

DOCUMENTOS

El cáncer en la era molecular: conceptos generales y aplicaciones clínicas

Drs. MANUEL ALVAREZ, HÉCTOR GALINDO, CLAUDIA SÁEZ, CONCEPCIÓN RISUEÑO

Oncología Médica, Laboratorio de Oncología Molecular y Celular, Departamento de Hematología-Oncología, Pontificia Universidad Católica de Chile

INTRODUCCIÓN

El cáncer representa actualmente uno de los mayores problemas de la salud pública mundial pues constituye, en conjunto con las enfermedades cardiovasculares y los traumas, la causa más frecuente de muerte en la población.¹ La mortalidad global por cáncer en las tres últimas décadas no ha sufrido variaciones considerables,² sin embargo, las proyecciones a futuro son preocupantes pues la Organización Mundial de la Salud predice un aumento global de la incidencia del cáncer de 10 a 20 millones por año y un incremento en la mortalidad de 6 a 10 millones para el año 2020. Esto ha llevado a algunas opiniones autorizadas a plantear un cambio en las estrategias actuales de la lucha contra el cáncer, sugiriendo una disminución del apoyo en la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas y dirigiéndolo especialmente hacia el diagnóstico temprano y la prevención.¹

Desde la década de los sesenta las estrategias terapéuticas que combinan la cirugía con quimioterapia y radioterapia han permitido excelentes resultados en un grupo pequeño de cánceres, consiguiendo más de un 60% de curación en tumores embrionarios, en varios tumores pediátricos y en ciertos tumores de adulto como linfomas y leucemias.³ También se han producido aumentos significativos en los porcentajes de curación, tiempo libre de enfermedad y mejoría en la calidad de vida en pacientes con otros tipos de cáncer como mama, ovario, cervicouterino, prostático, colorrectal y pulmonar.⁴ Sin embargo, estamos lejos de conseguir mejoras sustanciales del porcentaje de curación y sobrevida a largo plazo en las neo-

plasias de mayor prevalencia, especialmente cuando se encuentran en forma de metástasis avanzada. Esto indica que debemos modificar las actuales estrategias, mejorando no sólo los aspectos de prevención y diagnóstico precoz del cáncer, sino también avanzando continuamente en el entendimiento de la enfermedad a nivel celular y molecular, integrando constantemente estos conocimientos para conseguir una mayor eficiencia en el tratamiento de la enfermedad.⁵

¿Podemos llegar a curar definitivamente esta enfermedad?

El análisis de lo ocurrido en años recientes en la evolución del conocimiento médico, particularmente en el área del cáncer y de los procesos biológicos que lo causan, nos hace ser optimistas y responder afirmativamente.

El desarrollo del cáncer se produce por la acumulación de una serie de alteraciones genéticas. Durante los últimos años los grandes avances biotecnológicos y cibernéticos están permitiendo la búsqueda y caracterización funcional de muchos genes contenidos en nuestras células y están permitiendo entender los procesos moleculares básicos que producen la transformación de una célula normal en una tumoral. La iniciación y progresión de los tumores está regulada por complejas alteraciones a nivel de los genes; algunos, como los oncogenes, genes supresores de tumores y genes reguladores del ciclo celular ya están parcialmente definidos; otros, como los que participan en fenómenos como la muerte celular programada, inmor-

talización y diferenciación celular, han sido caracterizados más recientemente.^{6,7} Desde hace algunos años se está llevando a cabo uno de los proyectos más ambiciosos en el campo biomédico de la historia en el campo biomédico y que dentro de la próxima década caracterizará la información contenida en el código genético, desconocida en su mayor parte en estos momentos: el Proyecto del Genoma Humano. Este proyecto, en un esfuerzo coordinado y multicéntrico, está estableciendo primeramente mapas físicos de baja resolución que permiten la localización de los genes a nivel cromosómico,^{8,9} y posteriormente el conocimiento de su secuencia precisa de nucleótidos, lo que permitirá estudiar su funcionamiento y la interacción dinámica de sus productos, las proteínas.¹⁰ En la era post genoma será posible definir las lesiones moleculares en los genes contenidos en las células y conocer los procesos múltiples que conducen a la transformación progresiva de una célula normal en una tumoral, asociando un tipo de tumor específico con un perfil de expresión genética determinado. Estos conocimientos permitirán el diseño lógico de nuevas estrategias de prevención y el desarrollo de metodologías diagnósticas y terapéuticas altamente sofisticadas: los tratamientos serán individualizados según el perfil biológico molecular del tumor del paciente.¹¹

¿Cómo se ha podido avanzar en el entendimiento de la información contenida en una Célula?

Los genes que forman parte de nuestro genoma están formados por secuencias determinadas de nucleótidos y se encuentran al interior del núcleo de nuestras células en unidades discretas llamadas cromosomas. Podemos comparar los cromosomas con los libros de una biblioteca, los genes con las palabras en que están escritos y la secuencia de nucleótidos con las letras que forman estas palabras. La Citogenética es la ciencia que nos ha permitido catalogar estos libros (cromosomas), agrupándolos de acuerdo a su estructura mediante el análisis por microscopía convencional de las células vivas en división después de haberlas teñido. La observación de su número y aspecto ha sido esencial para identificar anomalías como pérdida de segmentos, translocaciones y amplificaciones, que son recurrentes en las enfermedades malignas y que han permitido la identificación de numerosos genes involucrados en distintas enfermedades. La técnica de Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH) mediante sondas de ADN marcadas con compuestos fluorescentes significó

un nuevo avance en el descubrimiento de translocaciones crípticas no detectadas por citogenética convencional, permitiendo en estudio en células fijadas y que no están en división.^{12,13} La detección de alteraciones cromosómicas desconocidas mediante la visualización colorimétrica (pintado cromosómico) diferencial de todos los cromosomas en forma simultánea con sondas específicas de ADN para cada uno de ellos, se ha logrado con una técnica nueva denominada Spectral Karyotyping (SKY). Otra técnica reciente de citogenética molecular es la Hibridación Genómica Comparativa (CGH), que permite un extenso análisis del genoma entero en un solo paso, permitiendo identificar regiones cromosómicas adquiridas o perdidas en el tumor mediante la marcación del ADN de células normales y cancerosas con compuestos fluorescentes distintos, que son posteriormente mezclados e hibridados con los cromosomas de células normales en metafase. La citogenética clásica y sus versiones más modernas, están permitiendo la detección de aberraciones cromosómicas complejas de una manera rápida y nos están permitiendo entender mejor las alteraciones múltiples que ocurren durante la progresión del proceso carcinogénico.

Actualmente es posible, entonces, identificar los cromosomas y posicionar en ellos un gran número de genes. Sin embargo, es necesario realizar la transición de un mapa citogenético a un mapa físico en el que se conozca la posición de cada uno de los genes y sus secuencias reguladoras (*linkage map*). Se considera que el genoma humano está formado por 30.000 a 100.000 genes (65.000 parece ser una estimación más adecuada), que contienen la información necesaria para el funcionamiento celular. El desarrollo de las técnicas de biología molecular nos está permitiendo conocer la secuencia nucleotídica de cada gen y detectar las alteraciones, así como conocer también cuál es su función y cuál es la relación entre su desregulación bioquímica o genética y el progreso de la enfermedad. Muchos de los eventos mutacionales que permiten explicar mejor el cáncer en términos moleculares han sido caracterizados e identificados mediante las técnicas moleculares de Southern blot y/o Northern blot, que permiten estudiar respectivamente secuencias específicas de ADN y ARN, mientras que el análisis de sus productos proteicos se realiza mediante técnicas de Western blot y caracterización funcional.

El proyecto del Genoma Humano permitirá muy pronto conocer la secuencia completa de nucleótidos de todos los cromosomas, tarea muy compleja y laboriosa si se considera que el genoma normal haploide consiste en aproximadamente 3

mil millones (3×10^9) de pares de bases de ADN, distribuido en 22 cromosomas autosómicos y 2 cromosomas sexuales.^{3,15} En la última década la mayoría de nuestra información acerca de la secuencia génica se ha hecho a partir de productos conocidos de genes, pero la mayoría de los genes serán sólo identificados mediante la secuenciación exhaustiva de ADN no seleccionado, con la perspectiva de determinar su función celular. Nuevas técnicas moleculares como la Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR) han simplificado este proceso permitiendo amplificar zonas específicas de ADN amplificado para su secuenciación directa, permitiendo la caracterización de regiones individuales del cromosoma. PCR ha revolucionado la forma de estudiar el cáncer porque permite el examen directo de los cambios genómicos que ocurren durante la iniciación, progresión y metástasis del tumor, incluso a partir de una sola célula tumoral. Las técnicas moleculares de secuenciación tradicional, que permiten leer el material nuclear caracterizado, están siendo complementadas con nuevas tecnologías que permiten automatizar y mejorar notoriamente la velocidad de los procesos mencionados, reduciendo significativamente el trabajo del análisis de información contenida en el DNA o, a nivel proteico.

La información de la secuencia del ADN obtenida por el proyecto del genoma humano nos permitirá decodificar los eventos celulares y descifrar los procesos involucrados en enfermedades como el cáncer.

Implicancias diagnósticas actuales y futuras

Tradicionalmente el diagnóstico del cáncer se ha basado en criterios morfológicos y fenotípicos, sin embargo, el análisis de los marcadores clonales del tumor pueden proveer al patólogo un diagnóstico específico y un medio de seguimiento de la progresión y remisión de la enfermedad. El diagnóstico oncológico ha evolucionado incorporando a los estudios inmunohistoquímicos la información aportada por la citogenética, la citometría de flujo y la biología molecular. La citogenética permite la detección de alteraciones cromosómicas que son específicas de determinados tipos de cáncer o que tienen valor pronóstico, y permiten, además, la detección de distintos clones tumorales por las alteraciones cromosomales presentes en ellos. La citometría de flujo permite un análisis rápido del patrón de expresión de diversas proteínas en las células cancerosas, permitiendo conocer con un gran nivel de especificidad y sensibilidad el estado de diferenciación y el tipo tumoral al que pertenece.

La técnica de biología molecular de PCR permite un nivel aún mayor de sensibilidad para detectar algunas alteraciones específicas a nivel del ADN de determinadas patologías tumorales y el seguimiento de los pacientes durante el tratamiento, incluso a partir de muestras muy pequeñas de tejido. Estas técnicas son complementarias pues analizan características distintas de las células tumorales y actualmente se están utilizando para la clasificación de algunos tipos de tumores como la recientemente presentada para el diagnóstico de los Linfomas no Hodgkin (REAL).

En el futuro, la caracterización de un creciente número de genes, que participan en los procesos celulares de carcinogénesis permitirá también la determinación de nuevos factores con posible rol predictivo independiente en un diverso número de neoplasias, complementando lo que hoy en día se utiliza a nivel morfológico como el grado nuclear, las características morfológicas celulares, el compromiso ganglionar, etcétera. En este grupo de genes se encuentran los oncogenes, los genes supresores de tumores y los genes de progresión tumoral e invasividad.

Los oncogenes son genes cuya expresión o estructura está alterada en una variedad de tumores y estos cambios se correlacionan con un mal pronóstico. La amplificación de oncogenes como N-Myc (*nuclear protein family*) en las etapas avanzadas del neuroblastoma y cáncer pulmonar, H - Ras (*membrane associated G proteins*) en tumores pancreáticos, HER2/Neu y BCL-2 en cáncer mamario, pulmonar, prostático y otros, son algunas de las alteraciones que ya se han correlacionado con peor pronóstico de sobrevida y agresividad tumoral.¹⁵ Paralelamente a esto, un creciente número de otros oncogenes está siendo caracterizado clínicamente para determinar implicancias pronósticas, independientemente de sus roles biológicos específicos en el proceso carcinogénico.

Los genes supresores de tumores son genes involucrados en el control del crecimiento celular promoviendo apoptosis (muerte celular programada) o diferenciación celular. La caracterización clínica de alguno de ellos como BRCA 1 (*Breast Cancer 1*) y BRCA2 (*Breast Cancer 2*) y su expresión anómala o mutada tendrían potencial importancia en la evaluación de poblaciones en riesgo de cáncer mamario y ovárico familiar, permitiendo en un futuro cercano la identificación de individuos de alto riesgo de padecer el cáncer, el diagnóstico precoz e intervenciones quirúrgicas profilácticas. La falta de funcionalidad del gen supresor de tumores p-53, conocido como Guardián del Genoma, identificaría los tumores potencialmente más agre-

sivos y podría explicar el fracaso terapéutico al no permitir gatillar procesos celulares de muerte celular programada con el empleo de terapias genotóxicas.¹⁶ El gen p-53 se ha encontrado mutado en más de un 50% de los tumores de mayor prevalencia, además, la mutación de este gen se ha correlacionado con síndromes como el de Li-Fraumeni, que se asocian a la expresión de sarcomas, cáncer de mama y tumores cerebrales.⁵ Otros genes supresores de tumores con importancia clínica serían RB1,¹⁷ asociado a retinoblastomas y osteosarcomas, APC y DCC en cáncer colónico, VHL y TSC2 en cáncer renal, por mencionar algunos de los más caracterizados.

En el proceso de progresión tumoral e invasividad participan una serie de genes cuya utilidad clínica y rol pronóstico están actualmente en evaluación. A este grupo pertenecen moléculas responsables de la adhesividad de las células a su entorno y a la membrana basal, tales como caderinas e integrinas; las colagenasas y metaloproteinasas (MMP), involucradas en el proceso de permeación de la membrana basal, y los genes reguladores de los procesos angiogénicos. En conjunto con estos genes hay otros cuya ausencia funcional representa un mayor riesgo de metástasis, como es el caso del gen nm-23. Todos ellos están siendo correlacionados con elementos clínicos convencionales, como el grado de infiltración de las estructuras linfáticas por inmunohistoquímica, y que se asocian a mal pronóstico e invasividad.

El uso de técnicas de gran potencia de amplificación de secuencias del ADN como PCR está permitiendo no sólo un diagnóstico rápido y específico, sino, además, una "etapificación molecular" significativamente más precisa que la obtenida con tecnología de imágenes convencional. Por su capacidad de detectar una célula cancerosa entre 10^5 a 10^7 células normales se está haciendo particularmente útil en el estudio de "enfermedad mínima residual", especialmente en neoplasias hematológicas, permitiendo evaluar acciones terapéuticas con intención curativa, siendo aún sus implicancias pronósticas teóricas motivo de discusión.

Finalmente, entre los avances más recientes que integran la tecnología de manipulación del ADN y la cibernética aplicada está el empleo de los "Gene Microarrays". Mediante la marcación con fluoróforos distintos del cADN del tumor y del cADN del tejido normal y su posterior hibridación conjunta con un *chip* que contiene miles de fragmentos cortos de diferentes cADNs, se puede evaluar la expresión e interacción conjunta de miles de genes de interés en cáncer, muchos de función todavía desconocida.⁵ Esta tecnología permitirá además

una caracterización molecular dinámica de las muestras de tejido de los pacientes, que facilitará una mejor aproximación diagnóstica, pronóstica y la toma de decisiones terapéuticas basadas en hallazgos moleculares evidentes, lo que supondrá una enorme ventaja sobre la aproximación clínica actual.

Aspectos terapéuticos en cáncer en la era molecular

La estrategia tradicional del cáncer se ha basado en la separación espacial del tumor del tejido normal mediante cirugía, complementada con tratamientos de radioterapia y quimioterapia no específicos ni selectivos, pero que han permitido un mejoramiento en la curación y sobrevida de los pacientes. Si el cáncer es diagnosticado antes de que la metástasis haya ocurrido es posible en muchos casos curarlo con tratamientos locales como la cirugía o la radioterapia, sin embargo, muchos tratamientos localizados fracasarán por el crecimiento de células metastásicas que estaban presentes, pero indetectadas al tiempo de tratamiento.

La radiación mata las células por daño masivo al ADN, pero no es específica para las células tumorales y por esa razón la investigación en el campo de la radioterapia se ha focalizado en la modificación del fraccionamiento de las dosis para reducir el daño a las células normales y en el uso de drogas radiosensibilizadoras para una suboblación específica de células tumorales. Los tratamientos sistémicos con drogas citotóxicas, por otra parte, son a menudo los únicos que pueden actuar en todos los sitios donde hay enfermedad metastásica, aunque una de las mayores limitaciones para el éxito del tratamiento con drogas es la presencia de células resistentes al tratamiento bien inicialmente o después de iniciado el tratamiento.

Hay un enorme interés en entender los mecanismos involucrados en la resistencia a drogas, lo que ha llevado a investigar el diseño de nuevas drogas o el uso de las actuales en combinaciones más efectivas. Por ello, a pesar de que menos de un 5% de los pacientes tratados ingresan a estudios clínicos, es posible presenciar un progresivo aumento en el número de estudios clínicos experimentales con mejor diseño metodológico científico y la incorporación de un mayor número de pacientes en estudios multicéntricos nacionales e internacionales. Esto ha permitido en años recientes importantes avances en definir grupos y sub grupos de pacientes con diferentes neoplasias que se beneficiarán con terapias genotóxicas, aplicándolas

tanto a nivel adjuvante (luego de la cirugía), o neo adjuvante, con intención curativa o bien paliativa. Los avances en las indicaciones y técnicas quirúrgicas, complementados con los nuevos conceptos de aplicación de radioterapia y quimioterapia, están permitiendo intervenciones menos mutilantes, preservando funcionalidad y estética y mejorando por ello la calidad de vida.

El desarrollo de nuevos antibióticos y de factores estimuladores de diferentes colonias celulares que potencian la recuperación de la médula ósea, han permitido incrementar las dosis de quimioterapia en el supuesto de que "más es mejor", hasta alcanzar la máxima dosis-toxicidad tolerable (MTD), necesitando los pacientes, en algunos casos, un trasplante de médula ósea (propia o donada por una persona sana compatible) debido a la toxicidad del tratamiento. Esto ha permitido la curación de un porcentaje de pacientes con neoplasias sensibles a terapias genotóxicas convencionales como leucemias, linfomas, tumores embrionarios y otros.

Por otra parte, nuevas combinaciones de drogas y radioterapia están permitiendo reducir las dosis útiles para minimizar los efectos laterales inmediatos y el riesgo de neoplasias secundarias al tratamiento. En este concepto se ha desarrollado la técnica de minitrasplante, que pretende reemplazar células tumorales hematológicas del paciente por células sanas de un donante compatible, sin necesidad de terapias mieloablativas genotóxicas como en el caso de quimioterapias muy intensivas.

La ausencia de diferencias específicas identificables entre las células tumorales y las normales ha sido una de las barreras que han limitado el desarrollo de la terapia anticáncer y casi todos los tratamientos causan un daño significativo al tejido normal. Las drogas que utilizamos actualmente tienen una efectividad limitada, la mayoría de los agentes son citotóxicos y actúan inhibiendo la síntesis de ADN o los mecanismos de replicación celular, son antiproliferativas en lugar de antineoplásicas, así que la selectividad bioquímica del tumor *versus* la célula normal es modesta, los efectos colaterales son frecuentes y la resistencia a las drogas se hace común. Debemos dirigir nuestras energías hacia el desarrollo de terapias realmente innovadoras que tengan un mayor impacto en la sobrevida y la calidad de vida y esto significa desarrollar tratamientos que sean mucho más selectivos en las células cancerosas y menos tóxicos para las células normales. Por ello es necesario focalizarnos en nuevos blancos que son responsables de la progresión tumoral: inestabilidad genómica, transducción de señales proliferativas, control del ciclo celular aberrante, sobrevivencia

desregulada, invasión, angiogénesis y metástasis. Atacando estos blancos tendremos buenas oportunidades de desarrollar drogas que sean realmente anticancerosas.

Quizá el mejor ejemplo de que la integración de los conceptos mencionados producirá importantes avances terapéuticos es lo ya conseguido por STI-571, (Gleevec®), uno de los éxitos en terapia oncológica más significativos en las últimas décadas. Este fármaco está molecularmente orientado a dañar selectivamente una vía de traducción de señales a nivel de células cancerosas que tienen la expresión de ciertas alteraciones nucleares específicas, como es la presencia del cromosoma Filadelfia y su proteína aberrante (p-210) en la Leucemia Mieloide Crónica, o la sobreexpresión del oncogen c-kit en Sarcomas Estromales. STI-571 permite efectuar lo que consideraríamos una terapia oncológica ideal: control de la enfermedad y eventualmente cura de algunos pacientes con esta patología, con una acción selectiva sobre la célula cancerosa y mínima repercusión en otras células normales y, por lo tanto, prácticamente carente de toxicidad general.

También se están abriendo nuevos campos de interés para el desarrollo farmacológico de drogas quimiopreventivas y facilitadoras de diferenciación celular, que evitarían el inicio del proceso carcinogénico y que también podrían revertirlo cuando ya se ha iniciado.¹⁸ Drogas como retinoides, salicilatos, tamoxifeno y derivados están siendo activamente evaluados en estudios clínicos para decidir su eventual empleo en clínica. En este sentido podemos citar estudios muy recientes con grandes series de pacientes con alto riesgo de desarrollar cáncer mamario por antecedentes familiares, reduciéndose éste significativamente al emplearse bloqueadores hormonales en forma profiláctica. Otras alternativas para el tratamiento del cáncer incluyen el uso de hormonas, en el caso de tumores sensibles a las hormonas como mama y próstata.

Otra área de desarrollo de terapias antitumorales es la inmunoterapia que utiliza anticuerpos monoclonales, vacunas y terapia génica.

La inmunoterapia desde sus comienzos, con el uso de interleukinas, interferon y otras drogas de costos elevados y alta toxicidad, ha evolucionado considerablemente creándose gran expectativa con terapias específicas recientemente aprobadas para uso clínico como son los anticuerpos monoclonales contra oncogenes como HER2/Neu en cáncer mamario y anti CD20 en neoplasias hematológicas, anti-Antígeno Carcinoembrionario en neoplasias colónicas, etcétera, existiendo múltiples

proyectos pre-clínicos que han considerado otros antígenos tumorales en diferentes fases de evaluación experimental.^{19,20} Simultáneamente en el campo de las vacunas se está avanzando en forma activa eligiéndose para ello diferentes antígenos con participación en procesos biológicos de diferenciación celular (como por ejemplo HER-2/neu, gangliosido, etcétera), antígenos embrionarios, antígenos mutacionales (eg, p53, ras, etcétera) y otros como antígenos virales en los cuales incluimos diferentes virus con participación en procesos oncológicos como los virus papova, herpes, hepatitis B, ebstein barr, etcétera.^{21,22}

Finalmente, la oncología ya entendida en su génesis como un daño a nivel molecular y celular, permite plantear la posibilidad de corrección de las alteraciones presentes en los genes mencionados y en los numerosos genes aún por descubrir mediante el desarrollo de un tipo de terapia muy promisoría conocida como terapia génica. Avances en el desarrollo de transportadores o "vectores" que llevan la información correcta, construida externamente, en forma eficiente hacia la célula blanco han evolucionado activamente y dado un nuevo impulso al desarrollo de este campo, particularmente con la incorporación del uso de virus.²²

Todas estas estrategias son complejas y de alto costo e incluyen cultivos de células cancerosas, manipulación y caracterización de la información genética contenida en ellas, perfil de respuesta biológica frente a múltiples fármacos en evaluación, estudios funcionales múltiples de viabilidad celular, inhibición de crecimiento, muerte celular, etcétera. Más recientemente se ha incorporado el apoyo dado por la introducción de técnicas de microarrays de ADN o de proteínas y microarrays de material obtenido de tejidos celulares patológicos, asociándose esto a la utilización de complejos programas computacionales y técnicas cibernéticas.^{24,25}

Hemos intentado resumir diferentes aspectos del rápido avance del conocimiento relacionado a cáncer analizando sólo alguno de los conceptos, a nuestro juicio más importantes que la integración de la investigación biomolecular y la clínica han permitido. Aunque las áreas y problemas biológicos aún pendientes son muy complejos y numerosos, los fundamentos básicos ya parcialmente entendidos, en conjunto con los conocimientos y tecnologías desarrolladas por numerosas disciplinas relacionadas a la oncología, nos permiten enfrentar este nuevo milenio con gran optimismo en cuanto a los avances que se podrán lograr, tanto a nivel terapéutico, preventivo, como de diagnóstico temprano.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bailar JC III, Smith EM: Progress Against Cancer? *N Engl J Med* 1986; 314: 1226-32.
2. Bailar JC III, Gornik M: Cancer undefeated. *N Engl J Med* 1997; 336: 1569-74.
3. Alvarez M, Besa P: Molecular Basis of Cancer and Clinical Applications. *Surg Clin North Am* 2000; 80: 443-57.
4. Doll R, Peto R: The causes of cancer: Quantitative estimates of avoidable risk of cancer in the United States today. *Natl Cancer Inst* 1981; 66: 1191-1308.
5. Vogelstein B, Kinzler K: The genetic basis of human cancer. Baltimore: McGraw-Hill 1998; 161-72.
6. Alberts B, Bray D, Johnson A *et al*: An Introduction to the Molecular Biology of the Cell. New York: Garland Publishing 1997; 313-46, 547-69, 571-91.
7. Bishop JM, Weinberg RA: Introduction. In: Bishop JM, Weinberg RA (eds). *Molecular Oncology*. New York: Scientific Am, Inc 1996; 1.
8. Collins FS: Positional cloning: Let's not call it reverse anymore. *Nat Genet* 1992; 1: 3.
9. Collins FS: Positional cloning moves from perditoinal to tradicional. *Nat Genet* 1995; 9: 347.
10. Lowy DR: The causes of cancer. In Bishop JM, Weinberger RA (eds): *Molecylular Oncology*. New York: Scientific Am, Inc 1996; 41.
11. Weinberg RA, Hanahan D: The molecular pathogenesis of cancer. In: Bishop JM, Weinberg RA (eds). *Molecular Oncology*. New York: Scientific Am, Inc 1996; 179.
12. Horvitz HR: Genetic control of prograded cell death in the nematode: *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res* 1999; 59: 7.
13. Liyamage M, Coleman A, Du Manoir S *et al*: Multicolor spectral karyotyping of mouse chromosomes. *Nat Genet* 1997; 14: 312-5.
14. Varmus H, Weinberger RA: The genetic elements governing cancer: Proto-oncogenes. In: *Scientific American Library*. New York: Genes Biol Cancer 1993; 67.
15. Blagosklonny MV, Alvarez M, Fojo A *et al*: Bcl-2 protein downregulation is not required for differentiation of multidrug HL60 leukemia cells. *Leuk Res* 1996; 20: 101-7.
16. El-Deiry WS: P53 and drug sensitivity. In: *Proceedings of the American Association of Cancer Research 90th Annual Meeting*. Philadelphia, 1999; 40: 771
17. Bertino JR, Li WW, Fon J *et al*: pRb / E2F and drug resistance. In: *Proceedings of the American Association of Cancer Research 90th Annual Meeting*, Philadelphia, 1999; 40: 771.
18. Sáez CG, Eugenin E, Alvarez MG: Gap junctional intercellular communication is increased by retinoic acid in oral epidermoid and colon cancer cell lines (abstract 3054). In: *Proceedings of the American Association for Cancer Research 90th Annual Meeting*. Philadelphia, 1999; 40: 4662.

19. Rosenberg SA: The immunotherapy and gene therapy of cancer. *J Clin Oncol* 1992; 10: 180-99.
20. Rosenberg SA, Yannelli JR, Yang JC *et al*: Treatment of patients with metastatic melanoma using autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2. *J Natl Cancdr Inst.* 1994, 86:1159-1166.
21. Ludwig OL: Cancer immunology and the development of cancer vaccines. In *Proceedings of the American Association of Cancer Research 90th Annual Meeting*, Philadelphia, 1999; 40: 746.
22. Rosenberg SA: Cancer vaccines based on the identification of genes encoding cancer regression antigens. In: *Proceedings of the American Association of Cancer Research 90th Annual Meeting*, Philadelphia, 1999; 40:755.
23. Scribner CL, Aebersold P: Gene therapy. In: Leder P, Claton DA, Rubenstein E (eds). *Introduction to Molecular Medicine*. New York: Scient Am, Inc 1994; 305.
24. Alvarez M, Robey R, Sandor V *et al*: Using The NCI Anticancer Drug Screen to assess the effect of MRP expression on drug sensitivity profiles. *Mol Pharmacol* 1998; 54: 802-14.
25. Alvarez M, Paul K, Monks A *et al*: Generation of a drug resistance profile by quantitation of mdr-1 / P-glycoprotein in the cell lines of the National Cancer Institute Anticancer Drug Screen. *J Clin Invest* 1995, 95: 2205-14.