotherapy in cervical cancer. Regulators of cell cycle, apoptosis and proliferation as determinants of response to therapy and disease outcome. *Am J Clin Pathol*. 2001;116:729-737
32. Konishi I, Nanbu K, Mandai M. Tumor response to neoadjuvant chemotherapy correlates with the expression of P-glycoprotein and PCNA but not GST-p in the tumor cells of cervical carcinoma. *Gynecol Oncol*. 1998; 70:365-271
33. Kim JW, Kim YT, Kim DK. Correlation between EGFR and c-erbB-2 oncoprotein status and response to neoadjuvant chemotherapy in cervical carcinoma. *Yonsei Med J*. 1999;40:207-214.
34. Gasinska A, Urbanski K, Jakubowicz J, et al. Tumor cell kinetics as a prognostic factor in squamous cell carcinoma of the cervix treated with radiotherapy. *Radiother Oncol*. 1999;50:77-84.
35. Amortegui AJ, Meyer MP, Elborne VL, et al. p53, retinoblastoma gene product, and cyclin protein expression in human papillomavirus virus DNA-positive cervical intraepithelial neoplasia and invasive cancer. *Mod Pathol*. 1995;8:907-912.
36. Pillai MR, Jayaprakash PG, Nair MK. bcl-2 immunoreactivity but not p53 accumulation associated with tumor response to radiotherapy in cervical carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1999;125:55-60.
37. Sheridan MT, Cooper RA, West CM. A high ratio of apoptosis to proliferation correlates with improved survival after radiotherapy for cervical adenocarcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1999;44:507-512.
38. Shoji Y, Saegusa M, Takano Y, et al. Correlation of apoptosis with tumor cell differentiation, progression, and HPV infection in cervical carcinoma. *J Clin Pathol*. 1996;49:134-138.
39. Riou GF, Zhou D, Ahomadegbe JC, et al. Expression of multidrug-resistance (MDR1) gene in normal epithelia and in invasive carcinomas of the uterine cervix. *J Natl Cancer Inst*. 1990;82:1493-1496.
40. Garzetti GC, Ciavattini A, Provinciali M. Expression of p53 and apoptosis of tumor cells in locally advanced cervical carcinoma after cisplatin based chemotherapy. *Anticancer Res*. 1996;16:3229-3234
41. Fujiwaki R, Takahashi K, Kitao M. Decrease in tumor volume and histologic response to intra-arterial neoadjuvant chemotherapy in patients with cervical and endometrial adenocarcinoma. *Gynecol Oncol*. 1997; 65:258-264
- Syrjänen SM, Syrjänen, KJ. New concepts on the role of human papillomavirus in cell cycle regulation. *Ann Med*. 1999;31:175-187.
42. Stoppler H, Stoppler MC, Johnson E, et al. The E7 protein of human papillomavirus type 16 sensitizes primary human keratinocytes to apoptosis. *Oncogene*. 1998;10:1207-1214.
43. Song S, Gulliver GA, Lambert PF. Human papillomavirus type E6 and E7 oncogenes abrogate radiation-induced DNA damage responses in vivo through p53-dependent and p53 independent pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:2290-2295.
44. Jones DL, Thompson DA, Such-Burgmann E, et al. Expression of the HPV E7 oncoprotein mimics but does not evoke a p53-dependent cellular damage response pathway. *Virology*. 1999;258:406-414.
45. Syrjänen K, Syrjänen S. Papillomavirus Infections in Human Pathology, J. Wiley & Sons, London; 2000:1-615.
46. Butz K, Geisen C, Ullman A, et al. Uncoupling of p21WAF1/CIP1 mRNA and protein expression upon genotoxic

- stress. *Oncogene*. 1998;13:781-787.
47. Walker NI, Harmon BV, Gobe GC, et al. Patterns of cell death. *Meth Achiev Exp Pathol*. 1988;13:18-54.
  48. Aoki Y, Tanaka K. Current approaches of neoadjuvant chemotherapy in cervical cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2002;2:73-82
  49. Kurvinen K, Syrjänen K, Syrjänen S. p53 and bcl-2 proteins as prognostic markers in Human papillomavirus-associated cervical lesions. *J Clin Oncol*. 1996;14:2120-2130.
  50. Aaltomaa S, Lipponen P, Eskelinen M, et al. Mitotix indexes as prognostic predictors in female breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1992;118:75-81.

## ● VALOR PRONOSTICO DE LA REACTIVIDAD CUTANEA RETARDADA EN LA SUPERVIVENCIA A 10 AÑOS EN EL CANCER COLORRECTAL



Columnista Experto de SIIC  
**Dr. Miguel Echenique Elizondo**

Cirujano General. Profesor Titular de Cirugía, Unidad Docente de Medicina, Universidad del País Vasco, San Sebastián. Departamento de Cirugía, Hospital «N<sup>o</sup> S<sup>a</sup> de Aránzazu», San Sebastián, España

Otro trabajo publicado: Echenique Elizondo M: "Recuento preoperatorio de plaquetas en el cáncer de páncreas y su valor pronóstico. Actualización", <[www.siicsalud.com/dato/dat028/02529000.htm](http://www.siicsalud.com/dato/dat028/02529000.htm)>

San Sebastián, España (**especial para SIIC**)

La reactividad cutánea de mediación inmunocelular proporciona información orientativa sobre la supervivencia a largo plazo en casos de cáncer colorrectal en estadios A y B, y fundamentalmente C de Dukes.

### RESUMEN

El propósito del estudio es determinar si la respuesta inmunocelular evaluada mediante reactividad cutánea tiene valor pronóstico en el cáncer colorrectal.

*Material y métodos:* se analiza de manera prospectiva y a 10 años una serie de 77 pacientes intervenidos por cáncer colorrectal en varios estadios histopatológicos (A = 4, B = 19, C = 49 y D = 5) tratados en un mismo hospital y con los mismos criterios durante un período de 2 años. Se demostraron vivos a los 10 años 4/4 (100%) en el estadio A, 7/19 (36.8%) en el B, 8/49 (16.32%) en el C y 0/5 (0%) en el D. Se determinó preoperatoriamente, a las 48 horas del posoperatorio y a los 30 días la reactividad cutánea retardada a un conjunto de antígenos [Multitest (r)]. *Resultados:* el estudio de los datos (una vez conocida la supervivencia real a 10 años) de la reactividad cutánea preoperatoria, medida en mm, proporciona indicios significativos en cuanto al pronóstico para pacientes en estadios B ( $p < 0.05$ ) y C ( $p < 0.01$ ).

*Conclusión:* la determinación numérica de la reactividad cutánea retardada preoperatoria parece constituir un índice de valor pronóstico en el cáncer colorrectal en estadios B y C.

**Palabras clave:** cáncer, colon, recto, inmunidad, supervivencia.

### SUMMARY

The aim of the study was to determine if the cell-mediated immune response may have any prognostic signification in cancer of the colon and rectum. *Material and Methods:* A series of 77 patients operated for cancer of the colon and rectum in the same hospital and with identical criteria during two years are analyzed prospectively for a ten year follow up. Dukes stages were -A=4, B=19, C=49 y D=5-.

Survival according stages was: 4/4 in stage A, 7/19 (36.8%) B, 8/49 (16.32%) C y 0/5 (0%) D. Before operation and 48 h. thereafter and at 30 days cell-mediated immune reactivity skin test was done trough a multiple antigen compound -Multitrst- R. *Results:* Comparison of preoperative numeric results according staging with a control group demonstrates, a significative diference for patients stage B and very significative for stage considering patients alive and death at ten years.

*Conclusion:* Cell-mediated immune reactivity skin test measured preoperatively may represent a prognostic factor y cancer of the colon and rectum for stages B and C.

**Key words:** cancer, colon, rectum, survival, immunity.

### INTRODUCCION

El cáncer colorrectal es la segunda neoplasia más frecuente del mundo occidental<sup>1</sup> y representa el 15% de las muertes por cáncer. Sus indicaciones quirúrgicas, así como la táctica y la técnica operatorias, están claramente establecidas. El tratamiento complementario en el cáncer avanzado (quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia) es objeto de constante revisión y modificación. Sin embargo, la supervivencia no ha sufrido grandes modificaciones en las dos últimas décadas.

Este trabajo es el resultado del seguimiento *real* a 10 años de una serie de pacientes intervenidos por cáncer colorrectal y cuyos resultados preliminares a 5 años ya fueron publicados.<sup>2</sup> El seguimiento de la serie permite confirmar y reforzar los resultados anteriormente demostrados.



## MATERIAL Y METODOS

Entre el 1 de enero de 1986 y el 31 de diciembre de 1987 fueron intervenidos, en el Departamento de Cirugía del Hospital N<sup>o</sup> S<sup>a</sup> de Aránzazu, 93 pacientes por cáncer de colon y recto. Este estudio fue diseñado en 1985 y realizado de forma prospectiva con un seguimiento real de la serie durante 10 años. Fueron establecidos los siguientes *criterios de inclusión*:

- Pacientes ingresados e intervenidos por presentar cáncer colorrectal en el mismo centro y tratados por las mismas personas, con pautas quirúrgicas y complementarias iguales.
- Haber cumplido la totalidad de las determinaciones incluidas en el diseño.
- Haber sido controlados en su evolución tanto en el hospital como telefónicamente.

Se consideró como *criterio de exclusión* el no haber completado la totalidad de los puntos del estudio, bien por razones personales, operativas ó de fallecimiento.

Un total de 77 casos (41 varones) fueron los que cumplieron los criterios indicados y que constituyen la base del trabajo. La edad media fue de 65.3 (rango 36-83) en los varones y de 70.2 (rango 40-84) en las mujeres. En el seguimiento a 10 años, 7 pacientes no pudieron ser controlados de los 84 registrados en la revisión a 5 años.

Todos los casos fueron adenocarcinomas, de diverso grado de diferenciación. Se determinaron preoperatoriamente, a las 48 horas de la intervención y a los 30 días los siguientes parámetros:

- a. Reactividad cutánea retardada a un conjunto de antígenos [Multitest (R)]; se midió en mm la respuesta a cada antígeno y su suma  $n_1 + n_2 + n_3 + \dots + n_7$  se tomó como indicador de la reactividad cutánea total. Esta determinación, realizada por grupos histopatológicos, permitió obtener un valor medio para cada uno de ellos. Se estableció un grupo control de 20 personas sanas (personal hospitalario) con el fin de realizar análisis comparativo.
- b. Inmunoglobulinas G, M y A.
- c. Proteínas totales.
- d. Albúmina.
- e. Hemograma completo.
- f. Se registró el estadio histopatológico según la clasificación de Dukes,<sup>2</sup> sin modificaciones para simplificar el estudio y por lo anteriormente comentado. El análisis de supervivencia de la serie se efectuó mediante registro de la *supervivencia real* a intervalos de 12 meses. Para el estudio estadístico se utilizó el programa SPSS 6.0. Fueron considerados como significativos los valores de  $p < 0.05$ .
- g. Se confeccionó un grupo control de 20 voluntarios sanos para valoraciones comparativas.

El propósito de nuestro estudio ha sido:

- I. Comprobar el estadio histopatológico en que los pacientes llegan al hospital.
- II. Determinar si existen diferencias en el estado inmunitario humoral y celular, determinado mediante reactividad cutánea, según el estadio tumoral.
- III. Valorar las modificaciones operatorias de los valores iniciales.
- IV. **Hipótesis principal.** Observar si existen implicaciones pronósticas entre la situación inmunitaria celular preoperatoria y la supervivencia real, considerando pacientes vivos y fallecidos a largo plazo. Se analizaron los resultados a 5 años y actualmente se valoran los resultados a 10 años, con especial referencia a estadios B y C.

## RESULTADOS

El análisis de la serie demuestra una distribución por sexo hombres/mujeres de 41/36 (gráfico 1). El estadio de Dukes de los pacientes intervenidos fue: A = 6 (7.1%), B = 22 (26.1%), C = 51 (60.7%) y D = 5 (5.9%), destacándose el hecho de que más del 60% de los casos corresponden a estadios avanzados de la enfermedad.

En el seguimiento a 10 años pudieron ser controlados en total 77 pacientes: A = 4 (5.19%), B = 7 (24.6%), C = 49 (63.63%), D = 5 (6.49%) (gráficos 2 y 3). Dos pacientes del estadio A no pudieron ser seguidos en el análisis final, y no se dispone de datos sobre su situación. A los 10 años de seguimiento permanecían con vida 4/4 en el estadio A, 7/19 (36.8%) en el B, 8/49 (16.32%) en el C y 0/5 (0%) en el D.

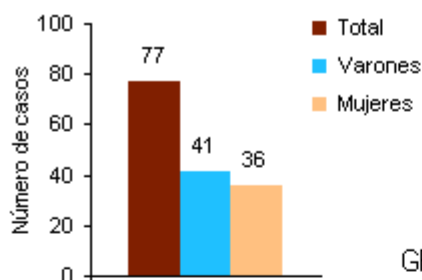


GRAFICO 1. Distribución por sexos.

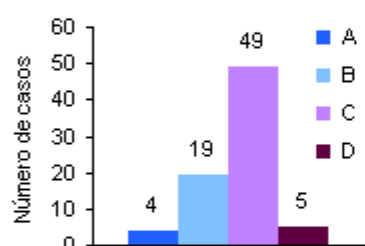


GRAFICO 2. Distribución por estadios en el momento de ser atendidos.

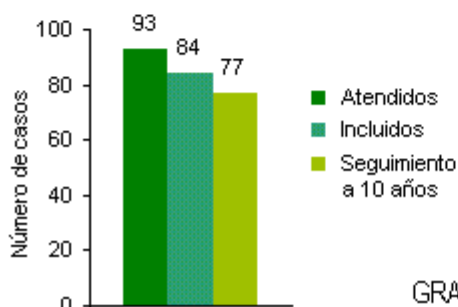


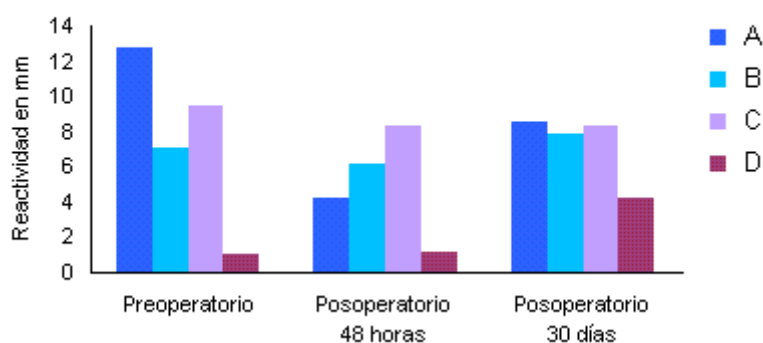
GRAFICO 3. Seguimiento de la serie.

El análisis de las modificaciones de las inmunoglobulinas G, M y A al comparar valores preoperatorios y posoperatorios (a las 48 horas y a los 30 días) por estadios no mostró diferencias significativas, salvo la elevación de la IgG en el estadio D ( $p < 0.05$ ), pero que carece de implicaciones pronósticas en cuanto a la supervivencia final. Dichos resultados ya fueron registrados. Lo mismo sucedió con las tasas de proteínas totales, albúmina y hemograma, cuyos valores no demostraron relación significativa con la supervivencia.

El análisis de las modificaciones de la reactividad cutánea preoperatoria, expresada por un valor numérico obtenido con el procedimiento indicado y por estadios histopatológicos (una vez conocidos), respecto de los valores de la muestra del grupo control de personas sanas demuestra que: (i) la diferencia no es significativa para el estadio A, (ii) resulta significativa para el B ( $p < 0.01$ ) y el C ( $p < 0.05$ ) y (iii) es muy significativa ( $p < 0.005$ ) para el estadio D. Todo ello parece indicar un descenso global de la respuesta inmune celular, determinada por este método. Descenso que es tanto más acusado cuanto más avanzado se halla el tumor. Esto puede obedecer a una imbricación de factores, tanto nutricionales como generales, pero que evidentemente guardan relación directa con el estadio histopatológico del tumor tratado.

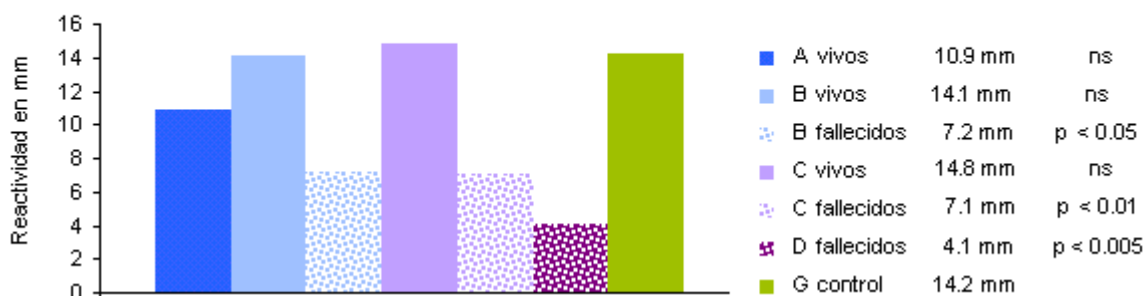
Del mismo modo, al comparar las modificaciones de la reactividad expresada en valores numéricos, se aprecia disminución a las 48 horas del posoperatorio respecto de las cifras preoperatorias. Esos valores se recuperan en las determinaciones realizadas a los 30 días, salvo en el estadio D, en el que existe una hipergia inicial que se recupera parcialmente en el período posoperatorio (gráfico 4) pero no resulta significativa en cuanto al pronóstico final (supervivencia).

GRAFICO 4. Evolución de la reactividad cutánea media por estadios.



Considerando los pacientes vivos y los fallecidos a los 10 años y su estadio histopatológico de Dukes, al comparar los valores preoperatorios con los del grupo control se observan diferencias significativas para el estadio B (fallecidos) ( $p < 0.05$ ) y para el estadio C (fallecidos) ( $p < 0.01$ ) (gráfico 5)

GRAFICO 5. Comparación de valores preoperatorios de la reactividad por grupos histopatológicos con el grupo control y de acuerdo con la supervivencia en cada uno de ellos.



## DISCUSION

El factor pronóstico principal actualmente lo constituye, todavía, la clasificación histopatológica de Dukes,<sup>3</sup> sin que las modificaciones posteriores debidas a Kirlin y cols.<sup>4</sup> o a Astler y cols.<sup>5</sup> hayan representado progresos reales, tal y como demostraron Fischer y cols.<sup>6</sup> Otras clasificaciones clinicopatológicas, como las establecidas por la *American Joint Comitee on Cáncer*<sup>7</sup> o la australiana,<sup>8</sup> resultan complejas o poco clarificadoras, tal como sucede con la clasificación española.<sup>9</sup> Jass y cols.,<sup>10</sup> con el empleo de análisis multivariante, desarrollaron un sistema basado en el estadio tumoral y variables patológicas relacionadas con el grado histológico. La teórica superioridad de este sistema tras el análisis de regresión de Cox estableció que sólo tres variables mantenían su importancia pronóstica, y tras la corrección del estadio tumoral solamente el grado de infiltración linfocitaria tenía una importancia significativa en la supervivencia. No obstante, «el grado de infiltración linfocitaria» permanece como un dato visual y de cuantificación sobre criterio del observador, sometido a la variabilidad impuesta por el patólogo que lo realiza.

Los métodos de cuantificación de ADN nuclear y de la ploidía<sup>11-16</sup> han ofrecido resultados variables no solamente en el cáncer colorrectal sino también en otras neoplasias.

El estudio de otras variables implicadas en el pronóstico final, tales como la edad,<sup>17</sup> el grado de invasión vascular y neural,<sup>18</sup> la afectación ganglionar, el índice de diferenciación celular,<sup>19</sup> los antígenos de histocompatibilidad,<sup>20</sup> embrionarios<sup>21</sup> y tumorales,<sup>22-24</sup> han ofrecido resultados no concluyentes en ocasiones o contradictorios en otras.

La supervivencia con relación con la respuesta inmune y su significación pronóstica en el cáncer colorrectal es objeto de estudio continuado así como las modificaciones de la reacción inmune ante la neoplasia continúa siendo objeto de análisis constante.<sup>25-28</sup> Recientes estudios aportan nuevos datos sobre las repercusiones de la linfadenectomía quirúrgica<sup>28</sup> en el pronóstico de pacientes con cáncer colorrectal en estadios B y C y el significado pronóstico de las micrometástasis en estadios A<sup>29</sup> y B. De ello ha nacido el interés en la utilización de inmunoterapia específica, con resultados variables pero mayormente positivos en cuanto a mejoría de los pacientes.<sup>26,27,30-32</sup> Asimismo, se ha discutido la importancia y la asociación de fenómenos inflamatorios

mediados por macrófagos junto con la infiltración linfocitaria como factor pronóstico.<sup>33,34</sup> Se continúan estudiando los mecanismos de actuación linfocitaria, activación de los linfocitos, efecto citotóxico y mecanismos moleculares implicados.<sup>35</sup> Los linfocitos activados eliminan células neoplásicas «in vitro».<sup>36</sup> Se ha demostrado la inhibición de la actividad citotóxica de los linfocitos en el cáncer colorrectal humano.<sup>37</sup> La supervivencia en el cáncer colorrectal ha mejorado discretamente en las últimas décadas, aunque no de manera importante si se comparan con series anteriores. De ello se ha derivado el interés en poder contar con un procedimiento pronóstico de supervivencia. De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio prospectivo, parece que el grado de reactividad cutánea a un conjunto de antígenos estimulantes de inmunidad de mediación celular puede orientar de forma global sobre las mayores o menores posibilidades de supervivencia, que en nuestros pacientes es similar a otras series recientemente publicadas.<sup>38-41</sup> Las determinaciones de inmunoglobulinas no han mostrado diferencias significativas considerando los valores preoperatorios y posoperatorios, salvo en lo referente a la IgG, lo que concuerda con observaciones anteriores y se encuadran dentro de las modificaciones ya conocidas en el paciente quirúrgico en cuanto a cambios del estado inmunitario propiciados por la propia intervención quirúrgica.<sup>42,43</sup> Los resultados se superponen con los ya publicados por nosotros anteriormente.

La reactividad cutánea, considerando grupos histopatológicos de Dukes de forma aislada y sus variaciones operatorias, demuestra una reacción hipoérgica en el período posoperatorio inmediato (como ya es bien conocido dentro de este tipo de cambios producidos por la cirugía)<sup>44,45</sup> que se recupera al mes de la intervención. Dichas variaciones concuerdan asimismo con resultados de trabajos anteriores en el mismo sentido, sin que sean objeto fundamental del estudio del presente trabajo.<sup>45,46</sup> Cuando comparamos los resultados de cada grupo con los de un grupo control de personas sanas, se aprecian diferencias significativas en el grado de reactividad.

Estas diferencias son tanto mayores cuanto más avanzado es el estadio histopatológico del tumor, en sentido de descenso del índice numérico de reactividad.

Esa comparación de los valores preoperatorios, sin las variaciones derivadas del acto quirúrgico y considerando cada grupo tumoral así como su significación, puede originarse no exclusivamente en la progresión tumoral sino en un conjunto de variables tales como el estado nutricional, la situación general e inmune del paciente o procesos intercurrentes, bien debidos a la propia enfermedad ó relacionados con ella. A pesar de ello, consideramos que la determinación va a registrar de forma global el resultado final de estas interacciones y su repercusión en la supervivencia final. Como se ha señalado, Jass y cols.<sup>10</sup> demostraron que el grado de infiltración linfocitaria tumoral es la única variable independiente que influye directamente en la supervivencia, aparte del estadio de Dukes, y que su valoración se encuentra sujeta a variaciones subjetivas y temporales. Por ello es importante poder disponer de un factor numérico que la exprese, bien de forma directa (no es el objeto del trabajo) o de forma indirecta, como lo hemos realizado. De aquí que el valor de la infiltración cutánea (linfocitaria) pueda constituir un dato pronóstico a ser tenido en cuenta.

La actividad linfocitaria y de sus subpoblaciones va a estar a su vez influenciada por una serie de factores: nutricionales,<sup>47-49</sup> infecciosos,<sup>50-52</sup> operatorios<sup>53-56</sup> y enfermedades asociadas.<sup>57-60</sup> La realización de pruebas cutáneas de sensibilidad retardada es una manera fácil y asequible de determinarla. Esta respuesta no es homogénea. Se han descrito diferencias poblacionales por factores puramente geográficos, sociales y alimentarios.

De aquí la importancia de contar con un grupo control en el medio en el que se vaya valorar este parámetro. La repercusión clínica y social de poder disponer de un método sencillo, que considere los factores de importancia pronóstica conocidos hasta la actualidad (estadio patológico e infiltración linfocitaria) son los que nos han orientado en la realización de este trabajo.

La probabilidad de mejorar la orientación pronóstica a los pacientes en estadios difíciles (B y sobre todo C) parece aumentar con el uso de un procedimiento sencillo como el expuesto. Según los resultados globales, la probabilidad de supervivencia a los 10 años es tanto mayor cuanto mayor sea la respuesta cutánea, como se comprueba al considerar sus resultados preoperatorios tal y como observamos anteriormente, y ello parece confirmarse en el seguimiento de la serie a 10 años. No es posible «cuantificar» el nivel de beneficio pronóstico, pero sí es posible concluir que a mayor reactividad cutánea preoperatoria existen mayores probabilidades de supervivencia a 10 años dentro del mismo estadio histopatológico.

Tal como se observó en los resultados a los 5 años de seguimiento, se puede afirmar que la reactividad cutánea de mediación inmunocelular proporciona información orientativa sobre la supervivencia a largo plazo en casos de cáncer colorrectal en estadios A y B, y fundamentalmente C de Dukes, y que el diseño de ensayos clínicos de tratamiento inmunoterápico en pacientes con cáncer colorrectal está justificado al existir evidencia científica suficiente de la mejoría de supervivencia.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. O'BRIEN MJ. Cáncer of the colon and rectum: current concepts of aethiology and pathogenesis, Br J Med Sci 1988. 157; 5-15.
2. ECHENIQUE ELIZONDO M, AMONDARAIN L, LIRON DE ROBLES C. El valor pronóstico de la

- reactividad cutánea retardada en la supervivencia a 5 años en el cáncer colorrectal, *Rev Esp Enf Digest* 1995. 87;843-848.
3. DUKES CE. The classification on cancer of the rectum. *J Pathol Bacteriol* 1932. 35;323-329.
  4. KIRKLIN JW, DOCKERTY MB y WAUGH JM. The role of peritoneal reflection in the prognosis of carcinoma of the rectum and sigmoid colon, *Surg Gynecol Obstet* 1949, 88;326-330.
  5. ASTLER VB y COLLER FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum, *Ann Surg* 1954; 139;846-857.
  6. FISHER ER, ROBINSKY B, SASS R, FISHER B. Relative prognostic value of the Dukes and the Jass system in rectal cancer: Finding from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Projects, *Dis Col Rectum* 1989. 32;944-949.
  7. AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER. Manual for staging cancer. J.B. Lippincott Ed. Philadelphia. 1983.
  8. PHEILS MT, BARNETT JE, NEWLAND R, MC PHERSON J. Colorectal carcinoma: A prospective clinicopathological study, *Med J Aust* 1976. 1;17-21.
  9. TERRAZAS J, VAL-BERNELL J y BUELTA L. Staging of carcinoma of colon and rectum, *Surg Gynecol Obstet* 1987, 165;255-259.
  10. JASS JR, ATKIN WS, CRUZICK J, BUSSEY HJ, MORSON BC, NORTHOVER JM, et al. The grading of rectal cancer: historical perspectives and a multivariate analysis of 447 cases, *Histopathology* 1986. 10;437-459.
  11. DIAZ AGUIRREGOITIA FJ, GARCIA-ALONSO I, ITURBURU I, PORTUGAL PORRAS V, ALONSO VARONA A, ECHEVERRÍA GARCIA-SANFRECHOSO A. et al. Valor pronóstico del ADN nuclear en 106 tumores colorrectales medido por microespectrofotometría. *Rev Esp Enf Digest* 1993. 83;421-428.
  12. ARMITAGE NCM, BALLANTYNE KC, SHEFFIELD JP, CLARKE P, EVANS DF, HARDCASTLE JD. A prospective evaluation of the effect of tumor-cell DNA content on recurrence in colorectal cancer. *Cáncer* 1991. 67;2599-2604.
  13. HIDDEMAN W, VON BASEWITZ DB, KLEINEMEIER HJ et al. DNA stem-line heterogeneity in colorectal cancer. *Cáncer* 1986. 58;258-263.
  14. GOMEZ-ALONSO A, GARCIA J y ORFAO DE MATOS A. El análisis de ADN mediante citometría de flujo en patología colorrectal maligna. *Cir Esp* 1991. 50;132- 136.
  15. BÖTTGER TC, GABBERT HE, STÖCKLE, M., WELLECK, S., HILS, R., HEINTZ, A. et al. DNA image cytometry: A prognostic tool in rectal cancer. *Dis Col Rectum* 1992. 35;436-443.
  16. TEMPLE WJ, SUGARBAKER EV, THORNWAITE JT, HENSLEY GT, KETCHAM AS. Correlation of cell-cycle analysis with Duke's staging in colon cancer patients. *J Surg Res* 1980. 28;314-318.
  17. KASHTAN H, PAPA MZ y STERN LS. Is age an independent variable in the morbidity and mortality of patients with colorectal cancer?. A prospective study. *Can J Surg* 1991. 34;374-376.
  18. KRASMA MJ, FLANCAUM L, CODY RD, SHEINBAUM S, ARI GB. Vascular and neural invasion in colorectal cancer: incidence and prognostic significance. *Cáncer* 1988. 61;1018-1023.
  19. RANKIN FW y BRODERS AC. Factors influencing prognosis in carcinoma of the rectum. *Surg Gynecol Obstet* 1928. 46;660-667.
  20. VAN DEN INGH HF, RUITER DJ, GRIFFOEN G, VAN MUIJEN S, FERRONE S. HLA antigens in colorectal tumors: low expression of HLA class I antigens in mucinous colorectal carcinomas. *Br J Cáncer* 1987. 55;125-130.
  21. MINTON JP, HOEHN JL, GERBER DM et al. Results of a 400 patients carcinoembryonic antigen second look colorectal cancer study. *Cáncer* 1985. 55;1284-1290.
  22. AVIRAM R, DEUTSH A, PATYA M et al. Biochemical tissue markers of human colorectal carcinoma. *Dis Col Rectum*. 1988. 3;176-180.
  23. MOORE, M., JONES, D.J., SCHOLFIELD, P.F., HARNDERN, D.O. Current status of tumor markers in large bowel cancer. *World J Surg* 1989. 13;52-59.
  24. CHAZELET C, BAUMEL H, DEIXONNE B, DAURES JM, SAISSI G. Prognostic factors of surgically-treated cancers of the right colon. Multifactorial analysis of 50 curative excisiones. *J Chir (Paris)* 1989.126;81-84.
  25. VOSE BM, GALLAGHER P, MOORE M, SCHOFFIELD PF. Specific and non-specific lymphocyte cytotoxicity in colon carcinoma. *Br J Cancer* 1981. 44;846-855.
  26. TRIOZZI PL, KIM JA, ALDRICH W, YOUNG DC, SAMPSEL JW, MARTIN EWJr. Localization of tumor reactive lymph node lymphocytes in vivo using radiolabeled monoclonal antibodies. *Cancer* 1994. 73;560-589.
  27. HOUSE AK, WATT AG. Survival and immune response in patients with carcinoma of the colorectum. *Gut* 1979. 20;868-874.
  28. BARBERA GUILLEM E, ARNOLD MW, NELSON MB, MARTIN EWJr. First result for resetting the antitumor immune response by immune corrective surgery in colon cancer. *Am J Surg* 1998. 176;339-343.
  29. NIERODA CA, ARNOLD MW, BARBERA-GUILLEM E, MARTIN EW. Lymphadenectomy in colorectal carcinoma. *Chirurg* 1998 .69;717-724.
  30. VERMORKEN JB, IAESSEN AM, van TINTEREN H, GALL HE, EZINGA R, MEIJER S et al. Active specific immunotherapy for stage I and stage III human colon cancer: a randomised trial. *Lancet* 1999. 353;345-350.
  31. KAHAN BD, PELLIS NR, RUTZKY LP, WISEMAN F, TOM BH. Active specific immunotherapy potential for treatment of large bowel cancer. *Cancer* 1977. 40;2740-2746.
  32. PATEL BT, LUTZ MB, SCHLAG P, SCHIRRMACHER V. An analysis of autologous T-cell anti-tumor responses in colon-carcinoma patients following active specific immunization. *Int J Cancer* 1992. 51;878-885.
  33. MARIC M, LIU Y. Cytotoxic T lymphocyte responses to a macrophage inflammatory protein 1-alpha-



- expressing tumor: linkage between inflammatory and specific immunity. *Cancer Res* 1999 . 5;5549-5553.
34. OHTANI H, NAITO Y, SAITO N, NAGURA H. Expression of costimulatory molecules B7-1 and B7-2 by macrophages along invasive margin of colon cancer: a possible antitumor immunity. *Lab Invest* 1997. 77;231-241.
  35. STAREN ED, ECONOMOU SG, HARRIS JE, BRAUN DP. Lymphokine-activated killer cell induction in tumor-infiltrating leukocytes from colon cancer patients. *Cancer* 1.989. 64;2238-224.
  36. JACOB L, SOMASUNDARAM R, SMITH W, MONOS D, BASAK S, MARINCOLA F et al. Cytotoxic T-cell clone against rectal cell carcinoma induced by stimulation of a patient's peripheral blood mononuclear cells with autologous cultured tumor cells. *Int J Cancer* 1997. 71;325-332.
  37. NIND AP, MATHEWS N, PHIL AEA, ROLLAND JM, NAIRN RC. Analysis of inhibition of lymphocyte cytotoxicity in human colon carcinoma. *Br J Cancer* 1975. 31;6220-629.
  38. DUKES CE y BUSSEY HJR. The spread of rectal cancer and its effect on prognosis. *Br J Cáncer* 1958. 12;309-320.
  39. ENKER WE, HEILWEIL HL, HERTZ RE. et al. En bloc pelvic lymphadenectomy and sphincter preservation in the surgical management of rectal cancer. *Ann Surg* 1986. 203;426-433.
  40. MICHELASSI F, BLOCK GE, VANNUCCI L, MONTAG A, CHAPPELL R. A 5 to 21 years follow-up and analysis of 250 patients with rectal adenocarcinoma. *Ann Surg* 1988. 206;379-389.
  41. CALVO SANCHO JJ, LAMATA FA, GARCIA GIL FA, LAGOS LIZAN J, CERDA R, ORTIZ SOLÓRZANO J, GONZALEZ GONZALEZ M. Cirugía del cáncer de recto. Aspectos terapéuticos y de supervivencia. Análisis retrospectivo de dos décadas. *Cir Esp* 1993. 54;423-429.
  42. CELAYA PEREZ S. Estudio de la relación entre presuntas variables antropométricas y bioquímicas de la nutrición y la respuesta inmune en el enfermo quirúrgico. Tesis Doctoral. Zaragoza. 1983.
  43. JAURRIETA E, SITGES SERRA A, SÁNCHEZ ORTEGA JM, SITGES CREUS A. Desnutrición e inmunodepresión preoperatoria. Factores de riesgo en cirugía mayor. *Cir Esp* 1981. 35;81-86.
  44. BROWN R, HAMID J, PATEL N. et al. The delayed hypersensitivity response as a prediction of outcome of surgical operation. Dogma disputed. *Br J Surg* 1980. 67;368-370.
  45. CAINZOS M, FERNANDEZ SEARA J, POTEJ JL. Pruebas de hipersensibilidad retardada en pacientes quirúrgicos y complicaciones sépticas postoperatorias. *Cir Esp* 1984. 38;48-52.
  46. RIBOLI EB, TERRIZZI A, ARNULFO G. et al. Immunosuppressive effect of surgery evaluated by the Multitest cell mediated immunity system. *Can J Surg* 1984. 27.19-25
  47. HEYS SD, PARK KGM, GARLICK PJ, EREMIN O. Nutrición y enfermedad neoplásica maligna. Sus implicaciones en la práctica quirúrgica. *Br J Surg* 1992. 79;614-623.
  48. DALY JM, DUDRICK SJ y COPELAND EM. Intravenous alimentation. Effect on delayed cutaneous sensitivity in cancer patients. *Ann Surg* 1980. 192;587-563.
  49. TWONEY P, ZIEGLER D, y DOMBEAU J. Utility of skin testing in nutritional assesement. A critical review. *J P E N* 1982. 6;50-58.
  50. MEAKINS JL, PIESTCH JB, BUBENICK O et al. Delayed hypersensitivity: Indication of acquired failure of host defenses in sepsis and trauma. *Ann Surg* 1977. 186;241-244.
  51. BJORKLHOLM M, HOLM G y MELLSTEDT H. No effect of delayed cutaneous hypersensitivity testing (Multitest) on blood lymphocyte count and function. *Acta Med Scand* 1983. 214;399-403.
  52. MC LEAN LD, MEAKINS JL, TAGUCHI K et al. Host resistance in sepsis and trauma. *Ann Surg* 1975. 182;207-217.
  53. FERNANDEZ SEARA J, CAINZOS M, POTEJ J, PUENTE DOMÍNGUEZ JL. Estudio de los posibles factores asociados con el estado de anergia y anergia relativa en pacientes quirúrgicos. *Cir Esp* 1984. 38;37-45.
  54. CAINZOS M, POTEJ JY, PUENTE JL. Valoración del estado de anergia con el Multitest(r) en pacientes quirúrgicos. *Rev Quir Esp* 1988. 15; 12-18.
  55. PIETSCH JB, MEAKINS JL y MC LEAN LD. Delayed hipersensitivity response: Application in clinical surgery. *Surgery* 1977. 82;349-355.
  56. GARCIA SABRIDO JL, MEDINA MC y QUINTANS A. Perfil inmunológico en pacientes quirúrgicos. *Cir Esp*. 1983. 37;353-355.
  57. JOHNSON WC, ULRICH F, MEGUID MM et al. Role of delayed hypersensitivity in predicting postoperative morbidity and mortality. *Am J Surg* 1979. 137;536-541.
  58. CHRISTOW NV, MEAKINS JL y MC LEAN LD. The predicted role of delayed hypersensitivity in preoperative patients. *Surg Gynecol Obstet* 1981. 152; 297-301.
  59. BOLTON DM, MANDEL AM, DAVIDSON JM. et al. Celular inmunity in cáncer: Comparison of delayed hypersensitivity test in three common cancers. *Br Med J* 1975.3;18-29.
  60. DOMINIONI L, DIONIGI R, DIONIGI D, NAZARI S, FOSSATI GS, PRATI V, TIBALDESCHI C, PAVASI F. Evaluation of possible causes of delayed hypersensitivity impairment in cancer patients. *J P E N* 1981. 5;300-306.

## LA HETEROGENEIDAD TERMICA ES UN MARCADOR PARA LA DETECCION DE LESIONES MALIGNAS SOLIDAS IN VIVO

Columnista Experto de SIIC  
Dr. Christodoulos Stefanadis



Profesor de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Atenas, Atenas, Grecia

Otro trabajo publicado: Stefanadis C, Chrysochoou C, Markou D, Petraki K, Panagiotakos DB, Fasoulakis C, Kyriakidis A, Papadimitriou C, Toutouzas PK: «Increased temperature of malignant urinary bladder tumors, in vivo; the application of a new method based on a catheter technique», *Journal of Clinical Oncology* 19(3):676-681, 2001

Atenas, Grecia (**especial para SIIC**)

Cuanto mayor es la diferencia de temperatura entre la lesión sospechosa y el tejido normal circundante, mayor es la probabilidad de que la lesión sea maligna.

### RESUMEN

El objetivo del estudio fue investigar la existencia de diferencias térmicas entre los tumores malignos y las lesiones inflamatorias benignas en el hombre y determinar si se correlacionan con la cuantificación de la angiogénesis tumoral. Para evaluar esta hipótesis se desarrolló en nuestro instituto un método in vivo basado en la termografía por catéter. Se calcularon las diferencias de temperatura entre el tumor sólido y un área normal ( $\Delta T$ ). El proyecto referido a vejiga incluyó a 8 pacientes con tumores benignos y 12 con tumores malignos según la histología de las biopsias. Hallamos diferencias significativas entre los  $\Delta T$  de pacientes con tumores benignos y con tumores malignos ( $p < 0.001$ ). También se hallaron diferencias en los valores medios del nivel de angiogénesis entre ambos tipos de tumores ( $p = 0.0261$ ) y una correlación positiva moderada entre este parámetro y el  $\Delta T$  ( $p = 0.02$ ). Mediante análisis de regresión logística se halló que un incremento de 1 grado en el  $\Delta T$  triplica el riesgo de que un paciente tenga un tumor maligno (*odds ratio* 2.91; intervalo de confianza 95%, 1.97 a 7.78;  $p < 0.001$ ), ajustado por el grado de angiogénesis ( $p = 0.0236$ ) y por el grado de tumor ( $p < 0.001$ ). Se determinó un valor umbral de  $\Delta T$  de 0.7 °C, con sensibilidad del 83% y especificidad del 75%.

Se obtuvieron resultados similares respecto de la asociación entre  $\Delta T$  y malignidad en los estudios sobre tumores pulmonares y del tracto gastrointestinal superior. Estos hallazgos sugieren que la diferencia calculada de temperatura entre el tejido normal y el área neoplásica podría ser un criterio útil para el diagnóstico de tumores malignos.

**Palabras clave:** termografía, malignidad, angiogénesis.

### ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the existence of any thermal difference between malignant tumors and inflammatory benign lesions of the human and to determine whether it correlates with tumor angiogenesis quantification. In order to test this hypothesis a new in vivo, method, was developed in our institute, based on a thermography catheter. We calculated the differences of the temperature of the solid tumor and of a normal area ( $\Delta T$ ). In the "urinary bladder" project 8 patients had benign tumor (40%) and 12 had malignant tumor (60%), according the biopsy histology. We found significant differences of  $\Delta T$  between patients with benign and malignant tumor ( $P$ -value  $< 0.001$ ). Also, differences were found for the mean values of angiogenesis level between malignant and benign tumors ( $P$ -value = 0.0261) and a moderated positive correlation was estimated between the degree of angiogenesis and  $\Delta T$  ( $P$ -value = 0.02). Based on logistic regression analysis we found that one-degree increase of  $\Delta T$  triples the odds of a patient having a malignant tumor [OR = 2.91; 95% CI, 1.97 to 7.78;  $P$ -value  $< 0.001$ ], adjusted for the degree of angiogenesis ( $P$ -value = 0.0236) and the grade of tumor ( $P$ -value  $< 0.001$ ). A threshold point of  $\Delta T = 0.7$  °C was determined, with sensitivity 83% and specificity 75%. Similar results, regarding the association between  $\Delta T$  and malignancy, were observed in the «upper gastrointestinal» and «lung» projects. These findings suggest that the calculated difference of temperature between normal tissue and neoplastic area could be a useful criterion in the diagnosis of malignancy in tumors.

**Key words:** thermography, malignancy, angiogenesis.

### INTRODUCCION

Hay un cúmulo de evidencias que sugiere que el aumento del flujo sanguíneo,<sup>1</sup> la angiogénesis<sup>2,3</sup> y la inflamación se asocian frecuentemente con la transformación maligna de los tumores sólidos, aunque su relación exacta sigue siendo poco clara. Se denomina angiogénesis a la formación de nuevos capilares a partir del lecho vascular existente. En condiciones normales, este proceso estrechamente regulado ocurre sólo durante el

desarrollo embrionario, el ciclo reproductivo femenino y la curación de heridas. En cambio, la angiogénesis se torna persistente en procesos patológicos tales como el crecimiento maligno, la aterosclerosis<sup>4,5</sup> y la retinopatía diabética, a causa del desequilibrio en la interrelación de señales regulatorias positivas y negativas que controlan el proceso.<sup>6,7</sup> Actualmente se cree que la interacción secuencial de las células neoplásicas con esta hipervascularización de la submucosa es uno de los pasos más significativos en la metástasis.<sup>8-10</sup> Por otra parte, varios investigadores han evaluado a la angiogénesis como un predictor independiente de la supervivencia en pacientes con carcinoma invasivo de la vejiga.<sup>8,9,11</sup> La hipertermia regional de un tumor maligno parece reflejar este proceso y varios expertos han utilizado ecografía<sup>12</sup> u otros métodos<sup>13-18</sup> que demuestran el aumento de flujo sanguíneo dentro del tumor maligno. Se han hecho intentos de revelar cáncer de vejiga oculto *in vivo* mediante la detección de fluorescencia del naranja de acridina, hematoporfirina y tetraciclina.<sup>16,17</sup> Desafortunadamente, la poca calidad de los resultados obtenidos fue la principal razón para el abandono de esas técnicas. En cambio, nunca se intentó la medición directa de la temperatura local de los tumores en el cuerpo humano *in vivo* con fines diagnósticos. El objetivo del presente estudio fue investigar la existencia de diferencias térmicas entre los tumores malignos y las lesiones inflamatorias benignas de la vejiga, el tracto gastrointestinal superior y el pulmón y determinar si tales diferencias se correlacionan con la cuantificación de la angiogénesis tumoral.

## METODOS

- **Pacientes.** Para evaluar la utilidad diagnóstica de la técnica de medición térmica, ésta fue aplicada a:
  - a. 20 individuos con hematuria,<sup>19</sup>
  - b. 54 personas sometidas a examen endoscópico por presentar síntomas del tracto gastrointestinal superior<sup>20</sup>
  - c. 20 individuos sometidos a broncoscopia para evaluar una lesión pulmonar sospechosa detectada por otros métodos (radiografía, tomografía computada)

En el caso de la vejiga, es muy común la inserción de agua durante la resección transuretral del tumor. Este lavado del tracto urinario puede influir sobre los resultados de la termografía, por lo que tratamos de eliminar el lavado del tracto urinario y de mantener una temperatura constante del agua. Además, esperamos 2 minutos antes de las mediciones térmicas, de manera de estabilizar la temperatura del agua dentro del tracto urinario. Se obtuvieron en cada paciente biopsias y excisiones de rutina.

Todos los participantes habían sido informados acerca del propósito del estudio, la metodología usada y el procedimiento; además firmaron un consentimiento escrito, conforme a los principios bioéticos en investigación médica y la declaración de Helsinki (revisada en 1983). En todos los casos el procedimiento fue breve y sin complicaciones.

- **Catéter de termografía.** Para medir la temperatura local de los tumores vesicales se usó una nueva técnica con catéter desarrollada en nuestro instituto.

Basándonos en la experiencia previa con un catéter termográfico especial para la detección *in vivo* de heterogeneidad térmica en las arterias coronarias ateroscleróticas humanas,<sup>21,22</sup> diseñamos un catéter modificado compatible con el citoscopio, con las características descritas previamente.<sup>19</sup> En el caso de la temperatura local del epitelio gástrico, se diseñó un catéter modificado compatible con el gastroscopio. El catéter de poliuretano tiene un diámetro 3F y porta la misma sonda unida a su parte distal.<sup>20</sup> Por último, en el caso del epitelio bronquial diseñamos un catéter termográfico direccionable compatible con el broncoscopio. El catéter de poliuretano tiene un diámetro 4F con la sonda térmica unida a su parte distal. La punta distal del catéter (10 cm de longitud) es flexible y puede ser curvada en un ángulo de hasta 90 grados. La configuración de esta porción del catéter puede ser cambiada por manipulación externa del brazo de dirección unido al extremo proximal del mango.

- **Procedimiento.** El catéter termográfico fue insertado a través del orificio de biopsia del endoscopio. En el caso del epitelio urinario y bronquial, la parte distal del catéter con la sonda fue guiada mediante manipulación externa del mecanismo de direccionamiento, lo cual permitió ponerla en contacto con la lesión de interés. La sonda térmica se puso en contacto con 2 puntos en el centro del tumor, donde el tejido está más vascularizado. En el caso de los tumores papilares la sonda se puso en contacto con la porción exofítica. Cada parte de la lesión contactada con la sonda fue extraída para evaluación por biopsia. La temperatura del tumor fue calculada como el promedio de 2 mediciones. La sonda fue puesta en contacto con 2 sitios de la mucosa normal (según el examen endoscópico) en un área ubicada entre 3 y 5 cm por fuera de la circunferencia del tumor y fuera de los límites de toda área sospechosa. Aunque el examen endoscópico revelara un tejido vesical normal, tomamos especímenes para biopsia del área contactada por la sonda para excluir la existencia de carcinoma *in situ* o lesión inflamatoria. Se calculó el valor promedio de temperatura medida en 2 sitios del epitelio normal.

- **Histopatología.** En la histopatología los tumores malignos fueron clasificados según los criterios de la Organización Mundial de la Salud.<sup>23</sup> La densidad de los microvasos (capilares y pequeñas venas) fue evaluada en áreas con morfología de tumor sólido lejos de todo artefacto diatérmico. No fue posible la medición precisa de la vascularidad de los tumores papilares dado que cada estructura papilar contiene su propio núcleo

fibrovascular. El recuento de vasos se realizó en las 3 áreas de máxima neovascularización, donde se observaba el mayor número de microvasos discretos teñidos. Estas regiones fueron identificadas por microscopía a bajo aumento (2x10 o 4x10). Luego se realizó el recuento de vasos en esas áreas con un objetivo 20X y un ocular 10X, cubriendo un área de 0.74 mm<sup>2</sup>, y se calcularon los promedios. Habitualmente los vasos sanguíneos tienen distribución heterogénea dentro de un tumor en particular. En nuestro estudio contamos la densidad de microvasos de muestras de tumores y lesiones, con lo cual pudimos no haber apreciado la expansión real de la neovascularización.

- **Análisis estadístico.** En todos los casos los cálculos estadísticos se basaron en métodos no paramétricos (prueba de Wilcoxon y criterios de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis) y en análisis de regresión logística exacta debido al escaso número de muestras. Se realizó análisis univariado y tablas de contingencia para evaluar cualquier dependencia entre los tumores malignos y otras variables categóricas. Los valores de p fueron calculados con la prueba exacta de Fisher, ya que las frecuencias celulares eran muy pequeñas como para que la prueba del  $\chi^2$  fuera precisa. Se construyó un modelo de regresión logística con análisis escalonado para valorar el efecto de los cofactores en la posibilidad de diagnosticar un tumor maligno y para calcular los correspondientes *odds ratio* (OR). Mediante los desvíos residuales se evaluó la bondad del ajuste al modelo. Por último, se realizó un análisis de valores de corte para determinar cambios significativos de temperatura ( $\Delta T$ ). Los valores de los factores continuos se presentan como intervalos de confianza del 95% (IC 95%) y las variables categóricas como frecuencias relativas. Todos los valores de p informados son exactos, calculados a 2 ramas y comparados con un nivel de significación del 5%.

## RESULTADOS

En el caso de las lesiones vesicales se estudiaron 16 varones y 4 mujeres con una edad promedio de 72.5 años (IC 95%, 68.5-76.4). De acuerdo con la histología de la biopsia, 8 de los pacientes (40%) tenían tumores benignos y 12 (60%) tenían tumores malignos. Cuatro de los tumores malignos (33%) eran grado I, 5 (42%) eran grado II y 3 (25%) eran grado III. Se hallaron diferencias significativas entre los valores medios del nivel de angiogénesis. Específicamente, los pacientes con tumores benignos tuvieron un valor medio de 40.25 (IC 95%, 37.8-42.7) y los pacientes con tumores malignos tuvieron un valor medio de 53.3 (IC 95%, 43.8-63.8). Esta diferencia fue significativa ( $p = 0.0261$ ). La relación entre el nivel de angiogénesis y el grado tumoral tuvo una significación marginal ( $p = 0.07$ ). Se calcularon 2 temperaturas en el tejido tumoral y el tejido proximal normal. La temperatura del tejido urinario normal fue calculada como la media de 2 mediciones, aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambas ( $p = 0.780$ ). La temperatura en el tejido tumoral vesical también fue calculada como la media de 2 mediciones a pesar de no haber diferencia significativa entre ambas ( $p = 0.730$ ). Todos los pacientes presentaban mayor temperatura en el tejido tumoral que en el tejido normal. Nuestro análisis demostró una diferencia estadísticamente significativa para el  $\Delta T$  entre los pacientes con tumores malignos y aquellos con tumores benignos (tabla 1).

TABLA 1. Estadística descriptiva para el  $\Delta T$  y grado de angiogénesis, estratificados por malignidad.

Diferencias de temperatura ( $\Delta T$ )	Pacientes con tumor benigno	Pacientes con tumor maligno	p*
Media	0.40	1.37	0.0022
Error estándar	0.014	0.184	
Intervalo conf. 95%	0.37 a 0.44	0.96 a 1.78	
Angiogénesis	Pacientes con tumor benigno	Pacientes con tumor maligno	p*
Media	40.25	53.33	0.0261
Error estándar	1.03	4.315	
Intervalo conf. 95%	37.81 a 42.68	43.83 a 62.83	

\* Sobre la base del criterio de Mann - Whitney

Además, hallamos que no existe relación entre  $\Delta T$  y la penetración del corion o la capa muscular ( $p = 0.71$  y  $p = 0.54$ , respectivamente). Más aún, encontramos una correlación positiva moderada entre el grado de angiogénesis y  $\Delta T$  ( $p = 0.50$ ,  $p = 0.02$ ), lo cual indica que un mayor grado de angiogénesis se corresponde con una mayor diferencia de  $\Delta T$  entre las 2 localizaciones (tabla 2).

TABLA 2. Estadística descriptiva para el  $\Delta T$  entre diferentes niveles de grado tumoral.

$\Delta T$	Benigno	Grado I	Grado II	Grado III	p*
Media	0.48	0.82	1.68	1.59	0.029
Error estándar	0.06	0.26	0.21	0.38	
Intervalo conf. 95%	0.32 to 0.62	-0.02 to 1.65	1.08 to 2.27	-0.05 to 3.24	

\* Sobre la base del criterio de Kruskal-Wallis.

Los resultados del modelo logístico indican que valores de  $\Delta T$  mayores a 1 °C pueden estimar con gran precisión un tumor maligno. Específicamente, un aumento de 1 °C en  $\Delta T$  triplica el riesgo de que un paciente tenga un tumor maligno (OR = 2.91; IC 95%, 1.97-7.78;  $p < 0.001$ ). No se halló una interacción significativa entre el efecto principal, es decir el  $\Delta T$ , y el grado de tumor o la angiogénesis ( $p = 0.79$  y  $p = 0.87$ , respectivamente). Finalmente, el análisis de valores de corte demostró que las diferencias de temperatura superiores a 0.7 °C pueden discriminar un tumor maligno con gran precisión. La sensibilidad para ese punto de corte fue del 83% y su especificidad del 75%. También fueron elevados los valores predictivos positivo (83%) y negativo (75%). Este resultado refuerza la capacidad diagnóstica del procedimiento propuesto. El área bajo la curva ROC (*receiver operating characteristic*) fue igual a 0.92 y altamente significativa comparada con la prueba de Wilcoxon ( $p < 0.001$ ), lo cual refuerza el objetivo principal del estudio, es decir el examen del papel del  $\Delta T$  en el diagnóstico de un tumor maligno.

En el caso de las lesiones gástricas, el estudio incluyó a 35 varones ( $56 \pm 10$  años) y 19 mujeres ( $68 \pm 7$  años). Los estudios de histopatología indicaron que 8 participantes tenían hiperplasia; 19, gastritis leve a moderada (13, gastritis activa crónica moderada a grave; 3, gastritis leve con áreas atróficas espontáneas; y 3, gastritis grave con metaplasia intestinal); 9, úlcera; 7, displasia; y 11, adenocarcinoma (6, invasivo difuso; y 5, diferenciación mediana a alta según la clasificación de Lauren). Se hallaron diferencias significativas de temperatura entre el tejido normal y la lesión en el caso de la gastritis ( $p = 0.045$ ), las úlceras ( $p = 0.035$ ), la displasia ( $p = 0.014$ ) y el cáncer ( $p = 0.005$ ). El pico observado no fue significativo en el caso de las lesiones hiperplásicas ( $p = 0.134$ ). El análisis demostró incrementos progresivos de  $\Delta T$  entre grupos de lesiones gástricas ( $p < 0.001$ ). Los valores de  $\Delta T$  se relacionaron significativamente con el nivel de angiogénesis ( $r = +0.32$ ,  $p = 0.020$ ). Además, el nivel de angiogénesis exhibió una asociación débil con los grupos de lesiones gástricas (prueba de  $\chi^2 = 7.14$ ;  $p = 0.128$ ). En base a los hallazgos previos, se ajustó un modelo de regresión logística para mostrar que, luego de ajustar por el nivel de angiogénesis, la diferencia de temperatura era un marcador significativo para la discriminación de lesión maligna de benigna [ $\ln(\text{OR}) = 4.096$ ; IC 95%, 2.94-6.43;  $p < 0.001$ ]. El análisis de valor de corte demostró que las diferencias de temperatura superiores a 1.7 °C constituyen un punto crucial que discrimina con precisión una lesión displásica de una lesión benigna. En particular, 13 de los 18 pacientes con tumores malignos tuvieron  $\Delta T$  superiores a 1.7 °C (es decir una sensibilidad del 72%) y 34 de los 36 pacientes con tumores benignos, gastritis o úlceras tuvieron un  $\Delta T$  menor a 1.7 °C (es decir una especificidad del 94%, con un área bajo la curva ROC de 0.846,  $p < 0.001$ ) (tabla 3).

TABLA 3. Diferencias de temperatura y niveles de angiogénesis (media  $\pm$  desvío estándar) según el tipo de lesión.

Tipo de lesión	Casos	Diferencias de temperatura ( $\Delta T$ ) (°C)	Angiogénesis (recuento de microvasos)
Hiperplasia	8	0.75 $\pm$ 0.39	44.2 $\pm$ 37.4
Gastritis	19	1.19 $\pm$ 0.21	78.2 $\pm$ 24.4
Úlcera	9	1.44 $\pm$ 0.29	82.8 $\pm$ 28.5
Displasia	7	1.60 $\pm$ 0.48	83.0 $\pm$ 18.6
Adenocarcinoma	11	2.20 $\pm$ 0.55	83.1 $\pm$ 51.0

El estudio sobre lesiones pulmonares incluyó a 12 pacientes con inflamación crónica y 10 con tumores malignos infiltrados (6 de ellos con cáncer de pulmón a células no pequeñas). Ninguno de estos enfermos se hallaba bajo tratamiento con drogas quimioterapéuticas o inmunosupresoras y todos tuvieron temperatura corporal normal durante la broncoscopia. Los  $\Delta T$  medios fueron 0.71  $\pm$  0.65 °C en los pacientes con inflamación crónica y 1.23  $\pm$  0.45 °C en los pacientes con tumores malignos ( $p < 0.01$ ). Finalmente, el análisis de valores de corte demostró que  $\Delta T$  mayores a 1.05 °C constituyen un punto óptimo para discriminar con precisión lesiones malignas de



benignas (sensibilidad 64%; especificidad 91%; área bajo la curva ROC = 0.851;  $p < 0.001$ ).

## DISCUSION

En nuestro instituto, en concordancia con el desarrollo de otros catéteres cardíacos y vasculares, desarrollamos una técnica basada en catéteres para la medición de temperatura de los tumores vesicales sólidos *in vivo*. Se halló que la diferencia térmica entre el área tumoral y la pared proximal normal es mayor en los tumores malignos que en los benignos o en las lesiones hiperplásicas, y que el aumento de esta diferencia de temperatura se asocia significativamente con la malignidad. En particular, la diferencia de 1 °C entre el tejido normal y la lesión sospechosa triplica el riesgo de que un paciente tenga un tumor maligno en la vejiga, cuatruplica el riesgo de tener una lesión gástrica maligna y sextuplica el riesgo de malignidad de las lesiones pulmonares.

Los estudios previos *in vivo*, realizados en los años 80, trataron de demostrar lesiones cancerosas y precancerosas planas en la vejiga mediante la inyección intravenosa de fluoresceína para revelar la neoangiogénesis submucosa.<sup>24,25</sup> Desafortunadamente, los resultados fueron desalentadores. En nuestros estudios, la cuantificación de la microvascularidad mediante el recuento por campos reveló que la neoangiogénesis puede ser un marcador de lesión neoplásica, aunque también existe un nivel importante de actividad angiogénica en las lesiones benignas.<sup>6</sup> Esta conclusión se desprende de los estudios de otros investigadores, en los que no se hallaron diferencias significativas en la densidad microvascular entre las lesiones preneoplásicas y las lesiones neoplásicas de baja malignidad.<sup>26</sup> Aunque muchos investigadores han publicado también hallazgos termográficos en el diagnóstico del cáncer,<sup>13,14</sup> nunca se había intentado la medición directa *in vivo* con fines diagnósticos de la temperatura local de tumores del árbol bronquial. Más aún, en algunos casos las lesiones displásicas o preneoplásicas de la submucosa siguen siendo difíciles de diagnosticar mediante examen endoscópico en la práctica clínica. La heterogeneidad térmica que hemos detectado se incrementa progresivamente de las lesiones benignas a la malignidad, lo cual indica el involucramiento del aumento de temperatura. Esto sugiere que en estas patologías coexisten procesos fisiopatológicos comunes. La elevada especificidad de la técnica refleja su capacidad para distinguir una lesión bronquial maligna durante la broncoscopia convencional. El uso de un catéter termográfico direccionable confiere la capacidad de medir la temperatura de lesiones que son difíciles de detectar durante la endoscopia convencional.

En conclusión, la técnica *in vivo* sugerida podría ser útil para identificar lesiones precancerosas y para evaluar el pronóstico de los tumores vesicales malignos mediante la detección de heterogeneidad térmica en un área sospechosa proclive a la transformación neoplásica, antes de que la lesión pueda ser detectable por citoscopia convencional.

## BIBLIOGRAFIA

1. Feldmann HJ, Molls M, Vaupel P: Blood flow and oxygenation status of human tumors. Clinical investigations. *Strahlenther Onkol* 175:1-9, 1999
2. Dickinson AJ, Fox SB, Persad RA, et al: Quantification of angiogenesis as an independent predictor of prognosis in invasive bladder carcinomas. *Br J Urol* 74:762-766, 1994.
3. Philp EA, Stephenson TJ, Reed MWR: Prognostic significance of angiogenesis in transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. *Br J Urol* 77:352-357, 1996
4. Isner JM: Cancer and atherosclerosis. The broad mandate of angiogenesis. *Circulation* 99:1653-1655, 1999
5. Luo CY, Ko WC, Tsao CJ, et al: Epstein-Barr virus-containing T-cells lymphoma and arteriosclerotic abdominal aortic aneurysm in a young adult. *Hum Pathol* 30:1114-1117, 1999
6. Arnold F: Exploiting angiogenesis. *The Lancet* 337:865-866, 1991
7. Malonne H, Langer I, Kiss R, et al: Mechanisms of tumor angiogenesis and therapeutic implications: angiogenesis inhibitors. *Clin Exp Metastasis* 17:1-14, 1999
8. Weidner N, Semple JP, Welch WR, et al: Tumor angiogenesis and metastasis- correlation in invasive carcinoma. *N Engl J Med* 324:1-8, 1991
9. Meitar D, Crawford SE, Rademaker AW, et al: Tumor angiogenesis correlates with metastatic disease, N-myc amplification, and poor outcome in human neuroblastoma. *J Clin Oncol* 14:405-414, 1996
10. Canete A, Navarro S, Bermudez J, Pellin A, Castel V, Llombart-Bos: Angiogenesis in neuroblastoma :relationship to survival and prognostic factors in a cohort of neuroblastoma patients *J Clin Oncol* 2000 Jan;18(1):27-34
11. Crew JP, O'Brien T, Bradburn M, et al: Vascular endothelial growth factor is a predictor of relapse stage progression in superficial bladder cancer. *Cancer Res* 57:5281-5285, 1997
12. Edell SI, Eisen MD: Current imaging modalities for the diagnosis of breast cancer. *Del Med J* 71:377-382, 1999
13. Head JF, Elliott RL: Thermography. Its relation to pathologic characteristics, vascularity, proliferation rate, and survival of patients with invasive ductal carcinoma of the breast. *Cancer* 79:186-188, 1999
14. Beldermann SC, Frey H, Reinhardt S, et al: Diagnosis of blood flow in breast tumors with increased blood pressure. New possibility in tumor field diagnosis. *Radiology* 37:643-650, 1997
15. Gasparini G, Harris AL: Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma: much more than a new prognostic tool *J Clin Oncol* 1995;13(3):765-82
16. Koss LG, Melamed MR, Ricci A, et al: Carcinogenesis in human urinary bladder: Observation after exposure to para-aminodiphenyl. *N Engl J Med* 272:767-770, 1965
17. Fukui I, Yokokawa M, Mitani G: In vivo staining test with methylene blue for bladder cancer. *J Urol* 130:252-255, 1983

18. Devonec M, Lenz P, Bouvier R, et al: Clinically occult bladder cancer diagnosis, Trial using ultraviolet cystoscopy. *Cancer* 55:468-471, 1985
19. Stefanadis C, Chrysochoou C, Markou D, Petraki K, Panagiotakos DB, Fasoulakis C, Kyriakidis A, Papadimitriou C, Toutouzas PK. Increased temperature of malignant urinary bladder tumors, in vivo; the application of a new method based on a catheter technique. *J Clin Oncol.* 2001; 19(3): 676-681.
20. Stefanadis C, Chrysochoou C, Paraskevas E, Panagiotakos DB, Xynopoulos D, Dimitroulopoulos D, Petraki K, Papadimitriou C, Karoutsos K, Pitsavos C, Toutouzas PK. Thermal Heterogeneity Constitutes A Marker For The Detection Of Malignant Gastric Lesions, In Vivo. *J Clin Gastroenterology* 2003; (in press)
21. Stefanadis C, Toutouzas P: In vivo local thermography of coronary artery atherosclerotic plaques in humans. *Ann Intern Med* 129:1079-1080, 1998
22. Stefanadis C, Diamantopoulos L, Vlachopoulos C, et al: Thermal heterogeneity within human atherosclerotic coronary arteries detected in vivo. *Circulation* 99:1965- 1971, 1999
23. World Health Organization. *Histological Typing of Urinary Bladder Tumors. International Classification of Tumors.* Geneva: WHO, 1973.
24. Fukui I, Yokokawa M, Mitani G: In vivo staining test with methylene blue for bladder cancer. *J Urol* 130:252-255, 1983.
25. Devonec M, Lenz P, Bouvier R, et al: Clinically occult bladder cancer diagnosis, Trial using ultraviolet cystoscopy. *Cancer* 55:468-471, 1985.
26. Shahabuddin S, Arnold F, Costello CB, et al: Tumor angiogenesis factor in urological cancers. *Br J Urol* 56:490-494, 1984.

## LAS MUTACIONES DEL GEN p53 EN EL LINFOMA DE BURKITT

Dra. Claudete Esteves Klumb

Médica del Servicio de Hematología y del Laboratorio de Hematología Celular y Molecular. Hospital do Câncer. Instituto Nacional do Câncer.

Último trabajo publicado: *p53 gene analysis in childhood B non-Hodgkin's lymphoma*, São Paulo Medical Journal 119(6):212-215, 2001.

Río de Janeiro, Brasil (**especial para SIIC**)

Los niños que padecen linfoma de Burkitt presentan a menudo mutaciones en el gen *p53*, según explicó la **doctora Claudete Esteves Klumb** en una entrevista concedida al **doctor Santiago Pavlovsky** y a la **doctora Isabel Giere**. El **doctor Pavlovsky** es el Director Médico del Centro de Internación e Investigación Angélica Ocampo, de FUNDALEU, en Buenos Aires, Argentina. Forma parte del Consejo Superior del Programa de Educación Médica Continuada de SIIC (PEMC-SIIC), y ha publicado numerosos trabajos como Columnista Experto, entre los cuales se destaca "Tratamiento de la leucemia mieloblástica aguda del adulto" (<http://www.siicsalud.com/dato/dat026/01o15039.htm>). La **doctora Giere** es la Jefa del Laboratorio de Citogenética y Biología Molecular de FUNDALEU.

La **doctora Esteves Klumb** y su equipo de colaboradores evaluaron las mutaciones en el gen *p53*, en un grupo de pacientes con linfoma de Burkitt. Este tipo de alteraciones, explicó la investigadora, son las más frecuentemente observadas en las neoplasias, incluyendo el cáncer de mama, el de pulmón y el intestinal.

La investigación incluyó a 12 niños que padecían esta enfermedad. Las mutaciones genéticas fueron evaluadas mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa.

Los expertos observaron la presencia de mutaciones en 4 de los pacientes, dos de los cuales fallecieron a causa de la enfermedad. La **doctora Esteves Klumb** explicó, en su diálogo con **SIIC**, las consecuencias de este hallazgo.

La experta ha publicado anteriormente trabajos científicos en las revistas *Experimental and Clinical Cancer Research*, *Medical and Pediatric Oncology* y *Revista Brasileira de Cancerologia*, entre otras.

### **SIIC: Doutora Esteves Klumb, qual é a importância das mutações do gene p53 nos tumores em humanos?**

Dra. Claudete Esteves Klumb: Oncogenes e genes supressores de tumor têm sido associados a diferentes tipos de neoplasias, sendo o gene *p53* o que com maior frequência apresenta alterações. Este gene localiza-se no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1) e codifica uma fosfoproteína nuclear de 53 kD que contém 393 aminoácidos. Esta proteína é capaz de se ligar a seqüências específicas do DNA sendo um fator de transcrição que controla de forma positiva ou negativa a expressão de diversos genes envolvidos em várias vias celulares. Dentre as vias mais importantes se destacam a inibição da replicação do DNA, funcionando como uma molécula de *check point* da progressão da célula no ciclo celular da fase G1 para a fase S, e também da fase G para fase M. Desta forma, é garantida a manutenção da integridade do genoma e o controle da proliferação celular.

Ao contrário dos outros genes supressores de tumor que são inativos por perda alélica, o gene *p53* distingue-se pela alta frequência de mutações. A maioria dessas mutações é do tipo *missense* (troca de um nucleotídeo) e alteram a função normal da proteína p53. Como resultado de mutações pontuais a proteína tem sua meia vida aumentada e se acumula nas células tumorais.

Também, embora em menor frequência, as mutações podem ser do tipo *nonsense* em virtude de deleções de porções do gene ou inserção de nucleotídeos. Este tipo de mutação pode levar a um *stop codon* (parada da leitura do RNA mensageiro) alterando a proteína e, em última análise, a ocorrência de uma proteína truncada. Em síntese, a inativação da proteína p53 por mutação, perda, seqüestração ou ligação a outras proteínas como proteínas virais, pode levar ao aumento da proliferação, instabilidade genômica e perda de importantes mecanismos de controle do ciclo celular.

### **SIIC: Qual é a característica dos pacientes estudados?**

C.E.K.: No estudo publicado na revista *São Paulo Medical Journal*, foram estudadas 12 crianças com diagnóstico de linfoma de Burkitt, com idade até 15 anos (mediana de 5.5 anos).

Houve predominância do sexo masculino com relação de 2:1. Com relação ao sítio inicial de doença, a maioria dos pacientes apresentaram comprometimento abdominal (66.6%) manifestado pela presença de massa abdominal associada ou não com ascite caracterizando um estágio mais avançado da doença (Estágio III).

**SIIC: Foi realizado estudo citogenético nesses pacientes? Neste caso, foi observada alguma associação dos resultados citogenéticos e a evolução clínica?**

C.E.K.: Nesta série o material estudado foi exclusivamente tumor incluído em parafina. A citogenética para pesquisa da translocação 8;14 ou suas variantes não foi realizada por falta de material fresco para tal análise. Também não foi realizada por hibridização *in situ* fluorescente (FISH).

O FISH combina a especificidade e sensibilidade da hibridização de ácidos nucleicos com a informação citogenética. Tem a vantagem sobre as técnicas tradicionais de citogenética pela possibilidade de estudar as células em interfase eliminando a necessidade de culturas de células.

A deleção do locus 17p53 não foi avaliada no nosso estudo, entretanto, em linhagens celulares derivadas de pacientes com linfoma de Burkitt (LB) foi observado que ambos os alelos normais foram perdidos ou ambos apresentavam mutações pontuais. As linhagens celulares do LB que apresentam mutações têm maior resistência à radioterapia quando perdem o alelo normal não mutado.

Na série de pacientes de Preudhorne e colaboradores foi detectada persistência de um alelo normal na maioria dos pacientes com LB e mutações do *p53*. A perda do alelo normal em linhagens celulares sugere que este é um evento tardio na evolução do LB, principalmente em pacientes em recidiva e, pode estar relacionada à ausência de resposta à quimioterapia observada nesses pacientes.

**SIIC: A frequência de mutações observada no exon 6 e 7 é semelhante a descrita por outros autores?**

C.E.K.: Até o momento os dados fornecidos pelo banco de dados da *International Agency for Research on Cancer (IARC)* computam 16 285 mutações somáticas do gene *p53* descritas. Destas, 103 mutações foram detectadas no LB. Os codons mais frequentemente mutados foram: codon 248 (exon 7), 213 (exon 6) e 273 (exon 8), em ordem decrescente de frequência.

Nosso estudo ainda é preliminar e está sendo estendido a um número maior de amostras mas, nosso achado inicial, sugere uma frequência semelhante a descrita anteriormente.

**SIIC: Qual é a importância da localização de lesões pontuais no gene *p53* com relação a resistência ou sensibilidade frente ao tratamento?**

C.E.K.: A influência da *p53* na sensibilidade da célula à irradiação ou agentes quimioterápicos cuja ação é a indução do dano ao DNA é controversa. Em alguns sistemas, a inativação da *p53* resulta em aumento da resistência, sugerindo que algumas vias que levam a morte celular são dependentes da *p53*. No entanto, em outros contextos a inativação da *p53* selvagem tem sido correlacionada ao aumento da sensibilidade a algumas drogas. O papel da *p53* na resistência a múltiplas drogas tem sido demonstrado por dados em que as mutações do gene *p53* levam ao aumento da resistência a agentes quimioterápicos devido a *up regulation* da expressão do gene MDR 1 (*Multi Drug Resistance*). Também neste caso, estudos mostrando correlação negativa e positiva têm sido publicados.

Embora a implicação da *p53* na regulação dos genes da resistência a drogas tais como MDR1, não esteja bem esclarecida, diversas evidências têm sido relatadas na literatura do papel da *p53* na indução da apoptose por drogas. Estes estudos enfatizam a necessidade de uma proteína *p53* funcional no processo de indução da apoptose por drogas e sugerem que a sua inativação pode levar a resistência. Como exemplo, podemos citar um estudo na linhagem HL60 (com mutação da *p53*) em que a restauração da proteína selvagem foi capaz de aumentar a sensibilidade dessas células a diversas drogas. É importante ressaltar que a sensibilidade pode variar entre os diferentes quimioterápicos e também foi demonstrado em linhagens celulares de câncer de ovário sensibilidade diminuída ao quimioterápico cisplatina após a inativação da *p53* enquanto que, com relação ao camptotecina, essas linhagens permanecem sensíveis. Um estudo recente, publicado na revista *Oncogene*, observou variação na sensibilidade a diferentes quimioterápicos na dependência do tipo de mutação.

Nos últimos anos os conceitos de quimiosensibilidade tem mudado e possivelmente o genótipo e não a genotoxicidade dos agentes quimioterápicos é o maior determinante da morte celular após a exposição a esses agentes. O gene *p53* está mutado em 50% dos tumores e sua correlação com a resposta ao tratamento tem sido extensivamente pesquisada. Estudos pré-clínicos sugerem que ação dos quimioterápicos que induzem dano ao DNA varia com o contexto celular em que a proteína *p53* é expressa, a classe de quimioterápico e possivelmente com tipo de mutação.

Estudos de manipulação genética do gene *p53* visando a restauração da *p53* selvagem para indução da apoptose são altamente promissores. Em síntese, diversos estudos sugerem que a proteína *p53* está envolvida na quimiosensibilidade entretanto, o uso das alterações da *p53* como marcador de resistência aos diversos tipos de tratamento ainda não está totalmente elucidado.

**SIIC: Qual é a importância clínica das alterações do gene e proteína p53?**

C.E.K.: A revisão dos estudos do gene *p53* e sua proteína nas neoplasias linfóides em primeira instância, fornece resultados que podem sugerir conclusões precipitadas. Em sua grande maioria o desenho do estudo ou os métodos de análise estatística não permitem uma avaliação adequada. A revisão crítica da literatura sobre o valor preditivo e prognóstico de alterações do gene *p53* nos linfomas não Hodgkin mostra 7 estudos e destes 5 demonstram que mutações estão associadas a pior sobrevida.

Os resultados mais expressivos foram observados no linfoma de células do manto. Também no grupo de linfomas agressivos de células B tratados de forma homogênea e avaliado por Ichikawa et al., esta correlação pode ser estabelecida. No entanto, com relação ao linfoma de Burkitt, uma neoplasia linfóide com alta frequência de mutações do gene *p53*, Preudhomme et al, como citado anteriormente, não observaram correlação entre mutações e pior sobrevida embora, em estudo anterior, esta correlação tenha sido sugerida por outros autores. A dificuldade de análise em alguns estudos está relacionada ao uso de populações heterogêneas, diferentes métodos de análise e objetivos não definidos.

O número de estudos referidos até o momento na literatura mostram que a pesquisa de alterações do gene e da proteína p53 em neoplasias, também as de origem linfóide, são relevantes para a compreensão da patogênese, evolução e resistência ao tratamento nessas neoplasias. Até o momento os resultados da pesquisa dessas alterações em neoplasias de origem linfóide, são heterogêneos e só permitem uma conclusão definitiva em alguns tipos histológicos de linfoma não Hodgkin. De forma ideal, os futuros estudos devem envolver grande número de pacientes tratados com idênticos esquemas terapêuticos e estratificados em tipos histológicos de forma a validar os resultados visando a pesquisa de rotina de mutações do gene *p53* e seleção de pacientes para modalidades terapêuticas mais agressivas.

Um grande progresso foi alcançado nos últimos anos no entendimento das funções da p53 e sua regulação. Como resultado deste esforço, diversas estratégias estão em andamento como a terapia gênica, agentes farmacológicos com ação independente da p53 cujo alvo são as células com a forma alterada da proteína e também a indução seletiva da apoptose em células com o gene mutado através do adenovírus humano. Espera-se que no futuro o desenvolvimento dessas estratégias se traduza no aumento da taxa de cura e da sobrevida dos pacientes com câncer.



## EVALUAN LOS FACTORES ASOCIADOS CON EL ACCESO A LOS CONTROLES MAMOGRAFICOS

Dra. Joanne M. Murabito

Investigadora, Framingham Heart Study, National Heart, Lung and Blood Institute.

Ultimo trabajo publicado: *Family breast cancer history and mammography:*

*Framingham Offspring Study*, American Journal of Epidemiology 154(10):916-923, 2001.

Framingham, EE.UU. (**especial para SIIC**)

Las mujeres con antecedentes familiares de cáncer de mama acceden con mayor frecuencia a los controles mamográficos, según explicó la **doctora Joanne Murabito** en un diálogo exclusivo con **SIIC**.

Las conclusiones presentadas por la experta fueron obtenidas a partir de los datos proporcionados por las mujeres de 40 a 79 años participantes en el Framingham Heart Study. La **doctora Murabito** y sus colegas analizaron, en este grupo, los factores predictores del acceso a esta técnica de detección temprana de los tumores.

Según explicó la investigadora, "las mujeres estudiadas en este trabajo son participantes del Framingham Heart Study. Este es un estudio poblacional de varias generaciones, que se inició en 1948 cuando 5209 hombres y mujeres fueron incluidos en la cohorte original. En la década de 1970, los hijos de los miembros de la cohorte original fueron reclutados y formaron la cohorte de descendientes del Framingham Heart Study".

"La cohorte original ha sido sometida a exámenes cada dos años desde que comenzó el estudio, y la cohorte de descendientes ha sido examinada en promedio cada tres a cuatro años desde su inclusión en el trabajo", detalló.

El análisis acerca del acceso a las mamografías se inició en 1996. "En ese año", explicó la **doctora Murabito**, "identificamos a las participantes de la cohorte de descendientes con una madre o hermana en el estudio, con cáncer de mama documentado. Luego identificamos dos grupos control, entre las mujeres del grupo de descendientes. Uno de ellos estaba formado por mujeres cuya madre o hermana, participante del Framingham Heart Study, había padecido un cáncer documentado, diferente del de mama.

El otro incluía mujeres cuya madre o hermana perteneciera a la cohorte, y no hubiese padecido cáncer".

"Se envió a las integrantes de cada uno de estos grupos un cuestionario por correo, a fin de que informaran su acceso a las mamografías. Se determinó que el porcentaje de mujeres que habían sido sometidas alguna vez a esta técnica diagnóstica fue muy alto (98% de las mujeres con antecedentes familiares de cáncer mamario, y 95% de las que no tenían antecedentes)".

El análisis de los factores asociados con este tipo de controles demostró, según la especialista, que "el acceso reciente a la mamografía (en los dos años anteriores) fue mayor entre las mujeres con antecedentes familiares de cáncer de mama. Una historia familiar de este tipo de tumores y un examen clínico reciente de las mamas fueron los factores que incrementaron las probabilidades de que las mujeres se hubiesen realizado una mamografía recientemente, mientras que el tabaquismo actual redujo esas probabilidades".

"No está claro por qué las mujeres con antecedentes familiares de cáncer de mama hacían un uso más frecuente de esta técnica", advirtió la **doctora Murabito**. "Las explicaciones posibles incluyen un mayor riesgo percibido entre ellas (un mayor conocimiento de la enfermedad, y de los beneficios de la mamografía) y entre sus médicos (lo cual lleva a aumentar las recomendaciones para el rastreo)".

En el futuro, "serán necesarios nuevos trabajos para determinar por qué las mujeres que fuman acceden en menor medida al rastreo mamográfico. No está claro si el hecho de fumar identifica a un grupo de mujeres que tienen menos probabilidades de buscar el acceso a las estrategias de mantenimiento y control de la salud, como la mamografía".

La **doctora Murabito** ha publicado anteriormente trabajos de investigación en las revistas American Journal of Epidemiology, Archives of Internal medicine, Circulation y American Journal of Medicine, entre otras.