

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA, GINECOLOGÍA Y
OBSTETRICIA Y MEDICINA PREVENTIVA

Hospital Universitario Vall d'Hebrón
Servicio de Ginecología y Obstetricia
Departamento de Anatomía Patológica

TESIS DOCTORAL

Estudio de la apoptosis y de la expresión de proteínas involucradas en su control y en los mecanismos de vigilancia genómica, en los tumores de ovario de estirpe epitelial.

Tesis presentada por Fco Javier de la Torre Fdez. de Vega

para optar al grado de doctor.

**Profesor tutor:
Prof. Dr. Jordi Xercavins Montosa.**

Directores:
Prof. Dr. Jordi Xercavins Montosa.
Dr. Angel García Jiménez.

CARTAS DE LOS DIRECTORES

Agradecimientos:

-Al Prof. Jordi Xercavins, por aceptar la dirección de esta tesis y haberme orientado en la tarea investigadora, mostrando un constante e inestimable apoyo y entusiasmo en el proyecto.

-Al Dr. Angel García, por haber procurado por el desarrollo de mi formación en el campo de la ginecopatología y por haberme prestado una generosa ayuda en el desarrollo de este trabajo.

-Al Prof. Javier Parache y al Prof. José Carlos Alberto, por haber estimulado mi vocación en la investigación ginecológica.

-A Federico Gustavo Rojo Todo, amigo y compañero, por su impagable contribución, implícita y explícita, en este propósito.

-Al Prof Eduardo Salido, a Raimundo Freire, José Ramón Murguia, Alfredo Santana y a todo el personal de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Canarias, por formarme en conocimientos de biología molecular y específicamente en el campo de las proteínas de vigilancia genómica.

-Al Dr. Raventos y al personal de la Unitat de Reserca Biomédica del Hospital Vall d'Hebrón (Jesús Planaguma, Francina Munnell , Carmen Torres y Cristina Esteban), por su contribución en los aspectos metodológicos.

-A Alejandro Jiménez Sosa, de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Canarias, y a Eduardo Hermosillas, del Departamento de Medicina Preventiva del Hospital Vall d'Hebron, por su cooperación en el análisis estadístico de los datos.

- Al personal de enfermería del laboratorio, Pilar Magrans, María Pons, M^a José Trujillo, Ana Solsona, Francesc Borràs, Asunción Jiménez, M^a Angeles Artazcoz....., por su colaboración desinteresada en el procesamiento del material histológico.

-A todos los médicos adjuntos del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Vall d'Hebrón, por su labor docente y por haberme animado a seguir en esta línea de trabajo.

- A aquellas personas que, directa o indirectamente, han estado a mi lado durante todo este tiempo, en el que me han ofrecido su amistad sin pedir nada a cambio.

- A los distinguidos miembros del Tribunal, por acceder amablemente a formar parte del mismo.

“La vida es lo que hacemos y lo que nos pasa”

José Ortega y Gasset

A la memoria de mis padres...
A la memoria de María Cubells...

A Montse...

por la felicidad e ilusión incondicional del día a día.

***A mis hermanos...
por estar siempre ahí.***

A mi familia y amigos...

ÍNDICE

Página

<u>1- INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1) CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES OVÁRICOS	3
1.1a- Embriología	3
1.1b- Clasificación histológica	5
1.2) ANATOMÍA PATOLÓGICA DE LOS TUMORES EPITELIALES	8
1.2a- Patogenia	8
1.2b- Clasificación	9
1.2b1: Tumores Serosos	10
a) Benignos	10
b) Borderline	11
c) Carcinomas	13
1.2b2: Tumores Mucinosos	14
a) Benignos	15
b) Borderline	16
b1. Tipo intestinal	16
b2. Tipo endocervical	17
c) Carcinomas	18
1.2b3: Tumores Endometrioides	19
a) Benignos	19
b) Borderline	20
c) Carcinomas	20
1.2b4: Tumores de células claras	21
a) Benignos y borderline	22
b) Carcinomas	22
1.2b5: Relación de la endometriosis ovárica y los carcinomas endometrioides y de células claras	23
1.2b6: Tumores de células transicionales	25
a) Benignos	25
b) Borderline y carcinomas	26
1.3) MÉTODOS DIAGNÓSTICOS	27
1.4) FACTORES PRONÓSTICOS	29
1.4a- Factores clínicos	29
1.4a1: Estadío Clínico	29
1.4a2: Edad	30
1.4a3: Estado General	30
1.4a4: Enfermedad residual	30
1.4a5: Otros factores	31
1.4b- Factores anatómo-patológicos	31
1.4b1: Tipo histológico	31

1.4b2: Grado de diferenciación -----	32
1.4b3: Rasgos nucleares -----	33
1.4b4: Índice mitótico -----	33
1.4b5: Otros factores -----	33
1.4c- Factores moleculares -----	34
1.4c1:Ploidia DNA -----	34
1.4c2: Alteraciones cromosómicas -----	34
1.4c3: Factores de crecimiento,Oncogenes, genes supresores tumorales y genes reparadores de DNA -----	34
1.4c4: Actividad proliferativa -----	35
1.5 TRATAMIENTO -----	36
1.5a- Cirugía -----	36
1.5a1: Cirugía en tumores borderline -----	36
1.5a2: Cirugía en el estadio I y II -----	36
1.5a3: Cirugía en estadios avanzados (III y IV) -----	37
1.6 b- Quimioterapia -----	38
1.6 c- Inmunoterapia -----	41
1.6 d- Terapia Génica -----	41
1.6 BIOLOGÍA MOLECULAR DEL DESARROLLO Y PROGRESIÓN DEL CARCINOMA OVÁRICO -----	43
1.6a- Factores de Crecimiento -----	44
1.6b- Genes Tumorales -----	45
1.6b.1:Oncogenes -----	46
1-El gen erb-B2 (Her2/neu) -----	46
2-Oncogen fms -----	46
3-Gen c-myc -----	47
4-Gen Ras -----	47
1.6b.2: Genes de supresión tumoral -----	47
1-Gen p53 -----	48
2-Gen PTEN -----	48
3-Gen B-Catenina -----	49
4-Gen BRCA 1 y BRCA 2 -----	49
5-Otros genes con pérdida de heterocigocidad -----	50
1.6b.3: Genes reparadores de errores replicativos del ADN -----	52
1.6c- Alteraciones de la clonalidad y de la metilación del ADN -----	53
1.6d- Futuras direcciones -----	53
1.7APOPTOSIS -----	56
1.7 a- Morfología -----	57
1.7 b-Genes reguladores de la apoptosis -----	59
1.7.b1-Familia bcl-2/ bax -----	60
1-Proteína bcl-2 -----	61
2-Otros miembros de la familia: Bax, bcl-x, bak, Mcl-1 -----	62
3-Mecanismo de acción -----	65
1.7.b2- Gen c-myc -----	67
1.7.b3- Gen supresor tumoral p53 -----	68
1-El gen p53 y su proteína -----	69
2-Activación y función -----	70
3-Mecanismo de acción -----	72
4-Mutación -----	75
1.7.c Mecanismos moleculares de la apoptosis -----	77

1.7.c1- Iniciación -----	77
1-Activación de receptores de membrana -----	77
2-Alteración mitocondrial -----	79
3-Pérdida del contacto intracelular -----	83
4-Alteración del DNA -----	83
5-Via perforina-granzima B -----	83
6-Via esfingomielinasa -----	83
7-Otras vías -----	84
1.7.c2- Ejecución -----	84
1.7.c3- Degradación celular -----	87
1.7.d Mecanismos reguladores de la apoptosis -----	89
1.7.d1- Inactivación de ligandos -----	89
1.7.d2- Proteínas inhibidoras y favorecedoras de apoptosis -----	89
1.7.d3- Activación de factores de transcripción antiapoptóticos -----	89
1.7.d4- Inhibición de las caspasas -----	90
1.7.e Mecanismos amplificadores de la apoptosis -----	92
1.7.f Significado fisiológico y patológico de la apoptosis -----	93
1.7.g Apoptosis y cancer -----	94
1.7.g1- bcl-2 y cancer -----	96
1.7.g2- p53 y cancer -----	98
1.7.g3- Resistencia a quimio y radioterapia -----	100
1.8 GENES DE VIGILANCIA (“CHECKPOINT”) -----	103
1.8.a Genes de “checkpoint” y cancer -----	104
1.8.b Proteínas de checkpoint (hus 1, rad 9 y rad 1) -----	104
1.8.c Proteínas de checkpoint y apoptosis -----	107
2- HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN -----	108
<u>3- OBJETIVOS</u> -----	112
4- MATERIAL Y MÉTODOS -----	114
4.1-SUJETOS DE ESTUDIO -----	115
4.2-DATOS CLÍNICOS -----	115
4.3-DATOS PATOLÓGICOS -----	116

4.3.a-Tipo histológico	-----117		
4.3.b-Grado histológico	-----117		
4.3.c-Grado nuclear	-----	117	4.3.d-
Grado de necrosis	-----	117	
4.3.e-Índice mitótico	-----118		
4.3.f-Índice apoptótico (Hematoxilina-eosina)	-----	118	
4.4-MARCAJE IN SITU DEL DNA FRAGMENTADO (TÉCNICA DE T.U.N.E.L.)	-----	119	
4.5-INMUNOHISTOQUIMICA DE FACTORES BIOLÓGICOS INVOLUCRADOS EN LA APOPTOSIS (P53, BCL-2 Y BAX)	-----	121	
4.6-ESTUDIO DE PÉRDIDA DE HETEROCIGOCIDAD DE TP53	-----	123	
4.7-INMUNOHISTOQUÍMICA PARA LA EXPRESIÓN DE GENES DE “CHECKPOINT”	-----	125	
4.7.a- Clonaje de rad 9 y Hus 1 en vectores de expresión en Bacterias	-----	126	
4.7.b- Técnica de inmunohistoquímica	-----	127	
4.8-ESTUDIO ESTADÍSTICO	-----	128	
 <u>5- RESULTADOS</u>	-----	129	
 5.1- ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA SERIE	-----	130	
5.1.a- Variables Clínicas	-----	130	
5.1.a1- Edad	-----	130	
5.1.a2- Malignidad	-----	131	
5.1.a3- Estadío de la F.I.G.O.	-----	131	
5.1.b- Variables Patológicas	-----	132	
5.1.b1- Tipo histológico	-----	132	
5.1.b2- Grado de diferenciación	-----	132	
5.1.b3- Grado nuclear	-----	133	
5.1.b4- Grado de necrosis	-----	133	
5.1.c- Variables biológicas	-----	134	
5.1.c1- Índice mitótico	-----	134	
5.1.c2- Índice apoptótico (H-E)	-----	134	
5.1.c3- Índice apoptótico (TUNEL)	-----	135	
5.1.c4- Índice de renovación	-----	136	
5.1.c5- Expresión de p53	-----	136	
5.1.c6- Expresión de bcl-2	-----	137	
5.1.c7- Expresión de bax	-----	137	
5.1.c8- Expresión de hus-1	-----	138	
5.1.c9- Expresión de rad-9	-----	138	
 5.2 ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN ENTRE EL ÍNDICE MITÓTICO, APOPTÓTICO (H-E Y TUNEL), EXPRESIÓN DE GENES REGULADORES DE APOPTOSIS Y DE VIGILANCIA, CON EL GRADO DE MALIGNIDAD DE LOS TUMORES OVÁRICOS.			
5.2.a- Índice Mitótico	-----	139	
5.2.b- Índice Apoptótico (H-E)	-----	140	
5.2.c- Índice Apoptótico (TUNEL)	-----	141	
5.2.d- Expresión de p53	-----	143	
5.2.e- Expresión de bcl-2	-----	145	

5.2.f- Expresión de bax -----	146
5.2.g- Expresión de hus-1 -----	148
5.2.h- Expresión de rad-9 -----	149
5.3 ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN ENTRE EL ÍNDICE MITÓTICO, APOPTÓTICO (H-E Y TUNEL), EXPRESIÓN DE GENES REGULADORES DE APOPTOSIS Y DE VIGILANCIA, CON EL TIPO HISTOLÓGICO.	
5.3.a- Índice Mitótico -----	151
5.3.b- Índice Apoptótico (H-E) -----	153
5.3.c- Índice Apoptótico (TUNEL) -----	157
5.3.d- Expresión de p53 -----	161
5.3.e- Expresión de bcl-2 -----	165
5.3.f- Expresión de bax -----	169
5.3.g- Expresión de hus-1 -----	173
5.3.h- Expresión de rad-9 -----	177
5.4 PERDIDA DE HETEROCIGOCIDAD DE TP53 -----	179
5.5 ANÁLISIS DE LA CORRELACIÓN ENTRE EL INDICE MITÓTICO Y APOPTÓTICO (H-E Y TUNEL), EXPRESIÓN DE GENES REGULADORES DE APOPTOSIS Y DE VIGILANCIA CON OTROS FACTORES PRONÓSTICOS YA ESTABLECIDOS. -----	180
5.6 ANÁLISIS DE LA CORRELACIÓN ENTRE EL INDICE MITÓTICO Y APOPTÓTICO (H-E Y TUNEL), EXPRESIÓN DE GENES REGULADORES DE APOPTOSIS Y DE VIGILANCIA EN LOS TUMORES DE OVARIO. -----	182
5.7 ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA Y DE PERIODO LIBRE DE ENFERMEDAD	
5.7.a- Índice Apoptótico (H-E) -----	184
5.7.b- Índice Apoptótico (TUNEL) -----	187
5.7.c- Expresión de p53 -----	189
5.7.d- Expresión de bcl-2 -----	191
5.7.e- Expresión de bax -----	194
5.7.f- Expresión de hus-1 -----	197
5.7.g- Expresión de rad-9 -----	199
5.8 ANÁLISIS MULTIVARIADO. MODELO DE REGRESIÓN DE COX -----	201
5.8.a- Tiempo de Supervivencia -----	201
5.8.b- Periodo libre de enfermedad -----	202
<u>6- DISCUSIÓN</u> -----	204
6.1 RELACIÓN DE LA APOPTOSIS Y DE LA EXPRESIÓN DE P53, BCL-2 Y BAX CON EL GRADO DE MALIGNIDAD -----	205
6.1.a- Índice apoptótico -----	205
6.1.b- Expresión de p53 -----	206
6.1.c- Expresión de bcl-2 y bax -----	207

6.2 RELACIÓN DE LA APOPTOSIS Y DE LA EXPRESIÓN DE P53, BCL-2 Y BAX CON EL TIPO HISTOLÓGICO	210
6.2.a- Índice apoptótico	210
6.2.b- Expresión de p53	211
6.2.c- Expresión de bcl-2 y bax	212
6.3 CORRELACIÓN ENTRE LOS DIFERENTES FACTORES BIOLÓGICOS CON LOS FACTORES PRONÓSTICOS YA ESTABLECIDOS	213
6.3.a- Índice apoptótico	213
6.3.b- Expresión de p53	214
6.3.c- Expresión de bcl-2 y bax	214
6.4 CORRELACIÓN ENTRE LA APOPTOSIS Y LA EXPRESIÓN DE FACTORES IMPLICADOS EN SU CONTROL	215
6.4.a- Índice apoptótico (H-E) e Índice apoptótico (TUNEL)	215
6.4.b- Índice apoptótico y expresión de p53, bcl-2 y bax	216
6.5 FACTORES PRONÓSTICOS EN LOS TUMORES DE OVARIO DE ESTIRPE EPITELIAL	217
6.5.a- Índice Apoptótico	218
6.5.b- Expresión de p53	220
6.5.c- Expresión de bcl-2-bax	223
6.5.d- Papel de la apoptosis y factores involucrados en su regulación como factores de quimioresistencia	224
6.5.e- Análisis estadístico multivariado	227
6.6 EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE VIGILANCIA O “CHECKPOINT” EN LOS TUMORES OVÁRICOS DE ESTIRPE EPITELIAL	228

<u>7- CONCLUSIONES</u>	233
-------------------------------	------------

<u>8- BIBLIOGRAFÍA</u>	238
-------------------------------	------------

1-INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El carcinoma de ovario primario representa el tumor ginecológico más letal, siendo su mortalidad prácticamente similar a la de todos los tumores ginecológicos juntos¹. Globalmente se calculan unos 162.000 casos nuevos y unas 106.000 muertes / año, por lo que se estima que 1 de cada 70 mujeres desarrollará un cáncer de ovario a lo largo de su vida². En Estados Unidos se diagnostican 21.000 casos nuevos / año y se producen 14.000 muertes / año por su causa³.

En nuestro país, tras el carcinoma de endometrio, es el segundo tumor ginecológico en frecuencia, comprendiendo el 4,3 % de todos los cánceres femeninos. Además representa la cuarta causa de mortalidad en la población femenina, y es el que presenta mayor tasa de mortalidad entre las neoplasias ginecológicas, representando el 49,3 % de todas las muertes producidas por estos tumores⁴.

Su frecuencia va en aumento en los países desarrollados, entre otras causas, por la prolongación de la esperanza de vida de las mujeres, que es próxima a los 80 años, y como es sabido, por la aparición de estos tumores sobretodo tras la menopausia⁵. La elevada tasa de mortalidad se debe, fundamentalmente, a que el 70% de los casos se detecta en un estadio muy avanzado (estadios III ó IV), ya que es un tumor intraabdominal que crece silenciosamente y además hasta el momento no hay ningún método diagnóstico que pueda ser usado como "screening" para detectar estadios precoces⁶. Las pacientes diagnosticadas en estadios I y II presentan una supervivencia a los 5 años superior al 70 % frente al 12 % en los casos avanzados, siendo la tasa global de 25-30 %⁷.

1.1 CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES OVÁRICOS

El ovario es un órgano capaz de producir una gran variedad de neoplasias con diferentes patrones histológicos . El conocimiento de la evolución embriológica del ovario, es de gran trascendencia a la hora de explicar la génesis y el desarrollo de estos tumores y, por ende, el diagnóstico de los mismos.

1.1 a) Embriología:

La embriogénesis es un proceso dinámico y continuo. Existe un consenso general en la identificación de signos morfológicos propios de diferentes estadios evolutivos. Sin embargo los sucesos que ocurren en la transición entre los estadios y, también, el origen de algunas unidades celulares dentro del desarrollo, están en continua discusión entre los especialistas . Por ello, todavía no se ha podido establecer una clasificación de tumores ováricos basada únicamente en el desarrollo gonadal ⁸.

El aparato genital deriva, en esencia, del conducto urogenital. Las gónadas empiezan a formarse alrededor de la 5ª semana de edad gestacional, cuando el embrión ha alcanzado unos 6 mm de tamaño, iniciándose con un engrosamiento del epitelio celómico (mesotelio) a ambos lados del mesonefros (mesenterio dorsal), haciendo prominencia en la cavidad celómica o peritoneal ⁹ . Simultáneamente, las células germinales , que han sido constituidas en el saco vitelino endodérmico, emigrarán pasando por la raíz del mesenterio hasta alcanzar y penetrar en la gónada primitiva.

Cuando el embrión ha alcanzado unos 9 mm, aparecen unos cordones de células que penetran en la profundidad de la gonada primitiva, dando lugar a los cordones sexuales primitivos. El origen de estas células continúa siendo controvertido. A pesar de que algunas

aportaciones han concluido que provienen del epitelio celómico ^{10,11} y otros favorecen su origen mesenquimal ¹², estudios recientes indican un probable origen mesonéfrico ¹³. A las 7^a-9^a semana de gestación, la zona periférica del ovario aumenta de tamaño, para formar la corteza definitiva, constituida por células germinales primitivas y en menor cantidad células de la pregranulosa. Estas últimas son fusiformes y se disponen anárquicamente en relación a las ovogonias ¹⁴. A partir de la 12 semana, un tejido conectivo-vascular penetra por el mesénquima de la porción medular ovárica hacia la corteza interna y posteriormente la externa finalizando hacia la 20^a semana ¹⁵. Este proceso da como resultado una corteza dividida en grupos celulares compuestos por oocitos y células pregranulosa (cordones sexuales), las cuales empiezan a rodear a la célula germinal para formar los folículos primordiales. El fenómeno de la foliculogénesis comienza en la parte interna de la corteza y gradualmente se extiende hacia la capa externa alrededor del periodo neonatal temprano ^{16,17}.

El aumento de tamaño gonadal se traduce por un incremento en el número y volumen de los folículos, rodeados a su vez por una capa de células de los cordones sexuales de naturaleza epitelial, denominadas células de la granulosa, delimitadas externamente por una capa periférica de células mesenquimales o también conocidas como células tecales ¹⁹. El mesotelio celómico o germinal que envuelve a la gónada, consiste en una capa de células cuboidales, aunque focalmente puede presentar pseudestratificación, y tiene como función aislar y proteger del medio externo, en este caso de la cavidad peritoneal ¹⁸.

1.1 b) Clasificación histológica

Se han propuesto numerosas clasificaciones de los tumores de ovario atendiendo a distintos criterios: consistencia del tumor (sólidos, quísticos), comportamiento biológico (benignos, malignos), de estructura histológica (epiteliales, mesenquimales), histogénesis, etc. Ninguna de ellas explicaba con total acierto la interpretación y origen de los tumores. Los primeros intentos de desarrollar una clasificación de los tumores ováricos avalada por un reconocimiento internacional surgen al principio de los sesenta, cuando la FIGO, en 1961, propuso un sistema de clasificación basado fundamentalmente en los aspectos histogenéticos, poniendo especial énfasis en los derivados del epitelio celómico. Esta clasificación aportó dos novedades destacables: a) Reconocimiento de los tumores “borderline” o de bajo potencial de malignidad; b) Incorpora a los quistes endometriósicos como entidad tumoral, tanto en su variante benigna, borderline como maligna ¹⁹.

Fue en 1973 cuando un grupo de expertos designados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) propusieron una clasificación histológica²⁰ de los tumores ováricos, que integraría la propuesta de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) sobre los tumores epiteliales¹⁹. Las bases de dicha clasificación permanecen vigentes y ha sido ampliamente aceptada y defendida de un modo unánime por distintos autores ^{8,21,22}, si bien es verdad que periódicamente algunos aspectos de la misma son susceptibles de reclasificación, en función del avance de los conocimientos científicos.

CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE LOS TUMORES DE OVARIO (OMS-1973)²⁰

1-Tumores de origen epitelial.

- A-Serosos:** *1a.1: Benignos:* Cistadenoma Seroso
Adenoma de superficie
1a.2: De bajo potencial maligno: Tumor Seroso Borderline
1a.3: Malignos: Cistadenocarcinoma Seroso
- B-Mucinosos:** *1b.1: Benignos:* Cistadenoma Mucinoso
1b.2: De bajo potencial maligno: T. Mucinoso Borderline
1b.3: Malignos: Cistadenocarcinoma Mucinoso
- C-Endometrioides:** *1c.1: Benignos:* Adenoma endometrioide
1c.2: De bajo potencial: T. Endometrioide Borderline
1c.3: Malignos: Adenocarcinoma Endometrioide
Sarcoma del Estroma endometrial
- D-Células claras:** *1d.1. Benignos:* Adenoma de Células Claras.
1d.2. De bajo potencial: T. Cél. Claras Borderline
1d.3. Malignos: Adenocarcinoma de Células Claras
- E-Transicionales:** *1e.1. Benignos:* Adenoma (tumor de Brenner)
1e.2 De bajo potencial: T. Cél. Trans. Borderline
1e.3. Malignos: Carcinoma de Células transicionales
- F-Müllerianos mixtos:** *1f.1: Benignos:* Adenofibroma y Cistadenofibroma
(Seroso, Mucinoso, Endometrioide, C. Claras)
1f.2: Malignos: -Adenosarcoma Homólogo
-Adenosarcoma Heterólogo
-Carcinofibroma
-Carcinosarcoma Homólogo
-Carcinosarcoma Heterólogo
- G- Carcinomas indiferenciados**
- H-Tumores epiteliales inclasificables**

2. Tumores de los Cordones Sexuales y Estromales

- 2.1 T. Cord. Sexuales:** 2.1.a. Granulosa.
2.1.b. Sertoli – Leydig (Androblastomas):
a) Bien diferenciado
b) Con diferenciación lipídica
c) Sarcomatoide.
d) Con elementos heterólogos
2.1.c. Ginandroblastoma
2.1.d. T. Cord. Sex. con Túbulos Anulares
2.1.e. T. Cord. Sex. Inclasificables
- 2.2 T. Estromales:** - Fibroma
- Tecoma
- Tumor estromal esclerosante
- Otros (fibroma celular, fibrosarcoma,)

3. Tumores Germinales

- 3.1 Disgerminoma**
3.2 Tumor del Seno Endodérmico
3.3 Carcinoma Embrionario
3.4 Poliembrioma
3.5 Coriocarcinoma
3.6 Teratoma: a) Inmaduro
b) Maduro Sólido
c) Maduro Quístico
d) Monodérmico: - struma ovarii
- carcinoide
e) Teratocarcinoma

4. Tumores derivados de los tejidos blandos, no específicos del ovario

- 4.1 Hemangioma**
4.2 Leiomiomas
4.3 Sarcomas: Rabdomyosarcoma.
Leiomyosarcoma.
Liposarcoma
4.4 Linfomas

5. Tumores Metastásicos

1.2 ANATOMÍA PATOLÓGICA DE LOS TUMORES EPITELIALES

Los tumores del epitelio-estroma de superficie constituyen el 60 % de todas las neoplásicas ováricas, alcanzando el 80-90 % dentro de las lesiones malignas primarias²³. La edad media de presentación de los tumores benignos es de 45 años, los de bajo potencial de malignidad se presentan en una edad media de 50 años, siendo los malignos, extremadamente raros por debajo de 40 años de edad, ocurriendo mayoritariamente en las mujeres postmenopáusicas²⁴.

Basándonos en la diferenciación epitelial existen cinco grandes grupos de categorías (seroso, mucinoso, endometriode, células claras, y de células transicionales), aunque es común la existencia de patrones mixtos o intermedios tanto desde el punto de vista arquitectural como citológico⁸. A pesar de pertenecer a un espectro de neoplasias mullerianas, cada uno de ellos tiene sus propias características histopatológicas así como patrón de metástasis, respuesta terapéutica y pronóstico clínico^{8,24}.

1.2 a) Patogenia:

Existen evidencias que apoyan la teoría sobre el doble origen de los carcinomas de ovario. Por un lado, pueden originarse de novo del epitelio de superficie, o bien, de las inclusiones del epitelio seroso⁸ (endosalpingiosis), implantes de epitelio endometrial (endometriosis), que, a su vez, pueden sufrir metaplasias mucinosas, de células claras, ó de células transicionales. Sin embargo, la localización intraovárica preponderante en estadios iniciales, hace pensar que la mayoría de estos tumores tengan su origen en las glándulas de inclusión del epitelio, más que directamente del epitelio de superficie²⁵. También muchas de las

características morfológicas (como la metaplasia tubárica)²⁶ ó inmunohistoquímicas (CA125, CA19-9, Fosfatasa alcalina placentaria, y la expresión de HER-2 neu/gene) que encontramos con frecuencia en el cancer epitelial²⁷, son mucho menos frecuentes en el epitelio de superficie que en el epitelio glandular de inclusión.

Existen tres datos , en la literatura, que apoyan la teoría sobre el origen de estas neoplasias sobre una lesión epitelial benigna preexistente:

- La edad media de las pacientes con carcinomas es 12 años superior que las pacientes con lesiones benignas, lo que sugiere que existan lesiones benignas previas al carcinoma, no diagnosticadas²⁸.
- La frecuencia de lesiones benignas en familiares de primer y segundo grado de pacientes con carcinoma, es 5 veces superior que en el grupo control.^{29,30}.
- La alta frecuencia de lesiones benignas que aparecen en las muestras histológicas para estudio por carcinoma³¹. Esta asociación se ha visto mayoritariamente en los casos de adenocarcinoma mucinoso, seguidos por las lesiones endometrioides y de células claras, siendo los carcinomas serosos y los de células transicionales los que menos asociación presentan³⁰.

1.2 b) Clasificación:

Siguiendo las recomendaciones de la Federación Internacional de Obstetricia y Ginecología (FIGO) y la WHO, este espectro se ha subdividido en tres categorías atendiendo al grado de malignidad: así tendremos Tumores benignos, Tumores de bajo potencial de malignidad o “borderline” y Tumores malignos.

1.2 b.1) Tumores serosos:

Comprenden una _ parte de los tumores benignos y de un 50 – 70% de los malignos primarios de ovario²⁴. El 10 – 45% son bilaterales⁸. Se presentan como tumoraciones quísticas, uni o multiloculares, repletas de un fluido acuoso o seroso. Aproximadamente 2/3 partes presentan unas calcificaciones microscópicas, denominadas cuerpos de psamoma. Las características más sobresalientes de cada uno de ellos serían las que a continuación se exponen.

a) *Benignos:*

Son los más comunes y representan 25 % de los tumores benignos de ovario y el 50-70 % de todos los tumores serosos de ovario. Presentan un pico de incidencia en la cuarta y quinta década de la vida²⁴.

Son en su mayor parte formaciones quísticas, de tamaño variable, recibiendo así la denominación de cistadenomas . Se reconocen dos variedades, simple y papilar, en función de que la cara interna de los quistes sea lisa o bien muestre proyecciones verruciformes papilares. Microscópicamente, la pared quística es delgada, pudiendo tener estructuras papilares, que proyectan hacia la luz, y espacios glandulares entre el estroma⁸. El epitelio que recubre la cavidad y las papilas suele ser cúbico, aplanado, con núcleo basal uniforme en monocapa , o por las células de revestimiento que remedan las que tapizan la mucosa de las trompas de Falopio, con características secretoras o ciliadas, dispuestas en pseudoestratificación . Este epitelio puede mostrar cambios similares a los encontrados en la mucosa tubárica, durante las diferentes etapas del ciclo menstrual incluídas los cambios secretores o de células claras²⁶. Las figuras de mitosis son escasas o nulas y no hay atipia nuclear. Puede existir cuerpos de psamomas hasta en un 15 % de los casos. El componente estromal puede presentar un componente fibroso muy celular, o

bien, hialino poco celular, con marcado edema. Existe una fina capa acelular entre el componente estromal y el epitelial. Es frecuente encontrar células histiocitarias debajo del epitelio formando el pseudoxantoma eosinofílico granular, incluso granulomas ceroides, con pigmento marrón de lipofucsina, y no de hemosiderina por lo que no debe ser confundido con los quistes endometriósicos²⁴.

Rara vez, se han encontrado inclusiones serosas (endosalpingiosis) en el omento o en las superficie de vísceras abdominales, incluso con formaciones papilares y cuerpos de psammomas, sin tener mayor significado pronóstico para la paciente³².

b) Borderline o de bajo potencial de malignidad.

Existe, igualmente, otro tipo de tumores serosos en los que existe una acusada actividad proliferativa epitelial, y que a diferencia del cistadenocarcinoma, no producen una franca invasión estromal⁸.

Estas neoplasias aparecen en mujeres algo más jóvenes que el carcinoma, con una edad media entre los 40-45 años, y a pesar de no reflejar los suficientes signos de malignidad histológica, pueden tener un comportamiento agresivo, debiéndose considerarse por ello como tumores de bajo grado de malignidad o de potencial incierto³³.

Desde un punto de vista histológico, se caracterizan por formaciones papilares complejas, recubiertas de hileras de células pseudoestratificadas, no exentas de cierto grado de atipia y figuras de mitosis, sin observarse invasión estromal franca. Sin embargo, existen tres patrones arquitecturales, poco frecuentes, que pueden encontrarse de manera focal o difusa: 1- Patrón cribiforme intraquístico o de superficie. 2- Patrón micropapilar intraquístico o de superficie. 3- Patrón sólido intraquístico⁸. Algunos autores concluyen que la presencia de los dos primeros

patrones está asociado a un peor pronóstico, y se relacionan con mayor frecuencia de implantes invasivos peritoneales^{34,35,36}. Incluso algunos proponen que la presencia de un patrón micropapilar representa un carcinoma intraepitelial, considerándose un grado de proliferación epitelial más cercano al carcinoma que al tumor borderline, por lo que el patólogo debe hacer un estudio más exhaustivo de la pieza para descartar la presencia de un carcinoma invasivo^{37,38,39,40}.

Otro punto interesante, es la presencia de microinvasión del estroma, descrita en aproximadamente un 10 % de estos tumores. Dicho hallazgo se caracteriza por la presencia de uno o más focos de proliferación epitelial en el estroma adyacente sin reacción desmoplásica, y que no sobrepasan un área de 10 mm⁴¹. Debe de ser diferenciado de los tumores serosos borderline con presencia de invasión franca, que presentan alta atipia citológica y una marcada reacción desmoplásica³⁶. Se ha observado, ocasionalmente, invasión de espacios linfovascuales, sin embargo, los resultados de los estudios al respecto, sugieren que no cambia el pronóstico de los tumores serosos borderline sin microinvasión^{39,40,42}.

La presencia de implantes peritoneales en este tipo de tumores se ha descrito en un 30-40 % de los casos³⁷. El estudio microscópico es de fundamental importancia, ya que varían desde focos de endosalpingiosis, hasta focos de tumor seroso borderline invasivo o no invasivo^{38,43}. Los focos no invasivos pueden ser de tipo epitelial, que remedan las proliferaciones papilares del tumor primario, o desmoplásicos⁴⁴. Estos últimos pueden presentarse como focos de necrosis masivos con marcado componente inflamatorio agudo, o bien, como amplias bandas de fibrosis recordando el estroma desmoplásico de los carcinomas o de los implantes invasivos⁴¹.

Los focos invasivos representan el 12 % de los casos. Microscópicamente recuerdan a un adenocarcinoma seroso papilar de bajo grado. El diagnóstico diferencial entre los implantes no invasivos desmoplásicos y los invasivos puede ser difícil, pero es de crucial importancia, ya que,

este hallazgo si conlleva importantes implicaciones pronósticas. Ante la presencia de implantes invasivos se recomienda una terapéutica más agresiva y el uso de tratamientos adyuvantes^{40, 45, 46}.

c) Malignos.

Los cistadenocarcinomas seroso papilares constituyen la variedad más frecuente de tumor ovárico maligno (80-90%), apareciendo en mujeres con una edad media alrededor de los 55 años²⁴. Macroscópicamente son tumoraciones quísticas, multiloculares, con áreas sólidas, papilares, friables que pueden ocupar la cavidad cerca de la mitad de los casos son bilaterales. Cuando alcanzan grandes dimensiones pueden aparecer áreas de hemorragia y necrosis, traduciendo así un crecimiento acelerado⁸.

Microscópicamente se caracterizan por un patrón papilar muy abigarrado, cuyo epitelio de revestimiento, a diferencia de los cistadenomas, está constituido por varias capas de células, con atipia citológica franca, presencia de mayor número de mitosis y lo que es más importante: existe una invasión clara del estroma ovárico⁴⁷. Con frecuencia estos tumores ocasionan afectación de los espacios linfáticos, pudiendo dar metástasis en etapas tempranas de la enfermedad²⁴.

Dependiendo del grado de diferenciación pueden adoptar diferentes patrones arquitecturales. Así los tumores poco diferenciados se caracterizan por la disposición en sábana de las células neoplásicas, que les confiere un patrón sólido, pudiendo contener glándulas tubulares en su interior. El patrón psamomatoso, con un predominio de calcificaciones amorfas y groseras intratumorales, se suele asociar a tumores bien diferenciados. También pueden existir otros patrones adicionales capaces de dificultar el diagnóstico como el adenoide-quístico,

microquístico, patrón reticular tipo yolk sac , con áreas de metaplasia escamosa ó con abundantes células gigantes sincitiotrofoblastica-like^{8,24,47}

1.2 b.2) Tumores mucinosos.

La frecuencia es similar a la de los serosos, siendo el 75 % benignos, 10 % borderline y 15 % malignos²³. La histogénesis no está del todo resuelta. Algunos autores piensan que se tratan de verdaderos teratomas en los que sólo se observa desarrollo de epitelio endodérmico, mientras que los restantes tejidos desaparecen^{48,49}. Otra explicación sería el origen metaplásico sobre otra lesión de origen seroso o endometriode, ya que ocasionalmente se ha visto una transición con ambos epitelios⁸.

Existe una asociación con lesiones similares en el apéndice, de carácter sincrónico, observándose en estos casos un alto porcentaje de pseudomixoma peritonii⁵⁰. También se ha visto una asociación con los adenocarcinomas mucinosos de cérvix, particularmente con el adenoma maligno, en las pacientes afectas por el Síndrome de Peutz-Jeghers^{51,52}.

Estos tumores pueden estar asociados a nódulos murales de varios tipos, que pueden clasificarse como sarcomas o como sarcoma-like³⁸. Los primeros aparecen en pacientes de edad avanzada y están constituidos por una población mesenquimal atípica, con invasión vascular por lo que conllevan un peor pronóstico^{53,54}. Por otro lado, los nódulos murales sarcoma-like, se presentan en pacientes jóvenes, como nódulos pardo-rojizos de 0,6 a 6 cm bien delimitados, constituidos por una población celular heterogénea, con células gigantes multinucleadas tipo “épulis”, células fusiformes atípicas y marcado componente inflamatorio, adyacentes al epitelio mucinoso^{55,56}. Posteriormente fue descrito un tercer tipo de nódulos murales asociados a este tipo de tumores, constituidos por focos de carcinoma anáplásico. Estos adquieren tamaños de hasta

12 cm de diámetro, se encuentran mal delimitados, presentan un franca invasión de estructuras vasculares y una diferenciación carcinomatosa obvia⁵⁷. Estos tres tipos de nódulos murales deben de ser diferenciados, ya que los nódulos sarcoma-like se acompañan de un pronóstico favorable^{56, 57}, a diferencia de los sarcomas^{54, 55} y carcinomas anaplásicos⁵⁸. Entre las variedades de tumores mucinosos podemos apreciar:

a) Benignos:

Son tumores quísticos, a menudo tabicados y unilaterales que reciben el nombre de cistadenomas. Su tamaño es variable, pudiendo alcanzar grandes volúmenes^{24, 8}. El contenido de los quistes es líquido viscoso. Al igual que los serosos, se reconocen las variedades simple y papilar en función de que la cara interna del quiste sea lisa o verrugosa. Microscópicamente las paredes del tumor están revestidas por un epitelio cilíndrico alto, productor de moco y alineado en una sola hilera, recordando el epitelio que reviste el endocérvix. Otras veces recuerda al revestimiento intestinal incluso con la presencia de células caliciformes²⁴. Raramente podemos encontrar focos de diferenciación escamosa, particularmente en aquellos con células de tipo endocervical. La clínica es semejante a los de los serosos y el comportamiento benigno. No hay que olvidar sin embargo, el peligro de rotura capsular de estos tumores y la posibilidad de que extravase fluido y células productoras de mucina a la cavidad abdominal, donde se implantarán dando lugar a un pseudomixoma peritonei, descrito entre un 2 y 5 % de los casos⁵⁸.

b- Tumor borderline

Presentan signos de actividad proliferante epitelial sin clara invasión del estroma ovárico. Se han subclasificado en dos formas clinicopatológicas diferentes: la más frecuente, constituida por epitelio tipo intestinal, y la constituida por epitelio tipo endocervical³⁸.

b-1. Tumor borderline mucinoso tipo intestinal.

Representan el 85 % de los casos y afectan a pacientes entre los 40 y 70 años⁵⁹. El 80-90 % se diagnostican en estadio I y menos del 10 % presentan afectación del ovario contralateral⁶⁰. Clínicamente, son los tumores ováricos, no endocrinos, que con más frecuencia presentan manifestaciones hormonales, secundarias a secreción de esteroides producidas por el estroma adyacente al tumor⁶¹, y ,en menor frecuencia, síndrome de Zollinger-Ellison o carcinoide⁸. Macroscópicamente, son tumores indiferenciables de los cistoadenomas o cistoadenocarcinomas, presentándose como tumores de más de 15 cm de diámetro, multiloculares y con contenido espeso y filante⁶⁰. Microscópicamente, se observan las cavidades quísticas revestidas por epitelio atípico de tipo intestinal, con presencia de células caliciformes, argirófilas y ocasionalmente células de Paneth, que pueden formar estructuras papilares finas y arborescentes^{62, 38}. Dichas células suelen disponerse en dos o tres capas , presentando leve-moderada atipia citológica y variable número de mitosis^{24, 8, 63} , sin producir invasión estromal destructiva. Sin embargo, al igual que en los tumores serosos borderline, estos tumores pueden presentar focos de microinvasión, caracterizado por focos de células tumorales, invadiendo un estroma reactivo, que ocupan un área inferior a 10 mm²³⁸. La microinvasión debe ser diferenciada de la reacción granulomatosa estromal que ocurre tras la rotura de glándulas con extravasación de moco, que

tiene lugar en un 25 % de los casos⁶³. La presencia de microinvasión no parece que empeore la supervivencia de las pacientes ^{63,38}.

Este tipo de tumor borderline se asocia a la presencia de Pseudomixoma Peritonii en un 20 % de los casos, aproximadamente ^{63,64}. Se ha visto que en un 60 % de estos casos la apéndice vermiforme presenta una lesión de similares características^{51,65}. Esta sincronidad de lesiones, fue considerada como tumores independientes, pero existen evidencias convincentes para asegurar que, en la mayoría de los casos, los tumores de ovario representan una metástasis de la lesión apendicular. Los datos que apoyan esta última teoría se basan en la presentación simultánea de las lesiones, la similitud histológica, la alta frecuencia de afectación bilateral ovárica, y en el caso de unilateralidad afectación del lado derecho, además de presencia de lagos de moco disecionando el estroma ovárico (Pseudomixoma Ovarii)^{38, 65, 66, 66}. Estudios moleculares sobre análisis de mutaciones en el gen c-Ki-Ras en tumores sincrónicos, también, sugieren una naturaleza clonal de las lesiones^{67, 68}.

b-2 Tumor borderline tipo endocervical.

Constituyen el otro 15 %, y se da en pacientes más jóvenes, con una edad media de 34 años⁶¹. La afectación bilateral, a diferencia de los anteriores, alcanza el 40 % de los casos. Se ha relacionado en un 20 % con endometriosis ovárica^{38,61}. En el momento del diagnóstico el 20 % presenta afectación del peritoneo o de los ganglios linfáticos, sin embargo los implantes peritoneales son discretos, conteniendo glándulas mucinosas en un estroma fibroso, sin haberse descrito ningún caso asociado a pseudomixoma peritonii ⁶¹.

Macroscópicamente son de menor tamaño que los anteriores, con un diámetro medio de 8 cm, y uniloculares, mostrando la mayoría de ellos formaciones papilares intraquísticas⁸. El patrón

microscópico es similar a los tumores borderline serosos, con complejas estructuras papilares, tapizadas por epitelio columnar endocervical-like, con leve o moderada atipia y sin signos evidentes de invasión estromal. Un hallazgo característico de estas lesiones es la presencia de un marcado componente inflamatorio en los ejes conectivo-vasculares de las papilas ^{61,38}. Al igual que los otros tumores borderline, se ha descrito focos de microinvación, inferiores a 10 mm, sin evidencia de enfermedad tras un seguimiento de 8 años ⁶⁹.

c- Malignos:

Reciben el nombre de cistadenocarcinomas mucinosos. Son menos frecuentes que los serosos, representando el 10% de todos los cánceres ováricos²⁴. La afectación bilateral es rara, y ante este hallazgo debemos descartar la presencia de un tumor primario gastro-intestinal ^{63, 70}. Macroscópicamente son tumores que no se diferencian de su contraparte benigna, aunque algunos pueden llegar a ser francamente sólidos⁸. El contenido de los quistes puede ser acuoso, gelatinoso o francamente hemorrágico, como consecuencia de torsión de pedículos vasculares²⁴. El epitelio puede ser relativamente similar al epitelio de los tumores benignos, aunque aquí se reconocen imágenes de invasión franca del estroma. Sólo en los casos más indiferenciados, las células se acompañarán de atipia citológica importante y habrán perdido en buena medida la capacidad de producción de moco, haciendo por tanto difícil su reconocimiento histológico^{24, 71}.

El pronóstico es relativamente mejor que el de los serosos, traduciéndose su comportamiento agresivo por las recidivas locales pélvicas y la invasión de órganos vecinos ^{71,71}. El estadio de la FIGO es el factor pronóstico más importante. Los tumores en estadio I, incluso con microinvación estromal, comportan un pronóstico tan excelente como los tumores borderline en el mismo estadio^{71, 72}. Sin embargo, los tumores en este estadio que metastatizan se

acompañan de una invasión estromal franca y abundante carcinoma intraepitelial acompañante^{71,72}.

1.2 b.3) Tumores endometrioides.

Los tumores endometrioides representan del 2 al 4 % de todos los tumores ováricos⁸. Menos del 1 % de los tumores ováricos benignos son endometrioides y casi todos son adenofibromas⁴⁸. Sólo el 2 % de los tumores borderline son endometrioides y los carcinomas endometrioides representan el 15 % de los carcinomas ováricos^{48,49,72}. Entre el 30 – 50% el tumor afecta ambos ovarios. Suelen presentarse en mujeres postmenopáusicas, con una edad media de 55 años⁸.

Son los derivados del tejido endometrial existente en el ovario. El origen de esta heterotopia se ha explicado por dos mecanismos diferentes; la idea más extendida es la propuesta por Sampson⁷³, que defiende el origen de estos tumores sobre focos de endometriosis ovárica. Otros autores piensan que se desarrollan a partir de una metaplasia endometrial del epitelio de superficie del ovario⁸.

a) Benignos:

Los cistoadenomas endometrioides son raros, y se presentan como quistes tapizados por epitelio endometrial que no poseen estroma endometrial subyacente, característico de los quistes endometriósicos. Algunos autores sugieren que estos tumores no existen como entidad pura⁸. Sin embargo, los adenofibromas endometrioides, si están plenamente aceptados y se caracterizan por la presencia de glándulas endometriales sobre un componente estromal predominantemente

fibroso^{48,74}. La ausencia de estroma endometrial típico, de figuras de mitosis y de hemorragia local recurrente ayuda a diferenciar esta entidad de la endometriosis ovárica⁷⁵.

b) Borderline:

Aproximadamente el 2-3 % de los tumores epiteliales borderline son de naturaleza endometriode^{38, 48}. Se ha visto una asociación con focos de endometriosis en un 38 % de los casos^{75, 76}. Sin embargo, no existe criterios establecidos para distinguir estos tumores de los carcinomas invasivos,^{75, 76, 76}. Por ello se propone seguir los criterios de la OMS, es decir objetivar la presencia de glándulas endometriales con atipia citológica sin identificarse invasión estromal destructiva^{8, 77}. Incluso Scully recomienda que ante esta situación, la atipia debe ser graduada con los criterios utilizados para los adenocarcinomas endometrioides de útero⁷⁷. Por otro lado, si se observa una invasión mayor a 10 mm², se debe diagnosticar de “carcinoma sobre un adenofibroma”⁸.

c) Malignos:

Las formas malignas son básicamente las del Adenocarcinoma endometriode. Suelen ser tumores quísticos, de contenido sanguinolento, con áreas sólidas concomitantes de color blanco grisáceo, y presentan una bilateralidad en el 15-20 % de los casos⁸. Microscópicamente, no difiere del carcinoma uterino; pudiendo presentarse con glándulas neoplásicas atípicas adosadas entre sí, constituidas por epitelio estratificado no mucinoso, con numerosas figuras de mitosis, y detritus intraluminales, que infiltran el estroma subyacente. En un 30 % de los casos existe diferenciación escamosa asociada, tipo metaplásica (Adenoacantoma) o atípica (Ca. Adenoescamoso)^{24, 78}. También se pueden presentar con un patrón cribiforme o velloglandular

con papilas vellosas protuyendo hacia la cavidad quística. Ocasionalmente aparecen con abundante material glucógeno en la porción apical citoplasmática que secreta hacia la luz glandular, denominándose adenocarcinomas endometrioides secretores²⁴. También pueden existir áreas con otra diferenciación müllerianas, adquiriendo un patrón seroso papilar o de células claras, por lo que es necesario realizar una seriación amplia de la pieza para realizar un diagnóstico histológico correcto⁸. Otras formas menos frecuentes se han encontrado en este tipo de tumores; glándulas dilatadas con material eosinófilo tipo coloide que remedan el struma ovarii; patrón microfolicular similar a los tumores de la granulosa del adulto; patrón insular o trabecular tipo carcinoide; y también con áreas que simulen los tumores de Sertoli-Leydig.

El adenocarcinoma endometrioide del ovario puede estar asociado a un adenocarcinoma endometrioide endometrial, de iguales características microscópicas. Se ha visto una asociación entre ambos tumores en un 15-20 % de los casos siendo en muchos casos lesiones sincrónicas independientes^{74, 77, 79, 80}.

1.2 b.4) Tumores de células claras.

De histogénesis un tanto confusa; inicialmente se les denominó mesonéfricos por creer que derivaban del mesonefros. Actualmente se acepta que tienen una naturaleza mülleriana, no sólo por su asociación con quistes endometriósicos en un 24 % de los casos, sino también por la relación que guardan con el resto de tumores epiteliales del ovario, asociándose con el carcinoma endometrioide en un 24 % de los casos.

a) Benignos y borderline :

Son extremadamente raros. El diagnóstico de adenofibromas de células claras se restringe a aquellos donde las glándulas están tapizadas por un epitelio benigno. La presencia de atipia citológica y la proliferación epitelial sin invasión estromal franca nos evoca al diagnóstico de tumor borderline de células claras⁸. Estos representan menos del 1 % de los tumores borderline y el 5-8 % de todos los tumores de células claras^{8, 38, 48}. La mayoría de los casos de tumores borderline publicados presentan una morfología adenofibromatosa, por lo que el diagnóstico diferencial nos debe hacer pensar en la variante benigna⁸¹. Por otro lado, se ha visto que muchos de los tumores borderline de células claras se asocian a focos de carcinoma, por lo que se debe realizar un amplio estudio histológico para diagnosticar la forma pura borderline^{8, 38}.

b) Malignos:

Los carcinomas de células claras tienen una presentación clínica y un comportamiento biológico diferente al resto de los tumores epiteliales de ovario^{82, 83, 84}. Son tumores que se presentan como grandes masas pélvicas, que rara vez se presentan de manera bilateral, y que con frecuencia se asocian a focos de endometriosis, siendo frecuente encontrar quistes endometriósicos adyacentes o intercalados con el tumor^{8, 24}. Clínicamente pueden acompañarse de complicaciones tromboembólicas y de alteraciones endocrinas como la hipercalcemia⁸⁵.

Microscópicamente se caracterizan por la presencia de patrones arquitecturales diferentes como sólido, papilar, glandular y/o tubulo-quístico, aunque frecuentemente suelen darse una mezcla de todos ellos dentro del mismo tumor, con un estroma fibroso circundante^{8, 85}. Citológicamente puede presentar gran pleomorfismo nuclear y diferentes peculiaridades, siendo las más comunes las células poligonales de citoplasma claro rico en glucógeno, y las células con

morfología "en tachuela" (Hobnail cells), con grandes núcleos picnóticos, que hacen prominencia hacia la luz glandular ⁸⁶.

Los carcinomas de células claras parecen tener un curso clínico y un comportamiento biológico más agresivo que el resto de los tipos histológicos, presentando tiempos de supervivencia y periodos libres de enfermedad más cortos ^{8,83,85,86}, asociado, entre otros factores, a una resistencia a la quimioterapia convencional con los derivados del platino ^{85, 87, 87}.

1.2 b.5) Relación de la endometriosis ovárica y el carcinoma endometriode y de célula clara

La asociación entre estos tipos de tumores y focos de endometriosis ovárica, bien en el mismo ovario, o en cualquier lugar de la pelvis, es hasta del 42 % en algunas series ⁸⁸.

Fue Sampson en 1925 ⁷⁴ el primero en describir tumores malignos de tipo endometrial en el ovario asociado a un quiste endometriósico. Por ello consideró la endometriosis como lesión preneoplásica definiendo tres criterios para establecer dicho origen:

1-Presencia de las dos lesiones en el mismo ovario.

2-La relación histológica, entre el componente benigno y maligno, debe de ser la misma que la observada, en el carcinoma endometriode uterino y el epitelio endometrial no neoplásico.

3-Se debe descartar invasión neoplásica secundaria de otra localización.

Veinticinco años más tarde, Scott ⁸⁹ añadió como cuarto criterio la presencia de una transición gradual entre el epitelio benigno al maligno en la misma preparación histológica. Con estos criterios se definen las lesiones endometriósicas que pueden ser consideradas como premalignas; utilizando estos criterios, estrictamente, se objetiva que, sólo, alrededor del 1 % de las endometriosis evolucionan a neoplasias ⁹⁰.

Posteriormente se observó que presentan una gran variedad histológica, como puede ser el adenoacantoma y el carcinoma de células claras^{91, 92}. Así Scully⁹² observó en 4 de 11 casos recogidos, de carcinoma de células claras, un crecimiento tumoral en el interior de un quiste endometriósico; Aure⁹³, la encontró en un 24 % de los casos y Coll⁹⁴ en el 50 %. Se estableció una relación entre endometriosis y carcinoma de células claras 6 veces mayor que la encontrada entre la endometriosis y los carcinomas de ovario en general⁹³.

Por otra parte, el potencial oncogénico de la endometriosis continúa siendo controvertido^{95, 96}, algunos autores han puesto de manifiesto que la endometriosis con signos de atipia tiene mayor riesgo de transformación neoplásica⁹⁷. En las zonas de transición puede haber proliferación glandular similar a la observada en la hiperplasia endometrial, y cambios celulares con núcleo aumentado de tamaño e hiper cromatismo, aunque estos cambios citológicos son más frecuentes en los casos de carcinomas de células claras^{98, 98}.

También se ha especulado sobre el papel de los estrógenos en los cambios metaplásicos y posterior transformación maligna del epitelio^{99, 100}. Por ello, algunos autores recomiendan el uso de progestágenos en la terapia sustitutiva para reducir el riesgo de tumores relacionados con la endometriosis⁹⁹.

Se ha descrito que las pacientes afectas por carcinomas endometrioides asociados a endometriosis en el mismo ovario, son de 5 a 10 años más jóvenes que las que padecen un tumor no asociado a endometriosis¹⁰¹. Por otro lado, también se ha asociado a tumores con estadios clínicos más precoces, por lo que algunos autores apoyan la idea de hacer un subgrupo histológico que presenta un mejor pronóstico¹⁰². Esto puede deberse a que la endometriosis, casi siempre, presenta síntomas, lo que permite realizar diagnósticos precoces de tumoraciones

adyacentes. Por el contrario, la mayoría de las pacientes con cancer ovárico avanzado son relativamente asintomáticas⁹¹.

1.2 b.6) Tumores de células transicionales

Son tumores cuya histogénesis ha sido controvertida desde su descripción por Brenner en 1907, quien creyó que se originaban a raíz de estructuras del folículo; algunos autores siguen fieles a esa teoría¹⁰³. Otros postularon la idea del desarrollo partir de los islotes de Walthard, encontrados en la serosa de las trompas de Falopio y ocasionalmente en el hilio ovárico¹⁰⁴. También se supuso que se originarían sobre vestigios del conducto de Wolf, remedando el epitelio urinario¹⁰⁵. Sin embargo, hoy en día está ampliamente aceptado, que estos tumores derivan del epitelio celómico superficial del ovario, y que sufren metaplasia de tipo urotelial, lo que le confiere el aspecto transicional^{8,24}.

a) Benignos:

La mayoría son benignos, denominados Adenomas de células transicionales (tumor de Brenner). Representan el 4 % de todos los tumores benignos epiteliales⁴⁸. Suelen aparecer en mujeres de edad avanzada^{8,107}. Suelen ser unilaterales, de dimensiones variables que van desde focos microscópicos hasta grandes tumores que ocupan la cavidad abdominal⁸. Al corte son sólidos, de consistencia firme, recordando a los fibromas^{8,24}. Microscópicamente se caracteriza por la existencia de elementos epiteliales de morfología transicional agrupados, formando nódulos, rodeados de tejido conectivo denso, conteniendo abundantes fibras reticulares. Ambos constituyentes, epitelio y estroma, son la base del diagnóstico histológico^{8,24}. Algunos nidos epiteliales presentan fenómenos degenerativos en el centro, traduciéndose en muchos casos por

espacios ópticamente vacíos y recordando así a la imagen del folículo ovárico . Pueden encontrarse focos de calcificación hasta en un tercio de los casos⁸. Además pueden presentar zonas de epitelio seroso o mucinoso, denominándose tumor de Brenner metaplásico¹⁰⁶.

b) Borderline y malignos.

Además de las formas benignas, también se han descrito formas de potencial incierto o de bajo grado ^{8, 38} y otras francamente malignas, los denominados carcinomas de células transicionales. Se han descrito casos con tumores sincrónicos o metacrónicos con carcinomas de células transicionales en la vejiga urinaria por lo que, en estos casos, conviene primero descartar un origen primario vesical ^{107, 108}. Un 15 % de carcinomas de células transicionales se han asociado a hiperplasia endometrial y pueden ser estrógenos –secretantes ^{24, 109}.

1.3 METODOS DIAGNÓSTICOS

El método que parece dar mejores resultados diagnósticos es la ultrasonografía transvaginal completada con el estudio mediante doppler color del flujo sanguíneo intratumoral¹¹⁰. El problema que se presenta es establecer unos protocolos de “screening” adecuados ya que el coste de la realización de pruebas de cribaje en el total de la población resultaría de proporciones incalculables.

Es importante considerar los factores de riesgo¹¹². La presencia de antecedentes familiares de carcinoma de ovario, o los antecedentes personales de tumores previos como mama, endometrio o colón son factores de primer orden. Otros datos clínicos a tener en cuenta son la nuliparidad, o baja fertilidad, así como historia de disfunción ovárica persistente y endometriosis ovárica^{8, 24}. Por lo general, se usan los procedimientos diagnósticos en las pacientes de riesgo o si hay síntomas, o hallazgos en la exploración ginecológica que los hagan necesarios¹¹¹.

La ecografía transvaginal es un método excelente para el diagnóstico, ya que valora unos criterios morfológicos fácilmente valorables, como el tamaño, la presencia de cavidades, la estructura de la pared y de los septos así como la presencia de ascitis¹¹². En los casos dudosos el doppler color es de gran utilidad, ya que tiene la ventaja de seleccionar los vasos sanguíneos sospechosos de estar afectados por la neoplasia, que destruye la capa muscular de las arterias, las dilata, y deforma la típica onda pulsátil que se obtiene, objetivando esta alteración con el índice pulsátil y de resistencia¹¹³.

Otro frente para abordar el diagnóstico precoz es la detección de antígenos específicos, producidos por las células tumorales. Se han utilizado numerosos marcadores tumorales como CA 125, CA 602, NB/70, LSA, UGF, CSF-1, CA 15.3, CA19.9, CF50, CA195, CF 511, TAG-

72, PP-4, STN, TPA, CEA, PLAP, HMFG 1, HMFG 2, IAP, IL6¹¹⁴, pero ninguno cumple los requisitos ideales exigidos, es decir máxima sensibilidad y especificidad. El que se ha demostrado más útil en la práctica es el Ca 125, que está presente en más del 80 % de los carcinoma no mucinosos, pero tampoco es específico, pudiéndose encontrar elevado tanto en otros carcinomas, como en situaciones no neoplásicas tales como miomas, endometriosis, diverticulitis, enfermedad pélvica inflamatoria o al inicio de la gestación¹¹⁵. Por otro lado, es poco sensible en fases iniciales, siendo negativo en más del 50 % de los tumores en estadio I. Por ello, se debería solicitar otros antígenos tumorales, como el OVX1, NB/70K, CA 15-3, TAG 72'3 y el M-CSF, ya que parecen estar significativamente aumentados en el 98 % de los tumores de ovario en estadio I¹¹⁶.

Hay que tener en cuenta, la práctica de otras exploraciones, como la tomografía axial computarizada o la resonancia magnética nuclear, cuando la ecografía no sea concluyente o en los casos en los que sospeche enfermedad diseminada¹¹⁷.

El diagnóstico clínico debe realizarse por técnicas quirúrgicas de laparotomía o laparoscopia. Mediante estas técnicas se puede explorar la extensión de la tumoración anexial en la cavidad intraperitoneal, practicar lavados peritoneales para estudio citológico y biopsias de los espacios infradiafragmáticos, espacios paracólicos, fondo de saco de douglas, epiplon mayor, muestreo ganglionar iliacos y paraaórticos, zona de adherencias o de masa extragenital anómala y ovario contralateral cuando sea macroscópicamente patológico, y así conocer su verdadera extensión, antes de iniciar el tratamiento¹¹⁸.

Debe existir confirmación histológica de la enfermedad. La pieza quirúrgica debe ser remitida íntegra al laboratorio de Anatomía Patológica, ya que, el estadiaje debe ser tanto más exhaustivo, cuanto menor sea la extensión macroscópica^{119, 120}.

1.4 FACTORES PRONÓSTICOS

Los factores pronósticos son utilizados para definir el riesgo individual de recurrencia y pueden tener implicaciones prácticas para la elección de un tratamiento selectivo.

1.4 a) Factores clínicos

1.4 a.1) Estadio clínico.

El factor que más influye sobre la mortalidad en estos tumores es la extensión del tumor^{8, 121, 122, 123, 124}. Por ello, uno de los mejores avances para el manejo de las pacientes con patología ovárica oncológica, es la utilización de estadios según el estudio de la pieza quirúrgica. La estadificación del carcinoma de ovario fue revisada y modificada por la F.I.G.O en el año 1985, publicándose sus resultados en el año 1987¹²⁵. En él se adoptó una clasificación de estadificación patológico-quirúrgico, en el cual se incluyen parámetros que están relacionados con el riesgo de recidiva y el pronóstico de supervivencia. Entre estos parámetros se encuentran: rotura de la cápsula ovárica, presencia de tumor en la superficie ovárica, células malignas en el líquido ascítico, extensión y/o implantes en útero, trompas, u otros tejidos pélvicos y las metástasis regionales o a distancia .

ESTADIOS DE LA F.I.G.O. PARA EL CANCER DE OVARIO¹²⁵

*Estadio I: Crecimiento limitado a los ovarios.

Ia: Limitado a 1 ovario. Cápsula íntegra. No ascitis.

Ib: Limitado a los 2 ovarios. Cápsula íntegra. No ascitis.

Ic: Ia ó Ib con cápsula rota ó afecta y/ó ascitis o lavados positivos.

*Estadio II: Extensión a la pelvis.

IIa: Extensión a útero y/ó trompas.

IIb: Extensión a otros tejidos pélvicos.

IIc: IIa ó IIb: con cápsula rota ó afecta y/ó ascitis ó lavados positivos.

*Estadio III: Extensión a peritoneo o a los ganglios:

IIIa. Implantes microscópicos en la superficie del peritoneo abdominal.ç

IIIb. Implantes peritoneales abdominales menores de 2 cm.

IIIc. Implantes peritoneales abdominales mayores de 2 cm. ó ganglios retroperitoneales ó inguinales positivos.

*Estadio IV: Metástasis a distancia. Derrame pleural con citología positiva.

1.4 a.2) Edad:

Se ha considerado como otro factor clínico de asociación con la supervivencia. A pesar de que el pronóstico empeora conforme avanza la edad ^{8, 126}, este factor sigue siendo controvertido⁸. Al parecer, el peor pronóstico no se debe a la índole del tumor, ya que, en general, son menos agresivos en edades avanzadas, sino a que la edad representa una limitación para el empleo de ciertas terapéuticas más agresivas^{127,128}.

1.4 a.3) Estado general:

El estado general de las pacientes en el momento del diagnóstico, también parece una factor importante para la aplicación de las diferentes terapias, y por tanto se correlaciona con la esperanza de vida^{121, 123}.

1.4 a.4) Enfermedad residual :

Un factor de suma importancia es la presencia de enfermedad residual tras la cirugía, y en su caso, el número de lesiones residuales ^{8, 24,121,122,123}. Incluso, algunos autores, postulan que realizar cirugía con efectos subóptimos no se asocia a mejores resultados en la supervivencia ^{129,130}.

1.4 a.5) Otros factores como la presencia de ascitis en el momento del diagnóstico, o la rotura espontánea de cápsula pre- o intraoperatoriamente están asociados a un peor pronóstico, pero son factores que afectan el estadio clínico, por lo que no se consideran factores independientes ^{8, 122}.

1.4 b) Factores anatómo-patológicos:

A pesar de la importancia del estadio en la evolución y pronóstico de las pacientes, la investigación básica sobre el carcinoma de ovario nos ha permitido utilizar otros hallazgos morfológicos que han demostrado ser muy válidos, para evaluar la agresividad en el comportamiento de estos tumores.

1.4 b.1) Tipo histológico :

Se aplica exclusivamente la clasificación de la O.M.S.¹⁹, comentada previamente en el capítulo de clasificación histológica y las diferentes variantes en el capítulo de anatomía patológica de los tumores epiteliales de ovario. Sin embargo, el papel de factor pronóstico según el tipo de célula tumoral sigue sin tener unos criterios establecidos por toda la comunidad científica ⁸. Sin embargo, se acepta que carcinomas indiferenciados y los transicionales son siempre de alto grado, al igual que los carcinomas de células claras, por lo que se les considera de

peor pronóstico histológico¹³⁴. El 70 % de estos tumores, se diagnostican en un estadio I, pero la tasa de recurrencias llega al 40 % , muy superior a las mostradas por carcinomas serosos o mucinosos en el mismo estadio⁸⁵. Por otro lado los tumores mucinosos suelen ser neoplasias de bajo grado, pero cuando están asociados a pseudomixoma peritonei el pronóstico es infausto⁶⁶.

1.4 b.2) Grado de diferenciación histológico :

Ha sido ampliamente estudiados por diversos autores que han propuesto diferentes sistemas de gradación. Uno de los más antiguos es el de Broder, que considera 4 grados teniendo en cuenta el porcentaje de células con anaplasia nuclear (< 25 %, < 50 %, < 75%, >75 % de la población celular total). En 1979, Russell propuso un sistema que evaluaba el patrón, la citología, el número de mitosis y la presencia de calcificaciones¹³¹. Posteriormente, otros autores han propuesto un sistema, basado en el sistema de Nottingham utilizado para la gradación del cáncer de mama, que considera el patrón arquitectural del tumor, el pleomorfismo nuclear y las mitosis¹³². La arquitectura se basa en la presencia de diferentes patrones, que deben de representar más del 50 % del tumor; siendo el glandular el grado 1, el papilar el grado 2 y el sólido el grado 3 . El grado nuclear se evalúa también en tres grados, así como el número de mitosis que considera de 0 a 7 mitosis por 10 campos de gran aumento (usando el objetivo 40 X) como grado 1, de 8 a 18 como grado 2, y más de 18 como grado 3¹³³.

Actualmente , la mayoría de los patólogos usan el patrón arquitectural del tumor, en los tumores de tipo endometrioides dependiendo del porcentaje de áreas sólidas: Grado 1: Menos del 10 % de componente sólido; Grado 2: hasta el 50 % de áreas sólidas. Grado 3 : más del 50 % de áreas sólidas. Considerando los otros factores de manera independiente¹³⁴. En los otros tipos histológicos se suele usar el grado nuclear. Además hay que considerar a los diferentes tipos

histológicos como lesiones que no son uniformes y en ocasiones , es una tarea difícil subjetivar la graduación debido a la heterogeneidad de los propios tumores ^{8, 134}. Sin embargo, varios estudios han correlacionado el grado histológico con la supervivencia ^{123, 135, 136}.

1.4 b.3) Rasgos nucleares:

El índice núcleo/citoplasma, la regularidad de la membrana nuclear, la presencia de nucleolos , su número y tamaño, han sido considerados como datos pronósticos ^{133, 134}. A pesar de que, generalmente, el grado histológico y el nuclear van paralelos en el carcinoma seroso, algunos autores prefieren realizar estudios morfométricos, mediante análisis de imagen, de los rasgos nucleares como el área , la densidad, la regularidad de la membrana para hacer más objetivo y reproducible estos parámetros ^{137, 138}.

1.4 b.4) El índice mitótico:

La cuantificación de figuras de mitosis en 10 campos de gran aumento proporciona el grado de proliferación que tiene dicho tumor ⁸, sin embargo en algunos estudios se plantean la relevancia pronóstica de este parámetro en los adenocarcinomas serosos ¹³⁹. Igualmente, también se ha propuesto el uso de programas de análisis morfométricos donde se estimen el índice de mitosis por volumen de células malignas ^{137, 138}.

1.4 b.5) Otras variables como el grado de necrosis, la falta de respuesta inflamatoria, la invasión de los espacios linfovasculares y, los caracteres y cantidad del tejido estromal intratumoral desmoplásico se han considerado como factores pronósticos por algunos investigadores ^{139, 140}.

1.4 c) Factores moleculares:

1.4 c.1) Ploidia DNA:

La utilidad de el análisis de DNA mediante citometría de flujo se ha demostrado en varios estudios, tanto en tejido en fresco como en material parafinado. Se ha correlacionado la aneuploidia y una alta fracción de DNA en fase S o de síntesis con los tumores de alto grado, estadios avanzados, mayor presencia de enfermedad residual, y ,por tanto, una menor tasa de supervivencia, en comparación con aquellos tumores que mostraban diploidía y menor fracción de DNA en fase S ^{123, 141, 142, 143}. Algunos autores apoyan que estos hallazgos genómicos son factores pronósticos independientes, existiendo controversia al respecto, ya que otros autores no consideran los resultados, por falta de reproducibilidad^{144, 145}.

1.4 c.2) Alteraciones cromosómicas:

Se han identificado algunos cambios numéricos o estructurales en el cariotipo en relación con los tumores de ovario⁸. La trisomía 12 se ha descrito en algunos tumores borderline, así como en tumores de otras estirpes celulares como los fibromas o los tumores de las células granulosa¹⁴⁶. Los carcinomas poco o moderadamente diferenciados presentan múltiples y complejos cambios en su cariotipo^{146, 147}. Las alteraciones numéricas más comunes son por la pérdidas del cromosoma X o de los cromosomas 22, 17, 13 y 8 ^{8, 146}. Por otro lado, las alteraciones estructurales son más frecuentes y aumentan con el grado y el estadio, afectando a alguno de los siguientes cromosomas 1, 3, 6, 11, 12, 13, 17, 18 y 19 ^{146,147}.

1.4 c.3) Factores de crecimiento, Oncogenes, Genes supresores tumorales y Genes reparadores de DNA:

Solamente algunos de estos factores se han estudiado en los tumores de ovario pero su correlación con el comportamiento biológico no se ha clarificado ⁸.

La expresión de receptores para factores de crecimiento, como el receptor EGFR, se ha relacionado con un peor pronóstico ¹⁴⁸. También se ha visto que los carcinomas de ovario que sobreexpresan el oncogen erbB-2, o el oncogen fms tienen muy mal pronóstico ^{149, 150}.

Respecto a los genes supresores tumorales, se ha visto que los tumores ováricos diagnosticados en estadios avanzados (Estadio III y IV) presentan mutaciones en el gen p53 en un alto porcentaje de casos ¹⁵¹. Las mutaciones en el gen BRCA1 y BRCA2 juegan un papel fundamental en la génesis de tumores ováricos asociados a síndromes familiares. Sin embargo, se ha observado que tumores que presentan alguna de estas mutaciones, tienen un curso clínico menos agresivo comparado con los tumores esporádicos, que no presentan estas alteraciones genéticas ¹⁵².

1.4 c.4) Actividad proliferativa:

La proliferación celular puede ser calculada mediante el recuento de células en mitosis, en la tinción con hematoxilina-eosina, en 10 campos de gran aumento. Sin embargo, las técnicas de inmunohistoquímica nos proporcionan el análisis de proteínas intranucleares involucradas en la proliferación celular, como el Ki67 (MIB 1) ó PCNA (proliferación cell nuclear antigen). En carcinomas de ovario, se ha visto una correlación entre grado histológico, estadios clínicos avanzados y cortos periodos de supervivencia ¹⁵³.

1.5 TRATAMIENTO

El tratamiento estándar del cáncer de ovario en estadios iniciales, será básicamente, la cirugía, con una finalidad tanto diagnóstica como terapéutica. En los casos diagnosticados en estadios avanzados, la cirugía puede proporcionar buenos resultados asociados a otros tratamientos adyuvantes^{3, 154}.

1.5 a) Cirugía:

1.5 a1) La cirugía en los tumores Borderline:

La naturaleza y el comportamiento biológico de estos tumores, conlleva controversia y dificultad a la hora de elegir el tratamiento más adecuado. En primer lugar, su diagnóstico, especialmente si es intraoperatorio, es frecuentemente problemático, ya que se ha descrito hasta un 30 % de casos con lesiones invasivas en el estudio histológico diferido^{155 156}.

Por otro lado, dado que el 30 % de estos tumores se diagnostican en mujeres de menos de 40 años, no es infrecuente que se plantee el deseo de preservar la fertilidad. En general en los estadios I el tratamiento de elección de salpingo-ooforectomía unilateral¹⁵⁷, realizando la estadificación quirúrgica. Los implantes peritoneales, a pesar que en ocasiones regresan tras la exéresis del tumor primario, deben researse en todos los casos¹⁵⁸.

1.5 a.2) La cirugía en el Estadio I y II:

Sólo un 10-15 % de todas las pacientes con cáncer epitelial de ovario son diagnosticadas en un estadio inicial de la enfermedad. La cirugía recomendada es la histerectomía abdominal total con salpingo-ooforectomía bilateral, más omentectomía, y la posibilidad de linfadenectomía,

ya que existe un alto porcentaje de casos con afectación del ovario contralateral, incluso con focos microscópicos y por el riesgo de diseminación linfática¹⁸.

En pacientes jóvenes, afectadas por un tumor bien diferenciado, en estadio Ia y con deseo de preservar la fertilidad, pueden tratarse mediante salpingo-ooforectomía unilateral¹⁵⁹, teniendo en cuenta que la tasa de recurrencias descritas en diferentes series puede alcanzar hasta el 30 %¹⁶⁰.

1.5 a.3) La cirugía en estadios avanzados (III y IV):

El tratamiento de elección para los tumores de ovario en estadio avanzado se basa en una cirugía citorreductora agresiva, que incluye la resección de ambos ovarios, trompas de Falopio, útero, omento, linfadenectomía pélvica y paraaórtica y todas las lesiones visibles o palpables de la cavidad abdominal y del espacio retroperitoneal. Incluso en los casos en los que la extirpación completa sea imposible, la resección parcial del tumor, es en todo caso beneficiosa, sobre todo cuando se administra quimioterapia adyuvante.

El objetivo de la cirugía citorreductora se basa en resultados empíricos descritos por Griffiths y cols,¹⁶¹ apoyando el concepto que cuanto menos volumen de tumor residual quede adherido, sin extirparse, en la cirugía inicial, mayor tiempo de supervivencia y periodo libre de enfermedad tendrá la paciente. Por otro lado, consideraron cirugía óptima cuando se consigue extirpar la enfermedad abdominal con masas residuales no mayores de 1-2 cm de diámetro y cirugía subóptima, cuando dejamos masa residual mayor de 2 cm. Se ha visto que no existen diferencias significativas en la supervivencia acumulada, entre tumor residual de 1 ó de 3 cm. Sin embargo, si existen diferencias cuando lo comparamos con la supervivencia de los casos sin neoplasia residual¹⁶².

1.5 b) Quimioterapia.

El tratamiento de elección ,después cirugía , en las pacientes con enfermedad residual , o aquellas con alto riesgo de recurrencia, es la quimioterapia combinada. Pacientes afectas por tumores bien o moderadamente diferenciados en estadio IA o IB, tienen una supervivencia global a los 5 años del 91 al 98 %, que no mejorara tras tratamientos adyuvantes¹⁶³. Sin embargo, las pacientes con un estadio IC, es decir con rotura cápsular prequirúrgica o con lavados peritoneales positivos, con tumores IA ó IB pero histológicamente pobremente diferenciados, o en estadio II, tienen un mayor riesgo de recurrencia, por lo que son candidatas a recibir tratamiento adyuvante^{164 165 166}.

En el tratamiento del cáncer de ovario avanzado, la quimioterapia se considera el complemento fundamental a la cirugía. Desde la introducción de la terapia combinada , basada en los derivados del platino, la supervivencia de estas pacientes a los 5 años ha mejorado significativamente. La supervivencia es, aproximadamente, del 50 % a los dos años, reduciéndose al 20 % a los 5 años^{23 167}. Sin embargo, las pacientes que presentan mayor periodo libre de enfermedad y tiempo de supervivencia, son las que no presentan enfermedad residual tras la cirugía¹⁶⁸. Previamente, mujeres con carcinoma de ovario en estadio avanzado tratadas con cirugía , con o sin radioterapia, tenían una supervivencia del 20-25 % al año e inferior al 5 % a los 5 años¹⁶⁹.

Desde los años 70 se ha venido investigando ,mediante ensayos comparativos randomizados, cual es el esquema ideal de quimioterapia para el tratamiento de cáncer de ovario avanzado. Inicialmente los agentes disponibles fueron los alquilantes como el melfalán ó ciclofosfamida, y las antraciclinas como adriamicina. La era de la quimioterapia moderna comenzó, en 1979 con el uso rutinario del cisplatino en el manejo del cancer de ovario, y desde

entonces ha evolucionado mucho. Se han utilizado diferentes esquemas de tratamiento . Se observó que el uso del cisplatino con algún otro fármaco, era igual de eficaz que esquemas terapéuticos de poliquimioterapia. Durante la década de los ochenta, fue la combinación cisplatino con ciclofosfamida, la más utilizada en los casos avanzado¹⁷⁰. El cisplatino tiene como efecto secundario ser muy emetizante y en altas dosis puede provocar neuropatías y nefropatías, entre otros efectos secundarios. Por ello, ha sido sustituido por un derivado ,el carboplatino, que es equivalente en la eficacia pero presenta menos toxicidad¹⁷¹. Los sucesivos estudios encaminados a perfeccionar los esquemas de quimioterapia permitieron definir el esquema de carboplatino 75 mg/m² + ciclofosfamida 750 mg/m² , cada 3 o 4 semanas, en 6 ciclos.. Con estas combinaciones, las remisiones completas patológicas alcanzan porcentajes del 50 % en pacientes con citoreducción óptima y entre el 20-30 % en pacientes con citoreducción subóptima ¹⁷².

Una de la estrategias para aumentar la tasa de remisiones completas patológicas ha sido la utilización de nuevas drogas. En los últimos años el descubrimiento del Paclitaxel (Taxol), ha constituido un avance significativo en el tratamiento de este tumor. Este fármaco se obtiene de un producto de la corteza de una planta, *Taxus brevifolia*, del tejo del Pacífico, y ejerce su efecto citotóxico a través de un único mecanismo de acción que involucra la polimerización de los microtúbulos, provocando una parada del ciclo celular entre la segunda fase de gap (G₂) y la fase de mitosis³. Un estudio del grupo de Oncología Ginecológica (GOG) indica que el paclitaxel, en combinación con cisplatino ó derivados, da mejores resultados que el esquema terapéutico estandar (carboplatino 75 mg/m² + ciclofosfamida 750 mg/m²de ciclofosfamida). Encontraron que las pacientes tratadas con paclitaxel y cisplatino tenían un periodo libre de enfermedad y un tiempo de supervivencia medio de 18 y 38 meses respectivamente, mientras que las tratadas con la combinación de ciclofosfamida y cisplatino presentaban un periodo libre de enfermedad y de

supervivencia medio de 13 y 24 meses, respectivamente ($p < 0.001$)¹⁷³. La forma más idónea para de administración del paclitaxel está por definir. Las recomendaciones actuales del tratamiento quimioterápico del cáncer de ovario avanzado son cisplatino 75 mg/m² + Paclitaxel (Taxol) 135 mg/m² en 24 horas, cada 3 semanas por 6 ciclos¹⁷⁴.

En algunos casos, cuando la enfermedad está tan avanzada que no es posible realizar una cirugía citoreductora óptima, la quimioterapia es el tratamiento de elección inicial ; es lo que se denomina quimioterapia neoadyuvante. Tras 3 o 4 ciclos de quimioterapia se puede volver a valorar la posibilidad de cirugía, y, en caso de ser posible, completar el tratamiento quimioterápico tras la cirugía. Esta estrategia parece viable, pudiéndose conseguir la citorreducción óptima en pacientes que inicialmente no eran quirúrgicas . Sin embargo, estudios recientes no muestran diferencias en tiempo de supervivencia, ni en periodos libre de enfermedad, entre un grupo de enfermas tratadas con quimioterapia neo-adyuvante y las tratadas con cirugía citoreductora más la quimioterapia combinada^{175 176}.

Otra vía de administración de la quimioterapia es la vía intraperitoneal. Consiste en introducir fármacos citotóxicos mediante un catéter insertado en la cavidad peritoneal, con el fin de minimizar los efectos secundarios sistémicos y así poder aumentar la dosis del fármaco citotóxico en contacto directo con el tumor.¹⁷⁷ El fármaco ideal para este tipo de administración, es aquel que pueda tener un radio de concentración mayor en peritoneo que en plasma, que presente una relación dosis respuesta de tipo exponencial, y aquellos que no sean irritante localmente. Estas características las cumple el cisplatino y el taxol⁴⁵. Aunque queda por definir el papel de la quimioterapia intraperitoneal, un estudio reciente indica que el esquema de administración mixto, cisplatino intraperitoneal y ciclofosfamida intravenosa, da mejores

resultados de supervivencia que los observados con la pauta intravenosa, en pacientes con estadio III y citoreducción óptima¹⁷⁸.

1.5 c) Inmunoterapia:

Aunque sólo existen resultados preliminares, otras de las técnicas que parecen tener futuro en el manejo del cáncer de ovario refractario, es la administración intraperitoneal de linfoquinas autólogas activadoras de linfocitos T8 o de anticuerpos conjugados de tóxicos o radioisótopos¹⁷⁹. El tratamiento con interferón gamma recombinante intraperitoneal en pacientes con enfermedad residual tras un second-look demostró una tasa de respuesta completa del 23 %¹⁸⁰. En otro estudio reciente, el tratamiento con interferón alfa, demostró una respuesta objetiva en el 28 % de pacientes con tumores sensibles a derivados del platino y enfermedad residual inferior a 0.5 cm, mientras que no presentaba respuesta alguna en las pacientes con tumores resistentes al platino.¹⁸¹

1.5 d) Terapia Génica:

Los avances en la biología molecular han permitido el desarrollo de la terapia génica como nueva arma para el tratamiento de las neoplasias de ovario. A pesar que la seguridad de la transferencia de genes al ser humano se ha confirmado repetidamente, la mayoría de los ensayos clínicos están actualmente en fase I. Estos ensayos evalúan diferentes estrategias terapéuticas:

1-Reemplazamiento de genes supresores tumorales para compensar mutaciones, mediante vectores víricos como el adenovirus u otros retrovirus (ej: p53¹⁸², BRCA1¹⁸³ ...).

2-Quimioterapia molecular. Mediante inserción de un gen (gen HSV-tk- Virus Herpes simple Thimidin- quinasa) y tras la administración de un fármaco antivírico como el ganciclovir, pasará a la forma trifosfato produciendo la muerte celular¹⁸⁴.

3-Inmunoterapia antitumoral trasferiendo genes productores de citoquinas como la Interleuquina-2¹⁸⁵, con el fin de potenciar el sistema inmune.

4-Inhibición de la expresión de oncogenes dominantes (gen erb-B2) y ó genes involucrados en quimioresistencia¹⁸⁶.

1.6 BIOLOGÍA MOLECULAR DEL DESARROLLO Y PROGRESIÓN DEL CARCINOMA OVÁRICO

En los últimos años la biología molecular ha dado algunos frutos para el entendimiento de los acontecimientos que dirigen la génesis y la biología del cancer . Sin embargo, la progresión del epitelio ovárico normal a tumoral así como los mecanismos genéticos moleculares causantes de su desarrollo son poco conocidos³ . A esto hay que añadir que las alteraciones genéticas más comunes en otras neoplasias no resultan aplicables a la mayoría de los carcinomas de ovario.

Se acepta la hipótesis de que la transformación maligna del epitelio de superficie ocurre a partir de los quistes epiteliales de inclusión que se forman tras múltiples ovulaciones¹⁸⁷ . Así, bajo la influencia de estímulos oncogénicos el epitelio benigno atrapado se transformaría en maligno e invasivo¹⁸⁸ . La investigación para luchar contra el cancer de ovario se está centrando en entender el los cambios moleculares relacionados con la iniciación y la progresión tumoral, ya que permitiría establecer un diagnóstico precoz, identificar tumores de mayor agresividad y justificar tratamientos con pacientes de alto riesgo, además de proporcionar objetivos para nuevas estrategias terapéuticas.

Se considerará que en el proceso de la carcinogénesis ovárica participan múltiples alteraciones genéticas, como el trastorno en la producción y respuesta de los factores de crecimiento, la activación de protooncogenes ó la inactivación de genes supresores tumorales.

La mayoría de los tumores de ovario son de aparición esporádica, y no presentan alteración genética específica. Parecen resultar de un proceso complejo que incluye la acción de numerosos oncogenes y genes supresores tumorales como se ha mencionado anteriormente. Sin embargo, se piensa que aproximadamente un 5-10 % de los casos se relacionan con síndromes de

cancer hereditarios¹⁸⁹. En este sentido se reconocen tres síndromes de carcinoma de ovario familiar:

- a) El carcinoma de ovario familiar aislado
- b) Síndrome de cancer Ovario-Mama familiar
- c) Carcinoma de ovario en el contexto de cáncer de colon familiar no asociado a poliposis ó Síndrome de Lynch II.

1.6 a) Factores de crecimiento

Uno de los sistemas de crecimiento y progresión tumoral mejor estudiados es el constituidos por los receptores celulares ErbB con actividad tirosin-kinasa. Esta familia de receptores está formada por cuatro receptores homólogos: HER1 (EGFR o ErbB1), HER2 (neu o ErbB2), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4)¹⁹⁰.

El receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es una glicoproteína transmembrana de 170 KD con actividad intrínseca tirosin-kinasa. Interviene en el crecimiento, diferenciación, motilidad y supervivencia de diversos tipos celulares en tejidos normales y el múltiples tipos de neoplasia¹⁸⁹. Los ligandos mejor estudiados, capaces de unirse a estos receptores, son el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y su homólogo estructural, el factor de crecimiento y transformación alpha (TGF- α). La unión de estos ligandos favorece la activación del receptor por la fosforilación del segmento tirosin-kinasa. Este hecho desencadena una cascada de respuestas bioquímicas y fisiológicas, englobadas en la transducción de señales mitogénicas de las células, estimulando así la proliferación de las células epiteliales no malignas¹⁹¹. Por el contrario la TGF- β inhibe la proliferación de estas células. En condiciones normales, las células epiteliales ováricas expresan tanto el EGF como el TGF- β , a pesar de la baja tasa de proliferación celular^{188,190}.

El significado de la importancia de la sobreexpresión de este receptor (EGFR), viene dada por su relación con un peor pronóstico y por ser susceptible de convertirse en una diana terapéutica mediante el uso de anticuerpos monoclonales contra el receptor, que bloquean su unión al ligando¹⁴⁹.

Por otro lado, la sobreexpresión del ligando TGF- en la células tumorales implican a esta molécula en la biología del tumor mediante un mecanismo de secreción autocrina. La célula tumoral adquiere la autonomía de producir, secretar y responder a su propio factor de crecimiento, y como consecuencia, muestra un ciclo celular más rápido y acelerado¹⁸⁸.

TGF- actúa como un factor de secreción autocrina inhibidor de la proliferación y por tanto, en la homeostasis celular, en el epitelio ovárico normal. Sin embargo, se ha encontrado, en la mayoría de líneas celulares de tumores ováricos, alteraciones en la producción, ó en la activación ó en la respuesta a TGF-, perdiendo así la capacidad inhibitoria de esta vía, pudiendo jugar un papel importante en el desarrollo de algunos tumores ováricos¹⁸⁸.

1.6 b) Genes tumorales

Existen genes implicados en la regulación del ciclo celular, replicación y reparación del ADN, cuyas mutaciones hacen más susceptibles a las células para que se transformen en neoplásicas. Son los llamados genes tumorales de los cuales se identifican tres tipos: Oncogenes, genes supresores tumorales y genes reparadores de errores replicativos del ADN.

1.6 b.1) Oncogenes:

Los oncogenes son la forma mutada de un tipo de genes celulares normales conocidos como proto-oncogenes, los cuales codifican productos que controlan el crecimiento y la

diferenciación celular y que en último término provocan la transformación y el desarrollo tumoral. De entre los genes que integran el genoma humano se han caracterizado unos 100 protooncogenes, los cuales son capaces de promover la transformación neoplásica cuando sufren mutaciones. Generalmente son dominantes, por lo que sólo es necesaria a la mutación de un alelo para producir la alteración en el crecimiento y la diferenciación normal¹⁹². La activación, ó la sobreexpresión de varios protooncogenes se han detectado en cancer de ovario.

1) El gen erb-B2 (Her2/neu).

Pertenece a la familia de oncogenes tirosin-quinasa y se localiza en el cromosoma 17q21. Codifica un receptor transmembrana tirosin-quinasa y comparte un 40 % de homología con el EGFR y, por tanto, puede intervenir en la traducción de señales importantes para la proliferación celular desde el exterior de la célula¹⁹². La sobreexpresión del gen erb-B2 parece jugar un importante papel en la carcinogénesis, tanto del carcinoma de ovario como el de mama. La sobreexpresión de erb B-2 puede ocurrir con o sin amplificación génica¹⁹³. Aproximadamente el 30 % de los carcinomas de ovario sobreexpresan erbB-2, teniendo ,estos tumores, muy mal pronóstico¹⁵⁰.

2) El oncogen fms.

Codifica un receptor transmembrana para el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), y también, traduce señales via tirosin-quinasa, estimulando la proliferación celular. Este receptor está ausente en los ovarios normales ,y sin embargo, se sobreexpresa en un 50 % de los tumores epiteliales malignos ováricos ,correlacionándose con estadios clínicos avanzados y grados histológicos altos¹⁵¹.

3) Gen c-myc.

El proto-oncogen c-myc se localiza en el cromosoma 8q24 y codifica una fosfoproteína nuclear que funciona como un factor de transcripción, pudiendo además estar implicado en la replicación del ADN y en la inducción de la muerte celular en determinadas circunstancias¹⁹². La amplificación de este gen se ha visto hasta en un 33 % de estos carcinomas, pero no parece tener un valor pronóstico^{188, 194}.

Los diferentes tipos histológicos del carcinoma de ovario se caracterizan por poseer algunas alteraciones moleculares específicas¹⁹⁵, tanto en oncogenes como en genes supresores tumorales.

4) Gen Ras.

Fue uno de los primeros oncogenes identificados. El protooncogen ras, se localiza en el cromosoma 12, está formado por una familia de genes (H-ras , K-ras, N-ras), cada uno de los cuales codifica una proteína de 21 KD localizada en la cara interna de la membrana plasmática, y sólo se diferencian en una región de 20 aminoácidos. Las proteínas Ras pertenecen a la familia de proteínas GTPasas monoméricas y participan en la transmisión de señales desde los receptores tirosin-quinasa, estimulando la proliferación y diferenciación celular¹⁹². Las mutaciones o amplificaciones de estos genes se relacionan con un pequeño porcentaje de tumores de ovario (2-12%)¹⁹⁵, siendo la mayoría de los casos carcinomas mucinosos¹⁹⁶.

1.6 b.2) Genes de supresión tumoral

Los genes de supresión tumoral codifican proteínas que regulan el ciclo celular, fundamentalmente paralizando o inhibiendo la proliferación celular . A diferencia del mecanismo

de los oncogenes, en los cuales la carcinogénesis resulta de la ganancia de una función genética, en este caso el mecanismo de actuación es la pérdida de función de estos genes, afectando el control del crecimiento y la subsecuente formación tumoral. Para inactivar funcionalmente un gen de supresión tumoral ambos alelos tienen que estar alterados, por mutación o delección. Frecuentemente una mutación inactiva uno de los alelos, mientras que una delección afecta el otro alelo como un segundo evento¹⁹⁷.

1)El gen p53.

Es uno de los genes supresores tumorales más frecuentemente afectados en tumores sólidos. Se localiza en el cromosoma 17p13 y codifica un factor de transcripción crítico en la regulación del crecimiento celular normal, estando implicado en la síntesis y reparación del ADN, el control del ciclo celular, diferenciación celular, la plasticidad genómica y la muerte celular programada¹⁹³. Las alteraciones del gen supresor tumoral p53 confieren una ventaja de crecimiento selectiva durante la progresión tumoral. Las mutaciones del gen p53 son frecuentes en tumores ováricos diagnosticados en estadios avanzados (Estadio III y IV), alcanzando el 50 % en algunas series¹⁵². Además la mutación de guanina por timina, prevalente en otros tumores como pulmón o hígado, no es característica en los tumores de ovario¹⁹⁸.

2)El gen PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome 10).

Se localiza en el cromosoma 10q23.3. Codifica una proteína que bien puede actuar como una tirosin-fosfatasa, que extrae grupos fosfato de los aminoácidos tirosina, o como tensina, que es una proteína que conecta proteínas filamentosas del citoesqueleto con el exterior¹⁹⁹. Se considera un gen de supresión tumoral ya que la proteína tirosin-fosfatasa puede contrarrestar a

las proteínas codificadas por el grupo de protooncogenes tirosin-quinasa. La activación de señales de transducción puede ocurrir por una ganancia de función de las proteín-quinasa, ó por una pérdida de función de las proteín-fosfatasas²⁰⁰. En los carcinomas endometrioides parecen intervenir mecanismos moleculares involucrados en los mecanismos de iniciación de los carcinomas endometrioides de endometrio, como son la inestabilidad de microsátélites o las mutaciones del gen PTEN²⁰¹ y mutaciones de B-catenina²⁰².

3) El gen de -Catenina.

Se localiza en el cromosoma 3p21 y codifica la proteína -Catenina que es una molécula implicada en la adhesión celular²⁰³. Además esta proteína puede ser tirosin-fosforilada y ha sido implicada en la transducción de señales por receptores de factores de crecimiento oncogénicos (EGFR²⁰⁴, erb-B²⁰⁵). En 1997 se describió que podía ser considerado como un gen de supresión tumoral, ya que mutaciones heterocigotas en su gen tenía un efecto similar a la inactivación del APC en el desarrollo del carcinoma de colón²⁰⁶. Las mutaciones de B-catenina producen un exceso de proteína citoplasmática y nuclear que se pueden poner de manifiesto inmunohistoquímicamente. En carcinomas de ovario endometrioides ocurren en el 35 % de los casos²⁰⁷.

4) Gen BRCA 1 y BRCA 2.

En el síndrome de cáncer de ovario familiar aislado y síndrome de cáncer Ovario-Mama familiar, los tumores ocurren en pacientes jóvenes con historia familiar de tumores en estas localizaciones. En ambos, se ha visto que mutaciones en el gen BRCA1 ó en el BRCA2,

localizados en el cromosoma 17q21 y en el cromosoma 13q respectivamente, juegan un papel fundamental^{204,208}.

Se ha observado que tumores que presentan mutaciones en alguno de estos genes, tienen un curso clínico menos agresivos comparado con los tumores esporádicos¹⁵³. Sin embargo, en tumores ováricos esporádicos se han identificado, también, mutaciones en el gen BRCA1 hasta en un 10 % de los casos²⁰⁹ y deleciones en el gen BRCA2 en aproximadamente el 50 % de los casos²¹⁰. A pesar de este elevado porcentaje de deleciones, las mutaciones somáticas en el gen BRCA2 son raras, mientras que las mutaciones germinales se detectan en una proporción significativa de tumores esporádicos, sugiriendo que estos casos pueden tener una predisposición a desarrollar cáncer de ovario^{211, 212}. Por otro lado, el carcinoma seroso, es el más comúnmente asociado a carcinoma hereditario de ovario y mama por mutaciones en BRCA 1 y BRCA 2²¹³.

5) Otros genes de supresión tumoral.

La pérdida de heterocigocidad se define como una deleción de una porción de un cromosoma que contiene un gen de supresión tumoral. La identificación de deleciones en un locus genético específico de las células tumorales sugiere la presencia de un gen de supresión tumoral inactivado en la zona delecionada. Se han identificado deleciones frecuentes en varios locus genéticos en tumores de ovario como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1: Pérdida de heterocigocidad de diferentes locus en los carcinomas de ovario.

Los locus 17p, 17q , 9p y 11p muestran una alta frecuencia de pérdida de heterocigocidad en los carcinomas de ovario. Otros locus, que posiblemente contienen genes de supresión tumoral importantes en la carcinogénesis ovárica, también presentan pérdida de heterocigocidad.

Locus	Ref ²¹⁴	Ref ²¹⁵	Ref ²¹⁶	Ref ²¹⁷	Ref ²¹⁸	Ref ²¹⁹	Ref ²²⁰	Ref ²²¹	Ref ²²²	Ref ²²³	Ref ²²⁴	Ref ²²⁵	Ref ²²⁶
4p				42%									
5q						43%		50%					
6p				50%		62%							
6q		64%				57%							
7p				43%		36%							
8p						40%							
8q				31%									
9p						54%		53%		31%			38%
11p		46%			53%			50%			47%	77%	
11q								29%				70%	
12p				38%									
12q				33%									
13q					58%	56%							
14q						47%				47%			
15q						36%							
16p				33%									
16q				38%									
17p	69%	75%	31%	46%	67%	81%	83%	64%		45%			
17q	77%		77%	39%		76%	74%	50%	35%	52%			
18q						43%				32%			
19p				34%									
21q						36%							
22q						71%							
Xp										41%			

Se ha visto una correlación entre las deleciones genéticas de locus específicos y parámetros pronósticos conocidos como el tipo o grado histológico así como el estadio clínico. Por ejemplo la pérdida de heterocigidad en 6q, 13q y 19q, sólo se ha identificado en tumores serosos¹⁹⁴. En general, los tumores mucinosos parecen tener baja frecuencia de pérdida de heterocigidad cromosómica¹⁹⁶. Por otro lado, algunos estudios sugieren que altas tasas de pérdida de heterocigidad ocurren en tumores con estadios avanzados y con alto grado histológico^{196,197, 101, 102}.

1.6.b3 Genes reparadores de errores replicativos del ADN.

Son los genes responsables de mantener la integridad del genoma y la fidelidad de la información que transfieren, en la transducción del ADN. El genoma humano codifica para aproximadamente 60.000 proteínas necesarias para la función celular normal y por lo tanto requiere una constante replicación del ADN. La tasa basal de errores de replicación espontáneos del ADN se ha estimado en más de 10000 eventos/día. Por otro lado, la exposición a carcinógenos ó un defecto subyacente en los mecanismos de reparación, aumenta significativamente los errores de replicación y facilita la acumulación de alteraciones en el ADN necesarias para que ocurra la transformación maligna¹⁹³.

En el carcinoma de ovario diagnosticado en el contexto de cáncer de colon familiar no asociado a poliposis (Síndrome de Linch II)²¹⁸ se identifican defectos, como inestabilidad de microsatélites, en genes relacionados con mecanismos de reparación de DNA (mismatch repair genes) como el hMSH2 , el hMSH1, hMLH1, hPMS1 y hPMS2²²⁷.

1.6 c) Alteraciones de la clonalidad y de la metilación del ADN

Además de las alteraciones ya mencionadas, la hipometilación generalizada del genoma parece jugar un papel en la génesis del cáncer ovárico. Se acepta que muchos tumores tienen un origen unicelular que ha adquirido uno o más lesiones genéticas. Por lo tanto la monoclonalidad se considera una prueba fidedigna para establecer la naturaleza tumoral. Los métodos de determinación de la clonalidad son el estudio de la inactivación del cromosoma X y el análisis del reordenamiento genético (TCR) de inmunoglobulinas y de los receptores de células T ¹⁹³.

El análisis de la metilación (inactivación) del cromosoma X es una valiosa herramienta para valorar la clonalidad de los tumores en mujeres. Durante el desarrollo de las células normales uno de los alelos del cromosoma X es metilado. Por lo tanto las células no malignas son heterogéneas respecto al estado de metilación del cromosoma X²²⁸. Las lesiones clonales, como los tumores malignos de ovario, derivan de una sólo célula, y por tanto, muestran un patrón de inactivación idéntico en todas sus células. El patrón de inactivación del cromosoma X puede ser analizado utilizando marcadores polimórficos de DNA y enzimas de restricción que son sensibles a la metilación²²⁹.

1.6 d) Futuras direcciones

El estudio de los eventos celulares moleculares, han proporcionado un gran beneficio, no sólo, en el entendimiento de la biología del cancer, sino también, en el diagnóstico, pronóstico, y objetivos terapéuticos. Los tumores esporádicos sólidos, como son la mayoría de los tumores de ovario plantean más de un desafío para completar el estudio a nivel molecular, ya que no sólo existen múltiples alteraciones genéticas involucradas en el desarrollo y progresión de estos

tumores, sino que además, el comportamiento clínico del tumor puede estar determinado por cambios sutiles en la regulación de algunos genes celulares²³⁰.

La secuenciación del genoma humano y las librerías de cDNA de tejido humano han proporcionado una base de datos que facilita la caracterización de los sucesos moleculares en la progresión tumoral. El CGAP (Cancer Genoma Anatomy Project), es un organismo dedicado a realzar esta base de datos mediante librerías de tejidos microdisecados por tecnología Laser, que representan características histológicas y estadios de progresión tumoral específicos. Es de gran utilidad para realizar “dot blots” virtuales que comparen los niveles de expresión entre estadios de progresión²³¹.

Los métodos tradicionales en Biología Molecular trabajan en base de un experimento por gen, lo que hace que resulte muy laborioso obtener una visión global de la función del gen. Sin embargo, una nueva tecnología, denominada “DNA microarrays”, es capaz de introducir gran cantidad de información en un simple “chip” de manera que se pueda tener una visión de la interacción entre miles de genes simultáneamente²³². Estas técnicas permiten un estudio paralelo de los niveles de expresión: la información estática de un gen, es decir en qué tejidos se expresa y la información dinámica, ó como se relaciona el patrón de expresión de un gen con el otro. Por otro lado, la tecnología microarray supone un avance en lo referente a la identificación y genotipaje de mutaciones y polimorfismos ya que permite determinar alelos de cientos de muestras de ADN así como el examen de susceptibilidad a determinadas enfermedades en una sólo sesión²³³.

La técnica consiste en depositar sobre un porta objetos, (desde pequeñas membranas de nylon hasta vidrios tratados con sustancias químicas que favorecen la unión de la sonda) una muestra que puede ser mRNA, cDNA, para experimentos de estudios de expresión, ó DNA

genómico para la detección de polimorfismos. Se utilizará productos de PCR cuando debido a la escasez de la muestra sea necesaria una amplificación. Se añadirá una sonda (oligonucleótidos o cDNA) marcada con fluorocromos procediendo así a la hibridación. Finalmente se obtiene una imagen por medio de un “array scanner” que realizará un barrido por todo el porta mientras que la cámara va “filmando” la luz emitida por los distintos fluorocromos cuando son excitados por el rayo láser obteniendo una imagen global del porta objetos: esta imagen generada debe ser analizada con un programa de ordenador^{234, 235} .

En un reciente estudio se analizó mediante esta técnica 9121 genes en 5 carcinomas serosos y 4 carcinomas mucinosos. Observaron que, en todos los tumores, 55 genes involucrados en la proliferación celular y en la prevención de la apoptosis se sobreexpresaban, y otros 48 genes estaban funcionalmente inhibidos. Asimismo objetivaron como 115 genes se expresaban de diferente manera en los tumores serosos y en los mucinosos²³⁵ .

Hasta ahora los trabajos se han focalizado en la proliferación celular del crecimiento tumoral, demostrándose ciertas alteraciones en el contenido del ADN, la sobreexpresión de ciertos oncogenes, la alteración en la función de los genes de supresión tumoral o la adquisición de resistencias a la quimioterapia, que harán que la célula se comporte biológicamente en un amplio espectro de posibilidades que van desde la benignidad a la más alta malignidad. Sin embargo el crecimiento tisular depende, no sólo de la proliferación celular, sino también de la falta de muerte celular programada . La apoptosis es un factor importante en la regulación de la densidad de la población celular normal, y puede ser un mecanismo de supresión de células anormales que han sido lesionadas por toxinas, radiación y otros estímulos, por lo que su inhibición permitiría la permanencia de las células mutadas en el tejido siendo determinante para el crecimiento del tumor .

1.7 APOPTOSIS

La apoptosis, o muerte celular programada, es un tipo de necrosis considerada como un proceso fisiológico, mediante el cual estímulos del desarrollo o ambientales activan un programa genético para llevar a cabo una serie específica de eventos que culminan en la muerte celular, y su eliminación de entre las células conservadas de un tejido, sin alteraciones de la arquitectura o de la fisiología tisular^{236, 237}. Sin embargo, la apoptosis, también puede provocarse ante situaciones patológicas²³⁸, siendo innumerables las enfermedades en las que se ha demostrado una alteración de la apoptosis, bien por exceso o por defecto.

La descripción de un tipo de necrosis, integrada en la fisiología de los mamíferos, diferente a la necrosis osmótica convencional, comienza a finales del siglo XIX (1885), por el equipo del Dr Walter Fleming²³⁹. Estos autores fueron capaces de reconocer morfológicamente, mediante microscopía óptica, fenómenos involutivos fisiológicos en los folículos ováricos o en la mama post-lactancia y se les dió el nombre de cromatolisis. Sin embargo no fue hasta 1914, cuando este término volvió a aparecer en la literatura médica, por el anatómico alemán Dr. Ludwig Graper, en un estudio sobre el desarrollo del saco vitelino²⁴⁰. Posteriormente, en 1951 Glucksmann, describió como este fenómeno podría explicar muchos de los cambios acontecidos durante el desarrollo embriológico²⁴¹. Ya en la década de los 60, y gracias al desarrollo de la microscopía electrónica, se descubrió mucho acerca de la morfología ultraestructural de este tipo de fenómeno. En 1972 Kerr, Wyllie and Curie²⁴² de la Universidad de Edimburgo, utilizaron por primera vez, en la práctica médica, la palabra apoptosis para describir estos hallazgos morfológicos y así simplificar la terminología utilizada para los tipos de muerte celular (necrobiosis, necrosis coagulativa, cromatolisis, necrosis isquémica...).

El término, procedente del griego “**apoptosis**”, indica la caída de las hojas de un árbol o de los pétalos de una flor, y fue propuesto por un profesor de Griego de la universidad de Aberdeen por la similitud morfológica entre ambos eventos.

El proceso se caracterizó inicialmente en su vertiente morfológica y sobrevivió más de 15 años en latencia. Gracias a estudios de los aspectos bioquímicos y moleculares, iniciados por Brenner en el nematodo **Caenorhabditis Elegans**²⁴³, y posteriormente, con el descubrimiento de un patrón característico “en escalera”²⁴⁴, al analizar el ADN de las células apoptóticas en un gel de electroforesis, hoy día es uno de los procesos investigados con mayor vigor .

1.7 a) Morfología

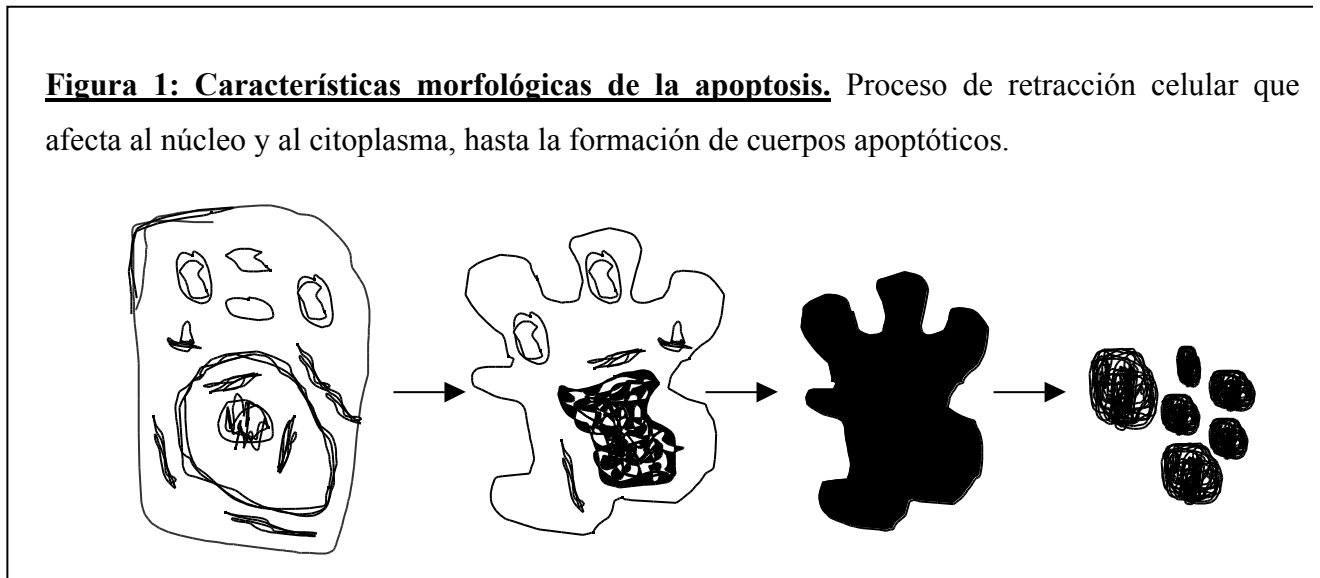
La apoptosis se considera, morfológica y bioquímicamente, diferente a la muerte celular por necrosis osmótica. En la necrosis, un grupo de células, ante estímulos externos, pierden la integridad de membrana alterando la regulación de la homeóstasis iónica celular y permitiendo un gran edema intracelular y la destrucción de organelas; como consecuencia se provoca una intensa respuesta inflamatoria que participará, igualmente, en la fagocitosis de los detritus celulares²⁴⁵ .

Los rasgos morfológicos de la apoptosis difieren de los de la necrosis observándose mejor con microscopía electrónica²⁴⁶. Inicialmente se produce la constricción de la membrana, disminuyendo el tamaño celular y agrupando las organelas, dándole al citoplasma un aspecto más denso. Los cambios nucleares son los rasgos más característicos. La cromatina se condensa en la periferia , por debajo de la membrana nuclear, en masas densas bien definidas. Posteriormente el núcleo se fragmenta, formándose , al mismo tiempo, vesículas citoplasmáticas y los denominados cuerpos de apoptosis. Estos cuerpos apoptóticos se componen de citoplasma y

organelas muy agrupadas, pudiendo contener también fragmentos nucleares, rodeados siempre de membrana. Los cuerpos de apoptosis serán fagocitados por las células sanas adyacentes del parénquima o por macrófagos, donde se degradaran con rapidez dentro de los lisosomas, gracias a su actividad enzimática. Seguidamente las células adyacentes serían capaces de migrar o proliferar reemplazando así el espacio ocupado por la célula apoptótica suprimida^{247, 248} (Figura 1).

La apoptosis afecta a células aisladas o racimos celulares pequeños. Histológicamente, con tinción de hematoxilina eosina, la célula apoptótica suele reconocerse como una masa redondeada u oval de citoplasma, fuertemente eosinófilo, con fragmentos de cromatina nuclear densa²⁴⁹. La constricción celular y la formación de cuerpos apoptóticos tienen un comienzo abrupto con una duración de pocos minutos^{250, 251}; sin embargo los cuerpos de apoptosis permanecen en el tejido aproximadamente 2 horas hasta que sean fagocitados y degradados²⁵². Cabe resaltar que la apoptosis, al contrario que la necrosis, no produce respuesta inflamatoria, haciéndola por tanto más difícil de detectar desde el punto de vista histológico²⁵³.

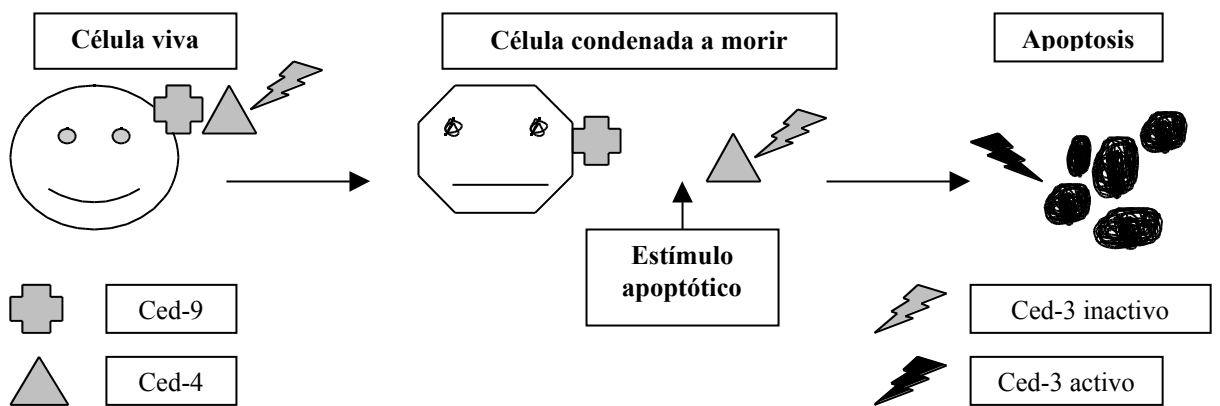
Figura 1: Características morfológicas de la apoptosis. Proceso de retracción celular que afecta al núcleo y al citoplasma, hasta la formación de cuerpos apoptóticos.



1.7.b) Genes reguladores de la apoptosis

Las reglas fisiológicas de la señal apoptótica en los mamíferos son cruciales y complejas. El nemátodo **Caenorhabditis Elegans** ha sido un buen modelo para estudiar los componentes de la muerte celular, ya que lleva a cabo una apoptosis programada durante el desarrollo²⁵⁴. Además muchos de los componentes de la maquinaria de la apoptosis, están conservados en mamíferos. En los estudios genéticos del **C. Elegans** se identificaron tres productos génicos esenciales: CED-3 y CED-4 que favorecen la apoptosis, y CED-9 que la inhiben²⁵⁵. CED-3 es una proteína específica de la cascada efectora de la apoptosis. CED-4 es homólogo al Apaf-1, factor promotor de la apoptosis en mamíferos, que se uniría a CED-3 y promueve su activación²⁵⁶. Mientras que el CED-9, en condiciones normales, se uniría a CED-4 y CED-3 formando un complejo, que mantiene al CED-3 inactivo. El estímulo apoptótico produciría la disociación de dicho complejo, permitiendo la activación del CED-3²⁵⁷ (Figura 2).

Figure 2: Genética de la muerte celular programada en C Elegans. En la célula viva, el complejo Ced-4/Ced-3 es secuestrado por el Ced-9, en forma de monómero inactivo. Ante un estímulo apoptótico se produce la liberación de dicho complejo produciéndose la oligomerización, provocando la activación del Ced-3



Estos tres productos génicos tienen homología de secuencia y función con productos génicos en mamíferos así: las caspasas de las células de mamífero son similares a CED-3; Apaf-1 es el único homólogo de CED-4 en mamíferos conocido; y algunos productos de genes de la familia de bcl-2 se relacionan con CED-9²⁵⁸.

Aunque los mecanismos bioquímicos y genes implicados en este proceso son en gran parte desconocidos, se han identificado numerosos genes que codifican productos que influyen en la susceptibilidad celular para entrar en la apoptosis. Entre ellos podemos distinguir activadores e inhibidores de la muerte celular programada²⁵⁹.

1.7 b.1) Familia bcl 2 - bax

Bcl-2 fue el primer miembro encontrado en una familia creciente de genes implicados en la regulación de la apoptosis que, a diferencia de otros oncogenes, prolonga la supervivencia celular bloqueando específicamente la muerte celular por apoptosis.

El gen bcl-2 (B-cell Lymphoma 2) se identificó hace más de una década, con el análisis y descubrimiento de la translocación 14;18 (q32,q21), en el cromosoma 18²⁶⁰. Esta translocación es la aberración cromosómica más común en los linfoma no Hodgkin, alcanzando el 70-80 % en los linfomas foliculares²⁶¹. En este caso la secuencia de bcl-2 se yuxtapone al gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina (Ig H), en la región 14q32. Sin embargo, la translocación no se traduce en una interrupción de la región codificante del bcl-2, sino en el gen de la Ig H. Consecuentemente, bajo el control del gen promotor de la inmunoglobulina, se produce la sobreexpresión, tanto del ARNm como del producto proteico, de bcl-2 en estos linfomas y como consecuencia, una disminución de la muerte de los linfocitos B afectados²⁶². Esta prolongación de la vida de las células B es un evento crítico en la génesis del linfoma folicular.

Por otro lado, y accidentalmente, se observó que este gen ,activado por la traslocación 14;18, permitía la supervivencia de células hematopoyéticas citoquin-dependientes, en estado quiescente, en ausencia de citoquina²⁶³. Este hallazgo se verificó en otras líneas celulares en ratones transgénicos, estableciéndose que la supervivencia y la proliferación celular estaban directamente relacionados con una sobreexpresión de bcl-2²⁶⁴.

1- Proteína bcl-2

El producto del gen bcl-2 es una proteína de 26 KDa que se localiza principalmente en la membrana externa de la mitocondria, aunque también en la nuclear, y en el citosol a nivel del retículo endoplásmico liso²⁶⁵.

La amplia expresión in vivo de bcl-2 en tejidos humanos normales, embriológicos, fetales y adultos sugiere que este gen tiene un importante papel en la homeostasis tisular normal²⁶⁶.

En tejidos adultos normales bcl-2 parece estar restringidos al compartimento proliferativo, donde se localizan las células madre, de larga vida, que se dividen y se diferencian continuamente a elementos maduros²⁶⁷. Por el contrario, la expresión de bcl-2 disminuye, o está ausente, en células terminales diferenciadas de los epitelios de colón, piel, y próstata, las cuales se cree que mueren por apoptosis. Bcl-2 también se expresa en células con una larga vida como las neuronas²⁶⁸ y algunas células sensibles al estímulo hormonal tales como el endometrio²⁶⁹ o los folículos ováricos²⁷⁰. Tomando en conjunto estas observaciones se ha podido hipotetizar que bcl-2 es un factor de supervivencia muy importante para células progenitoras precoces, presumiblemente a través de la prevención de la muerte celular programada en el compartimento regenerativo, y para células completamente diferenciadas que son de larga vida^{271, 272}.

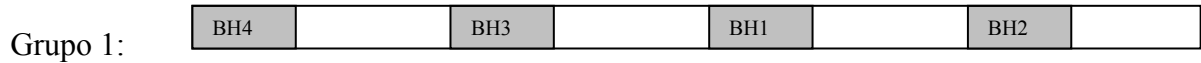
2-Otros miembros de la familia bcl-2

Se han identificado, en mamíferos, al menos 15 genes que tienen homología en la secuencia con el gen bcl-2, y se han clasificado como miembros de la familia de genes bcl-2. A su vez, se han dividido en dos grupos en base al efecto que tienen en el ciclo celular. Los antiapoptóticos son bcl-2, bcl-x_L, bcl-W, Mcl 1, A1, NR-13, BHRF 1, DRF 16, mientras los que promueven la apoptosis son Bax, bcl-x_s, Bok y Bak, entre otros²⁷³.

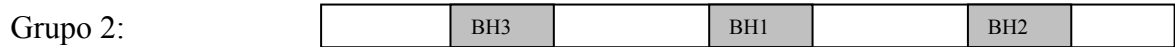
Las proteínas codificadas poseen, al menos, uno de cuatro dominios homólogos al bcl-2 (BH1, BH2, BH3 y BH4): Las inhibidoras de apoptosis contienen el BH1 y el BH2, incluso las de mayor homología con el bcl-2 presentan los cuatro dominios²⁷⁴. Sin embargo, las proteínas proapoptóticas pueden subdividirse en dos grupos en relación a la homología estructural que compartan con el bcl-2. El grupo Mdt que incluye bax, bak y bok contienen tres dominios (BH1, BH2 y BH3) homólogos al bcl-2. Por el contrario existen otras proteínas “asesinas” que tan sólo coinciden estructuralmente con una pequeña región central (9 a 16 residuos) del dominio BH3 como son Bik, Blk, Hrk, BNIP 3, Bim_L, Bad, Bid y EGL-1²⁷⁵

En la figura 3 representamos la estructura de los diferentes grupos de la familia bcl-2.

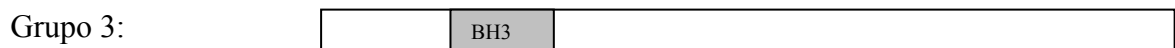
Figure 3: Estructura de los miembros de la familia Bcl-2. Las proteínas inhibidoras de la apoptosis son las que conservan los cuatro dominios de la proteína bcl-2. La subfamilia proapoptótica bax conservan parte de la homología estructural de la bcl-2 con ausencia del dominio BH4. La otra subfamilia proapoptótica conserva el dominio BH3 de la proteína Bcl-2.



Proteínas inhibidoras de la apoptosis: Bcl-2, Bcl-x_L, bcl-W, Mcl 1, A1, NR-13, BHRF 1, DRF 16...



Proteínas proapoptóticas (Mdt): Bax, bak, bok...



Proteínas proapoptóticas: Bik, Blk, Hrk, BNIP 3, Bim L, Bad, Bid y EGL-1

* **Bax:** La primera proteína conocida asociada con bcl-2 in vivo fue bax (Bcl-2-associated protein X), una proteína de 21 kD con la habilidad de suprimir la capacidad de bcl-2 para bloquear la apoptosis²⁷⁶.

En algunos tejidos incluyendo mama, estómago, piel, ganglios linfáticos, colón e intestino delgado, entre otros, los patrones de expresión de bax y bcl-2 están regulados de forma paralela, lo que sugiere que existe un antagonismo activo entre ambas proteínas²⁷⁷. Por otro lado, también se ha visto que la expresión de bax se localiza, especialmente, en áreas cuyas células tienen una alta tasa de apoptosis²⁷⁸. Se han propuesto varios mecanismos para explicar el papel regulador de esta interacción proteína- proteína en el control de la apoptosis²⁷⁹:

-Bax podría funcionar como una molécula inductora de muerte celular, que es neutralizada por bcl-2.

-Bcl-2 podría funcionar como un represor de muerte celular que es neutralizado, por competencia, con una molécula inerte de bax.

-Bcl-2 podría tener una función bioquímica totalmente expuesta a bax.

En otros tejidos se distribuye paradójicamente. Así, en algunas células de larga vida como neuronas del sistema nervioso central, la expresión de bax es alta, mientras que en células de corta vida tales como granulocitos y timocitos corticales su expresión es nula o escasa, lo que sugiere que , o bien la vía bcl-2/bax no es responsable de la regulación de la vida y la muerte en estas células, o bien que otros miembros de la familia bcl-2, son expresados en estas células y contribuyen a la regulación de la muerte celular²⁸⁰. Sin embargo, las neuronas están entre las células más sensibles para la inducción de muerte celular por pérdida de factores de supervivencia (neurotrofinas), hipoxia, hipoglucemia y una variedad de otros insultos. Por tanto, los altos niveles de bax encontrados en varios tipos de neuronas del sistema nervioso central, además de poder contribuir a su inherente estado de vulnerabilidad, sugieren que bax por sí sólo, es insuficiente para poner en marcha la vía de la muerte celular en estas células, e implica un antagonismo activo entre bax y presumiblemente otros miembros de la familia de proteínas bcl-2 para mantener la supervivencia de esa células de larga vida²⁸¹.

* **Bcl-x:** El gen Bcl-x está colocado en una forma larga (L) y en una forma corta (S). La proteína producida por la forma larga, Bcl-x_L, tiene un 47 % de homología con bcl-2 y una distribución celular semejante a este, lo que sugiere que ambas proteínas funcionan de una

manera similar. Por el contrario, el producto derivado de la forma corta, Bcl-xs , antagoniza con la inhibición de la muerte celular programada por las dos anteriores²⁸².

* **Bak:** La proteína Bak (Bcl-2 homologous antagonist/Killer) aumenta la tasa de apoptosis inducida por privación de factores de crecimiento de fibroblastos, neuronas y células linfoides murinas, lo que sugiere que funciona principalmente como un promotor de apoptosis²⁸³. Bak se expresa ampliamente en epitelios complejos incluyendo nasofaringe, esófagos, colon y vejiga, en los cuales tiene un papel pro-apoptótico.

* **Mcl-1:** El gen Mcl-1 (Mieloid cell leukemia-1), descubierto en células de la leucemia mieloblástica, funciona de manera similar a bcl-2 bloqueando la apoptosis en células hematopoyéticas más diferenciadas. Este gen codifica una proteína de 37 KD que tiene una homología significativa con bcl-2, pero al contrario que esta su expresión es mayor en las células más diferenciadas de epidermis, intestino, colon, próstata, nasofaringe y vía aérea superior. Esto sugiere que ambos desempeñan funciones diferentes en la regulación in vivo de la apoptosis²⁸⁴.

3- Mecanismos de acción

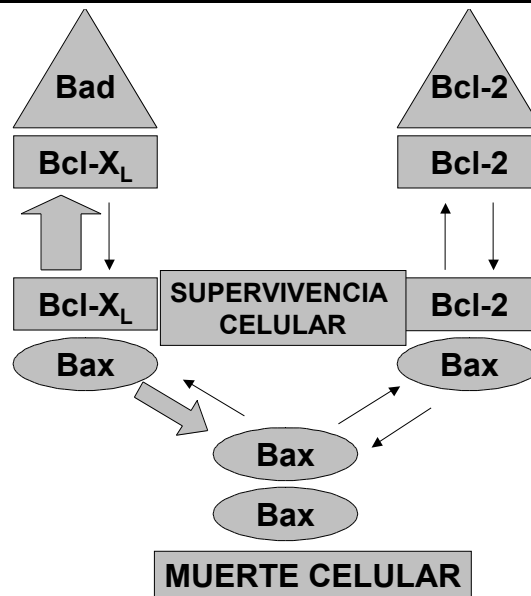
Los miembros de la familia pro y anti-apoptótica pueden formar dímeros; si las parejas son idénticas se denomina homodímeros, y si son diferentes heterodímeros. Algunos de los miembros de la familia forman homodímeros (bcl-2, bax, bcl-xL y bcl-xs), y otros, como el bcl-2, pueden formar heterodímeros con bax, bcl-x s, A1 y Bad ²⁸⁵. A su vez bax puede heterodimerizar con bcl-2, bcl-xL, Mcl-1 y A1 y bcl-xL puede heterodimerizar con bax, bad y bcl-xL. A pesar de que algunas células usan preferentemente uno de los miembros de la familia como factor de

supervivencia, la mayoría de las células eucariotas presentan una tremenda redundancia en la expresión de los miembros de la familia de bcl-2²⁸⁶. Por ejemplo, cuando bax aparece como un homodímero aumenta la sensibilidad de las células ante el estímulo apoptótico, sin embargo, si forma heterodímeros con proteínas antiapoptóticas, actúa protegiendo a la célula de la apoptosis. Por otro lado bad puede formar heterodímeros con las moléculas antiapoptóticas, permitiendo al bax aumentar su función proapoptótica²⁸⁷. Se ha establecido que los dominios BH1, BH2, y BH3 ejercen una fuerte influencia en la formación de homo o heterodímeros. Para la actividad proapoptótica, la formación de heterodímeros es esencial en el grupo de dominio BH3 que actúan a través de ligandos²⁸⁸, pero no para el grupo Mtd ya que esas tienen un impacto citotóxico independiente dañando las organelas directamente. Incluso ante la presencia de inhibidores de caspasas, las proteínas bax o bax-like conducen a la muerte celular, por permeabilidad mitocondrial formando canales iónicos en su membrana²⁸⁹ (Figura 4).

Figura 4: Consecuencias de las reacciones de homo- y heterodimerización de las proteínas

de la familia Bcl-2. El dímero Bax/Bax provoca la apoptosis, mientras que los heterodímeros Bcl-x_L/Bax y Bcl-2/Bax protegen a la célula de la apoptosis. La proteína Bad aparece para anular la actividad antiapoptótica de Bcl-x_L y Bcl-2, uniéndose a ellas y desplazándolas del Bax, lo que permite un aumento del homodímero Bax/Bax.

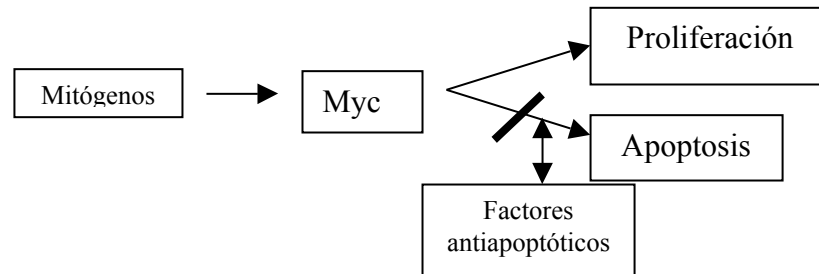
Bcl-2 y bax forman dímeros en la regulación de la apoptosis.



1.7 b.2) Gen c-myc

El gen c-myc es un elemento importante en el control de la proliferación celular. La sobreexpresión de c-myc puede inducir bien proliferación o bien apoptosis²⁹⁰, y la decisión celular entre esas dos respuestas está determinada por otras señales tales como la presencia de factores de crecimiento u otros estímulos de supervivencia como el bcl-2^{291, 292}. Por tanto, el efecto de c-myc, como el de p53, está en función del tipo celular y de estímulos específicos y no es necesario para todas las formas de apoptosis²⁹³ (Figura 5).

Figura 5: C-myc y apoptosis. Los estímulos mitógenos hacia myc activan tanto el crecimiento celular como la apoptosis, pero esta última está regulada por la disponibilidad de los factores anti-apoptóticos como el bcl-2.



1.7 b.3) Gen de supresor tumoral p53

P53 es un regulador fundamental en el normal crecimiento y la homeostasis de células y tejidos²⁹⁴. El gen p53 fue identificado y descrito, por primera vez, en 1979, en las células transformadas por el virus SV40, formando un complejo con el antígeno T, el producto proteico de dicho virus. Dado que dicho antígeno es necesario para mantener el fenotipo transformado, se sugirió que esta interacción era importante para la transformación y por ello, inicialmente se pensó que pertenecía a los oncogenes y actuaba como acelerador del ciclo celular²⁹⁵. Diez años más tarde, se mostró que todos los clones obtenidos eran formas mutantes de p53 y se planteó que este fuera un gen supresor tumoral que regularía el ciclo celular. Esta hipótesis se reforzó al evidenciarse que la expresión de clones de p53 sano suprimía la transformación de células en cultivo activadas por oncogenes, el crecimiento de células en cultivo y el potencial tumorigénico de células en animales. Por ello, y por el hecho de la frecuente delección de la zona del gen en varios tumores, se llegó a la conclusión de que p53 era efectivamente un gen supresor tumoral. No obstante puede comportarse como un oncogén en algunas formas mutantes²⁹⁶.

1-El gen p53 y su proteína

Se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 (17 p13), esta constituido por 11 exones dentro de un dominio cromosómico de 20 kb. En condiciones normales actua como “guardian del genoma” previniendo la proliferación de células que presenten un DNA dañado²⁹⁷. Esta función es realizada por la proteína p53 normal (“wild type”) que recibe ese nombre por ser una fosfoproteína nuclear de 53 Kda, constituida por 393 aminoácidos . Contiene tres dominios, con diferentes funciones. La región N-terminal principalmente controla la transactivación transcripcional, mientras que la región carboxi-terminal controla la oligomerización, modulando la unión de los tetrámeros al DNA^{298, 299}. La mutación a este nivel puede trasladar la localización de la proteína del núcleo al citoplasma³⁰⁰. Además, dentro de la región C-terminal, existe otra zona adicional que regula el cambio de la forma latente a la forma activa de la proteína, para la unión con secuencias específicas³⁰¹. Por último, el dominio central es la región por la que se une la proteína como tetrámero, a la secuencias dianas de los genes en el DNA. Esta zona está muy conservada entre las especies y, es donde se encuentran la mayoría de las mutaciones en tumores humanos³⁰² (Figura 6). Dichas mutaciones interfieren con el plegamiento tridimensional de la proteína y por lo tanto, con la interacción en el DNA, evitando así la activación transcripcional de los genes “downstream”³⁰³.

Figura 6: Estructura de la proteína p53. Es una fosfoproteína constituída por 393 aminoácidos distribuidos en 11 exones, el primero no codificante. El dominio central hidrofóbico es el que se une como tetrámero al DNA dañado. La región N-terminal principalmente controla la transactivación transcripcional, mientras que la región carboxi-terminal controla la oligomerización, modulando la unión de los tetrámeros al DNA.

N-terminal.....Dominio-central.....C-terminal

1-25	26-32	33-125	126-187	188-224	225-261	262-307	308-331	332-367	367-393
------	-------	--------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------

Exones: 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

2- Activación y función

La proteína p53 intracelular se determina, principalmente, por la cantidad de proteína que se degrada, más que por el exceso de formación de la misma. La degradación es un proceso proteolítico ATP-dependiente, mediado por ubiquitina³⁰⁴, y la proteína MDM-2 (Murine double minute) que estimula el proceso de unión entre esta y el extremo carboxi-terminal de la p53³⁰⁵. El oncogen MDM2, codifica una proteína de 90 kD que forma un complejo estable con p53, inhibiendo su unión secuencia-específica al ADN³⁰⁶. Por ello, la sobreexpresión de MDM2 inhibe la capacidad de p53 para estimular la expresión de determinados genes dianas importantes en su función como supresor tumoral³⁰⁷.

Estudios recientes, han confirmado la existencia de, al menos, tres mecanismos independientes que activen a la proteína p53³⁰⁸ (Figura 7):

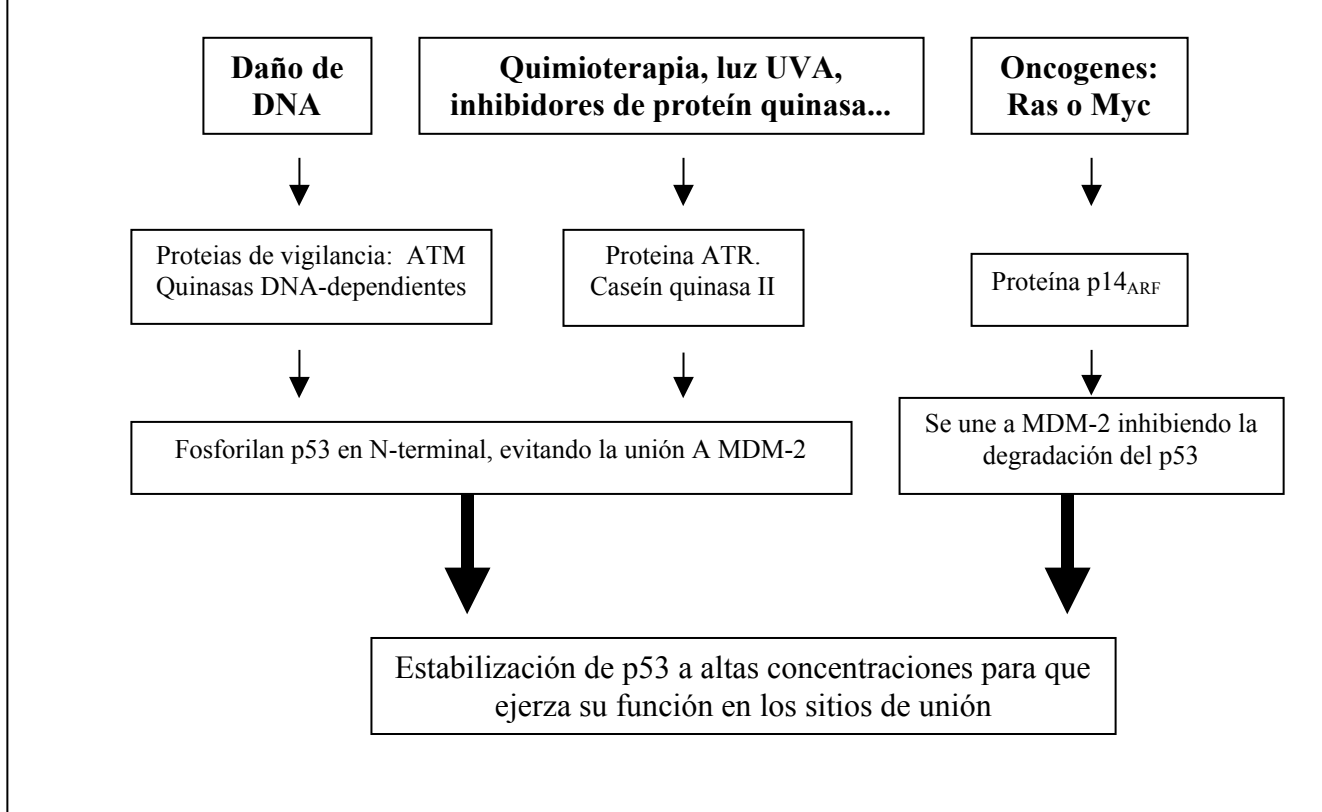
La primera vía se produce por daño en el DNA, como el causado por radiación ionizante. Este daño es captado por las proteínas reguladoras (de “checkpoint”) que retrasan el progreso del ciclo celular, hasta que el daño no es reparado. Estas enzimas protein-quinasas están representadas por la ATM (por encontrarse mutada en la ataxia telangiectasia), la cual es estimulada por roturas en la doble cadena, ChK1, ChK2 y la proteín-quinasa DNA-dependiente y ejercen su función fosforilando la p53 a los sitios amino-terminal que están cerca de los sitios de unión de las proteínas MDM-2, permitiendo la estabilización de la p53³⁰⁹.

La segunda vía se lleva a cabo por señales de crecimiento aberrantes, como las producidas por la expresión de oncogenes como Ras o Myc, en ausencia de daño de DNA. Estos oncogenes estimulan la transcripción del gen p14_{ARF}, o la estabilización de la proteína p14_{ARF}, que, a su vez, se une a la MDM-2 inhibiendo su función.

La última ruta es inducida por múltiples fármacos quimioterápicos, luz ultravioleta e inhibidores de la protein-quinasa, y se caracteriza por estar involucrada la proteína ATR (Proteína relacionada con ataxia-telangiectasia) y caseín-quinasa II.

Las tres vías actúan inhibiendo la degradación de la proteína p53, es decir estabilizándola a altas concentraciones, aumentando su actividad transcripcional dramáticamente. Esto hace que la p53 ejerza su función en los sitios de unión en el DNA dañado, como un tetrámero, que estimula la expresión de los genes adyacentes, con el fin de reparar el daño genómico³¹⁰.

Figura 7: Mecanismo de activación de la p53. Mediante estímulos enzimáticos se modifican los niveles de MDM 2 activo y, en consecuencia, aumentan los niveles de la proteína p53 activada.



3- Mecanismo de acción

Se han identificado múltiples genes que son controlados directamente por la p53, y han sido clasificados en cuatro categorías (Figura 8).

Genes involucrados en la inhibición del ciclo celular : La proteína p53 se une a secuencias específicas del DNA inhibiendo la transcripción de genes reguladores del ciclo celular. Estos ejercen un control negativo paralizando el ciclo celular en G1 y bloqueando la entrada en fase S, que es donde se sintetiza el DNA³¹¹. Uno de estos genes es el p21 (WAF 1/ CIP

1), codifica un potente inhibidor de quinasas dependientes de ciclina (CDKs), que junto con otras proteínas ciclinas responsable de la inactivación de la proteína Rb durante las fases G1 y G2 del ciclo celular³¹². Otra proteína involucrada en el control del ciclo es GADD45 (growth arrest DNA damage) la cual también se une al PCNA³¹³.

Por otro lado, en células epiteliales p53 estimula la expresión de la proteína 14-3-3, la cual secuestra la ciclina B1- complejo CDK1 fuera del núcleo y por lo tanto, mantiene el bloqueo en la fase G2. Se ha visto que la inhibición de esta proteína hace que las células humanas epiteliales crezcan indefinidamente en cultivo; esta inmortalidad puede ser la llave para diferenciar células tumorales de las normales³¹⁴. Con esta interrupción del ciclo, se permite a los mecanismos reparadores celulares actuar antes de la replicación de ADN.

Apoptosis: La proteína p53 no es necesaria para todas las formas de apoptosis, pero ejerce un efecto crucial en la inducción de la apoptosis que se produce en respuesta al daño de ADN. Si el daño es extenso e irreparable, entonces, la p53 activa los mecanismos de apoptosis, como mecanismo de defensa, para proteger la propagación y proliferación de células que han sufrido la mutación³¹⁵. La transcripción del gen bax es activada directamente por sitios de unión de la p53 en la región de regulación³¹⁶. Recientemente, se ha descubierto que los genes NOXA y P53AIP1 también son activados directamente por la p53, y que al igual que bax, expresan sus proteínas a nivel mitocondrial teniendo una acción inductora de la apoptosis³¹⁷. Otros mediadores de la apoptosis inducida por p53 incluye proteínas similares a los receptores de apoptosis, TNF y Fas como recientemente, se ha descubierto la PIDD³¹⁸. La p53 puede, también, actuar directamente sobre la mitocondria produciendo un exceso de tóxicos con potencial redox, sin inducir la translocación de bax.

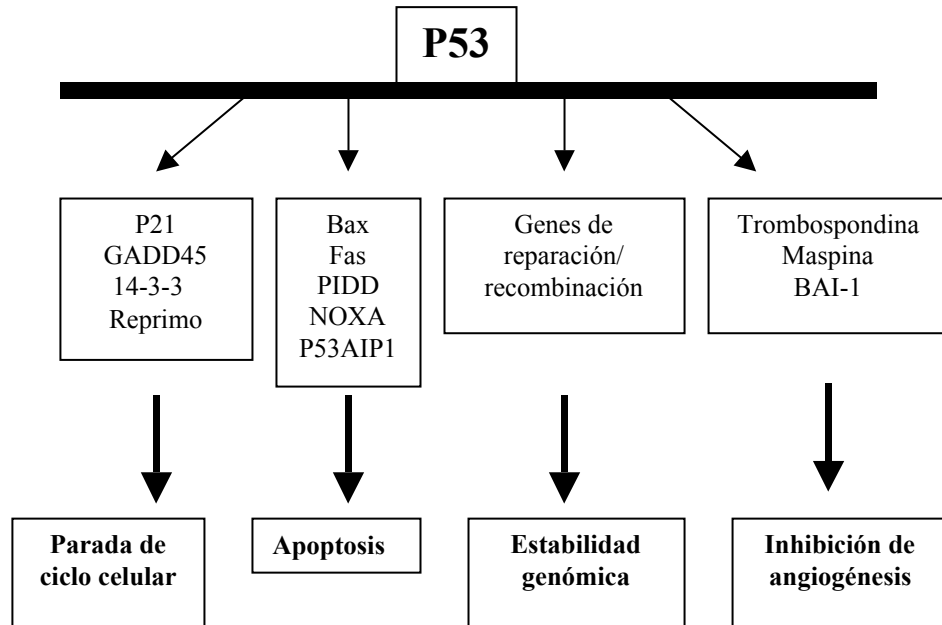
Estabilidad genómica: La inactivación de los genes de reparación produce inestabilidad genómica. La proteína p53 desempeña un papel clave para compensar dicho efecto regulando la expresión de genes implicados en los mecanismos de reparación y recombinación³¹⁹. P53 controla también la inducción de genes como el de la ribonucleótido reductasa (RNR), implicada en las respuestas celulares a daño en el DNA. RNR cataliza la síntesis de desoxiribonucleótidos trifosfato (dNTPs) requeridos para el metabolismo del DNA³²⁰. El enzima es citosólica, produciendo dNTPs que penetran en el núcleo para la síntesis de DNA.

Recientemente se ha identificado el gen p53R2, mutado en una serie de tumores de colon, que regula una subunidad de la RNR. Tanaka y cols. han demostrado que las células que no producen p53R2 son más sensibles a la muerte por agentes que dañan el DNA³²¹.

Inhibición de la angiogénesis: La p53 normal estimula la expresión de genes que previenen la formación de nuevos vasos, que es un paso crítico y precoz en el desarrollo de los tumores primarios³²². Se ha visto que la pérdida de función de p53 resulta en una disminución de la expresión de trombospondina (la cual es una poderosa inhibidora de angiogénesis).

Figura 8: Activación de genes diana mediante la proteína p53.

Muchos de estos genes están involucrados en la prevención del desarrollo de tumores, como los inhibidores de la progresión del ciclo celular, o del desarrollo de nuevos vasos sanguíneos, así como los que favorecen la apoptosis.



4- Mutación

El gen p53 parece tener una función pivote en la carcinogénesis humana, ya que se encuentra mutado en más del 50 % de los tumores³²³. La inactivación de p53 puede ocurrir a través de varios mecanismos, incluido la pérdida de alelos, deleciones, inserciones o mutaciones puntuales, la mayoría de las cuales, responden a una sustitución de una base en la secuencia codificante de p53 que, cambia un aminoácido en el dominio central produciendo un cambio conformacional y de estabilización de la proteína traslocada. Aunque la presencia de un alelo aberrante puede ser suficiente para comprometer la función de supresor tumoral, la pérdida de dicha función ocurre normalmente por la pérdida completa de uno de los alelos del gen,

resultado de una delección cromosómica, en combinación con una mutación puntual sin sentido del otro alelo ³²⁴. El polimorfismo más frecuentemente encontrado en las neoplasias humanas se localiza en el codón 72 y resulta de una sustitución entre la prolina y la arginina ³²⁵.

Sin embargo, los tumores pueden tener diferentes patrones de cambios de bases en el DNA dependiendo si los cambios genómicos ocurren espontáneamente, o bien por carcinógenos exógenos. Por ejemplo, en los tumores de piel, los rayos ultravioletas producen la sustitución de bases CC por TT ³²⁶. En tumores sólidos, los cambios de DNA son espontáneos en su mayoría, observándose mutaciones de C a T en los nucleótidos 5-meCpG, asociando hidrólisis de grupos amino en 5-metil citosina produciendo timidina ³²⁷. Esto produce un cambio en el código genético por sustitución de citosina: guanina a Timina: Adenina. El resultado de esa mutación es la síntesis de una proteína con cambios en su conformación, una vida media más prolongada y una función alterada en el crecimiento celular.

Asimismo, la inactivación del gen puede producirse porque la proteína transcrita es silenciada por formaciones complejas, bien por interacción con productos víricos, como el antígeno T SV40, la proteína adenovirus E1b o la proteína E6 del HPV de alto riesgo, o por interacción con otras proteínas celulares como MDM2 (murine double minute 2) ³²⁸, como se comentó anteriormente. De cualquier modo la inactivación de p53 conduce a una reducción en los niveles de p21/WAF 1, a la fosforilación del producto genético del retinoblastoma (rb) y a la progresión de G1 a la fase S del ciclo celular ³²⁹.

1.7 c) Mecanismos moleculares durante la apoptosis

El número de células del organismo está estrictamente controlado. En términos cinéticos, dicho número depende del balance entre la proliferación celular y las pérdidas celulares, fundamentalmente, por muerte, emigración y diferenciación³³⁰.

Desde un punto de vista molecular podemos considerar 3 fases dentro de la apoptosis:

a) iniciación b) ejecución y c) degradación celular. Las dos primeras pueden ser reversibles gracias a mecanismos bloqueadores o reguladores

1.7 c.1) Iniciación:

Aunque los mecanismos de activación que conducen el inicio de la muerte celular programada no son del todo conocidas, existen múltiples factores inductores de la apoptosis, algunos de ellos relacionados con la alteración de las condiciones ambientales como: la pérdida de factores tróficos o de crecimiento, aumento de iones de calcio, radicales libres, virus, radiaciones (gamma, UV), quimioterapia u otros fármacos, pudiendo utilizar cada factor una o varias de las vías de inducción de apoptosis, que se describen a continuación.

1-Activación de receptores especializados de la membrana celular³³¹.

Se lleva a cabo en elementos del sistema inmune, en el que la propia célula activa directamente su destrucción. Es la denominada apoptosis “instructiva”, mediada por receptores de superficie y provocada por secreción ligandos apoptóticos. Los receptores que median la apoptosis pertenecen a la gran familia de receptores de Factor de Necrosis Tumoral (TNF)³³², que se caracterizan por poseer la porción N-terminal de la proteína hacia el exterior y dominios de unión a ligandos ricos en cisteína. La región C-terminal se sitúa en el citoplasma y contiene

una secuencia de 60 a 70 residuos denominada “ dominio muerte “, a la que se unen moléculas específicas y actúan a modo de segundos mensajeros de la señal apoptótica (Figura 9).

Los receptores apoptóticos mejor caracterizados son:

CD 95 (Fas o Apo 1)³³³, es una proteína de transmembrana cuya porción intracelular puede trimerizarse y transducir la señal apoptótica, y cuyo ligando activador es el ligando CD45L o FasL. Una vez activado el Fas se une al FADD/MORT1 (Fas-associating protein with death domain), que a su vez se une al FLASH, que atrae a varias moléculas de procaspasas 8 y que inicia la cascada ejecutora de la apoptosis mediante la activación de otras caspasas;

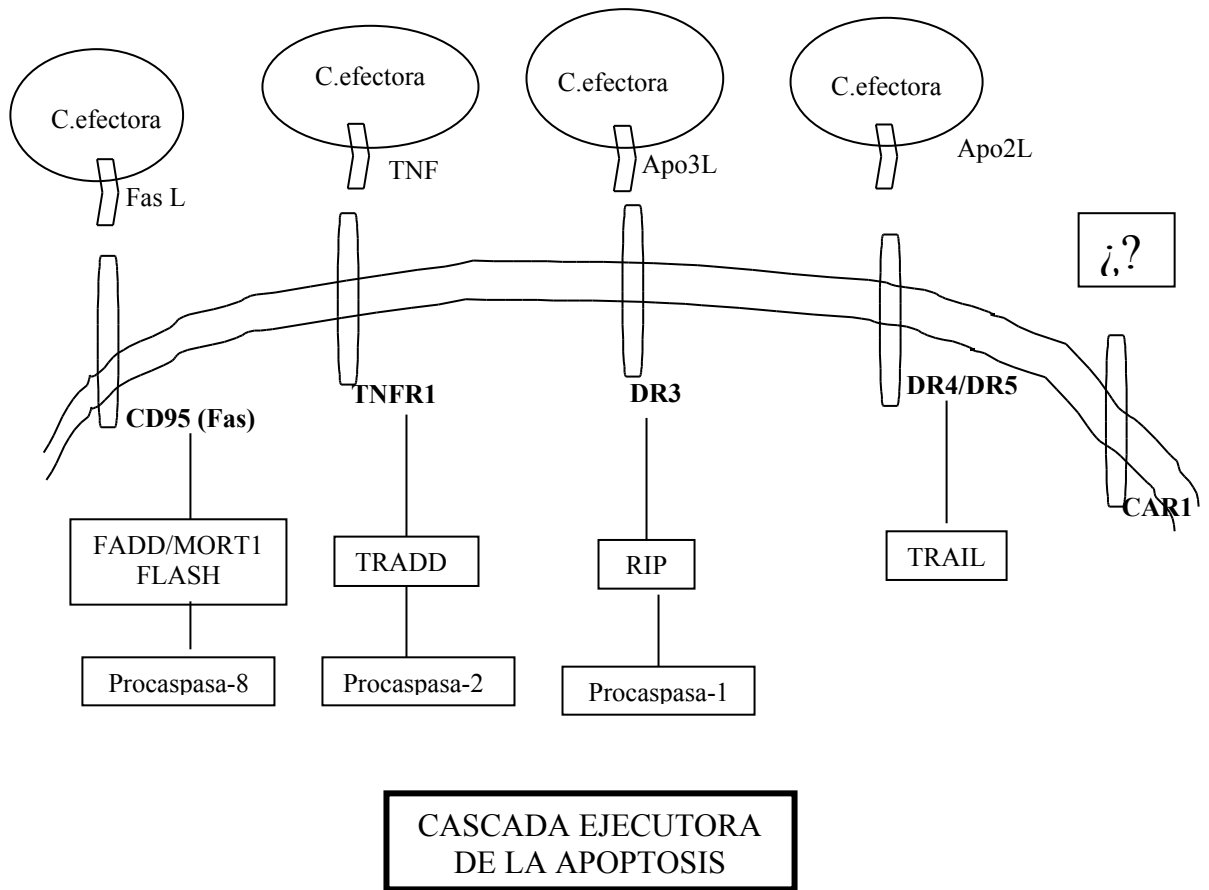
TNFR1 (p55 o CD120a)³³⁴ cuyo ligando es el TNF y linfotoxina . El TNFR 1 se une al TRADD (TNF receptor-associated death domain) que puede utilizar la vía del FADD u otra vía específica de TRADD, poco conocida, a través del RAIDD que promueve la agregación de la procaspasas 2 e inicia la apoptosis.;

DR3 (Death Receptor 3, Apo3, TRAMP, LARD o WSL-1)³³⁵ cuyo ligando es el Apo 3L o TWEAK. El receptor DR3, tiene como cofactor el RIP (Receptor interaction protein), que puede agrupar moléculas de procaspasas 1;

DR4 y DR5 (Apo2, TRAIL-R2, TRICK 2)³³⁶ comparten el mismo ligando Apo 2L o TRAIL (TNF-related apoptosis induced ligand).

CAR 1 cuyo ligando permanece desconocido.

Figura 9: Apoptosis mediada por los receptores de membrana. Las células efectoras del sistema inmune presentan el ligando de manera conformacional, permitiendo su unión al receptor de membrana de la célula diana, activando, de esa manera, la cascada apoptótica intracelular.



2- Alteración mitocondrial³³⁷:

Existe otra vía de activación que tiene a la mitocondria como elemento central en el proceso.

Las proteínas inhibidoras de apoptosis más representativas son la bcl-2 y la bcl-xl, y ejercen la protección sobre las membranas mitocondriales previniendo la tumefacción osmótica, translocando las proteínas proapoptóticas a la membrana mitocondrial interna e impidiendo la

formación de poros PTP mitocondriales (permeability transition pore) a través de varios mecanismos³³⁸:

- a) formando dímeros con otras proteínas homólogas anti-apoptóticas o pro-apoptosis;
- b) uniéndose a proteínas no homólogas como la Apaf-1 y la calcineurina;
- c) formando poros iónicos mitocondriales pequeños y protectores que regulan el equilibrio iónico mitocondrial.

Muchas de las proteínas de la familia bcl-2 residen en la membrana mitocondrial externa orientada hacia el citosol y ancladas por una cadena de aminoácidos hidrofóbicos en su extremo COOH-terminal. Se propone que bcl-2 y bcl-xl comunican funcionalmente con proteínas de la membrana interna, que gobiernan el transporte iónico. También regulan el PH del espacio intermembrana, produciendo un aumento de salida de protones desde la mitocondria.

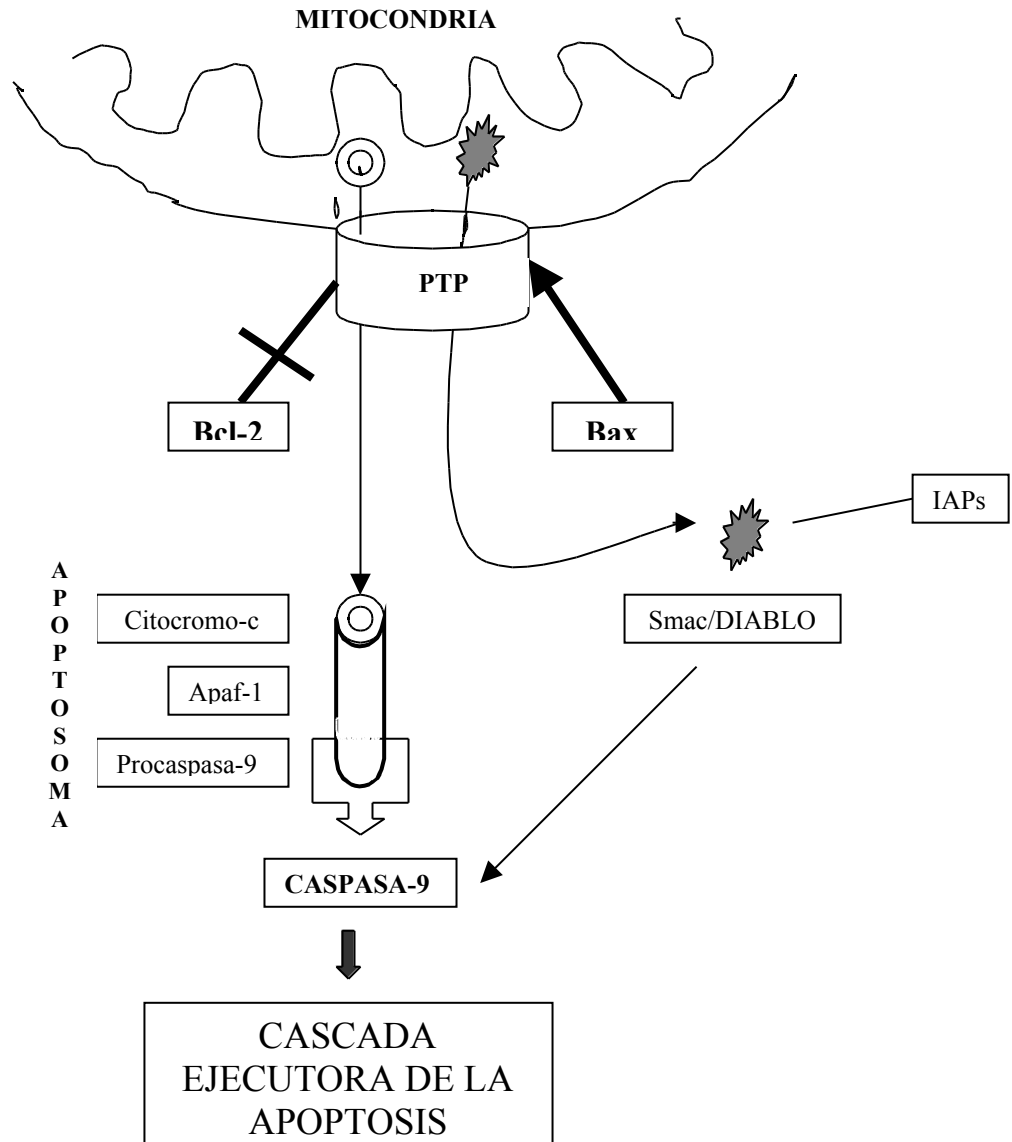
Durante la apoptosis se produce, a nivel mitocondrial, la apertura de canales no selectivos PTP (Permeability Transition Pore), alterándose el equilibrio de iones entre la matriz mitocondrial y el espacio entre sus membranas internas y externas, y produciéndose la pérdida de el potencial transmembrana. Estos fenómenos descompensan la cadena respiratoria creando una hiperosmolaridad de la matriz, lo que hace que se expanda y se hinche. La membrana mitocondrial interna se adapta a la expansión disminuyendo sus repliegues, pero la externa acaba rompiéndose y liberando hacia el citosol proteínas activadoras de las caspasas como el citocromo c, o el Smac (Second mitochondria-derived activator of caspasas)/ DIABLO (Direct IAP-Binding protein with Low pI) localizadas en el espacio intermembrana³³⁹.

Sin embargo, se ha visto que en algunas células, durante la apoptosis, no se altera la morfología mitocondrial. Se hipotetiza que algunas proteínas pro-apoptóticas, como el bax, al ser activadas por un estímulo apoptótico, (mediante p53), se translocaría a la membrana externa de la

mitocondria reclutando proteínas de la membrana externa mitocondrial regulando la actividad de los canales VDAC (voltaje-dependent anion channel). Estos canales normalmente están implicados en el intercambio ATP/ADP , pero en estas condiciones facilitarían la liberación de citocromo-c y Smac /DIABLO al citoplasma sin alteración de la estructura mitocondrial³⁴⁰.

El citocromo c (citoplásmico) en unión con un cofactor específico conocido como Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) y la procaspasa-9 forma parte de un complejo llamado apoptosoma. Dicho complejo es el que provoca la activación de la caspasa 9, que, a su vez, activará una cascada que producirá la ejecución bioquímica de la célula. Smac /DIABLO además de actuar activando las caspasas se une a la familia de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) inhibiendo su actividad anti-apoptótica³⁴¹ (Figura 10).

Figura 10: Vía de activación mitocondrial. Los efectos antagónicos de los miembros de la familia anti-apoptótica Bcl-2 y de los pro-apoptóticos Bax regulan la liberación mitocondrial de los co-factores apoptóticos citocromo-c y el Smac/DIABLO. El citocromo-c se adapta a la molécula de Apaf-1 citoplasmática que, a su vez, recluta y oligomeriza a la procaspasa-9 activándola, iniciándose así la cascada apoptótica. El co-factor Smac / DIABLO activa la caspasa 9, pero además se une a IAP inhibiendo su actividad anti-apoptótica.



3-Pérdida del contacto intercelular o del anclaje con la matriz extracelular:

Una de las señales reguladoras más importantes para la muerte celular procede de la conexión con células vecinas (integridad de las uniones intercelulares tipo desmosomas y cadherinas) o con la matriz extracelular (uniones tipo integrina)³⁴²; muchas de las integrinas reconocen a los grupos RDG (arginina-glicina-aspartato), que pueden iniciar la apoptosis por una vía poco conocida. Se postula que si existen grupos RGD solubles en la matriz, pueden bloquear la integrinas, haciendo que la célula se suelte e inicie la apoptosis; también se ha sugerido que estos grupos activarían directamente la procaspasa 3³⁴³.

4-Alteración del ADN³⁴⁴:

Cualquier daño del ADN puede ser detectado por las proteínas p53 y ATM (gen de mutación ataxia-telangiectasia), actuando tanto favoreciendo la supervivencia celular como la apoptosis por la vía mitocondrial.

5-Vía perforina-granzima B³⁴⁵:

Es la utilizada por los linfocitos citotóxicos. La perforina produce canales en la membrana celular por lo que la granzima B se introduce en el interior de la célula diana para activar directamente la procaspasa 3.

6-Vía esfingomielinasa³⁴⁶:

Diferentes estímulos como la radiación gamma, activarían la esfingomielinasa, capaz de degradar la esfingomielina hasta cerámica, que es uno de los inductores de la apoptosis.

7-Otras vías.

Determinados factores pueden inducir la apoptosis a través de la transcripción de otros genes. El aumento de iones de Ca^{2+} en el citosol puede actuar, a través de la calcineurina, como activador de la apoptosis, activando las caspasas y la endonucleasas, o pueden, activar la transcripción del gen que codifica por FasL. Igualmente, cuando faltan los factores de crecimiento que anulan la vía Akt (Activación de factores de transcripción próvida)³⁴⁷.

1.7 c.2) Ejecución:

Las caspasas juegan un doble papel en el desarrollo apoptótico, tanto como mediadores de señales, como efectores bioquímicos. Pertenecen a la familia de las cistein-proteasas y todas ellas comparten similitudes en su estructura, secuencia de aminoácidos, y especificidad de sustrato³⁴⁸. Se presentan como proenzimas (30-50KD) que contienen tres dominios: Un dominio NH₂-terminal, una subunidad grande (20KD) y otra pequeña (10KD). Las caspasas actúan rompiendo proteínas dianas con residuos de ácido aspártico, en un entorno que reconocen específicamente³⁴⁹ (Figura 11).

Pueden activarse, fundamentalmente, por dos mecanismos³⁵⁰:

*por agrupamiento de procaspasas mediadoras, en torno a cofactores que favorecen la polimerización;

*proteólisis por otra caspasa, en el caso de las caspasas efectoras 3, 6 y 7.

La procaspasa 8 es la que se activa cuando se utiliza la inducción vía Fas-FasL y requiere la asociación con el cofactor FADD (Fas-associated protein with death domain) a través de DED (Death effector domain). Mientras la procaspasa 9 se agruparía en torno al Apaf 1., a través de

CARD (Caspasa recruitment domain), activándose sólo cuando se utiliza la vía mitocondrial, necesitando, además, citocromo c y ATP³⁵¹.

Pueden actuar de manera indirecta, inactivando proteínas que protegen a la célula de la muerte celular. En este punto es interesante reseñar el mecanismo que tiene la enzima responsable de la fragmentación típica internucleosomal de DNA: CAD (caspase-activated Dnase)³⁵². Esta degradación del material genético constituye un “punto sin retorno” en el proceso, y está caracterizado por la especial forma de fragmentación del ADN en presencia de organelas funcionantes ³⁵³. El mecanismo subyacente a la condensación de la cromatina, observada morfológicamente, consiste en una segmentación del ADN nuclear que se presenta en las regiones de unión entre los nucleosomas. El producto de dicha degradación son fragmentos de ADN con longitudes múltiplos de 180-200 de pares de bases ³⁵⁴. Dichos fragmentos brindan un patrón en escalera típico de las células apoptóticas mediante electroforesis en gel. Este patrón contrasta con el carácter esmerilado difuso, de la rotura al azar del ADN, que se produce en la necrosis.

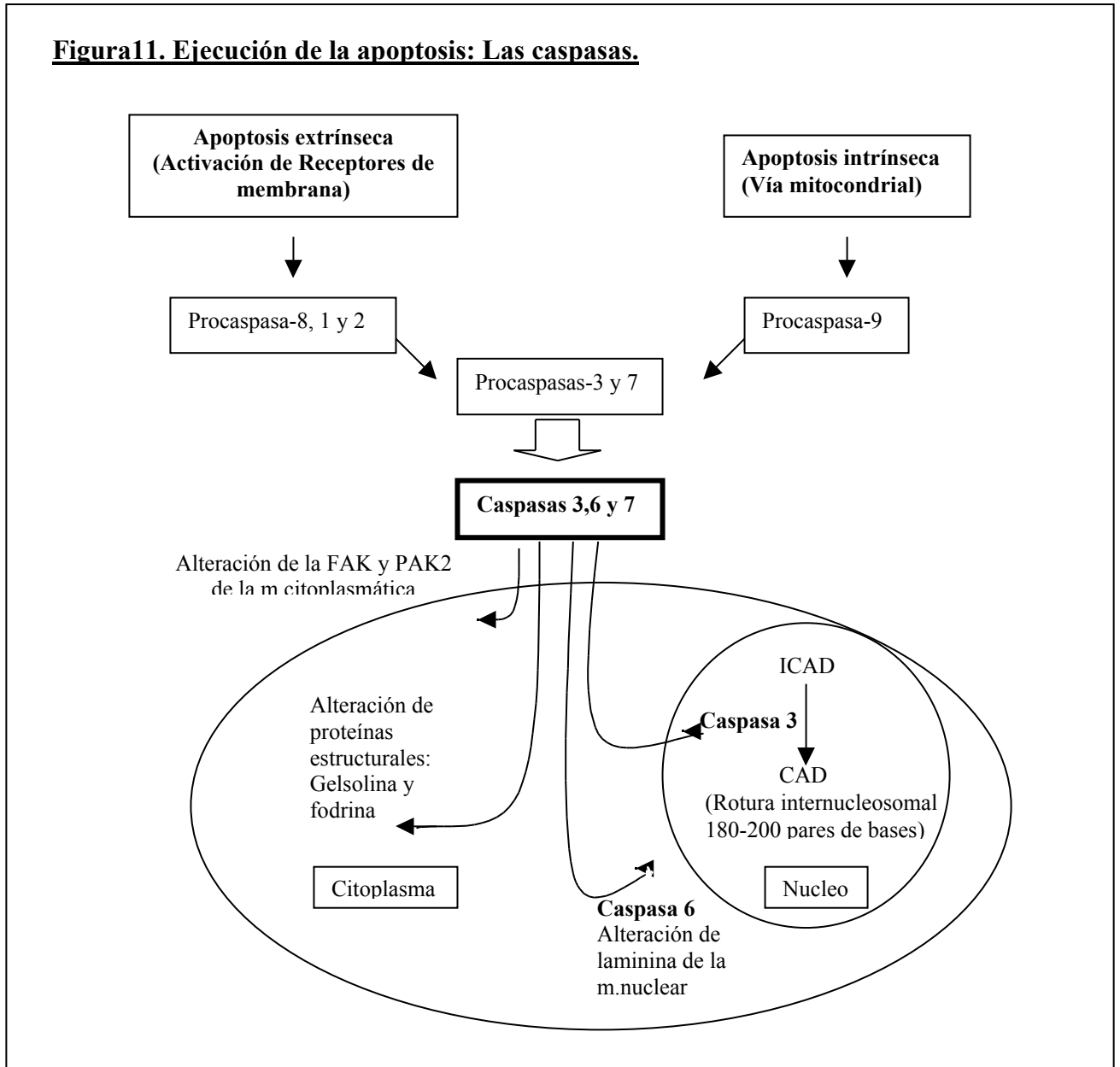
Dicha enzima está presente en las células de forma constitucional e inactiva, como un complejo unida a una subunidad inhibitoria, denominada ICAD. El mecanismo de activación se produce ante la presencia de caspasa-3 que se une a la subunidad inhibitoria (ICAD), produciendo así la liberación y activación de la subunidad catalítica³⁵⁵.

También realizan su función directamente, alterando distintas estructuras celulares, como por ejemplo por la destrucción de la lámina nuclear o del citoesqueleto. La lámina nuclear es una estructura rígida que se localiza por debajo de la membrana nuclear y que está involucrada en la organización de cromatina, constituida por polímeros de filamento intermedio llamado laminina³⁵⁶. Ante las caspasas, los filamentos intermedios se anclan por un solo sitio,

produciendo el colapso de la lámina nuclear lo que favorece la condensación de cromatina. En el caso del citoesqueleto, inactivan a proteínas que regulan la homeostasis como la fodrina y gelsolina, que despolimerizan los filamentos de actina, los constituyentes fundamentales del citoesqueleto, siendo clave en la rápida aparición de los cambios morfológicos³⁵⁷. Además modifican la Quinasa de adhesión focal (FAK) y Quinasa 2 P21-activada (PAK2)³⁵⁸, pudiendo colaborar en los cambios estructurales de la membrana citoplasmática.

En resumen, las caspasas participan en la apoptosis de una manera muy bien organizada: cortan los contactos con las células circundantes, reorganizan el citoesqueleto, entorpecen la replicación y reparación de DNA, interrumpe el “splicing”, destruye el DNA, rompe la estructura nuclear, induce la liberación de señales para la fagocitosis y desintegra la célula en cuerpos apoptóticos.

Figura11. Ejecución de la apoptosis: Las caspasas.



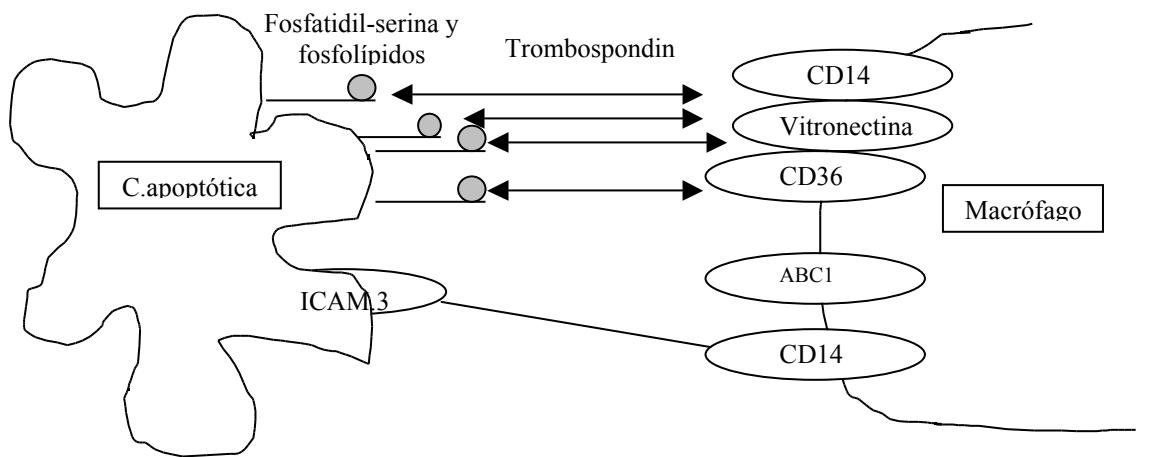
1.7 c.3) Degradación celular:

Se han identificado algunas moléculas en la superficie de los macrófagos y células apoptóticas como mediadores importantes en el proceso de reconocimiento y adhesión para la desintegración de los cuerpos apoptóticos³⁵⁹. Los receptores de las células macrofágicas se han

clasificado en clase A, a los que pertenecen el receptor de macrosialina, ABC 1, receptor vitronectina ($\alpha 3$ integrin), y los de clase B, que incluye a los receptores CD14 y CD 36³⁶⁰.

Los cambios superficiales de la membrana celular y de los lípidos subyacentes que quedan expuestos (fosfatidilserina y fosfolípidos) permiten que los cuerpos apoptóticos puedan ser reconocidos por los receptores situados sobre los macrófagos. Estos receptores tienen la habilidad de unirse a la molécula de trombospondina que ,a su vez, forma puente con la fosfatidilserina (PS) e ICAM 3 (Intercellular adhesión molecule 3) de la célula apoptótica³⁶¹ (Figura 12).

Figura 12: Degradación de la célula apoptótica. Se conocen algunas moléculas localizadas en la superficie de las células apoptóticas y en los macrófagos que intervienen en la interacción y, por consiguiente, en la degradación de la célula apoptótica.



1.7 d) Mecanismos reguladores de la apoptosis

Existen procesos moduladores de la apoptosis que actúan a diferentes niveles:

1.7 d.1) Inactivación de ligandos

Un nivel de regulación consiste en la proteólisis o bloqueo de los ligandos de los receptores de membrana, específicos de la apoptosis, a través de algunos polipéptidos. Por ejemplo la tirosin fosfatasa, unida al dominio citoplasmático de Fas, atenúa la muerte celular mediada por Fas. Otro ejemplo tiene lugar con la proteína SODD (silencer of death domain) que se une a uno de los dominios de TNFR1 y previene espontáneamente la oligomerización del receptor³⁶².

1.7 d.2) Proteínas inhibidoras y favorecedoras de apoptosis

La familia de la proteína bcl-2 son capaces de formar heterodímeros y cuya relación dentro de la célula resulta en una estimulación o inhibición de la apoptosis.

1.7 d.3) Activación de factores de transcripción anti-apoptóticos

Los factores de transcripción son proteínas reguladoras que se unen a lugares específicos del DNA y modulan la expresión de genes. Existen factores de transcripción pro y anti-apoptóticos que activan o reprimen la transcripción de genes implicados en apoptosis. Por ejemplo el factor de transcripción p53, en respuesta a señales apoptóticas, es capaz de activar la transcripción de mdm-2, Bax y p21 favoreciendo así el proceso apoptótico.

Los factores de crecimiento evitan la apoptosis, ya que la activación de sus receptores activa a la quinasa Akt (dependiente de la quinasa serina-treonina) que, a su vez, fosforila la

proteína pro-apoptótica Bad. El Bad fosforilado permanece inactivo en el citosol, ya que se encuentra unido a las proteínas específicas 14-3-3 y no interfiere con las proteínas anti-apoptóticas de la misma familia. La proteína Bak funciona de manera semejante³⁶³.

Los receptores apoptóticos TNRF1 y 2 son capaces de activar factores transcripcionales que favorecen la supervivencia celular, siendo el más importante el NF- κ B. El dominio citosólico del receptor TNRF activado se une a una familia de proteínas citosólicas que activan al gen NF- κ B que favorece, a su vez, la producción de moléculas anti-apoptóticas inhibiendo la activación de la procaspasa 9. Sin embargo otros receptores, como el Fas, carecen de esta función de supervivencia³⁶⁴.

Las proteínas myc y ras tienen también un papel en la apoptosis y exhiben esa dualidad supervivencia-apoptosis. Myc normalmente favorece la proliferación celular. Sin embargo, en condiciones de ausencia de factores de crecimiento, oxígeno o ciertos factores citotóxicos, se propone que myc secuestraría un hipotético factor pro-apoptótico conocido como Saf (supresor of apoptosis by Fas), lo que permitiría que se favoreciera la apoptosis³⁶⁵. Además, es capaz de inducir la activación de genes que sobreexpresen FasL y FasE, incluso activar la vía apoptótica de la p53³⁶⁶. Por otro lado, la inducción de la apoptosis por ras es independiente de p53 y se produce mediante la activación de factores de transcripción específicos (c-jun) que pueden ser suprimidos, a su vez, por la activación del NF- κ B³⁶⁷.

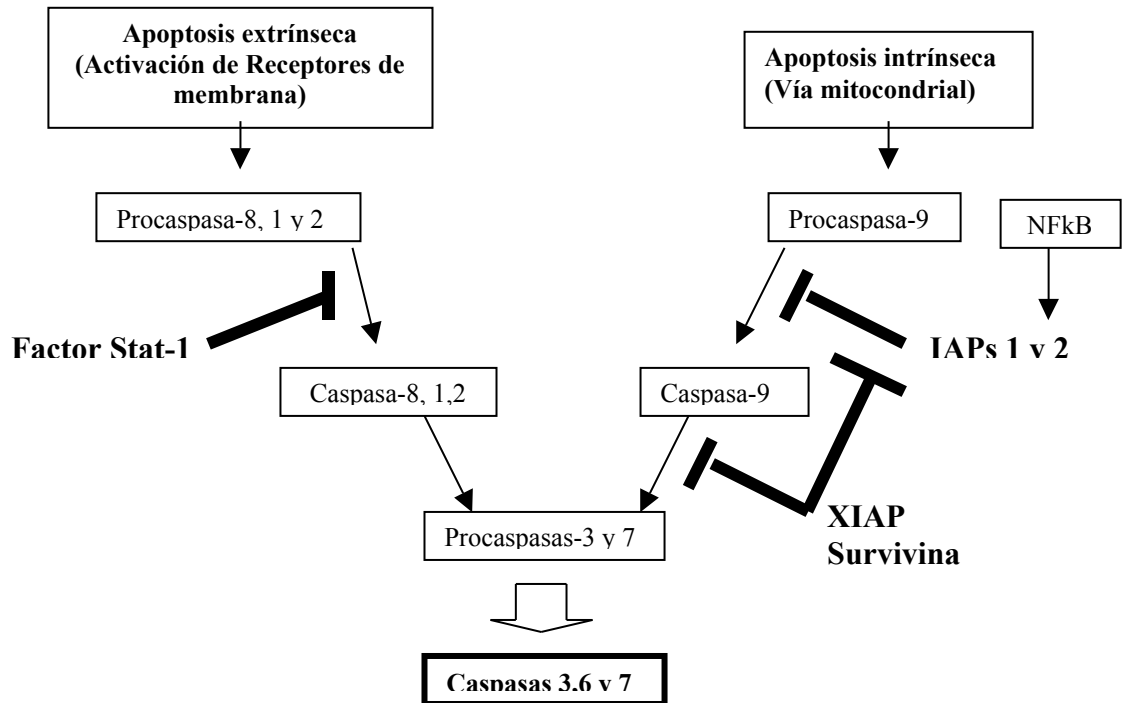
1.7 d.4) Inhibición de las caspasas

La regulación de las caspasas es un mecanismo sofisticado y complejo. Se propone que esta inhibición existe a varios niveles (Figura 13):

Un mecanismo específico de varias caspasas es la regulación de los niveles de procaspasas. Se conoce un factor de transcripción (factor Stat 1) que regula la expresión de las procaspasas 1,2 y 3, observándose en las células que carecen de este factor, una disminución de las mismas, y de la respuesta apoptótica ante ciertos estímulos³⁶⁸.

La existencia de proteínas inhibidora de caspasas (IAP), juegan un papel muy importante en su regulación. Dichas moléculas se identificaron primero en los baculovirus y tienen dos dominios importantes: el BIR (baculovirus inhibitor of apoptosis repeat) y el RING Zn finger, implicados en la interacción con ADN. La cIAP 1 y 2 (cuya expresión es regulada por la transcripción del factor NFkB), inhiben la activación de la procaspasa 9. Además, la XIAP y la survivina inhiben la activación de procaspasas 3, 7 y 9. La survivina sólo tiene un dominio BIR, y actúan inhibiendo la caspasa 3 directamente. Se expresa fisiológicamente en tejidos embrionarios, placenta, timo, estabilizando los microtúbulos del huso mitótico y con mayor intensidad en tumores sólidos y linfomas³⁶⁹.

Figura 13: Mecanismos reguladores de las caspasas. El factor de transcripción Stat-1, las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) 1 y 2 y las proteínas XIAP y survivina inhiben la activación de las caspasas a diferentes niveles.



1.7 e) Mecanismos amplificadores de la apoptosis

Además, existen una serie de mecanismos que afectan a células vecinas de la célula apoptótica, produciendo así una amplificación y transmisión local de la apoptosis.

Esta amplificación local y la propagación del estímulo apoptótico a las células vecinas puede producirse por la vía de la quinasa Akt. Si faltan factores de crecimiento deja de funcionar la citada vía y el factor FKHR-1 sin fosforilar, que tienen un dominio característico de unión al ADN, se transloca al núcleo, activando la transcripción de factores proapoptóticos como Bax, TNF y FasL³⁷⁰.

Otra vía es la producida mediante la proteína proapoptótica Bid, que actúa creando un circuito amplificador entre la vía Fas y la mitocondrial. La activación de la procaspasa 8 transloca Bid hasta la mitocondria, donde libera el coctel de factores letales como el citocromo c, que amplifica la señal apoptótica utilizando la vía mitocondrial³⁷¹.

1.7 f) Significado fisiológico y patológico

La apoptosis es responsable de numerosos acontecimientos fisiológicos y patológicos incluyendo los siguientes:

1. Destrucción programada de las células durante la embriogénesis, desde la implantación pasando por la organogénesis e involución del desarrollo, hasta la metamorfosis. Los espacios interdigitales, los órganos huecos, y la muerte del epitelio redundante en la fisura palatina, son algunos ejemplos de la actuación de la apoptosis durante el desarrollo³⁷².
2. Involución hormonodependiente en el adulto, como la destrucción de células endometriales durante el ciclo menstrual³⁷³, la atresia folicular y regresión del cuerpo lúteo del ovario³⁷⁴ y la regresión de la mama tras la lactancia³⁷⁵.
3. Deleción celular en la proliferación de poblaciones celulares, como por ejemplo el epitelio de la cripta intestinal³⁷⁶ o células de la epidermis.
4. Muerte de las células inmunitarias, tanto linfocitos T como B tras la depleción de citocinas³⁷⁷, además de la deleción de células T autorreactivas en el desarrollo del timo.
5. Muerte celular inducida por células T citotóxicas, como en la reacción inmunitaria celular y en la enfermedad injerto contra huésped³⁷⁸.
6. Lesión celular en enfermedades virales, como las hepatitis víricas, en la que los fragmentos celulares apoptóticos del hígado se conocen como cuerpos de Councilman³⁷⁹.

7. Atrofia patológica de tejidos hormonodependientes, como la atrofia prostática después de la castración³⁸⁰ y la pérdida de linfocitos en el timo tras la administración de glucocorticoides³⁸¹.
8. Atrofia patológica de los órganos parenquimatosos tras la obstrucción de conductos, como en el páncreas³⁸², riñón³⁸³, o glándulas salivares.
9. Muerte celular por estímulos nocivos que son capaces de producir necrosis, pero cuando se administran a dosis bajas inducen apoptosis. Entre estos estímulos se incluye, lesión térmica leve, radiación, fármacos citotóxicos³⁸⁴ y la hipoxia³⁸⁵.
10. Muerte celular en tumores, con más frecuencia durante la regresión, pero también en tumores con crecimiento celular activo^{386, 387}.

1.7 g) Apoptosis y cancer

Según la hipótesis de Nowell³⁸⁸, el desarrollo del cancer se produce por una sucesión de eventos genéticos que conducen a una inestabilidad genética y una pérdida progresiva de la regulación del crecimiento celular. Los modelos experimentales sugieren que el crecimiento tumoral está determinado por, al menos, tres factores principales: a) la duración del ciclo celular; b) el porcentaje de células proliferantes y c) el porcentaje de pérdida celular³⁸⁹.

Además hay una amplia relación entre la proliferación y la apoptosis. Se ha visto que los tumores con un crecimiento más acelerado suelen tener más apoptosis. El índice de renovación (mitosis - apoptosis en 10 campos de gran aumento) parece útil en el análisis de los linfomas y, en relación con factores pronósticos en algunos tumores sólidos como el carcinoma de próstata³⁹⁰.

La carcinogénesis es un proceso en el que una serie de cambios secuenciales en el genotipo celular transforman una célula normal en tumoral única. La acumulación de mutaciones

en varios genes que controlen el crecimiento y la supervivencia celular contribuyen de manera importante en la transformación. Entre estos procesos se incluye la apoptosis. Mutaciones que inactiven la vía proapoptótica favorecerían la progresión tumoral. En condiciones normales, cuando la mutación es irreparable la célula afectada entra en un programa de apoptosis. Pero si la célula escapa del control de la regulación fisiológica de la apoptosis se producirá una división incontrolada que terminará produciendo crecimiento tumoral y metástasis³⁹¹.

Durante dicha transformación celular tiene lugar la aparición y el crecimiento de una población celular premaligna, creyéndose que ocurre sobre el curso de tres etapas: iniciación, promoción y progresión³⁹². En estudios experimentales in vitro de hepatocarcinogénesis se ha visto una alta actividad apoptótica en focos de células preneoplásicas. Por otro lado, el cese del tratamiento promotor de la tumoración, aumentaba también la actividad apoptótica, que era particularmente pronunciada en focos de remodelación³⁹³. Por lo tanto, se cree que un aumento de la apoptosis podría jugar un papel en la eliminación de células preneoplásicas. Otro dato que favorece esta hipótesis es que los promotores tumorales, como el 12-O-Tetradecanoil forbol 13 acetato (T.P.A), pueden inhibir la apoptosis en lesiones preneoplásicas permitiendo la evolución de la tumorogénesis³⁹⁴. Por ello, se podría describir el cancer, como una enfermedad en la que no sólo interfiere una excesiva proliferación de células, sino también, la disminución de la capacidad de las mismas para morir y que los genes que regulan la apoptosis (familia bcl-2 o Apo-1 (Fas)) son tan importantes en la patogénesis molecular y genética de la neoplasia, como los oncogenes (c-myc, Ha ras, ABL) y los genes de supresión tumoral (p53)³⁹⁵.

La muerte celular espontánea es una propiedad inherente a las neoplasias malignas en la que la reducción de masa tumoral se produce por necrosis o por apoptosis. La apoptosis ha sido estudiada en varios tipos de tumores experimentalmente^{396, 397}, y también en tumores humanos.

Stauton mostró que el índice apoptótico en los diferentes tipos de tumores humanos tenía una variabilidad mucho mayor que la mostrada en los estudios experimentales, en la que dicho índice era relativamente pequeño y se mantenía en un estrecho y constante margen ³⁹⁸. Ello sugiere, entre otras propiedades, que los diferentes tipos de tumores difieren en su inherente susceptibilidad genética hacia la apoptosis.

En todas las neoplasias, las células tumorales tienen la capacidad de entrar en un programa de apoptosis, presumiblemente después de ser activado el mecanismo de disparo. Existen diferentes modalidades de inducción de la apoptosis, y por ello, la respuesta final varía con el tipo celular y con otras señales extracelulares ³⁹⁹. El estudio de la extensión de la apoptosis en los diferentes tumores es una medida útil para entender la cinética de las células tumorales y el comportamiento biológico de las mismas.

La apoptosis en los tumores puede estar regulada por los mecanismos de autocontrol propios de los tejidos normales ^{400, 401}, o perder dicha regulación siendo, entonces, inducida por diversos factores presentes en las neoplasias como la isquemia leve, el estrés oxidativo, la citotoxicidad linfocitaria, los factores de necrosis tumoral, las interacciones o disrupciones entre las células epiteliales y la matriz, la radioterapia, las drogas citotóxicas, o por la expresión de nuevos oncogenes ^{402, 403}. Es de señalar que la extensión de la apoptosis, medida en índice apoptótico, en los diferentes tumores no indica el mecanismo de su inducción y desarrollo.

1.7 g.1) Bcl-2 y cancer

Con el descubrimiento de la función antiapoptótica del bcl-2, la apoptosis empezó a considerarse como un paso central en el fenómeno de la tumorigénesis. El poder oncogénico de la translocación de bcl-2 encontrada en algunas neoplasias linfoides, fue verificada en ratones

transgénicos. Además, en estos, se encontró con frecuencia translocaciones en *myc*, lo que también favorecía la progresión a linfoma folicular. La sinergia entre *myc* y *bcl-2* en tumorigénesis puede reflejar la habilidad de cada gen para atacar el poder anti-oncogénico del otro: La sobreexpresión de *Myc* provoca tanto la apoptosis como la proliferación celular, mientras que el *bcl-2* estimula la salida del ciclo celular, así como la supervivencia celular⁴⁰⁴.

Todos los genes de la familia *bcl-2* con función anti-apoptótica tienen potencial oncogénico, y algunas mutaciones probablemente, incrementen su expresión indirectamente. En células hematopoyéticas, oncoproteínas tales como *Myb*, *Ras*, y *AML1-ETO* inducen la expresión de *bcl-2*⁴⁰⁵. Para tumores sólidos, en general, la correlación entre la expresión de *bcl-2* y un mejor pronóstico, es la regla, con la excepción de los adenocarcinoma de próstata⁴⁰⁶. Por otro lado, las células tumorales que expresen *bcl-2* pueden sobrevivir a altas dosis de agentes quimioterápicos, a pesar de tener un daño genético significativo. De hecho se ha demostrado que estas drogas pueden inducir una parada del ciclo celular cuando el *bcl-2* se sobreexpresa, pero sin llegar a producir la muerte celular o haciéndolo muy lentamente, por lo que el *bcl-2* puede convertir una droga citotóxica en citostática⁴⁰⁷.

Los miembros pro-apoptóticos actúan como supresores tumorales. *Bax* es mutado en neoplasias gastrointestinales y algunas leucemias. Además su expresión es activada en algunos tipos de células por *p53* provocando la apoptosis por vía mitocondrial⁴⁰⁸. En un modelo transgénico de tumores de plexos coroideos, así como en fibroblastos, la pérdida de *bax* reducía la apoptosis y aumentaba la tumorigenicidad. Este fenómeno sólo se observó en la mitad de los casos con pérdida de función de *p53*, por lo que se deduce que *bax* no es el único gen responsable de la apoptosis vía *p53*⁴⁰⁹. Una baja expresión de *bax* en las células tumorales de

mama se ha relacionado con un peor pronóstico y mayor tendencia a la progresión de la enfermedad⁴¹⁰.

1.7 g.2) P53 y cancer

En las células normales, hay un balance entre el crecimiento, la diferenciación y el control celular. La muerte celular programada es, además, un mecanismo normal para el control de la población celular. Sin embargo, la falta de apoptosis no parece un único mecanismo para el crecimiento y progresión tumoral, ya que el acúmulo de células tumorales ocurrirá también si existe una proliferación excesiva que compense a la pérdida celular por apoptosis. Esto explicaría porque en la mayoría de los tumores se ha observado altos índices de mitosis junto con altos índices de apoptosis⁴¹¹.

P53 es el gen mutado más común en cánceres humanos, estando involucrado en el desarrollo de al menos, el 50 % de los tumores. La mutación en genes asociados con el ciclo celular, conduce a la pérdida de guardianes del genoma, y a la progresión de células con DNA dañado. La pérdida de p53 conduce a la inestabilidad en el cariotipo, resultando en una aneuploidia, con múltiples amplificaciones y deleciones genéticas, tales como la pérdida de heterocigocidad (LOH). Las mutaciones en tumores humanos se encuentran en conjunción con la pérdida del alelo "wild type". La pérdida de la actividad normal de p53 se ve tanto en neoplasias hereditarias, como en las esporádicas, y en ambas se ha identificado una pérdida del cromosoma 17p⁴¹². Los pacientes que padecen el raro síndrome de Li-Fraumeni, heredan mutaciones en el p53 de la línea germinal, y por consiguiente presentan una pérdida de alelo "wild type" lo que conlleva el desarrollo de numerosos tumores (en corteza adrenal, cerebro, mama, y también sarcomas y leucemias). Estos pacientes tienen una probabilidad de desarrollar un tumor del 90 %

a la edad de 70 años. En los tumores, tanto en los hereditarios como en los somáticos, se tienen que presentar , al menos, dos fenómenos genéticos en p53 para el desarrollo del cancer. Por un lado, la pérdida de un alelo y por otro, la inactivación del alelo restante, y así no existiría ningún tetramero de p53 “wild type”. Este fenómeno ocurre en muchos tumores como en vejiga, cerebro, colón, hígado o pulmón. La p53 mutada produce una ventaja de crecimiento selectivo, incluso ante la presencia de un alelo normal, ya que le permitirá inactivarlo uniéndose a él, y evitando sus interacciones celulares normales⁴¹³.

Por otro lado, la mutación de p53 ocurre precozmente en la secuencia neoplásica, encontrándose en aquellos tumores expuestos crónicamente a carcinógenos externos o inflamación, tales como los carcinomas escamoso de la piel, cancer oral, y tumores sobre esófago de Barret. Sin embargo, la pérdida total de p53 ocurre en la progresión tardía del proceso; se encuentra en la interfase entre adenoma-carcinoma en tumores de colón esporádicos, después de la activación del oncogen Ki-ras y la pérdida del gen supresor tumoral del cancer colorectal (DCC)⁴¹⁴.

Para la detección molecular de cambios genéticos en el p53, se amplificara el DNA por PCR. La técnica de secuenciación directa da un conocimiento exacto de las mutaciones y potencialmente puede identificar todos los sucesos cromosómicos⁴¹⁵. Los métodos indirectos se basan en hacer un screening de mutaciones entre los exones 5-8 que es la región conservada de la molécula de p53. El SSCP (Non-Isotopic Single Strain Conformation Polymorphism) reconoce variaciones de secuencia por la diferencia de propiedades migratorias de las cadenas simples de DNA en gel de acrilamida no desnaturizante⁴¹⁶.

Las técnicas de inmunohistoquímica representan un método importante para la detección de la proteína. Hasta el momento, se ha utilizado como un método indirecto para establecer la

presencia de mutaciones en p53, ya que se había establecido que las mutaciones puntuales en p53 conducía a una estabilización y acumulación de la misma en las células tumorales. La proteína p53 mutada tiene una vida media, relativamente, más larga, alrededor de 12 horas, pero existen algunas mutaciones que no inducen sobreexpresión de p53 (20 % de los casos en tumores humanos). Por otro lado, la proteína p53 “wild type” es virtualmente indetectable en las células normales, ya que su vida media es muy corta, alrededor de 20 minutos. Sin embargo, ante un daño de DNA los niveles de p53 wild type aumenta por estabilización postranscripcional, y son estos niveles los que paran el ciclo celular o, en su caso, provocan apoptosis, siendo esta proteína reconocida inmunohistoquímicamente, igualmente. Por ello, los anticuerpos monoclonales utilizados en inmunohistoquímica, reconocen tanto la proteína “wild type” acumulada ante situaciones de estrés: hipoxia, inflamación, o exposiciones a agentes citotóxicos, como la proteína mutada que se sobreexpresa. De cualquier modo la detección inmunohistoquímica en células tumorales se basa en el aumento de concentración de los niveles de proteína, secundarios a un aumento de síntesis o a una disminución de la degradación con mayor vida media. Una inmunohistoquímica positiva con estudio molecular negativo puede ser explicado, bien por la presencia de la mutación fuera del exón rastreado con la técnica o bien, por el acúmulo y estabilización de la proteína no mutada⁴¹⁷.

1.7 g.3) Resistencia a quimioterapia y radioterapia

El estudio de la apoptosis ha empezado a clarificar porqué muchos tumores son resistentes a los efectos terapéuticos de la radiación y la quimioterapia. La mayoría de las drogas antitumorales, entre los que se incluyen inhibidores de la topoisomerasa, agentes alquilantes, antimetabolitos y antagonistas hormonales, producen apoptosis en células sensibles.

La presencia de células resistentes a la apoptosis en los tumores puede explicar, en parte, la pobre respuesta de esos tumores a la quimioterapia⁴¹⁸. Se pensaba que destruían el tumor directamente por necrosis, pero se ha visto que las células generalmente mueren por la vía de la apoptosis, a menudo por la activación de la p53⁴¹⁹. Las células que hayan sufrido una mutación o no contengan el gen de supresión tumoral p53 o produzcan altos niveles de la proteína bcl-2, presentarán resistencia a los efectos de los tratamientos antineoplásicos⁴²⁰. La producción de bcl-2 es una característica común de muchos carcinomas, linfomas y leucemias. Se ha visto que bcl-2 protege a las células tanto de la apoptosis inducida por quimioterapia como radioterapia. De hecho, la expresión de este en algunos tumores (carcinoma de próstata, neuroblastoma o leucemias) ha sido mostrada como un factor de peor pronóstico

Actualmente se estudian posibles terapias génicas para superar dichas resistencias a la apoptosis. Se intenta introducir el gen de supresión tumoral p53 normal dentro de las células tumorales, con el objetivo de restablecer la producción de proteína p53. También se investiga las vías para prevenir la hiperactividad del gen bcl-2. Otro objetivo sería bloquear los receptores celulares para factores de crecimiento específicos, con el fin de que la célula tumoral entre en el programa de apoptosis.

Resumiendo podemos decir que, la apoptosis es un proceso de vital importancia en la homeostasis tisular que está involucrada en diferentes procesos fisiológicos y patológicos, entre los que destaca el cáncer. La importancia de la apoptosis en las neoplasias se basa en :

- 1- su probable papel en la destrucción de células preneoplásicas.
- 2- estar presente en los tumores ya establecidos, como resultado de procesos intrínsecos de las células tumorales, o por factores externos que tienen lugar en el tejido tumoral.
- 3- ser necesaria para la respuesta terapéutica de las diferentes armas antitumorales.

Es evidente que un mejor entendimiento de la apoptosis en las neoplasias, ampliaría nuestros conceptos acerca de la cinética celular tumoral , que ha estado basada durante mucho tiempo en los índices de proliferación celular y a su vez, nos concedería métodos de conocimiento del pronóstico que pueden influir en las decisiones de las modalidades terapéuticas a emplear.

1.8 GENES DE VIGILANCIA O DE “CHECKPOINT”

Las células eucariotas han desarrollado mecanismos de control sobre el ciclo celular con el fin de asegurar que, en el proceso de división celular, la información genética en las células hijas sea idéntica a la de la célula madre. Estos mecanismos de control ó vigilancia se denominan checkpoints y su objetivo final es el de mantener la integridad genómica.

Los seres vivos están continuamente expuestos a agentes de origen fisiológico y medioambiental que dañan el material genético. La reparación de este daño es fundamental para la supervivencia de la célula. El daño en el DNA dispara varios mecanismos de respuesta en la célula. Uno de ellos es una parada en el ciclo celular, que da tiempo a los mecanismos de reparación a actuar sobre el DNA dañado. Esta parada en el ciclo se denomina checkpoint en respuesta a daño en el DNA y está conservada en todas las células eucariotas desde levaduras al hombre. Otro proceso conservado en la evolución eucariota es el llamado checkpoint mitótico. Si el checkpoint en respuesta a daño en el DNA es un control del ciclo sobre agentes externos al sistema, el checkpoint mitótico es un mecanismo de vigilancia interno, controlando procesos del propio sistema. Durante la mitosis se llevan a cabo procesos definidos y ordenados en el tiempo y espacio. Así, primero se lleva a cabo la condensación de los cromosomas, el alineamiento de cromatidas hijas, su posterior ordenamiento en el uso mitótico, y, por último, su separación. El checkpoint mitótico asegura que éste sea el orden e impide que se lleve a cabo un proceso si el proceso anterior en el tiempo no ha finalizado en su totalidad.

1.8 a) Genes de checkpoint y cáncer

Un fallo en estos mecanismos de checkpoint puede resultar en inestabilidad genómica. En eucariotas superiores ha sido asociado a riesgo de tumorigénesis y/o a determinadas enfermedades degenerativas. Por ejemplo, si en la fase G₂ del ciclo se produce un corte de la doble cadena de DNA que no repara y el ciclo celular no se detiene en mitosis, se pueden producir pérdidas de material genético en las células hijas. El caso más claro de conexión entre falta de checkpoint, inestabilidad genómica y cáncer es el de p53, implicada en el proceso de checkpoint en respuesta a daño en el DNA ⁴²¹. En eucariotas superiores la acumulación de mutaciones ha sido propuesta como una de las causas fundamentales de aparición de cancer. Existen una serie de factores que predisponen a una célula hacia tumoral, que incluyen deficiencias en determinados mecanismos como la apoptosis y control del ciclo celular y la activación de otros como la angiogénesis y la proliferación celular en ausencia de estímulo ⁴²². La existencia de la mutación en un solo gen que incremente el número de mutaciones en el genoma (como por ejemplo, p53), puede provocar, por tanto, una predisposición hacia procesos cancerígenos.

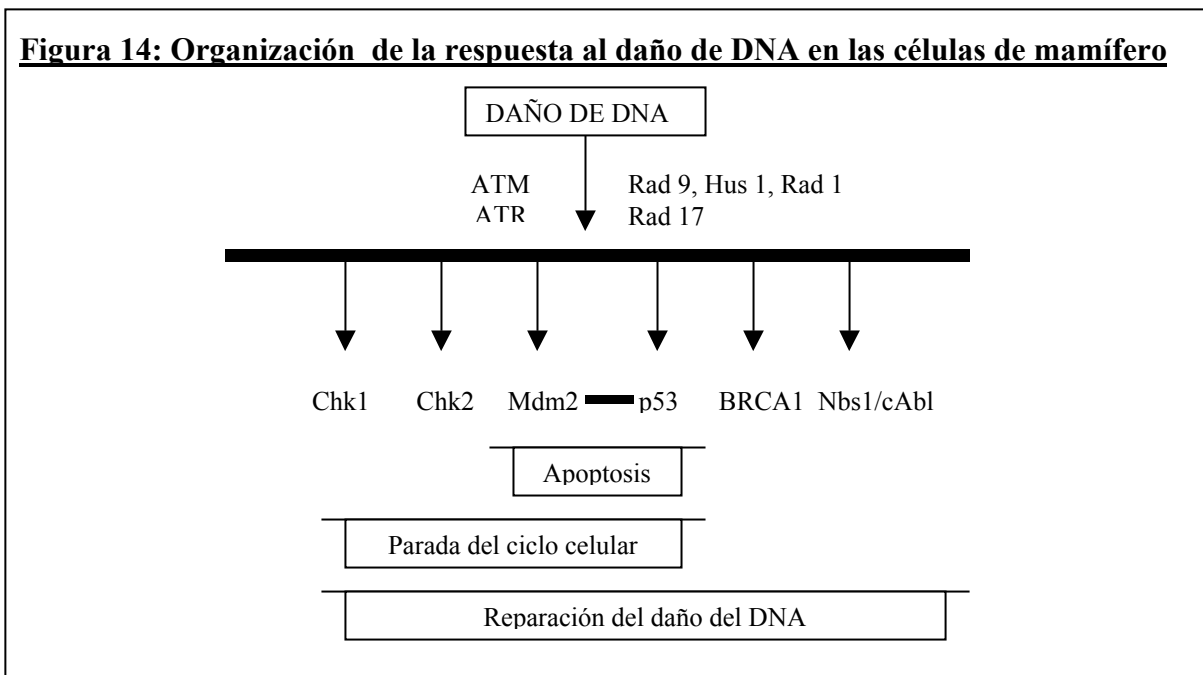
1.8 b) Proteínas de checkpoint (Hus1, Rad9, Rad1)

Estudios genéticos en levaduras han identificado a muchos de los genes implicados en el checkpoint en respuesta a daño en el DNA. Más recientemente se han aislado genes homólogos en humanos, sugiriendo una conservación del mecanismo a lo largo de la evolución. Las proteínas humanas implicadas en este control (grupo de las Rads) se denominan hRad1, hRad9, hRad17, hHus1, ATM y ATR ⁴²³. Estudios genéticos en levaduras demuestran que todas estas proteínas actúan a un nivel cercano al daño en el DNA (es decir, reconocen directamente el daño

o interaccionan con proteínas que reconocen el daño en el DNA), mientras que existen otras dos proteínas por debajo de ellas en una cascada de eventos que conducen a la parada del ciclo celular; éstas son las proteína-quinasa hChk1 y hChk2 . Estas dos proteínas quinasa parecen ser efectoras y establecer la conexión entre la maquinaria de checkpoint en respuesta al daño en el DNA y la de progresión del ciclo celular (ciclinas y proteínas quinasa dependientes de ciclinas).

Las proteínas de checkpoint, hRad1, hHus1 y hRad9 presentan homología con un factor de replicación (PCNA) e interaccionan formando complejos de función desconocida en la célula. HRad17 presenta homología con otro factor de replicación (RF-C) . ATM y ATR son proteína-quinasa de gran tamaño con un dominio catalítico que presenta homología con las proteína-quinasa dependientes de fosfatidil inositol. Estudios recientes en eucariotas superiores han establecido, además, una conexión entre alguno de estos genes y p53 (Figura 14). Por ejemplo se ha descrito que tanto ATM, como ATR y hChk son capaces de fosforilar residuos de p53 importantes en la respuesta a la parada en el ciclo celular⁴²⁴

Figura 14: Organización de la respuesta al daño de DNA en las células de mamífero



Deficiencias en el proceso de checkpoint en respuesta a daño en el DNA se relacionan con inestabilidad genómica en varios organismos. Se ha descrito que líneas celulares con el gen de Hus1 interrumpido presentan un alto porcentaje de alteraciones. También se han descrito conexiones entre estos genes y procesos cancerígenos, en concreto deficiencias en el gen que codifica la proteína ATM provocan una enfermedad genética recesiva, la ataxia telangiectasia, que se caracteriza porque los individuos que la padecen presentan degeneración del sistema nervioso central, deficiencias en el sistema inmune y propensión al cáncer⁴²⁵. También se ha descrito que hChk2, se presenta mutada en un porcentaje bajo de los casos de un síndrome degenerativo humano caracterizado por alto riesgo de tumores, el síndrome de Li-Fraumeni, en el que aproximadamente un 80% tienen mutado el gen supresor tumoral p53⁴²⁶. En el caso de hRad17, se ha descrito como sobreexpresada en determinados cánceres de colon⁴²⁷, y, por el contrario, no se encuentra presente en casos de cáncer de testicular⁴²⁸.

Estudios genéticos en levaduras indican que existen multitud de genes implicados en el proceso de checkpoint mitótico. Algunos de sus homólogos humanos han sido identificados, y se han descrito, además, como relacionadas con procesos cancerígenos. Se trata de hBub1 y de hChfr. hBub1 es una proteína con una actividad quinasa que está implicada en evitar la segregación de cromosomas durante la anafase mientras la formación del uso mitótico no haya finalizado completamente. hBub1 se ha descrito mutada en un porcentaje bajo de cánceres de colon⁴²⁹. hChfr es una proteína que presenta una baja homología con otras proteínas conocidas y actúa en el tiempo antes de Bub1 en el proceso de checkpoint mitótico, concretamente en la transición profase-metafase; recientemente, se ha descrito como no presente en 4 de 8 líneas celulares cancerígenas⁴³⁰.

1.8 c) Proteínas de checkpoint y apoptosis

hRad1, hHus1 y hRad9 son un grupo de proteínas que interaccionan, y que se especula formen en la célula un heterotrímero. Debido a su reciente caracterización en células humanas, su función específica no se encuentra totalmente definida. Sin embargo, otros datos recientes las relacionan con procesos de apoptosis. Por ejemplo, la sobreexpresión de hRad9 en células humanas induce apoptosis y ésta puede ser rescatada por la sobreexpresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-x⁴³¹. El mecanismo molecular de este efecto es la interacción entre ambas proteínas (hRad9 y Bcl-2/x) a través de un dominio BH3. hRad9 es una proteína hiperfosforilada en condiciones normales⁴³², lo que sugiere que su función molecular puede estar regulada mediante modificaciones en su grado de fosforilación.