

Alteraciones celulares y moleculares no clásicas en el desarrollo del cáncer

Víctor Manuel Valdespino-Gómez^{a*} y Víctor Edmundo Valdespino-Castillo^b

^aUnidad Xochimilco, Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F., México

^bHospital General de Zona 1, Instituto Mexicano del Seguro Social. Campeche, Campeche, México

Recibido en su versión modificada: 6 de mayo de 2010

Aceptado: 7 de mayo de 2010

RESUMEN

Se requieren numerosas alteraciones genéticas y epigenéticas para producir la transformación maligna de las células normales. Estas alteraciones participan en las vías moleculares intracelulares onco-génicas que permiten la proliferación y la diseminación de las células tumorales. Hanahan y Weinberg, en su artículo "The hallmarks of cancer", puntuaron las principales características celulares adquiridas en el desarrollo y progresión del cáncer: autosuficiencia de los señalamientos moleculares que inducen crecimiento, insensibilidad a los señalamientos de anticrecimiento, evasión de la apoptosis, potencial ilimitado de la replicación celular, angiogénesis aumentada, e invasión tisular y desarrollo de metástasis. Esta revisión examina otras características biológicas importantes estudiadas en años recientes, entre algunas de las más importantes biomarcas no clásicas del cáncer destacan la inestabilidad genómica, la evasión de la senescencia celular, las alteraciones epigenéticas que modifican los genes relacionados con el cáncer, las alteraciones de la expresión génica por interferencia del mRNA, las alteraciones en el metabolismo intermedio de la glucosa y la glutamina, la participación de las stem cells cancerosas en el mantenimiento de la proliferación celular, la participación de las células estromales en el microambiente tumoral, y las alteraciones en la presentación antigenica celular junto con la immunosupresión por citocinas en el microambiente tumoral. La identificación de las biomarcas moleculares clásicas y no clásicas del proceso tumoral en un tumor específico, permitirá el mejor entendimiento de su fisiopatología y el diseño de estrategias terapéuticas dirigidas personalizadas.

Palabras clave:

Cáncer, biomarcas no clásicas, fenotipo celular tumoral

SUMMARY

A wide number of genetic and epigenetic changes are required to drive normal cells towards malignancy. These changes participate in oncogenic intracellular pathways that allow tumor cells proliferation and dissemination. Hanahan and Weinberg¹ in their seminal paper "The hallmarks of cancer" described the classic cell hallmarks acquired in cancer development and progression: self-sufficiency in growth signals, insensitivity to anti-growth signals, evading apoptosis, limitless replication potential, sustained angiogenesis, tissue invasion and metastasis.

This review covers other recently described biological characteristics associated with the emergence of cancer. Some of the main non-classical hallmarks of cancer that are broadly accepted include: genetic instability, evasion of cell senescence, epigenetic alterations of cancer related-genes, RNA interference alterations in the expression of cancer related-genes, changes in glucose and glutamine metabolism, participation of cancer stem cells in cellular proliferation, stromal cell participation in the tumor's micro-environment, and changes in antigenic presentation and immunosuppression due to cytokines in the tumor's micro-environment. The identification of molecular biomarkers of classical and non classical tumor processes in a specific tumor will allow a better understanding of its pathophysiology. It will also permit the design of ad-hoc therapeutic strategies.

Key words:

Cancer, non-classical hallmarks, tumor cell phenotype

El conocimiento acumulado en los últimos 10 años del estudio subcelular y molecular de las distintas células cancerosas ha coadyuvado al mejor entendimiento de la fisiopatología de las variedades y subtipos de los más de 100 tipos de cáncer que afectan a la especie humana. Hanahan

y Weinberg, en 2000, en su artículo "The hallmarks of cancer",¹ puntuaron las principales características celulares adquiridas en el desarrollo y progresión del cáncer, las cuales se han convertido en las biomarcas biológicas clásicas de las células neoplásicas reconocidas por la mayoría de los auto-

*Correspondencia y solicitud de sobretiros: Víctor Valdespino-Gómez. Andrés Molina Enríquez 361, Col. Ampliación Sinatel, Del. Iztapalapa, 09479 México D.F., México. Correo electrónico: vvaldespinog@yahoo.com.mx

res: autosuficiencia de los señalamientos moleculares que inducen crecimiento, insensibilidad a señalamientos de anticrecimiento, evasión de la apoptosis, potencial ilimitado de la replicación celular, angiogénesis aumentada e invasión tisular y desarrollo de metástasis. Ha transcurrido una década desde la publicación de ese artículo y nuevos conocimientos se han generado.

Además de las características biológicas anotadas en ese trascendente artículo, otras biomarcas biológicas en el proceso de la generación del cáncer han sido analizadas en años recientes. Entre las más importantes biomarcas aceptadas del cáncer no mencionadas por el modelo de Hanahan y Weinberg destacan la inestabilidad genómica, la evasión de la senescencia celular, las alteraciones epigenéticas que modifican los genes relacionados con el cáncer, las alteraciones de la proliferación y diferenciación celular por microRNA, las alteraciones en el metabolismo intermedio de la glucosa y la glutamina, la participación de las *stem cells* cancerosas en el mantenimiento de la proliferación celular, la participación de las células estromales en el microambiente tumoral, y las alteraciones en la presentación antigenica e inmunosupresión en el microambiente tumoral. Aunque la mayoría de estas características biológicas del cáncer eran conocidas antes de la publicación de Hanahan y Weinberg, los nuevos conocimientos generados con nuevos diseños y tecnologías han favorecido su entendimiento.

Diferentes cambios en la secuencias y en el número de copias de genes en *loci* cromosomales y sus correspondientes niveles de expresión de los genes han sido identificados por estudios genómicos a gran escala, y éstos han sido asociados con las características biológicas clásicas y no clásicas del fenotipo celular tumoral. Esto también ha permitido la identificación de redes moleculares conductoras o participantes en los señalamientos intracelulares de iniciación y progresión tumoral. Los estudios de asociación de los cambios del genoma humano empleando tecnologías de amplia cobertura proveen una nueva perspectiva en la estructura, función, regulación y conservación del genoma humano, y permiten entender mejor la fisiopatología molecular de las diferentes enfermedades y de los diferentes tipos de cáncer.^{2,3} Próximamente la exploración integral de la expresión génica tejido-específica (todas las especies de RNA, no solo mRNA), y el uso de la secuenciación genómica de amplia cobertura, conformarán un mapa más completo de las marcas genómicas de asociación con enfermedades específicas.⁴

De igual manera a lo que sucede en la regulación y control de los aparatos y sistemas de un organismo multicelular complejo, por medio de hormonas/señales químicas agónicas y antagónicas en el cuerpo humano, a nivel intracelular, la célula contiene diferentes sistemas moleculares que funcionan de manera agónica o antagónica en la regulación de la expresión de diferentes proteínas, las cuales funcionan como verdaderos efectores intracelulares para modificar el fenotipo celular. Por lo general en cada una de las características fenotípicas celulares participan varias moléculas estimuladoras y sus correspondientes inhibido-

ras, todo ello en un microambiente celular donde, además, algunas de éstas forman parte simultáneamente de cadenas moleculares tanto verticales como horizontales relacionadas con diferentes efectos fenotípicos. Sin embargo, en esta gran red de moléculas, algunas se destacan por ejercer una acción significativa en los cambios fenotípicos celulares, lo cual les permite funcionar como sitios o moléculas "controles" (*hubs*) para dicho efecto celular. El genoma humano puede actualmente explorarse de manera global en su conjunto, desde niveles subcromosómicos de megabases hasta resoluciones de decenas de kilobases,⁵ y establecer asociaciones de marcadores genéticos como factores causales o participantes en procesos patofisiológicos específicos (marcadores pronósticos de la evolución de los pacientes con cáncer).^{6,7}

El 98 % de las enfermedades humanas no infecciosas, como el cáncer, es de naturaleza poligénica,^{8,9} con afectación funcional de los genes por mecanismos de sobreactivación (duplicación, amplificación, sobreestimulación, regulación epigenética positiva, etcétera), subactivación (deleción, pérdida de heterocigosidad, regulación epigenética negativa), de afectación en la maquinaria de transcripción (regulación aumentada o disminuida, participación de los microRNA, etcétera) y afectación en la maquinaria traduccional o postraduccional (proteínas mutadas hiperfuncionantes, hipofuncionantes, proteólisis aumentada, proteólisis disminuida, etcétera), en un ambiente de mayor o menor susceptibilidad genética del hospedero (polimorfismos humanos a partir de su genoma) o por mayor o menor susceptibilidad a modificaciones epigenéticas (hábitos, costumbres, exposiciones, consumo de fármacos). Cada uno de estos factores o su interrelación influye proporcionalmente con diferente impacto en los distintos tipos de cáncer. En los cánceres humanos de adultos, las células tumorales pueden acumular lentamente mutaciones, translocaciones cromosómicas, delecciones puntuales hetero/homocigotos, amplificaciones, o modificaciones de su expresión génica por alteraciones en la maquinaria de regulación epigenética. Para comprender la función de un gen particular resulta clave identificar la participación de su proteína codificada en los procesos o rutas moleculares que sigue en una célula determinada. El producto de un gen puede pertenecer a un subconjunto de proteínas implicadas en el control del ciclo celular y, al mismo tiempo, formar parte de una vía de regulación metabólica.

Los Proyectos Genoma Humano y HapMap han facilitado la identificación de las variantes genéticas heredadas o asociadas con más de 40 enfermedades complejas.¹⁰ De los 25 mil genes ubicados en el DNA de cada una de las células somáticas humanas, aproximadamente 10 mil mantienen el proceso de diferenciación celular, 10 mil se encuentran apagados y cinco mil se conservan activados o "en uso" para ejecutar las funciones de mantenimiento celular (*house-keeping*). De esta última cifra, solo una pequeña porción es susceptible de alterarse y desarrollar tumorigénesis, particularmente los genes codificantes de proteínas que funcionan como reguladoras de vías de señalamientos intracelulares que controlan proliferación y apoptosis, junto con otros que participan en el desarrollo y progresión del cáncer.

En la actualidad se sabe que cada tumor maligno de acuerdo con su subtipo histológico y grado de diferenciación, desarrolla mecanismos moleculares globales similares en su carcinogénesis y progresión, sin embargo, cada tumor individualizado contiene variantes específicas de alteraciones moleculares, las cuales se relacionan y explican las características fenotípicas específicas de agresividad biológica y del comportamiento clínico en el paciente; éstas pueden servir como biomarcadores personalizados de pronóstico y predicción de la enfermedad y de blanco de terapias moleculares dirigidas.^{7,11} Muchos de los nuevos fármacos anticancerosos se dirigen contra moléculas específicas, lo cual permite administrar cocteles farmacológicos personalizados en función del perfil tumoral molecular de cada paciente. El presente documento revisa las principales biomarcas biológicas no clásicas¹ que participan en el inicio y progresión del cáncer, lo cual amplía el complejo panorama de su fisiopatología (Figura 1). Las alteraciones del proceso de diferenciación celular, reconocida universalmente como una de las biomarcas del cáncer, no son analizadas debido a que la información publicada es incipiente para lograr un nivel de entendimiento comparativo al de las biomarcas que se describen.

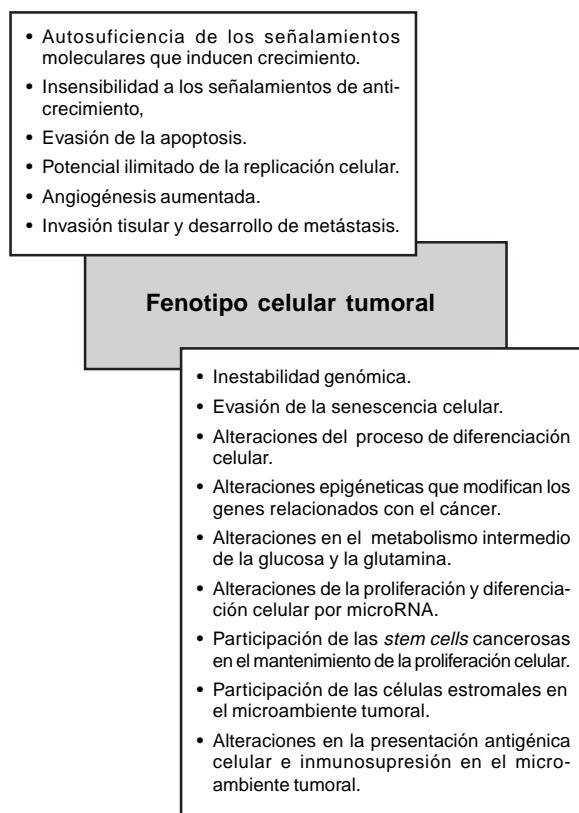


Figura 1. Biomarcas celulares y moleculares identificadas en las células tumorales. El cuadro superior corresponde a las biomarcas clásicas del cáncer descritas por Hanahan y Weinberg. El cuadro inferior corresponde al modelo de las biomarcas adicionales del cáncer identificadas en la última década.

Alteraciones en la reparación del DNA conducen a inestabilidad genómica

El cáncer surge de una serie de alteraciones genéticas y epigenéticas que afectan los genes identificados como onco-genes y genes supresores tumorales. Los genes supresores tumorales pueden clasificarse en genes de mantenimiento celular que codifican productos que estabilizan el genoma (*caretaker*¹²), genes de vigilancia y control celular (*gatekeeper*¹²) y genes que regulan el ambiente microtumoral (*landscapers*¹³). Los genes *caretakers* participan en las vías de reparación del DNA junto con el mantenimiento del telómero e indirectamente en los procesos de los controles del ciclo celular; cuando sufren mutaciones contribuyen a la tumorigénesis ya que pueden aumentar la inestabilidad genómica y la proliferación celular, y disminuir la apoptosis.

La oncogénesis representa un proceso evolutivo en el cual las células acumulan mutaciones, lo cual contribuye a la proliferación celular no programada (*unscheduled proliferation*). En ausencia de señales mitogénicas, la mayoría de los tumores adquiere inestabilidad genómica que provoca nuevas mutaciones y mayor inestabilidad cromosómica, lo cual le otorga a la célula no solo mayores ventajas para la proliferación sino incrementa su susceptibilidad para la progresión tumoral y para adquirir fenotipos tumorales más agresivos.¹⁴ La inestabilidad genómica se clasifica generalmente en dos tipos: inestabilidad microsatelital (que involucra cambios de nucleótidos) e inestabilidad cromosomal (anormalidades estructurales y numéricas de los cromosomas).

Las células en nuestro cuerpo (10^{14}) están continuamente expuestas a lesiones genómicas por errores endógenos en los procesos de división celular y metabolismo (radicales libres derivados de estrés oxidativo: productos de peroxidación, agentes alquilantes endógenos, metabolitos de estrógenos y del colesterol) o por daños externos genotóxicos (radiación ultravioleta, rayos X, rayos gamma, sustancias químicas mutagénicas, virus). Las lesiones más frecuentes del DNA provocadas por agentes endógenos son la oxidación (de bases o azúcares), la alquilación e hidrólisis de bases nitrogenadas (formando sitios apurínicos, por pérdida de una base púrica A o G, o cambiando T por C por desaminación), la formación de aductos, el mal apareamiento de bases por errores en la replicación y las diferentes clases de rupturas en la cadena. Los principales daños provocados por agentes exógenos físicos y químicos son la formación de dímeros de pirimidinas (entre C-T), la ruptura de las cadenas, la depurinización y la formación de diversos aductos. Algunas lesiones del DNA son primariamente mutagénicas y otras son principalmente citotóxicas o citostáticas, dependiendo de la localización y número de lesiones, del tipo celular y de la fase del ciclo celular.¹⁵ Muchas células poseen mecanismos fisiológicos que las protegen de las lesiones genotóxicas, por ejemplo, la melanina como fotoprotector (transforma la radiación ultravioleta en calor), las enzimas biotransformadoras como la catalasa y el superóxido dismutasa (que reducen las concentraciones de los radicales libres del oxígeno), el citocromo P-450 (enzima que detoxifica diferentes sustancias químicas) y la glutatión-

S-transferasa (GST, que conjuga el glutatión-reducido con compuestos electrofílicos impidiendo su potencial mutagénico). La función defectuosa de la GST ha sido identificada en cáncer pulmonar, mamario y prostático.¹⁶

A pesar de los múltiples mecanismos de protección celular contra el desarrollo de inestabilidad genómica, se pueden desarrollar y acumular alteraciones genéticas con la edad o por la exposición crónica a los agentes genotóxicos, lo cual puede conducir a la oncogénesis. Las principales alteraciones genéticas en los tumores son las mutaciones puntuales, las lesiones pequeñas o medianas, como translocaciones, amplificaciones/delecciones parciales o lesiones mayores como pérdida/ganancia de cromosomas completos o incompletos. El daño del DNA nuclear afecta la estructura primaria de su doble hélice, introduce puentes químicos no nativos, aductos y alteraciones en su superenrollamiento. El DNA mitocondrial es dañado más frecuentemente que el DNA nuclear por productos reactivos del oxígeno o radicales libres.

Se ha estimado que la tasa de rupturas de la cadena junto con las lesiones de los nucleótidos del DNA nuclear puede ser cercana a 10^5 eventos por célula al día,¹⁵ debido a exposición a mutágenos endógenos o exógenos, o por defectos en la capacidad de detección o reparación de errores simples en la secuencia nucleotídica; su identificación solo puede efectuarse por análisis de la secuencia nucleotídica del gen (secuenciación del DNA). Veinte o más mutaciones en cada tipo de cáncer han sido identificadas, desde pequeñas inserciones o delecciones de nucleótidos, alteraciones en la conformación B del DNA,¹⁷ hasta lesiones cromosomales medianas o amplias como traslocaciones, amplificaciones y delecciones. Por lo menos más de 100 mutaciones en las 600 proteincinasas normales celulares han sido identificadas en los tumores malignos.

La traslocación cromosómica consiste en la alteración de la ubicación y colocación de dos segmentos de cromosomas diferentes, resultando en la fusión anormal de dos fracciones o genes diferentes (genes quiméricos) o en la colocación de un gen cerca de un elemento regulatorio inapropiado (como alteraciones del promotor génico o de la expresión de microRNA); algunos ejemplos incluyen la traslocación t(9;22) en la leucemia mielocítica crónica (resultando en la expresión del gen quimérico BCR-Abl, promotor del crecimiento celular) y la t(14;18) en el linfoma folicular. Las amplificaciones y delecciones del DNA del tamaño de 0.5 a 10 megabases corresponden a la adición de varias copias de genes o a la eliminación de varios de ellos. Los tumores sólidos particularmente presentan pérdida o ganancia de cromosomas completos, fenómeno conocido frecuentemente como aneuploidía, por ejemplo, los glioblastomas pierden el cromosoma 10 (donde se encuentra localizado el gen PTEN) y los melanomas ganan el cromosoma 7 (donde está ubicado el gen BRAF); o ganancia o pérdida de cromosomas incompletos, como por ejemplo la ganancia del cromosoma 3 o 3q encontrado frecuentemente en cáncer cervicouterino, y el cromosoma Filadelfia en la leucemia mielocítica crónica.

Asimismo, las regiones denominadas microsatélites de DNA (secuencias simples repetitivas de 5-10 nucleótidos

localizadas a lo largo del genoma) presentan alteraciones denominadas *inestabilidad microsatélital*, las cuales también se observan en distintos tipos de cáncer como en las familias de pacientes con cáncer de colon hereditario sin poliposis. Las alteraciones más frecuentes que sufren los genes supresores tumorales son la mutación en un alelo y la delección del segundo alelo, resultando con ello la denominada *pérdida de heterocigosisidad*. Solo en muy escasos tipos de cáncer, el DNA ha sido secuenciado en su totalidad (más de 95 %), lo cual permite identificar los perfiles de mutaciones recurrentes de su patogénesis, como en pacientes con leucemia mieloide aguda-M1 (comparadas con células normales de piel), en los cuales se identificaron 12 mutaciones en secuencias codificantes y 52 en porciones reguladoras del genoma.⁶

Mecanismos de mantenimiento y reparación del DNA, y sus alteraciones en el cáncer

El mantenimiento de la estabilidad genética que un organismo necesita, requiere mecanismos precisos para la replicación y reparación del DNA. La mayoría de los cambios que sufre el DNA son temporales, debido a que son rápidamente corregidos por un proceso complejo de reparación. El DNA es la única biomolécula cuya reparación depende de múltiples mecanismos moleculares; se manufactura o se fabrica solo en la fase S del ciclo celular, permite acumular daño durante toda la vida, lo cual puede alterar su replicación por cambios permanentes secundarios (mutaciones, aberraciones cromosómicas) o alterar su proceso de transcripción (detención de la replicación, contribuir a la senescencia y muerte celulares). Es importante distinguir entre los dos principales tipos de error en el DNA: daño y mutación. El daño corresponde a anomalías físicas del DNA, como ruptura simple o doble de la cadena o la formación de intercalamientos o aductos por hidrocarburos aromáticos policíclicos, aflatoxinas, bromuro de etidio; estas alteraciones pueden ser reparadas correctamente por sistemas enzimáticos si la cadena complementaria del DNA o el cromosoma homólogo no se encuentran dañados. Por su parte, las mutaciones del DNA se producen con menos frecuencia y son difícilmente reconocidas por enzimas ya que el cambio de bases se establece en ambas cadenas. Las células con mutaciones pueden aumentar o disminuir la capacidad para sobrevivir o reproducirse, y pueden ser propagadas a las siguientes generaciones. Ante estos dos tipos de daño del DNA, las células que no se replican o que lo hacen esporádicamente pueden acumular daño y son causa prominente de envejecimiento; las que mantienen condiciones de división activa pueden presentar daños en la replicación celular, mayores mutaciones y tumorigénesis.¹⁶

Las células contienen múltiples sistemas enzimáticos para reparar el DNA, de acuerdo con los diferentes tipos de lesión. El sistema de reparación de errores en la replicación del DNA por agentes exógenos o endógenos (por ejemplo por desaminación oxidativa) está representado por los sistemas de reparación de una cadena sencilla: el sistema de escisión/reparación de nucleótidos (NER), el sistema de escisión/reparación de bases (BER), el sistema de reparación

ción que corrige los errores de la replicación y recombinación del DNA de nucleótidos no dañados (MMR); y por los sistemas de reparación de doble cadena integrados por una intrincada cascada de proteínas que participan en el proceso de la recombinación homóloga (HR) y en el proceso de unión de extremos no homólogos (NHEJ).^{15,16}

Los sistemas de reparación NER y BER responden principalmente a lesiones exógenas o endógenas de agentes que dañan al DNA deformando su hélice alfa, por ejemplo, radiación ultravioleta, químicos exógenos (carbohidratos policíclicos aromáticos). El sistema BER involucra varias enzimas DNA glucosilasas, que reconocen bases específicas alteradas y catalizan su remoción hidrolítica (junto con el azúcar fosforilado mediante una AP endonucleasa), para que luego una DNA-polimerasa y una ligasa coloquen y peguen el nucleótido complementario. El sistema NER comprende un complejo multienzimático constituido por DNA-nucleasas, DNA-helicasas y DNA-polimerasas/ligasas, que reparan lesiones más voluminosas formadas por dímeros de pirimidinas o por aductos covalentes (benzopireno). Los genes XP (genes mutados en el síndrome de xeroderma pigmentosa) implicados en el reconocimiento y reparación de lesiones puntuales del genoma y los genes CS involucrados en la reparación acoplada a la transcripción (genes mutados en el síndrome Cokayne) forman parte del sistema NER.

Si la ruptura de la doble cadena del DNA por exposición a radiación ionizante o daño oxidativo no es reparada puede conducir a translocaciones, amplificaciones/delecciones de los cromosomas. La ruptura de las dos cadenas en el DNA es detectada y reparada por una cascada de proteínas que involucran los procesos de HR, de NHEJ y de unión de los extremos mediados por microhomología. El inicio de los señalamientos que reparan la doble cadena incluyen cinasas parecidas a PI3K, ATM y ATR, las cuales fosforilan a varias proteínas como la histona H2AX y las CHK2 y CHK1, las cuales activan a p53 y a las proteínas del complejo MRN (MRE11/RAD50/NBS1) que participan en el mantenimiento del telómero. La reparación del DNA a partir de la HR utiliza como modelo la cadena idéntica de la cromátida hermana, los complejos MRN y CHK reconocen a la doble cadena y activan la proteína de replicación A y la RAD51 para iniciar la síntesis del DNA (la helicasa BLM en conjunción con la topoisomerasa IIIa la separan de la otra doble cadena). La ruptura de las dobles cadenas en humanos es reparada predominantemente por el sistema NHEJ. Algunas proteínas asociadas con la reparación de la ruptura de la doble cadena se encuentran mutadas en diferentes cánceres, entre ellas las BRCA1 y BRCA2, quizás las proteínas más estudiadas en los tumores (cáncer de mama/ovario familiar), y participan en el proceso de la HR; sus mutaciones pueden desestabilizar el genoma y promover el desarrollo del cáncer. La BRCA1 forma un heterodímero con BARD1, el cual está implicado en el control de las fases G1/S y de la G2/M del ciclo celular; por su parte, BRCA2 regula la citocinesis.^{15,17}

El proceso de reparación por NHEJ requiere que los extremos rotos de la doble cadena de DNA sean reconocidos por el heterodímero Ku70-/Ku80, el cual recluta a una proteincinasa DNA-PK y una nucleasa-Artemis que sintetizan el DNA, para que finalmente la ligazón se realice por un complejo que contiene XRCC4 y DNA/ligasa 4; los defectos de la NHEJ pueden promover la tumorigénesis.

Cuando las lesiones del DNA ocasionan el bloqueo de la transcripción, la célula utiliza un sistema de reparación acoplado a la transcripción (TCR) para reparar el daño, el cual corresponde a un tipo de sistema de NER que permite que se reanude la transcripción. El sistema de reparación de la transcripción (RNA polimerasa) se asocia con el NER y es particularmente específico para desbloquear la transcripción por aductos voluminosos; los pacientes que solo presentan deficiencias en el TCR tienen mayor sensibilidad a la luz solar, pero no mayor incidencia de cáncer de piel.¹⁸

Los individuos que heredan defectos genéticos en los diferentes sistemas de reparación del DNA permiten que sus células acumulen mutaciones en tasas elevadas (inestabilidad genómica) y muestren predisposición a desarrollar cáncer. La acumulación de mutaciones y cambios epigenéticos provoca defectos en los controles normales de división/diferenciación celular y apoptosis, y todo ello puede contribuir al desarrollo y progresión de cánceres.

Alteraciones que evaden la senescencia celular

Todas las células somáticas contienen moléculas controladoras que regulan la progresión en el ciclo celular y la senescencia celular; en un organismo vivo, el número de células se mantiene relativamente constante a través de un permanente equilibrio entre la muerte y la división celular. Las células son reemplazadas cuando funcionan inadecuadamente o se enferman, y la proliferación celular compensa la muerte celular; este mecanismo es parte de la homeostasis u homeodinamia. La homeostasis celular se logra cuando la tasa de mitosis en el tejido está balanceada por la tasa de muerte celular o viceversa. Si las células se dividen más rápidamente que las que mueren, se desarrolla un tumor; si las células se dividen más lentamente que las que mueren, se provoca pérdida celular y se presentan varias enfermedades relacionadas con una mayor tasa de envejecimiento. La homeostasis incluye una serie de mecanismos que controlan los procesos celulares de supervivencia/senescencia, proliferación, diferenciación, apoptosis y de reparación del daño.

La tasa de reparación del DNA depende de muchos factores que incluyen el tipo celular, la edad de la célula y el microambiente extracelular. Una célula que acumule daño celular crónico (acortamiento del telómero, capacidad reducida de reparación del DNA, deficiencia en los controles de homeostasis celular) puede desarrollar tres condiciones: entrar a senescencia (detención permanente del ciclo celular), a apoptosis o a un estado de división celular perturbado que conduce a la tumorigénesis.^{19,20} La respuesta al daño del DNA incrementa los niveles de inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CDK) o disminuye el nivel de los activadores de CDK, con lo que se bloquea la transición en el ciclo celular de G1/S o G2/M.¹⁴

El mantenimiento de los sistemas orgánicos adultos requiere la participación balanceada de la apoptosis y de la renovación celular (sobrevivencia y senescencia). Los errores en la replicación del DNA debidos a carcinógenos intrínsecos o ambientales coadyuvan a la generación de cambios para la transformación maligna. Uno de los efectos más importantes de los genes supresores tumorales es activar la apoptosis y la senescencia, las cuales están relacionadas con las vías de p16^{INK4a}, ARF-p53 (regulan la progresión del ciclo celular) y la regulación de los telómeros. Por lo tanto, la inducción de la senescencia y de la apoptosis es considerada parte del proceso de protección contra el cáncer.

En el proceso de senescencia, las células cultivadas sufren la detención permanente del crecimiento *in vitro* o *in vivo* después de un periodo de vida finito. La senescencia celular es diferente de la quiescencia, condición permanente o irreversible inducida por acortamiento telomérico, provocada por daño prolongado del DNA por activación de oncogenes/estrés oxidativo y desencadenada por la expresión de p16^{INK4a}, ARF, p53, p21 y Rb (*versus* p53, p21, Rb, p107, p130).²¹ La senescencia inducida por p53 implica también un efecto antiproliferativo por la estimulación de la expresión de p21^{CIP} (inhibidor de cinasa dependiente de ciclina), que detiene la progresión del ciclo celular. Un sensor importante de la activación de los oncogenes es p14ARF, el cual se une y bloquea el p53 a través de su degradación mediada por MDM2.

El proceso de senescencia celular actúa como una barrera a la tumorigénesis, y la expresión de la β-galactosidasa y de p16^{INK4a} han sido empleadas como marca de ella. La senescencia está íntimamente asociada con la activación del gen INK4a/ARF, también llamado CDKN2a que codifican p16^{INK4a} y ARF, y del gen CDKN2b que codifica a p15^{INK4b}, proteína que también activa a Rb. En diferentes cánceres humanos frecuentemente se presenta delección homocigota del locus *INK4a/ARF/INK4b* (localizado en el cromosoma 9p21) que elimina la expresión de estas proteínas; de manera similar, estos tres genes supresores tumorales han sido encontrados inactivos epigenéticamente en diferentes cánceres.

Además de los genes que directamente median la senescencia (p16^{INK4a}), otros genes supresores tumorales (proapoptóticos) se encuentran frecuentemente mutados en cáncer. Uno de los más frecuentes es el p53, cuyas mutaciones heredadas se asocian con el síndrome de Li-Fraumeni, caracterizado por el desarrollo de cáncer a temprana edad; el otro gen que comúnmente se encuentra mutado es el CHK2 (molécula que detecta el daño al DNA). No obstante, la mayoría de los pacientes con cáncer esporádico también presentan mutaciones en el locus de p53. El p53 es el principal participante en la respuesta del estrés celular y frecuentemente se inactiva durante la transformación maligna. Las mutaciones de los genes requeridos para la reparación del DNA (como NBS1) provocan fenotipos mutadores por la hiperacumulación de mutaciones secundarias; p53 controla la muerte celular programada (induce la vía extrínseca y la intrínseca de la apoptosis en múltiples pasos) y la senescencia celular; se requiere la pérdida de su función para que el tumor prevalezca.²²

La senescencia inducida por la activación de oncogenes (RAS) o por inactivación de genes supresores tumorales

(PTEN) está provocada por la expresión de p16^{INK4a} y p14^{ARF} (inhibe la función de MDM2, provocando la acumulación y activación de p53). La expresión de p16^{INK4a} en conjunción con las histonas y no histonas (HMGA) de la cromatina promueven la activación de RB, el cual reprime los genes blanco de E2F. La pérdida de expresión de p16^{INK4a} en los tumores humanos se debe a cambios epigenéticos (alteraciones en los patrones de metilación del DNA y modificaciones de las histonas) que contribuyen a la inestabilidad genómica y facilitan el desarrollo de aneuploidía. La senescencia está caracterizada por la acumulación de elevadas cantidades de inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas y detención permanente del ciclo celular en G1. Hay evidencias que sugieren que el incremento en la expresión de p16^{INK4a} y de p53 se asocia con el envejecimiento celular.

Mantenimiento del telómero

La manifestación biológica más prominente de la función de los genes supresores tumorales es la apoptosis y la senescencia, y estos procesos están relacionados con tres poderosas vías de señalamiento que los controlan: 16^{INK4a}-RB y 14^{ARF}-p53, junto con la relacionada con la regulación del telómero.

Como hemos mencionado, la senescencia difiere de la quiescencia celular en varias características:

- En estado quiescente la célula puede entrar al ciclo celular, mientras que en senescencia no es posible.
- La senescencia puede ser inducida por acortamiento del telómero, por daño prolongado del DNA, por estrés oxidativo y por la activación de oncogenes, mientras que la quiescencia por condiciones de privación de nutrientes, de factores de crecimiento en el suero y de daño transitorio del DNA.
- En la senescencia se expresa β-galactosidasa, en la quiescencia no.
- La senescencia mantiene como biomarcadores la alta expresión del inhibidor del activador de plasminógeno y la pérdida de la expresión de c-fos inducida por estimulación sérica, y en la quiescencia están ausentes.
- La senescencia requiere la activación de 16^{INK4a}, 14^{ARF}, p53, p21 y Rb; la quiescencia requiere la activación de p53, p21, p27, Rb, p107 y p130.¹⁹ La expresión ectópica de 16^{INK4a} es suficiente para producir senescencia, y ésta se puede retardar silenciando el gen 16^{INK4a} mediante oligonucleótidos antisentido o con siRNA.

La senescencia previene el cáncer, algunas evidencias de ello muestran que las células con función alterada de 16^{INK4a}-RB en presencia de exposición a carcinógenos desarrollan cáncer. 16^{INK4a} participa de forma importante en la prevención del cáncer; su pérdida a través de mutaciones puntuales o pequeñas delecciones (deleciones homocigotas de INK4a/ARF/INK4b) o el silenciamiento por metilación de su promotor ha sido observada en múltiples tumores de diversas histologías. Estos genes supresores tumorales pueden ser inducidos por radiación ionizante, radicales oxidativos, disfunción del telómero, edad y estrés replicativo.

Los telómeros, nucleoproteínas de 5 a 15 kb colocadas en los extremos de los cromosomas contienen cientos de repeticiones nucleotídicas de doble cadena TTAGGG y un complejo de proteínas (TRF1, TRF2, POT1, TPP1, RAP1) son importantes para mantener la estabilidad de los extremos de los cromosomas, formando una estructura denominada asa t (t-loop).²³ La longitud del telómero disminuye con el envejecimiento, activando el programa de senescencia. Muchas proteínas de reparación del DNA que participan en los procesos de RH y NEHJ se relacionan con el mantenimiento de los telómeros.

En las células somáticas humanas la telomerasa se expresa en niveles bajos o no detectables, lo que conduce al acortamiento del telómero; en contraste, en muchos tumores, la expresión de telomerasa es elevada y el telómero se encuentra alargado, manteniendo su función de cubierta cromosómica. La disfunción telomérica puede ser responsable de fragmentación cromosómica, de traslocaciones y de la formación de cromosomas dicéntricos (unidos por sus extremos) y, por ende, de inestabilidad cromosómica y eventualmente carcinogénesis.

Algunas proteínas reguladoras de la estructura del telómero como la TRF2 se encuentran sobreexpresadas en diferentes carcinomas, esta proteína interactúa con diferentes proteínas reparadoras del DNA como el complejo MRN, BLM helicasas, DNA-PK, PARP, etcétera. El crecimiento celular puede ser detenido en respuesta de la activación de oncogenes, estrés oxidativo, condiciones no óptimas de cultivo o contacto con fármacos de quimioterapia, a través de la activación de las vías de RB y p53, lo cual provoca senescencia "replicativa".¹⁹

En condiciones subóptimas de cultivo, el crecimiento de las células humanas es detenido por senescencia, asociado con el acortamiento de los telómeros y a la activación de p16^{INK4a} y de p53. La división de células tumorales con telómero corto y disfunción de la vía de p53 incrementa la inestabilidad cromosomal, lo cual conduce a perder viabilidad y capacidad de proliferación (estado de crisis replicativa). Para salir de esta crisis, la célula tumoral restaura la longitud del telómero, sobreregulando la actividad de la telomerasa o empleando otros mecanismos alternativos de alargamiento del telómero.

La subsecuente reactivación de la telomerasa, junto con otras condiciones de inestabilidad genómica en clonas transformadas, mejorará parcialmente la estabilización del genoma a un nivel compatible con la viabilidad celular para permitir la carcinogénesis (predominantemente en tumores epiteliales). Una actividad aumentada de la telomerasa ha sido observada en más de 80 % de todos los cánceres humanos, y aunque en ellos los telómeros son frecuentemente cortos, la telomerasa restaura su función, lo cual favorece que la célula salga de la crisis celular relacionada con el acortamiento del telómero y progrese la oncogénesis. Las células cancerosas evaden la senescencia replicativa de dos maneras: adquieren los cambios genéticos y epigenéticos que alteran el control del ciclo celular, aun en condiciones de acortamiento telomérico (inactivando la vía de p53), o mantienen la actividad de la telomerasa (eventualmente desarrollan mecanismos alternativos para alargar los telómeros).

La disfunción telomérica *per se* produce amplificaciones o delecciones de diferentes regiones del DNA; en condiciones de supresión tumoral (p53 activo) provoca apoptosis y senescencia, pero cuando coincide con la pérdida de p53 se produce desestabilización del genoma, mutaciones y tumorigénesis.²³ La telomerasa sintetiza al telómero, es una ribonucleoproteína compleja con actividad de transcriptasa inversa constituida por un componente de unión al telómero (hTERC) y un componente de transcriptasa inversa (hTERT); su promotor es controlado por c-Myc. En condiciones fisiológicas, los niveles de telomerasa son insuficientes para mantener la longitud del telómero, resultando el desgaste progresivo en cada división celular. En los humanos, el riesgo de desarrollar cáncer aumenta a partir de la cuarta década, esto refleja un fenotipo celular propenso a la acumulación de carga mutagénica: existe disminución de la capacidad de reparación del DNA, aumento del silenciamiento epigenético de los genes supresores tumorales, acortamiento de los telómeros y alteración en los microambientes hormonales y estromales.

Alteraciones epigenéticas que modifican la expresión de los genes relacionados con el cáncer

El cáncer tradicionalmente ha sido visto como un desorden genético primario, sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que diferentes alteraciones epigenéticas colaboran en la inducción del crecimiento celular maligno.²⁴ La actividad de los genes está influida por modificaciones epigenéticas: alteraciones químicas menores que modifican la expresión del DNA, sin alterar la estructura primaria del DNA o que alteran el soporte del DNA en la cromatina a través de modificaciones menores en las histonas. Diversos compuestos han sido identificados como carcinógenos epigenéticos (no muestran actividad mutagénica), entre ellos el dietilestilbestrol, el hexaclorobenceno y algunos compuestos de níquel y arsénico. Las alteraciones epigenéticas se presentan universalmente en los cánceres humanos provocando cambios en la expresión génica y en la estructura de la cromatina.²⁵ Aunque la inestabilidad génica se ha considerado una marca del cáncer, no está totalmente aclarado si la desorganización cromosomal es causa o consecuencia de la tumorigénesis, algunos tipos de cánceres muestran mínima inestabilidad genómica y la tumorigénesis ha sido generada probablemente por cambios epigenéticos (metilación del DNA, modificaciones en las histonas, ubicación alterada del nucleosoma, RNA no codificantes).²⁶

Las bases moleculares de la epigenética son complejas, involucran modificaciones menores de la activación de ciertos genes pero no de la base estructural de DNA. El perfil epigenético celular se hereda parcialmente cuando las células se dividen; sin embargo, la mayoría de los cambios epigenéticos en las células diferenciadas ocurren en el transcurso de las fases G0/G1. Algunos de los más evidentes ejemplos de procesos epigenéticos fisiológicos son la impronta genómica (fenómeno en mamíferos donde los

progenitores contribuyen con expresión diferencial de un gen), el silenciamiento de genes en la inactivación del cromosoma X, la reprogramación genómica y la regulación de las modificaciones de histonas y de la heterocromatina. El fenotipo de una célula está directamente influido por los genes que transcribe, siendo que los dos principales sistemas epigenéticos de regulación en la expresión de los genes son la metilación de la citosina en los dinucleótidos CpG del DNA y el remodelamiento de la cromatina a través de las modificaciones postraduccionales de las histonas. La metilación de la citosina en el DNA es mediada por DNA-metiltransferasas (DNMT) y por proteínas que unen metilos a los CpG (MeCP2 y MBD1).

El remodelamiento epigenético de la cromatina es logrado por dos mecanismos: modificaciones en los aminoácidos en las histonas, como acetilación, metilación, ubiquitinización, fosforilación y sumoilación; y por adiciones de grupos metilos en los sitios CpG del DNA celular, para convertir la citosina en 5-metilcitosina, lo cual modifica las propiedades electroquímicas de la interfase DNA-cromatina. Estas alteraciones modifican la expresión génica por procesos enzimáticos, así la acetilación de las histonas se asocia con activación de la transcripción, mientras que la metilación del DNA tiende a la desactivación de la transcripción. Pueden ocurrir múltiples modificaciones simultáneamente en diferentes regiones génicas, lo cual puede provocar cambios significativos en la transcripción de múltiples genes específicos.

Los mecanismos epigenéticos son esenciales para el desarrollo normal y el mantenimiento tisular de los patrones de expresión génica. El inicio de la diferenciación en las células madre somáticas y en las *cancer stem cells* (CSC) está asociado con la alteración de la expresión de genes, la cual depende de la remodelación de la cromatina.²⁷

El inicio y la progresión del cáncer se desarrollan en un ambiente de anormalidades epigenéticas junto con alteraciones genéticas.²⁸ Existe en los cánceres humanos una fuerte relación entre las alteraciones de metilación del DNA y la inestabilidad genómica²⁵ junto con otros factores, como los relacionados con las modificaciones de la cromatina. Las células malignas muestran alteraciones importantes en sus perfiles de metilación de DNA, particularmente hipermetilación en las regiones de los promotores génicos e hipometilación global del DNA. La hipermetilación conduce a pérdida de la expresión génica, particularmente de genes supresores tumorales reguladores del ciclo celular, genes de reparación del DNA, genes asociados con apoptosis, de regulación hormonal y de detoxificación.²⁹ La hipometilación genómica se presenta en diferentes tumores sólidos que activan oncogenes como H-RAS, BORIS/CTCFL, FGFR1, c-MYC, etcétera.^{30,31} Así, la hipermetilación de genes supresores y la hipometilación de oncogenes y de algunas secuencias repetitivas (LINE1, Alu, otros transposones) son elementos principales para desarrollar la carcinogénesis.³² Uno de los métodos para explorar el perfil de metilación del DNA de todo el genoma es el uso de tecnologías que acoplan los microarray de DNA a la inmunoprecipitación del DNA metilado.³³ Otras técnicas relacionadas con la identificación de los cambios epigenéticos incluyen la inmunoprecipitación de croma-

tina (ChIP-on-chip), la identificación de la DNA-metiltransferasa (DamID) y la secuenciación del DNA tratado con bisulfito.

McKenna y Roberts²⁶ han considerado que dado que las alteraciones epigenéticas silencian genes supresores tumorales tanto como activan oncogenes, esto puede provocar inestabilidad genómica y de manera secundaria la carcinogénesis, por ello han propuesto un modelo novedoso del desarrollo de tumorigénesis en el cual el cáncer se iniciaría por los eventos epigenéticos en las poblaciones de células madre somáticas, lo cual formaría un ambiente favorable para la acumulación de mutaciones genéticas adicionales y el desarrollo del tumor. De acuerdo con este modelo, la inestabilidad genómica podría ser consecuencia de las alteraciones epigenéticas y no el evento iniciador de la carcinogénesis. La idea de que las alteraciones epigenéticas pueden ser suficientes para provocar tumorigénesis constituye un nuevo paradigma de mecanismo. Apoyando este paradigma, un número limitado de tipos de cáncer muestran mínima inestabilidad cromosómica o de microsatélites.³⁴

Una conexión estrecha entre los procesos epigenéticos fisiológicos y fisiopatológicos y el proceso de interferencia de la expresión génica por RNA no codificantes ha permitido identificar que diferentes microRNA (miRNA) modulan directa o indirectamente la actividad de la maquinaria epigenética, y que por ello pueden servir como biomarcadores de procesos biológicos alterados o blancos para terapias dirigidas.³⁵

Alteraciones de la proliferación y diferenciación celular por miRNA

Los miRNA controlan diferentes procesos celulares fundamentales a través de la transcripción genética y de mecanismos de regulación epigenética; en los últimos años ha habido una expansión del entendimiento de su papel en la patogénesis del cáncer. La identificación del proceso de la interferencia por RNA (RNAi) fue precedida por las observaciones de la inhibición transcripcional por RNA antisentido expresa- da en plantas transgénicas y por el silenciamiento de genes provocado por RNA de doble cadena, publicadas por Mello y Fire en 1998.³⁶ Los miRNA son RNA pequeños de 18-23 nucleótidos, no codificantes, altamente conservados, que controlan la expresión postranscripcional por medio de la degradación de los mRNA o por la inhibición de la traducción de proteínas; participan en los procesos de desarrollo, diferenciación celular, regulación del ciclo celular y de apoptosis. Se ha considerado que aproximadamente 1000 miRNA se encuentran presentes en las células humanas y que regulan la codificación de la tercera parte de las proteínas sintetizadas. Cada miRNA regula la expresión de múltiples RNA, y muchos miRNA están asociados con la iniciación y progresión del cáncer humano. Algunos miRNA tienen actividad oncogénica, mientras que otros actúan como supresores tumorales;³⁷ los miRNA supresores tumorales funcionan disminuyendo la función de los protooncogenes (KRAS, NRAS, HMGA2), mientras que los miRNA oncogénicos disminuyen la función de los genes supresores tumorales (Bcl-2, p53). Los distintos miRNA derivan de genes trans-

critos pero no traducidos a proteínas, se forman a través de varios pasos: un transcripto primario (pri-miRNA), un transcripto intermedio (pre-miRNA) y, finalmente, un transcripto maduro o funcional miRNA, el cual puede ser complementario total o parcialmente de uno más RNA mensajeros, siendo su principal función la de regulación por medio de disminuir la expresión del gen.

La localización de los genes de los miRNA en el DNA es variable: en regiones codificantes de proteínas, no codificantes, intergénicas, intrónicas, en regiones 3'UTRs del RNAm, transposones, etcétera. La expresión de los miRNA está controlada en los niveles transcripcional y postranscripcional, a partir de pri-RNA (constituido por 70 nucleótidos); este precursor es inicialmente remoldeado y cortado en el núcleo por las enzimas Drosha y Pasha, y luego el pre-miRNA en el citoplasma por la endonucleasa Dicer y finalmente el miRNA inicia la formación de un complejo responsable del silenciamiento de genes o interferencia de RNA llamado complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), cuyo principal componente catalítico es la endonucleasa llamada Argonauta. Aunque se requieren seis nucleótidos del miRNA para su perfecto acoplamiento con el mRNA generalmente en el sitio 3'UTRs, los nucleótidos previos o posteriores a este sitio también son requeridos para ello. Los miRNA participan también en el funcionamiento normal de las células eucariotas y su desregulación ha sido asociada con diferentes enfermedades (ver la base de datos en www.mir2disease.org). Su sobreexpresión o baja expresión se asocia con varias enfermedades humanas; algunas alteraciones de miRNA (deleciones, sobreexpresiones, baja regulación, etcétera) se asocian con algunos tipos de cáncer.^{38,39}

La expresión de los miRNA puede ser identificada por un tipo de RT-PCR modificada seguida de QPCR, por microarreglos de miRNA o por otros métodos.⁴⁰ La actividad de los miRNA puede ser bloqueada por oligonucleótidos específicos llamados también antagomir, y este efecto puede ser explorado *in vitro* e *in vivo*. Una secuencia complementaria de RNA de doble cadena puede sintetizarse de acuerdo con la secuencia del gen de interés, e introducirlo en una célula o en un organismo; mediante el uso de este mecanismo se han logrado disminuciones importantes de la expresión del gen blanco (no se logra la eliminación de expresión del gen); a esta técnica se le denomina comúnmente *knock down*. En la mayoría de los experimentos realizados por interferencia del mRNA en células de mamífero, se emplean cadenas cortas de RNA, ya que las dobles y largas cadenas de RNA inducen liberación de interferón al material genético extraño como respuesta de inmunidad innata; para facilitar su introducción se emplean plásmidos recombinantes o vectores virales recombinantes que se introducen a la célula por medio de transfección.⁴⁰

La interferencia de la expresión génica por microRNA es un camino promisorio para estudiar o tratar el cáncer a través del silenciamiento de genes sobreexpresados involucrados en la progresión tumoral, como la sobreexpresión de la histona 3 (H3K27) metiltransferasa EZH2, la cual disminuye la expresión del gen tumoral supresor p16^{INK4A}.⁴¹ En los últimos años el tratamiento de muchas otras enfermedades está siendo explorado empleando esta estrategia.

Los miRNA han sido identificados como importantes reguladores de la pluripotencia y de la diferenciación de la progenie de las células madre somáticas y CSC, y su disfunción provoca alteraciones en el control del ciclo celular, de la diferenciación y supervivencia y al desarrollo del cáncer.⁴² La primera evidencia experimental de la participación de los miRNA en la carcinogénesis fue informada en la leucemia linfocítica crónica en 2004;⁴³ muchos de ellos desempeñan un papel importante en el cáncer, como el miR-15a, el miR-16-1 (los niveles de Bcl2 se correlacionan inversamente con la expresión de miR-15/16), la familia miR-34, la familia let-7 entre otros.^{44,45} La expresión de los miRNA se encuentra desregulada en el cáncer por una variedad de mecanismos que incluyen la amplificación, delección, mutación y silenciamiento epigénico. Diferentes alteraciones específicas de los miRNA han sido identificadas en cánceres de mama, hepático, broncogénico, de colon y gástrico;⁴⁶ incluso dentro de estos perfiles, algunas variaciones de ellos se asocian como factores clínicos pronósticos. En estudios recientes se ha demostrado que algunos miRNA reprimen directamente enzimas de las maquinaria epigenética (DNA-metiltransferasas, histonas deacetilasas e histonas metiltransferasas), por lo que el establecimiento del nivel de algunos de los miRNA podría eventualmente establecer de nuevo las vías moleculares alteradas en cáncer;^{44,45} esta estrategia también puede utilizarse como terapia molecular codependiente dirigida, en vías de señalamientos intracelulares donde los oncogenes (como KRAS) han sido resistentes a otros tratamientos.⁴⁷

Alteraciones de las células tumorales en el metabolismo intermedio de la glucosa y la glutamina

El crecimiento de las células eucariotas requiere un mayor gasto de glucosa para cubrir las necesidades energéticas y de biosíntesis. El metabolismo está involucrado directa o indirectamente en todas las funciones que realiza la célula, ello implica una conexión entre las vías de señalamiento intracelular de diversos procesos celulares y el control metabólico de cada organismo. En contraste con las células diferenciadas cuya energía necesaria para sus procesos celulares la obtienen de la fosforilación oxidativa mitocondrial, la mayoría de las células en proliferación, tanto como las células cancerosas, muestran un metabolismo anabólico, un aumento de la glucólisis aeróbica y una disminución de la fosforilación oxidativa, fenómeno denominado efecto de Warburg.⁴⁸ La glucólisis aeróbica no es una vía eficiente para producir ATP pero es conveniente para formar las biomoléculas necesarias (nucleótidos, aminoácidos, lípidos) en la proliferación celular. Las células tumorales con rápido crecimiento celular muestran tasas glucolíticas 200 veces más altas que las células de los mismos tejidos. El efecto Warburg en las células tumorales sirve como vía bioenergética y biosintética; 10 % de la glucosa disponible produce energía por glucólisis vía piruvato en la mitocondria y 90 % lo emplea para la producción de ácido láctico en el citosol, esto aun con niveles intracelulares suficientes de

oxígeno. La glucólisis provee del material bioquímico requerido en la síntesis de biomoléculas durante el crecimiento celular, por lo que la glucosa es empleada tanto para generar biomasa como para producir ATP.

En la mayoría de las células neoplásicas en cultivo, la glucosa (en forma de lactato) y la glutamina (en forma de lactato y alanina) son las principales fuentes de carbón y nitrógeno para formar biomoléculas, así como fuentes de energía libre y de equivalentes reductores (NADH) necesarios para el crecimiento y división celulares. Durante este proceso, la glucosa es convertida inicialmente a acetil-CoA en la matriz mitocondrial y entra al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (realizando reacciones anapleróticas y catapleróticas) o es excretada al citosol para la síntesis lipídica. Recientemente se ha identificado un circuito molecular que enlaza el control de los genes del metabolismo de la glucosa con alteraciones epigenéticas de la cromatina, particularmente por medio de la acetilación de las histonas dependiente de la ATP-citrato liasa (enzima que convierte el citrato derivado de la glucosa a acetil-CoA).^{49,50}

La identificación del incremento de gasto y metabolismo de la glucosa por las células tumorales comparado con las del tejido normal es el fundamento de la realización de la tomografía por emisión de positrones con fluoro-2-deoxi-D-glucosa para el diagnóstico clínico.⁵¹ Por otro lado, el aminoácido glutamina es la segunda molécula más importante después de la glucosa en el fenotipo metabólico de las células en proliferación; ambos nutrientes cooperan para satisfacer las necesidades energéticas y de los precursores intermedios para la síntesis de macromoléculas, particularmente la glutamina es utilizada para la síntesis de purinas, pirimidinas, hexosaminas (en forma de glutamato), aminoácidos no esenciales y glutatión-reducido (antioxidante endógeno que sirve como amortiguador de productos del estrés oxidativo).⁵²

El interés en el estudio del metabolismo tumoral ha renacido recientemente en parte por la identificación de las conexiones moleculares entre el proceso de transformación y el metabolismo celular, y por la posibilidad de estudiar el metabolismo celular del tumor *in vivo*. Normalmente diferentes protooncogenes y genes supresores participan en la regulación del metabolismo celular y sus mutaciones (por ejemplo de p53, PI3K, Ras, Myc) contribuyen en el metabolismo tumoral. Así, la vía de la fosfoinositidocinasa 3 (PI3K) está relacionada tanto con el control del crecimiento como con el metabolismo de la glucosa (consumo y utilización); la PI3K/AKT regula la hexoquinasa y la fosfofructocinasa (también modifica a mTOR); c-Myc favorece la glutaminólisis; LKB1/AMPK y p53 disminuyen el flujo de la glucosa a glicólisis aeróbica en condiciones de baja disponibilidad de energía o en estrés oxidativo; la activación de RAS puede inducir el efecto Warburg, etcétera.⁵³ Las mutaciones de otras enzimas metabólicas como la succinato deshidrogenasa y la fumarato hidratasa también inducen el efecto Warburg. Las células en fase de proliferación expresan selectivamente la isoenzima piruvato cinasa tipo M2 (M2-PK), la cual induce el efecto Warburg en las células tumorales.⁵⁴ Distinta a otras isoformas de las piruvato cinasas, la M2-PK

es regulada por proteínas tirosina-fosforiladas, las cuales funcionan como un *switch* molecular que permite a las células metabolizar la glucosa mediante glucólisis aeróbica solo en presencia de señales moleculares de crecimiento.

Las mitocondrias son organelos vitales en la homeostasis celular, producen ATP por medio de la fosforilación oxidativa y participan en la apoptosis mediante la liberación del citocromo c de su membrana interna hacia el citoplasma, lo cual activa la cascada de caspasas (cisteinproteasas). Dado su papel central en el metabolismo, las alteraciones de las mitocondrias por mutaciones en el mtDNA o en los genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales (succinato deshidrogenasa que forman parte del complejo II, y la proteína GRIM-19, del complejo I) desempeñan un papel importante en diferentes enfermedades humanas. En la especie humana existen 37 genes codificados por el mtDNA, 22 de ellos codifican a distintos RNA de transferencia y 13 codifican a proteínas del sistema de la fosforilación oxidativa (OXPHOS): ND1, -2,-3,-4, ND4L, ND5, -6 (forman parte del complejo I), CytB (del complejo III), COI, COII, COIII (del complejo IV), ATPasa6 u ATPasa8 (del complejo V).⁵⁵ Las mitocondrias como fábricas de energía de la célula forman productos reactivos del oxígeno, los cuales pueden provocar mutaciones del mtDNA, y consecuentemente conducir a anormalidades enzimáticas. La tasa de mutaciones del mtDNA es 10 a 20 veces mayor a las del DNA nuclear, en parte por la cercanía de altas concentraciones de productos reactivos del oxígeno. Las mitocondrias contenidas en las células cancerosas muestran dos principales alteraciones: son relativamente resistentes a la permeabilización de su membrana, lo que limita la vía intrínseca de la apoptosis⁵⁶ y presentan reducción de la OXPHOS, por lo que el ATP es generado de la conversión de glucosa a piruvato, y luego eliminado como lactato. La acumulación de una gran cantidad de mitocondrias anormales se ha identificado en oncocitomas tiroideos, mamarios, renales, etcétera, los cuales muestran diferentes patrones de alteraciones de los 13 genes codificados por el mtDNA; la producción defectuosa de ATP explicaría la proliferación elevada compensadora de mitocondrias en este tipo de células.

Los mecanismos por los cuales las mutaciones de las mtDNA/DNA (genes codificadores de enzimas mitocondriales) conducen a la tumorigénesis no están totalmente entendidos, pero el aumento de la glucólisis aeróbica favorece la supervivencia de las células en microambientes tisulares de hipoxia y acidez (lo cual puede conducir a la activación HIF1-alfa, resultando con ello la transcripción de genes asociados con la tumorigénesis),⁵⁷ escapando también de la formación excesiva de radicales de oxígeno y así evitar la apoptosis.

El fenotipo metabólico de las células tumorales, denominado también metaboloma del tumor muestra en general las siguientes características: actividad enzimática glucolítica elevada, expresión de la isoenzima piruvato cinasa tipo M2 (M2-PK), redirecciónamiento de los carbonos de la glucosa para sintetizar ácidos nucleicos, aminoácidos y fosfolípidos, elevada síntesis de bases púricas y pirimidínicas, baja relación de ATP + GTP/CTP + UTP, alta capacidad glutami-

nolítica y liberación de sustancias inmunosupresoras.⁵⁸ Por todo ello, actualmente algunos inhibidores de la glucólisis se encuentran en ensayos clínicos como agentes anticáncer.⁵⁹ Sin embargo, el efecto de Warburg no es universal en el metabolismo de las células tumorales y por ello es necesario identificar el perfil metabólico de cada tipo tumoral.

Participación de las *cancer stem cells* en la renovación tumoral

Los tejidos normales se renuevan a partir de células precursoras llamadas células tallo, células madre o *stem cells*. En los adultos, las células madre somáticas se mantienen en un estado indiferenciado, capaces de autorrenovarse y proliferar en intervalos de larga duración; o capaces de diferenciarse progresivamente hasta formar células terminalmente diferenciadas, las cuales ejecutan tareas especializadas. Los cánceres mantienen semejanzas con la organización de sus tejidos originales, ya que la mayor proporción de las células en la población tumoral pueden tener un potencial proliferativo limitado y solo una pequeña proporción de las células son capaces de autorrenovarse; a esta subpoblación se le denomina *cancer stem cells* (CSC). El concepto de CSC implica dos aspectos: el que estas células son blanco del proceso de la oncogénesis y que dan origen a dos tipos de células: las nuevas CSC y las células derivadas tumorales o células que propagan el tumor (TPC, el mayor componente de la masa tumoral), que corresponden a células tumorales diferenciadas o en diferenciación.⁶⁰ En términos operacionales, las CSC son las células tumorales capaces de iniciar un xenotrasplante; por su parte, las TPC son células originadas de las CSC que pierden el fenotipo de *stem cell*, pero conservan el fenotipo tumoral. Se ha demostrado la presencia de CSC en la leucemia mieloide aguda, en cánceres mamario, de colon, de ovario, de páncreas, de próstata, del área de cabeza y cuello, y en glioblastoma.^{61,62}

La investigación de las CSC ha recibido enorme atención en los últimos cinco a 10 años, sin embargo, quedan varios puntos por aclarar. Las CSC podrían derivar de *stem cells* normales a través de la desregulación de las vías de proliferación y diferenciación, controladas por la actividad de oncoproteínas, como la BMI-1, un oncogen represor de Notch, de Sonic hedgehog (SHH) y de WNT. Las alteraciones genéticas del cáncer que contribuyen a la desregulación en la renovación celular pueden ocurrir en el compartimiento de las *stem cells* o en sus siguientes progenitores, o eventualmente en el de células diferenciadas. La vía de señalamiento WNT que normalmente regula la renovación de las *stem cells* se encuentra alterada en muchos cánceres. En cáncer colorrectal, la inactivación del gen APC conduce a la estabilización inadecuada de la β-catenina, resultando en la translocación nuclear y la activación de los genes LEF/TCF, los cuales participan en el control de la proliferación y supervivencia, y regulan la migración y el programa de autorrenovación.^{61,62}

Se requieren por lo menos 10^4 a 10^5 células tumorales para que un autotransplante o un homotransplante tumoral

se pueda desarrollar, ya que las poblaciones tumorales son heterogéneas en su capacidad de proliferación. La frecuencia de las CSC en leucemia mieloide aguda es menor de una en 10 mil células, y se ha estimado que en tumores sólidos es de una en 1000 células.⁶³ A semejanza de las células madre somáticas, las CSC poseen la capacidad de autorrenovarse (probablemente con programas genómicos parecidos) y producir poblaciones tumorales heterogéneas en diferente proporción (con diferente programa genómico) cuando el tumor se encuentra en crecimiento. Las células madre de leucemia comparten algunas características fenotípicas con las células madre hematopoyéticas, por ejemplo, la expresión de patrones inmunofenotípicos CD34+ y CD38-, sin embargo expresan marcas específicas como IL-3Ra y CD123, algunas isoformas de CD44, NF-κB y PTEN, las cuales participan importantemente en su supervivencia. En algunos tumores sólidos también se han identificado marcas fenotípicas de CSC, como en el carcinoma mamario (CD44+CD24^{low}), en algunos tipos de tumores malignos del sistema nervioso (CD133+), en cáncer de colon (CD133+), en carcinoma epidermoide del área de cabeza y cuello (CD44+), con elevada expresión de BMI-1, etcétera.⁶¹

Se han propuesto dos mecanismos sobre el origen de las CSC: a partir de las mutaciones oncogénicas o alteraciones epigenéticas que transforman a las *stem cells* o por la acumulación de mutaciones oncogénicas o alteraciones epigenéticas en células diferenciadas que se mantienen en proliferación. Las CSC son biológicamente distintas a la mayor parte de las células del tumor, sus vías de señalamiento moleculares de supervivencia y respuesta al daño (presencia de transportadores de resistencia a las drogas) son diferentes. Las CSC en los tumores sólidos promueven la transición celular de su forma epitelial a su forma mesenquimatosa (por liberación de Zeb1, Zeb2 y Twist, y miembros de la familia TGFβ), lo cual se ha relacionado con progresión tumoral. La identificación de las CSC en los tumores tiene diferentes implicaciones en el pronóstico, en el tratamiento y en las terapias por emplear (selección de blancos moleculares). Las células CSC son frecuentemente resistentes a los agentes quimioterapéuticos, contienen mecanismos moleculares como las proteínas MDR que eliminan los medicamentos citotóxicos; si las CSC fueran eliminadas, el resto de las TPC podrían involucionar por diferenciación celular y apoptosis. El comportamiento de las CSC parece estar influido por sus aberraciones genéticas específicas en un tumor dado, por el estado de progresión de la enfermedad y por las drogas utilizadas para tratar de evitar el crecimiento tumoral. Actualmente los tratamientos contra el cáncer, como la quimioterapia, no destruyen una suficiente cantidad de CSC y frecuentemente el tumor reaparece. Es muy probable que las estrategias de tratamiento dirigidas a CSC combinadas con las estrategias de tratamiento de las poblaciones TPC, optimen el tratamiento para obtener mejores resultados clínicos.⁶² Solo en algunos tumores como en el carcinoma hepatocelular⁶⁴ han sido identificadas las diferentes vías moleculares de señalamientos y los mecanismos de regulación epigenética de sus CSC.

Participación de las células estromales en el microambiente tisular tumoral

Los tejidos contienen gran variedad de tipos de células que trabajan en conjunto para mantener su funcionamiento, se intercomunican a través de señales facilitadoras e inhibitorias. Las células estromales se encuentran en el tejido conectivo, el cual le da soporte y organización estructural a las células del parénquima. Los principales tipos de células estromales incluyen los fibroblastos, las células de la respuesta inmunológica, los pericitos, las células endoteliales y las células de la respuesta inflamatoria; por ejemplo, las células estromales en la epidermis liberan factores de crecimiento que promueven la división celular, y con ello el proceso de regeneración de la piel. Las lesiones proliferativas focales se acompañan de alteraciones de los patrones de crecimiento en el tejido donde se ubican, no solo asociadas con la generación de vasos sanguíneos por cambios bioquímicos o metabólicos del microambiente tumoral, sino por diferentes cambios de las células estromales.⁶⁵ Algunos de los más importantes reguladores del comportamiento de una célula normal y de la homeostasis tisular son la matriz extracelular (a través de proteínas de unión y moléculas de adhesión), y los fibroblastos estromales.

Uno de los ambientes locales frecuentes que se asocian con la oncogénesis es un microambiente de inflamación crónica, el cual favorece la proliferación y supervivencia celular tumoral.⁶⁶ Estudios recientes sobre la regeneración tisular han demostrado que las *stem cells* estromales de diferentes tipos participan en la regeneración tisular (*stem cell* mesenquimáticas) y en la coordinación del sistema inmune para promover una reparación del tejido y prevenir la infección del lecho tisular.⁶⁷

Avances recientes en la expresión génica y el perfil genético y epigenético de las células estromales han mejorado nuestro entendimiento de las interacciones entre las células epiteliales y las células mesenquimales que propician un microambiente permisivo para la tumorigénesis.⁶⁸ Los señalamientos paracrinos entre las células estromales y epiteliales son importantes en la regulación de la proliferación, invasividad, angiogénesis y comportamiento metastásico.^{69,70}

Una gran variedad de células estromales, particularmente células derivadas de la médula ósea, son movilizadas y reclutadas por los tumores (la regulación de esto se desconoce), aumentando su crecimiento y facilitando su invasión y metástasis. Los tumores en su desarrollo reclutan diferentes tipos de células estromales que favorecen la promoción tumoral, como células endoteliales, pericitos, fibroblastos y varios tipos de células derivadas de la médula ósea como macrófagos, neutrófilos, mastocitos, células mieloídes supresoras y *stem cell* mesenquimáticas. Los macrófagos asociados con el tumor son el tipo de células derivadas de la médula ósea capaces de modificar el comportamiento del ambiente tumoral, ya que promueven la angiogénesis, la invasión tisular, la invasión capilar y las metástasis; los mecanismos moleculares de algunos de estos fenotipos de las células estromales ya han sido identificados.⁷¹ Las células mieloídes supresoras suprimen la respuesta inmune

adaptativa, bloqueando las funciones de los linfocitos CD4 y CD8 y NK a partir de la producción de arginasa y óxido nítrico; corresponden a una variedad de células mieloídes inmaduras identificadas en humanos con diferentes marcas inmunofenotípicas (en ratones como CD11b⁺GR1⁺), su acumulación en el microambiente tisular se asocia con el crecimiento y progresión tumoral. Las *stem cell* mesenquimáticas, aunque no son de origen hematopoyético, residen en la médula ósea y junto con las plaquetas favorecen la diseminación metastásica de las células malignas (expresan los receptores VIIa y X, que sirven para iniciar la coagulación). Actualmente una gran cantidad de agentes que bloquean las funciones de las diferentes células estromales del microambiente tumoral se encuentran en exploración en ensayos preclínicos.⁷²

Alteraciones en la presentación celular de antígenos y la generación de condiciones de inmunosupresión local en el microambiente tumoral

La inmunología del cáncer es el estudio de las interacciones del sistema inmunológico y las células tumorales; en general, los pacientes con cáncer generan una respuesta inmune adaptativa (generalmente no efectiva) contra el tumor. La respuesta inmune incluye el reconocimiento de los antígenos específicos (péptidos inmunogénicos de antígenos asociados con el tumor),⁷³ y su eliminación se lleva a cabo principalmente a través de linfocitos y de células *natural-killer* (NK) que infiltran el tumor (TIL); sin embargo, esta respuesta falla ya que las células malignas desarrollan mecanismos que la evaden, reduciendo su antigenicidad y desregulando el proceso de presentación de antígenos. Las células malignas producen también citocinas imunosupresoras que bloquean la función y proliferación de los TIL y NK, e incluso pueden eliminar activamente a los linfocitos T a través de inducirles muerte celular.⁷⁴

En los últimos 10 años se ha logrado un notable progreso en la acumulación de evidencias científicas para entender los procesos de inmunovigilancia e inmunorrespuesta (*immunoediting*) en los pacientes con cáncer. La inmunovigilancia sustenta que los linfocitos actúan como centinelas, reconociendo y eliminando las células transformadas, inhibiendo la carcinogénesis y manteniendo la homeostasis. La inmunorrespuesta es un proceso de dos principales etapas:⁷⁴ eliminación y equilibrio/escape. La fase de eliminación está constituida por cuatro subetapas:

1. Reconocimiento del crecimiento tumoral (remodelamiento estromal y daño tisular) por células de la respuesta inmunológica innata (NK, NKT, que producen INF γ , macrófagos y células dendríticas).
2. Síntesis de INF γ y quimiocinas CXCL10, CXCL9 y CXCL11 para provocar muerte tumoral, reclutamiento de una mayor cantidad de células de la respuesta inmunológica y bloqueo de la angiogénesis.
3. Los NK y macrófagos liberan IL12, además de INF γ , lo que favorece la producción de intermedios del oxígeno

y nitrógeno, las células dendríticas activan a los linfocitos Th1 en los ganglios linfáticos para facilitar el desarrollo de los linfocitos CD8+.

4. Los linfocitos CD4+ y CD8+ acuden al microambiente tumoral y los linfocitos T citotóxicos destruyen las células que contienen el antígeno tumoral.

En la etapa de equilibrio y escape, las células tumorales que sobrevivieron a la fase de eliminación entran en fase de equilibrio (proliferación/muerte), y debido a su inestabilidad genética mutan rápidamente, adquieren resistencia a la eliminación inmunológica y entran a la fase de escape, donde finalmente continúan creciendo y se expanden de forma descontrolada. La tasa alta de infiltración de los linfocitos CD4+Th1+ y CD8+ en el microambiente tumoral ha sido reconocida como una marca de la respuesta inmunológica antitumoral en múltiples tumores, y se ha identificado como un factor pronóstico independiente de menor recurrencia tumoral y mayor supervivencia en los pacientes.⁷⁵⁻⁷⁷

Mecanismos que emplea el tumor para escapar de la respuesta inmunológica

Aun cuando las células malignas expresan antígenos específicos y los pacientes con cáncer tienen el potencial de desarrollar una respuesta inmunológica adaptativa contra el tumor, los TIL (CD8+) y los NK generalmente fallan ante los mecanismos que desarrolla el tumor para evadir la inmunovigilancia y la inmunorrespuesta efectiva. Las células tumorales se hacen invisibles al sistema de inmunovigilancia y evaden el sistema de inmunorrespuesta, alterando las proteínas necesarias para la presentación de antígenos asociados con el tumor, principalmente las moléculas clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), ya sea por mutaciones genéticas o por pérdida o baja expresión de todas o algunas moléculas aloespecíficas de este complejo, las cuales son esenciales para la presentación de los péptidos obtenidos por degradación por proteosoma a los linfocitos CD8+ citotóxicos. Las células tumorales pueden presentar también alteraciones en la maquinaria del procesamiento de las proteínas para producir los antígenos asociados con el tumor en los mecanismos de su degradación en el proteosoma o de transportación al retículo endoplásmico (TAP-1, TAP2).

Las células malignas liberan factores solubles como citocinas inmunosupresoras, prostaglandinas y VEGF, las cuales redireccionan la respuesta inmunológica para favorecer un ambiente de crecimiento tumoral y evadir la inmunorrespuesta. Las células tumorales producen citocinas como IL4, IL5 e IL10, TGF-β1 y TGF-β2, IL6, M-CSF, y prostaglandinas, que suprimen la proliferación de linfocitos B y T e inducen la producción de IL10 y VEGF (que inhiben el desarrollo de células dendríticas maduras). Un último mecanismo que las células tumorales utilizan es eliminar directamente a las células del sistema inmunológico por medio de la expresión de FasL, el cual induce la muerte celular de los TIL reactivos.

La posibilidad de estimular la respuesta de los linfocitos T en el tratamiento del cáncer tiene teóricamente múltiples

ventajas: los linfocitos T pueden ir a los depósitos específicos de tejido tumoral no importa donde se localicen, y pueden proliferar y atacar hasta que el tumor sea erradicado, sin provocar toxicidad al tejido adyacente.^{78,79} Sin embargo, para lograr el éxito terapéutico clínico se tendría que superar todos los mecanismos de escape o tolerancia inmunológica que desarrollan los tumores.

En conclusión, el reconocimiento integral de las biomarcas moleculares clásicas y no clásicas del proceso tumoral conduce a la mayor identificación de genes relacionados con el cáncer junto con su participación en las vías de señalamientos intracelulares oncogénicas, permitiendo un mejor entendimiento de sus complejas fisiopatologías. La traslación rápida de estos conocimientos a la práctica clínica permitirá la modulación y el interventionismo de esos señalamientos moleculares y mejorará la atención médica del paciente con cáncer.

Referencias

1. Hanahan D, Weinberg R. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
2. Zhou Y, Barlogie B, Shaughnessy JD. The molecular characterization and clinical management of multiple myeloma in the post-genome era. *Leukemia* 2009;23:1941-1956.
3. Cooper CS, Campbell C, Jhavar S. Mechanisms of disease: biomarkers and molecular target from microarray gene expression studies in prostate cancer. *Nat Clin Pract Urol* 2007;4:677-687.
4. Hardy J, Singleton A. Genomewide association studies and human disease. *N Engl J Med* 2009;360:1759-1768.
5. Herrick J, Bensimon A. Introduction to molecular combining: genomics, DNA replication and cancer. *Methods Mol Biol* 2009;521:71-101.
6. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med* 2009;361:1058-1066.
7. Toguchida J, Nakayama T. Molecular genetics of sarcomas: applications to diagnosis and therapy. *Cancer Sci* 2009;100:1573-1580.
8. Thornton-Wells TA, Moore JH, Haines JL. Genetics, statistics and human disease: analytical retooling for complexity. *Trends Genet* 2004;20:640-647.
9. Balmain A, Gray J, Ponder B. The genetics and genomics of cancer. *Nat Genet* 2003;33 Suppl:238-244.
10. Kraft P, Hunter DJ. Genetic risk prediction—are we there yet? *N Engl J Med* 2009;360:1701-1703.
11. Nagarajan RP, Costello JF. Molecular epigenetics and genetics in neuro-oncology. *Neurotherapeutics* 2009;6:436-446.
12. Kinzler KW, Vogelstein B. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 1997;386:761-763.
13. Michor F, Iwasa Y, Nowak M. Dynamics of cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2004;4:197-205.
14. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 2009;9:153-166.
15. Hoeijmakers JHJ. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med* 2009;361:1475-1485.
16. Reed SI. Cell cycle. En: DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. *Cancer, Principles & Practice of Oncology*. 8th Edition. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2008. pp. 79-92.
17. Wang G, Zhao J, Vasquez KM. Methods to determine DNA structural alterations and genetic instability. *Methods* 2009;48:54-62.
18. Hanawalt PC, Spivak G. Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:958-70.
19. Yan Q, Wajapeyee N. Exploiting cellular senescence to treat cancer and circumvent drug resistance. *Cancer Biol Ther* 2010;9:166-175.
20. von Figura G, Rudolph KL. Cancer and aging-biological mechanisms. *Oncologie* 2009;32 Suppl3:34-38.
21. Wong KK, Sharples NE, DePinho RA. Telomeres, Telomerase and cell immortalization. En: DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. *Cancer, Principles & Practice of Oncology*. 8th Edition. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2008. pp. 53-66.
22. Zuckerman V, Wolyniec K, Sionov RV, Haupt S, Haupt Y. Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence. *J Pathol* 2009;219:3-15.
23. Artandi SE, DePinho RA. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis* 2010;31:9-18.

24. Downing JR. Cancer genomes-continuing progress. *N Engl J Med* 2009;361:1111-1112.
25. Sadikovic B, Al-Romaih K, Squire JA, Zielenska M. Cause and consequences of genetic and epigenetic alterations in human cancer. *Current Genomics* 2008;9:394-408.
26. McKenna ES, Roberts CWM. Epigenetics and cancer without genomic instability. *Cell Cycle* 2009;8:23-26.
27. Siddiqi S, Mills J, Matushansky I. Epigenetic remodeling of chromatin architecture: exploring tumor differentiation therapies in mesenchymal stem cells and sarcomas. *Curr Stem Cell Res Ther* 2009 (Epub ahead of print)
28. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 2009;31:27-36.
29. Valdespino VG, Valdespino PC. Mecanismos epigenéticos celulares y sus alteraciones en cáncer. *GAMO* 2008;7:80-92.
30. Cheung HH, Lee TL, Rennert OM, Chang WY. DNA methylation of cancer genome. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2009;87:335-350.
31. Franco R, Schoneveld O, Georgakilas AG, Panayiotidis MI. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Lett* 2008;266:6-11.
32. Choi SH, Worswick S, Byun HM, Shear T, Soussa JC, Wolff EM, et al. Changes in DNA methylation of tandem DNA repeats are different from interspersed repeats in cancer. *Int J Cancer* 2009;125:723-729.
33. Shen Y, Fouse SD, Fan G. Genome-wide DNA methylation profiling: the mDIP-chip technology. *Methods Mol Biol* 2009;568:203-216.
34. Tang R, Changchien CR, Wu MC, Fan CW, Liu KW, Chen JS, et al. Colorectal cancer without high microsatellite instability and chromosomal instability—an alternative genetic pathway to human colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2004;25:841-846.
35. Yang N, Coukos G, Zhang L. MicroRNA epigenetic alterations in human cancer: one step forward in diagnosis and treatment. *Int J Cancer* 2008;122:963-968.
36. Fire A, Xu S, Montgomery M, Kostas S, Driver S, Mello S. Potent and specific genetic interference by double-stranded in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391:806-811.
37. Dávalos V, Esteller M. MicroRNAs and cancer epigenetics: a macroevolution. *Curr Opin Oncol* 2009;22:35-45.
38. Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Med* 2009;60:167-179.
39. Yendamuri S, Calin GA. The role of microRNA in human leukemia: a review. *Leukemia* 2009;23:1257-1263.
40. Mullenders J, Bernards R. Loss-of-function genetic screens as a tool to improve the diagnosis and treatment of cancer. *Oncogene* 2009;28:4409-4420.
41. Varambally S, Cao Q, Mani RS, Shankar S, Wang X, Atteq B, et al. Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. *Science* 2008;322:1695-1699.
42. Hime GR, Somers WG. Micro-RNA mediated regulation of proliferation, self renewal and differentiation of mammalian stem cells. *Cell Adh Migr* 2009;3:425-432.
43. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:2999-3004.
44. Aqueilán RI, Calin GA, Croce CM. miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives. *Cell Death Differ* 2010;17:215-220.
45. Hermeking H. The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ* 2010;17:193-199.
46. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005;65:7065-7070.
47. Barbie D, Tamayo P, Boehm JS, Kim SY, Moody SE, Dunn IF, et al. Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1. *Nature* 2009;462:108-114.
48. Vander HMG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009;324:1029-1033.
49. Rathmell JC, Newgard CB. A glucose-to-gene-link. *Science* 2009;324:1021-1022.
50. Wollen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM, Bui TV, Cross JR, Thompson CB. ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science* 2009;324:1076-1080.
51. Rohren EM, Turkington TG, Coleman RE. Clinical applications of PET in oncology. *Radiology* 2004;231:305-332.
52. DeBerardinis RJ, Cheng T. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene* 2010;29:313-324.
53. DeBerardinis RJ. Is cancer a disease of abnormal cellular metabolism?: New angles on an old idea. *Genet Med* 2008;10:767-777.
54. Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris M, Rammanathan A, Gerzten RE, Wei Ru. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 2008;452:230-234.
55. Maximo V, Lima J, Soares P, Sobrinho-Simões M. Mitochondria and cancer. *Virchows Arch* 2009;454:481-495.
56. Gottlieb E, Tomlinson IP. Mitochondrial tumor suppressors: a genetic and biochemical update. *Nat Rev Cancer* 2005;5:857-866.
57. Diaz-Ruiz R, Uribe-Carvajal S, Devin A, Rigoulet M. Tumor cell energy metabolism and its common features with yeast metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2009;1796:252-265.
58. Spratlin JL, Serkova N, Eckhardt SG. Clinic applications of metabolomics in Oncology: a review. *Clin Cancer Res* 2009;15:431-440.
59. Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, Haromy A, Beaulieu C, Thompson R. A mitochondria-K+ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell* 2007;11:37-51.
60. Maenhaut C, Dumont JE, Roger P, van Staveren WC. Cancer stem cells: a reality, a myth, a fuzzy concept or a misnomer? An analysis. *Carcinogenesis* 2009;31:149-158.
61. Schatton T, Frank NY, Frank MH. Identification and targeting of cancer stem cells. *Biossays* 2009;31:1038-1049.
62. Frank NY, Schatton T, Frank MH. The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *J Clin Invest* 2010;120:41-50.
63. Rosen JM, Jordan CT. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science* 2009;324:1670-1673.
64. Yao Z, Mishra L. Cancer stem cells and hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol Ther* 2009;8:1691-1698.
65. Eng C, Leone G, Orloff MS, Ostrowski MC. Genomic alterations in tumor stroma. *Cancer Res* 2009;69:6759-6764.
66. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garianda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancers: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 2009; 30:1073-1081.
67. Stappenbeck TS, Miyoshi H. The role of stromal stem cells in tissue regeneration and wound repair. *Science* 2009;324:1666-1669.
68. Polyak K, Haviv I, Campbell IG. Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. *Trends Genet* 2009;25:30-38.
69. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 2009;9:239-252.
70. Hu M, Polyak K. Microenvironmental regulation of cancer development. *Curr Opin genet Dev* 2008;18:27-34.
71. Kitamura T, Kometani K, Hashida H, Matsunaga A, Mihoshi H, Hosogi H, et al. SMAD4-deficient intestinal tumors recruit CCR1+ myeloid that promote invasion. *Nature Genet* 2007;39:467-475.
72. Gocheva V, Wang HW, Gadea BB, Shree T, Hunter KE, Garfall AL, et al. IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes Dev* 2010;24:241-255.
73. Gunnarsson R, Isaksson A, Mansouri M, Goransson H, Jansson M, Cahill N, et al. Identification of native, immunogenic peptides from cyclin D1. *Leukemia* 2010;24:209-211.
74. Loose D, Van de Wiele C. The immune system and cancer. *Cancer Biother Radiopharm* 2009;24:369-376.
75. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirivosky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, et al. Type, density and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006;313:1960-1964.
76. Lee HE, Chae SW, Lee YL, Kim MA, Lee HS, Lee BL, Kim WH. Prognostic implications of type and density of tumour-infiltrating lymphocytes in gastric cancer. *BJC* 2008;99:1704-1711.
77. Bellati, Visconti V, Napoletano C, Antonilli M, Frati L, Panici PB, Nuti M. Immunology of gynecologic neoplasms: analysis of the prognostic significance of the immune status. *Curr Cancer Drug Targets* 2009;9:541-565.
78. Disis ML, Bernhard H, Jaffee EM. Use of tumour-responsive T cells as cancer treatment. *Lancet* 2009;373:673-683.
79. Jian B, Yang I, Parsa AT. Monitoring immune response after glioma vaccine immunotherapy. *Neurosurg Clin N Am* 2010;21:195-199.