## UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS Y DE LA SALUD



**Tesis Doctoral** 

Apoptosis, Proliferación y su regulación (P53, Bax, Bcl-2, IGF-1R, Ciclina D1) en Cáncer de Cérvix uterino. Predicción de la toxicidad radioinducida del tejido sano.

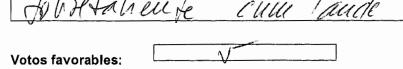
Dª Elisa Bordón Rodríguez

Las Palmas de Gran Canaria

2006

# UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA SUBDIRECCIÓN DE TERCER CICLO Y POSTGRADO

Reunido el día de la fecha, el Tribunal nombrado por el Excmo. Sr. Magfco. de esta Universidad, y finalizada la defensa y discusión de esta tesis doctoral, los señores miembros del Tribunal, emiten la siguiente calificación global:



Las Palmas de Gran Canaria, a 15 de diciembre de 2006

larara

El Presidente: Dr. D. Vicente Pedraza Muriel

La Secretaria: Dra. Da. Rosa María Apolinario Hidalgo

El Vocal: Dr. D. Claudio Otón Sánchez

El Vocal: Dr. D. Bonifacio Nicolas Diaz Chico

La Vocal: Dra. Da María Isabel Núñez Torres

La Doctoranda: Da. Elisa de los Reyes Bordón Rodríguez

uiu 192

D/Dª ISABEL MARRERO ARENCIBIA SECRETARIO/A DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUIÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR, FISIOLOGÍA, GENÉTICA E INMUNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA,

## CERTIFICA,

Que el Consejo de Doctores del Departamento en su sesión de fecha 20 de octubre de 2006, tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada "APOPTOSIS, PROLIFERACIÓN Y SU REGULACIÓN(P53,BAX, BCL-2, IGF-1R, Ciclina D1) EN CÁNCER DE CÉRVIX UTERINO. PREDICCIÓN DE LA TOXICIDAD RADIOINDUCIDA DEL TEJIDO SANO" presentada por el/la doctorando/a D/Dª Elisa Bordón Rodríguez y dirigida por el/la Doctor/a Pedro Carlos Lara Jiménez.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Art. 73.2 del Reglamento de Estudios de Doctorado de esta Universidad, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a veinte de octubre de dos mil seis.







# UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS Y DE LA SALUD

Apoptosis, Proliferación y su regulación (P53, Bax, Bcl-2, IGF-1R, Ciclina D1) en Cáncer de Cérvix uterino. Predicción de la toxicidad radioinducida del tejido sano.

**Tesis** 

Que, para optar al Grado de Doctor, presenta la Licenciada en Biología **D**<sup>a</sup> Elisa Bordón Rodríguez

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2007

D. Pedro Carlos Lara Jiménez, Profesor Titular de Radiología y Medicina Física de la Facultad de Ciencias Médicas y de la Salud de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

## **CERTIFICA:**

Que Da Elisa Bordón Rodríguez, Licenciada en Ciencias Biológicas, ha realizado el trabajo de investigación correspondiente a la Tesis Doctoral Apoptosis, Proliferación y su regulación (P53, Bax, BCI-2, IGF-1R, Ciclina D1) en Cáncer de Cérvix uterino. Predicción de la toxicidad radioinducida en el tejido sano, que ha finalizado con el mayor aprovechamiento.

Revisado el presente trabajo, estima que corresponde fielmente a los resultados obtenidos y queda conforme con su presentación, para ser juzgado por la Comisión que sea designada para su lectura.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extiende y firma el presente Certificado en Las Palmas de Gran Canaria, a 15 de Octubre de 2006.

Fdo: Prof. D. Pedro C Lara Jiménez

Director de la tesis

## Agradecimientos:

Al Profesor Dr. Pedro C Lara Jiménez, por su dedicación en el desarrollo de esta tesis sin la cual no podría haberse llevado a cabo. Por una dirección exhaustiva, tanto de los contenidos como en el análisis de los datos. Por su paciencia y ánimo en todo momento y por la pasión a su trabajo que consigue transmitir a todos los que les rodea.

A la Dra. Marta Lloret, con quien con su ayuda y conocimientos en cáncer de cérvix ha sido posible el seguimiento de las pacientes incluidas en este estudio y a la Dra. Beatriz Pinar por su ayuda y colaboración en la medida de la toxicidad clínica de las pacientes.

Al Dr. Agustín Rey del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Dr. Negrín por su colaboración en los procedimientos histológicos utilizados, así como a Estibaliz Valdés por su colaboración en las técnicas de inmunohistoquímica.

A Ana Manzanedo y Mª Teresa Martínez por sus esfuerzos iniciales en la puesta a punto de la técnica de apoptosis en linfocitos y a Carlos Rodríguez Gallego, de la Unidad de Inmunología del Hospital de Gran Canaria Dr. Negrín, por la transmisión de sus conocimientos en las técnicas de citometría de flujo.

A Araceli, de la Unidad de Investigación del Hospital de Gran Canaria Dr. Negrín por su participación y consejos en el tratamiento de los análisis estadísticos.

A todos mis compañeros del Servicio de inmunología: a Maika Alvarez-Santana y Esther santiago, de la sección de Biología celular, por toda la ayuda recibida en mis inicios facilitando la realización de este proyecto. Al Doctor Florentino Sánchez Jefe del Servicio de inmunología, por su simpatía y cariño facilitando las tareas realizadas en su Servicio.

Al personal del Servicio de Oncología Radioterápica del Hospital de Gran Canaria Dr. Negrín por su amabilidad y colaboración desinteresada en todo momento.

A todas las pacientes incluidas en este estudio por su apoyo a la investigación y solidaridad participando en un proyecto de mejora en el tratamiento de otros posibles pacientes.

Finalmente, a mis amigas quien siempre me han animado a seguir adelante, a mi familia y sobre todo a mi madre sin cuyo sacrificio y apoyo no hubiera sido posible la evolución en mi carrera profesional.

INDICE	Páginas
CAPITULO I	
Introducción	1-76
CAPITULO II	
Objetivos Generales	77
CAPITULO III	
Papel de la apoptosis y sus genes reguladores P53, Bax y	
BCI-2 en cáncer de Cérvix localizado con largo seguimiento.	78-99
CAPITULO IV	
IGF-1R y Ciclina D1 en el estudio de la proliferación en el	
carcinoma de cérvix. Relación con la apoptosis y papel	400 440
predictivo en pacientes con largo seguimiento.	100-119
CAPITULO V	
Predicción de la toxicidad clínica radioinducida en pacientes	
con cáncer de cérvix localizado mediante el estudio de	
apoptosis radioinducida en linfocitos de sangre periférica	120-140
(PBIs).	
CAPITULO VI	
Predicción de la toxicidad clínica radioinducida en pacientes	
con cáncer de cérvix localizado mediante el estudio de	
apoptosis radioinducida en subpoblaciones de linfocitos de	141-167
sangre periférica (PBIs).	
CAPITULO VII	168
Conclusiones	
BIBLIOGRAFÍA	169-179

# **CAPITULO I**



## 1. EPIDEMIOLOGIA

El cáncer de cérvix uterino es la sexta neoplasia más frecuente en la mujer, después del cáncer de mama, pulmón, colorecto, endometrio, y ovario. Los datos a nivel mundial indican que todos los años se producen unos 466.000 nuevos casos de cáncer de cérvix en mujeres de todo el mundo donde casi el 80% de ellos se produce en países subdesarrollados debido a que los programas de diagnóstico precoz de la enfermedad están poco extendidos en esos países. La incidencia de cáncer de cérvix ocupa el segundo lugar, detrás del cáncer de mama, produciendo la muerte de 231.000 mujeres/año (Parking et al 2001).

Las tasas de incidencia normalizadas por edad más elevadas se han registrado en Melanesia, África meridional, Centroamérica, África Oriental y América del Sur.

En la Provincia de Las Palmas la incidencia de este tumor está por encima de la media nacional. Así en el año 2003, la incidencia del cáncer de cérvix fue similar a la del cáncer de endometrio, con una prevalencia de 10/100.000 mujeres/año (National Cancer institute 2003)

El carcinoma de cérvix uterino es el más frecuente en mujeres que iniciaron relaciones sexuales a edad temprana, aquellas con historia de promiscuidad, o las que tuvieron un número elevado de gestaciones y en aquellas que han padecido otras enfermedades de transmisión sexual (Cannistra et al 1996). En un estudio realizado en la india (Agarwal et al, 1992), se analizaba la influencia del factor masculino, observándose que el riesgo de presentar carcinoma cervical era mayor cuando el marido había mantenido relaciones previas al matrimonio o extramaritales con 3 o más mujeres, y cuando tenía historia de enfermedades de transmisión sexual. Por otro lado, la circuncisión del varón está asociada con un bajo riesgo de que la pareja padezca cáncer cervical (Castellsague et al 2002). El cáncer de cérvix es relativamente frecuente en mujeres jóvenes, siendo la edad de mayor incidencia del tumor invasivo entre los 45 y 60 años. La edad media en 436 casos registrados entre 1994 a 2003

en la Provincia de las Palmas fue de 54.7 años (National Cancer institute 2003).

Otros factores asociados con el cáncer cervical incluyen el tabaco, las inmunodeficiencias, las deficiencias en vitaminas A y C y los anticonceptivos orales (Castellsague et al 2002).

## 2. ETIOLOGIA

2.1 Virus. La prevalencia de la infección por el virus del papiloma humano en el cáncer cervical es de un 95% y su contribución al riesgo de desarrollar la enfermedad es mucho mayor que la de otros factores determinantes (Walboomers et al 1999).

Se han identificado más de 100 genotipos de HPV, más de 35 tipos se relacionan con infecciones del tracto anogenital, y al menos 15 de los cuales son oncogénicos (Schiffman et al 2003, Muñoz et al 2003). Basado en su asociación con el cáncer cervical, se dividen en HPV de bajo riesgo, de alto riesgo probable y grupos de alto riesgo. En total 15 HPV están clasificados como de alto riesgo (16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,68,73 y 82);tres se clasifican como probables de alto riesgo (26,53,66) y 12 tipos se clasifican como de bajo riesgo (6,11,40,42,43,44,54,61,70,72,81 y Cp6108). El miembro más frecuente del grupo de alto riesgo es el HPV16, el cual se encuentra en más del 60% de los cánceres cervicales. Los tipos de alto riesgo se encuentran en más del 95% de todos los casos de cáncer cervical. Una de las principales diferencias entre los distintos tipos es la posibilidad de integración en el genoma. El HPV 16 se integra en el 72% de todos los cánceres cervicales invasivos (Ferenczy et al 2002) y el HPV 18 muestra un 100% de integración. La carcinogenesis cervical ocurre cuando el genoma viral circular se integra dentro del genoma de la célula huésped (Goodman et al 2003). Cuando la integración se produce en la región E2 del gen se produce la pérdida del control transcripcional de E6 y E7 (Tjalma et al 2004) las cuales tienen capacidad para interaccionar con dos genes supresores tumorales, p53 y Rb. En el 50% de los tumores sólidos se encuentra una p53 anómala, debido fundamentalmente a mutaciones en el gen. Sin embargo, sólo el 7% de los carcinomas de cérvix presentan mutaciones del gen (Lazo, 1999). La alteración

de la función supresora de p53 se deberá, fundamentalmente, a alteraciones en la funcionalidad de su producto proteico. Así, la proteína viral E6 se uniría a la proteína p53 iniciando su rápida degradación e impidiendo su normal funcionamiento (Bonn y Bradbury, 1998). La alteración de p53 conduce a una disrregulación del balance tisular entre proliferación y apoptosis, predominando la primera, permitiendo la promoción y progresión tumoral. El retinoblastoma gen (Rb) codifica una proteína (pRb) que suprime la proliferación celular, mediante la inactivación de la proteína E2F. La proteína viral E7 inhibe a la pRb, con lo que E2F queda libre para mantener la proliferación, incluso en células con alteraciones en su genoma y que no han entrado en apoptosis por alteración de p53 (Cuadro 1).

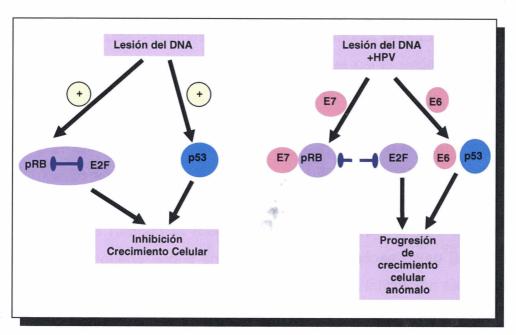


Figura 1: Alteración en el funcionamiento de p53 y pRb mediado por las proteínas E6 y E7 del HPV (Lloret M,2000).

Si bien el mecanismo por el cual HPV puede inducir cáncer de cérvix parece bien estudiado, existe una gran variabilidad en la posibilidad de padecer este tumor entre mujeres infectadas por HPV. Esta variación puede ser debida, a la presencia de arginina o prolina en la posición 72 de p53, observándose en estudios in vitro, que E6 degrada ambas formas de p53, aunque p53-prolina (p53-Pro) es mucho más resistente a la degradación por E6 que p53-arginina (p53-Arg). En un estudio con 30 tumores de cérvix y 42 controles, se observó

una diferencia significativa en la presencia de p53-Arg entre tejidos tumorales y controles (76.7% vs 36.5%), concluyendo los autores que la forma homocigótica de p53-Arg tiene 7 veces más capacidad de desarrollar carcinoma de cérvix que la forma heterocigótica Pro/Arg (Storey et al, 1998). Este hecho podría explicar porqué no todas las mujeres con infección por HPV desarrollan carcinoma de cérvix sin embargo, todavía estos datos no son concluyentes. En el estudio de Bhattacharya en 55 mujeres indias con carcinoma de células escamosas la forma homocigótica Pro/Pro y no Arg/Arg podía ser un factor de riesgo para desarrollar carcinoma de cérvix (Bhattacharya et al 2002)

## 3. HISTORIA NATURAL Y VIAS DE DISEMINACION

El carcinoma de células escamosas de cérvix se origina generalmente en la unión escamocolumnar (zona de transformación) del canal endocervical y la portio, zona de continuos cambios metaplásicos sobre todo durante la pubertad y primer embarazo que decae tras la menopausia. La lesión está asociada frecuentemente con displasia cervical severa, y carcinoma in situ que progresa entre los 10 a 20 años. Se ha aceptado que el carcinoma in situ precede al carcinoma invasivo durante varios años en la mayoría de los casos. Cuando las células neoplásicas rompen la membrana basal se produce la invasión del estroma. La lesión puede seguir creciendo, manifestándose como una úlcera superficial, un tumor exofítico del exocérvix o como una infiltración extensa del endocérvix. En su progresión puede alcanzar los fornix vaginales o los tejidos parametriales y paracervicales, con invasión directa a vejiga, recto o ambos. La relación entre el crecimiento local y la extensión paracervical fue evaluada por Landoni et al (1995) en 230 piezas de histerectomía radical con linfadenectomía pélvica realizada en pacientes con estadío IB y IIA. El tumor se extiende desde el endocérvix en todas direcciones de la misma manera. La extensión hacia los ligamentos vesicocervicales (parametrio anterior) se observó en el 23%, hacia los ligamentos uterosacros (parametrio posterior) y el septo rectovaginal en el 15%, y hacia los parametrios laterales izquierdo y derecho en el 34% y en el 28% de los casos respectivamente. La extensión

paracervical se relacionó con la profundidad de la invasión estromal, el tamaño tumoral, la invasión linfática y la presencia de ganglios metastásicos. Estos parámetros son importantes en la determinación de la mejor técnica de cirugía o radioterapia y en la evaluación de la eficacia de estos tratamientos.

La diseminación linfática y hematógena se produce dependiendo del estadío tumoral, pero no siempre sigue una secuencia ordenada, y ocasionalmente puede verse, un carcinoma invasor pequeño que infiltra ganglios, invade vejiga o recto, o da metástasis a distancia.

El cérvix tiene una red linfática muy extensa, sobre todo en las capas musculares, y una vez que se ha producido la invasión de estas estructuras, existe una alta probabilidad de diseminación ganglionar. El carcinoma de cérvix puede metastatizar a los ganglios paracervicales y parametriales, a los ganglios obturadores, de la iliaca externa, y a los ganglios hipogástricos; desde ahí hacia ganglios de la iliaca común y paraaórticos.

La afectación ganglionar varía según los estadíos y su porcentaje está en función del método con que se estudie (linfografía, cirugía, TAC).

## 4. ESTADIAJE

Se sigue la clasificación de la Federación Internacional Ginecológica y Obstetricia (FIGO) (1996) y/o clasificación TNM del comité Estadounidense Conjunto Sobre el cáncer (AJCC) (2002). Las categorías T se corresponden con los estadíos de la FIGO.

El sistema de estadiaje de la FIGO se basa en la evaluación clínica (inspección, palpación, colposcopia), legrado endocervical y biopsia y estudios radiológicos (Rx de tórax, TAC abdominopélvico). La sospecha de invasión de recto y/o vejiga se confirma por biopsia, descartando el edema bulloso de la vejiga y la inflamación de la mucosa rectal como criterios de afectación. El American Joint Committee on Cancer (AJCC) ha propuesto un sistema paralelo según TNM (tabla 3) donde las categorías T se corresponden con los estadíos de la FIGO. La afectación ganglionar se incluye como estadío IIIB de la FIGO. En ambos sistemas se incluyen todos los tipos histológicos.

TABLA 1: Estadiaje del carcinoma de cérvix

^	/JC	FIGO					
	TUMOR PRIMARIO (T)						
Tx			No se puede evaluarar tumor 1º				
TO			No evidencia del tumor 1º				
Tis			Carcinoma in situ				
T1		l	Carcinoma cervical limitado al útero (la extensión al cuerpo no se tiene en cuenta)				
	T1a	IA	Carcinoma invasivo preclínico, sólo diagnosticado por microscopio				
	T1a1	IA1	Invasión estromal ≤3mm en profundidad y ≤7mm en extensión horizontal				
	T1a2	IA2	Tumor con invasión ≤ 5mm en profundidad y ≤7mm en extensión horizontal				
	T1b	IB	Lesión mayor que en lA o tumor macroscópico limitado al cérvix				
		IB1	Tumor ≤ 4cm				
		IB2	Tumor > 4cm				
T2		II	Tumor cervical que se extiende fuera del útero sin llegar a la pared pélvica ni al tercio inferior de la vagina				
	T2a	IIA	Tumor sin invasión parametrial				
	T2b	IIB	Tumor con invasión parametrial				
Т3		111	Tumor cervical que se extiende hasta la pared pélvica y/o al tercio inferior de la vagina y/o causa hidronefrosis o riñón no funcionante				
	Т3а	IIIA	Tumor que se extiende a tercio inferior de vagina				
	T3b	IIIB	Tumor que se extiende hasta la pared pélvica y/o causa hidronefrosis o riñón no funcionante				
T4*		IVA	Tumor que invade la mucosa de la vejiga o del recto y/o se extiende fuera de la pelvis				
M1		IVB	Metástasis a distancia				
			GANGLIOS REGIONALES (N)				
			nales incluyen paracervicales, parametriales, hipogástricos (obturador), ternos y externos, presacros y sacros				
Nx			No se puede documentar afectación ganglionar				
N0			No existe afectación ganglionar				
N1			Existen ganglios linfáticos metastásicos				
			METASTASIS A DISTANCIA (M)				
Mx			No se puede documentar metástasis a distancia				
MO			No existen metástasis a distancia				
M1		IVB	Metástasis a distancia				

AJCC: American Joint Committe on Cancer; FIGO: International Federation of Gynecologists and Oncologists. \*La presencia de edema bulloso de vejiga no es suficiente para ser T4. (Modificado de Atlas TNM, Cuarta edición, 1997, pp 230-236. Springer.Verlag Ibérica, SA.1998).

## 5. CLASIFICACION PATOLOGICA

Se reconocen tres categorías generales: carcinoma epidermoide, adenocarcinoma, y un amplio grupo de tumores que engloba distintos tipos de carcinomas.

Los carcinomas epidermoides son tumores que crecen normalmente de la mucosa escamosa metaplásica en la región de la zona de transformación. Está compuesto núcleos y nidos de células epiteliales aleatoriamente; las células muestran una queratinización central con perlas cornificadas У algunas necrosis. Pueden observarse tumores queratinizados. Son neoplasias infiltrantes compuestas exclusiva o casi exclusivamente por células escamosas malignas. Corresponden al 60-80% de todos los carcinomas de cérvix.

Macroscópicamente, las lesiones precoces se localizan en el 98% de los casos en la zona de transición endo-ectocervical. Los tumores más avanzados suelen extenderse tanto a nivel endocervical como exocervical, y el crecimiento puede ser de dos tipos, exofítico (masa polipoide o papilar) y endofítico (lesión ulcerada o nodular que produce rigidez y engrosamiento parietal o bien cérvix macroscópicamente normal).

Los adenocarcinomas son tumores que crecen a partir de la mucosa cilíndrica del endocervix o de glándulas endocervicales que segregan mucus. En las dos últimas décadas se ha detectado un aumento de su incidencia, representando en la actualidad entre el 5-15% de todos los carcinomas de cérvix uterino. Son tumores exofíticos (papilares o polipoides), infiltrativos (nodulares, difusos o ulcerados), o tumores microscópicamente indetectables. Comprenden un grupo heterogéneo de tumores con gran variedad de patrones histológicos, que con frecuencia están mezclados, y se clasifican en función del tipo histológico predominante.

El adenocarcinoma mucinoso es el tipo más frecuente de adenocarcinoma infiltrante. Existen tres variantes morfológicas: el tipo endocervical (similar al epitelio endocervical normal), el tipo intestinal (similar al adenocarcinoma colorectal), y el tipo de células en anillo de sello, que con frecuencia se asocia

a los otros dos tipos morfológicos. El adenocarcinoma endometrioide representa el 30% de los adenocarcinomas cervicales. Histológicamente son similares al adenocarcinoma endometrial típico, por lo que se deberá hacer el diagnóstico diferencial con la invasión endocervical de este tumor.

Otros tumores epiteliales son el adenoescamoso, el de células esmeriladas, mucoepidermoide, linfoepitelioma-like y neuroendocrino.

## 6. FACTORES PRONOSTICOS CLASICOS

## 6.1 Edad

No se ha llegado a un acuerdo sobre el valor pronóstico de la edad en el carcinoma de cérvix. En un estudio realizado en 1300 pacientes con carcinoma de cérvix el pronóstico era el mismo en mujeres menores que en pacientes mayores de 40 años (Berkowitz et al 1979, Kyriakos et al1971). Otros autores han observado un descenso en la supervivencia en mujeres menores de 35 (Prempree et al 1983) o 40 años (Dattoli et al 1989) que tenían una mayor frecuencia de tumores pocos diferenciados. Esta contradicción puede explicarse por el análisis de Rutledge et al que demostró una interacción entre la edad y el estadío en 250 pacientes menores de 35 años elegidos al azar e individuos controles (Rutledge et al 1992). Mitchell et al 1998 evaluó 398 pacientes en estadío I y III de carcinoma cervical tratados con radioterapia. Los pacientes se dividían en dos grupos, uno con pacientes de 35 a 69 años y otro mayor de 70 años. Aunque la supervivencia libre de enfermedad a los 5 años y la supervivencia causa específica eran comparables en los dos grupos, la recidiva tumoral y muerte por cáncer era más frecuente en el segundo grupo de pacientes (Mitchell et al 1998)

## 6.2 Anemia.

Diversos estudios han corroborado el impacto pronóstico de la anemia en cáncer cervical sin embargo, los mecanismos patofisiológicos son controvertidos. Algunas investigaciones han encontrado que la anemia tiene un impacto independiente en el pronóstico en el análisis multivariante (Petersen et

al 1995, Grogan et al 1999, Caro et al 2001). Otros investigadores encuentran que la significancia pronóstica de la anemia resulta de una asociación entre la anemia y el volumen tumoral y que la anemia no ejerce un impacto independiente (Fyles et al 2000). En un estudio retrospectivo realizado en 7 centros de Canadá se observó que la anemia durante la radioterapia era más importante que los niveles de Hb pretratamiento y que no hay diferencias entre los niveles de Hb que aumentan espontáneamente y los niveles de Hb después de las transfusiones (Grogan et al 1999). En el estudio de Dunst et al 2003 en 87 pacientes con cáncer de cérvix, el nivel de hemoglobina durante la radioterapia fue el factor pronóstico más importante para la supervivencia y control local de la enfermedad (Grogan et al 1999). De todas formas, todavía no sabemos con exactitud como la anemia puede impactar en el pronóstico de la enfermedad.

### 6.3. Volumen tumoral.

En general, el estadío clínico sigue siendo el factor pronóstico independiente más relevante en la mayoría de estudios realizados. Sin embargo, existen otros factores dependientes de las características del tumor, que están adquiriendo importancia en los últimos años y que están siendo objeto de estudio. Los más importantes son el volumen tumoral, grado histológico, la invasión estromal y la presencia o ausencia de ganglios afectos.

El diámetro clínico del tumor está fuertemente correlacionado con el pronóstico en pacientes tratadas con radiación o cirugía. Son numerosos los estudios publicados que tratan de relacionar el tamaño y el volumen tumoral, con el pronóstico de la paciente (Dubben et al, 1998), mostrándose como factor independiente de supervivencia en el análisis multivariante en algunos de ellos (Landoni et al, 1995, Ogino et al, 1997).

La importancia del tamaño tumoral motivó, que en la revisión de la clasificación de la FIGO de 1995, se subdividiera el estadío IB en función del tamaño del tumor debido a las implicaciones pronósticas, tanto por la mayor incidencia de metástasis ganglionares y extrapélvicas como por la menor supervivencia (Rotman et al, 1981; Álvarez et al, 1989).

En un estudio reciente se analizaron 179 pacientes con carcinoma cervical avanzado tratados con radioterapia observándose que el volumen tumoral se asociaba de forma significativa con la supervivencia global en el análisis multivariante (P=0.004)( Narayan et al 2006)

### 6.4 Grado de Diferenciación.

La relación entre la supervivencia y el grado de diferenciación en el carcinoma escamoso y el adenocarcinoma es controvertida.

Aunque Swan y Roddick (1973), Reagan y Fu (1979) demostraron el valor pronóstico del grado histológico en pacientes tratados con irradiación, otros como Goelner et al (1976), y Crissman et al (1987) no observaron ninguna relación con la supervivencia.

Alfsen et al analizaron 417 pacientes con adenocarcinomas y 88 con carcinoma de células no escamosas de cérvix observando que el carcinoma de células pequeñas era el único subgrupo con importancia pronóstica independiente en pacientes con adenocarcinomas de cérvix uterino (P<0.001) (Alfsen et al 2001)

## 6.5. Histología.

Con la excepción de algún tipo morfológico específico los resultados sobre el tipo histológico como factor pronóstico continúan siendo controvertidos. Normalmente se considera que los adenocarcinomas tienen un peor pronóstico que los carcinomas escamosos (Davy et al 2003). De igual forma, el carácter desfavorable adscrito a los tumores de tipo adenocarcinoma no ha podido ser unifomemente demostrado (Hopkins et al, 1991; Shingleton et al, 1995) sin embargo, en estadíos precoces I-IIA parece existir unanimidad en cuanto a su valor pronóstico.

## 6.6. Afectación ganglionar.

El estado de los ganglios linfáticos, tiene una importancia significativa en la progresión de la enfermedad y en la supervivencia (Stehman et al 1991).

- Ganglios parametriales: la enfermedad parametrial con ausencia de ganglios pélvicos positivos tiene escasa repercusión en la supervivencia (72% a los 5

años) pero si se asocia a la afectación ganglionar pélvica la supervivencia se reduce en un 44%. La combinación de afectación parametrial y ganglios pélvicos positivos reduce la supervivencia alrededor de un 50% comparada con pacientes con ganglios negativos y sin afectación parametrial.

- Ganglios pélvicos: En el estadío IB, la presencia de ganglios pélvicos afectados, reduce la supervivencia en un 32%, de una supervivencia media del 89% para los ganglios negativos a un 57% cuando son positivos. El impacto en la supervivencia depende prioritariamente del número, localización y resecabilidad de los ganglios. En el estudio realizado por Uno et al el estado de los ganglios pélvicos tuvo un impacto significativo en la supervivencia. La supervivencia global a los 5 años en pacientes con ganglios positivos y negativos fue de 52% y 89% respectivamente (P=0.0005). La supervivencia libre de enfermedad a los 5 años en pacientes con ganglios negativos, uno positivo y dos o más positivos fue de 83%, 61% y 31% respectivamente (P=0.0001) (Uno et al 2005)
- Ganglios aórticos: la presencia de ganglios aórticos afectados ejerce un fuerte efecto en la supervivencia de forma más pronunciada que en el caso de ganglios pélvicos. La baja supervivencia de las pacientes está de algún modo relacionada con el tamaño del tumor pélvico. Fundamentalmente las metástasis paraórticas confieren un pronóstico desfavorable (supervivencia a 5 años 20-40%)

#### 6.7. Afectación endometrial.

Se ha encontrado que el carcinoma de cérvix se extiende dentro del segmento uterino inferior y la cavidad endometrial en el 10% a 30% de los pacientes (Mitani et al 1964, Pérez et al 1981). Pérez et al demostraron un descenso en la supervivencia y mayor incidencia de metástasis, en aquellas pacientes con afectación endometrial por invasión del estroma endometrial o reemplazamiento del endometrio normal por carcinoma cervical, confirmando las observaciones publicadas por Mitani et al en 1964. (Perez et al 1998)

## 6.8. Invasión estromal

En el estudio de Delgado et al (1989) se observa relación entre la profundidad de la invasión estromal y la supervivencia, siendo del 86-94% en aquellos <10mm, 71-75% entre 11-20mm y del 60% para los >20mm. Samlal et al (1997) confirmaban estos resultados en una serie de pacientes con estadíos IB-IIA con ganglios negativos (p<0.01). Sin embargo, cuando se analizaban las pacientes con ganglios positivos, la invasión estromal perdía significación en el análisis multivariante.

### 6.9. Invasión vascular linfática.

No se considera un factor de gran relevancia pronóstica. En una revisión de 25 estudios evaluando un total de 6500 pacientes, solo tres de ellos pudieron demostrar que la invasión vascular linfática era un factor de riesgo independiente (Creasman et al 2004). La presencia o ausencia de dicho factor no implica a la metástasis linfática (Memarzadeh et al 2003).

## 7. FACTORES PRONOSTICOS BIOLÓGICOS

## 7.1 PROLIFERACIÓN CELULAR

El cáncer es una proliferación descontrolada de células con anomalías en su material genético. La proliferación celular está sometida en primer término a la presencia de factores externos (factores de crecimiento, interacciones con otras células, nutrientes).

Los factores de crecimiento son generalmente proteínas que actúan mediante uniones de alta afinidad a receptores cuya función principal es la del control externo del ciclo celular, mediante el abandono de la quiescencia celular (Go) y la entrada en la fase G1, pudiendo realizar su función como inductores (IGF-1) o supresores (TGFb) de la proliferación celular, a través de la promoción de la diferenciación celular, la movilidad y la adhesión celular entre otros. Estos factores actúan sobre otros elementos celulares por mecanismo endocrino, paracrino o autocrino. Una vez unido el factor de crecimiento a su receptor se inicia una cascada de procesos bioquímicos, denominados

sistemas de transducción de señales, que permiten gracias a la actividad quinasa del receptor, la llegada de esta señal proliferativa hasta el núcleo, donde por inducción de la expresión de diversos mediadores incluidas las ciclinas especialmente la ciclina D, se favorece la proliferación celular. Sin embargo, cuando la señal proliferativa llega al núcleo, la división celular está regulada por los puntos de control o check-points del ciclo celular, que impiden la progresión de células dañadas y mantienen la homeostasis celular.

El ciclo celular se divide en fases: La fase S y la fase M son fases que corresponden a la síntesis de DNA y mitosis que están separadas por la fase G1 (fase de crecimiento plástico de la célula) y G2 (fase de preparación para la división celular). Existe una gran variedad de proteínas que controlan y coordinan el ciclo celular. Las principales son las quinasas dependientes de ciclina (CDKs), que consisten en dos subunidades, una catalítica con actividad quinasa, que permite fosforilar proteínas produciéndose cambios en su actividad o estructura y una subunidad de unión al sustrato (Ciclinas). Las ciclinas son necesarias en diferentes momentos del ciclo celular, fluctuando sus niveles en las distintas fases.

El proceso central en la regulación de este punto de control o "restriction checkpoint" es la fosforilación o desfosforilación de la proteína codificada por el gen retinoblastoma (Rb). Cuando Rb está hipofosforilada, inhibe a E2F, evitando que éste induzca la expresión de genes que regulan la síntesis de DNA. La fosforilación de Rb conlleva alteraciones, que impiden su unión y por tanto la inhibición de E2F, quedando esta libre para promover la síntesis de DNA. Este punto de restricción R está regulado por las CDKs, reguladadas a su vez por inhibidores (CDKIs) y otros moduladores. p21 (WAF1/CIP), p27 (KIP1) y p57 (KIP2) inhiben tanto los complejos ciclina D-CDk4/6 como a los complejos ciclina E-CDk2 y ciclina A-CDk2. p16 (INK4a), p15 (INK4b), p18 (INK4c) y p19(INK4d), interfieren de forma más selectiva sobre los complejos ciclina D-CDK4/6.

La síntesis de ciclina D es inducida por factores de crecimiento y disminuida por inhibidores de la proliferación. La formación del complejo ciclina D-CDK4/6 provoca la fosforilación de Rb (completada posteriormente por ciclina E-CDK2) liberando E2F. Además el complejo ciclina D-CDK4/6, secuestra a los inhibidores de CDK2, lo que reduce el efecto inhibidor de los inhibidores de

ciclinas sobre la ciclina E-CDK2, incrementando la capacidad de fosforilación de CDK2 sobre Rb y favoreciendo la proliferación celular.

## 7.1.1 PROLIFERACION TUMORAL Y RADIOTERAPIA

La proliferación celular durante la radioterapia provoca que la prolongación del tiempo de tratamiento global esté asociado con un peor control tumoral en carcinomas de cabeza y cuello (Withers et al 1988, Wilson et al 1995) y cérvix uterino (Fyles et al 1992, Lanciano et al 1993). La medida del índice de proliferación tumoral pretratamiento (Fowler et al 1992, Tsang et al 1995), como un parámetro que refleja la extensión de la repoblación tumoral durante la radioterapia fue propuesto para identificar pacientes que pueden ser tratados con radioterapia acelerada (Tucker et al 1990).

La repoblación del tumor durante el tratamiento radioterápico reduce la tasa de control tumoral inducido por la irradiación, ya que hasta un tercio de la radiación administrada en cada fracción de radioterapia se emplea en controlar la repoblación tumoral acaecida desde la fracción administrada el dia anterior; por ello en los tumores altamente proliferativos este fenómeno será más relevante obteniéndose peor control tras irradiación.

La proliferación tumoral continúa durante la irradiación, siendo la tasa de repoblación al menos tan rápida, como la estimada antes de iniciar el tratamiento mediante Tpot (tiempo potencial de duplicación) (Durand, 1997). Se han desarrollado estudios sobre el índice de proliferación pretratamiento mediante diferentes técnicas: por citometría de flujo y marcaje con BrdUrd se analiza la ploidía, fracción de crecimiento tumoral (fracción de fase S), tiempo potencial de duplicación celular (Tpot); por inmunohistoquímica se detectan proteínas de proliferación endógenas como Ki- 67, antígeno nuclear celular proliferante (PCNA) o mediante el uso de la tinción con hematoxilina-eosina (IM). En los estudios de Tsang et al y Bolger et al se demostró una tendencia a menor supervivencia y a recidiva local en aquellas pacientes con un Tpot corto (Tsang et al, 1995 y Bolger et al, 1996) sin embargo, en un estudio posterior en donde se midió la incorporación de bromodeoxiuridina y Tpot por citometría de flujo, en 101 pacientes con cáncer de cérvix, se observó que ninguno de los

parámetros de proliferación pretratamiento tenía significancia pronóstica con la respuesta clínica en el análisis univariante y multivariante (Tsang et al 2003).

Los estudios realizados mediante Tpot han resultado mayoritariamente ineficaces para predecir adecuadamente el curso clínico de los pacientes ya que la proliferación celular está equilibrada por la pérdida celular y esta medida no tiene en consideración las pérdidas celulares del tumor (streel et al 1977). Por otro lado la citometría de flujo dificulta el análisis de los resultados al no poder separarse adecuadamente las células pertenecientes al tejido sano de las células que componen el tumor (particularmente en tumores diploides) (Begg et al 1985, Tsang et al 1999, Bergstrom et al 1999).

Los estudios de inmunohistoquímica, permiten el contaje de la proliferación exclusivamente en las células tumorales, bajo la visión directa de la preparación por el investigador. De este tipo de estudios la determinación de la proliferación celular mediante la determinación de la expresión de la proteína Ki67 es una de las mas exploradas.

El antígeno Ki-67 es una proteína nuclear de 395 a 345 KD expresada en células en G1, S, G2 y M pero ausente en células en G0. Este hecho permite que tras su determinación en el tumor pueda ser estimada la fracción de crecimiento del tumor.

Los pacientes que presentan un alto porcentaje de células tumorales proliferantes (Alto porcentaje de fase S combinado con una alta fracción de crecimiento medida por PCNA) tienen una peor respuesta a la radioterapia, particularmente si el tumor es lo suficientemente radioresistente como para que la proliferación se mantenga incluso durante el tratamiento (Durand et al 2004). La relación entre proliferación tumoral (medida mediante la expresión de ki67) extensión tumoral (local, ganglionar), y supervivencia, se ha estudiado mediante los anticuerpos frente a Ki67 en carcinoma de cérvix (Tabla 2)

TABLA 2: Relación entre proliferación (estimada mediante ki67), factores pronósticos clásicos y supervivencia en carcinoma de cérvix.

	Nº Ptes	Grado Histológico	Extensión Local / Gg	Supervivencia
Wong (1991)	31	Si		
Cole(1992)	28	No	No	No
Garzetti (1995)	57	No	Si	Peor
Levine(1995)	66			No
Camacho(1997)	35	Si (1)	No	No
Nakano (1998)	64			Mejor
Pillai (1998)	152			Mejor
Lloret (2000)	65	No	Si	No
Oka (2000)	75			Mejor*
Padovan (2000)	86			Peor
Davidson (2000)	49			No
Ho (2000)	97			Peor
Suzuki (2000)	67			Mejor
Liu (2000)	124			Peor
Graflund (2002)	141		No	No
Kamer (2003)	23		No	
Van de pute (2004)	221			no

<sup>\*</sup> a 9GY de dosis. (1) Grado 2 vs 3

Dos estudios han demostrado relación entre expresión de Ki67 y extensión local o ganglionar de la enfermedad (Garzetti et al, 1995, Lloret et al 2000). En relación a la supervivencia, los resultados no son concluyentes, ya que en cinco estudios los niveles elevados de Ki67 se asociaron a peor supervivencia (Garzetti et al, 1995; Chung et al, 1994,Padovan et al 2000, Ho et al 2000, Liu et al 2001), en tres la relación fue inversa (Nakano et al, 1998; Pillai et al, 1998, Suzuki et al 2000), y en la mayoría no se pudo demostrar relación entre Ki67 y supervivencia (Camacho et al 1997, Lloret 2000, Davidson et al 2000, Graflund et al 2002,Putte et al 2004 y otros). En el estudio de Oka et al, Ki67 a los 9 Gy se relacionaba con la supervivencia global (P=0.025) supervivencia libre de enfermedad (P=0.024) y metástasis libre de supervivencia (P=0.045) siendo

Ki67 a los 9Gy un factor predictivo de buen pronóstico en pacientes con carcinoma de células escamosas. (Oka et al, 2000)

En el estudio de Padovan et al se observó una relación entre el estadío y la expresión de Ki-67. La mayoría de los pacientes en estadío lb eran negativos para ki67 y por el contrario todos los casos con estadío IV eran positivos para Ki-67 (Padovan et al 2000).

En el estudio preliminar de nuestro grupo (Camacho et al, 1997) sobre 35 pacientes con carcinoma de cérvix observándose una tendencia a una correlación entre el grado histológico y la expresión de ki67, sobretodo entre los grados II vs grado III. El índice medio de expresión del marcador fue del 32.46% para los adenocarcinomas, significativamente más bajo que para los carcinomas epidermoides (48.4%), lo cual podría justificar la diferente conducta y respuesta a los tratamientos entre ambos tipos histológicos. En el estudio posterior de nuestro grupo (Lloret, 2000) sobre una serie de 65 casos los tumores epidermoides son más proliferativos y muestran menores tasas de apoptosis que los adenocarcinomas. Estos resultados son similares a los del estudio de Oka en 1996 (Oka et al, 1996).

En el estudio de Lloret et al, en 65 pacientes con carcinoma de cérvix, la proliferación tumoral estimada mediante Ki67 fue útil, junto con el estadío, para predecir la respuesta a la irradiación y el control local de las pacientes (Lloret et al,2000) demostrando ser un método fiable en la predicción de respuesta y control local para los tumores tratados con radioterapia.

## 7.1.2. PROTEINAS REGULADORAS DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Son muchos los genes relacionados con la regulación de la proliferación celular en los proesos neoplásicos. En esta introducción nos centraremos en el análisis de dos modelos adecuados y poco estudiados en carcinoma de cervix uterino como son por un lado un receptor de un factor de crecimiento como es IGF1-r y por otro de l efector mas importante de esa cadena de transducción de señales desde el receptor hasta el núcleo que son las ciclinas pero especialmente la Ciclina D1.

## **7.1.2.1 IGF-1 RECEPTOR**

El IGF-1R, o receptor de *Insuline Like Growth Factor-1* participa en el crecimiento celular además de jugar un papel importante en el proceso metastásico regulando la migración celular, invasión y angiogenesis.

Es una molécula transmembrana con actividad tirosin kinasa que se expresa en muchos tipos celulares y presenta una alta secuencia de homología con el receptor de la insulina.

Su estructura consiste en dos cadenas extracelulares alfa y dos subunidades transmembranales beta, las cuales están unidas por puentes disulfuro para formar un receptor homodímero complejo. El dominio de unión al ligando, está presente en la subunidad extracelular alfa. Las subunidades beta, comprenden una región juxtamembrana, un dominio intracelular tirosin quinasa y un dominio terminal carboxilo con funciones de interacción proteica (Hubbard and Till, 2000).

Se expresa mayoritariamente en tejidos que juegan un rol en el crecimiento tisular, principalmente via hormona de crecimiento, la cual estimula la producción de IGF-1 para activar el IGF-1R. La unión de IGF-1R a IGF-1 se produce con alta afinidad, generando un cambio conformacional en el receptor, seguido por una autofosforilación de tres residuos tirosina dentro del dominio kinasa. Esto produce un aumento en la actividad catalítica, seguido por fosforilaciones adicionales de residuos tirosina en la región juxtamembrana y residuos serina y tirosina localizados en el carboxilo terminal, que conducen a la activación de distintas rutas de señalización. Una de ellas activa Ras, Raf, y MAPK, la ruta principal de transducción mitógena, y la otra es responsable de la transducción de la señal antiapoptótica, implicando PI3K (Lin J 1999). Su activación previene la apoptosis y estimula la proliferación celular o diferenciación (Navarro and Baserga 2001). Además, el IGF-1R activado regula la adhesión, organización del citoesqueleto y migración a través de la interacción con moléculas de adhesión e integrinas (Gray et al, 2003).

El IGF-1R se ha asociado con la angiogenesis en varios tipos de tumorales ya que su activación aumenta la expresión de VEGF. Se ha observado en pacientes con cáncer de mama metastásicos un nivel elevado de VEGF en suero y IGF-1 comparado con los controles y pacientes sin enfermedad metastásica (Coskun et al 2003). La inhibición de IGF-1R en varias líneas tumorales causó una disminución en la expresión de VEGF, angiogenesis y metástasis (Reinmuth et al 2002, Stoeltzing et al 2003).

Por otro lado, IGF-1R parece ser crucial en el crecimiento independiente de anclaje, una propiedad única de las células tumorales. Experimentos de laboratorio han demostrado que la dependencia de anclaje se adquiere cuando se produce un aumento de IGF-1Rs en la superficie celular (Baserga, 1999). Esta propiedad de IGF-1R, también implica la función de este receptor en la progresión tumoral, ya que la disminución de la independencia de anclaje refleja el nivel de malignidad. De esta forma, la metástasis adquiere mayor independencia de anclaje, y mayor dependencia de IGF-1R comparado con el tumor primario. Además, estudios recientes han observado que la pérdida de oncogenes supresores, como de la activación de proto-oncogenes, está relacionada con la función y actividad de IGF-1R (Werner et al,2000; Girnita et al,2003;Zhao et al,2004). Estos estudios demuestran la existencia de una ruta p53/MDM2/IGF-1R en la cual las señales son propagadas en ambas direcciones. Cambios que conducen al aumento de distribución de MDM2 en el núcleo celular inactivando p53, pueden contribuir a un crecimiento avanzado de las células tumorales por sobreexpresión de IGF-1R.

En los últimos años se ha observado que IGF-1R también juega un rol significante en la efectividad de la señalización intracelular. Hay estudios que han observado una interacción entre el IGF-1R y el EGFR (Adams et al,2004). En cultivos epiteliales humanos, hay un efecto sinergístico de IGF-1 y EGF o TGF- $\alpha$  en la promoción de la síntesis de DNA, aunque en la ausencia de IGF-1, EGF carece de efecto (Stull et al, 2002). Tanto IGF-1 como EGF inducen la expresión de ciclinas D, pero únicamente IGF-1 activa a la ciclina E, la cual se requiere para atravesar el checkpoint G1-S. De este modo, IGF-1 no solo estimula la progresión del ciclo celular en células epiteliales humanas, sino que es esencial para que la progresión mediada por EGF atraviese el Checkpoint G1-S.

Varios receptores de factores de crecimiento se han asociado con la radioresistencia de la célula tumoral. La transducción de la señal radioinducida

interacciona con las rutas de señalización de IGF-1R que siguen a la activación de PI3K.

Se han identificado a IGF-1R como una proteína capaz de inducir radioresistencia en cáncer de mama, ya que la inhibición de la función de IGF-1R incrementa la respuesta del tumor a la irradiación en cánceres de mama y colon (Wen B. et al 2001). En el estudio de Cosaceanu et al, (2005) se estudia la expresión de IGF-1R en líneas de cáncer de pulmón no pequeñas (NSCLC). La inhibición de IGF-1R combinada con la irradiación da lugar a un descenso en la muerte celular radioinducida en 5 de 6 líneas de cáncer NSCLC, normalmente resistentes a la radiación ionizante.

Entre los receptores tirosin kinasas, IGF-1R es particularmente importante por su efecto anti-apoptótico frente a la radiación ( Kulik G et al 1997) .Un posible mecanismo que puede contribuir a la influencia de IGF-1R en el bloqueo de la radiosensibilidad incluye la ATM kinasa. Tanto Macaulay et al(2001) como Peretz et al (2001)han mostrado que la inhibición de IGF-1R incrementa la radiosensibilidad, una inhibición que está directamente conectada con la expresión y señalización de ATM (ataxia telangiectasia mutada). No se conoce muy bien los mecanismos biológicos por los cuales este tratamiento combinado induce un efecto antitumoral. Es también posible que otros mecanismos de IGF-1R induzcan radioresistencia (Cosaceanu et al 2005).

Hay muy pocos estudios sobre la expresión de IGF-1R en carcinoma cervical. Steller et al (1996) observaron que la sobreexpresión de IGF-1R era un componente importante que controlaba la proliferación en células de carcinoma cervical.

En un estudio realizado por Railo et al 1994 se analizó el valor pronóstico de IGF-1R en 126 pacientes con cáncer de mama. 39% de los pacientes eran IGF-1R positivos. La expresión del marcador se relacionaba significativamente con la supervivencia libre de enfermedad (P=0.0108) y no tenía valor predictivo en el subgrupo con ganglios negativos (Railo et al 1994).

En sarcoma de tejido blando se ha observado una asociación entre la expresión de IGF-1R y respuesta de la enfermedad. Una alta expresión de IGF-1R se asociaba con una mejor supervivencia y con un menor desarrollo de metástasis. (Ahlén et al 2005). Hay estudios que muestran que el bloqueo genético de IGF-1R en líneas celulares de cáncer de colon humano incrementa

la eficacia ala quimioterapia por aumento de la tasa de apoptosis (Adachi et al 2002). Además, usando usando anticuerpos antagonistas IGF-1R que permiten bloquear su función se incrementa el porcentaje de respuesta de un tratamiento combinado con 5-fluorouracilo (5-FU) y radioterapia externa en células de cáncer de colon (Perer et al 2000)

En un estudio más reciente se analizó la expresión de IGF-1R en 276 pacientes con cáncer de mama sin encontrarse ninguna relación con parámetros clinicopatológicos (edad, grado histológico, presencia o ausencia de metástasis nodo linfática axilar) ni con la supervivencia libre de enfermedad (Shimizu et al 2004). En el estudio de Hirano et al realizado en 32 pacientes con carcinoma de cérvix, no se observó ninguna relación entre una alta expresión de IGF-1R con la edad, estadío y grado histológico del paciente (Hirano S. et al 2004)

### 7.1.2.2 Ciclina D1

Como otras ciclinas, la ciclina D1 esta implicada en el favorecimiento de la progresión del ciclo celular, alcanzando su pico durante la fase G1 mientras que los niveles de CDK permanecen en su nivel regular. El complejo ciclina D1-CDK4/6 fosforila la proteina del retinoblastoma (Rb) para liberar las células que están en fase G1, promocionando su entrada en la fase S. Este paso es inhibido por los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CDKI) tal como las proteinas p15, p16 y p18 y p19 que interfieren de forma selectiva sobre el complejo ciclina D1-CDK4/6. La ruta CDKI/ciclinaD1/CDK4/Rb es uno de los puntos control de la proliferación celular. Las alteraciones de esta ruta podrían promocionar la proliferación celular, aumentando la inestabilidad genómica y favoreciendo el desarrollo de células cancerígenas.

Muchos investigadores han observado una correlación entre la expresión de ciclina D1 y el pronóstico en cáncer esofaríngeo, cabeza y cuello, pancreático, tiroides y pulmón (Michalides et al 1997, Caputi et al 1999, Ishikawa et al 1998). En general, la sobreexpresión de ciclina D1 se asocia con un peor pronóstico en carcinoma de células escamosas de diferentes localizaciones, sin embargo en carcinoma cervical

esta asociación no está tan clara porque la expresión de ciclina D1 se encuentra disminuida debido a la acción del virus HPV (Lukas et al 1994, Bae et al 2001).

El estudio de Skomedal et al (1999), mostró sobreexpresión de ciclina D1 en el 3% de los pacientes al igual que el estudio de Cho et al (1997) en carcinoma de células escamosas invasivo la expresión era significativamente baja (p=0.004) especialmente cuando se asociaba con el HPV. Sin embargo en el estudio de Cheung et al(2001)., se observó sobreexpresión de ciclina D1 en el 33.3% de los tejidos de carcinoma cervical

Southern et al en 1998, publicaron que la ciclina D1 se expresaba frecuentemente en lesiones intraepiteliales de bajo grado infectadas por HPV de bajo riesgo, pero no en lesiones infectadas por HPV de alto riesgo. Según Cheung y colaboradores(2001), la baja expresión de ciclina D1, puede deberse a que en carcinoma cervical la proteína E7 de HPV puede inactivar la proteína Rb, por ello las mutaciones o amplificaciones de los reguladores del gen Rb, como la ciclina D1, son poco frecuentes en cáncer cervical. En un estudio posterior realizado por Skomedal et al (2003) se demostró que en carcinoma de cérvix la ciclina D3 puede compensar los bajos niveles de ciclina D1, mientras que en otros tipos de cáncer, ambas isoformas pueden contribuir al fenotipo neoplásico.

En pacientes con cáncer cervical en estadío temprano la expresión de ciclina D1 no se correlaciona con los factores pronósticos de la enfermedad, sin embargo, la expresión de ciclina D1 se correlacionada con una baja supervivencia libre de enfermedad (P=0.0175) y una baja supervivencia global (P=0.0189). En el análisis multivariante, era un factor pronóstico para la recidiva de la enfermedad (P=0.0004) (Bae et al 2001). Cheung et al (2001) en 106 pacientes con carcinoma de células escamosas de cérvix uterino observó que la sobreexpresión de ciclina D1 se correlacionaba con un peor pronóstico de la enfermedad. En el estudio de Shiohara et al en 103 pacientes con carcinoma de células escamosas de cérvix uterino se observó una correlación positiva entre la ciclina D1 y la proteína Ki-67 en estadíos lb+II (P=0.0379) y estadíos III+IV (P=0.0526) (Shiohara et al 2005).

Suzuki et al (2004) en 53 casos de adenocarcinomas de cérvix uterino no encuentra ninguna significancia pronóstica en la expresión de ciclina D1 en este tipo de tumores.

Tabla3 .Relación de ciclina D1 con supervivencia en carcinoma epidermoide cervical

	Nº Ptes	Tratamiento	Estadío	CiclinaD1/Superv
Skomedal(1999)	61		I-IV	No
Bae ( 2001)	28	CX	lb-lla	peor
cheung (2001)	106	CX	I-IV	peor
Suzuki (2004)*	53	RT	I-IVa	No
Shiohara (2005)	103	CX,RT/QT	lb+II/III+IV	No

<sup>\*</sup>Adenocarcinoma

#### 7.2 APOPTOSIS

En 1885, Walther Flemming observó que la atresia del epitelio de los folículos ováricos, se debía a una muerte celular con unos cambios nucleares característicos, a la que denominó cromatolisis. Esta era una forma de muerte celular, diferente a la conocida hasta ese momento, la necrosis. Desde entonces, fueron numerosas las observaciones sobre este fenómeno, hasta que en los años 70 Allison Crawford dirige la atención sobre la "muerte celular programada en los tejidos normales durante la embriogénesis y el desarrollo", concluyendo que el proceso era el mismo descrito por Flemming. Se denominó apoptosis (del griego "cayendo") para subrayar esa eliminación celular aislada ("como caen las hojas de los árboles") y se propuso que el inicio inadecuado o la inhibición de la apoptosis, podría influir en la génesis de enfermedades como el cáncer.

Durante la apoptosis se produce condensación de la cromatina con rotura del DNA internucleosomal (de aproximadamente 180 pares de bases) condensación citoplasmática y encogimiento celular, manteniéndose las organelas prácticamente intactas. Tras esta primera fase, la célula se fragmenta en cuerpos apoptóticos que son fagocitados por macrófagos o células adyacentes.

El fenómeno se puede observar con microscopio óptico con tinción de hematoxilina-eosina (Kerr et al, 1972), aunque también se puede estudiar por métodos más complejos (microsocopio electrónico, citometría de flujo, ruptura de DNA).

En la apoptosis la célula sufre el daño principalmente en el núcleo, sin producirse reacción inflamatoria, y ocurre generalmente de forma aislada, afectando a ciertas células de forma selectiva. (Mikulski, 1994). Se caracteriza por ser un proceso biológico ordenado que resulta necesario para evitar la sobreproducción celular siendo de vital importancia durante la morfogénesis.

El término apoptosis y muerte celular programa son a menudo utilizados como sinónimos sin embargo, hay otros procesos de muerte celular como son la autofagia y la necrosis en los que se han identificado a nivel molecular componentes que justifican la existencia de un programa de ejecución. A pesar de la idea de que la muerte celular programada genéticamente requiere la síntesis proteica, todos estos programas (apoptosis, autofagia, necrosis) parecen estar ya listos para ser ejecutados, lo que sugiere que la definición de muerte celular programada englobaría todos los casos. (Lockshin 2001)

Durante la necrosis, a diferencia de la apoptosis, la muerte va acompañada de un aumento del volumen celular, vacuolarización del citoplasma, aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática y lisis nuclear sin fragmentación específica de la cromatina. Esta forma de muerte celular se produce en respuesta a daños importantes causados por isquemia e hipoxia severas, o por exposición a dosis elevadas de compuestos genotóxicos que afectan al metabolismo energético celular. La muerte celular por autofagia es un proceso menos estudiado que se caracteriza por la destrucción de componentes celulares dentro de la célula en vacuolas autofágicas. Las características morfológicas de la autofagia incluye vacuolarización, degradación de contenido citoplásmico y ligera condensación de la cromatina (Fink SL et al 2005)

La apoptosis se puede iniciar en cualquier fase del ciclo, dependiendo de la célula y del tipo de estímulo.

## 7.2.1 APOPTOSIS Y PROTEINAS REGULADORAS

El proceso de apoptosis tiene una regulación compleja. En principio, cualquier célula tiene potencialidad de sufrir apoptosis, produciéndose una interacción entre la célula y elementos externos o internos a la misma, cuyo resultado es la muerte celular.

La pérdida de integridad de las uniones intercelulares, hormonas y factores de crecimiento, los impactos ambientales como agentes químicos, radiaciones ionizantes e isquemia, y el sistema inmune, son algunos de los desencadenantes extracelulares de apoptosis. Estos agentes actúan a través de receptores de membrana, receptores intracelulares o produciendo un daño directo nuclear, dando lugar a la liberación o inhibición de reacciones intracelulares que conducen a la fragmentación del material genético y a la muerte celular (Raff 1992).

Existen decenas de genes implicados en la apoptosis, especialmente factores de transcripción, proteasas e inhibidores de proteasas. Los genes cuya expresión promueve la supervivencia celular, disminuyendo la susceptibilidad de apoptosis, se llaman oncogenes, destacando entre ellos BCL-2, y aquellos que inducen apoptosis, se les denomina genes supresores, entre los que destaca P53 y el gen del retinoblastoma (RB). La mutación, sobreexpresión o ausencia de estos genes, pueden provocar un desequilibrio en el destino celular, de forma que una célula sana podría ser eliminada erróneamente, mientras que una célula con aberraciones genéticas podría quedar protegida, perpetuándose en su descendencia las mutaciones, potencialmente carcinogénicas. Así, anomalías o ausencia de bcl-2 podrían dar como resultado un acortamiento inadecuado de la supervivencia celular, o su sobreexpresión un alargamiento de la misma, mientras que mutaciones o ausencia de p53 producirían una ausencia de muerte celular por apoptosis.

De forma simple nos referiremos a continuación a los genes que regulan de forma mas inmediata el proceso de apoptosis inducido por la radiación y otros factores externos. Así el daño nuclear inducido detyerminará la expresiópn nde P553 y su mensaje apoptótico será alentado por BAX y contrarrestado por BCL-2.

### P53.

Es una de las principales proteínas relacionadas con los mecanismos de regulación de "puntos control" o Check-points del ciclo celular, que centraliza la coordinación de otros procesos relacionados con el daño celular como son, la reparación de daños en las bases o roturas dobles de cadena, la progresión del ciclo celular y la muerte por apoptosis. Es comúnmente denominado el "guardián del genoma" porque mantiene la estabilidad genética celular (Levine AJ et al 1997). Su relación con el cáncer es conocida por la alta frecuencia de alteraciones observadas (más del 50% de los tumores muestran alteraciones en p53), como por la frecuencia de aparición de tumores en personas con mutaciones germinales de p53 (Síndrome Lifraumeni). Además, en tumores que no muestran mutaciones del gen, la función de la proteína puede estar alterada debido a su secuestro citoplasmático por oncoproteinas virales (HPV-E6) (Morris SM et al 2002).

Es una proteína de 393 aminoácidos cuyo gen codificador se encuentra en el cromosoma 17. Puede ser dividida en varios dominios discretos (May P and May E, 1999). En el domino N-terminal se encuentran:

- 1.- Dominio transactivador (TA) en el N-terminal, en el cual las interacciones entre proteínas, facilitan o bloquean la capacidad de transactivación de p53.
- 2.- Región poliprolina que podría mediar las funciones apoptóticas de p53 y la supresión de crecimiento celular independiente de transcripción.
- 3. Nuclear Export Signal (NES) relacionada con el transporte de p53 desde el núcleo al citoplasma para su degradación mediada por MdM-2.

El dominio central contiene la secuencia especifica de unión al DNA, que permite la unión de p53 con los sitios promotores de genes diana como p21 (WAF1/Cip1). Además, aquí se encuentran las cuatro regiones conservadas que regulan las interacciones proteína-DNA. En esta región ocurren por encima del 90% de las mutaciones identificadas en cánceres humanos. Algunas mutaciones limitan la actividad de transcripción de p53 y otras tienen la capacidad de transactivar genes específicos como c-Myc, (proliferación celular), MDR-1 (resistencia a drogas), tolerancia al estrés celular, radioresistencia relacionada con mejoras en la capacidad de reparación del DNA o inhibición de la apoptosis (Sigal et al 2000)

En este dominio, además se producen uniones a otras proteínas, bien inhibidoras de la acción de p53 (SV40 Large T antigen protein) favorecedoras de la misma (p53BP1/2) o proteínas de reparación (BRCA1, BLM y Rad51) facilitando la reparación homóloga (HR) de las roturas dobles de cadena (dbs) del DNA inducidas por la irradiación.

El dominio C-terminal, incluye un dominio de oligomerización que permite la óptima configuración de p53 en forma de tetrámeros, una región de señalización de localización nuclear (NLS) relacionada con la translocación de p53 desde el citoplasma al núcleo, tras la inducción de un daño en el DNA y una región de unión con secuencias no específicas de DNA y roturas dobles de cadena inducidas por radiación ionizante, permitiendo el reconocimiento del DNA dañado y favoreciendo su papel en la reparación del daño mediado por XPD, XPB, BLM, Rad51 etc (Cuddihy and Bristol, 2004)

La regulación de p53 en condiciones basales, muestra bajos niveles de la proteína (denominada "salvaje", Wild-Type), con una vida media corta (10-20 minutos). Este rápido recambio, viene controlado por la proteolisis inducida por Mdm-2. En caso de daño al DNA, p53 se acumula y activa, desarrollándose un estrecho sistema de regulación (Ashcroft et al 1999)

La proteína **BCL-2** consta de 239 aminoácidos y su gen codificador está en el cromosoma 18.Contiene cuatro dominios de homología estructuralmente conservados. BH1, BH2, y BH3 se requieren para interaccionar con otros miembros de la familia BCL-2, mientras que el dominio BH4 media las funciones de control del ciclo celular. El dominio transmembrana (TM) se requiere para la localización subcelular de BCL-2 y es de gran importancia para su función (Belka C and Budach W 2002). En condiciones normales, los niveles de BCL-2 descienden cuando las células están maduras o en situación de poder ser eliminadas, mientras que se expresa en células que deben sobrevivir, como las células hematopoyéticas precursoras y las células del sistema nervioso. BCL-2 tiene un importante papel en la embriogénesis, donde la mayoría de las células expresan niveles elevados de BCL-2 (Jacobson et al 1997). En general, las células que expresan BCL-2 bloquean la apoptosis, por lo tanto promueven la supervivencia celular, facilitando la adquisición de mutaciones y la transformación maligna (Vaux et al, 1988; Pezella y Gatter,

1995). Una característica de BCL-2 es que inhibe la apoptosis sin estimular la proliferación celular (Hockenbery et al, 1991) mediante el bloqueo del citocromo C liberado por la mitocondria durante la ruta de apoptosis mitocondrial (Brustugun et al, 1998)

BAX (bcl-2 associated X protein) es una proteína cuyo gen codificador está en el cromosoma 19. Aunque posee una alta homología con la proteina BCL-2 carece del dominio BH4. Participa en la ruta de apoptosis mitocondrial induciendo la liberación del citocromo C. Se ha observado que BAX se asocia con el complejo del poro de la mitocondria (PT) que participa en la regulación del Ca<sup>2+</sup>de la matriz, PH, potencial de membrana mitocondrial etc. La proteína BAX se une a un componente de este complejo (transportador nucleótido adenina, ANT) induciendo la apertura del poro con la consiguiente rotura del potencial de membrana mitocondrial y liberación de moléculas pro-apoptóticas como el citocromo C (Marzo et al 1998, Narita et al 1998, Susin et al 1999). BCL-2 interactua con BAX a nivel de la mitocondria modulando la inactivación de BAX a través de la heterodimerización.

Cuando la proteína BCL-2 está en exceso, forma homodímeros BCL-2- BCL-2 y heterodímeros de BCL-2 -BAX, estando la célula protegida de la apoptosis, pero cuando BAX está en exceso dominan los homodímeros BAX— BAX y la célula es susceptible de apoptosis (Petros et al 2004)

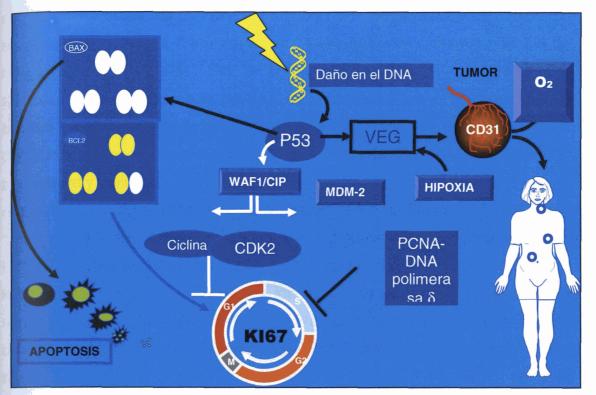


Fig 2. Regulación de Apoptosis/proliferación mediante p53,Bax y Bcl-2. Lloret 2000

#### 7.2.2. APOPTOSIS Y CANCER

Se puede establecer relación entre apoptosis y cáncer al menos en cuatro aspectos: oncogénesis, homeostasis tumoral, respuesta al tratamiento con radioterapia y pronóstico de la enfermedad.

# 7.2.2.1 Apoptosis y Oncogénesis

El crecimiento de una célula maligna se debe en parte a que los genes reguladores de la apoptosis se encuentran alterados. Las células con anomalías en su material hereditario, no pueden ser eliminadas por apoptosis, perpetuando en su descendencia. Estas células anómalas proliferan más de lo que mueren, lo que da lugar al crecimiento tumoral.

Saegusa et al (1995) observó una mayor expresión de la proteína BCL-2 en CIN III que en CINI/II o carcinoma invasivo de células escamosas de cérvix. En el estudio de Giarnieri et al (2000), se estudió los efectos de los distintos marcadores genéticos por inmunohistoquímica, en la progresión del carcinoma de células escamosas cervical. Se observó sobreexpresión de P53 en el 28.6%

de los carcinomas no invasivos y 69.6% de los invasivos (P<0.02). La sobreexpresión de BCL-2 se detectó en 14.3% de los no invasivos y 65.2% de los invasivos (P<0.003). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de BAX en estos dos tipos de lesiones. En un estudio posterior realizado por Cheung et al (2002), no se encontró ninguna diferencia entre la expresión de la proteína BCL-2 y neoplasia cervical premaligna y maligna.

Grace et al (2003) analizaron la coexpresión de las proteínas P53 y BCl-2 en 105 pacientes con carcinoma de células escamosas de cérvix inducidos por HPV. El análisis estadístico mostró una correlación positiva y significante entre los niveles de expresión proteica y los diferentes estadíos, desde displasia media a cáncer invasivo (P=0.00001 respectivamente). Se observó una correlación positiva entre la expresión de P53 y BCL-2 y la infección por HPV además, el estudio mostró una correlación directa (P=0.00001) entre la expresión de P53 y BCL-2 sugiriendo que la co-sobreexpresión de estas proteínas en cáncer cervical estaba asociada al HPV.

# 7.2.2.2 Apoptosis y Homeostasis Tumoral.

El crecimiento tumoral es el resultado del balance entre el número de células procedentes de la división celular y la pérdida celular, fundamentalmente por apoptosis o necrosis, debida a deprivación de oxígeno o nutrientes, muerte mitótica, muerte inmunológica, exfoliación o metástasis (Kerr et al, 1972; Wyllie et al, 1980; Fukuda et al, 1993, Levine et al, 1995). En general, el crecimiento tumoral se deberá a mitosis, mientras que la reducción tumoral será debida a apoptosis (Wheeler et al, 1995). Existe una relación directa entre proliferación y apoptosis en los tejidos neoplásicos.

La relación apoptosis-mitosis se ha observado en carcinoma de cérvix (Levine et al, 1995; Isacson et al, 1996; Tsang et al, 1999). Se ha encontrado relación directa entre el índice de apoptosis (IA) y el índice de mitosis (IM), siendo el IA generalmente mayor o igual que el IM (tal vez porque la mitosis se completa antes que la apoptosis y por tanto se infracuantifican) (Stauton y Gaffney, 1995). La cuantía de la apoptosis también depende del patrón histológico. En

los tumores de cérvix los adenocarcinomas presentan un mayor IA que los carcinomas epidermoides (Levine et al, 1995; Wheeler et al, 1995; Tsang et al, 1999).

Nuestro grupo ha realizado estudios de apoptosis/proliferación en tumores de laringe, mama y vejiga, comprobando que los tumores altamente proliferativos tienen un índice elevado de apoptosis (Lera et al, 1998; Pérez et al, 1998; Lara et al, 1999). En el estudio de Lloret, se analizaron una serie de 65 pacientes con carcinoma de cérvix con distinto tipo histológico sin observarse relación directa entre apoptosis/proliferación aunque se observaron mayores tasas de apoptosis en los tumores con mayor extensión local (estadío clínico), de la misma forma a lo observado para la proliferación estimada mediante Ki67 (estadío clínico) o IM (tamaño tumoral) (Lloret, 2000). En los estudios recientes se observa una relación entre la tasa de proliferación y la tasa de apoptosis (Zanotti 2003, Reesink et al 2005).

El papel que juega la apoptosis/proliferación durante la evolución desde displasia cervical a carcinoma invasivo, ha sido motivo de estudio. De forma general se aprecia que existe una relación directa entre apoptosis y grado de displasia de forma similar a la proliferación (Tabla 4).

TABLA 4: Relación entre apoptosis, proliferación y grado de displasia cervical.

	Nº Ptes	Apoptosis/grado lesión	Proliferación/grado lesión
Sheets (1996)	42	Inversa (p<0.001)	
Levine (1995)	66	Directa	Directa
Isacson (1996)	81	Directa	Directa
Shoji (1996)	191	Directa	No
Zanotti (2003)	30	Directa	Directa
Reesink (2005)	79	Directa	Directa*
Santoprieto (2006)	232	Directa	Directa

<sup>\*</sup>Solo en lesiones CIN

Para Sheets et al(1996), el grado de displasia cervical se relacionaba de forma inversa con la apoptosis mientras que para la mayoría de los autores se producía una relación directa (Isacson 1996, Shoji 1996, Reesink 2005). En

cuanto a la relación entre el grado de lesión y la tasa de proliferación, la mayoría de los estudios observan una relación directa (Isacson 1996, Zanotti 2003).

En el estudio de Reesink, además de observarse una relación directa de los marcadores de apoptosis y proliferación con el grado de la lesión, se observa una baja tasa de células proliferativas en las lesiones de cáncer cervical comparado con las lesiones CIN III. Cuando la tasa apoptosis/proliferación se calculó de forma separada para cada una de las lesiones y cáncer cervical, el porcentaje era mayor en cáncer cervical que en las lesiones CIN (P<0.001) indicando que el desequilibrio producido entre la tasa de proliferación y apoptosis era menor en las muestras de cáncer cervical. Estos resultados sugieren que las lesiones de CIN mayores y las muestras de cáncer cervical, no han perdido su capacidad apoptótica sino que han ganado capacidad proliferativa (Reesink 2005)

Santoprieto et al (2006) analizaron el IA y IM en 232 biopsias de pacientes con neoplasia intraepitelial cervical. Los valores de apoptosis y proliferación eran elevados en lesiones de alto grado, pero solo el IM era un predictor independiente de CIN III en el análisis multivariante

#### 7.2.2.3 Apoptosis y Radioterapia.

# - Apoptosis y pronóstico en cáncer cervical.

La tasa de apoptosis inducida por una dosis de radiación ionizante está relacionada directamente con la apoptosis espontánea (Meyn et al, 1993). Existe además, una heterogeneidad de la respuesta apoptótica en los distintos tumores (Meyn et al, 1993). Kelland y Steel (1988) analizaron la respuesta a la irradiación de 5 líneas conocidas de carcinoma de cérvix, utilizando distintas tasas de dosis (16, 32 o 150 cGy/min), encontrando diferencias significativas en la radiosensibilidad de estas líneas celulares.

La tasa de apoptosis de un tumor antes del tratamiento puede tener implicaciones importantes en la respuesta a la radioterapia y supervivencia a largo plazo.

Los estudios realizados sobre apoptosis, proliferación y respuesta a la RT en diversos tumores, han mostrado distintos resultados (Tabla 5).

De forma general en cáncer de cérvix, un alto índice apoptótico se asocia con una mejor respuesta a radioterapia en adenocarcinomas (Wheeler et al 1995, Sheridan et al 1999) mientras que en carcinomas epidermoides se asocia con una peor respuesta (Levine et al 1995, Tsang et al 1999). En cuanto a la relación entre la proliferación y respuesta a la raditerapia, la mayoría de los estudios no encuentran relación significante (Chung et al 1999, Kim et al 2001, Tsang et al 2003)

TABLA 5: Apoptosis, proliferación y respuesta a Radioterapia en carcinoma de cérvix

	Nº Pacientes	Apoptosis/ Control Local	Apoptosis/ Supervivencia	Proliferación/ Supervivencia
Levine (1995)	66	Peor (A.M)	Peor (A.M)	No
Wheeler (1995)	44(1)	No	No (2)	Water Control of the
Sheridan(1999)	39(1)		No (3)	
Chung (1999)	48	Mejor (A.M)	No(2)	No
Lloret(2000)	65	No	No	No
Paxton (2000)	146		No(4)	<del></del>
Zaghloul (2000)	40		Mejor	
Kim (2001)	42	Peor (A.B)	Peor (A.B)	No
Liu (2001)	124		Peor (A.M)	
Tsang (2003)	101	No (AU/M)	No (AU/M)(4)	No (AU/AM)

<sup>1:</sup> Tipo Histológico Adenocarcinoma. 2: Mejor supervivencia global. 3: Mejor supervivencia utilizando el cociente IA/IM, p<0.03. 4: Supervivencia libre de enfermedad AU: análisis invariante; A.B: análisis bivariante; AM: análisis multivariante.

Levine al (1994, 1995)et en un grupo de pacientes compuesto fundamentalmente por carcinomas epidermoides, confirmaron la relación entre apoptosis pretratamiento y supervivencia, observando que tumores con IA por encima de la mediana (0.71%) tenían peor control local y supervivencia tras RT. En el estudio de Kim (2001) se obtienen resultados similares. El análisis del IA tanto antes del tratamiento como después de 2 Gy de irradiación mostró que pacientes con un alto IA espontáneo mostraban una peor respuesta a corto plazo, peor control local (P=0.054) y peor supervivencia (P=0.013) y que un alto IA se asociaba con un peor control local y pronóstico a largo plazo carcinoma de células escamosas avanzado de cervix.

Paxton et al (2000) analizaron 146 carcinomas escamosos de cérvix y observaron que los niveles de apoptosis no presentaban valor predictivo en la predicción de la supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad después de RT. En el estudio de Chung et al, los tumores con alto IA se asociaban a una mayor supervivencia global, siendo el IA marginalmente significativo en el análisis multivariante para el control local (p<0.057). Por otro lado, los pacientes con un IA por encima de la media tenían un mejor control local (P=0.0062) y supervivencia global (P=0.0053) que los que tenían un bajo IA (Chung et al 1999).

Cuando se analizaban adenocarcinomas de cérvix, los tumores con mayor IA presentaban una tendencia a una mayor supervivencia global, sin que existiera esta relación con el control local ni con la supervivencia causa específica (Wheeler et al, 1995).

Sheridan et al (1999) no encontró ninguna relación pero utilizando el cociente entre IA/IM, observaron que los tumores con un valor alto presentaban una supervivencia significativamente mejor que los que tenían valores bajos (p<0.03).

También se ha estudiado el papel que los genes reguladores de la apoptosis tienen en la predicción del resultado clínico a la irradiación en cáncer de cérvix. Parece que la modificación en su expresión inducida por la irradiación tiene relevancia pronóstica (Tabla 6).

TABLA 6: Modificación de la apoptosis y la expresión de bax y bcl-2 durante Radioterapia.

	Nº Pacientes	Apoptosis	Bax	Bcl-2
Ohno (1998)	20	Aumenta	Aumenta	No se modifica
Kokawa (1999)	7	Aumenta	Aumenta	No se modifica
Harima (2000)	37		Aumenta	
Auki(2000)	30	Aumenta	Aumenta	
Wootipoom(2004)	174		Aumenta	No se modifica
Cerciello(2005)	40	Aumenta		
Adhya (2006)	30	Aumenta	Aumenta	No se modifica

Harima et al (2000) estudiaron la expresión de las proteínas BAX y BCL-2 tanto antes como durante el curso del tratamiento radioterápico con una dosis total de 10.8Gy, observando un aumento relativo en la expresión de BAX , pasando de un nivel de expresión en los tumores de 10.5% a un 15.8% durante el curso

del tratamiento. Sin embargo, no hubo correlación entre el aumento de la expresión de BCL-2 y la respuesta a la radioterapia. En el estudio de Yuki et al (2000)en pacientes con carcinoma de células escamosas estadío IIIb se estudió el porcentaje de células apoptóticas y la expresión de las proteínas que participan en el proceso después de la primera semana de irradiación y se observó que el IA era 0.8+/-0.9% antes de la irradiación y 1.7+/-1.3% al final de la primera semana de irradiación. Observaron que pacientes que sobrevivieron más de 5 años, tenía niveles de IA 2.1+/-1.3% al final de la primera semana de la terapia. Este porcentaje fue significativamente mayor que el de 1.1+/- 0.8% (p=0.02) de los pacientes que murieron a los 5 años. En 17 de los casos IA+, la expresión de BAX (P=0.006) al final de la primera semana era significativamente mayor que antes de la irradiación.

Estos resultados son similares a los obtenidos por Ohno et al (1998), el IA aumentó de 0.22% antes de la irradiación a 1.20% después de haber irradiado (p<0.004), y la tasa de BAX se incrementó de 15% a 60% (p<0.0126) además, se observó correlación entre la expresión de BAX y apoptosis.

En un estudio más reciente, se analizaron la expresión de BAX y BCL-2 en 174 pacientes con carcinoma de células escamosas, observándose un aumento en la expresión de BAX en el 68.4% de los casos, sin embargo, la expresión de BCL-2 era de un 25.9%, no aumentando con respecto a su nivel más bajo de expresión (20-68%) (Wootipoom et al 2004).

En el estudio realizado por Adhya et al en 30 pacientes con en carcinoma de células escamosas invasivo irradiados con 10Gy se observó un aumento significante del IA de 0.90% en el grupo pre-radioterapia a un 2.25% en el grupo post –radioterapia además, BAX aumentaba de forma significativa durante el tratamiento (P<0.05) mientras que no produjeron cambios significativos en la expresión de BCL-2 (Adhya et al 2006)

# 7.2.3.3 Genes reguladores de Apoptosis y Pronóstico.

Existe una tendencia a mayor progresión de la enfermedad en tumores con más apoptosis y viceversa (Staunton y Gaffney, 1995).

Sin embargo, la relación entre los genes reguladores de apoptosis y el pronóstico, es controvertida debido probablemente a que la apoptosis es un fenómeno ligado a múltiples aspectos de la biología tumoral, y dependiendo de

la influencia que cada uno de estos aspectos, tenga sobre la apoptosis en cada tumor, la interpretación de los resultados será diferente (Tabla 6).

Debido a que la mayoría de los carcinomas cervicales estan unidos a la infección por HPV, se podría asumir que la función de P53 se encuentra afectada en una proporción importante de cánceres cervicales. Sin embargo aunque se ha publicado que la sobreexpresión de P53 está asociada con peor pronóstico en cáncer de mama, carcinoma ovárico y carcinoma de cabeza y cuello (Lipponen 1993, Skirnisdottir 2002, Couture 2002) y en cáncer cervical (Huang et al 2001, Tjalma et al 2001, Jain et al 2003) hay muchos estudios en los que no se ha encontrado tal asociación (Rajkumar et al 1998, Pillai et al 1999, Dimitrakakis et al 2000).

En el estudio de Suzuki et al 2004 realizado en pacientes con adenocarcinoma cervical se muestra una correlación estadísticamente significante entre la sobreexpresión de P53 y una supervivencia libre de enfermedad desfavorable en pacientes tratados únicamente con radioterapia (P=0.019) (Suzuki et al 2004)

La evaluación de BAX en relación con el pronóstico en cáncer cervical ha sido valorada en pocos estudios; 3 no pudieron demostrar significancia pronóstica (Crawford 1998, Tjalma 2001, Harima 1998) y 2 mostraron lo contrario (Chung et al 2002, Wootipoom et al 2004).

En el estudio de Cheng et al 2002 el porcentaje de casos que expresaban Bax era mayor en los pacientes con supervivencia libre de enfermedad que en los pacientes con supervivencia global o que morían de la enfermedad (P<0.05). En el estudio de Wootipoom (2004) no solo se demuestra la relación entre la expresión de BAX y un mejor pronóstico de la enfermedad en el análisis multivariante sino que la coevaluación de BAX y BCL-2 aumenta la predicción pronóstica. La combinación BCL-2+/BAX+ fue significativamente asociada con una peor supervivencia libre de enfermedad al contrario que la asociación BCL-2-/BAX+; sin embargo ninguno de los marcadores o combinaciones de ambos estaba asociado con la supervivencia global.

La relación de BCL-2 con el pronóstico de la enfermedad es la más controvertida. Hay estudios que encuentran una relación entre la expresión de BCL-2 y peor supervivencia (Rajkumar et al 1998, Pillai et al 1999, wootipoom et al 2004) y otros que observan lo contrario (Dimistrakakis et al 2000, Tjalma

et al 2001). En el estudio de Dimistrakakis et al la expresión de BCL-2 aumentaba de forma directa con el grado de la lesión (P=0.02) mientras que esta observación no se observaba para p53.Sin embargo, aunque la expresión de BCL-2 se relaciona con un mejor pronóstico de la enfermedad no puede relacionarse con una mejor respuesta a la radioterapia porque los pacientes fueron tratados unicamente con cirugía. (Dimistrakakis et al 2000)

El rol exacto de la expresión de BCL-2 durante la progresión tumoral en carcinoma de cérvix continua siendo contradictorio. Algunos autores encontraron un aumento en la expresión de BCL-2 durante la progresión de CIN de bajo grado a cancinoma invasivo mientras que otros autores no observaron dicha asociación (Saegusa et al 1995, Dimitrakakis 2000, Cheung et al 2002). Los estudios de Harima et al, Chung et al y Jain et al no demuestran significancia pronóstica de la expresión de BCL-2 en carcinoma cervical.

TABLA 7: Relación de genes reguladores de apoptosis con supervivencia en carcinoma cervical.

	Nº Ptes	Estadío (Tto)	P53	BAX	BCL-2
Riou (1990)	93	lb-lla(Cx±RT)			
Oka (1993)	192	III (RT)	No		
Kainz (1995)	109	lb-IIb (Cx)	No		
Uehara(1995)	259	lb-lla (Cx)		No	No
Wu (1996)	48	I-IV			
Dellas (1997)	76	lb (Cx)	No		
AvallLundqvist(1997)	113	I-IV (Cx, RT)	Peor (AU)		
Nakano (1998)	64	(RT)	No		_
Rajkumar (1998)	40	IIb (RT)	No		Peor (AU)
Crawford (1998)	46	I-IV (Cx, RT)	Peor (AU)	No	Mejor (AU)
Harima (1998)	44	RT		No	No
Pillai (1999)	101	RT	No		Peor(AU)
Dimistrakakis (2000)	171	lb/lla (Cx)	No		Mejor(AU)
Oka (2000)					
Tjalma (2001)	111	Ia-Vb(Cx,RT)	Peor (AU)		Mejor(AM)
Huang (2001)	103	I-IV(CX,RT)	Peor (AU)		
Chung (2002)	43	I-IV(CX)		Mejor (AU)	
Jain (2003)	76	IIb-III(RT)	Peor (AU)		No
Wootipoom (2004)	174	lb-IVa(RT)	No	Mejor (AM)	Peor (AM)
Suzuki(2004)	53	I-la(RT)	Peor(AM)*		
Van de Putte (2005)	220	lb(CX)		No(AU)	No(AU)

AU: Análisis univariante.AM: Análisis multivariante.CX: Cirugía.RT: Radioterapia.\*Adenocarcinoma

También existe una relación entre la expresión de los distintos genes reguladores y la radiosensibilidad del tumor en carcinoma de cérvix. En los casos de tumores radioresistentes se observó un 15% de tumores que expresaban BCL-2 y p21 y 34% expresaban una P53 mutante. Ninguno de los tumores radiosensibles eran positivos para estas proteinas. Con respecto a la expresión de Bax los tumores radioresistentes eran negativos en un 81% frente a un 75% positivos en tumores radiosensibles. Estos datos sugieren que BAX junto con marcadores proliferativos podría jugar un rol importante en la determinación de la respuesta de los tumores al tratamiento radioterápico, mientras que BCL-2, p21 y P53 podrían además estar relacionados con la radioresistencia del tumor (Mukherjee et al 2001)

En el estudio de Van de Putte et al 2005 en el análisis univariante ninguno de los marcadores se asociaban con el pronostico de la enfermedad. En el análisis multivariante la invasión estromal profundad era el único marcador que estaba independientemente relacionado con la supervivencia.

# 7.2.2.3.1 Modificaciones inducidas por la radiación en los procesos de proliferación y apoptosis.

El cáncer aparece como consecuencia de alteraciones en el DNA que culminan en un desequilibrio entre los mecanismos que mantienen la homeostasis tisular proliferación/apoptosis. Estas alteraciones son el resultado de errores espontáneos en la duplicación del DNA, deficiencias en los procesos de reparación o más frecuentemente debido a causas externas como la radiación ionizante.

Una vez producido el daño la secuencia de eventos subsiguiente incluye: señalización de daño, transmisión de la información, expresión de genes reguladores de iniciación de procesos celulares de respuesta y desarrollo de los mismos (reparación del daño, detención del ciclo, mantenimiento de la integridad cromosómica) y muerte celular.

#### - Mecanismos de señalización

Una vez que el daño se ha producido, se inicia la acción concertada de dos tipos de familias denominadas Rad17-RFCs (rfc2-5) y 9-1-1 (Rad-1, Hus-1 and Rad-9) que homo- y heterotrimerizan respectivamente con PCNA, facilitando la acción de las polimerasas. Una tercera familia denominada complejo MRN (Mre-11-Rad50,NBS-1), parece ser imprescindible para la señalización del daño relacionada con la posterior reparación homóloga (HR) y no homóloga (NHEJ) durante el procesamiento inicial de la lesión. Este complejo es necesario para la activación posterior de ATM y de las rutas de señalización activadas por ella. Además, este complejo es a su vez activado por ATM, favoreciendo la fosforilación por ATM de otros substratos como Chk2 (Uriel et al 2003).

Hoy en día, parece evidente que otros genes incluidos dentro de la categoría de transductores, podrían tener un efecto directo en la señalización del daño. Así, la heterorimerización de Ku70 y Ku80 permitirían formar una especie de canasta, que sostuviera los extremos rotos del DNA, sobre la que sería reclutada DNA-PKc que estabilizaría el conjunto e iniciaría la cascada de señalización de la reparación basada en Non-homologous end joining (NHEJ) (Walter et al 2001). BRCA-1/p53BP1 podrían actuar como sensores que favorecerían la fosforilación de ATM y ATR, actores principales de la cadena de transducción de señales hasta los genes efectores, incluida la reparación homóloga (HR). BRCA-1 junto con la expresión de otros sensores y proteínas relacionadas con check-points y reparación del daño, formarían el denominado BASC (BRCA-1 associated genome surveillance complex).

#### - Transducción de señales

ATM, ATR (ATM-rad3-related) y DNAPKC, pertenecen a la familia de las serina/treonina quinasas. La falta de ATM conlleva una exquisita sensibilidad a la radiación ionizante, defectos en los chekpoints celulares e inestabilidad cromosómica. Los defectos en ATR están relacionados con radiosensibilidad, pero también con incrementos de la sensibilidad a la radiación ultravioleta, por lo que parecen tener activaciones y respuestas celulares diferenciadas a través de la activación de diferentes substratos (Brown and Baltimore et al 2003). ATM tiene además una función relevante en el control de los check-points celulares,

impidiendo la progresión de células dañadas y manteniendo la homeostasis celular.

#### - Mecanismos efectores y proliferación

# Check-point G1

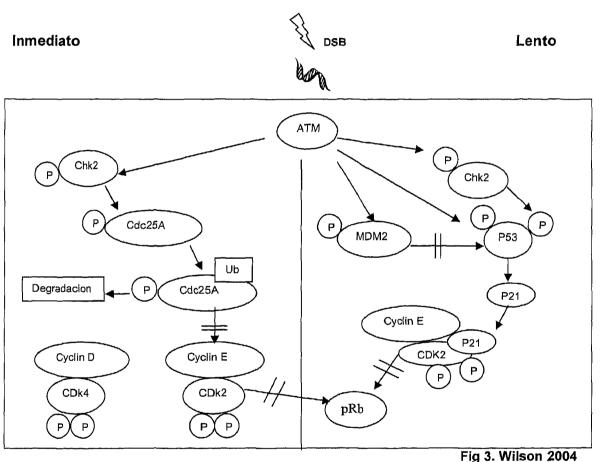
Una vez se ha producido un daño en el DNA, la detención en G1 genera tiempo para que la lesión pueda ser reparada, antes de entrar en la fase de síntesis. Esta decisión se lleva a cabo a través de la actividad transcripcional coordinada por el gen del retinoblastoma (Rb) y c-myc. La fosforilación de Rb por parte del complejo ciclinaD/CDK4, permite la liberación del factor transcripcional E2F y la progresión celular; y de una forma más tardía, la activación mediada por c-myc de ciclina E y la posterior activación de cdk2 es un prerrequisito para la iniciación de la replicación del DNA. La progresión a partir de G1 puede bloquearse previniendo la fosforilación de Rb y por interferencias en la actividad de la ciclina E-CDK2. (Bartek and Lukas 2001).

En los últimos años se consideró que P53 era una proteína central en el checkpoint G1 en respuesta a la radiación ionizante sin embargo, investigaciones recientes han sugerido la presencia de dos rutas diferentes aunque con regulación inicial similar:

- El arresto inmediato, p53-independiente: se produce mediante la activación por ATM de Chk2, que inactiva a cdc25A. Esta situación, bloquea la fosforilación de CDK2 en el residuo tirosina 15, que es imprescindible para su unión a ciclina E, que a su vez es imprescindible para finalizar la fase G1 e iniciar la fase de síntesis.
- El arresto lento, p53-dependiente: es más duradero, mantiene el arresto inicial, pudiendo ser irreversible y permitiendo el inicio de los procesos de reparación. Este hecho viene dado, por el tiempo que es necesario para que se hagan evidentes todas los mecanismos efectores regulados por p53 y que requieren la unión a secuencias DNA específicas y la transcripción de factores inhibidores de ciclo, reparadores o inductores de apoptosis (Ryan et al 2001). Así, ATM induce la estabilización y por tanto el incremento de la actividad de p53, de al menos tres formas:

- 1) Mediante fosforilación directa, de p53 en el residuo serina 15, estabilizando la proteína e impidiendo su translocación nuclear.
- 2) fosforilando Mdm2 e impidiendo así la degradación de p53.
- 3) fosforilación inducida por Chk2 del residuo serina 20 de p53, que impide la unión de mdm2 a p53, reduciendo su degradación.

El resultado de estas acciones es el incremento de la activación transcripcional de p21 (Waf1/Cip1), un inhibidor de las CDKs, en este caso bloqueando el complejo CDK2/ciclìna E y CDK4/ciclina D, manteniendo por tanto a Rb hipofosforilada e impidiendo la liberación de E2F.



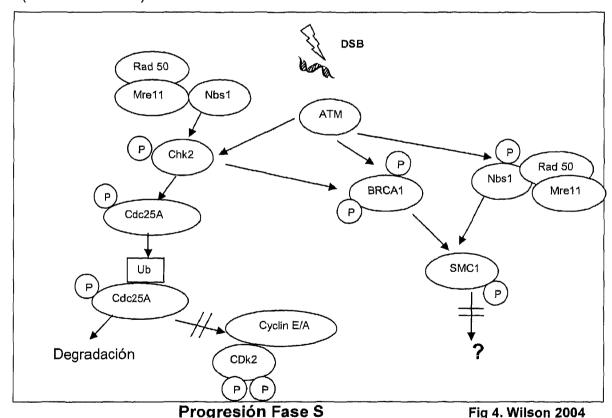
i ig 3. Wilson 200

Transición Fase G1/S

#### Check-point S

ATM es también, el principal iniciador de la cascada de eventos que se producen en esta ruta. Si bien en células normales se observa una disminución de la síntesis de DNA durante la irradiación de las células en fase S, en células deficientes en ATM, este hecho no se produce, objetivándose la Síntesis Radioresistente de DNA (RDS). Queda patente por tanto, el papel central de

ATM en el correcto funcionamiento del check-point de fase S. Por un lado, se pone en marcha la ruta de señalización de arresto rápido, ya descrita en G1, que conlleva la activación de Chk2 por ATM y la subsiguiente inactivación de cdc25A, por lo que CDK2 permanece inhibida y no puede formarse el complejo CDK2/ciclina E ni el complejo CDK2/ciclina A, imprescindibles para la progresión durante la fase S (Falck et al 2001).Por otro lado, existe otra vía, que mediante fosforilación mediada por ATM de Nbs-1 como parte del complejo MRN y de BRCA-1, induce la activación mediante fosforilación de proteínas SMC (structural maintenance of chromosomas), necesarias para la cohesión de las cromátidas. Parece existir un mecanismo de seguridad, que permite el cruzamiento de ambas vías ya que Nbs-1, como parte del complejo MRN, puede fosforilar directamente a Chk-2 iniciando el arresto de fase S vía cdc25A. Por otra parte Chk2 puede fosforilar BRCA-1 iniciando la vía ATM/SMC-1 (Yazdi et al 2002).



# Check-point G2/M

La entrada de las células dañadas en G2 supondría la permanencia de poblaciones genéticamente anómalas en el tejido, debido a la segregación aberrante de cromosomas durante la fase M. Resulta por tanto de gran importancia para la célula, asegurarse que las células hijas reciben copias adecuadas del material genético. Las ruta de señalización y efectoras de este check-point son muy complejas, de forma que parece que se ha puesto en marcha, un último sistema de control lo mas completo posible.

BRCA-1 parece tener un importante papel en este check-point, bien siendo imprescindible para la activación por ATM/ATR de Chk2/Chk1 respectivamente, bien fosforilando directamente a Chk1.

Dos vías principales y algunas accesorias, estarían involucradas en la regulación de este check-point (Xu et al 2002). Así, parecen existir dos diferentes check-points desde el punto de vista molecular, en esta transición G2/M. Este hecho tiene que ver con el momento en que se produce el daño en las células que se encuentran en fase G2. Así, el mecanismo de arresto en G2 de las células dañadas durante la fase S, será ATM independiente, dosis dependiente y representaría un check-point "tardío", mientras que el arresto en G2 de las células dañadas en esa fase es ATM-dependiente, dosis independiente y representaría un chekpoint "temprano".

Así ATR fosforila Chk1 que bloquea cdc25C impidiendo la acción activadora de cdc25C sobre CDK1, y por tanto impidiendo la formación del complejo CDK1/ciclinaB. A su vez cdc25C es secuestrada en el citoplasma por 14-3-3, inactivada por Plk3 (un regulador negativo, similar a Chk1-2, y activada por ATM) y dejada de activar por el bloqueo inducido por ATM/ATR sobre su activador Plk1. Pero CDK1 tiene otros sitios regulados negativamente por Wee1/Mik1 y Mit1, que a su vez son defosforilados por cdc25C. Si esta se encuentra inactiva, como es el caso que nos ocupa, esa regulación negativa persistirá, entonces CDK1 seguirá inactiva y no se formará el complejo CDK1/ciclinaB.

Por otra parte, ATM activaría sus rutas ya conocidas de "arresto rápido" (ATM/Chk2/cdc25C/inhibición CDK1/inhibición complejo CDK1/ciclina B) y la

ruta de "arresto lento" en el que los otros genes efectores de p53 a parte de p21 (14-3-3 y GADD45) parecen inhibir también CDK1 ((ATM/p53/(p21-14-3-3-GADD45)/inhibición CDK1/ inhibición complejo CDK1/ciclina B)). Esta última ruta significaría la salvaguarda del control del check-point en G2 independiente de cdc25C.

Pero además existe una tercera vía de inhibición que tiene como diana a la propia ciclina B que queda secuestrada en el citoplasma durante S y G2, impidiendo la formación de complejos activos CDK1/ciclinaB.

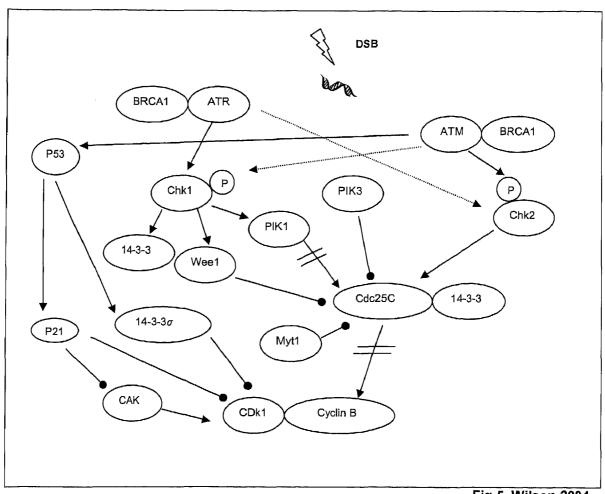


Fig 5. Wilson 2004

Transición fase G2/M

# - Mecanismos efectores y reparación del DNA

La reparación del daño inducido en el DNA por la radiación incluye alteraciones en las bases, roturas simples o dobles de cadena (dsb), sitios locales de daño múltiple, entrecruzamientos intra e intercatenario de DNA o DNA-proteinas, etc.

Existen complejos sensores del daño en el DNA, entre los que p53 podría coimnuoprecipitar incluidos el complejo DNA-PKc/KU70/80, BRCA1 etc. Los efectores implicados en las rutas de reparación variarán según el tipo de lesión a reparar. Así, p53 parece estar implicado a través de interacciones con genes de XP, DNA-polimerasa delta o MSH2 en los procesos de reparación por excisión de nucleótidos (NER), reparación por excisión de bases (BER) y reparación inadecuada (Mismatch repair MMR). Por otra parte p53 está involucrado en la reparación de las roturas dobles de cadena mediante reparación homóloga (HR) y no homóloga (NHEJ). Estos, son los principales mecanismos por los que las dsb pueden ser reparadas. En ambos casos, el complejo MRN (Mre-11-Rad50, NBS-1), podría estar relacionado, siendo el complejo DNA-PKc/KU70/80, el mas relevante para NHEJ, cuyos efectores serían XRCC4 y ligasa IV, y BRCA1, Rad51, 52,XRCC2 y ligasa I los mas relevantes para HR.

Por tanto, P53 podría tener un papel en la reparación de dsb, mediado por su diana p53R2, por su capacidad de unirse directamente al DNA dañado, promoviendo la alineación de cadenas simples de ácidos nucleicos, o a través de sus interacciones con RAD51 y BRCA1, así como con DNAPKc. Además el dominio carboxiterminal de p53, tiene actividad exonucleasa por si mismo, demostrando un papel en la re-unión de dsb. Quizás, sin embargo, el mayor papel que p53 tenga en la reparación del DNA, incluya su capacidad de disminuir la velocidad de progresión celular durante el ciclo, permitiendo el arresto celular duradero y la adecuada reparación del daño. Este efecto, parece estar influido directamente por BRCA-1, que estabiliza p53 favoreciendo estos fenómenos, mediados no solo por p21 sino también por XP y otros genes.

# - Mecanismos efectores y apoptosis

El daño al DNA, especialmente dsb, que no ha sido reparado o está mal reparado lleva a la muerte celular por apoptosis. De tal forma, que el daño en el DNA, lleva a la acumulación y activación de p53, que induce una detención el ciclo celular que puede llevar a la reparación, y/o si esta no es posible, llevará a apoptosis. Hay una importante relación entre el nivel de p53 en diversos tejidos y la apoptosis inducida por radiación en los mismos.

La apoptosis o muerte celular programada, representa el hecho final de una compleja ruta de señalización que activa unas proteasas, denominadas caspasas, que generan alteraciones celulares que llevan a la muerte de la célula. Se distinguen 2 grandes grupos de caspasas (cistein proteinasas que requieren substratos con residuos aspartato): caspasas iniciadoras (2, 8, 9,10 y 12) que actúan como transductores de la señal apoptótica inducida por los genes reguladores, ya que su activación autoproteolítica desencadena a la activación subsecuente de las caspasas efectoras (3,6 y 7), que interactúan con una gran variedad de substratos, llevando a la apoptosis. El bloqueo de todas las caspasas, no evita por tanto la muerte celular, sino solo aquella en forma de apoptosis, así que la célula podría cambiar el fenotipo de muerte hacia la necrosis.

#### Rutas de apoptosis mitocondrial

Clásicamente, la apoptosis mediada por P53 en respuesta al daño celular inducido por radiaciones ionizantes, esta mediada por la activación transcripcional de genes proapoptóticos de la familia BCL-2 que incluyen Bax, Bak, Noxa, y Puma. Estos genes, inducen el daño mitocondrial, mediante la rotura del potencial de su membrana con la liberación posterior de Citocromo C. Este, junto con Apaf-1 y ATP activan proteolíticamente a la caspasa 9, que activa de la misma forma a otras caspasas efectoras (3, 6, 7,8) responsables de la muerte celular. Sin embargo, este proceso esta estrechamente balanceado por la existencia de genes antiapoptóticos como BCL-2 o Bcl-xl, que pueden heterodimerizar con Bax u otros genes similares como Bcl-xs. El predominio de unos u otros establecerá la proclividad celular o no a sufrir apoptosis (Voudsen and Lu 2002, Belka and Budach 2002)

### • Rutas de apoptosis mediadas por receptores

Existen dos tipos de receptores que unidos a sus ligandos inducen la apoptosis celular: el receptor CD95/Fas/Apo y su ligando (CD95/Fas/Apo1L) y el receptor de TNF-R1 y su ligando (Tumor necrosis factor related apoptotic inducting ligando, TRAIL/Apo2).

Esta unión receptor-ligando, lleva al reclutamiento de FADD que actúa como adaptador, que facilita que caspasa 8 se active proteolíticamente, activando a su vez caspasas efectoras (caspasa 3). Adicionalmente, caspasa 8 puede activar Bid, una proteína pro-apoptótica que desencadena la liberación de citocromo C de la mitocondria al citoplasma, activando la ruta de caspasa 9 y consecuentemente caspasas efectoras (caspasa 3) generalizando un modelo de auto activación (Belka et al 2000)

# Rutas de apoptosis mediadas por daño en la membrana

La interacción de la radiación ionizante con la membrana celular induce la hidrólisis rápida de esfingomielina a ceramida (Haimovitz-Friedman et al 1994). Una vez formada la ceramida interacciona con una variedad de dianas intracelulares, incluyendo quinasas, fosfatasas, y proteasas, permitiendo la activación de la ruta SAPK/JNK (protein kinasa activada por estrés). Las fosfatasas PP2A y PP1 son activadas por ceramida y BCL-2 desfosforilato (Dobrowsky et al 1993, Wolff et al 1994) AKT/ protein quinasa B, proteína RB, C-Jun y proteínas con dominio nuclear rico en arginina/serina. La ceramida recluta PP2A a través de su subunidad B reguladora en la mitocondria donde se activa la BCL-2 fosfatasa que inactiva BCL-2 (Ruvolo et al 2002). La proteasa catepsina D está activada por ceramida y participa en la activación de caspasa 3 después de la translocación desde los lisosomas (De Stefanis et al 2002)(Modrak et al 2006).

Fig 6.Pinar B 2006

# 8. TOXICIDAD DEL TEJIDO SANO SECUNDARIO AL TRATAMIENTO CON RADIOTERAPIA EN CÁNCER DE CÉRVIX

#### 8.1 INTRODUCCION

El control tumoral secundario a los tratamientos con radioterapia está determinado, entre otros factores, por la dosis máxima que pueda ser administrada con un riesgo aceptable de toxicidad en el tejido sano.

De todos los pacientes tratados con intención radical, sólo algunos van a presentar reacciones agudas y tardías severas, este hecho condiciona la dosis de radioterapia a administrar ya que la dosis total va a estar limitada por la tolerancia de estos pacientes más radiosensibles. (Hellman et al 1985, Horwich et al 1990, Withers et al 1992). La posibilidad de determinar de antemano la radiosensibilidad del paciente, permitiría mejorar la calidad de un tratamiento radioterápico (Bentzen et al 1998, Mackay et al 1999). Para ello se han desarrollado ensayos predictivos que nos permitirían identificar aquellos pacientes más radiosensibles y de este modo podríamos reducir los efectos tanto agudos como tardíos en el tejido sano.

Los estudios demuestran que el 90% de la variación de la radiosensibilidad puede explicarse por factores intrínsecos en el paciente, mientras que los otros factores explicarían solo un 10% de esta variación (Safwat et al 2002).

Existe una variabilidad individual en la respuesta al tratamiento radioterápico, de tal forma, que incluso después de un tratamiento estandarizado en pacientes con factores de riesgo equiparables, los pacientes pueden presentar una gran variabilidad en la toxicidad del tejido sano.

La existencia de una diferencia individual en la respuesta a la radiación en la piel humana fue documentada por Tucker et al (1992,1996), Turesson (1989,1990, 1996) y Bentzen (1998). En sus trabajos demuestran que los pacientes con similares factores de riesgo, presentan distinto nivel de toxicidad tanto aguda como crónica y que son las diferencias intrínsecas de cada paciente, las responsables de la variación que se observa en la aparición de dichas toxicidades.

# 8.2 DEFINICIÓN DE TOXICIDAD, TOXICIDAD AGUDA Y CRÓNICA

Se define la toxicidad como cualquier cambio temporal o permanente en los tejidos normales y/o los síntomas derivados del tratamiento del cáncer (Trotti et al 2000).

Según los criterios de la RTOG y del NCI, publicados en la guía CTC (Common Toxicity Criteria), se considera toxicidad aguda a todas aquellas alteraciones ocurridas durante el tratamiento y antes de los 90 días de finalizado el mismo (Cox et al 1995) sin embargo, se considera efectos crónicos o tardíos a los que aparecen tras meses o años a partir de los 90 días del tratamiento.

Los efectos agudos de la radiación se manifiestan principalmente en los tejidos de renovación como piel, recto, mucosa de la vejiga y de la vagina. Estos tejidos proliferan rápidamente y dado que su respuesta viene determinada por el equilibrio entre las células que nacen y las que mueren, las reacciones agudas están influenciadas por el tiempo de repoblación del tejido y, por tanto, dependen entre otros factores de la duración del tratamiento. Los efectos crónicos (necrosis, fibrosis, daño específico de un órgano) son los que suponen un factor limitante de la dosis en radioterapia ya que dependen mucho más de la dosis total de radiación y del fraccionamiento de la misma (De vita et al 2000).

Durante el tratamiento con radioterapia de la pelvis las pacientes con carcinoma de cérvix pueden presentar daño en los siguientes órganos:

- 1.-Recto: Las manifestaciones clínicas están en relación con la porción anterior de la pared rectal, que es la más afectada. Así, en los casos de toxicidad de predominio mucoso, la manifestación clínica será la presencia de heces hematoquécicas como consecuencia del desarrollo de una mucosa rectal extremadamente friable y con telangiectasias. Por otro lado, en los casos en los que predomina la fibrosis de la pared rectal, la manifestación más frecuente será la urgencia rectal por disfunción del esfínter ano-rectal(Montero et al 2005).
- 2.-Vejiga: Pueden observarse un amplio espectro de complicaciones, tanto sobre el epitelio de la mucosa como sobre el estroma subyacente. Se desarrolla una fibrosis intersticial que se acompaña de endarteritis y

telangiectasias. Los vasos de la submucosa aparecen dilatados y tortuosos y en ocasiones aparecen roturas en la pared de los mismos que condiciona la presencia de hematuria. Si el daño infligido es grande o la viabilidad de los tejidos está comprometida, pueden producirse ulceraciones o fístulas, que en ocasiones son indistinguibles de una recidiva tumoral. Cuando la necrosis se hace más extensa, se produce la colonización por gérmenes que agravan el cuadro. La presencia prolongada y mantenida de fibrosis e infecciones en la vejiga puede ocasionar reflujo vesicoureteral y pielonefritis con daño renal secundario (Pearse et al 1994)

- 3.- Vulva y Vagina: La irradiación de la vulva y vagina puede provocar, a largo plazo y como consecuencia de la fibrosis radioinducida del tejido subcutáneo, la aparición de cuadros de atrofia, sequedad o prurito así como la formación de sinequias ocasionando dispareunia. En ocasiones se ha descrito la aparición de fístulas recto-vaginales o vésico-vaginales tras braquiterapia (Montero et al 2005)
- 4.-Intestino: Después de la irradiación abdómino-pélvica, se aprecian síntomas o signos de disfunción crónica intestinal en el 60-90% de los pacientes, lo que sugiere que la enteropatía crónica intestinal es casi inevitable tras la radioterapia (Yeoh et al 1993)

La patogenia de la enteritis crónica es compleja, y comprende cambios en la mayoría de estructuras que forman la pared intestinal: atrofia mucosa, fibrosis intestinal o esclerosis vascular que origina cuadros de malabsorción y trastornos en la normal motilidad intestinal (Husebye et al 1994)

En el estudio de Hsu et al (2004) se analizó la toxicidad en 90 pacientes con cáncer cervical invasivo tratados con radioterapia después de histerectomía observándose una buena tolerancia al tratamiento sin toxicidades agudas significantes. Se observó toxicidad tardía en un 15.5% y complicaciones menores como proctitis, cistitis o enteritis en un 14.4% de los pacientes. Seis pacientes desarrollaron proctitis por radiación, 4 obstrucción intestinal y 3 cistitis hemorrágica. Complicaciones mayores como toxicidades gastrointestinales o urinarias que requerían intervención quirúrgica solo fue

observada en 1 paciente. Las pacientes sufrieron estenosis del íleón terminal con obstrucción intestinal severa después de dos años tras la terapia.

# 8.3 ESCALAS DE VALORACIÓN DE LA TOXICIDAD. SISTEMA LENT/SOMA EN CARCINOMA DE CERVIX

En carcinoma de cérvix las complicaciones tardías radioinducidas en recto y vejiga son los factores limitantes de la dosis primaria para este tipo de tumores. A pesar de la mejora en el conocimiento de los esquemas de fraccionamiento, todavía no conocemos con exactitud la tolerancia que va a presentar el tejido normal al tratamiento radioterápico.

Durante años se han desarrollado varios sistemas estandarizados para medir la toxicidad en el tejido sano. En 1982 la NCI (Nacional cancer institute) desarrolló los CTC (escala common toxicity criteria) como criterios de valoración de la toxicidad de los tratamientos con quimioterapia, para su utilización en los ensayos clínicos.

En 1983 se publicaron los criterios de la toxicidad de la radioterapia elaborados por la RTOG (Radiation Therapy Oncology Group) y la EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer) que diferencian entre toxicidad aguda y toxicidad crónica y son los más utilizados en la práctica clínica en Oncología Radioterápica. No toxicidad se considera grado 0 y la muerte del paciente directamente relacionada con la toxicidad se considera grado 5. En 1995, en la conferencia de consenso de efectos tardíos en tejidos normales se introdujo una nueva escala de toxicidad tardía, desarrollada también por la RTOG y la EORTC denominada SOMA/LENT (Subjetive, Objetive, Management and Analytic/ The Late Effects on Normal Tisues). El objetivo principal de esta nueva escala, era conseguir un sistema de clasificación de la toxicidad tardía de los órganos vitales, como resultado del tratamiento multidisciplinario del cáncer, es decir considerando la toxicidad producida por radioterapia, quimioterapia y cirugía. Para su correcta utilización es imprescindible disponer de la puntuación basal (antes del tratamiento).

En esta escala se valora para cada órgano incluido en el campo de irradiación, 4 aspectos:

- 1.-Subjetivo : descripción de síntomas como por ejemplo dolor
- 2.- Objetivo : signos tales como edema o pérdida de peso que pueden detectarse en la exploración física,
- 3.- Manejo: posibilidad de tratamiento y de reversibilidad de la toxicidad, y
- 4.- Analítica: test especiales de laboratorio o técnicas de imagen (TAC, RMN) y procedimientos cuantificables.

Dependiendo de la severidad de la toxicidad, hay 4 grados para cada apartado:

- Grado 1: síntomas menores que no requieren tratamiento.
- Grado 2: síntomas moderados que precisan tratamiento conservador.
- Grado 3: síntomas severos que tienen un impacto significativo negativo en la actividad diaria y que requieren tratamiento agresivo.
- Grado 4: daño funcional irreversible que precisa una intervención mayor terapéutica.
- Grado 5: muerte del paciente o pérdida del órgano directamente relacionada con la toxicidad.

Tabla 8. LENT SOMA.Radiotherapy and Oncology 35 (1995) 17-60

Toxicidad vaginal	Grado I	Grado II	Grado III	Grado IV
Subjetivo:				
-Dispareunia	Ocasional y min	Interm y tolerable	Persist e intensa	Refractaria
- Sequedad	Ocasional	Intermitente	Persistente	Refractaria
-Sangrado	Ocasional	Intermitente	Persistente	Refractaria
- Dolor	Ocasional y min	Interm y tolerable	Persist e intensa	Refractaria
Objetivo:				
- Estenosisl /long	>2/3 de normal	1/3-2/3	<1/3	Cleisis total
- Sequedad	Asintomática	Sintomática	Disfunción 2arla	Fistula
- Ulcerac/necrosis	Superficial <1cm <sup>2</sup>	Superficial <1cm <sup>2</sup>	Ulcera profunda	
- Atrofia	Parcheada	Confluyente	No confluyente	Difusa
- Aspecto	Telang sin sangrado	Telang con sangrado		]
		masivo		
- Sinequia		Parcial	Completa	
- Sangrado		Al contacto	Intermitente	Persistente
Manejo:				
- Dispareunia/Dolor	No narcoticos	No narcoticos	Narcoticos	Cirugía
- Atrofia	ocasional	regularmente	Regularmente	
	Crema hormonal	Crema hormonal	Crema hormonal	
-Sangrado	ocasional	intermitente	Persistente	
	Tto hierro	Transfusión	Transfusión	Cirugía
- Estenosis		ocasional	Frecuente	
-Sequedad	Dilatación ocasional	Dilat intermitente	Dilat persistente	Reconstruc
- Ulceración	THS	Lubric artificial		quirurgica
	Conservador	Desbridamiento	НВО2	Reparac
				inferto

Grado de adelgazamiento de pared, senos y formación de fístulas
Grado de adelgazamiento de pared, senos y formación de fístulas
Diametro de pared, longitud y superficie mucosa

Toxicidad intestinal	Grado I	Grado II	Grado III	Grado IV
Subjetivo:				
-Frecuencia	2-4/dia	5-8/dia	>8/dia	Diarrea
deposición				Refractaria
- Consistencia	Pastosas	Liquidas	Moco, acuosas,	
deposición			Oscuras	
-Dolor	Ocasional y min	Intem y tolerable	Persist e intensa	Refractario
-Estreñimiento	3-4/semana	Solo 2/semana	Solo 1/semana	10dias sin
				deposición
Objetivo:				
- Melena	Oculta/Ocasional	Intermit/tolerable	Persistente,10-	Refractaria o
		Hb normal	20% dismin Hb	Sangre
				franca
- Pérdida de peso desde tto	5-10%	10-20%	20-30%	>20% dismin
- Estenosis	>2/3 diametro	1/3-2/3	<1/3	Нь
	normal con			>30%
	dilatación			Obstrucción
				Completa
- Ulceración	Superficial<1cm	Superficial>1cm	Ulcera profunda	
				Perforac,
				fistula
Manejo:				
- Dolor	No narcoticos	No narcoticos	Narcoticos	Cirugía
	ocasional	regularmente	Regularmente	
- Consistencia/frec heces	Dieta modificada	Antidiarreicos no	Antidiarrelcos no	
		narcoticos	Narcoticos	
		regularmente	Continuos	ļ
- Sangrado	Tto hierro	Transfusión	Transfusión	
		ocasional	Frecuente	Cirugia
-Estenosis	Ocasional	Adaptación dieta	Intervención	
	adaptación dieta		Médica, SNG	Cirugía
-Ulceración		1	Intervención	Cirugía
			Médica	

Analítico:	
- CT	Grado de adelgazamiento de pared, senos y formación de fístulas
- RMN	Grado de adelgazamiento de pared, senos y formación de fístulas
- Estudio absorción	Absorción de proteinas y grasa, balance metabólico
-Transito bario	Luz y peristaltismo

Toxicidad rectal	Grado I	Grado II	Grado III	Grado IV	
Subjetivo:					
-Tenesmo	Urgencia ocasional	Urgencia	Urgencia	Refractario	
		intermitente	Persistente		
- Perdida mucosa	Ocasional	Intermitente	Persistente	Refractaria	
- Control esfinter	Ocasional	intermitente	Persistente	Refractario	
- Frecuencia deposiciones	2-4/dia	4-8/dia	>8/dia	Diarrea	
				incontrolable	
-Dolor	Ocasional y mínimo	Intermitente y	Persist e intenso	Refractario y	
		tolerable		Excruciante	
Objetivo:					
- Sangrado	Oculto	Ocasional,	Persistente,	Rectorragia	
		>2/sem	Diaria	Masiva	
		2,00,11		Perforac, fistula	
- Ulceración	Superficial<1cm	Superficial>1cm	Uicera profunda	Obstrucción	
- Estenosis	>2/3 diametro	1/3-2/3	<1/3	Completa	
- Lateriosis	normal con	170-270	1110	) oomplote	
	dilatación				
	dilatación				
		)			
Manejo:					
-Tenesmo/	Ocasional,<2	Regular,>2	Múltiple,>2	Cirugía/colosto	
frecuencia heces	Antidiarreicos/	Antidiarreicos/	Antidiarreicos/	mia	
	Semana	Semana	Dia	Permanente	
-Dolor	No narcoticos	No narcoticos	Narcoticos		
	Ocasional	Regularmente	Regularmente	Cirugía/colosto	
-Sangrado	Laxantes,tto	Transfusión	Transfusión	mia	
	Hierro	ocasional	Frecuente	Permanente	
-Ulceración	Modif dieta,laxantes	Corticoides	Enema de esteroides,		
		ocasional	O2 hiperbarico		
-Estenosis	Modif dieta	Dilatación	Dilatación	Cirugía/colosto	
		ocasional	Regularmente	mia	
-Control esfinter	Uso ocasional	Uso intermitente	Uso persistente	Permanente	
	pañales	pañales	Pañales	Cirugía/colosto	
				mia	
				Permanente	
				Cirugía/colosto	
				mia	
				Permanente	
Analítico:					
- Enema opaco	Luz y peristaltismo				
- Rectoscopia	Luz y superficie mucosa				
- CT	Grado de adelgazamiento de pared, senos y formación de fístulas				
-RMN	Grado de adelgazamie	ento de pared, senos y	/ formación de fístulas		
- Manometría anal	Estudio de funcionalid	ad rectal			
- Ecografía	Grado de adelgazamie	ento de pared, senos y	/ formación de fístulas		

Toxicidad vesical/uretral	Grado I	Grado II	Grado III	Grado IV		
Subjetivo:						
-Disuria	Oasional y mínima	Intermitente y	Persistente e intensa	Refractaria y		
		tolerable		excruciante		
- Frecuencia	Cada 3-4h	Cada 2-3h	Cada 1-2h	Horaria		
- Hematuria	Ocasional	intermitente	Persistente	Refractaria		
- Incontinencia	<episodio< td=""><td><episodio< td=""><td>&lt;2 compresas/dia</td><td>Refractaria</td></episodio<></td></episodio<>	<episodio< td=""><td>&lt;2 compresas/dia</td><td>Refractaria</td></episodio<>	<2 compresas/dia	Refractaria		
	semanal	diario				
-Disminución del chorro	Ocasionalmente	Intermitente	Persistente pero	Obstrucción		
	débil		obstruce incompl	Completa		
Objetivo:						
- Hematuria	Microscópica,Hb N	Macroscópica	Macroscópica	Refractaria		
		Intermit,<10-20%	Persist,10-20%	>20%		
		Hb disminuida	Hb disminuida	Hb disminuida		
-Endoscopia	Atrofia parcheada	Atrofia conflu o	Ulceración de			
	o telangiectasias	Telangiectasias	Mucosa	Perforación,		
	sin sangrado	Con sangrado		fistula		
		masivo				
-Volumen máximo	>300-400cc	200-300cc	100-200cc			
- Volumen residual	25cc	25-100cc	>100cc			
Manejo:						
- Disuria	No narcoticos	No narcoticos	Narcoticos	Cirugía		
	Ocasional	Regularmente	Regularmente			
- Frecuencia	Alcalinación	Espasmoliticos	Narcoticos	Cistectomía		
		Ocasional	Regularmente			
- Hematuria/	Tto hierro	Transfusión	Transfusión	Cirugía		
telangiectasias		Ocasional o	Frecuente o			
		Cauterización	Coagulación			
- Incontinencia	Uso ocasional	Uso intermitente	Uso persistente	Sondaje		
	pañales	Pañales	Pañales	Permanente		
- Disminución		Autosondaje	Dilatación, >1	Cirugia/sondaj		
del chorro		diario	Autosondaje/dia	е		
				permanente		
Analítico:						
-Cistoscopia	Superficie mucosa					
- Análisis volumétrico	Capacidad vesical en o	c				
-Rx contraste	Ulceras, capacidad y contractilidad					
-IXX CONTRASTE	Ulceras, capacidad y c	onadanada	Grado de adelgazamiento de pared, senos y formación de fístulas			
- Ecografía			formación de fístulas			
	Grado de adelgazamie					

Toxicidad sexual	Grado I	Grado II	Grado III	Grado IV
Subjetivo:				
-Dispareunia	Ocasional	Intermitente		Refractaria
- Sequedad	Ocasional	Intermitente		Refractaria
-Deseo	Ocasional	Intermitente		Nunca
-Satisfacción	Ocasional	Intermitente		Nunca
Objetivo:				
- Estenosis vaginal /long	>2/3 de normal	1/3-2/3	<1/3	Cleisis Total
- Sinequias			Parcial	Completa
- Frecuencia			Raro	Nunca
- Orgasmo	Ocasional	Menor intermitente	Muy ocasional	Nunca
Manejo:				
- Sequedad	THS	Lubricación artif		
- Estenosis	Dilatación	Dilat intermitente	Dilat persistente	Reconstrucc
- Sinequia	Ocasional			Quirúrgica
-Dispaurenia	Crema hormonal	Crema hormonal	Crema hormonal	
	ocasional	intermitente	Persistente	

Analítico:	
- Psicosocial	Evaluación calidad de vida/satisfacción sexual
- Medida vaginal	Evaluación grado de estenosis vaginal

En 1997, el NCI amplia el CTC con la intención de integrar agentes sistémicos, radiación y criterios quirúrgicos dentro de este sistema. Representantes de la RTOG participaron en este proceso en un esfuerzo de mejorar los criterios relacionados con la toxicidad aguda y conseguir una mejor claridad y consistencia entre las modalidades. CTC versión 2.0 reemplaza a la NCI CTC y la RTOG incluyendo más de 260 efectos adversos individuales siendo más de 100 de ellos aplicables a efectos agudos de la radiación (Trotti et al 2000). Posteriormente, en diciembre de 2003 se publicó la CTCAE ( Commom Terminology Criteria for Adverse Events versión 3.0), su objetivo era clasificar los efectos adversos en 5 grados: grado 1 efecto adverso leve, grado 2 efecto adverso moderado, grado 3 efecto adverso severo, grado 4 efecto adverso que

compromete la vida y grado 5 muerte relacionada con el efecto adverso. La versión 3.0 intenta englobar la toxicidad producida por la cirugía, quimioterapia y radioterapia (Trotti et al 2003)

En un estudio realizado por Anack et al en donde se correlaciona las escalas de toxicidad tardía RTOG/EORTC con la escala SOMA/LENT respecto a irradiación pélvica en 116 pacientes con cáncer ginecológicos (64 casos con cáncer de cérvix uterino y 52 casos con cáncer de endometrio) se observó una buena correlación para recto (p<0.01) y vejiga (p<0.01) en las dos escalas; sin embargo, ciertas toxicidades estaban mejor analizadas en SOMA/LENT que en la RTOG/EORT como el sangrado rectal o la frecuencia urinaria (Anack et al 2001)

En cáncer de cérvix el Glosario Franco-Italiano y el sistema AADK (Aarhus, Denmark) han mostrado ser útiles en el estudio de la latencia y progresión del daño. En el estudio de Davidson et al (2003) donde se compararon los sistemas de medida de toxicidad LENT/SOMA y Franco Italiano en pacientes con carcinoma de cérvix se pudo observar que la medida objetiva del LENT/SOMA se correlacionaba con la establecida por el glosario Franco-italiano pero el primer sistema proporcionaba una información adicional en los efectos subjetivos del tratamiento

Los estudios recientes parecen indicar un bajo porcentaje de toxicidad tardía grave en carcinoma de cérvix con las técnicas actuales de tratamiento. Ferrigno et al (2003) analizaron 190 pacientes con carcinoma de cérvix tratados con radioterapia externa seguido de una o dos aplicaciones de braquiterapia de baja dosis observando una incidencia global de toxicidad tardía según la RTOG/EORTC en el recto, intestino delgado y tracto urinario de 15.3%,4.2% y 6.8% respectivamente y una incidencia de toxicidad tardía a los 5 años de 16.1%,4.6% y 7.6% respectivamente. Las toxicidades severas tardías en recto, intestino delgado y tracto urinario fueron relativamente bajas con incidencias de 3.6%, 1.0% y 1.0% respectivamente

Davidson et al (2003) analizaron el impacto de la radioterapia en la función sexual y vaginal en carcinoma de cérvix utilizando las escalas LENT/SOMA a diferentes tiempos después del comienzo del tratamiento valorando la severidad de los síntomas desde 1 hasta 4. Se observó en 48 de los pacientes que la disfunción vaginal disminuía significativamente a los 70 días

comparado con los valores pre-radioterapia, sin embargo no ocurría lo mismo para la disfunción sexual. Se producía una heterogeneidad en los cambios de los valores a lo largo del tiempo: para algunas pacientes no se producían cambios en los resultados de la subsección vaginal, para algunas aumentaba y para otras disminuía.

Saibishkumar et al (2005) analizaron 105 pacientes con carcinoma cervical invasivo tratados con radioterapia externa con o sin radioterapia intracavitaria después de histerectomía, siendo el porcentaje de toxicidad tardía a los 5 años según la RTOGC de 19% en recto, 4.8% en vejiga, 24.8% en la piel y 14.3% en intestino delgado. En otro estudio realizado por el mismo autor se realizó un análisis retrospectivo de 1069 pacientes con carcinoma de cérvix uterino tratados solo con radioterapia observándose que la incidencia de toxicidad tardía severa (3/4) medida según el criterio de la RTOG en recto, vejiga, intestino delgado y piel fue 1.1%, 1.2%, 0.2% y 1.2% respectivamente)

En un estudio reciente realizado por Brand et al (2006) se analizó la incidencia, severidad y momento en el que producía la estenosis vaginal en pacientes con carcinoma de cérvix que recibieron radioterapia pélvica o vaginal como parte de su tratamiento. 179 pacientes realizaron el seguimiento y se disponía del 98% de los datos de la toxicidad vaginal. 27% tuvo toxicidad de grado 1 (estenosis parcial o reducida pero sin oclusión completa) y 11% tuvo grado 2 (oclusión completa). Pacientes con edad superior a los 50 años tenían un alto riesgo de sufrir estenosis vaginal. La estenosis vaginal ocurría en un 38% de los pacientes y con mayor frecuencia en el primer año después del tratamiento

# 8.3 PREDICCIÓN DE LA TOXICIDAD

Actualmente, la prescripción de la dosis adecuada para cada paciente, obedece al principio de minimizar las complicaciones severas de los tejidos normales y maximizar la probabilidad de control tumoral local (Burnet et al, 1996).

La existencia de una variabilidad inter-paciente en la radiosensibilidad, implica que la dosis utilizada en los tratamientos convencionales, está determinada fundamentalmente por esos pacientes más radiosensibles. Por ello, se han realizado ensayos predictivos que nos permiten identificar a aquellos pacientes más radiosensibles antes del tratamiento radioterápico. Esta identificación, nos permitiría ajustar de manera personalizada la dosis de radioterapia a administrar.

En general, se acepta que la radiaciones ionizantes inducen la muerte de las células eucariotas por daño en la estructura y función del ADN genómico (Teoría de la diana).

Se han propuesto principalmente dos hipótesis, que pueden operar de forma conjunta, para explicar las diferencias en radiosensibilidad entre las células:

- Variación en la cantidad de daño inducido por una dosis dada de radiación (Ruiz de Almodóvar et al 1994)
- Variación en la capacidad celular de reparar el daño del ADN radioinducido.
   (Núñez et al 1996, Powell et al 1998)

#### 8.3 ENSAYOS PREDICTIVOS DE TOXICIDAD

La individualización del tratamiento radioterápico basado en ensayos predictivos de radiosensibilidad del tejido normal, puede conducir a la mejora en los resultados del tratamiento. Un ensayo predictivo ideal debe ser barato, rápido, con poder predictivo independiente, con pocos falsos positivos o negativos y lo más inocuo posible para el paciente.

El conocimiento de la radiosensibilidad del tejido normal antes del tratamiento radioterápico, podría identificar a aquellos pacientes con alto riesgo de toxicidad o por el contrario, pacientes relativamente radioresistentes, que podrían probablemente tolerar mayores dosis de radiación sin graves complicaciones.

Durante la pasada década se han realizado estudios con fibroblastos y linfocitos de pacientes para analizar la posible relación entre la radiosensibilidad celular y la respuesta clínica, sin llegar a una evidencia clara que permita utilizar estos ensayos en la práctica clínica rutinaria (Dörr et al 2001).

#### 8.3.1. FIBROBLASTOS

#### 8.3.1.1 Cultivos celulares: Do o SF2

Los fibroblastos son utilizados frecuentemente como modelo experimental en el estudio de la radiosensibilidad del tejido normal. Una vez extraidos los fibroblastos del paciente, es necesario establecer una línea de cultivo que será sometida a distintas dosis de radiación. El número de colonias en cada frasco de cultivo nos dará una medida de la supervivencia celular (Do o SF2) que define la radiosensibilidad de los fibroblastos de cada paciente.

Sin embargo, los resultados de los estudios sobre el valor predictivo de los fibroblastos en la radiosensibilidad es controvertido. Muchos estudios han encontrado una correlación entre reacciones del tejido normal tardías y radiosensibilidad de fibroblastos. Geara et al (1993) encontraron una correlación negativa significante (P< 0.0001) entre la fracción de supervivencia de fibroblastos después de irradiación con 2GY (SF2) y complicaciones tardías en pacientes con cánceres de cabeza y cuello. Una correlación significante se observó también entre las fracciones de supervivencia de fibroblastos después de 3.5 Gy (SF3.5) y fibrosis subcutánea en pacientes con cáncer de mama, aunque no se encontró ninguna correlación entre SF3.5 y telangiectasia (Johasen et al 1996). El estudio retrospectivo de Peacock et al en 39 pacientes con cáncer de mama no mostró ninguna correlación entre la radiosensibilidad clonogénica de fibroblastos y la severidad de los efectos tardíos en pacientes con cáncer de mama (Peacock et al 2000) En cuanto a la toxicidad aguda o crónica, se ha observado que pacientes con cáncer de mama que desarrollaron reacciones agudas graves en la piel durante la radioterapia, se caracterizaban por una radiosensibilidad incrementada de sus fibroblastos (Loeffler et al 1990, Burnet et al 1996). Oppitz et al (2001) en un estudio retrospectivo mostró una correlación significante entre los pacientes con reacciones agudas en la piel y la radiosensibilidad de los fibroblastos estimado mediante supervivencia de células clonogénicas.

#### 8.3.1.2 Daño del ADN

Puede determinarse por distintas técnicas como son: la formación de micronúcleos inducida por la radiación, el comet assay o medida del daño inicial de ADN radioinducido estimado mediante roturas dobles de cadena por electroforesis en campo pulsado.

El ensayo de formación de micronucleos mide el nivel de DNA o daño cromosómico producidos en cultivos in vitro. Los micronucleos se forman de fragmentos de cromosomas acéntricos o de cromosomas que se han perdido durante o después de la mitosis y se identifican como cuerpos extranucleares pequeños en células en interfase expuestas a la radiación ionizante.

El comet assay es una técnica mediante la cual las células son suspendidas en geles de agarosa marcadas con un marcador fluorescente observándose la migración del DNA mediante microscopio fotométrico. El DNA migra hacia el ánodo y esta migración es más pronunciada en células irradiadas que en controles. Las diferencias de los patrones de migración se miden cuantitativamente. Las ventajas del comet assay es que nos permite utilizar un bajo número de células pero no deja de ser una técnica que lleva un tiempo de ejecución largo y laborioso.

La medida del daño inicial radioinducido estimado por el número de rupturas dobles de cadena (dsb) en electroforesis de campo pulsado (PFGE) permite obtener resultados en 7 días aproximadamente.

Mediante suspensiones de fibroblastos o queratinocitos se procede a irradiación a diferentes dosis. Posteriormente, se procesan las muestras para realizar una electroforesis de campo pulsado que permite movilizar fragmentos grandes de ADN, como son los producidos tras una rotura doble de la cadena del ADN.

Los estudios que relacionan el daño del DNA con la toxicidad no han resultados concluyentes. En el estudio de Nachtrab et al (1998) en 10 controles , 10 pacientes hipersensibles y 2 con AT (ataxia telangiectasia) se observó que los fibroblastos de individuos hipersensibles y con AT mostraban una mayor inducción de micronucleos que los individuos con sensibilidad normal sin embargo, en un estudio realizado en 9 líneas de fibroblastos establecidas de

biopsias vaginales de pacientes con carcinoma de cérvix pretratamiento y 1 linea de AT no se observó ninguna relación con la toxicidad y la formación de micronucleos (O'Driscoll et al 1998). En estudio de Oppitz en 1999 mediante comet assay se observó una relación con la toxicidad. Los individuos con AT mostraban un alto daño radioinducido y una baja reparación del daño comparado con individuos con reacciones tisulares normales. Los fibroblastos de pacientes con reacciones agudas y tardías incrementada tenían una lenta reparación del daño.

En los estudios publicados mediante el análisis por PFGE (Núñez et al,1998, Kiltie et al 1999) se demuestra una posible correlación entre los datos experimentales obtenidos "in vitro" y los datos clínicos sobre toxicidad en pacientes analizados.

#### 8.3.1.3Diferenciación de fibroblastos

La radiación ionizante induce cambios funcionales en los fibroblastos. Bayreuther et al en 1998 describieron como los sistemas de células fibroblásticas humanas podían divirse dentro de tres estadíos precursores activos mitóticamente (MFI,II,III) y tres estadíos post mitóticos (PMFIV,V,VI) (Bayreuther et al, 1998). Aunque no hay división, los fibroblastos postmitóticos son fiuncionalmente muy activos y producen grandes cantidades de colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular (Rodemann et al 1991, Lara el at 1996).

Se han realizado estudios que comparan la diferenciación de fibroblastos con la toxicidad en pacientes de cáncer pero los resultados han sido controvertidos.

Lara et al 1996 encontraron un aumento en la producción de colágeno, medido por la incorporación de prolina tritiada en fibroblastos irradiados, pero sin embargo no encontró relación con la aparición de fibrosis clínica postradioterapia en un estudio posterior en donde se analizaban 79 pacientes con cáncer de mama (Russell, Lara et al 1998). Los estudios de Delanian et al y Herskind et al pudieron demostrar una correlación entre el cociente fibroblastos MF-III y MF-II tardíos frente a MF-I y II tempranos y el riesgo de fibrosis severa. (Delanian et al 1998 y Herskind et al 1998)

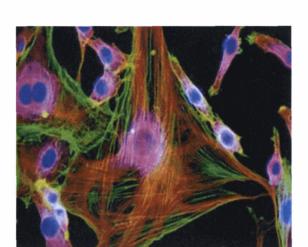


Fig 7.Fibroblastos humanos en cultivo detectados por microscopía de fluorescencia (B.Pinar 2002)

#### 8.3.2. LINFOCITOS

Debido a que el proceso de obtención de fibroblastos es largo, tedioso y no es posible en el 100% de los casos debido a las dificultades de obtener primocultivos viables de todos los pacientes, las células más utilizadas en los ensayos predictivos de toxicidad han sido los linfocitos de sangre periférica (PBLs).

Los linfocitos son células que presentan una elevada sensibilidad a la irradiación, son fáciles de obtener por venopunción y en grandes cantidades siendo un proceso inocuo para el paciente y nos ofrecen una mayor rapidez en la obtención de resultados.

### 8.3.2.1 Cultivos celulares: Do y SF2

La mayoría de los estudios (Ramsay et al 1995, West et al 1998,2001) muestran una relación entre los ensayos clonogénicos de supervivencia en linfocitos tras radioterapia y la toxicidad radioinducida del paciente. Solo en un estudio realizado por Geara et al en 1993 no se observan resultados favorables. En el estudio realizado por West et al 2001 en 174 pacientes con cáncer de cérvix, se observó en 83 de ellos, que el SF2 en linfocitos era un factor pronóstico significante para la probabilidad de no desarrollar toxicidad

(p=0.002) o desarrollar toxicidad de grado 3 (P=0.056); además se observó una correlación inversa entre el SF2 y el grado de toxicidad (P=0.002).

#### 8.3.2.2 Daño del ADN

La mayoría de los estudios realizados no demuestran una correlación entre la frecuencia de micronucleos inducidos en linfocitos in vitro y la toxicidad del tejido sano (Rached et al 1998, Slonina et al 2000) sin embargo, un estudio realizado en 55 pacientes con cáncer de cérvix avanzado mostró una correlación significante entre la frecuencia de micronucleos a los 4Gy y la gravedad de las toxicidades agudas y tardías (P=0.000001). (Widel et al 2003) Los estudios de Alapetite et al 1999 y Muller et al 2001 mediante comet assay en linfocitos mostraban una relación entre el daño del DNA y la toxicidad del paciente.

Alapetite et al observaron que el daño del DNA se asociaba en pacientes con cáncer de mama con un riesgo individual de mayor toxicidad a la radioterapia (Alapetite et al 1999). El estudio de Muller et al en 24 pacientes sanos y 18 pacientes radiosensibles mostró que los individuos que mostraban peor características en la reparación del daño en linfocitos irradiados in vitro tenían una mayor probabilidad de ser sensibles a la radiación (Muller et al 2001)

En cuanto a los estudios mediante PFGE tampoco hay resultados concluyentes. El estudio de Nuñez et al 1998 en 25 pacientes preradioterapia y 8 con cáncer de mama hipersensibles el número inicial de roturas dobles de cadena era un indicador de la respuesta in vivo a la radiación. Nuestro grupo (Pinar, 2006 bajo revisión) analizó las dsb radioinducidas en PBIs medidas por PFGE en 42 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama avanzado tratadas con radioterapia hiperfraccionada y su posible relación con la toxicidad aguda y tardía, demostrándose una relación significativa entre mayores tasas de roturas dobles de cadena y toxicidad tardia grado 3, en el subgrupo de pacientes tratadas a dosis de 81,6 Gy.

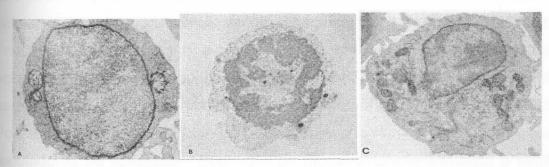
### 8.3.2.3 Daño cromosómico

Entre las técnicas que permiten analizar el daño cromosómico se encuentran la citogenética, aberraciones cromosómicas y FISH.

Casi todos los trabajos publicados que analizan el daño cromosómico linfocitario radioinducido demuestran una correlación con la toxicidad aguda o tardía del paciente ( Neubauer et al 1997, Kearsley et al 1998, Yamada et al 2000 ).

En el estudio de Borgmann et al en 16 pacientes con cáncer de cabeza y cuello con distinta toxicidad tras radioterapia se realizó un análisis de aberraciones cromosómicas en linfocitos en metafase observándose en el número de fragmentos acéntricos claras diferencias entre individuos sanos, pacientes con toxicidad de grado 1 y pacientes de grado 3 (Borgmann et al 2002)

Fig 8. Ultraestructura de Linfocitos normales irradiados a 20Gy y a 24 y 48 horas de incubación. (Artículo Rana R et al 1990)



A) Irradiación a 20Gy y 24 horas de incubación. Se observa descondensación de la cromatina (x17,000) B)Morfología después de 20Gy y 48Horas de cultivo. Se observa una picnosis nuclear y alteraciones citoplasmáticas (x14,000) C)Morfología de un linfocito no irradiado (x24,000)

# 8.4 ANALISIS DE APOPTOSIS RADIOINDUCIDA EN LINFOCITOS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

Como ya hemos descrito previamente, la radiación ionizante produce la muerte celular en forma de apoptosis desencadenada por la activación de las caspasas, verdaderos ejecutores del programa de muerte. Aunque el mecanismo preciso de cómo las caspasas son activadas después de la

radiación ionizante está todavía siendo investigado, tres modelos de rutas de apoptosis radioinducidas han sido propuestas:

Primeramente, el DNA radioinducido dañado puede iniciar la apoptosis via mecanismo dependiente de P53 por sobreregulación de la expresión de Bax que regula la apoptosis dependiente de la mitocondria por inducción de la formación del apoptosoma una molécula compleja formada por citocromo c, Apaf-1 y caspasa 9 (Tsujimoto et al 1998). P53 puede además sobreregular la expresión de Fas, el receptor de muerte de CD95 y activar la cascada de caspasas tanto a través de mecanismos dependientes como independientes de la mitocondria.

En segundo lugar, los cambios bioquímicos tal como el incremento en la generación de especies reactivas del oxigeno (H2O2) y disminución de glutation se ha observado en células irradiadas como prioritarias en la pérdida de la integridad de la membrana

Sheng-Tanner et al 1998). De este modo, el estrés oxidativo puede jugar un rol directo en la apoptosis radioinducida.

En tercer lugar, la interacción de la radiación ionizante con la membrana celular induce la hidrólisis rápida de esfingomielina a ceramida (Haimovitz-Friedman et al 1994), y la activación de la ruta SAPK/JNK (protein kinasa activada por estrés) pro-apoptótica puede ocurrir a partir de las señales de ceramida derivadas de la membrana (Westwick et al 1995, Verheij et al 1996). Posteriormente, la fosforilación de c-Jun aumenta la transcripción de los genes reguladores de apoptosis. Dado que un medio ambiente sometido a estrés también estimula a la SAPK/JNK, la esfingomielina y los sistemas de señalización de SAPK/JNK pueden estar coordinados en la inducción de apoptosis. Además, la formación de ceramida y posterior activación de caspasas también puede tomar parte en la apoptosis inducida por daño en el ADN (Tepper et al 1999)

Las células que mueren por apoptosis sufren una serie de cambios morfológicos y bioquímicos característicos como son: la fragmentación del DNA, cambios en la simetría de la membrana, activación de caspasas, alteración en los niveles de las proteínas relacionadas con la muerte celular. Los resultados iniciales de la señalización apoptótica son intracelulares mientras que la membrana plasmática permanece intacta. La rotura del DNA

genómico entre unidades nucleosomales es un evento irreversible que lleva a la muerte celular. La cuantificación de los fragmentos de DNA mono y oligonucleosomales resultantes pueden ser observados por la técnica ELISA; el número de fragmentos de DNA asociados a histonas refleja la cantidad de muerte en una muestra particular, además, este DNA fragmentado puede ser medido in situ mediante ensayo TUNEL usando la enzima deoxynucleotidyl transferasa terminal (TdT); los DNA fragment End-labeling son detectados por un marcador fluorescente o por un sustrato colorimétrico.

Por otra parte, los cambios en la morfología celular, incluyendo pérdida de volumen celular, condensación cromatínica y citoplasmática, fragmentación en cuerpos apoptóticos nos sirven también para la detección de la muerte por apoptosis. La citometría de flujo puede ser utilizada para cuantificar fragmentos marcados con fluorescencia (DAPI, IP) donde los cambios producidos en la luz Scatter, pueden utilizarse para medir parámetros como son el tamaño y la complejidad celular. Esta técnica, ha sido utilizada tanto en investigación como en la práctica clínica rutinaria, por su capacidad de análisis de las características ópticas de partículas individuales presentes en una suspensión celular en cuestión de segundos. Cuando la célula es intersectada por un láser la dispersión frontal y lateral de la luz o FSC nos da información del tamaño relativo, mientras que la dispersión lateral o SSC nos da información de la complejidad estructural. Además, los fragmentos de DNA pueden ser aislados de poblaciones apoptóticas y ser analizados por electroforesis en gel de agarosa observándose la presencia de un patrón en escalera de DNA de aproximadamente 180pb que confirma la presencia de dicho proceso.

Otro proceso bioquímico de la muerte por apoptosis es la translocación de la fosfatidíl serina desde la cara interna del citoplasma a la cara externa de la superficie celular. La detección in vitro de la fosfatidíl serina puede realizarse mediante la Anexina V (proteína dependiente de calcio que se une con gran afinidad a la fosfatidilserina). Uniendo a la Anexina V un marcador fluorescente puede detectarse por citometría de flujo o por microscopía de fluorescencia. La integridad de la membrana puede ser también evaluada con yoduro de propidio (IP) que se intercala en la doble cadena de ADN permitiendo la diferenciación entre apoptosis temprana, apoptosis tardía o necrosis.

# 8.4.1 Estudios de apoptosis radioinducida en linfocitos por citometría de flujo

La técnica de análisis de la apoptosis radioinducida en linfocitos de sangre periférica (PBIs) por citometría de flujo se desarrolló en un intento de acelerar la obtención de resultados para el desarrollo de un test predictivo factible y útil en la práctica clínica rutinaria (Ozsahin et al, 1997; Crompton et al, 1999; Barber et al, 2000; Crompton et al, 2001). En la mayoría de los trabajos publicados salvo en el estudio de Barber et al 2000, se ha demostrado una correlación entre la tasa de apoptosis radioinducida y la toxicidad del paciente.

En el estudio de Ozsahin et al (1997) se analizó la apoptosis radioinducida en 45 donantes sanos y 5 pacientes con distintas anormalidades genéticas observándose que los linfocitos T CD4 de un paciente con ICF (síndrome de anormalidades facial) tenía una baja apoptosis radioinducida al igual que para un paciente con AT (Ataxia Telangiectasia) tanto en los linfocitos T CD4 como CD8.

Alguna de las características de la técnica fueron: 1)Utilización de sangre completa heparinizada con lisis posterior de eritrocitos, 2) DNA marcado con DAPI, 3) Análisis a las 24horas de incubación, 4) Dosis de 0,2,8Gy, 5) Apoptosis determinada mediante la degradación del DNA que producía una población adicional de células con valores DNA sub-G1 a la izquierda del pico G1/G0.

Crompton et al (1999)analizaron la apoptosis en linfocitos T CD4 y CD8 en 12 pacientes con cáncer que presentaban una alta toxicidad a la radioterapia y 9 pacientes con AT, observándose en los 12 pacientes hipersensibles menos apoptosis radioinducida que los controles sanos. Los pacientes con AT desarrollaban incluso menos apoptosis que los pacientes hipersensibles. El porcentaje de la respuesta apoptótica de los linfocitos T CD3+CD8+ de los individuos radiosensibles, estaba por debajo del porcentaje de apoptosis de los individuos que respondían de forma normal

En un estudio posterior se llega a la conclusión de que son cuatro las fuentes fisiológicas de la variación en la respuesta a la radiación: dos genéticas como son la hipersensibilidad y enfermedad hereditaria y dos epigenéticas como son el tipo celular y la edad del paciente (Crompton et al 2001). Algunas de las

características del experimento fueron: 1) Utilización de sangre heparinizada con lisis de eritocitos, 2) DNA marcado con IP, 3) Análisis a las 48horas de incubación, 4) Dosis de 0,2,9Gy 5) Apoptosis fue confirmada por microscopía y por kits de detección de apoptosis (*in situ* nick translation y Annexin V).

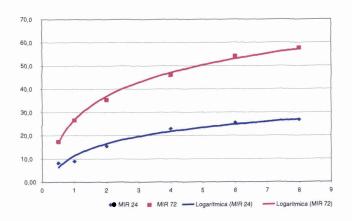
Barber et al (2000), compararon pacientes homo y heterocigotos para la AT y pacientes con cáncer de mama con toxicidad tardía incrementada, frente a donantes sanos y pacientes tratadas por cáncer de mama con toxicidad tardía normal sin encontrar relación apoptosis-toxicidad (no se observó correlación entre la apoptosis y severidad de la fibrosis mamaria, retracción o telangiectasia). Sin embargo, se observó una peor inducción de apoptosis radioinducida en pacientes homocigotos para AT y un nivel reducido en heterocigotos para AT comparado con individuos normales. También se observaron bajos niveles en pacientes con cáncer de mama comparado con individuos normales Algunas de las características de la técnica fueron: 1) Aislamiento de PBLs de sangre completa, 2) Determinación tras 24horas de incubación 3) Utilización de un único punto de dosis (4Gy) 4) estimación de apoptosis mediante ensayo TUNEL

Tabla 9. Relación apoptosis radioinducida con toxicidad

Autor	Pacientes	Tipo de ensayo	Toxicidad
Ozsahin 1997	45 controles sanos 3 niños sanos	Citometría de flujo	SI
Crompton 1999	2 AT e ICF  109 controles sanos  12 pacientes hipersensib  9 AT homo	Citometría de flujo	SI
Barber 2000	13 controles sanos 13 AT homo y hetero 31 Ca mama	Citometría de flujo TUNEL	NO
Crompton 2001	105 controles sanos 48 pacientes normales 12 pacientes hipersensib 12 AT homo	Citometría de flujo	SI

Nuestro grupo (Tesis Pinar,2002) logra desarrollar la técnica de apoptosis por Annexina-yoduro para analizar la apoptosis radioinducida en PBIs por citometría de flujo, además de llegar a definir un modelo matemático al que podían ajustarse los incrementos de apoptosis observados a diversos niveles de dosis y a diversos tiempos de estudio. Este modelo matemático semilogarítmico (MIR=β Ln (Gy)+α) nos proporciona una única medida (β=pendiente de la curva) de la radiosensibilidad intrínseca individual que no han llegado a proporcionar estudios anteriores, aportando una información global sobre la radiosensibilidad intrínseca del paciente (a una dosis y a un tiempo determinado). (Figura 1)

Figura 9. Adaptación de las curvas de MIR por dosis de radiación, para 6 puntos de dosis, con 24 y 72 horas de incubación.



# 8.4.2 Estudios de apoptosis radioinducida en subpoblaciones linfocitarias por citometría de flujo

El estudio de la radiosensibilidad de las distintas subpoblaciones linfocitarias (CD4, CD8, B, NK) nos podría ayudar a determinar qué población linfocitaria sería más útil para un tests predictivo de uso clínico habitual pre-radioterapia. Se han realizado varios estudios sobre el efecto de la radiación ionizante en las distintas subpoblaciones de linfocitos de sangre periférica aunque sin llegar a resultados concluyentes.

Desde los años 1997 y 1999 los estudios de Ozsahin et al y Crompton et al mostraban que dentro de controles sanos e individuos con enfermedades

genéticas, se producían claras diferencias entre la radiosensibilidad de las subpoblaciones linfocitarias CD3+CD4+ y CD3+CD8+.

Stewart et al en 1988 utiliza un sistema de cultivo y medida por citometría de flujo para evaluar la radiosensibilidad de los linfocitos TCD4+,CD8+ y linfocitos B obtenidos de controles sanos. Los linfocitos CD8+ eran dos veces más radiosensibles que los CD4+ y los linfocitos B tenían una radiosensibilidad intermedia (Stewart et al 1988).

Rana et al (1990) analizaron la sensibilidad de las células NK después de la exposición a diferentes dosis de radiación gamma. Las PBIs se irradiaron conjuntamente a bajas (2-6Gy) y altas dosis (10-30Gy) de radiación y se analizaron después de las 3 y 48 horas de incubación. Después de las 48 horas postirradiación se observaba un descenso en la actividad citotóxica de las PBIs mientras que la actividad lítica de las NK aumentaba. Las células NK tenían actividad citotóxica a bajas dosis sin embargo, a altas dosis se producía una pérdida de actividad. Por tanto, la radiación ionizante se encargaba de seleccionar aquellas subpoblaciones de células NK más citotóxicas o estimulaba la actividad citotóxica en células supervivientes.

Seki et al 1995 estudió el posible efecto protector de varias citoquinas en la apoptosis radioinducida de subpoblaciones linfocitarias. La exposición a la irradiación gamma producía cambios apoptóticos en todas las subpoblaciones linfocitarias. Las células natural Killer (NK) eran las más radiosensibles, mientras que los linfocitos T CD8+ y B mostraban una débil susceptibilidad a la radiación y los CD4+ eran relativamente radioresistentes. La apoptosis inducida por radiación de los linfocitos NK y B estaba inhibida por IL-2 y IL-4 respectivamente y la de CD4+ y CD8+ por IL-2, IL-4, IL-7. Además el efecto protector de cada citoquina en la apoptosis radioinducida podría estar parcialmente atribuida al aumento de expresión de la proteína BCL-2 (Seki et al 1995).

Ozsahin et al (1997) analizó la apoptosis radioinducida a los 2 y 8Gy para los linfocitos T CD4+ y CD8+ de 45 donantes sanos. Se observó una buena correlación entre la apoptosis a los 2 y 8Gy tanto para los CD4+ como para los CD8+(r=0.77). Sin embargo, se observaron correlaciones inferiores cuando se relacionaba la apoptosis observada entre ambos tipos celulares (r=0.63 para los 2Gy y r= 0.65 para los 8Gy). Esto sugiere que la muerte celular inducida

dependía del tipo celular. La radiosensibilidad absoluta era también diferente entre los linfocitos T siendo los CD3+CD8+ más radiosensibles que los TCD3+CD4+.

Crompton et al (1997). en 12 donantes sanos a dosis de 0,2,8Gy y 24 horas de incubación representaron el porcentaje de citotoxicidad radioinducida en 6 tipos celulares diferentes observándose que las células más sensibles a la citotoxicidad radioinducida eran los linfocitos T CD8 CD3+, seguido de los linfocitos B, NK, T CD4 CD3+, granulocitos y monocitos. Todos los tipos celulares excepto monocitos mostraron un claro aumento dosis dependiente en citotoxicidad

Philippé et al (1997) realizaron el estudio en 6 donantes sanos a 2Gy de dosis y analizaron los resultados a las 24 horas de irradiación con Anexina V por citometría de flujo. Observaron que las células NK eran las más resistentes y que las B eran las más sensibles y que entre los linfocitos T, los CD4+ y CD45 RA- eran más susceptibles a la apoptosis que los CD8+ y CD45RA+. Por otro lado, se observó que la apoptosis espontánea correlacionaba con la diferente radiosensibilidad a la apoptosis entre las subpoblaciones. Además se observó una relación con la vida media de los linfocitos *in vivo*. Así, poblaciones linfocitarias con una corta vida media *in vivo* eran más susceptibles a la apoptosis in vitro y viceversa .

En un estudio más extenso, Schmitz et al (2003) analizaron 63 donantes sanos a dosis de 0,0.5, 1,2Gy a intervalos de 2 horas (8h-22h) utilizando Anexina V y Hoechst 33258 (marcador fluorescente que permite discriminar células necróticas) observándose como en estudios anteriores que dentro de los linfocitos T los CD4+ eran más resistentes que los CD8+ y que los linfocitos B eran los más sensibles. La apoptosis espontánea y apoptosis radioinducida estaban correlacionadas en todos los tipos celulares. Las radiosensibilidad de los linfocitos T CD4+ y CD8+ estaban estrechamente correlacionadas y ninguno de ellos se correlacionaba con la radiosensibilidad de los linfocitos B.

Tabla10. Radiosensibilidad de las distintas subpoblaciones linfocitarias

	N°	RADIOSENSIBILIDAD	
	Pacientes		
Stewart (1988)	15	Linfocitos TCD8+ más radiosensibles que CD4+.Linfocitos B radiosensibilidad intermedia	
Seki (1995)		Nk más radiosensibles. T CD8+, B radiosensibilidad débil. CD4 más radioresistentes	
Ozsahin (1997)	45	Linfocitos T CD8+ más radiosensibles que CD4+	
Crompton (1997)	12	De menor a mayor radiosensibilidad: Linfocitos TCD8+, B, NK, TCD4+	
Philippé (1997)	6	Linfocitos B más sensibles. Nk más resistentes. Entre los linfocitos T CD4+CD45RA- más sensibles que CD8+ y CD45RA+	
Schmitz (2003)	63	De menor a mayor radiosensibilidad: TCD4+, TCD8+,B	

En un estudio reciente realizado por Ozhasin et al (2005) se correlacionó la modificación de la tasa de apoptosis radioinducida de cada subpoblación linfocitaria con la toxicidad de 399 pacientes con distintos tipos de cáncer. Se observó que la apoptosis radioinducida de linfocitos T predecían significativamente los efectos tardíos de grado 2 y grado 3 (P< 0.0001). Los pacientes con efectos tardíos de grado 3 mostraron una apoptosis radioinducida en CD3+CD4+ o CD3+CD8+ por debajo de la media (P< 0.0001) siendo los linfocitos CD3+CD8+ más sensibles y más específicos que la apoptosis de los linfocitos T CD3+CD4+ en el análisis multivariante. No se encontró asociación entre la toxicidad temprana y la apoptosis de los linfocitos T radioinducidos o entre la toxicidad temprana y tardía.

A pesar de estos estudios, las bases moleculares de la diferente radiosensibilidad a la radiación ionizante permanece sin esclarecer. Así, SEKI et al (1994) mediante el análisis por Western Blot de la proteína p53 de distintas subpoblaciones linfocitarias observó una inducción por irradiación de la proteína en células CD4+, CD8+ y células B sin embargo, no se identificó ninguna banda se identificó en células NK irradiadas. Estos resultados sugieren que la síntesis de Novo de algunas proteínas incluyendo p53, es requerida para la apoptosis radioinducida en células T mientras que otros mecanismos independientes de P53 pueden estar operando en la iniciación de la apoptosis en células NK irradiadas.

Por otro lado MULLER et al (1998) analizaron por Western Blot el complejo DNA-PK que participa en la reparación de roturas dobles de cadena (dsb) en células de mamífero. El análisis reveló que las células B expresaban una forma variante de la proteina Ku-86 con un aparente peso molecular de 69 kDA y no la proteína de 86KDA. Esta forma alterada del heterodímero Ku tiene una capacidad menor para reclutar el componente catalítico del complejo DNA-PKcs, el cual contribuye a una ausencia de actividad DNA-PK detectable en células B. Estos datos proporcionan unas bases moleculares para la explicar la sensibilidad incrementada de las células B ante la radiación ionizante.

En un reciente estudio M Mori et al (2005) utilizando RT-PCR cuantitativa demostraron que los niveles de expresión de BAX aumentaban en linfocitos en correlación con la sensibilidad de las células (NKCD56+<TCD4+<TCD8+<BCD19+) lo cual refleja su radiosensibilidad diferencial para el efecto de la muerte por radiación. En contraste, los niveles de expresión de otro gen proapoptótico TNFRSF10B en células irradiadas no se diferenciaba significativamente entre las distintas subpoblaciones, sugiriendo que su expresión no podía relacionarse con la radiosensibilidad diferencial de los subtipos celulares. Estos resultados sugieren que la apoptosis radioinducida en linfocitos es disparada por al menos dos rutas dependientes de p53. La primera, a través de BAX induce la muerte celular actuando en la mitocondria, e influye en la radiosensibilidad diferencial entre las subpoblaciones celulares y la segunda, a través de TNFRSF10B el cual media la apoptosis actuando a nivel de membrana plasmática vía interacción con su ligando TRAIL)

## **CAPITULO II**



- 1.-Analizar la expresión del fenómeno apoptótico (IA) y las proteínas reguladoras P53, BAX, BCL-2 en el carcinoma invasivo de cérvix, la relación entre estas variables, su relación con factores clásicos de pronóstico (estadío, volumen tumoral, edad, grado y tipo histológico), y valorar su importancia como factores predictivos de respuesta inmediata a la radiación y la supervivencia en una cohorte de pacientes con largo seguimiento.
- 2.-Conocer la expresión de IGF1-r en pacientes de cáncer de cérvix y describir la posible relación con Ciclina D1 y la proliferación estimada por el Indice Mitótico(I.M.) y la expresión de Ki67. Profundizar en el conocimiento de la regulación por parte de IGF1-r de los procesos de apoptosis y expresión génica de P53,BAX y BCL-2. Definir el papel predictivo de respuesta tumoral y supervivencia que tienen la proliferación y sus genes reguladores.
- 3.-Analizar el proceso de apoptosis inducida por radiación en PBLs en pacientes con cáncer de cérvix, estudiar su ajuste a un modelo matemático semilogarítmico MIR =  $\beta$ .In(Gy)+ $\alpha$ , y conocer las relaciones que las constantes de definidas por el modelo tienen entre sí y definir su papel en la predicción de la toxicidad clínica tardía que presentan las enfermas tras ser tratadas con irradiación.
- 4.-Analizar el proceso de apoptosis inducida por radiación en PBLs en pacientes con cáncer de cérvix, estudiar su ajuste a un modelo matemático semilogarítmico MIR =  $\beta$ .In(Gy)+ $\alpha$ , y conocer las relaciones que las constantes definidas por el modelo tienen entre sí y definir su papel en la predicción de la toxicidad clínica tardía que presentan las enfermas tras ser tratadas con irradiación.

PAPEL DE LA APOPTOSIS Y SUS GENES REGULADORES P53,BAX Y BCL-2 EN CÁNCER DE CÉRVIX LOCALIZADO CON LARGO SEGUIMIENTO.

## PAPEL DE LA APOPTOSIS Y SUS GENES REGULADORES P53, BAX Y BCL-2 EN CANCER DE CERVIX LOCALIZADO CON LARGO SEGUIMIENTO.

#### RESUMEN

Antecedentes: El cáncer de cérvix uterino es todavía una enfermedad frecuente en nuestro medio. La cirugía o la irradiación son los tratamientos adecuados para los estadios precoces. En los estadios mas avanzados la irradiación radical con quimioterapia concurrente parece la alternativa terapéutica mas adecuada. La posibilidad de predecir la respuesta de los tumores a una u otra opción terapéutica que permitiera elegir el mejor tratamiento en cada caso, mediante estudios de la expresión del fenómeno de la apoptosis y sus genes reguladores P53,BAX y BCL-2 es una hipótesis atrayente.

**Objetivo**: analizar la expresión del fenómeno apoptótcio (IA) y las proteínas reguladoras P53, BAX, BCL-2 en el carcinoma invasivo de cervix, la relación entre estas variables, su relación con factores clásicos de pronóstico (estadío, volumen tumoral, edad, grado y tipo histológico), y valorar su importancia como factores predictivos de respuesta inmediata a la radiación y lasupervivencia.

**Material y Métodos**: En en este estudio hemos incluído 201 pacientes con carcinoma infiltrante localizado de cervix con un seguimiento medio de 84,74 meses (I.C.95%72,37-97,12 meses) máximo de 258 meses (21,5 años). Treinta y dos pacientes pacientes (15,9%) recibieron como tratamiento principal cirugía, y 151 (75,1%) radioterapia (RT). Dieciocho casos (9%) fueron tratados de forma paliativa por deterioro del estado general y progresión de la enfermedad. Se determinó mediante técnicas histológicas la apoptosis (IA) y genes reguladores (P53, BAX, BCL-2-2). Se utilizó tinción de hematoxilina-eosina (IA), y técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) para la determinación de P53, BAX y BCL-2. Se analizó la relación entre estas variables, su relación con factores clásicos de pronóstico, y su valor como factores predictivos de respuesta, control local y supervivencia.

Resultados: Observamos una estrecha relación entre apoptosis y la expresión de P53 y BAX. Además los tres genes reguladores estudiados se relacionaban estrechamente entre ellos. Además se observó una relación significativa entre la sobreexpresión de p53 y tumores indiferenciados (p<0.049) y entre mayor tasa de apoptosis y tipo adenocarcinoma(p<0,032). Se pudo valorar la respuesta en las 151 pacientes tratadas con RT radical, presentando remisión completa 110 de ellas (72.8%). Los tumores más avanzados (p<0.001), con baja expresión de BCL-2(p<0,013) y con baja apoptosis (p<0,087) obtuvieron peor tasa de respuesta inmediata de la enfermedad a la irradiación. La Supervivencia Libre de Enfermedad (SLE) de la serie a los 20 años fue del 52% y la Supervivencia Causa especifica(SCE) del 53%. Ni la apoptosis ni sus genes reguladores resultaron de utilidad para predecir la supervivencia. Solo el estadio clínico resultó definitorio de la supervivencia en análisis bivariante y multivariante. Marginalmente, la sobreexpresión de P53 mayor del 15% resultó predictiva para el control local (SLRLR) (p<0,058), SLE (p<0,038) y SCE (p<0,066) en el análisis univariante y multivariante para la supervivencia excepto Supervivencia Libre de Metástasis (SLM).

#### Conclusión:

En nuestra serie madura de casos con largo seguimiento, se ha podido objetivar una estrecha relación de la apoptosis y de sus genes reguladores P53, BAX y BCL-2 entre si. Además se demuestra la existencia de factores predictivos de carácter biológico para la obtención de respuesta inmediata a la irradiación (BCL-2). Marginalmente la expresión de P53 fue relevante en la predicción de las variables de supervivencia en pacientes con cáncer de cérvix con largo seguimiento.

#### INTRODUCCION

El cáncer de cérvix uterino es todavía una enfermedad frecuente en nuestro medio. El pronóstico de las pacientes que lo portan viene marcado por la extensión de la enfermedad al diagnóstico. Entre los factores más importantes están el estadío, el tamaño tumoral y la afectación ganglionar (Riou et al, 1990; Dellas et al, 1997). Sin embargo, no es raro ver en la práctica clínica que tumores con igual tamaño y estadío tengan evoluciones distintas. La cirugía o la irradiación son los tratamientos adecuados para los estadios precoces. En los estadios mas avanzados la irradiación radical con quimioterapia concurrente parece la alternativa terapéutica mas adecuada. La posibilidad de predecir la respuesta de los tumores a una u otra opción terapéutica que permitiera elegir el mejor tratamiento en cada caso, mediante estudios de la expresión de los fenómenos celulares y de su regulación génica es una hipótesis atrayente. Existe, por tanto, una necesidad de estudiar características biológicas de los tumores, que puedan ser útiles en la identificación de pacientes con bajo riesgo, a los que en primer término se les pueda ofrecer un tratamiento más conservador evitando mutilaciones, y pacientes con alto riesgo a los que se les planteen tratamientos de combinación más intensivos (Avall-Lundqvist et al, 1997).

El cáncer es la consecuencia de una proliferación incontrolada de células, con anomalías en su material genético. El fenómeno de la apoptosis está usualmente alterado en los tumores invasivos, reduciéndose frente al fenómeno de proliferación. Además, algunos de los genes que la regulan están también intimamente relacionados con el fenómeno de proliferación de esta célula anómala que se duplica a mayor velocidad de lo que muere, dando lugar al crecimiento tumoral.

El estudio del valor pronóstico que el fenómeno de la apoptosis y sus genes reguladores P53, BAX y BCL-2 han mostrado previamente han sido descritos in

extenso en el capítulo 1. De forma general podemos decir que existe una variación interindividual en la tasa de apoptosis espontánea, que podría explicar la heterogeneidad de la respuesta apoptótica en los diferentes tumores (Meyn et al, 1993) y que las radiaciones ionizantes inducen apoptosis, observándose en modelos experimentales, que la tasa de apoptosis inducida es directamente proporcional a la apoptosis espontánea (Meyn et al, 1993). De esta manera, altas tasas de apoptosis pretratamiento predecirían una buena respuesta al tratamiento radioterápico (Kerr et al, 1994; Meyn et al, 1994), y su determinación sería un método rápido y fácil para conocer la radiosensibilidad en cada tumor. Sin embargo, los tumores con alto índice apoptótico se asocian, en general, a peor supervivencia, tanto en carcinoma de cérvix (Levine et al, 1995; Wong et al, 1997) como en otros tumores (Lera et al, 1998; Lara et al, 1999)aunque esta relación podría ser inversa cuando se trata del tipo histológico adenocarcinoma (Sheridan et al. 1999). Entre los genes reguladores de apoptosis más estudiados se encuentran p53, bax y bcl-2. La alteración de p53 se relacionó con peores tasas de supervivencia en carcinoma de cérvix (Avall Lundqvist et al, 1997; Nakano et al, 1998; Crawford et al, 1998Wootipoom (2004)Van de Putte (2005)). La expresión de los genes reguladores bax/bcl-2 han sido analizados en algunas series con resultados controvertidos (Wootipoom (2004) Suzuki (2004) Van de Putte (2005)).

Pretendemos en este capítulo analizar la expresión del fenómeno apoptótico (IA) y las proteínas reguladoras P53, BAX, BCL-2 en el carcinoma invasivo de cérvix, la relación entre estas variables, su relación con factores clásicos de pronóstico (estadío, volumen tumoral, edad, grado y tipo histológico), y valorar su importancia como factores predictivos de respuesta inmediata a la radiación y lasupervivencia.

#### MATERIAL Y METODOS

#### **Pacientes**

Se han incluido en este estudio 201 pacientes afectas de carcinoma localizado de cérvix uterino tratadas y seguidas por los Servicios de Ginecología Oncológica y Oncología Radioterápica, componentes del Comité de Tumores

Ginecológicos de la Provincia de Las Palmas de Gran Canaria desde hasta Diciembre de 2004, con un seguimiento medio de 84,74 meses (I.C.95%72,37-97,12 meses) máximo de 258 meses (21,5 años).

En todos los casos se había realizado una biopsia para confirmación histológica del diagnóstico. Las características generales de las pacientes se detallan en la Tabla 1. La edad media fue de 53,34+/-13,48 años (rango 26-89)(distribución normal,test Kolmogorov-Smirnoff). Las pacientes se estadiaron siguiendo los criterios de TNM, realizándose exploración ginecológica y TAC abdomino-pélvico, y en los casos que fue preciso rectoscopia y cistoscopia. La extensión del tumor se realizó mediante examen pélvico bimanual.

La mayoría portaban tumores epidermoides (173 casos, 86,1%) en estadios mayoritariamente precoces (I(30,8%)-II(47,8%)). Los tratamientos realizados variaron según el estadio de la enfermedad y el estado general de la enferma, así como el devenir propio de los conocimientos científicos de cada época. Así, las pacientes con tumores precoces I-IIA fueron remitidas inicialmente a cirugía (32 casos, 15,9%) en 24 de ellos se indicó además irradiación postoperatoria, por la existencia de factores de riesgo de recurrencia local, como afectación ganglionar, bordes afectos o afectación parametrial. En las pacientes con tumores más avanzados o en enfermas no susceptibles de cirugía, el tratamiento prescrito fue la irradiación exclusiva (151 casos, 75,1%,) asociada (65 casos) o no (86 casos) a quimioterapia. En pacientes con mal estado general y tumores muy avanzados (18 casos, 9%), el tratamiento fue meramente paliativo, incluyendo la irradiación a dosis bajas como tratamiento del dolor, del sangrado etc.

La cirugía practicada fue en todos los casos histerectomía radical tipo II-III con linfadenectomía pélvica en tiempos recientes (tipo Wertheim-Meigs), con preservación de ovarios en pacientes premenopaúsicas. La irradiación incluyó en todos los casos, tratamiento a pelvis total mediante técnica de cuatro campos en "box" con un fraccionamiento convencional de 1,8-2 Gy día hasta una dosis total de 45-50,4 Gy, seguida de braquiterapia. En los casos de irradiación postoperatoria se realizaron mediante cilindro vaginal. Hasta el año 2000, se realizó una aplicación de braquiterapia de baja tasa hasta administrar 20 Gy a punto A. A partir del año 2000 se realizaban 3 aplicaciones de 5 Gy cada una mediante un equipo de alta tasa. En los casos de irradiación

exclusiva la braquiterapia se aplicó mediante colpostatos y tandem. Hasta el año 2000 mediante 2 aplicaciones de 20 Gy cada una a punto A con un equipo de baja tasa. A partir del año 2000 se realizaron 5 aplicaciones de 5 Gy con un equipo de alta tasa. En aquellos casos que lo requirieron, se realizó boost parametrial. La quimioterapia usada en nuestra serie de pacientes (65 casos) ha sido siempre concomitante con la irradiación, incluyendo Cisplatino a dosis de 40 mgr/m² semanales, mediante infusión endovenosa durante el periodo de irradiación externa.

Tabla 1 Características generales de las pacientes				
Casos	Porcentaje			
61	30,8			
89	47,8			
45	18,4			
6	3,0			
104	51,7			
97	48,3			
173	86,1			
28	13,9			
38	18,9			
86	42,8			
77	38,3			
32	15,9			
151	75,1			
18	9,0			
	61 89 45 6 104 97 173 28 38 86 77 32 151			

AJCC (2002). AJCC Cancer Staging Manual. Sixth ed. Springer Verlag: New York. UICC (2002). TNM classification of malignant tumors. Sixth ed. John Wiley & Sons: New York.

### Determinación de la apoptosis y de sus genes reguladores.

La técnica para la determinación de apoptosis ya ha sido descrita por nuestro grupo (Perez S, 1998,Lara et al 1999). De forma concisa, se realizó sobre secciones tumorales con un grosor de 4 micras, fijadas en formalina y teñidas con hematoxilina. Diez campos fueron analizados en cada sección tumoral, con objetivo de alto poder de aumento (400x), elegidos randomizadamente, aunque evitando las áreas de necrosis e inflamación. Los criterios para definir

apoptosis o cuerpos apoptóticos han sido descritos previamente (Lera et al, 1998). El Indice Apoptótico (I.A.) fue definido como el cociente entre el número de figuras apoptóticas y el número de células contabilizadas en cada tumor, expresado como porcentaje.

Para el resto de técnicas (Rey et al 1998; Apolinario et al 1997) se desparafinan las laminillas, mediante pases de xylol y etanol a distintas concentraciones (100%, 70%, 50%), 10 minutos cada pase. Posteriormente se lavan en agua destilada, y se procede a la rehidratación de las muestras, sumergiéndolas en una solución citrato durante 3 minutos a partir de la ebullición de la solución. Tras el lavado de las muestras con agua destilada, se bloquea la peroxidasa endógena mediante H2O2 diluida en solución salina buffer fosfato (PBS), durante 10 minutos. Una vez desparafinadas, rehidratadas y bloqueada la peroxidasa endógena, se procederá a la técnica de IHQ específica. En todas se utilizó el kit de detección de DAKO LSBA (Carpinteria, CA) que consta de: 1º Blocking Reagent, que bloquea los anticuerpos no específicos (tiempo de incubación 5 minutos), 2º Ac secundario avidin-biotina (tiempo de incubación 30 minutos). El anticuerpo primario específico se pone después del blocking reagent. La dilución y el tiempo de incubación variará según el tipo de anticuerpo a estudio. En todos los procedimientos, se utilizó un control positivo, que correspondía a un tumor con elevada positividad para el anticuerpo a estudio, y un control negativo, en el que se omitía el anticuerpo primario y se ponía PBS.

Para la detección de P53 se utilizó el Ac monoclonal de ratón anti-P53 (clona D07, Biogenex), a una dilución 1:100, con un periodo de incubación de 24 horas a 4°C. Si es positivo, se observa tinción de los núcleos de las células tumorales. Se estudia toda la sección, para encontrar la zona de mayor expresión, y se cuentan 800-1000 células con 400X, obteniendo el porcentaje de células con P53 positivo.

Las proteínas BAX y BCL-2 se expresan en el citoplasma de las células tumorales. Se utiliza para su detección el Ac policional de conejo anti-BAX (clona SC-493, Santa Cruz Biotechnology, Inc) y el Ac monocional de ratón anti-BCL-2 (clona 124, Dako Diagnosticos, SA) a una dilución 1:100 y 1:50 respectivamente, con un tiempo de incubación (a 4°C) de 1 y 2 horas, respectivamente. Las células con expresión de estas oncoproteínas presentan

tinción citoplasmática granular. En ambos casos existe control interno positivo con la tinción de linfocitos.

Las secciones se incubaron posteriormente con un anticuerpo secundario biotinado y posteriormente con un complejo preparado de peroxidasa estreptavidina-biotinada (Dako LSBA kit, Carpintería,CA) y se revelaron con un sustrato de tetrahidroclorhidro diaminobenzidina (Dako DAB Chromogen, Carpintería,CA) y ligeramente teñida con hematoxilina de Harris. Posteriormente deshidratamos en alcohol de 96° y 100° y aclaramos en xilol. Finalmente realizamos el montaje de las preparaciones con DPX

Como control positivo se usaron muestras tisulares con intensa positividad para los marcadores estudiados. Como control negativo, una sección de cada tanda se procesó omitiendo el primer anticuerpo.

La expresión proteica de los genes estudiados, fue estimada en las áreas de máxima expresión del marcador, en al menos diez campos con un objetivo de 400x. Cuando la expresión proteica era de localización fundamentalmente nuclear, se ha realizado una estimación cuantitativa del número de núcleos teñidos. La expresión de la oncoproteína estudiada, fue definido como el cociente entre el número de núcleos teñidos y el número de células contabilizadas en cada tumor, expresado como porcentaje En las tinciones de localización citoplasmática se ha realizado una estimación semicuantitativa en la que en una gradación de negativo(-), débilmente positivo(+), moderadamente positivo (++) y fuertemente positivo(+++), se integran la intensidad de la tinción y la cantidad de células que expresan la proteína.

La limitación impuesta por el pequeño tamaño de la pieza a estudiar (biopsia), explica que no hayan podido obtenerse tinciones adecuadas de todos los marcadores en todos los casos.

#### Estadística.

Los estudios estadísticos se realizaron mediante un programa informático SPSS 13.0 licenciado a la unidad de estadística (Unidad de Investigación) del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr Negrín. Las variables codificadas como categóricas fueron contrastadas mediante el test de chi cuadrado. Las variables continuas fueron estudiadas para valorar su distribución normal versus no normal mediante el test de Kolmogorov-Smirnoff. Las variables

codificadas como continuas fueron analizadas mediante estudios de correlación de Pearsons para variables con distribuciones normales y de Spearman para variables de distribución no normal. El análisis de relación entre variables categóricas y continuas se realizaron mediante análisis de Mann-Withney y Kruskall-Wallis en casos de distribución no normal y T test y análisis de Anova para variables de distribución normal. El análisis multivariante se ha realizado mediante test de regresión, lineal en caso de variables dependientes y binomial o polinomial en caso de variables categóricas.

El fallo en el control locorregional a largo plazo incluye no solo aquellas enfermas que nunca estuvieron libres de enfermedad locorregional (respuesta no completa tras irradiación), sino aquellas que estando inicialmente libres de enfermedad por irradiación o cirugía recayeron de la enfermedad.

El fallo en el control sistémico se definió como la presencia de enfermedad mas allá de la pelvis. Se definió también la supervivencia global, como la probabilidad de estar vivo al final del periodo de observación, cualquiera que fuera la causa y la supervivencia causa-especifica como la probabilidad de no morir de cáncer. La supervivencia actuarial para las variables categóricas se realizó mediante el log-rank test para el análisis bivariante. Para las variables continuas se realizó un análisis bivariante mediante test de Cox simple. Para el análisis multivariante se usó el test de regresión de Cox.

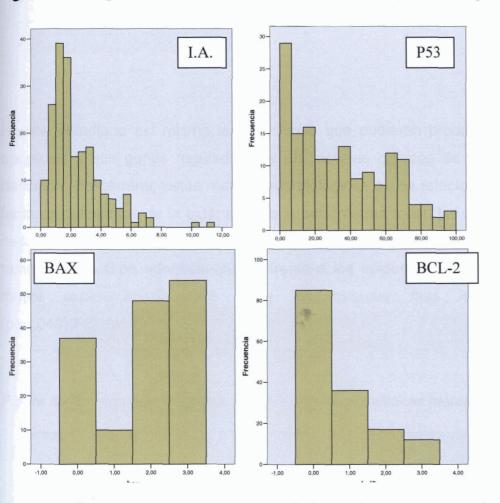
#### RESULTADOS.

La expresión del fenómeno celular de la apoptosis y de su regulación génica se describen en la tabla 2. El fenómeno apoptótico fue estimado en 201 casos, objetivándose un Indice Apoptótico(IA) medio de 2,40+/-1,78%, mediana 1,86% (rango 0,19-11,11%). La expresión de P53 fue determinada en 155 casos, con unos valores de 34,25+/-26,58%, mediana 29% (rango 0-98%)(Figura 1).

La expresión de Bax fue estimada en 149 casos, resultando negativa solo en 37 casos(24,8%) y positiva en los 112 restantes (10 casos(+), 48(++),54(+++). Sin embargo, la expresión de BCL-2 (150 casos) fue negativa en el 56% de los casos(85 pacientes) y positiva en los 65 restantes(36 casos(+), 17(++),12(+++). (Figura 1)

Las variables categóricas BAX y BCL-2, han sido agrupadas en función de los resultados en el intento de obtener grupos numéricamente homogéneos que potencien los subsiguientes análisis. Así BAX queda configurado en 2 grupos: negativo/débilmente positivo 47 casos y positivo 102 casos. Bcl-2 queda configurado en negativos 85 casos y positivos 65 casos. Como se ha descrito previamente, los valores de apoptosis y P53 no siguen una distribución normal, como se aprecia en el histograma (Figura 1).

Figura 1.- Histograma de distribución de las variables I.A., P53, BAX y BCL-2.



Hemos realizado un cuidadoso análisis de la posible relación que los factores clásicos de pronóstico pudieran mostrar entre si, en nuestro grupo de pacientes. Hemos observado una mayor proporción de estadios avanzados entre las pacientes de mayor edad (p<0,029 (Figura 3) y tumores de estirpe epidermoide (p<0,067).

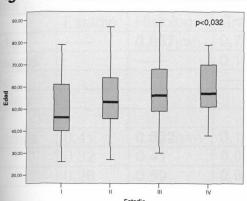


Figura 3.- Relación del estadio clínico con la edad de la paciente al diagnóstico.

Hemos estudiado así mismo las relaciones que pudieran producirse entre la apoptosis y sus genes reguladores y los factores clásicos de pronóstico ya descritos. En general, estos marcadores biológicos no se relacionaron con los factores definitorios de la extensión de la enfermedad o con las características histológicas. Es de resaltar la mayor tasa de apoptosis que presentaron los tumores de estirpe adenocarcinoma frente a los epidermoides (p<0,032) y la mayor expresión de P53 entre los tumores mas indiferenciados (p<0,049)(Figura 4).

Figura 4.- Relación entre apoptosis y P53 con características histológicas.

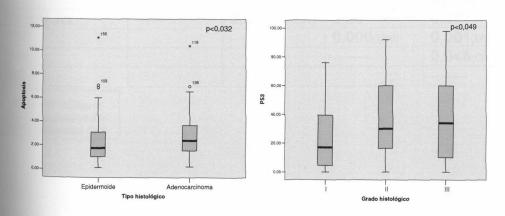


Tabla 1 Relación de la apoptosis y genes reguladores con los factores clásicos de pronóstico					
	Estadio	Histolog.	Grado	Edad	
Estadio		<b>0,067</b> (Ch <sup>2</sup> )	0,76	<b>0,032</b> (AT)	
Histologia			0,14	0,40	
Grado				0,28	
Ganglios				0,56	
Edad					
Apoptosis	0,41	<b>0,032</b> (MW)	0,18	0,49	
P53	0,32	0,41	<b>0,049</b> (KW)	0,10	
Bax	0,26	0,59	0,046(Ch2)	0,19	
Bcl-2	0,39	0,94	0,97	0,34	

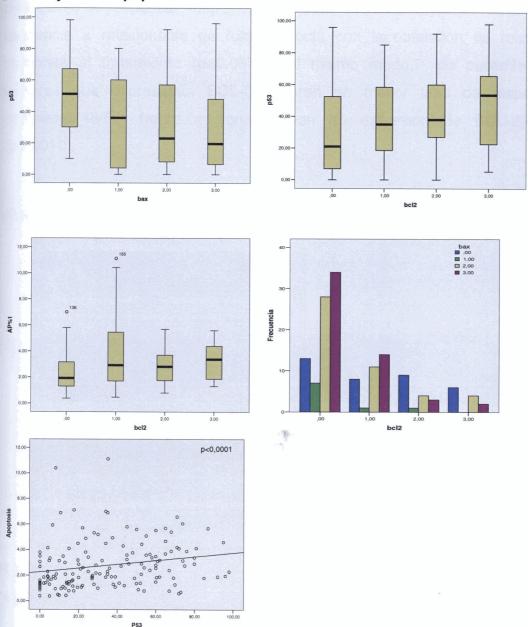
(AT): Anova Test (Ch<sup>2</sup>): Chi cuadrado (KW): Kruskall-Wallis (MW): Mann-Withney (TT): T- test

Tanto la apoptosis como los genes reguladores estudiados se relacionaron estrechamente entre si, salvo la expresión de BAX y el índice apoptótico.(Tabla 4;Figura 5). Efectivamente la presencia de altos índices apoptóticos, se relacionó estrecha y directamente con la sobrexpresión de P53 y BCL-2. Además BCL-2 y BAX presentaron una estadísticamente significativa relación inversa en su expresión proteica.

Tabla 2 Relaciones observadas entre la expresión de los genes reguladores entre si y con la apoptosis				
	I.A.	P53	BAX	BCL-2
Apoptosis		<b>0,000</b> (SR:0,31)	0,80	<b>0,003</b> (MW)
P53			0,000(MW)	<b>0,001</b> (MW)
Bax				<b>0,048</b> (Ch <sup>2</sup> )
Bcl-2				

(Ch²): Chi cuadrado (KW): Kruskall-Wallis (SR): Spearman Rho

Figura 5.- Relaciones observadas entre la expresión de los genes reguladores entre si y con la apoptosis.



La respuesta a los tratamientos oncológicos, control locorregional ,a distancia y la supervivencia absoluta y causa específica, observada en nuestra serie incluye exclusivamente a aquellas pacientes referidas a tratamientos oncológico curativos, obviándose para este tipo de análisis las enfermas (18 casos) tratadas con medidas de intención paliativa.

De entre las 151 enfermas referidas a tratamiento de irradiación radical asociada o no a quimioterapia, 110 consiguieron una respuesta completa de la enfermedad una vez finalizado el tratamiento (72,84%). Solo el estadio clinico(p<0.0001), influyó en la posibilidad de obtener una respuesta completa, sin embargo ni la edad, el tipo histológico o el grado de diferenciación fueron predictivas de respuesta terapéutica completa. El índice apoptótico mostró una tendencia a relacionarse de forma directa con la obtención de respuesta completa al tratamiento (p<0,087). Del mismo modo, las pacientes con tumores que expresaban BCL-2 tuvieron un mayor tasa de respuestas completas(46/52) frente a aquellas con no expresión de BCL-2(43/63) (p<0,010).

Figura 6.- Relación de la apoptosis con la respuesta a irradiación.

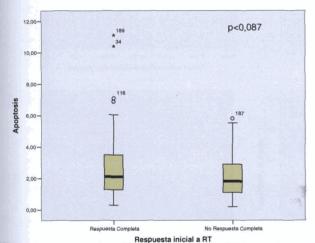


Tabla 3.- Relación entre la expresión de BCL-2 y la obtención de respuesta completa tras radioterapia.

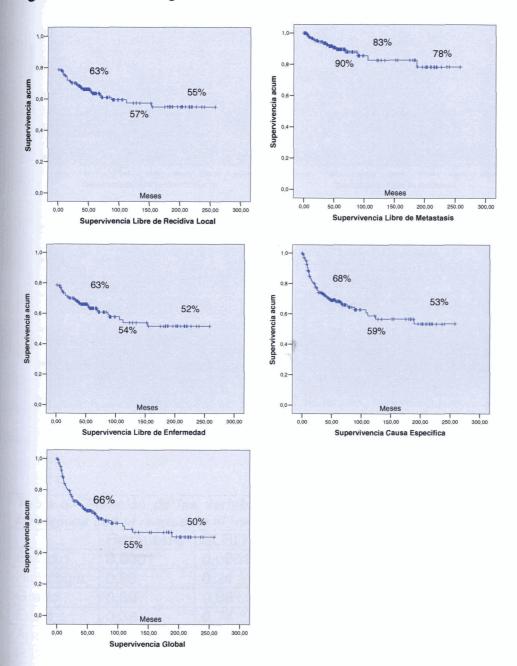
BCL-2 Negativa BCL-2 Positiva Valor de p

	BCL-2 Negativa	BCL-2 Positiva	Valor de p
R. Completa	43	46	
No Respuesta	20	53	0,010

Realizamos un análisis de regresión logística en el intento de conocer la relevancia de los diversos factores analizados en nuestra serie en la descripción de las variables respuesta a radioterapia. Solo el estadio clínico resultó predictivo en dicho análisis.

Las tasa de supervivencia y supervivencia libre de recaída, bien local o a distancia se muestran en la Figura 6. Dado el largo periodo de estudio de nuestra serie, podemos, que la Supervivencia Libre de Enfermedad o la Supervivencia Globlal, se sitúan en torno al 50% a 20 años. Resulta evidente de nuestro estudio, la moderada tendencia a la metastatización a distancia de este tipo de tumores, pues el 78% de las enfermas estaban libres de recidiva distal tras 20 años de seguimiento.

Figura 6.- Resultados generales de la serie.



La extensión de la enfermedad ha sido el único factor pronóstico que ha alcanzado significación estadística en nuestra serie (Figura 7). El análisis realizado para el resto de los factores no ha alcanzado significación estadística(Tabla 5).

Figura 7.- Estadio clínico y resultados del tratamiento

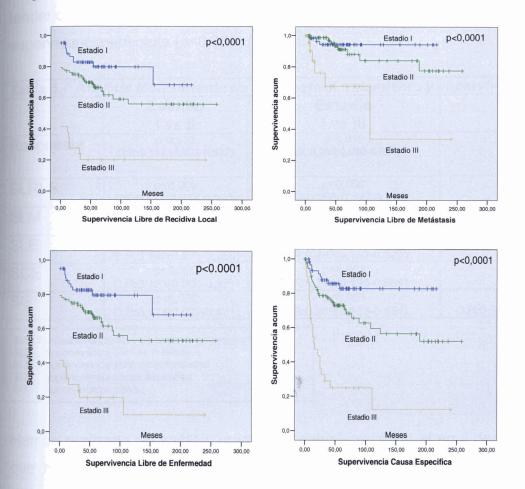


Tabla 5 Relación de las variables clásicas de pronóstico y los marcadores biológicos con la respuesta al tratamiento y la supervivencia.						
	Respuesta	SLRLR	SLM	SLE	SCE	SG
Estadio	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Histologia	0,99	0,24	0,36	0,34	0,45	0,60
Grado	0,59	0,86	0,94	0,93	0,50	0,59
Edad	0,38	0,77	0,30	0,47	0,29	0,10
Apoptosis	0,087	0.50	0,11	0,46	0,48	0,33
P53	0,91	0,40	0,77	0,38	0,29	0,33
Bax	0,58	0,59	0,50	0,55	0,84	0,91
Bcl-2	0,010	0,28	0,34	0,20	0,34	0,55

SLRLR:supervivencia libre de recidiva loco-regional

SLM: supervivencia libre de metástasis SLE: supervivencia libre de enfermedad SCE: supervivencia causa especifica

SG: supervivencia global

En el análisis multivariante mediante el test de Cox se han incluido todas las variables descritas en el presente estudio. Solo el estadio clínico ha sido significativo en para la predicción de supervivencia, observándose una débil tendencia hacia la significación para los niveles de P53 en el estudio de la supervivencia absoluta (p<0,088) (Tabla 6).

Tabla 5 Análisis Multivariante de respuesta al tratamiento y supervivencia.				
	Estadio I vs II	Estadio I vs III	P53	
Respuesta	p<0,007 O.R:0,108;(0,022-0,537)	p<0,019 O.R:0,256(0,082-0,801)		
SLRLR	p<0,000 OR:0,171(0,074-0,393)	p<0,000 O.R:0,255(0,127-0,515		
SLM	p<0,020 O.R:0,091(0,012-0,683)	p<0,005 O.R:0,102(0,021-0,505)		
SLE	p<0,000 O.R:0,169(0,073-0,389)	p<0,000 O.R:0,262(0,131-0,525)		
SCE	p<0,000 O.R:0,153(0,060-0,391)	p<0,001 O.R:0,270(0,128-0,569)		
SG	p<0,000 O.R:0,174(0,072-0,421)	p<0,001 O.R:0,309(0,153-0,624)	p<,088 O.R:0,988(0,974-1,002)	

SLRLR:supervivencia libre de recidiva loco-regional

SLM: supervivencia libre de metástasis SLE: supervivencia libre de enfermedad SCE: supervivencia causa especifica

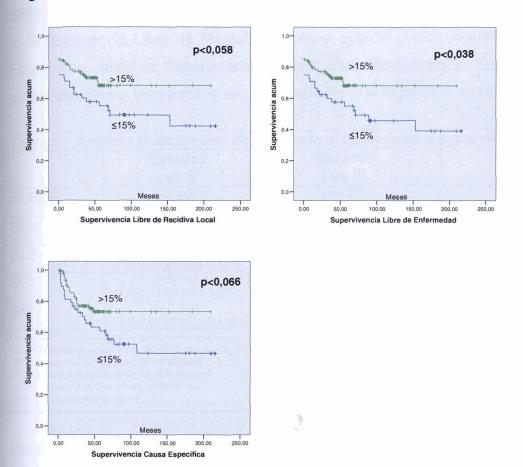
SG: supervivencia global

Hemos realizado un análisis marginal y complementario al aquí descrito, en el que hemos tratado de descubrir la existencia de un valor de IA y P53 que pudieran tener impacto en la supervivencia, convirtiendo las variables contínuas en variables categóricas. Los puntos de corte utilizados para IA y P53, que son variables con distribución de sus valores no normales, fueron la mediana y los tertiles o cuartiles de la distribución. Ninguna de las dos variables alcanzó valor predictivo cuando fue segregado en dos grupos usando la mediana de la distribución. Se eligieron posteriormente como punto de corte el valor que separa el tertil o cuartil mas bajo del resto.

El índice apoptótico mayor o menor de 1,15%, no resultó predictivo para ninguna variable de supervivencia. Sin embargo, en el conjunto de las

pacientes, una alta expresión de P53 por encima del 15%, se relacionó con mejores tasas de control loco-regional (p<0,058), de supervivencia libre de recidiva (p<0,038) y de supervivencia causa especifica (p<0,066). No se alcanzó significación estadística en el estudio de la supervivencia libre de metástasis (p<0,79) ni supervivencia global (p<0,12).

Figura 7.- P53 y resultados del tratamiento.



Sin embargo, estos resultados fueron más relevantes cuando consideramos el papel predictivo de P53 entre las pacientes estadio II y entre aquellas que recibieron como tratamiento principal irradiación exclusiva, asociada o no a quimioterapia (Tabla 6). Efectivamente, en estas situaciones de pacientes estadios II y de aquellas sometidas a irradiación radical, los niveles de expresión de P53 en el tumor fueron capaces de predecir no solo el control loco-regional (p<0,029 y p<0,028, respectivamente), y la Supervivencia Libre de Enfermedad (p<0,011 y p<0,009, respectivamente), sino también la Supervivencia Causa Especifica (p<0,012 y p<0,016, respectivamente) y la Supervivencia Global (p<0,037 y p<0,030, respectivamente).

Así mismo, hemos realizado un análisis de Cox para determinar los factores clásicos y los marcadores biológicos que se asocian a la supervivencia de los pacientes, incluyendo en este análisis todas las variables descritas en el presente estudio.

En cuanto al análisis multivariante de Supervivencia Libre de Recidiva Loco-Regional, el estadio clínico(p<0,0001) y la expresión de P53(segregada en ≤5% y >15%)(p<0,056) resultaron las variables explicativas del modelo. Para la Supervivencia Libre de Metástasis solo el estadio clínico resultó relevante. Finalmente, tanto la Supervivencia Causa Especifica como la Supervivencia global estuvieron bien explicadas por el estadio y la expresión de P53.

Tabla 5 Análisis Multivariante de respuesta al tratamiento y supervivencia.					
	Estadio	Estadio	P53		
l	l vs II	i vs III			
SLRLR	p<0,000	p<0,000	p<0,056		
	OR:0,176(0,077-0,406)	O.R:0,278(0,138-0,560)	O.R:1,932(0,982-3,800)		
SLM	p<0,022 O.R:0,097(0,013-0,710)	p<0,008 O.R:0,116(0,024-0,565)			
SLE	p<0,000	p<0,000	p<0,043		
	O.R:0,175(0,076-0,403)	O.R:0,287(0,143-0,575)	O.R:2,002(1,023-3,196)		
SCE	p<0,000	p<0,001	p<0,014		
	O.R:0,147(0,057-0,377)	O.R:0,291(0,138-0,611)	O.R:2,556(1,210-5,400)		
SG	p<0,000	p<0,002 ,332	p<0,023		
	O.R:0,172(0,071-0,419)	O.R:0,332(0,165-0,670)	O.R:2,222(1,119-4,412)		

SLRLR:supervivencia libre de recidiva loco-regional

SLM: supervivencia libre de metástasis SLE: supervivencia libre de enfermedad SCE: supervivencia causa especifica

SG: supervivencia global

#### DISCUSION

En la serie de pacientes aquí descrita encontramos características propias del tumor que reflejan la situación real de esta enfermedad neoplásica en nuestra provincia. Efectivamente predominan los estadio I-II, pero sigue existiendo una proporción significativa de estadios avanzados (21%). La distribución por tratamientos así mismo, refleja las tendencias terapéuticas y la extensión de la enfermedad que portan las pacientes que nos son referidas. Es de resaltar que a pesar de la cuidadosa selección de los casos remitidos a cirugía 24/32(66%) recibieron RT postoperatoria. En el momento actual, nuestro grupo de estudio sería de los mas amplios publicados con respecto a la apoptosis con 201 pacientes, con un seguimiento medio de 7 años que en algunos casos llega a los 20 años de control clínico.

La expresión de P53 con BAX y BCL-2 una inversa y otra directa, muestra a nuestro juicio de forma inequívoca, que parte de la expresión proteica medida corresponde a P53 mutada o secuestrada, ineficiente en su papel de control de ciclo, por lo que se relacionará con elevados niveles de proliferación y por tanto de apoptosis espontánea (Lera et al 1998, Lara et al 1999), teniendo en cuenta la estrecha relación observada entre ambos fenómenos en las series publicadas. Desde este punto de vista, es lógica la relación directa entre BCL-2 y apoptosis. Es relevante señalar que BAX y BCL-2 muestran expresiones relacionadas pero inversas, siendo mayor la expresión de BAX en casos BCL-2 negativos y viceversa. Este resultado confirma aún más la solidez de los estudios por nosostros realizados, al observarse en tumores clínicos la expresión de genes cuya relación era conocida en estudios in Vitro. Podemos por tanto describir una situación, en la que una expresión elevada de P53 correspondiente en parte a proteína mutada con mayor vida media, por tanto inactiva, coincide con expresiones bajas de BAX y altas de BCL-2, favoreciendo la proliferación, por abrogación del Check Point G1 y por reenvio celular al ciclo por parte de BCL-2. Las altas tasas de apoptosis espontánea observadas corresponden al proceso homeostático con la proliferación ya descrito previamente.

Si bien el estudio del I.A. no ha resultado de una gran relevancia pronóstica, hemos de resaltar que en consonancia con lo publicado por (Meyn et al) las pacientes con altos índices apoptóticos mostraron una cierta tendencia estadística hacia mejores tasa de respuesta completa (p<0,087), al igual que los tumores con sobreexpresión de BCL-2(p<0,010). Este hecho podría venir explicado por una mejor respuesta de los tumores que mostrarían tendencia hacia una mayor destrucción tumoral inmediata en casos de alta proliferación(). Este hecho previamente descrito por otros autores () estaría justificado por la rapidez de la expresión el daño inducido por radiación en tumores altamente proliferativos.

Las tasas de supervivencia generales mostradas en nuestra serie de pacientes son alentadoras. Así aproximadamente la mitad de las enfermas estará libre de recidiva locorregional, recurrencia o muerte por tumor a los 20 años de seguimiento. Además se confirma en nuestra serie que la tendencia a la metastatización es muy reducida en este tipo de pacientes, concentrándose de

forma mayoritaria en las pacientes que consultan para tratamiento portando tumores localmente avanzados(referencia).

Resulta evidente en nuestro estudio que el estadio clínico es el principal factor pronóstico para la estimación de las variables de supervivencia. Analizada la expresión de oncoproteínas, ni la apoptosis, ni sus genes reguladores resultaron predictivos en análisis bivariantes ni multivariantes, salvo excepción hecha de una cierta tendencia hacia predicción de supervivencia de P53 en Supervivencia Global(p<0,088) y menor para Supervivencia Causa Especifica (p<0,11).

Segregando los valores de P53 en dos grupos, uno de muy baja expresión(≤15%) frente a los de alta expresión (>15%) se objetivó un importante papel predictivo para P53 en todos los análisis de supervivencia menos en Supervivencia Libre de Metástasis, especialmente en los estadíos II y en pacientes sometidas como tratamiento fundamental a irradiación. Incluso, cuando en el análisis multivariante se introduce la variable P53 segregada en los dos grupos previamente descritos, alcanza significación estadística junto con el estadio clínico en todas las variables de supervivencia excepto en Supervivencia Libre de Metástasis.

La aparente diferencia de resultados podría ser explicada si tenemos en cuenta que en el análisis de la variable mediante Cox simple como variable continua, lo que nos dice el modelo es que incrementos o decrementos porcentuales de la variable no se relacionan de forma proporcional con modificaciones de la supervivencia. Sin embargo, la segregación de la variable por un punto preestablecido (tertiles) permite identificar valores de la variable que definen grupos de comportamiento desigual. De tal forma que si bien parece existir un papel predictivo para P53 este podría no ser uniforme a todos los niveles de expresión de la misma.

Parece observarse en nuestra serie una tendencia hacia una mejor control local, y supervivencia para los tumores con mayor expresión de P53. Especialmente en tumores estadio II y sometidos a irradiación. Este hecho podría entrar en contradicción con el definitivo papel que la acumulación de P53 alterada tiene en la proliferación y progresión de los tumores. Tres aspectos pueden en nuestra opinión ser tenidos en cuenta a la hora de explicar los presentes resultados. Por una parte, es sabido que la infección por HPV presente en la

mayoría de los tumores de cérvix uterino, se asocia con el secuestro de P53 dando lugar a elevadas tasas de detección de la proteína en estudio inmunohistoquímicos. Sin embargo la infección por HPV se asocia en cáncer de cérvix uterino y de cabeza y cuello con un mejor pronóstico tras tratamientos de irradiación.

De otra parte, la capacidad de detección de los distintos anticuerpos disponibles en el mercado y la variabilidad de las tinciones utilizadas () pueden justificar las divergencias que en cuanto a resultados se observan en distintas publicaciones. En nuestro caso hemos utilizado el clon D07, uno de los más ampliamente incluidos en los protocolos patológicos de la mayoría de los hospitales europeos y americanos. La inmunohistoquímica realizada con D07, suele ofrecer tasas de positividad mayores que otros anticuerpos (), probablemente a través del reconocimiento de P53 salvaje. Este hecho ha sido estudiado por nuestro grupo (Apolinario et al), demostrando en cáncer de pulmón una diferente capacidad pronóstica en distintos tipos de anticuerpos, resultando en este caso que niveles elevados de la proteína pudieran asociarse a mejores resultados clínicos. La relación entre la capacidad de detectar P53 según diferentes anticuerpos en pacientes con infección por HPV no ha sido aún descrita.

Finalmente, no es de extrañar, que las ventajas observadas para las pacientes con P53 elevadas, se observen en cuanto al control local y por ende a la recidiva y la supervivencia. Es relevante recordar que el control local es la primera causa de recaída y muerte en estas pacientes, siendo la afectación metastásica poco importante en cuanto a su frecuencia de aparición. Parece despenderse de nuestro estudio y otros () que una mayor tasa de proliferación podría asociarse a mayores tasas de respuestas tumorales tras irradiación y de esa forma incidir en el pronóstico.

Ha de quedar claramente discutido aquí, que en el análisis de Cox simple y multivariante realizado, ninguna variable de carácter biológico ha resultado predictiva de supervivencia en análisis bi- o multivariante, por lo que las hipótesis aquí reflejadas tratan de arrojar luz sobre un hallazgo marginal, pero que no debía oscurecerse, de nuestro presente estudio. Por tanto la importancia que debe concedérsele ha de estar en consonancia con la metodología usada y los resultados obtenidos.

Podemos concluir que la apoptosis y sus genes reguladores P53, BAX y BCL-2, mostraron estrechas relaciones entre sí, orientadas hacia que la alteración de P53 se asocia incapacidad de control de ciclo celular que llevaría a proliferación incrementada, sobreexpresión de BCL-2 que actuaría en el mismo sentido y represión de BAX que limitaría la inducción de apoptosis tras el daño al DNA. La presencia de altas tasa de apoptosis espontánea en el presente escenario, tiene que ver por tanto, no con una alteración de su control mediada por los genes estudiados, sino como un mecanismo homeóstático con la proliferación que se encontraría incrementada.

Es necesario en nuestra opinión, indagar en el conocimiento del fenómeno proliferativo en los tumores de cérvix uterino y en la expresión de sus genes reguladores, para conocer de forma conjunta el alcance pronóstico de las modificaciones que puedan aparecer en el sistema apoptosis/proliferación.

IGF-1R Y CICLINA D1
EN EL ESTUDIO DE LA
PROLIFERACIÓN EN EL
CARCINOMA DE CÉRVIX.
RELACIÓN CON LA APOPTOSIS
Y PAPEL PREDICTIVO EN
PACIENTES CON LARGO
SEGUIMIENTO.

IGF1-r y CICLINA D1 EN EL ESTUDIO DE LA PROLIFERACION EN EL CARCINOMA DE CERVIX. RELACION CON AL APOPTOSIS Y PAPEL PREDICTIVO EN PACIENTES CON LARGO SEGUIMIENTOMATERIAL Y METODOS

### RESUMEN

Antecedentes: El cáncer de cérvix uterino es todavía una enfermedad frecuente en nuestro medio, utilizándose diversos tratamientos locales en función de la extensión de la enfermedad. La posibilidad de predecir la respuesta de los tumores a una u otra opción terapéutica que permitiera elegir el mejor tratamiento en cada caso. Si bien la apoptosis y especialmente la expresión de P53 parecen ser de utilidad predictiva, su posible relación con la proliferación merece ser estudiada. IGF1-r tiene un importante papel en la regulación de ambos procesos y no existen datos en la actualidad sobre su papel en cáncer de cervix.

Objetivo: Conocer la expresión de IGF1-r en pacientes de cáncer de cervix y describir la posible relación con Ciclina D1 y la proliferación estimada por el Indice Mitótico(I.M.) y la expresión de Ki67. Profundizar en el conocimiento de la regulación por parte de IGF1-r de los procesos de apoptosis y expresión génica de P53,BAX y BCL-2. Definir el papel predictivo de respuesta tumoral y supervivencia que tienen la proliferación y susu genes reguladores

Material y Métodos: En en este estudio hemos incluído 201 pacientes con carcinoma infiltrante localizado de cervix scon un seguimiento medio de 84,74 meses (I.C.95%72,37-97,12 meses) máximo de 258 meses (21,5 años). Treinta y dos pacientes pacientes (15,9%) recibieron como tratamiento principal cirugía, y 151 (75,1%) radioterapia (RT). Dieciocho casos(9%) fueron tratados de forma paliativa por deterioro del estado general y progresión de la enfermedad. Se determinó la proliferación mediante técnicas histológicas la apoptosis (IA) y genes reguladores (IGF1-r, Ciclina D1). Se utilizó tinción de hematoxilina-eosina (IM), y técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) para la determinación de Ki67, IGF1-r, Ciclina D1. Se analizó la relación entre estas variables, su relación con factores clásicos de pronóstico, y su valor como factores predictivos de respuesta, control local y supervivencia.

Resultados: Observamos una débil relación entre la proliferación y los genes reguladores estudiados. Sin embargo, la proliferación estimada medinte Ki67 se relacionó estrecha y directamente con la apoptosis(p<0,0001), la expresión de P53(p<0,0001) y BCL-2 (p<0,001) e inversamente con la expresión de BAX (p<0,008). La expresión de IGF1-r se relacionó directamente con la proliferación (p<0,087), la apoptosis (p<0,054) y la expresión de BCL-2(p<0,006) e inversamente con la expresión de BAX(p<0,082). Existe una estrecha relación entre la sobreexpresión de Ciclina D1 y el estadio clínico (p<0,010). Además, los tumores que portan las pacientes de mayor edad resultaron tener mayor expresión de IGF1-r(p<0,059) y ser mas proliferativos (Ki67 (p<0,056).

Se pudo valorar la respuesta en las 151 pacientes tratadas con RT radical, presentando remisión completa 110 de ellas (72.8%). Los tumores más avanzados (p<0.001) obtuvieron peor tasa de respuesta inmediata de la enfermedad a la irradiación. La Supervivencia Libre de Enfermed (SLE) de la serie a los 20 años fue del 52% y la Supervivencia Causa Especifica(SCE) del 53%. La expresión de Ciclina D1 fue el único factor biológico estudiado que resultó predictivo en el análisis bivariante. En el análisis multivariante, la expresión de Ki67 y de BCL-2 contribuyeron a definir el modelo de supervivencia Libre de Metástasis y P53 mostró un cierto papel en la predicción de la Supervivencia Causa Especifica y Global. Marginalmente, pudimos demostrar que las pacientes que portaban tumores P53+/Ciclina D1-, obtuvieron mejores tasas de superviencia que el resto de los casos.

### Conclusión:

La expresión de IGF1-r se relacionó con la apoptosis y sus genes reguladores BAX y BCL-2. Sin embargo, no fue útil en predecir la supervivencia. La Ciclina D1 se ha revelado como un factor pronóstico de primer orden para la supervivencia en análisis univariantes y multivariante. La expresión combinada de genes ha permitido identificar subgrupos de pacientes con excelente supervivencia (P53+/Ciclina D1-)

### INTRODUCCION

El IGF-1R, o receptor de *Insuline Like Growth Factor-1* participa en el crecimiento celular además de jugar un papel importante en el proceso metastásico regulando la migración celular, invasión y angiogenesis.

Es una molécula transmembrana con actividad tirosin kinasa que se expresa en muchos tipos celulares y presenta una alta secuencia de homología con el receptor de la insulina. Se expresa mayoritariamente en tejidos que juegan un rol en el crecimiento tisular, principalmente via hormona de crecimiento, la cual estimula la producción de IGF-1 para activar el IGF-1R. La unión de IGF-1R a IGF-1 conducen a la activación de distintas rutas de señalización. Una de ellas activa Ras, Raf, y MAPK, la ruta principal de transducción mitógena, y la otra es responsable de la transducción de la señal antiapoptótica, implicando PI3K (Lin J 1999). Su activación previene la apoptosis y estimula la proliferación celular o diferenciación (Navarro and Baserga 2001). Además, el IGF-1R activado regula la adhesión, organización del citoesqueleto y migración a través de la interacción con moléculas de adhesión e integrinas (Gray et al, 2003).

Por otro lado, IGF-1R parece ser crucial en el crecimiento independiente de anclaje, una propiedad única de las células tumorales. Además, estudios recientes han observado que la pérdida de oncogenes supresores, como de la activación de proto-oncogenes, está relacionada con la función y actividad de IGF-1R (Werner et al,2000;Girnita et al,2003;Zhao et al,2004). Estos estudios demuestran la existencia de una ruta p53/MDM2/IGF-1R en la cual las señales son propagadas en ambas direcciones. Cambios que conducen al aumento de distribución de MDM2 en el núcleo celular inactivando p53, pueden contribuir a un crecimiento avanzado de las células tumorales por sobreexpresión de IGF-1R.

En los últimos años se ha observado que IGF-1R también juega un rol significante en la efectividad de la señalización intracelular. Hay estudios que han observado una interacción entre el IGF-1R y el EGFR (Adams et al,2004). En cultivos epiteliales humanos, hay un efecto sinergístico de IGF-1 y EGF o TGF- $\alpha$  en la promoción de la síntesis de DNA, aunque en la ausencia de IGF-1, EGF carece de efecto (Stull et al,2002). Tanto IGF-1 como EGF inducen la expresión de ciclinas D, pero únicamente IGF-1 activa a la ciclina E, la cual se requiere para atravesar el checkpoint G1-S. De este modo, IGF-1 no solo

estimula la progresión del ciclo celular en células epiteliales humanas, sino que es esencial para que la progresión mediada por EGF atraviese el Checkpoint G1-S.

Varios receptores de factores de crecimiento se han asociado con la radioresistencia de la célula tumoral. La transducción de la señal radioinducida interacciona con las rutas de señalización de IGF-1R que siguen a la activación de PI3K.

Se han identificado a IGF-1R como una proteína capaz de inducir radioresistencia en cáncer de mama, ya que la inhibición de la función de IGF-1R incrementa la respuesta del tumor a la irradiación en cánceres de mama y colon (Wen B. et al 2001). En el estudio de Cosaceanu et al, (2005) se estudia la expresión de IGF-1R en líneas de cáncer de pulmón no pequeñas (NSCLC). La inhibición de IGF-1R combinada con la irradiación da lugar a un descenso en la muerte celular radioinducida en 5 de 6 líneas de cáncer NSCLC, normalmente resistentes a la radiación ionizante.

Entre los receptores tirosin kinasas, IGF-1R es particularmente importante por su efecto anti-apoptótico frente a la radiación ( Kulik G et al 1997) .Un posible mecanismo que puede contribuir a la influencia de IGF-1R en el bloqueo de la radiosensibilidad incluye la ATM kinasa. Tanto Macaulay et al(2001) como Peretz et al (2001)han mostrado que la inhibición de IGF-1R incrementa la radiosensibilidad, una inhibición que está directamente conectada con la expresión y señalización de ATM (ataxia telangiectasia mutada). No se conoce muy bien los mecanismos biológicos por los cuales este tratamiento combinado induce un efecto antitumoral. Es también posible que otros mecanismos de IGF-1R induzcan radioresistencia.(Cosaceanu et al 2005)

Hay muy pocos estudios sobre la expresión de IGF-1R en carcinoma cervical. Steller et al(1996) observaron que la sobreexpresión de IGF-1R era un componente importante que controlaba la proliferación en células de carcinoma cervical. En el estudio de Hirano et al realizado en 32 pacientes con carcinoma de cérvix, no se observó ninguna relación entre una alta expresión de IGF-1R y las características clínicas del paciente. (Hirano S. et al 2004)

Por tanto la relación de IGF1-r con la proliferación ha de ser estudiada a través de su relación con las ciclinas, pero también con la apoptosis y sus genes reguladores, que podrian estar implicados en su mecanismo de acción.

El objetivo el presente estudio es conocer la expresión de IGF1-r en pacientes de cáncer de cervix y describir la posible relación con Ciclina D1 y la proliferación estimada por el Indice Mitótico(I.M.) y la expresión de Ki67. Profundizar en el conocimiento de la regulación por parte de IGF1-r de los procesos de apoptosis y expresión génica de P53,BAX y BCL-2. Definir el papel predictivo de respuesta tumoral y supervivencia que tienen la proliferación y sus genes reguladores.

### MATERIAL Y METODOS

Los datos con respecto a las características de las pacientes, de la extensión de sus tumores y de los tratamientos realizados son idénticas a las descritas en el capitulo 3 de esta obra. Se incluyen aquí nuevamente dichas características, en el intento de permitir la lectura y análisis del presente capítulo contando en el mismo con toda la información que pudiera resultar pertinente.

# **Pacientes**

Se han incluido en este estudio 201 pacientes afectas de carcinoma localizado de cérvix uterino tratadas y seguidas por los Servicios de Ginecología Oncológica y Oncología Radioterápica, componentes del Comité de Tumores Ginecológicos de la Provincia de Las Palmas de Gran Canaria desde hasta Diciembre de 2004, con un seguimiento medio de 84,74 meses (I.C.95%72,37-97,12 meses) máximo de 258 meses (21,5 años).

En todos los casos se había realizado una biopsia para confirmación histológica del diagnóstico. Las características generales de las pacientes se detallan en la Tabla 1. La edad media fue de 53,34+/-13,48 años (rango 26-89)(distribución normal,test Kolmogorov-Smirnoff). Las pacientes se estadiaron siguiendo los criterios de la FIGO, realizándose exploración ginecológica y TAC abdomino-pélvico, y en los casos que fue preciso rectoscopia y cistoscopia.

La mayoría portaban tumores epidermoides (173 casos,86,1%) en estadios mayoritariamente precoces (I(30,8%)-II(47,8%)). La afectación ganglionar fue

investigada bien por métodos de imagen o en el acto quirúrgico en 134 casos, clasificandose como positiva en 18 casos(13,4%).

Los tratamientos realizados variaron según el estadio de la enfermedad y el estado general de la enferma, así como el devenir propio de los conocimientos científicos de cada época. Así, las pacientes con tumores precoces I-IIA fueron remitidas inicialmente a cirugía (32 casos,15,9%) en 24 de ellos se indicó además irradiación postoperatoria, por la existencia de factores de riesgo de recurrencia local, como afectación ganglionar, bordes afectos o afectación parametrial. En las pacientes con tumores más avanzados o en enfermas no susceptibles de cirugía, el tratamiento prescrito fue la irradiación exclusiva(151 casos, 75,1%,) asociada(65 casos) o no (86 casos) a quimioterapia. En pacientes con mal estado general y tumores muy avanzados (18 casos,9%) el tratamiento fue meramente paliativo, incluyendo la irradiación a dosis bajas como tratamiento del dolor, del sangrado etc.

La cirugía practicada fue en todos los casos histerectomía radical tipo II-III con linfadenectomía pélvica en tiempos recientes (tipo Wertheim-Meigs), con preservación de ovarios en pacientes premenopaúsicas. La irradiación incluyó en todos los casos, tratamiento a pelvis total mediante técnica de cuatro campos en "box" con un fraccionamiento convencional de 1,8-2 Gy día hasta una dosis total de 45-50,4 Gy, seguida de braquiterapia. En los casos de irradiación postoperatoria se realizaron mediante cilindro vaginal. Hasta el año 2000, se realizó una aplicación de braquiterapia de baja tasa hasta administrar 20 Gy a punto A. Apartir del año 2000 se realizaban 3 aplicaciones de 5 Gy cada una mediante un equipo de alta tasa. En los casos de irradiación exclusiva la braquiterapia se aplicó mediante colpostatos y tandem. Hasta el año 2000 mediante 2 aplicaciones de 20 Gy cada una a punto A con un equipo de baja tasa. A partir del año 2000 se realizaron 5 aplicaciones de 5 Gy con un equipo de alta tasa. En aquellos casos que lo requirieron, se realizó boost parametrial. La quimioterapia usada en nuestra serie de pacientes (65 casos) ha sido siempre concomitante con la irradiación, incluyendo Cisplatino a dosis de 40 mgr/m² semanales, mediante infusión endovenosa durante el periodo de irradiación externa.

## Tabla 1.- Características generales de las pacientes

	Casos	Porcentaje
Estadio		
	61	30,8
11	89	47,8
	45	18,4
IVA	6	3,0
Edad		
<b>≤</b> 52 a	104	51,7
>52 a	97	48,3
Tipo Histológico		
Epidermoide	173	86,1
Adenocarcinoma	28	13,9
Grado Histologico		
	38	18,9
]]	86	42,8
111	77	38,3
Tratamiento prescrito		
Cirugía+/- Radioterapia postoperatoria	32	15,9
Radioterapia radical +/-quimioterapia	151	75,1
Paliativo	18	9,0

AJCC (2002). AJCC Cancer Staging Manual. Sixth ed. Springer Verlag: New York. UICC (2002). TNM classification of malignant tumors. Sixth ed. John Wiley & Sons: New York.

# Determinación de la apoptosis y de sus genes reguladores.

La técnica para la determinación de mitosis ya ha sido descrita por nuestro grupo (Perez S, 1998). De forma concisa, se realizó sobre secciones tumorales con un grosor de 4 micras, fijadas en formalina y teñidas con hematoxilina. Diez campos fueron analizados en cada sección tumoral, con objetivo de alto poder de aumento (400x), elegidos randomizadamente, aunque evitando las áreas de necrosis e inflamación. Los criterios para definir lasapoptosis o cuerpos apoptóticos han sido descritos previamente (Baak et al 1985). El Indice Mitótico (I.A.) fue definido como el cociente entre el número de figuras mitóticas y el número de células contabilizadas en cada tumor, expresado como porcentaje.

Para el resto de técnicas(Rey et al 1998; Apolinario et al 1997) se desparafinan las laminillas, mediante pases de xylol y etanol a distintas concentraciones (100%, 70%, 50%), 10 minutos cada pase. Posteriormente se lavan en agua destilada, y se procede a la rehidratación de las muestras, sumergiéndolas en una solución citrato durante 3 minutos a partir de la ebullición de la solución. Tras el lavado de las muestras con agua destilada, se bloquea la peroxidasa endógena mediante  $H_2O_2$  diluida en solución salina buffer fosfato (PBS), durante 10 minutos. Una vez desparafinadas, rehidratadas y bloqueada la

peroxidasa endógena, se procederá a la técnica de IHQ específica. En todas se utilizó el kit de detección de DAKO LSBA (Carpinteria, CA) que consta de: 1º Blocking Reagent, que bloquea los anticuerpos no específicos (tiempo de incubación 5 minutos), 2º Ac secundario avidin-biotina (tiempo de incubación 30 minutos). El anticuerpo primario específico se pone después del blocking reagent. La dilución y el tiempo de incubación variará según el tipo de anticuerpo a estudio. En todos los procedimientos, se utilizó un control positivo, que correspondía a un tumor con elevada positividad para el anticuerpo a estudio, y un control negativo, en el que se omitía el anticuerpo primario y se ponía PBS.

Para la detección de Ki67 se utilizó el Ac monoclonal de ratón anti-MIB1 (clona 1001, Dianota, Germany), a una dilución 1:100, con un periodo de incubación de 24 horas a 4°C. Si es positivo, se observa tinción de los núcleos de las células tumorales. Para la determinación de Ciclina D1 se utilizó el Ac monoclonal de ratón anti-Ciclina D1( AM29, Zymed), a una dilución 1:100, con un periodo de incubación de 24 horas a 4°C.

La proteína IGF1-r se expresa en el citoplasma de las células tumorales. Para la detección de IGF-1R se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón anti-IGF-1R (Ab1Clon 24-31, Neomarkers) en una dilución 1:100.

Las secciones se incubaron posteriormente con un anticuerpo secundario biotinado y posteriormente con un complejo preparado de peroxidasa estreptavidina-biotinada (Dako LSBA kit, Carpintería,CA) y se revelaron con un sustrato de tetrahidroclorhidro diaminobenzidina (Dako DAB Chromogen, Carpintería,CA) y finalmente ligeramente teñida con hematoxilina de Harris.

Como control positivo se usaron muestras tisulares con intensa positividad para los marcadores estudiados. Como control negativo, una sección de cada tanda se procesó omitiendo el primer anticuerpo.

La expresión proteica de los genes estudiados, fue estimada en las áreas de máxima expresión del marcador, en la menos diez campos con un objetivo de 400x. Cuando la expresión proteica era de localización fundamentalmente nuclear, se ha realizado una estimación cuantitativa del número de núcleos teñidos. La expresión de la oncoproteina estudiada, fue definido como el cociente entre el número de núcleos teñidos y el número de células contabilizadas en cada tumor, expresado como porcentaje En las tinciones de

localización citoplasmática se ha realizado una estimación semicuantitativa en la que en una gradación de negativo(-), débilmente positivo(+), moderadamente positivo (++) y fuertemente positivo(+++), se integran la intensidad de la tinción y la cantidad de células que expresan la proteína.

La limitación impuesta por el pequeño tamaño de la pieza a estudiar (biopsia), explica que no hayan podido obtenerse tinciones adecuadas de todos los macadores en todos los casos.

### Estadística.

Los estudios estadísticos se realizaron mediante un programa informático SPSS 13.0 licenciado a la unidad de estadística (Unidad de Investigación) del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr Negrín. Las variables codificadas como categóricas fueron contrastadas mediante el test de chi cuadrado. Las variables continuas fueron estudiadas para valorar su distribución normal versus no normal mediante el test de Kolmogorov-Smirnoff. Las variables codificadas como continuas fueron analizadas mediante estudios de correlación de Pearsons para variables con distribuciones normales y de Spearman para variables de distribución no normal. El análisis de relación entre variables categóricas y continuas se realizaron mediante análisis de Mann-Withney y Kruskall-Wallis en casos de distribución no normal y T test y análisis de Anova para variables de distribución normal. El análisis multivariante se ha realizado mediante test de regresión, lineal en caso de variables dependientes y binomial o polinomial en caso de variables categóricas.

El fallo en el control locorregional a largo plazo incluye no solo aquellas enfermas que nunca estuvieron libres de enfermedad locorregional (respuesta no completa tras irradiación), sino aquellas que estando inicialmente libres de enfermedad por irradiación o cirugía recayeron de la enfermedad.

El fallo en el control sistémico se definió como la presencia de enfermedad mas allá de la pelvis. Se definió también la supervivencia global, como la probabilidad de estar vivo al final del periodo de observación, cualquiera que fuera la causa y la supervivencia causa-especifica como la probabilidad de no morir de cáncer. La supervivencia actuarial para las variables categóricas se realizó mediante el log-rank test para el análisis bivariante. Para las variables

continuas se realizó un analisis bivariante mediante test de Cox simple. Para el análisis multivariante se usó el test de regresión de Cox.

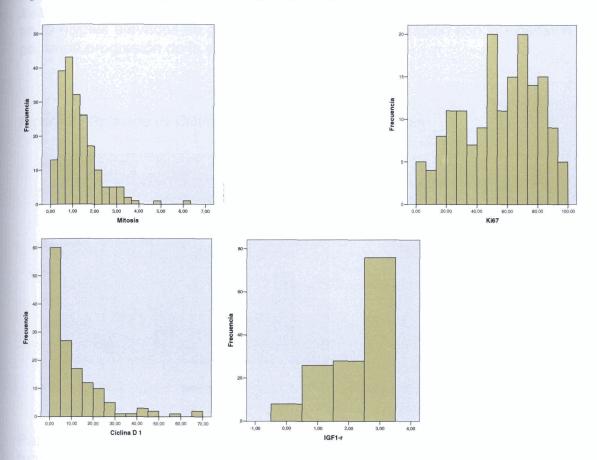
### RESULTADOS.

La expresión del fenómeno de proliferación y de su regulación génica se describen en la tabla 2. El Indice Mitótico (IM) fue estudiado en 200 casos, mostró una distribución no normal de los valores (test Kolmogorov-Smirnoff) con una media de 1,24+/-0,87%, mediana 1,05(rango 0,04-6,10). La estimación del fenómeno de la proliferación mediante la expresión de Ki67 fue posible en 164 casos (distribución normal, test Kolmogorov-Smirnoff) y mostró unos valores de 54,74+/-24,74%, mediana 57,42%(rango 0-98%). La expresión de la ciclina D1 pudo ser analizada en 141 casos, mostrando una distribución no normal (test Kolmogorov-Smirnoff) con unos valores de 9,71+/-13,34%, mediana 5%, rango(0-70%).

La expresión de IGF1-r pudo ser estimada en 138 casos, resultando negativa en solamente 8 casos (5,8%), débilmente positiva en 26(18,8%), moderadamentes positiva en 28 (20,3%) y fuertemente positiva en la mitad de los casos (55,1%;76 pacientes).

La variable categórica IGF1-r, ha sido agrupada en función de los resultados en el intento de obtener grupos numéricamente homogéneos que potencien los subsiguientes análisis. Así IGF1-r queda configurado en fuertemente positivos 76 casos, frente a 62 casos de tinción menor.

Figura 1.- Valores de proliferación (I.M. y Ki67), Ciclina D1 e IGF1-r.



Hemos realizado en primer lugar el análisis de la posible relación entre las variables clásicas de pronóstico y la proliferación y sus genes reguladores estudiados.

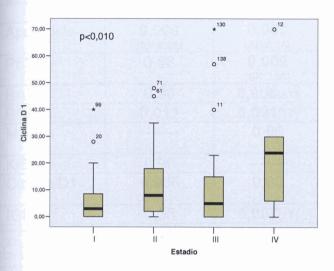
	Estadio	Histología	Grado	Edad
Mitosis	0,54	0,33	0,24	0,66
Ki67	0,98	0,10	0,81	<b>0,056</b> (PT:0,15)
Ciclina D1	<b>0,012</b> (KW)	0,38	0,29	0,53
IGF1-r	0,98	0,37	0,45	<b>0,059</b> (TT)

(AT): Anova Test (Ch<sup>2</sup>): Chi cuadrado (KW): Kruskall-Wallis (MW): Mann-Withney

(MW): Mann-Withney (PT): Correlación de Pearson

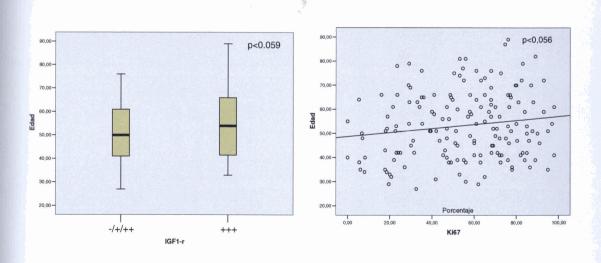
(SR): Spearman-Rho (TT): T- test La sobreexpresión de ciclina D1 está relacionada con estadios avanzados(p<0.030)(Figura 2). Este hecho conforma una estrecha relación entre niveles elevados de genes que regulan la proliferación con la extensión y por ende progresión de la enfermedad.

Figura 2.- Relación de Ciclina D1 con la extensión el tumor



Parece existir además, una relación directa entre una mayor proliferación tumoral estimada mediante la expresión de Ki67 (p<0.056) y la expresión del receptor de IGF1(p<0.059) con la edad avanzada de las enfermas.

Figura 3.- Relación de IGF1-r y Ki67 con la edad al diagnóstico.



La proliferación estimada mediante I.M. o Ki67 no se relacionan entre sí y muy débilmente con los genes reguladores estudiados (IGF1-r y Ciclina D1). Sin embargo, es de resaltar que los fenómenos de proliferación y apoptosis están

directa y estrechamente relacionados tanto estimada mediante I.M. (p<0,0001) como mediante Ki67(p<0,0001) (Tabla 4).

		sticas observad con los proceso		
	I.M.	Ki67	Ciclina	IGF1-r
Apoptosis	<b>0,000</b> (SR:0,25)	<b>0,000</b> (SR:0,34)	0,54	<b>0,054</b> (MW)
P53	0,58	<b>0,000</b> (SR:0,56)	<b>0,059</b> (SR:0,16)	0,60
BAX	0,96	<b>0,008</b> (AT)	0,92	0,082(Ch <sup>2</sup> )
BCL-2	0,011	0,001(TT)	0,39	<b>0,006</b> (Ch <sup>2</sup> )
Mitosis	May have seen some some based from	0,96	<b>0,086</b> (SR:0,14)	0,52
Ki67	0,90		0,80	<b>0,087</b> (TT)
Ciclina D1	<b>0,086</b> (SR:0,14)	0,80		0,93
IGF1-r	0,38	<b>0,087</b> (TT)	0,93	

(AT): Anova Test (Ch<sup>2</sup>): Chi cuadrado (KW): Kruskall-Wallis (MW): Mann-Withney( SR): Spearman-Rho (TT): T- test

Además de la relación con de Ki67 con la apoptosis, la expresión de P53(p<0,0001) y BCL-2 (p<0,001) se relacionó directamente con la proliferación acelerada, mientras que BAX mostró una relación inversa (p<0,008) (Figura 4).

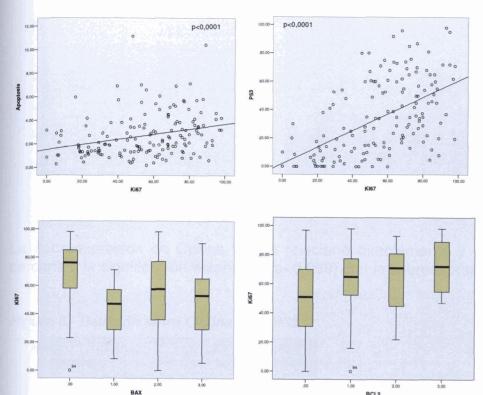


Figura 4.- Relación de Ki67 con la apoptosis y genes reguladores.

IGF1-r se ha asociado de forma directa y estadísticamente relevante a la apoptosis (p<0,054) y a BCL-2 (p<0,006). Además IGF1-r, muestra una cierta tendencia estadística hacia una relación con la proliferación estimada mediante Ki67 (p<0,087) y con el gen BAX de forma inversa. (Tabla 5)(Figura 5)

	IGF1-r Negativa	IGF1-r Positiva	Valor de p	
BCL-2 negativa	42	34		
BCL-2 positiva	19	41	0,006	
BAX negativa	15	31		
BAX positiva	42	45	0,082	

Figura 5.- Relación de IGF1-r con la apoptosis y la proliferación

La sobreexpresión de Ciclina D1 se relacionó directamente y de forma muy cercana a la significación estadística(p<0,059) con la sobreexpresión de P53.

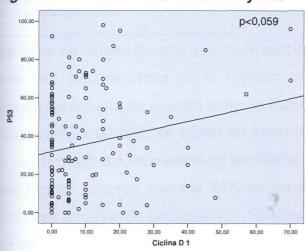


Figura 6.- Relación entre Ciclina D1 y P53

La respuesta a los tratamientos oncológicos, control locorregional, a distancia y la supervivencia absoluta y causa específica, observada en nuestra serie incluye exclusivamente a aquellas pacientes referidas a tratamientos oncológico curativos, obviándose para este tipo de análisis las enfermas tratadas con medidas de intención paliativa (Tabla 6).

De entre las 151 enfermas referidas a tratamiento de irradiación radical asociada o no a quimioterapia 110 consiguieron una respuesta completa de la enfermedad una vez finalizado el tratamiento(72,84%). Ninguno de los marcadores biológicos estudiados se relacionó con la obtención de respuesta completa a la irradiación.

	Relación de la con la respues					marcadores
	Respuesta	SLRLR	SLM	SLE	SCE	SG
Mitosis	0,89	0,74	0,31	0,63	0,48	0,33
Ki67	0,16	0,86	0,59	0,85	0,96	0,94
Ciclina D1	0,34	<b>0,095</b> O.R:1,019 (0,997-1,041)	0,17	<b>0,053</b> O.R:1,021 (1-1,043)	<b>0,049</b> O.R:1,023 (1-1,047)	<b>0,078</b> O.R:1,019 (0,998-1,044)
IGF1-r	0,22	0,49	0,64	0,49	0,92	0,76

SLRLR:supervivencia libre de recidiva loco-

regional

SLM: supervivencia libre de metástasis SLE: supervivencia libre de enfermedad SCE: supervivencia causa específica

SG: supervivencia global

Las tasa de supervivencia y supervivencia libre de recaída generales de la serie han sido descritas en el capítulo previo de esta obra. Dado el largo periodo de estudio de nuestra serie, la Supervivencia Libre de Enfermedad o la Supervivencia Globlal, se sitúan en torno al 50% a 20 años. Resulta evidente de nuestro estudio, la moderada tendencia a la metastatización a distancia de este tipo de tumores, pues el 78% de las enfermas estaban libres de recidiva distal tras 20 años de seguimiento. Además la extensión del tumor estratificada por el estadio clínico ha sido estadísticamente significativa para todas las variables de supervivencia.(Capitulo 3).

Ni la proliferación ni la expresión de IGF1-r se ha relacionado con las variables de supervivencia. Solamente la sobreexpresión de Ciclina D1 se ha relacionado con peores tasa de control locoregional (p<0,095, Odds Ratio:1,019(0,997-1,041), Supervivencia Libre de Enfermedad (p<0,053 Odds.Ratio:1,021(1-1,043), Supervivencia Causa Especifica (p<0,049 Odds.Ratio:1,023(1-1,047) y Supervivencia Absoluta (p<0,078 Odds.Ratio:1,019(0,998-1,044).

En el análisis multivariante mediante el test de Cox se han incluido todas las variables descritas en el presente estudio. Solo el estadio clinico ha mostrado ser predictivo de la respuesta a radioterapia. El estadio clínico ha resultado factor pronóstico independiente en este análisis para todas las variables de

supervivencia, con resultado mas limitado para la Supervivencia Libre de Metástasis. Junto al estadio, el tipo histológico adenocarcinoma ha resultado factor pronóstico independiente de peores tasas de supervivencia, salvo para la supervivencia global. De entre los marcadores biológicos sobreexpresión de ciclina D1 ha resultado un factor predictivo de la todas las variables de supervivencia, incluyendo la Supervivencia Libre de Metástasis. Efectivamente, en el caso de la probabilidad de Supervivencia Libre de Metástasis, no solmente el estadio, el tipo histológico y la sobreexpresión de Ciclina D1 han resultado factores pronósticos independientes, sino también la edad de la paciente al diagnóstico, la expresión de BCL-2 y la proliferación estimada mediante Ki67. Finalmente P53 parece tener un cierto papel en la predicción de la supervivencia global y algo menor en la Supervivencia Causa Especifica. (Tabla 7).

	Respuesta	SLRLR	SLM	SLE	SCE	SG
Estadio	p<0,017	P<0,000		P<0,000	P<0,000	P<0,001
	O.R:0, 094	O.R:0,166		O.R:0,164	O.R:0,134	O.R:0,167
i vs li	(0, 014-0,651)	(0,065-0,422)		(0,064-0,417)	(0,045-0,402)	(0,060-0,459)
Estadio	p<0,029	P<0,000	P<0,009	P<0,000	P<0,000	P<0,001
	O.R:0,242	O.R:0,196	O.R:0,019	O.R:0,203	O.R:0,192	O.R:0,237
<u> </u> vs	(0,068-0,863)	(0,088-0,436)	(0,001-0,375)	(0,092-0,448)	(0,079-0,465	(0,103-0,543)
Edad			P<0,026			
			O.R:1,102			
			(1,011-1,200)			
Histología		P<0,051	P<0,026	P<0,067	P<0,041	
· notologia	ì	O.R:0,409	O.R:1,102	O.R:0,435	O.R:0,346	
		(0,167-1,005)	(1,011-1,200)	(0,179-1,060	(0,125-0,957)	
P53					P<0,083	P<0,052
. 00	ĺ	{		)	O.R:0,982	O.R:0,982
	]				(0,962-1,002)	(0,964-1,000)
BCL-2			P<0,020			
			O.R:0,036			
			(0,002-0,593)		<u> </u>	<u> </u>
Ciclina D1		P<0,074	P<0,061	P<0,049	P<0,018	P<0,044
-:-:::a b :		O.R:0,021	O.R:1,074	O.R:1,023	O.R:1,031	O.R:1,025
		(0,998-1,045)	(0,997-1,158)	(1,000-1,046)	(1,005-1,057)	(1,001-1,051,
KI67			P<0,021			
			O.R:0,940			1
			(0,893-0,991)			L

SLRLR:supervivencia libre de recidiva loco-regional

SLM: supervivencia libre de metástasis SLE: supervivencia libre de enfermedad SCE: supervivencia causa especifica

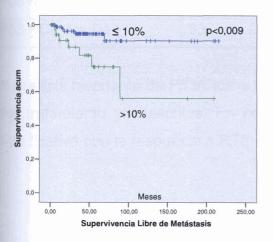
SG: supervivencia global

En las variables continuas de distribución no normal se han elegido puntos de corte cercanos a los cuartiles de la distribución. En las de distribución normal se eligió la mediana de los valores.

Hemos analizado la existencia de un valor de I.M., Ki67 y ciclina D1 que pudieran tener impacto en la supervivencia, convirtiendo las variables continuas en variables categóricas. Los puntos de corte utilizados para I.M. y Ciclina D1, que son variables con distribución de sus valores no normales, fueron la mediana y los tertiles o cuartiles de la distribución. Ninguna de las dos variables alcanzó valor predictivo cuando fue segregado en dos grupos usando la mediana de la distribución. Se eligieron posteriormente como punto de corte, la mediana en el caso de variables de distribucón normal o el valor que separa el tertil o cuartil mas bajo o mas alto del resto.

Ni índice mitótico mayor o menor de 0,63%, ni la expresión de Ki67, mayor o menor de 52%, resultaron predictivos para ninguna variable de supervivencia. Sin embargo, en el conjunto de las pacientes, una alta expresión de Ciclina D1 por encima del 10%, se relacionó con peores tasas de supervivencia libre de metástasis(p<0,009)(Figura 5).

Figura 5.- Ciclina D1 y Supervivencia Libre de Metástasis



La estratificación por estadios muestra un importante papel predictivo de Ciclina D1 que incluye además el control loco-regional(p<0,010 y p<0,021;estadios I yII), Supervivencia Libre de Enfermedad (p<0,010 y p<0,0 estadios I y II), Supervivencia Causa Especifica (p<0,007 estadios I)y Supervivencia Global(p<0,012 estadios I).

Resulta por tanto relevante un estudio combinado de los procesos de apoptosis y proliferación, siendo fundamentalmente P53 y la Ciclina D1, de entre todas las oncoproteínas estudiadas, las que parecen predecir de forma mas adecuada el porvenir de las pacientes con cáncer de cervix localizado. Parece posible por tanto realizar una combinación de ambas variables que nos podría permitir una mejor definición del resultado terapéutico en nuestra serie de enfermas.

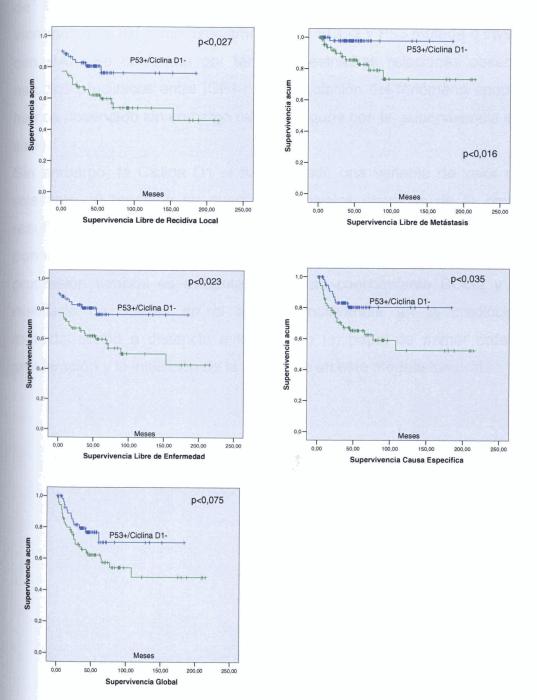
La combinación de ambas variables resulta por tanto en cuatro grupos, que se describen en la Tabla 7. Como es evidente por la relación significativa entre P53 y Ciclina D1 previamente descrita, la proporción de casos entre todos los grupos, varía en función de la coincidencia de la expresión de ambas oncoproteínas.

Tabla 8 Combinación P53/Ciclina D1	de la	s variables
	Casos	Porcentaje
P53 -/Ciclina D1 -	37	26,2
P53 -/Ciclina D1+	7	5,0
P53+/Ciclina D1 -	64	45,4
P53+/Ciclina D1+	33	23,4

La proporción de casos P53 - /Ciclina D1+ representa prácticamente la mitad de toda la serie con 64 casos (45%), por lo que ha sido enfrentada con el resto de los subgrupos definidos que representan 77 casos (55%). Hemos repetido

el análisis bivariante de P53/Ciclina D1, para todos los parámetros de resultado del tratamiento ya descritos. En primer término no se observó una relación significativa con la respuesta a RT(p<0,15).

Figura 6.- Relación de la expresión de la variable combinada P53/Ciclina D1, con la supervivencia.



### DISCUSION.

La expresión de IGF1-r en pacientes con cáncer de cervix ha sido elevada teniendo en cuenta que mas de la mitad de los casos han tenido niveles de expresión fuertemente positivos y en solo 8 casos no se ha detectado epresion de la proteina. Además IGF1-r se relaciona con proliferación y apoptosis incrementada, así como directamente con BCL-2 y P53 mutada e inversamente con BAX. Se confirman por tanto las estrechas relaciones observadas en estudios preclinicos entre IGF1-r y la regulación del fenómeno apoptótico. No hemos observado sin embargo relación alguna con la supervivencia en nuestra serie.

Sin embargo, la Ciclina D1 si ha resultado una variable de valor pronóstico relevante, si tenemos en cuenta que niveles elevados de la proteina han resultado predictivos en todas las variables de supervivencia, lo que viene a poner en claro que el estimulo inducido por ciclina en el sistema complejo de la progresión tumoral es evidente. De forma concomitante BCL-2 y Ki67 han resultado de utilidad en el análisis multivarinte en la predicción de la metastatización a distancia evidenciando un papel de primer orden para la proliferación y la inhibición de la apoptosis en este modelo tumoral.

# **CAPÍTULO V**

PREDICCIÓN DE LA TOXICIDAD
CLÍNICA RADIOINDUCIDA EN
PACIENTES CON CÁNCER DE
CÉRVIX LOCALIZADO MEDIANTE
EL ESTUDIO DE APOPTOSIS
RADIOINDUCIDA EN
LINFOCITOS DE SANGRE
PERIFÉRICA (PBLs)

PREDICCIÓN DE LA TOXICIDAD CLINICA RADIOINDUCIDA EN PACIENTES CON CÁNCER DE CERVIX LOCALIZADO MEDIANTE EL ESTUDIO DE APOPTOSIS RADIOINDUCIDA EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA(PLBS).

#### RESUMEN:

Antecedentes: El tratamiento del cáncer de cérvix incluye la cirugía o la irradiación en estadios precoces. Si bien podemos desarrollar ensayos que predigan la respuesta tumoral a uno u otro tratamiento, resulta evidente que la predicción de la toxicidad inducida por los tratamientos sería de utilidad para elegir el tratamiento mas adecuado. La determinación de la radiosensibilidad celular podría ser útil para la predecir que pacientes tienen una sensibilidad exquisita a la radiación y por tanto se les debería ofrecer otro tratamiento. Un test predictivo pre-irradiación debería cumplir una serie de requisitos como son el ser barato, rápido, con pocos falsos negativos o positivos, accesible a cualquier centro donde se pueda realizar tratamientos con RT.

<u>Objetivos</u>: Analizar el proceso de apoptosis inducida por radiación en PBLs en pacientes con cáncer de cervix, estudiar su ajuste a un modelo matemático semilogarítmico MIR =  $\beta$ .ln(Gy)+ $\alpha$ , y conocer las relaciones que las constantes de definidas por el modelo tienen entre sí y definir su papel en la predicción de la toxicidad clínica que presentan las enfermas tras ser tratadas con irradiación.

Métodos: Se incluyeron 99 pacientes afectas de carcinoma de cérvix localizado tratadas mediante cirugía +/-quimioterapia o con radioterapia radical +/-quimioterapia. Los PBLs se obtuvieron tras la centrifugación de las muestras de sangre periférica en un gradiente de densidad (Ficoll-Hipaque). La apoptosis se determinó tras marcaje con Annexina V y yoduro de propidio (IP). Se realizó un análisis por triplicado en todos los pacientes a dosis de 0,1,2 y 8 Gy en análisis a 24,48 y 72 horas. La toxicidad clínica de las pacientes se evaluó según el sistema Lent-Soma.

Resultados: La muerte inducida por irradiación (MIR) aumentaron con la dosis de radiación y el tiempo de incubación. Los valores de las constantes  $\alpha$  (valor de origen en abscisa) y  $\beta$  (incremento de la apoptosis debido al incremento de la dosis de radiación, pendiente de la curva semilogarítmica) definidas por el modelo, se relacionaron estrechamente entre si y con el intervalo de tiempo entre el inicio del tratamiento y la determinación de la radiosensibilidad. Los valores de  $\alpha$  y  $\beta$  se relacionaron con el daño inducido por la radiación en los tejidos sanos de las pacientes. En el análisis multivariante, solo la edad y los valores de  $\alpha$  y  $\beta$  a 24h, resultaron junto con el tratamiento o la dosis de radiación administrada con la braquiterapia, predictivos de la toxicidad clínica observada.

Conclusión: Es posible estimar la radiosensibilidad celular de los linfocitos de sangre periférica de una paciente mediante el estudio de la apoptosis radioinducida, con una técnica de Anexina/IP que se ajusta a un modelo matemático semilogarítmico, que permite definir variables individuales de radiosensibilidad. Los valores de  $\alpha$  y  $\beta$  observados en nuestras pacientes definen un "patrón de radiosensibilidad" individual que junto con la edad y el tratamiento recibido se han relacionado con la toxicidad clínica observada. Es necesario, sin embargo, profundizar en el conocimiento de este fenómeno en las diversas subpoblaciones linfocitarias que permitan ajustar mas adecuadamente el papel predictivo de toxicidad clínica de este tipo de ensayos.

# INTRODUCCIÓN

El tratamiento del cáncer de cérvix incluye la cirugía o la irradiación en estadios precoces. Si bien podemos desarrollar ensayos que predigan la respuesta tumoral a uno u otro tratamiento, resulta evidente que la predicción de la toxicidad inducida por los mismos sería de utilidad para elegir la opción terapéutica mas adecuada. El daño de los tejidos normales inducido por la radiación, es una de las mayores limitaciones para la curación de los tumores. Las dosis de irradiación están supeditadas a la tolerancia de los tejidos normales incluidos dentro del campo de tratamiento. Por tanto, las dosis máximas a administrar van a estar limitadas por la toxicidad mostrada por un número reducido extremadamente radiosensibles. de pacientes La determinación de la radiosensibilidad celular podría ser útil para la predecir que pacientes tienen una sensibilidad exquisita a la radiación y por tanto referirlos a otro tipo de tratamientos, incrementando la dosis de radiación en aquellos definidos como "radioresistentes". Un test predictivo pre-irradiación debería cumplir una serie de requisitos como son el ser barato, rápido, con pocos falsos negativos o positivos, accesible a cualquier centro donde se pueda realizar tratamientos con irradiación.

Las células propuestas más frecuentemente para su utilización en estudios de radiosensibilidad intrínseca han sido los linfocitos de sangre periférica, dada su facilidad de obtención y en número suficiente para los ensayos. Si bien se han utilizado otras técnicas (Capitulo 1), la búsqueda de un método más sencillo y rápido de estimar la radiosensibilidad para su uso rutinario, ha conducido al desarrollo de la técnica de análisis de la apoptosis radioinducida en linfocitos de sangre periférica (PBLs) por citometría de flujo (Ozsahin et al, 1997; Crompton et al, 1999; Barber et al, 2000; Crompton et al, 2001; Ozsahin2005). Se ha descrito una amplia variación interindividual en la tasa de apoptosis radioinducida, que relaciona bajas tasas de apoptosis con mayor toxicidad clínica (Ozsahin et al 1997). Efectivamente existen diferencias estadísticamente significativas de las tasas de apoptosis radioinducida en pacientes normales, pacientes radiosensibles y homocigotos para la Ataxia-Telangiectasia (AT) (Crompton et al, 1999). Barber et al (2000), utilizando un método similar, con la

estimación de la apoptosis por marcaje TUNEL, observó un porcentaje muy reducido de apoptosis radioinducida en homocigotos AT (4.7%) y moderadamente disminuido en heterocigotos AT (17.7%), comparado con los porcentajes en pacientes con cáncer de mama y controles sanos (21.6% y 29.9% respectivamente), no demostraron relación con la toxicidad a dosis únicas de 4 Gy y 24 horas de incubación.

Nuestro grupo utiliza una técnica de determinación de Annexina –loduro que permite la detección precoz de apoptosis, con la que hemos observado que la apoptosis radioinducida aumenta con la dosis administrada y el tiempo de incubación(Pinar 2000). Este aumento en la tasa de apoptosis dosis-dependiente no sigue una función linear, de manera que aumentos de dosis administrada, no van acompañados de aumentos proporcionales en la muerte celular radioinducida. Nuestro grupo cuyos resultados vienen definidos por un modelo matemático, MIR =  $\beta.\ln(Gy)+\alpha$ , que permite obtener valores característicos únicos ( $\alpha$ : origen en abscisas y  $\beta$ : pendiente de la curva) que define la radiosensibilidad intrínseca de un individuo.

El objetivo de este estudio es analizar el proceso de apoptosis inducida por radiación en PBLs en pacientes con cáncer de cérvix, estudiar su ajuste a un modelo matemático semilogarítmico MIR =  $\beta$ .ln(Gy)+ $\alpha$ , y conocer las relaciones que las constantes de definidas por el modelo tienen entre sí y definir su papel en la predicción de la toxicidad clínica tardía que presentan las enfermas tras ser tratadas con irradiación.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Pacientes**

Se han incluido en este estudio 94 pacientes afectas de carcinoma localizado de cérvix uterino tratadas y seguidas por los Servicios de Ginecología Oncológica y Oncología Radioterápica, componentes del Comité de Tumores Ginecológicos de la Provincia de Las Palmas de Gran Canaria, y que aceptaron participar en este estudio. La obtención de la muestra y el desarrollo del proceso técnico de medida, comenzó en Abril de 2003 y finalizó en Marzo de 2004. La evaluación de la toxicidad clínica se realizó en la consulta de

Oncología Radioterápica por parte de la Dra Pinar. El análisis de los resultados de la citometría,"gating" y construcción del modelo matemático para cada paciente se realizó aposteriori. El seguimiento medio fue de 26,07+/-17,69. mediana 23,00 rango 3-73.

En todos los casos se había realizado una biopsia para confirmación histológica del diagnóstico. Las características generales de las pacientes se detallan en la Tabla 1. La edad media fue de 51,07+/-13,07, mediana 48 años (rango 26-89)(distribución normal,test Kolmogorov-Smirnoff). Las pacientes se estadiaron siguiendo los criterios de TNM. La mayoría portaban tumores epidermoides (71 casos,75,1%) en estadios mayoritariamente precoces (I(53,3%)-II(40,2%)).

Los tratamientos realizados variaron según el estadio de la enfermedad y el estado general de la enferma, así como el devenir propio de los conocimientos científicos de cada época. Así, las pacientes con tumores precoces I-IIA fueron remitidas inicialmente a cirugía y radioterapia postoperatoria (25 casos) en 7 de ellos se indicó además quimioterapia adyuvante. En las pacientes con tumores más avanzados o en enfermas no susceptibles de cirugía, el tratamiento prescrito fue la irradiación exclusiva (69asos) asociada(51 casos) o no (18 casos) a quimioterapia.

La cirugía practicada fue en todos los casos histerectomía radical tipo II-III con linfadenectomía pélvica en tiempos recientes (tipo Wertheim-Meigs), con preservación de ovarios en pacientes premenopaúsicas. La irradiación incluyó en todos los casos, tratamiento a pelvis total mediante técnica de cuatro campos en "box" con un fraccionamiento convencional de 1,8-2 Gy día hasta una dosis total de 45-50,4 Gy, seguida de braquiterapia. En los casos de irradiación postoperatoria se realizaron mediante cilindro vaginal realizándose 3 aplicaciones de 5 Gy cada una mediante un equipo de alta tasa. En los casos de irradiación exclusiva, la braquiterapia se aplicó mediante colpostatos y tandem realizándose 5 aplicaciones de 5 Gy con un equipo de alta tasa.

La dosis media de la irradiación externa fue de 48,84+/-7,64, mediana 50Gy (rango 0-60 Gy). La dosis media de braquiterapia fue de 22,47+/- 8,11, mediana 25 Gy rango 0-40 Gy. La combinación de ambas ha sido considerada la dosis total administrada con una media 70,34+/-12,37, mediana 75 Gy rango 16,50-90.

La quimioterapia usada en nuestra serie de pacientes (58 casos) ha sido siempre concomitante con la irradiación externa, incluyendo Cisplatino a dosis de 40 mgr/m² semanales, mediante infusión endovenosa durante el periodo de irradiación externa.

Tabla 1 Características generales de las pacientes					
	Casos	Porcentaje			
Estadio					
	49	53,3			
<u>II</u>	37	40,2			
111	5	5,4			
IVA	1	1			
Tipo Histológico					
Epidermoide	71	75,1			
Adenocarcinoma	23	24,9			
Grado Histologico					
	11	13,8			
11	38	47,5			
111	31	38,8			
Tratamiento prescrito					
Cirugía+Radioterapia postoperatoria	18	19.1			
Cirugía+RT postop.+Quimioterapia	7	7,4			
Radioterapia radical	18	19,1			
Radioterapia radical +quimioterapia	51	53,4			

AJCC (2002). AJCC Cancer Staging Manual. Sixth ed. Springer Verlag: New York. UICC (2002). TNM classification of malignant tumors. Sixth ed. John Wiley & Sons: New York.

Para la estimación de la toxicidad radioinducida se utilizó la Clasificación LENT-SOMA. Se clasificaron en toxicidad sexual, vaginal, intestinal, rectal y urinaria estratificadas de grado 0 (no toxicidad) a grado 4 (toxicidad grave). En nuestra serie de pacientes no se produjo ninguna muerte tóxica (grado 5).

### Obtención de muestras, irradiación y preparación de linfocitos

Las muestras heparinizadas de 10 cc de sangre periférica se obtuvieron por venopunción periférica de donantes sanos y 99 pacientes tratadas por carcinoma de cérvix localizado.

Los linfocitos fueron separados por centrifugación en un gradiente de densidad (Linfoprep, Gibco, Life Technologies). La capa mononuclear se extrajo y se resuspendió en medio RPMI 1640 (Biowhittaker), conteniendo penicilina, estreptomicina, glutamina y 25 mM Hepes, suplementado con 10% suero AB (Sigma), a una concentración de 2.10<sup>5</sup> células ml<sup>-1</sup>. La suspensión celular separada fue posteriormente dividida en 4 frascos de cultivo de 25 cc, tres para

ser irradiados y uno como control. Las células fueron irradiadas a temperatura y oxigenación ambiental, a dosis de 0, 1, 2 y 8 Gy mediante fotones de 6 MV (Mevatron, Siemens), con una tasa de dosis de 50 cGy.min<sup>-1</sup>.

Tras la irradiación, las muestras se incubaron a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, durante 24 y 72 horas. Después de 24 horas, el contenido de cada frasco se distribuyó en 3 tubos de 5 cc, conteniendo 150.000 células cada tubo, aproximadamente, y se centrifugó a 500 G durante 10 minutos en 3 ml de PBS libre de Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup>. Posteriormente se decantó la mayor parte del sobrenadante y el pellet celular se resuspendió en 100 μl de buffer del kit de Annexina V (Pharmingen, Becton Dickinson). Tras añadir 4 μl de Annexina-V-FITC y 10 μl de yoduro de propidio (IP), las células fueron sometidas a incubación en la oscuridad, a temperatura ambiente, durante 15 minutos. Previamente al análisis de citometría de flujo, se añadieron 400 μl de buffer del kit de Annexina V. El mismo proceso se repitió tras 72 horas de incubación. Todos los ensayos se analizaron por triplicado.

# Citometría de flujo

La citometría de flujo, analizando tres parámetros, se realizó mediante un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson) con excitación mediante un láser de argón de 488 nm. Los datos fueron analizados mediante el programa BD CellQuest mediante un software Macintosh (Apple Computer, Inc., Cupertino, CA) y se calcularon los niveles de apoptosis temprana y tardía. Se adquirió un mínimo de 6000 eventos en la región seleccionada de cada muestra y se analizaron las fluorescencias específicas de la anexina V (FTIC, fluorescencia verde, canal FL1) y el IP (fluorescencia roja y tercer color, canales FL2 y FL3) mediante amplificación logarítmica. Teniendo en cuenta los parámetros de tamaño celular (forward scatter) y complejidad celular (side scatter) se seleccionó la población de linfocitos tanto vivos como apoptóticos, éstos últimos se caracterizan por presentar menor tamaño y una complejidad ligeramente mayor que la población de células vivas (Figura 1).

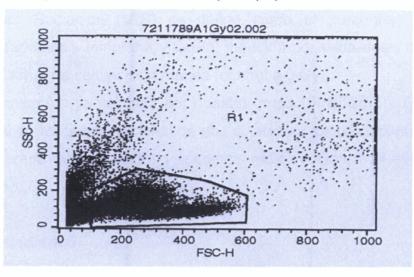
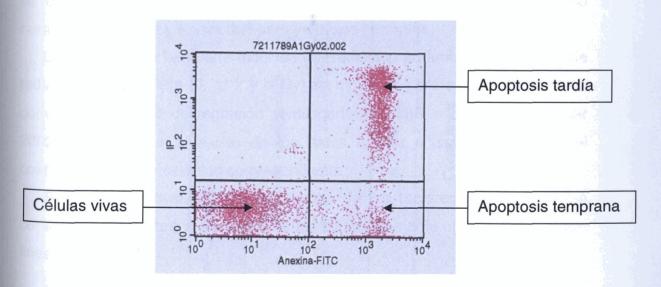


Figura 1: Grafico de tamaño y complejidad.

El número de células apoptóticas en cada muestra, se calculó como el porcentaje del número total de linfocitos en el control y los frascos irradiados. Una vez seleccionada la población, se definieron 3 poblaciones celulares diferentes según fluorescencia (Figura 2).

Figura 2: Determinación de apoptosis.



Las células en apoptosis temprana fueron, identificadas por el marcaje con anexina V de las moléculas de fosfatidilserina exteriorizadas de forma precoz,

en la membrana celular de las células apoptóticas. Como las células en apoptosis tardía, también externalizan dichas moléculas por pérdida de la integridad de la membrana, se realizó también el marcaje con IP. La Muerte inducida por Radiación (MIR) se define como el porcentaje de muerte linfocitaria (apoptosis temprana y tardía) inducida por cada dosis de radiación tras restar la muerte celular espontánea (control a 0 Gy).

Nuestra técnica fue ya validada por nuestro grupo (Pinar 2002). Sin embargo hemos incluido un grupo adicional de dos sujetos sanos (controles) en los que hemos realizado el análisis de la apoptosis radioinducida a 24,48 y 72 horas por triplicado.

### Análisis estadístico

Se realizó por parte de la Unidad de Investigación de nuestro centro. Las medidas de las variables continuas se muestran como media y desviación típica y mediana. Se contrastó la normalidad de su distribución mediante el test de Kolmogorov-Smirnov.

La relación de las variables continuas entre sí se realizó mediante la correlación de Pearsons para variables normales y Spearman Rho para variables no normales. La correlación entre variables categóricas y continuas se realizó mediante el test de Kruskall-Wallis y Mann-Withney para variables no normales y el TTest y Anova test para variables normales.

La evolución de la muerte inducida por radiación en función de la dosis de radiación administrada (0, 1, 2 y 8 Gy) se modelizó para cada determinación como una ecuación de regresión semilogarítmica: MIR =  $\alpha$ +  $\beta$  ln(Gy) (Pinar 2002). Para valorar el ajuste de los datos a esta ecuación se calculó el coeficiente de determinación correspondiente.

El análisis multivariante de la relación de los factores clásicos con las constantes del modelo matemático se realizaron mediante un test de regresión lineal.

La relación entre la aparición de toxicidad y las variables pronósticas se realizó también de forma actuarial teniendo en cuenta los diferentes periodos de seguimiento de las enfermas mediante el test de Cox simple. El análisis multivariante se realizó mediante test de regresión de Cox.

El nivel de significación estadística se estableció para una p<0.05. El análisis de los datos se efectuó con la hoja de cálculo Excel 2000 y el paquete estadístico SPSS, versión 13.0 para Windows.

### **RESULTADOS**

Los resultados obtenidos en nuestra serie de pacientes con cáncer de cervix, en cuanto la determinación de la apoptosis radioinducida ha mostrado un estrecho ajuste al modelo semilogarítmico descrito por nuestro grupo (Pinar B,2002). En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos para las variables definitorias del modelo a 24,48 y 72 horas y los coeficientes de ajuste a dicho modelo para los 94 casos que componen nuestra serie.

Los valores de alfa van aumentando de forma estadísticamente significativa con el tiempo de estudio(p<0,001), mientras que los valores de beta no parecen seguir una relación continua en sus valores, aunque son todos etadísticamene diferentes entre si (p<0,0001). Es de resaltar que el modelo parece integrar adecuadamente los valores de MIR observados a los diversos niveles de dosis e intervalos temporales del experimento ya que la mediana de ajuste del modelo es de 0,99 para 24 y 48 horas y de 0,98 para 72 horas

Tabla 2 V	/ariables α, β y coeficieι	ntes de ajuste a 24,48 y 72	?
	α (media, mediana,rango)	β (media, mediana,rango)	Ajuste R (media, mediana,rango)
24 horas	14,50+/-9,69;15,42	11,19+/-4,18;11,19	0,94+/-0,11; 0,99
	(-29-46,7)	(-5,42-23,70)	(0,29-1)
48 horas	25,84+/-9,99;26,22	9,48+/-4,40;9,34	0,96+/-0,068; 0,99
	(-5,07-44,44)	(-8,00-19,83)	(0,64-1)
72 horas	28,46+/-10,76;30,31	10,22+/- 5,39;10,75	0,93+/-0,15; 0,98
	(-0,46-51,32)	(0,24-32,83)	(0,11-1)

Los coeficientes de variación (C.V.) intraindividual de los controles fueron siempre inferiores a la variación interindividual encontrada entre los casos. Así el CV a 24 horas para  $\alpha$  fue de 33,4% para controles y 66,82% para casos, y el  $\beta$  de 23,74 para controles y 37,35% para casos. Los resultados fueron similares a 48 horas para  $\alpha$  (12,44% vs 38,66%) y  $\beta$  (15,08%vs46,41%) y a 72 horas para  $\alpha$  (20,14%vs37,80%) y  $\beta$  (13,78%vs52,73%).

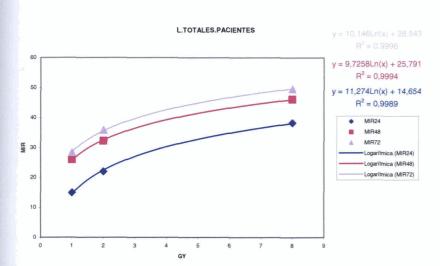


Figura 3.- Apoptosis radioinducida en linfocitos a  $\alpha$ ,  $\beta$  a 24,48 y 72 entre sí.

Todas las variables de  $\alpha$  y  $\beta$  descritas mas arriba siguieron una distribución normal de sus valores (Kolmogorov-Smirnoff). En la Tabla 3 se muestran las correlaciones observadas entre ellos. Ha resultado relevante el presente análisis, si tenemos en cuenta que prácticamente todas las variables se han correlacionado estrechamente entre si, alcanzando los valores mas altos de coeficientes de correlación la relación entre  $\alpha$  a 48 y 72 horas(PT:0,798) y los  $\beta$  a 48 y 72 horas (PT:0,654). Los resultados a 24 mostraron peores correlaciones entre si y con el resto de valores.

Tabla	Tabla 3 Correlación entre la variables α, β a 24,48 y 72							
	α 24	β 24	α 48	β 48	α 72	β 72		
α 24	1	P<0,035 (PT:0,218)	<b>P&lt;0,000</b> (PT: 0,439)	P<0,072 (PT: -0,186)	P<0,030 (PT:0,224:)	P=0,536 (PT:-0,065)		
β 24		1	<b>P&lt;0,000</b> (PT:0,713)	<b>P&lt;0,000</b> (PT: 0,468)	<b>P&lt;0,000</b> (PT:0,603)	<b>P&lt;0,033</b> (PT:0,220) ,		
α 48			1	<b>P&lt;0,003</b> (PT: 0,302)	<b>P&lt;0,000</b> (PT:0,806)	P=0,795 (PT: 0,027)		
β 48				1	<b>P&lt;0,000</b> (SPT: 0,406)	<b>P&lt;0,000</b> (PT:0,702)		
α 72					1	P=0,552 (PT: 0,062)		
B 72						1		

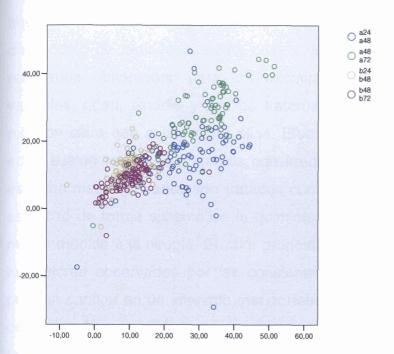


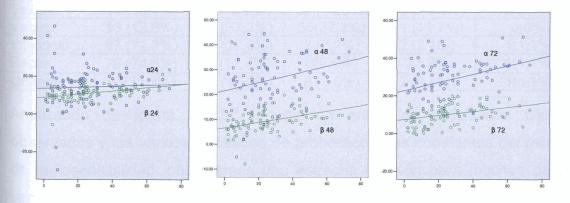
Figura 4.- Relación de las constantes α, β a 24,48 y 72 entre sí.

Hemos estudiado la posible relación entre las constantes de radiosensibilidad y las variables características de nuestra serie de pacientes. Ha resultado llamativo en nuestro estudio que el tratamiento y por ende el uso de quimioterapia o cirugía, se relacionara con las constantes de los modelos de radiosensibilidad. Además el Intervalo entre el tratamiento y la determinación de la apoptosis radioinducida en linfocitos periféricos ha resultado estrechamente relacionado con tales constantes.

Tabla 4 Correlación entre la variables α, β a 24,48 y 72 y variables dependientes del huésped, tumor y tratamientos						
	α 24	β 24	α 48	β 48	α 72	β 72
Edad Estadio Histología Grado Tratamiento Quimioterapia Cirugía Dosis Radiación Dosis RT externa Dosis braquiterapia		0,016(TT)		P<0,045 (PT-0,207) 0,016(TT) 0,011(AT) 0,021(TT) 0,004(TT)	0,018(MW)	0,053(TT)
Intervalo		P<0,000 (PT: 0,358)	P<0,004 (PT:0,292)	P<0,000 (PT:0,453)	P<0,000 (PT0,358)	P<0,000 (PT:0,351)

Hemos realizado un análisis de regresión lineal, para conocer de todas aquellas variables que se asocian en el análisis bivariante con las constantes del modelo de radiosensibilidad, cuáles definen de forma mas adecuada los resultados observados para las mismas. El impacto observado por las variables, edad, estadio y tipo de tratamiento, podrían ser explicadas por la relación clara que existe entre ellas. Efectivamente, las pacientes con mayor edad suelen recibir tratamientos con irradiación, de la misma forma que los estadios mas avanzados son tratados con radioterapia. En tiempos recientes, se utilizó de forma sistemática la quimioterapia asociada a la irradiación y en menor medida a la cirugía. El valor pronóstico que estas variables tienen sobre los valores observados por las constantes del modelo de radiosensibilidad, podrían confluir en un intervalo menor desde el tratamiento a la determinación de la radiosensibilidad en pacientes con quimioterapia (tratados mas recientemente) frente a los de no quimioterapia mayoritariamente tratados con cirugía.

Figura 5.- Relación de las constantes  $\alpha$ ,  $\beta$  a 24,48 y 72 con el Intervalo entre tratamiento y determinación de la apoptosis.



Se han incluido por tanto, en el presente análisis de regresión lineal, todas las variables analizadas en el análisis bivariante, salvo la variable cirugía y

quimioterapia que construyen la variable tratamiento. Solo el intervalo temporal entre el tratamiento y la determinación de la apoptosis radioinducida fue capaz de definir adecuadamente las constantes de radiosensibilidad.

abla 5 Análisis de regresión de variables $\alpha$ , $\beta$ a 24,48 y 72 horas e Intervalo ratamiento-Determinación de radiosensibilidad.					
	Valor de p	Riesgo Relativo	Intervalo de Confianza (95%)		
A 24					
B 24	0,006	0,089	0,026-0,152		
A 48	0,010	0,205	0,051-0,360		
B 48	0,001	0,110	0,050-0,172		
A 72	0,002	0,25	0,095-0,420		
B 72	0,012	0,102	0,023-0,181		

La toxicidad observada en nuestra serie de pacientes es descrita en la Tabla 6. Podemos observar que la mayoría de las enfermas no sufrieron toxicidad o lo hicieron de una forma leve, especialmente las referentes a la toxicidad gastrointestinal (70,8%), rectal (73,8%) y urinaria (70,7%). La mitad de las pacientes (48 casos;51,1%) seguían manteniendo relaciones sexuales en el momento del análisis de nuestra serie.

Tabla 6 Toxicidad clínica observada en la serie general de pacientes.					
Toxicidad (Glosario)	Ninguna	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
Sexual	15 (16,0%)	31(33,0%)	32 (34,0%)	12 (14,9%)	2(2,1%)
Vaginal	13 (13,8%)	35 (37,2%)	35(37,2%)	11 (11,7%)	0(0%)
Intestinal	67 (71,3%)	21 (22,3%)	3 (3,2%)	2 (2,1%)	1(1,1%)
Rectal	70 (74,5%)	11(11,7%)	9(9,6%)	3(3,2%)	1(1,1%)
Urinaria	67(71,3%)	16 (17,0%)	8 (8,5%)	2 (2,1%)	1(1,1%)

Analizando de forma "cruda" la relación entre las toxicidades clínicas observadas y las variables clásicas de pronóstico y las constantes del modelo de radiosensibilidad, observamos una estrecha relación para muchas de las variables dependientes del tratamiento con la toxicidad. También la edad avanzada se relacionó con la toxicidad rectal y menos relaciones sexuales.

Tabla 7 Corre huésped, tum						dientes del
,	Toxicidad	Toxicidad	Toxicidad	Toxicidad	Toxicidad	Relaciones
	Sexual	vaginal	Intestinal	Rectal	Urinaria	Sexuales
Edad				P<0,011		P<0,0001
Estadio						
Histología						
Grado						
Cirugía	P<0,058	P<0,038	P<0,059			P<0,048
Quimioterapia		P<0,048			P<0,025	
Tratamiento	P<0,0001	P<0,022	P<0,018	P<0,023	P<0,016*	
Dosis Externa		P<0,030				
Dosis Braqui.	-					
Dosis Total						
Seguimiento	P<0,011	P<0,074		P<0,010	P<0,082	P<0,024
α 24						
β 24						
a 48				P<0,017		
β 48						
a 72				P<0,010		
β72						

<sup>\*</sup>grado 0 vs 1-4

De lo anteriormente expuesto se deduce que la toxicidad clínica observada se relaciona bien con las variables dependientes del tratamiento. Además podemos observar que existe una estrecha relación entre un mayor periodo de seguimiento y mayores tasas de toxicidad clínica tardía. Hemos realizado por tanto un análisis de Cox simple en que valoramos el riesgo (odd ratio) que comportan niveles crecientes de un factor en la probabilidad de padecer el evento problema a estudio.

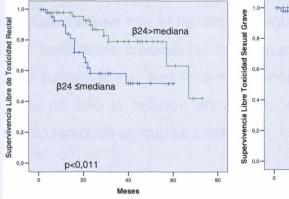
Tabla 8 Corre huésped, tum						
	Toxicidad	Toxicidad	Toxicidad	Toxicidad	Toxicidad	Relaciones
li i	Sexual	vaginal	Intestinal	Rectal	Urinaria	Sexuales
	#	#	*	*	*	
Edad					P<0,052 O.R:1,047 (1,000-1,097)	P<0,0001 O.R:1,038 (1,018-1,058)
Estadio					_	
Histología						
Grado						
Tratamiento			P<0,060(3) O.R:0,296 (0,083-1,054),			
Dosis Total						

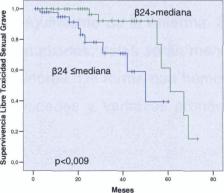
				P<0,045		(Fi. 15)
				O.R:0,951		
α 24				(0,906-0,999)		
β 24	P<0,007	P<0,063	P<0,073	P<0,063	P<0,021	4
	0,834	O.R.:0,868	O.R.:0,916	O.R:0,908	O.R:0,835	
	(0,730-0,951)	(0,747-1,008)	(0.832-1.008)	(0,821-01,005)	(0,717-0,973)	
α 48	P<0,066		P<0,014	P<0,001	P<0,015	
	O.R.:0,941		O.R:0,946	O.R:0,940	O.R:0,907	
	(0,882-		(0,905-0,989)	(0,898-0,983)	(0.838-0.982)	
	01,004)					
			P<0,071	P<0,026	P<0,053	P<0,001
			O.R:0,914	O.R:0,897	O.R:0,855	O.R:0,884
β 48			(0,830-1,008)	(0,816-0,987)	(0,729-1,002)	(0,828-0,944)
α 72			P<0,010	P<0,011	P<0,010	
		h.	O.R:0,951	O.R:0,950	O.R:0,915	
			(0,915-0,988)	(0,913-0,988)	(0,855-0,979)	
				P<0,013		P<0,026
				O.R:0,951		O.R:0,935
β 72	<u></u>			(0,913-0,989)		(0,882-0,992)

#grado 0-2vs3-4

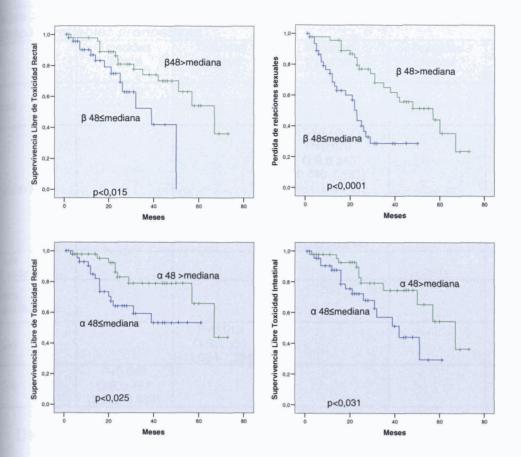
Con la intención de mostrar gráficamente el impacto que las constantes de radiosensibilidad del modelo tienen en la probabilidad de padecer toxicidad tardía, hemos construido tablas de Kaplan-Meier segregando los valores de las variables descritas por la mediana de la distribución. Presentamos a modo de ejemplo algunas de las gráficas que han resultado significativas en el análisis bivariante mediante el log-rank test.

Figura 6.- Relación de las constantes  $\alpha$  y  $\beta$  con la toxicidad clínica radioinducida.





<sup>\*</sup>grado 0 vs 1-4



Hemos realizado un análisis multivariante mediante regresión de Cox, para conocer el impacto que las diversas variables estudiadas tienen en la predicción de la probabilidad de estar libre de toxicidad grave sexual y vaginal (grado3-4) y de sufrir toxicidad intestinal, rectal o urinaria (grado1-4). La elección de este análisis tiene que ver con la relación que las toxicidades detectadas tienen con el tiempo de seguimiento de la enferma. Efectivamente al ser toxicidades crónicas las aquí estudiadas, estas serán menos frecuentes en las pacientes con seguimientos menores. De forma que hemos de tener en cuenta no solo la relación entre toxicidades y variables pronósticas, sino el espacio temporal en que se producen.

clínica y va	riables pronós			T	<del></del>	
	Toxicidad Sexual	Toxicidad vaginal	Toxicidad Intestinal	Toxicidad Rectal	Toxicidad Urinaria	Relaciones Sexuales
Edad						P<0,0003 O.R:1,045 (1,015-1,075)
Tratamiento			RT/RT+QT(1) P<0,070 O.R:0,213 (0,040-1,133)  RT/C+RT(3) P<0,037 O.R:0,226 (0,056-0,914)			
Dosis RT externa						
Dosis Braquiterapia						P<0,025 O-R:1,00 (0,999-1,000)
α 24		P<0,018 O.R:1,151 (1,024-1,294)				
β 24	P<0,040 O.R:0,787 (0,627-0,989)					Universitaria, 2007

De forma general, parece que tanto la edad como el valor de  $\alpha$  y  $\beta$  a 24 horas, han resultado predictivas de algunas de las toxicidades presentes en nuestra serie clínica de pacientes. Los factores dependientes de la opción terapéutica elegida (tratamiento) o de la dosis de braquiterapia, están relacionadas con la toxicidad intestinal agravada por la quimioterapia(p<0,070) o la cirugía (p<0,039) y las relaciones sexuales (p<0,025) respectivamente.

#### DISCUSION

La irradiación es un tratamiento capital en la mayoría de los tumores, especialmente en el carcinoma cervical donde es el tratamiento de elección en los tumores localmente avanzados, compitiendo además con la cirugía en los tumores en estadios precoces. El daño inducido por la radiación en los tejidos normales, es un factor limitante para la curación por irradiación de un amplio panel de tumores. Es necesario por tanto el desarrollo de ensayos predictivos de toxicidad. El método por nosotros usado tiene algunas ventajas sobre otros publicados como son la mejor detección de la apoptosis precoz mediante el uso de annexina, y la modelización de los datos de MIR que se ajustan adecuadamente a un modelo semilogarítmico que define constantes con

valores individuales a cada paciente. Además este modelo permite integrar en un solo valor  $\alpha$ ,  $\beta$  la apoptosis radioinducida a diversas dosis de radiación.

Hemos observado en nuestra serie de pacientes que las variables  $\alpha$ ,  $\beta$  se relacionaban (salvo contadas excepciones) estrechamente entre sí. Este hecho parece confirmar que si bien los niveles de apoptosis a dosis 0 del modelo (constante a) aumentan su valor conforme se incrementa el periodo de incubación de los linfocitos, estos valores representan una condición intrínseca del paciente, como también sucede con los valores de  $\beta$ . Sin embargo los resultados del grupo suizo (Ozsahin 1997,2005 y Crompton 1997,2001) no han encontrado esta relación. Sin embargo (Schmitz et al 2003) usando una técnia similar a la nuestra (incluye marcaje con annexina) encontraron una estrecha relación entre la apoptosis espontánea y la radioinducida en todas las subpoblaciones estudiadas. Además la apoptosis espontánea era mas importante en las subpoblaciones mas radiosensibles. Además en algunas series se encontró una estrecha relación de la apoptosis espontánea con la edad de forma inversa (Crompton et al 2001) o entre apoptosis espontánea y radioinducida de forma inversa (Schmitz et al 2005) o ninguna relación (Barber et al 2000).

El segundo hecho relevante de nuestro estudio es que los valores de las constantes del modelo se incrementan en función del periodo transcurrido entre el tratamiento con radiación y la realización del experimento. Descartamos en nuestro estudio la posibilidad de que los procedimientos para determinar la apoptosis radioinducida pudieran estar subyacentes al resultado observado. Las enfermas fueron siendo incluidas en el estudio de forma aleatoria, la irradiación y marcaje se llevo a cabo durante aproximadamente un año y medio, el análisis de los datos de citometría de flujo y posteriormente la construcción del modelo matemático, se realizó de consecutivamente en todos los pacientes de forma anónima. Si bien el uso de quimioterapia podría potenciar este efecto, el hecho es que el intervalo entre el tratamiento indicado y la determinación de la apoptosis, es el factor que mejor explica el proceso. Este hecho podría venir explicado por la selección de subpoblaciones linfocitarias durante la misma irradiación que condicionaría radiosensibilidades distintas y la modificación del sistema linfocitario, que tras sufrir tratamientos

que dañan el DNA (RT) modifica su equilibrio predominando subpoblaciones que confieren una cierta radioresistencia clínica (mas apoptosis menor toxicidad clínica). Efectivamente la linfopenia inducida por radiación puede persistir durante años tras la exposición, al contrario que la granulopenia que se normaliza en 1-3 meses. En un estudio reciente Louagie H et al (1999) demuestran en pacientes con cáncer de cérvix que tras tratamiento de irradiación, se producen cambios significativos en la proporción de subpoblaciones linfocitarias circulantes. Efectivamente este decremento afecta en primer término a los Linfocitos B (los mas radiosensibles), seguidos de los T (tanto CD4 como CD8) y finalmente los NK. No resulta por tanto descabellado pensar que los hallazgos observados en nuestra seríe corresponden a cambios relativos en la proporción de subpoblaciones, pero también probablemente a modificaciones en las tasa de apoptosis mostrada por esas mismas estirpes linfocitarias tras la selección clonal que induce la radiación. Así ha sido descrito que al menos el número de NK y su radiosensibilidad variaría con la irradiación previa. Efectivamente Rana et al (1990) analizaron la sensibilidad de las células NK después de la exposición a diferentes dosis de radiación gamma y observaron que la radiación ionizante se encargaba de seleccionar positivamente aquellas subpoblaciones de células NK más citotóxicas o estimulaba la actividad citotóxica en células supervivientes. Además se observó una relación con la vida media de los linfocitos in vivo. Así, poblaciones linfocitarias con una corta vida media in vivo eran más susceptibles a la apoptosis in vitro y viceversa. De hecho tras irradiaciones totales a bajas dosis se produce una expansión de células NK en la sangre y bazo de ratones, mediada por IL12 e IL8 (Miller et al 2003). Esto significaría que modificaciones en la expresión y liberación de citoquinas, con la consiguiente influencia sobre la activación y proporción de las distintas subpoblaciones podría tener lugar. Efectivamente, este incremento de producción de citoquinas produce un efecto "by stander" en las células adyacentes no irradiadas, amplificando el efecto de la radiación.

Sin olvidar que nuestra serie tiene aún un corto seguimiento, hecho relevante a la hora de analizar la toxicidad radioinducida, hemos observado una relación entre el valor de las constantes  $\alpha$ ,  $\beta$  con la toxicidad clínica observada en

nuestras pacientes. Efectivamente además del impacto que los diversos tratamientos y la edad de las pacientes han tenido en la predicción de la toxicidad en análisis bivariantes, niveles progresivamente más elevados de  $\alpha$  y  $\beta$ . En el momento actual, los resultados publicados son los de dos grupos europeos de investigación. Los estudios iniciales fueron realizados por el grupo suizo (Ozsahin et al, 1997; Crompton et al, 1999 y 2001), analizando la apoptosis por tinción con IP y por tamaño celular. La radiosensibilidad intrínseca variaba entre los linfocitos CD4 y CD8, siendo la respuesta apoptótica diferente y progresivamente menor desde pacientes sanos a pacientes radiosensibles o con ataxia-telangiectasia (AT). Además, los pacientes con bajas tasas de apoptosis radioinducida mostraban toxicidades clínicas mas graves en los estudios antes citados salvo en el estudio de Barber (2000)

Este hecho que podríamos considerar sorprendente, ya que una mayor tasa de apoptosis se relaciona con menor toxicidad clínica, es un hallazgo constante en las serie originales antes citadas, pero también en estudios recientes que incluyen análisis de las diversas subpoblaciones (Oszahin 2005). Efectivamente, los linfocitos de pacientes que sufren el síndrome de ataxia teleangiectasia, tienen tasa de apoptosis menores, que los linfocitos de pacientes heterocigóticos para AT y estos menos que los pacientes de cáncer y de la misma forma los últimos, menos que los linfocitos de controles sin cáncer.

La explicación de este fenómeno no es sencilla, y tiene que ver con la elección de la vía de muerte que la célula elige una vez el daño inducido por la radiación es considerado irreparable. Así ha sido publicado que en pacientes con AT y otros síndromes de radiosensibilidad como síndrome de Bloom o anemia de Fanconi, los linfocitos no muestran una inducción de P53 tras el daño causado por radiación (Dachaud et al 1994,Roselli et al 1995). Esto determina una deficiente respuesta apotótica tras irradiación aunque con altos niveles de apoptosis espontánea (Dachaud et al 1994). De hecho las subpoblaciones linfocitarias con menos apoptosis muestran niveles bajos de BAX(Mori M y Desaintes C 2005). Para Ozsahin et al (2005) esta relación entre radiosensibilidad y apoptosis reducida aunque aún sin clarificar, podría estar en relación con la adecuación de la respuesta a irradiación que incia el linfocito.

Por tanto la no inducción de apoptosis significaría una respuesta no adecuada, basada e alteraciones moleculares, que se asocian con toxicidad tardía grave. En nuestra opinión, es posible estimar la radiosensibilidad celular de los linfocitos de sangre periférica de una paciente mediante el estudio de la apoptosis radioinducida, con una técnica de Anexina/IP que se ajusta a un modelo matemático semilogarítmico, que permite definir variables individuales de radiosensibilidad. Los valores de  $\alpha$  y  $\beta$  observados en nuestras pacientes definen un "patrón de radiosensibilidad" individual que junto con la edad y el tratamiento recibido se han relacionado con la toxicidad clínica observada. Es necesario, sin embargo, profundizar en el conocimiento de este fenómeno en diversas subpoblaciones linfocitarias que permitan ajustar adecuadamente el papel predictivo de toxicidad clínica de este tipo de ensayos. es posible estimar la radiosensibilidad celular de los linfocitos de sangre periférica de una paciente mediante el estudio de la apoptosis radioinducida, con una técnica de Anexina/IP desarrollada a este efecto por nuestro grupo. De más hemos observado un importante papel predictivo de las constantes que definen el modelo de radiosensibilidad la toxicidad generada por la radiación.

# **CAPÍTULO VI**

PREDICCIÓN DE LA TOXICIDAD
CLÍNICA RADIOINDUCIDA EN
PACIENTES CON CÁNCER DE
CÉRVIX LOCALIZADO MEDIANTE
EL ESTUDIO DE APOPTOSIS
RADIOINDUCIDA EN
SUBPOBLACIONES DE
LINFOCITOS DE SANGRE
PERIFÉRICA (PBLs)

ESTUDIO DE APOPTOSIS RADIOINDUCIDA EN SUBPOBLACIONES (CD4,CD8,B,NK) DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA(PLBS). PREDICCIÓN DE LA TOXICIDAD CLINICA EN PACIENTES CON CÁNCER DE CERVIX LOCALIZADO TRATADOS CON RADIOTERAPIA.

#### RESUMEN:

Antecedentes: Es evidente que la predicción de la toxicidad inducida por los tratamientos oncológicos en cáncer de cérvix sería de utilidad para elegir la terapéutica mas adecuada. La determinación de la radiosensibilidad celular en PLBs ha resultado en nuestro estudio previo predictiva de la posibilidad de desarrollar toxicidad tardía post irradiación. La determinación de la apoptosis radioinducida en linfocitos es útil en este cometido, sin embargo es necesario conocer cuáles de las subpoblaciones linfocitarias mas importantes sustentan ese papel.

<u>Objetivo</u>: Analizar el proceso de apoptosis inducida por radiación en las distintas subpoblaciones de PBLs (CD8, CD4,B,NK) en pacientes con cáncer de cérvix, estudiar su ajuste a un modelo matemático semilogaritmico MIR =  $\beta$ .In(Gy)+ $\alpha$ , y definir las variaciones en radiosensibilidad que presentan. Conocer su papel en la predicción de la toxicidad clínica que presentan las enfermas tras ser tratadas con irradiación.

<u>Métodos</u>: Se incluyeron 94 pacientes afectas de carcinoma de cervix localizado tratadas mediante cirugía +/-quimioterapia o con radioterapia radical +/-quimioterapia. Los PBLs se obtuvieron tras la centrifugación de las muestras de sangre periférica en un gradiente de densidad (Ficoll-Hipaque). La apoptosis se determinó tras marcaje con Annexina V y yoduro de propidio (IP). Se realizó un análisis por triplicado en todos los pacientes a dosis de 0,1,2 y 8 Gy en análisis a 24,48 y 72 horas para cada una de las cuatro subpoblaciones estudiadas CD4,CD8,B y NK. La toxicidad clínica de las pacientes se evaluó según el Glosario Francés.

Resultados: La muerte inducida por irradiación (MIR) aumentaron con la dosis de radiación y el tiempo de incubación. Los valores de las constantes  $\alpha$  (valor de origen en abcisa) y  $\beta$  (incremento de la apoptosis debido al incremento de la dosis de radiación, pendiente de la curva semilogarítmica) definidas por el modelo, se relacionaron estrechamente entre si. Los valores de las constantes de  $\alpha$  y  $\beta$  para CD4 no se relacionaron con la toxicidad. Sin embargo, los valores observados para las constantes de modelo para para CD8 y B, si se relacionaron con las toxicidades clínicas observadas en análisis bivariantes. En el análisis multivariante solo la edad y los valores de  $\alpha$  y  $\beta$  para B y en menor medida para CD8, resultaron junto con el tratamiento o la dosis de radiación administrada con la braquiterapia, predictores de la toxicidad clínica observada.

Conclusión: La apoptosis radioinducida varía ampliamente entre las diversas subpoblaciones linfocitarias, aumentando los valores de  $\alpha$  y  $\beta$  para los linfocitos B con el intervalo entre el tratamiento y la determinación de la apoptosis. Los valores de  $\alpha$  y  $\beta$ , para B y en menor medida para CD8 se relacionan junto con la edad de la paciente y el tratamiento recibido con la toxicidad clínica observada, sin observarse papel alguno para la subpoblación CD4 y NK. Este hecho, hace necesario profundizar en la expresión génica de las diversas subpoblaciones que permita identificar genes que expliquen las diferencias observadas.

## INTRODUCCIÓN

La irradiación es un tratamiento de primera línea en el cáncer de cérvix, asociada en algunos casos a la presencia de toxicidades tardías indeseables. Efectivamente, este daño radioinducido limita la curación de los tumores debido a la propia limitación impuesta por las toxicidades desarrolladas por individuos radiosensibles. La apoptosis radioinducida en linfocitos ha sido estudiada como modelo celular que permita predecir que pacientes desarrollaran este tipo de efectos indeseables. Efectivamente nuestro grupo (Capitulo 5) y otros (Ozsahin et al, 1997,2005; Crompton et al, 1999,2001; Barber et al, 2000) han descrito una amplia variación interindividual en la tasa de apoptosis radioinducida y una relación estrecha con la toxicidad clínica tardía de forma inversa, mostrando tasa menores de apoptosis los pacientes que sufren síndromes genéticos de radiosensibilidad.

En nuestro grupo determinamos la apoptosis radioinducida en PBLs por citometría de flujo, mediante doble marcaje con annexina V y yoduro de propidio, y definida un modelo matemático MIR =  $\beta$ .ln(Gy)+ $\alpha$ , al que se ajustan los incrementos de apoptosis observados. Si bien los linfocitos totales parecen ser de utilidad predictiva en nuestro estudio, publicaciones que han investigado el efecto de la radiación sobre las diferentes subpoblaciones han demostrado una diversa respuesta apotótica de las misma a la radiación(Mori M. & Desaintes C, 2004). Además, de forma consecuente con lo observado para los estudios con linfocitos totales, tasas crecientes de apoptosis radioinducida se asociaban a menores toxicidad radioinducidas (Crompton 1999). Finalmente en estos estudios son las subpoblaciones CD8 las que representan una mayor capacidad predictiva de dicha toxicidad (Oszahin et al 2005).

El objetivo de este estudio es analizar el fenómeno de la apoptosis radioinducida en subpoblaciones linfocitarias, conocer su ajuste al modelo semilogaritmico descrito para los linfocitos totales, estudiar la existencia de diferencias en las tasas de apoptosis radioinducida en las

subpoblaciones linfocitarias CD4,CD8, B y NK y definir el posible papel predictivo de su determinación con respecto a la toxicidad clínica radioinducida en pacientes con cáncer de cérvix tratados con irradiación.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **Pacientes**

Se han incluido en este estudio 94 pacientes afectas de carcinoma localizado de cérvix uterino tratadas y seguidas por los Servicios de Ginecología Oncológica y Oncología Radioterápica, componentes del Comité de Tumores Ginecológicos de la Provincia de Las Palmas de Gran Canaria, y que aceptaron participar en este estudio. La obtención de la muestra y el desarrollo del proceso técnico de medida, comenzó en Abril de 203 y finalizó en Marzo de 2004. La evaluación de la toxicidad clínica y el análisis de los resultados del experimento fueron realizados posteriormente. El seguimiento medio fue de 33,08+/- 23, mediana 35,68 meses rango 1-186)

En todos los casos se había realizado una biopsia para confirmación histológica del diagnóstico. Las características generales de las pacientes se detallan en la Tabla 1. La edad media fue de 51,12+/-13,18, mediana 48 años (rango 26-89)(distribución normal,test Kolmogorov-Smirnoff). Las pacientes se estadiaron siguiendo los criterios de TNM, realizándose exploración ginecológica y TAC abdomino-pélvico, y en los casos que fue preciso rectoscopia y cistoscopia. La extensión del tumor se realizó mediante examen pélvico bimanual.

La mayoría portaban tumores epidermoides (76 casos,76,8%) en estadios mayoritariamente precoces (I(52,6,8%)-II(40,2%)). Los tratamientos realizados variaron según el estadio de la enfermedad y el estado general de la enferma, así como el devenir propio de los conocimientos científicos de cada época. Así, las pacientes con tumores precoces I-IIA fueron remitidas inicialmente a cirugía y radioterapia postoperatoria (29 casos) en 7 de ellos se indicó además quimioterapia adyuvante. En las pacientes con tumores más avanzados o en enfermas no susceptibles de cirugía, el tratamiento prescrito fue la irradiación exclusiva(70 casos) asociada(51 casos) o no (19 casos) a quimioterapia.

La cirugía practicada fue en todos los casos histerectomía radical tipo II-III con linfadenectomía pélvica en tiempos recientes (tipo Wertheim-Meigs), con

preservación de ovarios en pacientes premenopaúsicas. La irradiación incluyó en todos los casos, tratamiento a pelvis total mediante técnica de cuatro campos en "box" con un fraccionamiento convencional de 1,8-2 Gy día hasta una dosis total de 45-50,4 Gy, seguida de braquiterapia. En los casos de irradiación postoperatoria se realizaron mediante cilindro vaginal. Hasta el año 2000, se realizó una aplicación de braquiterapia de baja tasa hasta administrar 20 Gy a punto A. Apartir del año 2000 se realizaban 3 aplicaciones de 5 Gy cada una mediante un equipo de alta tasa. En los casos de irradiación exclusiva la braquiterapia se aplicó mediante colpostatos y tandem. Hasta el año 2000 mediante 2 aplicaciones de 20 Gy cada una a punto A con un equipo de baja tasa. A partir del año 2000 se realizaron 5 aplicaciones de 5 Gy con un equipo de alta tasa. En aquellos casos que lo requirieron, se realizó boost parametrial.

La dosis media de la irradiación externa fue de 47,83+/-10,16, mediana 50 Gy (rango 0-60 Gy). La dosis media de braquiterapia fue de 22,48+/- 8,51, mediana 25 Gy rango 0-40 Gy. La combinación de ambas ha sido considerada la dosis total administrada con una media 69,39+/-15,28, mediana 75 Gy, rango 6-90.

La quimioterapia usada en nuestra serie de pacientes (58 casos) ha sido siempre concomitante con la irradiación externa, incluyendo Cisplatino a dosis de 40 mgr/m² semanales, mediante infusión endovenosa durante el periodo de irradiación externa.

Tabla 1 Características generales	de las pacier	ntes
	Casos	Porcentaje
Estadio		
I	51	52,6
TI .	40	41,2
111	5	15,2
IVA	1	1
Tipo Histológico		
Epidermoide	76	76,8
Adenocarcinoma	23	23,2
Grado Histologico		
	11	13,1
II	41	48,8
III	32	38,1
Tratamiento prescrito		
Cirugía+Radioterapia postoperatoria	22	22,2
Cirugía+RT postop.+Quimioterapia	7	7,1
Radioterapia radical	19	19,2
Radioterapia radical +quimioterapia	51	51,5
A ICC (2002) A ICC Cencer Staging	Manual Sixth	

AJCC (2002). AJCC Cancer Staging Manual. Sixth ed. Springer UICC (2002). TNM classification of malignant tumors. Sixth ed. John Wiley & Sons: New York.

Verlag: New York.

Para la estimación de la toxicidad radioinducida se utilizó la clasificación LENT-SOMA, a lo largo de la evolución de las pacientes. Se clasificaron en toxicidad sexual, vaginal, intestinal, rectal y urinaria estratificadas de 0 (no toxicidad y 4(toxicidad grave). En nuestra serie de pacientes no se produjo ninguna muerte tóxica(grado 5).

## Obtención de muestras, irradiación y preparación de linfocitos

Las muestras heparinizadas de 10 cc de sangre periférica se obtuvieron por venopunción periférica de 94 pacientes tratadas por carcinoma de cervix localizado, en 40 ml de tubos Vacutainer conteniendo heparina de litio como anticoagulante (Becton Dickinson, San Jose, CA) en el Servicio de Oncología Radioterápica del Hospital de Gran Canaria Doctor Negrín, previo consentimiento informado de la paciente.

Los linfocitos de sangre periférica (PBLs) fueron aislados mediante centrifugación en gradiente de densidad (Linfoprep, Gibco, life technologies). Se extrajo la capa mononuclear y se resuspendió en medio RPMI 1640 (Biowhittaker), conteniendo penicilina, estreptomicina, glutamina y 25mM Hepes, suplementado con 10% de suero bovino fetal (FCS), a una concentración de 2.10<sup>5</sup> células ml<sup>-1</sup>.

La suspensión celular fue posteriormente repartida en 4 frascos de cultivo de 25cc, tres para ser irradiados y uno como control. Los frascos se irradiaron a dosis de 0,1,2,8Gy, a temperatura ambiente, en condiciones óxicas y mediante fotones de 6 MV (Mevatron, Siemens), con una tasa de dosis de 50 cGy.min<sup>-1</sup>. Tras la irradiación el contenido de cada frasco se distribuyó en 5 tubos de citometría de 5cc en condiciones de esterilidad, conteniendo 300.000 células/ml y se centrifugó a 500G durante 10 minutos en 3 ml de PBS libre de Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup>. Posteriormente se decantó el sobrenadante y se procedió al marcaje con CD45 APC para excluir eventos no leucocitarios que pudieran quedar presentes en la muestra además de los distintos anticuerpos monoclonales para poder detectar las subpoblaciones linfocitarias en estudio: IgG1 PE/IgG1 PERCP (Controles negativos), CD3 PE/CD4 PERCP (Linfocitos T CD4), CD3 PERCP/CD8 PE (Linfocitos T CD8), CD3 PERCP/CD16 PE/CD56 PE (Linfocitos NK) y CD20 PERCP (Linfocitos B) que se incubaron durante 30 minutos a 4º C en

oscuridad. Pasado este tiempo se vuelve a lavar con 3 ml de PBS y centrifugación a 500G durante 10 minutos.

Una vez decantado el sobrenadante se resuspende el pellet celular en 100 ul de buffer del kit de AnnexinaV (Pharmingen, Becton Dickinson) y tras añadir 4 ul de Annexina-V-FITC las células fueron sometidas a incubación en oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos. El marcaje único con anexina permite detectar aquellas moléculas de fosfatidilserina exteriorizadas de forma precoz en la membrana celular de las células apoptóticas.

Posteriormente se añaden 400ul de buffer del kit de Annexina V y se procede al análisis por citometría de flujo. El mismo procedimiento se repite a las 24, 48, 72horas de incubación (a 37C, 5% CO2) para realizar una cinética del proceso.

## Citometría de flujo

La citometría de flujo, se realizó en el Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Dr Negrín, analizando 4 parámetros, se realizó mediante un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson; San José, CA) con excitación mediante un láser de argón de 488nm. Los datos se analizaron mediante el programa BD CellquestPro mediante un software Macintosh (Apple computer, Inc, Supertino, CA). Se adquirieron un mínimo de 5000 eventos para el control negativo, 3000 eventos para linfocitos CD4+,CD8+ y células NK y 1000 eventos para los linfocitos B.

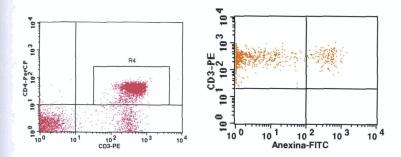
Teniendo en cuenta los parámetros de tamaño celular (Forward Scatter) y complejidad celular (Side Scatter) se selecciona la población de linfocitos tantos vivos como apoptóticos, caracterizados estos últimos por presentar un menor tamaño y una mayor complejidad que la población de células vivas.

Los linfocitos son identificados por una fluorescencia CD45APC positiva mientras que los elementos CD45 negativos son eliminados al representar debris y restos celulares.

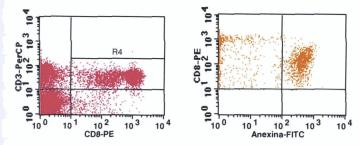
La selección de linfocitos T CD4 se realiza en base a un marcaje positivo para CD3-PE y CD4-PERCP. Los T CD8 se seleccionan como CD3-PE+ y CD8-PERCP+, los NK como CD56-CD16-PE+CD3PERCP- y los linfocitos B como CD20PERCP+. Las células apoptóticas son AnexinaV+ para los distintos marcadores (Figura 1).

Figura 1. Ejemplo del análisis por citometría de flujo de la apoptosis en subpoblaciones linfocitarias, 24horas y 2 Gy de irradiación.

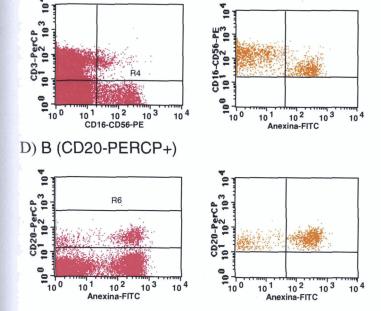
# A) CD4 (CD3-PE CD4-PERCP+),



# B) CD8 (CD8-PE CD3-PERCP+)



## C) NK (CD16-CD56PE+CD3PERCP-)



El número de células apoptóticas en cada muestra, se calculó como el porcentaje del número total de linfocitos en el control y los frascos irradiados. Las células en apoptosis fueron identificadas por el marcaje con anexina V de las moléculas de fosfatidilserina exteriorizadas de forma precoz, en la membrana celular de las células apoptóticas. La Muerte Inducida por Radiación (MIR) se define como el porcentaje de muerte linfocitaria (apoptosis temprana y tardía) inducida por cada dosis de radiación tras restar la muerte celular espontánea (control a 0 Gy).

#### Análisis estadístico

Se realizó por parte de la Unidad de Investigación de nuestro centro. Las medidas de las variables continuas se muestran como media y desviación típica y mediana. Se contrastó la normalidad de su distribución mediante el test de Kolmogorov-Smirnov.

La relación de las variables continuas entre sí se realizó mediante la correlación de Pearsons para variables normales y Spearman Rho para variables no normales. La correlación entre variables categóricas y continuas se realizó mediante el test de Kruskall-Wallis y Mann-Withney para variables no normales y el TTest y Anova test para variables normales.

La evolución de la muerte inducida por radiación en función de la dosis de radiación administrada (0, 1, 2 y 8 Gy) se modelizó para cada determinación como una ecuación de regresión semilogarítmica: MIR =  $\alpha$ +  $\beta$  ln(Gy) (Pinar 2002). Para valorar el ajuste de los datos a esta ecuación se calculó el coeficiente de determinación correspondiente.

El análisis multivariante de la relación de los factores clásicos con las constantes del modelo matemático se realizaron mediante un test de regresión lineal.

La relación entre la aparición de toxicidad y las variables pronósticas se realizó de forma actuarial teniendo en cuenta los diferentes periodos seguimientos de las enfermas mediante el test de Cox simple. El análisis multivariante se realizó mediante test de regresión de Cox.

El nivel de significación estadística se estableció para una p<0.05. El análisis de los datos se efectuó con la hoja de cálculo Excel 2000 y el paquete estadístico SPSS, versión 13.0 para Windows.

## **RESULTADOS**

Los resultados obtenidos en nuestra serie de pacientes con cáncer de cérvix, en cuanto la determinación de la apoptosis radioinducida ha mostrado un estrecho ajuste al modelo semilogaritmico descrito por nuestro grupo (Pinar B,2002). En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos para las variables definitorias del modelo a 24, 48 y 72 horas y los coeficientes de ajuste a dicho modelo par las cuatro subpoblaciones estudiadas (CD4,CD8,B,NK) de los 94 casos que componen nuestra serie.

Los valores de alfa van aumentando con el tiempo de incubación, mientras que los valores de beta no parecen seguir una relación continua en sus valores. Es de resaltar que el modelo parece integrar adecuadamente los valores de MIR observados a los diversos niveles de dosis e intervalos temporales del experimento ya que la mediana de ajuste del modelo oscila entre 0,82 y 0,99.

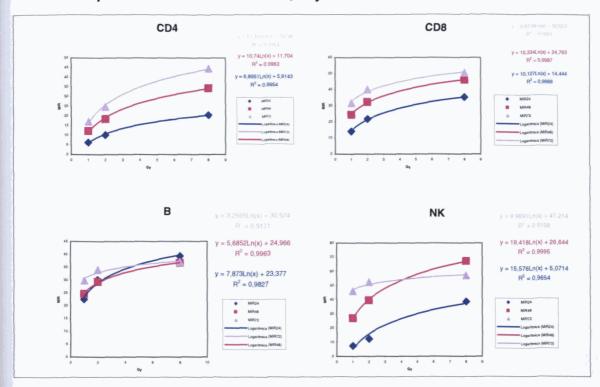
Tabla 2.1-	Variables α, β y coeficie	entes de ajuste a 24,48 y	72 para CD 4
	α (media,	β (media,	Ajuste R (media,
	mediana,rango)	mediana,rango)	mediana,rango)
24 horas	5,88+/-5,30; 5,42	6,92 +/-4,27; 6,80	0, 91+/-0, 14; 0,97
	(-13,94-18,57)	(-13,57-19,50)	(0,83-1)
48 horas	11,70 +/-7,65 ; 12,02	10,81 +/-4,82 ; 10,48	0, 91+/-0, 18; 0,98
	(-10,61-35,58)	(-,85-21,58)	(0,05-1),
72 horas	16,71 +/-9,93; 16,61	13,25 +/- 6,74; 14,37	0, 90+/-0, 17; 0, 97
	(-3,51-45,88)	(-13,11-24,10)	(0, 35-1)

Tabla 2.2-	Variables $\alpha$ , $\beta$ y coeficie	entes de ajuste a 24,48 y	72 para CD 8
	a (media,	$oldsymbol{eta}$ (media,	Ajuste R (media,
	mediana,rango)	mediana,rango)	mediana,rango)
24 horas	14,27 +/-11,92; 15,16	11,30+/-11,17; 10,44	0, 92+/-0, 18; 0,99
	(-32,22-53,82)	(-38,36-88,45)	(0,39-1)
48 horas	24,70 +/-12,66; 26,01	10,52 +/-6,38; 10,02	0,96+/-0,068; 0,99
	(-17,37-49,06)	(-2,14-31,45)	(0,64-1)
72 horas	32,61 +/-14,52; 32,48	10,39 +/- 8,90; 9,79	0,81+/-0, 32; 0,97
	(-,082-92,77)	(-24,97-53,48)	(0,05-1)

Tabla 2.3-	Variables α, β y coeficie	entes de ajuste a 24,48 y	72 para B
	σ (media, mediana,rango)	eta (media, mediana,rango)	Ajuste R (media, mediana,rango)
24 horas	23,35 +/-11,22 ; 23,90	8,00 +/-7,97; 8,09	0,94+/-0,0; 0,94
	(-16,78-48,54)	(-42,60-28,09)	(0,41-1)
48 horas	25,89+/-13,23;27,42	5,11 +/-3,44; 4,46	0,90+/-0,25; 0,90
	(-8,71-51,82)	(-0,30-22,81)	(0,05-1)
72 horas	29,96 +/-15,79; 32,69	4,01 +/- 6,16; 2,69	0,71+/-0,28; 0,82
	(-13,66-57,47)	(-2,76-49,28)	(0,01-1)

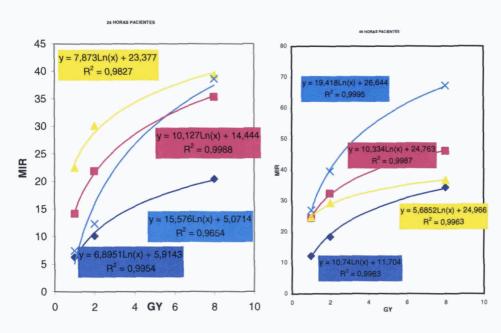
Tabla 2.4-	Variables α, β y coeficie	entes de ajuste a 24,48 y	72 para NK
	α (media,	β (media,	Ajuste R (media,
	mediana,rango)	mediana,rango)	mediana,rango)
24 horas	5,40+/-8,83; 3,69	15,58 +/-14,67; 8,19	0,91+/-0,96; 0,95
	(-11,99-31,03)	(1,95-38,35)	(0,53-1)
48 horas	28,60 +/-19,88;26,91	19,77 +/-9,25; 20,68	0,90+/-0,15; 0,95
	(-17,2-67,04)	(1,17-38,57)	(0,15-1)
72 horas*	48,72 +/-19,66; 53,79	7,13 +/- 8,52;5,47	0,71+/-0,31; 0,88
	(-5,26-81,29)	(-8,67-31,78)	(0,02-1)

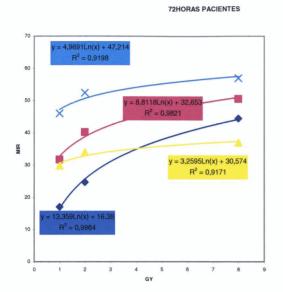
Figura 2. Apotosis en subpoblaciones linfocitarias CD4,CD8,B y NK. en relación con el tiempo de incubación a 24horas,48 y 72 horas.

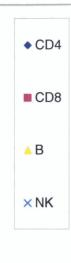


Hemos realizado también unas gráficas en las que observamos los valores para el ajuste semilogarítmico a los diversos tiempos de incubación permitiendo una comparación directa entre las diversas subpoblaciones estudiadas.

Figura 3. Apotosis en subpoblaciones linfocitarias en relación con el tiempo de incubación a 24horas,48 y 72 horas.







	_				_					- control		******	T T		*******	1000000	000000000	-		0.000000	Controlon	0000000	-0404-201	********	annoideac	Moral.		entine.	amena	Scholmi.	K48HENG	14000	**		*****		******	100000000	harromia	E97700-Ye	THE PERSON	Metal e	400465254	Marson.	unvitaen:	esetitus	ez-iro	_		_	_		_	_	_
BVZNK	Ž	<u> </u>	510	88	92 4	210	26	8	£13	35	-039	E i	2 8	g g	62	2002	Ř	50		Į į	0 3	Į ų	2 8	187	980	8	345	6883	88	8 3	ž 8	116	8	19	219	E E	R	8	91	is i	2 92	Ř	ä	8	25. 15.	8	Ť.	810	8	, i	į 8	+6+'-	8 :	.894	Ę
a728K	Œ.	07. 67.	253	<b>190</b>	<u>şe</u>	ā	32	743	(385	76	Â	ğ	2	1 8	P P2	J.F.	8	20	551,	₹.	6	1	9 8	} }	Ą	8	Ņ	133	8	ğ	į s	Ř	ğ	79	010	đ g	F	Z	22	91.	2 S	192	<u>8</u>	8	ģ	í 8	Ē	Ą	8	ţ	3 8	ig.	8;	3,	4 1
		<u>2</u> 8																																																				8	-
31816	5	lš es	1 88	Ą	8 8	9 70	80	<u>89</u>	SEE.	<u></u>	Ř	18 E	3 8	707	8	R	990	8	<b>6</b>	in t	8 8	9	- G	N.	×	8	Sag.	5885	8	œ 7	η &	Į.	9	188	+51.	ē K	198	Ą	ĕ	611	710	189	Ğ	23	į į	2 6	.C.+.	8	8	į,	3 %	-	ł	8 8	<u> </u>
		<u> </u>																																																				8 1	Įξ
SZ4WK	Ģ.	of B	遠	5355	88	1 0	18	586	£14.	88	6897	<del>1</del> 1	8 5	2 5	2 88	9,0-	88	Si	ř.	8	n S	2 0	4 8	8 8	G	200	-589	ŧ	8	ظ ز الا ا	무 8	ğ	i ii	8	-213	‡ 8	. B	) A	%	120	in a	, g	R	8	 D :	- 8	3 -		g	Ä	<b>Q</b> 8	.443.	8	8	ξ ξ
97.7E	ā	375	ã	ğ	ia c	1 6	16	ġ	93	88	-,191	570	8 8	4	8	Ř	92	5	-D19	18 G	5 0	9 8	8 8	351.8	i d	28	138	210	88	86 F	N R	į	880	88	**	E &	8	ř.	8	-86.4	8 %	ā	ž	9	-	ō	100	317	8	1982	o g	S	61 d	28 5	į į
3776	<u> </u>	8 6	600	1937	ő	i i	168	ž.	2	88	000	196	88 8	1	8	082	Đ,	6	180	ig d	ī ,	i i	į 8	8 8	00	8	'n	033	88	Ē ;	9 8	30,12	8	8	,909 <sup>c</sup>	8	1 12	8	28	-533	8 8	3		6	ē i	į	100	. 150	8	-,111	Ę &	- 58g	Ū	3 8	ĘĒ
		168																																																					
3486	<u>\$</u>	i i	18	812	<b>*</b>	ž Ž	S	Ą	8	88	1+7	27,	88	ą į	ğ 18	E.	R	88	245	į į	8	. 8	1 6	8 19	8	8	Ā	ğ	88	ą i	8 6	5	8	88	Ŕ	8 8	8	-	88	3834	ą 8	S A	8	8	<u>5</u>	ě	8 8	R	8	į į	ģ ä	84	สุ้	18	ξĘ
950	ğ	96 8	3 2	ş	18	£ 4	88	5107	m Fig	88	£61	1 <u>9</u>	88	ą (	7 88	620-	Ĝ	SH	27.3"	8	Į K	5.0	2 8	3 2	, m	88	88	8	88	E !	<u>8</u> 8	3 2	Į Į	댊	-	8	i iç	8	88	S.	8 8	8 19	8	88	Ą	ğ 8	B E	1 4	8	88	ĝ.	15	8	8	, r
35.58	Œ.	<u>5</u> 8	B g	8,	28	± 8	18	<u> </u>	iv.	188	S,	505	88 ,	1	5 89	<u>ē</u>	88	33	151,	īë į	3 2	į	ā 8	.71.7	8	8	in in	510	8	<u></u>	8	3 -	-	얾	50	R S	3 K	8	18	OEU.	ر اور ا	1,767	8	58	ŧ51.	8 8	8 6	2	8	220	18 8	R	808	16 5	A Z
27Z	19	Ci X	8 8	940	16	8 8	18	1887	£83	88	i di	8	8	÷ (	18	=	17.	8	-500°	eg (	3 5	į	<b>4</b> 8	8 15	8	8	000	183	88	<del>-</del>	8	2 5	280	88	DE3	8€ 8	8 8	3 2	8	OEO.	10 d	100	, m	65	960	រី <u>រ</u>	, c	5	8	19.	Ą E	8 2	Ą	S	, 15 15 15 15 15 15 15 15 15 15 15 15 15 1
#8T8	ē	ğ Ø	8 B	× ×	ŧő.	ž ģ	88	300	ģ	8	<u>18</u>	61.	kă j	in i	£ 16	503	376	16	++1.	+1.	5	7 1	7 2	345	į	5	-		ō	0.00	E 8	8 [	2 0	8	80	£ 8	å ģ	8	18	0Q1.	R V	8 1	[ 8	88	36	120	8 9	i	8	910	CH S	240.	8	83	Řξ
18T8	g	ğ b	ō 3	58	ē	<u> </u>	188	348	ě	8	292	S S	δō	ą į	a to	-046	88	16	900-	÷ 61	ē	į	n 7	7	-	ē	346*	ō	16	317	g 8	8	0	8	901	315	g ů	9 8	88	1.54E.	ą	8 5	8	8	Į.	01G	88 5	} [	2 8	551.	<u>-</u>	8 8	Ņ	8	Š į
PIS P	Č.	g a	8	Ą	δõ	10 to	8	- DES	g	8	311:	8	ŝõ	= 1	÷ 65	- F	8	5	33;**	ā	5	-	ě	5 6	į	ē	1 1 1	ğ	6	-137	คี่ 8	В	ň Š	8	101,	38	¥ .	Ę	8	8	4	8 2	1	88	N.	R	88	1 (	¥ &	ā	\$3	8 8	1 %	8	19
24T8 G	SS	Ř a	R 18	620	ន	A E	<b>8</b>	is.	, to	88	151,	22	8	Œ i	<u> </u>	362	8	6	-		i i	ž į	Ę č	5	3 3	ē	1	174	6	100	of S	2 3	į ž	8	.£13.	8	SI I	1 2	88	CCO	īĝ	8 8	2 18	ā	910°	38	8	1	<u>a</u> 6	887	Ř	81 8	<b>*</b>	*	ğğ.
81,	iŖ	8 8	R A	[A	8	ĝi 8	8	88	8	88	3222	8	8	Į į	A 8	-		ŧ6	1	8	đ,	7 1	8 3	2 2	9 9	} ō	ě	916	5	<u>‡</u> .	12	3	<u> </u>	61	630	Ğ.	BK [	j b	88	150	131	88 8	į Ę	6	ŧa.	950	5	2 6	<b>1</b>	ĥ	Ą	8 8	1 18	88	540.
Ě	ā	1 de 18	8 5	岩	18	<u>8</u> 8	į	i.	8	90	916	Ŕ	8	_	8	12	Ŕ	8	521.	55	8	5 1	* 1	1000	2 8	1 10	320	Ē	bõ	ŧ	5	s	- 50	88	190	23	88	ą į	18	E	908	8	R &	8	25	Ř	88	2 1	<u>=</u> 8	E	F	88 ĝ	192	ដ	741
ĕ	9	8 8	8 ×	8	88	8 8	, i	19	8	ã	-	-	8	9 1	į S	4224	8	8	161,	A	g	F	B 1	ă i	Ę 5	9 6	9 8	<u></u>	δã	ā	10	6	E E	8	751.	198	88	¥ (	, 78	-,341	ą	8	3 9	8	161	575	88	60 (	±. 8	F	010	8 3	18	8	G S
\$T.¢	ls Fi	Ę	Ď	8	ŧ	£4.	8	-	-	88	,483th	8	ŧ.	ក្រ ក្រ	B #	200	000	88	134	Fig	88	R I	8	8 0	ž į	3 8	8 8	į	8	580	EF.	â	i i	1 88	210	513	88	Ą	8	-,077	ĝ	Si i	÷ :	1 18	800	66	<b>18</b>	3	á g	2	88	8 8	<u> </u>	18	S
(ST¢	09	8	347	8	**	<del>-</del>	- 88	131	8	88	D86;	90	ă.	8	8	, C.57	8	88	247	ã	88	9	8 2	28	2 6	1 1	8 2	1 12	<b>18</b>	:38	<u> </u>	8	<u> </u>	3 18	575	1881	8	å (	£ 5	181.	860	ß	8 8	ę sa	-046	573	£		Đ X	3 3	Į	28	ē #	18	ŽĮ Š
24T4 3	951,	<b>15</b> 8	3 -		8	ė į	i	100	8	oŏ	Ř	800	86	eg :	5 K	Ŕ	EEG	8	186	670	8	R	Ŗ i	ŏ	į ģ	<u> </u>	à g	i R	hi	EE	940	8	ğ ?	8 8	ā	196	88	g :	N N	860	ř.	ž	8 8	į iš	đ	į	lő :	-O-	G 8	S G	ğ	8	£ Q	a	51. jš
324T4 b.	_	-	3 8	190	S	606	3 8	30.0	- C	<b>∞</b>	.4+6	8	88	ğ	, K	2	8	8	1887	Ą	8	1	e i	80 8	3 8	ē 6	õ	ğ	lio.	590-	St	*	<u>B</u> 9	2 8	529	838	88	9	* * * *	210	88	8	E }	i i	ğ	977	ξō	ģ	S 8	g 3	8	_			341,
_			and the second	-	-	- earson		26.202.53			Peatson	_	-	Pearson.		Pezition			Pearson			Pedisor			Lease of				_	Pedisor	_	1	e Pedison		Permon	_		e Pedisor	_	Petron	_		le Pecesor		e Pegran	•		de Peterson	<u>-</u>	de Person	Ŷ		at)		the Person
	onelación de Peassor	ig. Onliaierai)	melación de Bearco	g. deliateral)		onelación de Pearso la tallación de	g. dallacter.	alı cişi acianc	k. Olizieral		onelaction de Peatson	tg.(billaleral)		onelacionale Pearso	3g.(billaleral)	renelación de	Elg. (billaleral)		Correlación de Pearso	Sg. (kilakral)		Correlación de Pearso	Elg. (billateral)		Correlation Me Feation Of Attached	(9. ymarid)	A core l'action de	Sty. Oslialeral)	_	Correlación de Pearso	Sig. (fellateral)	_	Correlation lie Pearson	Ag. milaicid.	Correlation	Sig. (bilateral)	*	Consideration of Pearso	Og. dilakral)	Considerion	Og. (elfakral)		Correlacion de Pearso	ag. (makra)	Contractor	21g. (billakral)	*	Contribution (le Pearso)	20.04aen	Correlacion	Cig. (Milateral)	_	Contraction lie region	_	Considerate Peason of a Malabrah

Carrelationes

Todas las variable s de  $\alpha$  y  $\beta$  descritas mas arriba siguieron una distribución normal de sus valores, menos la variable  $\alpha$  a 72 horas que siguió una distribución no normal (Kolmogorov-Smirnoff). En la Tabla 3 se muestran las correlaciones observadas entre los valores de dichas constantes. Ha resultado relevante el presente análisis, si tenemos en cuenta que existe una relación entre todos los parámetros de radiosensibilidad, y entre las diversas subpoblaciones, siendo especialmente relevante para el valor de  $\beta$ 48 de los CD8. Hemos observado una estrecha relación entre los valores de  $\alpha$  y en los diversos tiempos del ensayo para las subpoblaciones CD8 y B (Figuras 4 y 5) y algo peor para CD4(Figura 3). Entre la subpblación NK se observó una menor correlación entre las constantes entre si (Figura7)

Figura 4.- Relación de las constantes α, β a 24,48 y 72 en CD4.

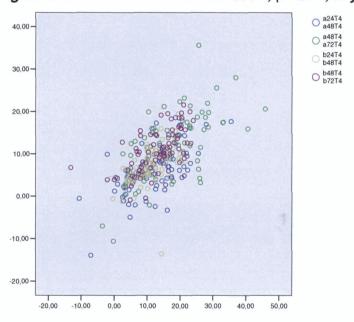


Figura 5.- Relación de las constantes  $\alpha$ ,  $\beta$  a 24,48 y 72 en CD8

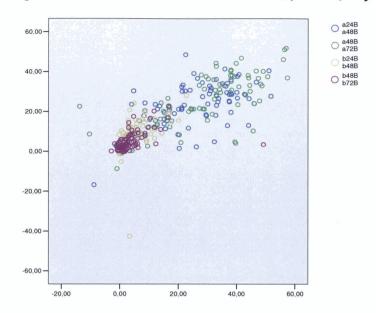
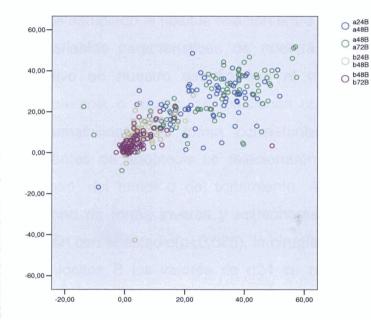


Figura 6.- Relación de las constantes  $\alpha$ ,  $\beta$  a 24,48 y 72 en B



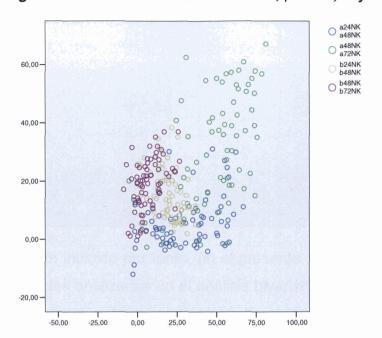
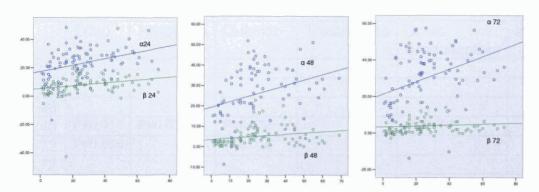


Figura 7.- Relación de las constantes α, β a 24,48 y 72 en NK

Hemos estudiado la posible relación entre las constantes de radiosensibilidad y las variables características de nuestra serie de pacientes. Ha resultado llamativo en nuestro estudio que el tratamiento y por ende el uso de quimioterapia o cirugía, se relacionan con la constantes de los modelos de radiosensibilidad. De forma consistente algunas determinaciones de constantes de apoptosis se relacionaron con los factores dependientes del huésped, del tumor o del tratamiento. Así en los CD8 el valor de β48 se relacionó de forma inversa y estrechamente con la edad (-0,322;p<0,002) y también con el estadio(p<0,025), la cirugía (p<0,002) tratamiento (p<0,008). En los linfocitos B los valores de α24 se relacionaron con el estadio(p<0,012) cirugía (p<0,002) quimioterapia (p<0,006) tratamiento (p<0,004) dosis de barquiterapia (SR:-0,224;p<0,033) dosis total(SR:-0,223;p<0,032). Sin embargo el hallazgo mas relevante es in duda la estrecha relación observada entre el intervalo tratamiento-determinación de la apoptosis y las constantes alfa y beta especialmente en la subpoblación B ( $\alpha$ 24,  $\beta$ 24,  $\alpha$ 48,  $\beta$ 48, $\alpha$ 72) y en menor medida con CD8(β48h) y NK(α24,β48)

Figura 8.- Relación de las constantes  $\alpha$ ,  $\beta$  a 24,48 y 72 de la subpoblación B con el Intervalo Tratamiento-Determinación de la apoptosis.



Se han incluido por tanto, en el presente análisis de regresión lineal, todas las variables analizadas en el análisis bivariante. Solo el intervalo temporal entre el tratamiento y la determinación de la apoptosis radioinducida fue capaz de definir adecuadamente las constantes de radiosensibilidad de una subpoblación a todas las escalas temporales. Efectivamente las subpoblación B es la mas afectada por el intervalo radiación-determinación de apoptosis. También la edad y el tratamiento realizado con la inclusión de quimioterapia, han resultado predictivas de las variables de muerte apoptótica en algunos casos. El estadio, grado histológico, tratamiento quirúrgico y dosis de radioterapia externa no han resultado predictivas de los valores de las constantes en ningún caso.

			e Regresión ctores prond		ra la relación	entre las cons	tantes de
		Edad	Histologia		Tratamiento	Dosis Braquiterapia	Intervalo
CD4	<i>α</i> 24						
	β 24						
	a 48						
	β 48	P<0,011	P<0,039	P<0,036		P<0,050	
	α 72	P<0,005		P<0,016			
<u>_</u>	β 72						
CD8	α 24				P<0,022	P<0,018	
	β 24				P<0,032		
	a 48						P<0,002
	β 48						P<0,043
	α 72						
	β 72						
В	α 24						P<0,022
	β 24	P<0,003	P<0,018				P<0,0001
	α 48						P<0,013
	β 48	P<0,025		P<0,001			P<0,002
	a 72						P<0,001
	β 72		P<0,012	_			P<0,016
NK	α 24	P<0,011					P<0,035
	β 24					P<0,011	
	a 48						
	β 48						
	a 72						
	β 72		P<0,013				

La toxicidad observada en nuestra serie de pacientes es descrita en la Tabla 6. Podemos observar que la mayoría de las enfermas no sufrieron toxicidad o lo hicieron de una forma leve, especialmente las referentes a la toxicidad gastrointestinal (70,8%), rectal (73,8%) y urinaria (70,7%). La mitad de las pacientes (48 casos;51,1%) seguían manteniendo relaciones sexuales en el momento del análisis de nuestra serie.

Tabla 6 To	Tabla 6 Toxicidad clínica observada en la serie general de pacientes.												
Toxicidad (Glosario )	Ninguna	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4								
Vaginal	15 (15,2%)	33 (33,3%)	32 (32,3%)	15 (15,2%)	4(4%)								
Sexual	13 (13,1%)	37 (37,4%)	35(35,4%)	12 (12,1%)	2(2%)								
Intestinal	70 (70,8%)	23 (23,2%)	3 (3%)	2 (2%)	1(1%)								
Rectal	73(73,8%)	13 (13,1%)	9 (9,1%)	3 (3%)	1(1%)								

MERCHANISM SERVICE SER	AND CONTRACTOR OF THE PROPERTY	Schleistelfeigt für finansketen stamma dannin auf sinne und stellt wir befreit fran fin	eccaldationaleccocionismosaches describes composito de problema de la composito de la composit	naces pour and country about your manuscripture pour and the contract of the country and the contract of the country and the c	Secretaria de la company d	
Urinaria	70 (70,7%)	17 (17,2%)	8 (8,1%)	2(2%)	2(2%)	

Hemos realizado por tanto un análisis de Cox simple en que valoramos el riesgo (odd ratio) que comportan niveles crecientes de un factor en la probabilidad de padecer el evento problema a estudio. Resulta evidente de nuestros datos que niveles bajos de apoptosis espontánea y radioinducida se asocian con mayor probabilidad de padecer toxicidades clínicas. De forma preferente esta relación se centra en las constantes del modelo para la apoptosisi de los linfocitos CD8 y especialmente en los B. La apoptosis espontánea (a) o radioinducida  $(\beta)$  de linfocitos CD4 no se relacionó con la apaprición de toxicidad. Las relaciones observadas para NK fueron limitadas.

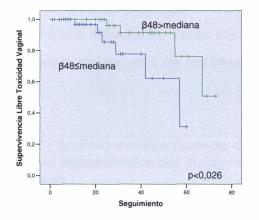
Tabla 7 Estudi huésped, tumor					s dependiente	es del
	Toxicidad Sexual	Toxicidad Vaginal	Toxicidad Intestinal	Toxicidad Rectal	Toxicidad Urinaria	Relaciones Sexuales
Edad					P<0,052 O.R:1,047 (1,000-1,097)	P<0,0001 O.R:1,038 (1,018-1,058)
Grado						
Tratamiento			P<0,060			
Dosis Externa						
Dosis Braqui.						
a 24	NK P<0,018 O.R:1,071 (1,012-1,134)	NK P<0,012 O.R:1,084 (1,018-1,154)		P<0,003 O.R:0,942 (0,906-0,980)		P<0,045 O.R:0,971 (0,944-0,999)
β 24			B P<0,002 O.R:0,953 (0,924-0,982)	B P<0,020 O.R:0,961 (0,929-0,994)	B P<0,003 O.R:0,933 (0,892-0,977) CD8P<0,074 NK P<0,052	
a 48			B P<0,039 O.R:0,968 (0,939-0,998)	B P<0,014 O.R:0,960 (0,929-0,992) CD8P<0,083	B P<0,037 O.R:0,940 (0,888-0,996) CD8 P<0,052	NK P<0,029 O.R:01,018 (1,002-1,035)
β 48			<b>CD8</b> P<0,098	CD8 P<0,050 O.R:0,932 (0,869-1,000)		CD8 P<0,010 O.R:0,935 (0,888-0,984)  NK P<0,047 O.R:0,962 (0,926-0,999)
a 72		CD8 P<0,050 O.R:0,961	<b>B</b> P<0,011 O.R:0,969	CD8 P<0,014 O.R:0,965	P<0,010 O.R:0,950	B P<0,022 O.R:0,978

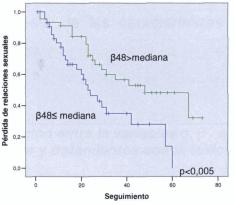
	(0,923-1,000)	(0,947-0,993)	(0,938-0,993)	(0,914-0,988)	(0,960-0,997)
	l.		B P<0002 O.R:0,962	<b>NK</b> P<0,052	
0.70			(0,942-0,987)	B P<0,022	
β 72				O.R:01,071 (1,010-1,135)	

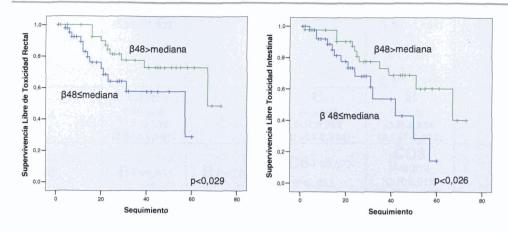
#grado 0-2vs3-4 \*grado 0-1 vs 4

Con la intención de mostrar de una forma visual el impacto que los valores de las constantes de radiosensibilidad tienen en la predicción de la toxicidad clínica se presentan a continuación las gráficas que muestran el papel predictivo de algunos de las constantes que han resultados significativas en el análisis multivariante. El valor de  $\beta$  a 48 horas de la subpoblación CD8 se ha asociado estrechamente a los valores de b para otras subpoblaciones así como a otras características de las pacientes.

Figura 9.- Relación de las constante  $\beta$  a 48 horas de la subpoblación CD8 con la toxicidad clínica radioinducida.







Hemos realizado un análisis multivariante mediante regresión de Cox, para conocer el impacto que las diversas variables estudiadas tienen en la predicción de la probabilidad de estar libre de toxicidad grave sexual y vaginal (grado3-4) y de sufrir toxicidad intestinal, rectal o urinaria (grado1-4). La elección de este análisis tiene que ver con la relación que las toxicidades detectadas tienen con el tiempo de seguimiento de la enferma. Efectivamente al ser toxicidades crónicas las aquí estudiadas, estas serán menos frecuentes en las pacientes con seguimientos menores. De forma que hemos de tener en cuenta no solo la relación entre toxicidades y variables pronósticas, sino el espacio temporal en que se producen. Hemos incluido en este análisis los valores de las dos subpoblaciones (CD8 y B) que han resultado relevantes en el análisis bivariante junto con el resto de las características propias del huésped, del tumor o de los tratamientos.

Tabla 7.- Análisis multivariante de correlación entre la variables α, β a 24,48 y 72 y las variables dependientes del huésped, tumor y tratamientos con la toxicidad clínica observada.

	Toxicidad Sexual	Toxicidad Vaginal	Toxicidad Intestinal	Toxicidad Rectal	Toxicidad Urinaria	Relaciones Sexuales
	#	#	*	*	*	30,44.75
Edad						P<0,006 O.R:1,050 (1,014-1,087)
Tratamiento	(3)0,098	(2)0,081	P<0, 020(2) O.R:0,114 (0,018-0,713)			
Dosis RT Externa			P<0,033 O.R:0,930 (0,869-0,994)			
Dosis Braquiterapia		P<0,074		P<0,027 O.R:0,999 (0,999-1,000)	,	P<0,049 O.R:1,000 (0,999-1,000)
α 24	B P<0 ,031	B P<0,057		CD8 P<0,023		<b>B</b> P<0,013

	O.R:0,829 (0,699-0,983)			O.R:1,054 (1,007-1,104) B	O.R:0,938 (0,891-0,986)
				P<0,001 O.R:0,875 (0,809-0,946)	
β 24	CD8 P<0,045 O.R:0,389 (0,154-0,981)		P<0,001 O.R:0,769 (0,655-0,904)	B P<0,001 O.R:0,834 (0,747-0,932)	P<0,007 O.R:0,895 (0,826-0,971)
α 48	B P<0,053	B P<0,074	CD8 P<0,072 B P<0,053	CD8 P<0,024 O.R:0,919 (0,855-0,989)	CD8 P<0,07 B P<0,086
β 48			B P<0 ,004 O.R:1,376 (1,109-1,706)		
a 72			<b>B</b> P<0,063	CD8 P<0,038 O.R:1,117 (1,006-1,240)	
β 72	B P<0,088	<b>B</b> P<0,073	P<0,005 O.R:0,790 (0.669-0.932)	B P<0,027 O.R:0,741 (0.569-0.966)	

#grado 0-2vs3-4 \*grado 0 vs 1-4

De forma general, parece que los valores de  $\beta$  para linfocitos B predicen muy estrechamente la toxicidad intestinal y rectal de nuestra serie, estando también relacionada con la pérdida de relaciones sexuales. También la constante  $\alpha$ 24 de los linfocitos B se ha correlacionado con la toxicidad sexual y la pérdida de relaciones sexuales. De forma menos estrecha, algunos valores para CD8 han alcanzado cierta significación estadística especialmente para la toxicidad rectal. La edad y el tipo de tratamiento incluyendo la dosis de braquiterapia han sido predictivas para la toxicidad rectal y la pérdida de relaciones sexuales.

#### DISCUSION

La irradiación es un tratamiento capital en la mayoría de los tumores, especialmente en el carcinoma cervical donde es el tratamiento de elección en los tumores localmente avanzados, compitiendo además con la cirugía en los tumores en estadios precoces. El daño inducido por la radiación en los tejidos normales, expresado como toxicidad aguda, pero de manera mas relevante como toxicidad tardía, es un factor limitante para la curación por irradiación de un amplio panel de tumores. Es necesario por tanto el desarrollo de ensayos predictivos de toxicidad. El método por nosotros usado tiene algunas ventajas sobre otros publicados como son la mejor detección de la apoptosis precoz

mediante el uso de annexina, y la modelización de los datos de MIR que se ajustan adecuadamente a un modelo semilogaritmico que define constantes con valores individuales a cada paciente. Además este modelo permite integrar en un solo valor de  $\alpha$  la apotosis espontánea y  $\beta$  la apoptosis radioinducida a diversas dosis de radiación.

El primero de los hallazgos de nuestro estudio ha sido el valor creciente de la constante alfa (apoptosis predicha por el modelo a dosis de radiación 0 o apoptosis espontánea) según se alarga el tiempo de incubación, este hecho que ya observamos en los estudios sobre linfocitos totales, se hace patente en todas las subpoblaciones estudiadas. Además los valores de beta tienen comportamientos diferentes. mostrando incrementos de la radioinducida (beta incremento de la apoptosis por incrementos de la dosis de radiación administrada) en los CD4 y NK y disminuciones leves para CD8 y marcadas para B. Si como otros estudios tenemos que definir la radiosensibilidad de las diversas subpoblaciones y hemos de tener en cuenta las constantes que definen nuestro modelo (Figuras 2 y 3) podríamos decir que las células menos radiosensibles son las CD4, seguidas de CD8, B y NK. Sin embargo, esta relación que está bien definida por la apoptosis espontánea no lo es tanto por la apoptosis radioinducida en la que el orden de menor a mayor inducción de apoptosis por dosis de radiación sería probablemente B,CD8/CD4,NK. Además estas relaciones podrían ser distintas en función de la escala temporal que se escoja. Es muy importante resaltar que las células B son muy estables en cuanto a sus resultados con independencia del tiempote incubación que se elija (Figura 2). Queda por otra parte a discutir el hecho ya desarrollado en el capítulo previo, de que mayores tasas de apoptosis refieren adecuada respuesta celular al daño radioinducido y menor presencia de alteraciones genéticas que predisponen a mayor toxicidad. Desde ese punto de vista entonces serían los linfocitos B los que en relación a la respuesta final a la radiación mas radiosensibles serían, seguidos de CD8, CD4 y NK.

Nuestros resultados resultados entran a formar parte de las publicaciones que han versado sobre este tema. Así, el grupo suizo (Crompton y Ozsahin,1997,1999,2001,2005)ha demostrado que los linfocitos CD8 sufren mas apoptosis radioinducida que los CD4. De forma similar Steward et al (1988) consideran que los B tienen una radiosensibilidad intermedia, sin

embargo Schmitz et al (2003) considera que los B son mas radiosensibles que los CD8. Sehi et al (1995) establece a los CD4 como resistentes, CD8 y B como intermedios y NK como los mas radiosensibles. Este grupo de resultados (CD4 menos apoptosis seguidos de CD8 o B), y NK con radiosensibilidad intermedia o alta, es radicalmente distinto al presentado por otros autores. Efectivamente, para Philippé et al (1997) y Mori et al 2005, los mas resistentes son los NK seguidos de CD8, CD4 y B mas sensibles.

Las causas que subyacen a estas diferencias de apoptosis inducida tienen que ver con la cartera de genes que expresa cada subpoblación. Así existe una expresión diferencial de P53 que se induce en CD4+, CD8+ y células B, pero no en NK (Seki et al,1994) Además (Mori et al 2005), se ha demostrado que los niveles de expresión de BAX aumentan en linfocitos en correlación con la sensibilidad de las células (NKCD56+<TCD4+<TCD8+<BCD19+)sin que existieran cambios para TNFRSF10B (Mori et al 2005). La expresión del gen anti-apoptótico BCL-2 varía en las diversas subpoblaciones tras el estímulo de citoquinas (Seki et al 1995). Además las células B expresan una forma variante de Ku86 que produce heterodimeros con Ku70, que resultan ineficaces para reclutar a DNAPKC y por tanto reparan peor el daño radioinducido (Muller et al1998)

Otro aspecto a tener en cuenta a la hora de examinar estos resultados es la existencia de un fenómeno de selección de subclones en el intervalo entre el tratamiento de radioterapia y la determinación de la apoptosis. Efectivamente en los linfocitos totales se observó un aumento de los valores de alfa y beta con el tiempo. En el presente estudio es en la subpoblación B, en la que de forma mas evidente se muestra el impacto que tiene el intervalo entre el tratamiento de la paciente y la determinación de la apoptosis. Se observan que los valores de alfa y beta también se modifican con el tiempo. Este hecho, junto con el conocimiento de las modificaciones que la radiación induce en la proporción de las distintas subpoblaciones que componen el conjunto de linfocitos totales(Louagie H et al (1999) y en la producción de citoquinas (Miller et al 2003). que activan y expanden subpoblaciones concretas (NK) podría influir en las tasas de apoptosis observadas(Rana et al, 1990).

Hemos observado en nuestra serie de pacientes que las variables  $\alpha$ ,  $\beta$  se relacionaban estrechamente entre sí dentro de cada estirpe linfocitaria

estudiada salvo en NK. Además parece desprenderse de nuestros datos una cierta relación entre los valores de  $\alpha$  de todas las subpoblaciones y de forma similar con los  $\beta$ . Este hecho parece confirmar que si bien los niveles de apoptosis a dosis 0 del modelo (constante  $\alpha$ ) aumentan su valor conforme se incrementa el período de incubación de los linfocitos, estos representan una condición intrínseca del paciente, como también sucede con los valores de  $\beta$ .

Las variables  $\alpha$  y  $\beta$  del modelo se han relacionado con algunas características de los tratamientos, como la quimioterapia, la irradiación o las dosis de braquiterapia, casi exclusivamente en CD4/CD8 y estaría en relación con la modificación inducida por los tratamientos en las diversas subpoblaciones linfocitarias. Este hallazgo ha sido ya evidenciado por (Crompton et al 1999) mostrando altos niveles de apoptosis espontánea en pacientes que recibe quimioterapia. La relación con la edad ha sido también suficientemente discutida en el capítulo previo(Barber et al 2000, Crompton et al 2001, Schimtz 2003 et al). Hemos observado una relación con la edad que no afecta por igual a todas las subpoblaciones ni a todas los puntos de tiempo, representando una relación poco sólida en nuestra opinión. El hallazgo de una relación espúrea con el tipo histológico, no es fácilmente explicable. De forma global podemos convenir con Ozsahin et al (2005) que la radiosensibilidad de los linfocitos viene dada por dos tipos de factores, unos genéticos y otros epigenéticos como la edad (Crompton et al 2001) o en menor medida los tratamientos empleados como guimioterapia o mayores dosis de radiación

Como ya hemos referido previamente nuestra serie tiene aún un corto seguimiento, aunque similar a los mas recientemente publicados(Ozsahin 2005) hecho relevante a la hora de analizar la toxicidad radioinducida. Sin embargo hemos observado una importante valor predictivo en análisis bivariantes a las subpoblaciones CD8 y B e inexistente para CD4. Este hecho (Crompton los hallazgos del suizo У confirma grupo Ozsahin,1997,1999,2001,2005) en cuanto al relevante papel de CD8 en la predicción de toxicidad tardía y la no utilidad de CD4. Sin embargo hasta ahora ni B ni NK se habían incluido en estudios de predicción. Con respecto a NK, hemos observado algunas relaciones con algunas características de toxicidad, pero no se han extendido a una mayoría de las toxicidades estudiadas. Por el contrario, el estudio del valor de las constantes  $\alpha$ ,  $\beta$  en los linfocitos B con la

toxicidad clínica observada en nuestras pacientes ha reportado resultados consistentes tanto en el análisis univariante como en el multivariante. Efectivamente además del impacto que los diversos tratamientos y la edad de las pacientes han tenido en la predicción de la toxicidad en análisis bivariantes. niveles progresivamente mas elevados de  $\alpha$  y  $\beta$  se han asociado con menores probabilidades de sufrir toxicidades clínicamente relevantes. discutimos en el capítulo anterior, este hecho que podríamos considerar sorprendente, ya que una mayor tasa de apoptosis se relaciona con menor toxicidad clínica, es un hallazgo constante en las serie originales antes citadas. pero también en estudios recientes que incluyen análisis de las diversas subpoblaciones (Oszahin 2005). La explicación de este fenómeno no es sencilla, y tiene que ver con la elección de la via de muerte que la célula elige una vez el daño inducido por la radiación es considerado irreparable. Para Ozsahin et al (2005) esta relación entre radiosensibilidad y apoptosis reducida aunque aún sin clarificar, podría estar en relación con la adecuación de la respuesta a irradiación que incia el linfocito. Por tanto la no inducción de apoptosis significaría una respuesta no adecuada, basada e alteraciones moleculares, que se asocian con toxicidad tardía grave, como el caso de Ataxia Telengiectasia, Bloom o anemia de Fanconi con expresión defectiva de P53(Dachaud et al 1994.Roselli et al 1995). y deficiente respuesta apoptótica a radiación aunque con altos niveles de apoptosis espontánea(Dachaud et al 1994).

Así ha sido publicado que en pacientes con AT y otros síndromes de radiosensibilidad como síndrome de Bloom o anemia de Fanconi, los linfocitos no muestran una inducción de P53 tras el daño causado por radiación Esto determina una deficiente respuesta apotótica tras irradiación aunque con altos niveles de apoptosis espontánea.

En nuestra opinión, es posible estimar la radiosensibilidad celular de los linfocitos de sangre periférica de una paciente mediante el estudio de la apoptosis radioinducida, con una técnica de Anexina/IP desarrollada a este efecto por nuestro grupo. Los incrementos de apoptosis no lineares, observados en función de la dosis y el tiempo, se ajustan a un modelo matemático semilogarítmico, que permite definir variables individuales de

radiosensibilidad. La facilidad, rapidez y reproducibilidad de esta técnica, permitiran realizar estudios más amplios para analizar su papel predictivo.

La apoptosis radioinducida varía ampliamente entre las diversas subpoblaciones linfocitarias, aumentando los valores de  $\alpha$  y  $\beta$  para los linfocitos B con el intervalo entre el tratamiento y la determinación de la apoptosis. Los valores de  $\alpha$  y  $\beta$  para la subpoblación B y en menor medida para CD8 se relacionan junto con la edad de la paciente y el tratamiento recibido con la toxicidad clínica observada, sin observarse papel alguno para la subpoblación CD4 y NK. Este hecho, hace necesario profundizar en la expresión génica de las diversas subpoblaciones que permita identificar genes que expliquen las diferencias observadas.

## **CAPÍTULO VII**



- 1.-En nuestra serie madura de casos con largo seguimiento, se ha podido objetivar una estrecha relación de la apoptosis y de sus genes reguladores P53,BAX y BCL-2 entre si. Además se demuestra la existencia de factores predictivos de carácter biológico para la obtención de respuesta inmediata a la irradiación(BCL-2). Marginalmente, la expresión de P53 fue relevante en la predicción de las variables de supervivencia en pacientes con cáncer de cérvix con largo seguimiento
- 2.- La expresión de IGF1-r se relacionó con la apoptosis y sus genes reguladores BAX y BCL-2. Sin embargo, no fue útil en predecir la supervivencia. La Ciclina D1 se ha revelado como un factor pronóstico de primer orden para la supervivencia en análisis univariantes y multivariante. La expresión combinada de genes ha permitido identificar subgrupos de pacientes con excelente supervivencia (P53+/Ciclina D1-)
- 3.-Es posible estimar la radiosensibilidad celular de los linfocitos de sangre periférica de una paciente mediante el estudio de la apoptosis radioinducida, con una técnica de Anexina/IP que se ajusta a un modelo matemático semilogarítmico, que permite definir variables individuales de radiosensibilidad. Los valores de  $\alpha$  y  $\beta$  observados en nuestras pacientes se relacionan estrechamente entre sí y se incrementan con el tiempo transcurrido la irradiación. Además las constantes  $\alpha$  y  $\beta$ , junto con la edad de la paciente y el tratamiento recibido se han relacionado con la toxicidad clínica observada.
- 4.-Las subpoblaciones linfocitarias estudiadas difieren en sus tasas de apoptosis radioinducida, siendo progresivamente mayores en CD4, CD8, B y NK. Las variables  $\alpha$  y  $\beta$  definidas por el modelo semilogaritmico han resultado predictivas de toxicidad tardia en una amplia serie de pacientes, cuando se estudia especialmente las subpoblaciones B, CD8 y NK. Los linfocitos CD4 no mostraron valor predictivo. Investigar las causa que justifican esa diferente respuesta a la irradiación entre subpoblaciones y posteriores análisis con mayores seguimientos son a nuestro juicio las direcciones futuras de investigación.



Adams TE, Mckern NM, Ward CW. Signalling by the type 1 Insulin-like growth factor receptor: Interplay with the epidermal growth factor receptor. Growth Factors 2004.22(2):89-95

Adhya AK, Srinivasan R, Patel FD. Radiation therapy induced changes in apoptosis and its major regulatory proteins, Bcl-2, Bcl-XL, and Bax, in locally advanced invasive squamous cell carcinoma of the cervix. Int J Gynecol Pathol 2006. 25(3):281-287

Agarwal J, Gupta SC, Singh PA, Bisht D, Keswani NK. A study of humoral factors in carcinoma cervix.Indian J Pathol Microbiol. 1992;35(1):5-10.

Alapetite C, Thirion P, de la Rochefordiere A, Cosset JM, Moustacchi E. Analysis by alkaline comet assay of cancer patients with severe reactions to radiotherapy: defective rejoining of radioinduced DNA strand breaks in lymphocytes of breast cancer patients. Int J Cancer. 1999, 24;83(1):83-90.

Alfsen GC, Kristensen GB, Skovlund E, Pettersen EO, Abeler VM. Histologic subtype has minor importance for overall survival in patients with adenocarcinoma of the uterine cervix: a population-based study of prognostic factors in 505 patients with nonsquamous cell carcinomas of the cervix. Cancer. 2001;92(9):2471-83.

Alvarez RD, Soong SJ, Kinney WK. Identification of prognostic factors and risk groups in patients found to have nodal metastasis at the time of radical hysterectomy for early stage squamous carcinoma of the cervix. Gynecol Oncol 1989; 35: 130-135.

Anacak y, Yalman D, Ozsaran Z, Haydaroglu A. Late radiation effects to the rectum and bladder in gynecologic cancer patients: the comparison of LENT/SOMA and RTOG/EORTC late-effects scoring systems. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2001;50:1107-1112

Ashcroft M, Voudsen KH:regulation of p53 stability. Oncogene 1999;18:7367-7643.

Bae DS, Cho SB, Kim YJ, Whang JD, Song SY, Park CS, Kim DS, Lee JH. Aberrant expression of cyclin D1 is associated with poor prognosis in early stage cervical cancer of the uterus. Gynecol Oncol 2001. 81:341-347.

Barber J., West C., Kiltie A., Roberts S., Scott D. Detection of individual differences in radiation-induced apoptosis of peripheral blood lymphocytes in normal individuals, ataxiatelangiectasia homozygotes and heterozygotes, and breast cancer patients after radiotherapy. Rad Res, 2000; 153: 570-578.

Bartek J and Lukas J: mammalian G1- and S-phase in response to DNA damage. Curr Opin Cell Biol 2001;13:738-747

Baserga R. The IGF-I receptor in cancer research. Exp Cell Res 1999. 253:1-6

Bayreuther K., Rodemann HP., Hommel R., Dittmann K., Albiez M., Francz Pl. Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage. Proceedings of the National Academy of Science. USA. 1988; 85: 5112-5116.

Belka C and Budach W: Anti-apoptotic BCL-2 proteins:structure, function and relevance for radiation biology.Int J Radiat Biol 2002;78:643-658

Belka C et al: Differential role of caspase-8 and BID activation during radiation- and CD95-induced apoptosis. Oncogene 2000; 19:1181-1190

Bentzen S. M., Tucker S. L. Individualization of radiotherapy dose prescriptions by means of an in vitro radiosensitivity assay. Radiother. Oncol 1998; 46: 216-218

Berkowitz RS, Ehrmann RL, Lavizzo-Mourey R, Knapp RC. Invasive cervical carcinoma in young women. Gynecol Oncol. 1979;8(3):311-6

Bhattacharya P, Duttagupta C, Sengupta S. Proline homozygosity in codon 72 of p53: a risk genotype for human papillomavirus related cervical cancer in Indian women. Cancer Lett. 2002 15;188(1-2):207-211.

Bolger BS, Symonds RP, Stanton PD, MacLean AB, Burnett R, Kelly P, Cooke TG. Prediction of radiotherapy response of cervical carcinoma through measurement of proliferation rate. Br. J. Cancer, 74: 1223-1226, 1996.

Bonn D, Bradbury J. The warts and all aproach to tackling cervical cancer. The Lancet 1998; 351: 810

Borgmann K, Röper B, El-Awady RA, Brackrock S, Bigalke M, Dörk Tilo, Alberti W, Dikomey E, Dahm-Daphi J et al 2002

Brand AH, Bull CA, Cakir B. Vaginal stenosis in patients treated with radiotherapy for carcinoma of the cervix. Int J Gynecol Cancer. 2006 Jan-Feb;16(1):288-93.

Brown EJ and Baltimore D: essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance. Genes Dev 17:615-628, (2003).

Brustugun OT, Fladmark KE, Doskeland SO, Orrenius S, Zhivotovsky B. Apoptosis induced by microinjection of cytochrome c is caspase dependent and is inhibited by Bcl-2. Cell Death and Differentiation 1998, 5: 660-668.

Burnet N. G., Wurm R., Nyman J. and Peacock J. H. Normal tissue radiosensitivity: how important is it? Clin. Oncol, 1996; 8:25-34.

Burnet NG, Wurm R, Peacock JH. Low dose-rate fibroblast radiosensitivity and the prediction of patient response to radiotherapy. Int J Radiat Biol 1996;70:289-300.

Camacho C, Lara PC, Rey A, López Bonilla A, Falcón O. Expresión del antígeno de proliferación ki67 en el cáncer de cérvix uterino. Relación con variables clásicas de pronóstico y supervivencia a largo plazo. Prog Obst Bin 1997; 40: 204-412.

Cannistra SA, Niloff JM. Cancer of the uterine cervix. N Engl J Med. 1996;334(16):1030-8

Caputi M, Groeger AM, Esposito V, Dean C, De Luca A, Pacilio C, Muller MR, Giordano GG, Baldi F, Wolner E, Giordano. A prognostic role of cyclin D1 in lung cancer. Relationship to proliferating cell nuclear antigen. Am J Respir Cell Mol Biol.1999;20(4):746-750

Caro JJ, Salas M, Ward A, Goss G.Anemia as an independent prognostic factor for survival in patients with cancer: a systemic, quantitative review. Cancer. 2001 Jun 15;91(12):2214-21. Castellsague X, Bosch FX, Munoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. Virus Res. 2002;89(2):191-199.

Cerciello F, Hofstetter B, Fatah SA, Zaghloul M, Odermatt B, Bodis S, Varga Z, Pruschy M, Ciernik IF. G2/M cell cycle checkpoint is functional in cervical cancer patients after initiation of external beam radiotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2005;62(5):1390-1398

Cervical cancer :PDQ :Prevention of cervical cancer. National Cancer Institute. Actualizado 19/6/2003

Cervical cancer: PDQ: Screening. National Cancer Institute. Actualizado 19/6/2003

Cervical cancer: PDQ: Tratamiento. National Cancer Institute. Actualizado 23/10/2003

Cheung TH, Chung TK, Lo KW, Yu MY, Krajewski S, Reed JC, Wong YF\_Apoptosis related proteins in cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the cervix. Gynecol Oncol 2002;86:14-18

Cheung TH, Yu MM, Lo KW, Yim SF, Chung TK, Wong YF. Alteration of cyclin D1 and CDK4 gene in carcinoma of uterine cervix. 2001.166(2):199-206.

Cho NH, Kim YT, Kim JW. Correlation between G1 cyclins and HPV in the uterine cervix. Int J Gynecol Pathol 1997.16(4):339-347

Chung TK, Cheung TH, wong FW, Wong VF. Ki67 and AgNORs staining in squamous cell carcinoma of the cervix: a comparison. Gynecol Obstet Invest 1994; 37 (2): 127-129.

Cole DJ, Brown DC, Crossley E, Alcock CJ, Gatter KC. Carcinoma of the cervix uteri: an assessment of the relationship of tumour proliferation to prognosis. Br J Cancer 1992; 65(5): 783-785.

Cole DJ, Brown DC, Crossley E, Alcock CJ, Gatter KC. Carcinoma of the cervix uteri: an assessment of the relationship of tumour proliferation to prognosis. Br J Cancer 1992; 65(5): 783-785.

Cosaceanu D, Carapancea M, Castro J, Ekedahl J, Kanter L, Lewensohn R, Dricu A. Modulation of response to radiation of human luna cancer cells following insulin-like growth factor 1 receptor inactivation. Cancer Letters 2005. 222:173-181

Coskun U, Gunel N, Sancak B, Gunel U, Onuk E, Bayram O, Yilmaz E, Candan S, Ozkan S. Significance of serum vascular endotelial growth factor, insulin-like growth factor-l levels and nitric oxide activity in breast cancer patients. Breast 2003. 12:104-110

Cox JD, Stetz J, Pajak TF. Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC).

Creasman WT, Kohler MF. Is lymph vascular space involvement an independent prognostic factor in early cervical cancer? Gynecol Oncol. 2004;92(2):525-9

Crissman JD, Budhraja M, Aron BS. Histopathologic prognostic factors in stage II and III squamous cell carcinoma of the uterine cervix. Int J Gynecol Pathol 1987; 6: 97-103

Crompton N., Miralbell R., Rutz H., Ersoy F., Sanal O., Wellmann D., Bieri S., Coucke P., Emery G., Shi Y., Blattmann H., Ozsahin M. Altered apoptotic profiles in irradiated patients with increased toxicity. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys, 1999; 45(3): 707-714.

Crompton N., Shi Y., Emery G., Wisser L., Blattmann H., Maier A., Li L., Schindler D., Ozsahin H., Ozsahin M. Sources of variation in patient response to radiation treatment. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys, 2001; 49(2): 547-554.

Cuddihy AR and Bristol RG: p53 protein family and radiation sensitivity :yes or no?. Cancer

## and Metast Rev. 2004: 23: 237-257.

Davidson B, Goldberg I, Lerner-Geva L, Gotlieb WH, Ben-Baruch G, Novikov I, Kopolovic J. Expression of topisomerase II and ki-67 in cervical carcinoma-clinicopathological study using immunohistochemistry. APMIS 2000;108:209-15.

Davidson SE, Burns MP, Routledge JA, Swindell R. The impact of radiotherapy for carcinoma of the cervix on sexual function assessed using the LENT SOMA scales. Radiotherapy and Oncology 2003; 68(3):241-247.

Davy ML, Dodd TJ, Luke CG, Roder DM.Cervical cancer: effect of glandular cell type on prognosis, treatment, and survival. Obstet Gynecol. 2003;101(1):38-45.

De vita JR, Hellman S, Rosenberg SA. Editorial Médica Panamericana.Cancer: Principios y práctica de oncología 5ª edición. 2000

Delanian S, Martin M, Bravard A, Luccioni C, Lefaix JL. Abnormal phenotype of cultured fibroblasts in human skin with chronic radiotherapy damage. Radiother Oncol. 1998, 47(3):255-61.

Delgado G, Bundy B, Zaino R. Prospective surgical-pathological study of disease-free interval in patients with stage IB squamous cell carcinoma of the cervix: a Gynecologic Oncology Group study. Gynecol Oncol 1990; 38: 352-357.

Delgado G, Bundy BN, Fowler WC. A prospective surgical pathological study of stage I squamous carcinoma of the cervix: a Gynecologic Oncology Group study. Gynecol Oncol 1989; 35: 314-320.

Dorr W, HendryJH. Consequential late effects in normal tissues. Radiother Oncol. 2001;61(3):223-31

Dubben HH, Thames HD, Beck-Bornholdt HP. Tumor volume: a basic and specific response predictor in radiotherapy. Radiother Oncol 1998; 47(2): 167-174.

Durand RE. Tumor repopulation during radiotherapy: Quantitation in two xenografted human tumors. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1997; 32(5): 803-808.

Falck J et al: The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoints pathway guards against radiorresistant DNA synthesis. Nature 410:842-847, (2001).

Ferenczy A, Franco E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. Lancet Oncol. 2002;3(1):11-6.

Ferrigno R, Campos de Oliveira Faria SL, Weltman E, Salvajoli JV, Segreto RA, Pastore A, Nadalin W. Radiotherapy alone in the treatment of uterine cervix cancer with telecobalt and low-dose-rate brachytherapy :retrospective analysis of results and variables. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2003;55(3):695-706.

Fink SL and Cookson BT. Apoptosis, Pyroptosis, and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. Infection and immunity 2005;1907-1916

Fowler JF, Lindstrom MJ. Loss of local control with prolongation in radiotherapy. Int J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 23: 457-462,1992.

Fyles A, Keane TJ, Barton M, Simm J. The effect of treatment duration in the local control of cervix cancer. Radiother. Oncol., 25:273-279,1992.

Fyles AW, Milosevic M, Pintilie M, Syed A, Hill RP. Anemia, hypoxia and transfusion in patients with cervix cancer: a review. Radiother Oncol. 2000 Oct;57(1):13-9.

Garzetti G, Ciavattini A, Lucarini G. MIB-1 immunostaining in stage I squamous cervical carcinoma: relationship with natural killer activity. Gynecol Oncol 1995; 58 (1): 28-33.

Geara FB, Peters LJ, Ang KK, Wike JL, Brock WA. Prospective comparison between in vitro normal cell radiosensitivity and normal tissue reactions in radiotherapy patients. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys 1993;27:1173-1179.

Giarnieri E, Mancini G, Pisani T, Alderisio M, Vecchione A. Msh2, Mlh1, Fhit, p53,Bcl-2, and Bax expresión in invasive and in situ squamous cell carcinoma of the uterine cervix. Clinical Cancer Research 2000;6:3600-3606.

Girnita L, Girnita A, Larsson O. Mdm2-dependent ubiquitination and degradation of the insulin-like growth factor 1 receptor. Proc Natl Acad Sci USA 2003.100: 8247-8252

Goellner JR. Carcinoma of the cervix: clinicopathologic correlation of 196 cases. Am J Clin Pathol 1976; 66: 775-785.

Goodman A, Wilbur DC. Case records of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Case 32-2003. A 37-year-old woman with atypical squamous cells on a Papanicolaou smear. *N Engl J Med* 2003;349:1555–64.

Grace VM, Shalini JV, Lekha TT, Devaraj SN, Devaraj H. Co-overexpression of p53 and bcl-2 proteins in HPV-induced squamous cell carcinoma of the uterine cervix. Gynecol Oncol

2003: 91(1):51-8.

Graflund M, Sorbe B, Bryne M, Karlsson M. The prognostic value of a histologic grading system, DNA profile, and MIB-1 expression in early stages of cervical squamous cell carcinomas. Int J Gynecol Cancer 2002;12:149-157.

Gray SG, Stenfeldt Mathiasen I, de Meyts P.The insulin-like growth factors and insulin-signalling systems: an appealing target for breast cancer therapy? Horm Metab Res 2003. 35:857-871

Grogan M, Thomas GM, Melamed I, Wong FL, Pearcey RG, Joseph PK, Portelance L, Crook J, Jones KD. The importance of hemoglobin levels during radiotherapy for carcinoma of the cervix

Haimovitz-Friedman A, Kan CC, Ehleiter D, Persaud RS, McLoughlin M, Fuks Z, Kolesnick RN. Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. J Exp Med. 1994;180(2):525-35.

Harima Y, Nagata K, Harima K, Oka A, Ostapenko VV, Shikata N, Ohnishi T, Tanaka Y.Bax and Bcl-2 protein expression following radiation therapy versus radiation plus thermoradiotherapy in stage IIIB cervical carcinoma. Cancer. 2000 Jan 1;88(1):132-8.

Hellman S. Principles of radiation therapy. In: V. T. De Vita, Jr, S. Helman and S. A. Rosenberg (eds). Cancer principles and practice of oncology, pp 227-255, JB Lippincot, Philadelphia (1985).

Herskind C., Bentzen SM., Overgaard J., Overgaard M., Bamberg M., Rodemann HP. Differentiation state of skin fibroblasts cultures versus risk of subcutaneous fibrosis after radiotherapy. Radiother Oncol, 1998, 47 (3): 263-269

Hirano S, Ito N, Takahashi S, Tamaya T. Clinical implications of insulin-like growth factors through the presence of their binding proteins and receptors expressed in gynaecological cancers. Eur J Gynaecol Oncol 2004. 25(2):187-91.

Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer S. Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 6961-6965.

HoDM, Hsu CY, Chiang H. MIB-1 labeling index as a prognostic indicator for survival in patients with FIGO Stage IB Squamous cell carcinoma of the cervix. Gynecologic oncology 2000; 76:97-102.

Hopkins MP, Morley GW. A comparison of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix. Obstet Gynecol 1991; 77: 912-917.

Horwich A. The future of radiotherapy. Radiother. Oncol, 19, 353-356; 1990.

Hsu WL, Shueng PW, Jen YM, Wu CJ, Hwang JM, Chang LP, Chen CM, Lin LC, Teh BS. Long-term treatment results of invasive cervical cancer patients undergoing inadvertent hysterectomy followed by salvage radiotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2004; 59(2):521-527

Huang LW, Chou YY, Chao SL, Chen TJ, Lee TT. p53 and p21 expression in precancerous lesions and carcinomas of the uterine cervix: overexpression of p53 predicts poor disease outcome. Gynecol Oncol. 2001 Nov;83(2):348-54.

Hubbard SR, Till JH. Protein tyrosine kinase structure and function. Annu Rev Biochem 2000.69: 373-398

Husebye E, Hauer-Jensen M, Kjorstad K, Skar V. Severe late radiation enteropathy is characterized by impaired motility of proximal small intestine. Dig Dis Sci.1994;39(11):2341-2349.

Int J Radiat Oncol Biol Phys 1995;31:1341-1346.

Ishikawa T, Furihata M, Ohtsuki Y, Murakami H, Inoue A, Ogoshi S. Cyclin: D1 overexpression related to retinoblastoma protein expression as a prognostic marker in human oesophageal squamous cell carcinoma. Br J Cancer 1998; 77(1):92-7

Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. Cell 1997;88:347-54

Johansen J., Bentzen SM., Overgaard J., Overgaard M. Relationship between the in vitro radiosensitivity of skin fibroblasts and the expression of subcutaneous fibrosis, telangiectadia and skin erythema after radiotherapy. Radiother Oncol, 1996; 40: 101-109;

Kamer SA, Yalman D, Öxer E, Sayhan S, Hanhan M, Özsaran A, Haydaroglu A. Changes of ki-67 index in squamous cell carcinoma of the cerviz during the early course of radiotherapy and prediction of prognosis. Eur J Gynaecol Oncol. 2003;24(3-4):287-9

Kearsley JH, Fang ZM, Clarke RA. Clinical radiohypersensitivity screening using radiation-

induced chromosomal aberrations. Australas Radiol. 1998; 42(3):219-21.

Kerr JFR, Searle J. A suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basalcell carcinomas that contain numerous mitotic figures. J Pathol 1972; 107: 41-44.

Kiltie AE, Barber JB, Swindell R, Ryan AJ, West CM, Hendry JH, Magee B. Lack of correlation between residual radiation-induced DNA damage, in keratinocytes assayed directly from skin, and late radiotherapy reactions in breast cancer patients. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1999, 1;43(3):481-7.

Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, Merry DE, Oltvai ZN. Bcl-2/bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. Sem Canc Biol 1993; 4: 327-332.

Kulik G, Klippel A, Weber MJ. Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor i receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. Mol Cell Biol 1997.17(3): 1595-1606

Kyriakos M, Kempson RL, Pérez CA. Carcinoma of the cervix in young women. Obstet Gynecol 1971; 38: 930-944.

Lanciano RM, Pajak TF, Martz K, Hanks GE. The influence of treatment time on outcome for squamous cell cancer of the uterine cervix treated with radiation: a patterns-of-care study. Int J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 25:391-397,1993.

Landoni F, Bocciolone L, Perego P. Cancer of the cervix, FIGO stages IB and IIA: patterns of local growth and paracervical extension. Int J Gynecol Cancer 1995; 5: 329-334

Lara PC, Rey A, Santana C et al. The role of Ki-67 proliferation assessment in predicting local control in bladder cancer patients treated by radical radiation therapy. Radiother Oncol, 1998; 49(2): 163-7.

Lara PC., Russell NS., Smolders IJH., Bartelink H., Begg AC., Coco-Martin JM. Radiation-induced differentiation of human skin fibroblasts: relationship with cell survival and collagen production. Int J Radiat Biol. 70 (6): 683-692; 1996.

Lazo PA. The molecular genetics of cervical carcinoma. Br J Cancer 1999; 80 (12): 2008-2018.

Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumor suppresor gene. Nature 1991; 351: 453-456.

Levine EL, Renehan A, Gossiel R, Davidson SE, Roberts SA, Chadwick C, et al. Apoptosis, intrinsic radiosensitivity and prediction of radiotherapy response in cervical carcinoma. Radiother Oncol 1995; 37: 1-9.

Lin J, Adam RM, Santiestevan E, Freeman MR, The phosphatidylinositol 3'-kinase pathway is a dominant growth factor-activated cell survival pathway in LNCap human prostate carcinoma cells. Cancer Res 1999.59:2891-2897

Liu SS, Tsang BK, Cheung ANY, Xue WC, Cheng DKL, Ng TY, Wong LC, Ngan HYS. Anti apoptotic proteins, apoptotic and proliferative parameters and their prognostic significance in cervical carcinoma. Eur J cancer 2001; 37(9): 1104-1110

Lloret M. Factores pronósticos en el carcinoma infiltrante de cérvix: Factores clásicos, Marcadores séricos tumorales, Apoptosis, Proliferación, tumoral, (IM,Ki67) y genes reguladores (p53, Bcl-2, Bax). Relación con la angiogenesis (CD-31 y VEGF) y la oxigenación Tumoral. Tesis Doctoral 2000

Lockshin RA, Zakeri Z. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory .Nat Rev Mol Cell Biol. 2001; 2:545-50

Loeffler JS., Harris JR., Dailberg WK., Little TJ. In vitro radiosensitivity of human diploid fibroblasts derived from woman with unusually sensitive clinical responses to definitive radiation therapy for breast cancer. Radiat Res, 1990; 121, 227-231.

Macaulay VM, Salisbury AJ, Bohula EA, Playford MP, Smorodinsky NI, Shiloh Y,. Downregulation of the type 1 insulin-like growth factor receptor in mouse melanoma cells is associated with enhaced radiosensitivity and impaired activation of Atm kinase. Oncogene 2001.20: 4029-4040.

Mackay R. I., Hendry D. H. The modelled benefits of individualizing radiotherapy patients' dose using cellular radiosensitivity assays with inherent variability. Radiother. Oncol, 1999; 50 (1): 67-75.

Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jurgensmeier JM, Susin SA, Vieira HL, Prevost MC, Xie Z, Matsuyama S, Reed JC, Kroemer G. Bax and adenine nucleotide translocator cooperative in the mitochondrial control of apoptosis. Science1998; 281:2027-2031.

May P and May E: Twenty years of p53 research. Structural and functional aspects of the p53 protein. Oncogene 1999;18: 7261-7636.

Michalides RJ, Van veelen NM, Kristel PM, Hart AA, Loftus BM, Hilgers FJ, Balm AJ.

Overexpression of cyclin D1 indicates a poor prognosis in squamous cell carcinoma of the head and neck. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1997; 123(5):497-502.

micronucleus assay for patients with severe acute reaction of normal tissue after radiotherapy. Eur J Cancer. 1998 Feb;34(3):378-83.

Mikulski SM. Pathogenesis of cancer in view of mutually opposing apoptotic and anti-apoptotic growth signals (Review). Int J Oncol 1994; 4: 1257-1263.

Mitani Y, Yukinari S, Jimi S. Carcinomatous infiltration into the uterine body in carcinoma of the uterine cervix. Am J Obstet Gynecol 1964; 89: 984-989.

Mitchell PA, Waggoner S, Rotmensch J, Mundt AJ. Cervical cancer in the elderly treated with radiation therapy. Gynecol Oncol 1998; 71(2):291-298.

Modrak DE, Gold DV, Goldenberg DM. Sphingolipid targets in cancer therapy. Mol Cancer Ther 2006;5(2):200-206

Montero A, Hervás A, Morera R, Sancho S, Córdoba S, Corona JA, Rodríguez I, chajón E, Ramos A. Control se síntomas crónicos. Efectos secundarios del tratamiento con radioterapia y quimioterapia. Oncología,2005;28(3)

Mori. M., Benotmane M.A., Tirone I., Hooghe-Peters E.L., Desaintes C. Transcriptional response to ionizing radiation in lymphocyte subsets.Cell. Mol. Life Sci.62.,2005.,1489-1501 Morris SM: a role for p53 in the frecuency and mechanism of mutations. Mutat Res 2002; 511:45-62.

Muller C., Dusseau C., Calsou P. and Salles B. Human normal peripheral blood B-lymphocytes are deficient in DNA-depent protein kinase activity due to the expression of a variant form of the Ku 86 protein. Oncogene.,1998.,16 (12): 1553-1560

Muller WU, Bauch T, Stuben G, Sack H, Streffer C. Radiation sensitivity of lymphocytes from healthy individuals and cancer patients as measured by the comet assay. Radiat Environ Biophys. 2001;40(1):83-9.

Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med 2003;348:518–27.

Nachtrab U, Oppitz U, Flentje M, Stopper H. Radiation-induced micronucleous formation in human skin fibroblasts of patients showing severe normal tissue damage after radiotherapy. Int J Radiat Biol 1998,73:279-287.

Nakano T, Oka K, Ishikawa A, Morita S. Immunohistochemical prediction of radiation response and local control in radiation therapy for cervical cancer. Cancer Detect Prev 1998; 22(2): 120-128.

Narayan K, Fisher R, Bernshaw D.Significance of tumor volume and corpus uteri invasion in cervical cancer patients treated by radiotherapy. Int J Gynecol Cancer 2006;16(2):623-30.

Narita M, Shimizu S, Ito T, Chittenden T, Lutz RJ, Matsuda H, Tsujimoto Y.Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.1998;95:14681-14686.

Navarro and Baserga. Limited redundancy of survival signals from the type 1 insulin-like growth factor receptor. Endocrinology. 2001.142:1073-1081

Neubauer S, Dunst J, Gebhart E. The impact of complex chromosomal rearrangements on the detection of radiosensitivity in cancer patients. Radiother Oncol. 1997; 43(2):189-95.

Núñez M. I., Guerrero R., López E., Del Moral M., Valenzuela T., Siles E., Villalobos M., Pedraza V., Peacock J., Ruiz de Almodóvar M. DNA damage and prediction of radiation response in lymphocytes and epidermal skin human cells. Int. J. Cancer, 1998; 4; 76(3):354-61.

Nuñez MI, McMillan TJ, Valenzuela MT, Ruiz de Almodovar JM, Pedraza V. Relationship between DNA damage, rejoining and cell killing by radiation in mammalian cells. Radiother Oncol. 1996; 39(2):155-65.

O'Driscoll MC, Scott D, Orton CJ, Kiltie AE, Davidson SE, Hunter RD, West CM. Radiation-induced micronuclei in human fibroblasts in relation to clonogenic radiosensitivity. Br J Cancer. 1998, 78(12):1559-63.

Ogino I, Okamoto N, Andoh K, Kitamura T, Okajima H, Matsubara S. Analysis of prognostic factors in stage IIB. IVA cervical carcinoma treated with radiation therapy: value of computed tomography. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1997; 37 (5): 1071-1077.

Oka K, Nakano T, Hoshi T. Analysis of response to radiation therapy of patients with cervical adenocarcinoma compared with squamous cell carcinoma. MIB-1 and PC10 labeling indices. Cancer 1996; 77(11): 2280-2285.

Oka K, Suzuki Y, Nakano T. High growth fraction at 9 grays of radiotherapy is associated with a good prognosis for patients with cervical squamous cell carcinoma. Cancer (Phila.) 2000, 89:1526-153.

Oppitz U, Baier K, Wuf J, Schakowski R, Flentje M. The in vito colony assay: A predictor of clinical outcome. Int J Radiat Biol 2001,77:105-110.

Oppitz U, Denzinger S, Nachtrab U, Flentje M, Stopper H. Radiation-induced cometformation in human skin fibroblasts from radiotherapy patients with different normal tissue reactions. Strahlenther Onkol. 1999, 175(7):341-6.

Ozhasin M, Crompton N, Gourgou S, Kramar A, Li L, Shi Y, Sozzi WJ, Zouhair A, Mirimanoff RO, Azria D.CD4 and CD8 T-Lymphocyte apoptosis can predict radiation-induced late toxicity: A prospective study in 399 patients. Clin Cancer Res 2005;11(20):7426-7433.

Ozsahin M., Ozsahin H., Shi Y., Larsson B., Würgler F., Crompton N. Rapid assay of intrinsic radiosensitivity based on apoptosis in human CD4 and CD8 lymphocytes. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys, 38(2): 429-440;1997.

Padovan P, Salmaso R, Marchetti M, Padovan R. Prognostic value of bcl-2, p53 and ki-67 in invasive squamous carcinoma of the uterine cervix. Eur J Gynaecol Oncol. 2000;21(3):267-72.

Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. Eur J Cancer 2001;37:S4-S66

Peacock J, Ashton A, Bliss J, Bush C, Eady J, Jackson C, Owen R, Regan J, Yarnold J. Cellular radiosensitivity and complication risk after curative radiotherapy.Radiother Oncol. 2000, 55(2):173-8.

Pearse HD. The urinary bladder . Moss'Radiation Oncology 7th edition.JD Cox,editor, et al 1994

Pedersen D, Sogaard H, Overgaard J, Bentzen SM. Prognostic value of pretreatment factors in patients with locally advanced carcinoma of the uterine cervix treated by radiotherapy alone.

Acta Oncol. 1995;34(6):787-95.

Peretz S, Jensen R, Baserga R, Glazer PM. ATM-dependent expression of the insulin-like growth factor-I receptor in a pathway regulating radiation response. Proc Natl Acad.Sci USA 98.2001:1676-1681.

Pérez CA, Camel HM, Askin F. Endometrial extension of carcinoma of the cervix: a prognostic factor that may modify staging. Cancer 1981; 48: 170-180.

Perez CA, Grigsby PW, Chao KS, Mutch DG, Lockett MA. Tumor size, irradiation dose, and long-term outcome of carcinoma of uterine cervix.Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1998 May 1;41(2):307-17. Erratum in: Int J Radiat Oncol Biol Phys 1999 Nov 1;45(4):1093.

Pezzella F, Gatter K. What is the value of bcl-2 protein detection for histopathologist? Histopathology 1995; 26: 89-93.

Philippe J., Louagie H., Thierens H., Vral A., Cornelissen M., De Ridder L. Quantification of apoptosis in lymphocyte subsets and effect of apoptosis on apparent expression of membrane antigens. Cytometry, 29:242-249.1997

Pillai MR, Jayaprakash PG. Tumour-proliferative fraction and growth factor expression as markers of tumour response to radiotherapy in cancer of the uterine cervix. J Cancer Res Clin Oncol 1998; 124(8):456-461.

PinarB. Tesis Doctoral: Radioterapia radical hiperfaccionada en cáncer de mama localmente avanzado. Predicción de la respuesta tumoral (Ki-67) y de la toxicidad radioinducida mediante estudios de liinfocitos in vitro (PGFE, Apoptosis) 2002. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Facultad de Ciencias médicas y de la salud.

Powell SN, Mills J, McMillan TJ. Radiosensitive human tumour cell lines show misrepair of DNA termini. Br J Radiol. 1998 Nov;71(851):1178-84

Prempree T, Patanaphan V, Sewchand W. The influence of patients age and tumor grade on the prognosis of carcinoma of the cervix. Cancer 1983; 51: 1764-1771.

Rached E, Schindler R, Beer KT, Vetterli D, Greiner RH. No predictive value of the micronucleous assat for patients with severe acute reaction of normal tissue after radiotherapy. Eur J Cancer.1998;34(3):378-383

Raff MC. Social control on cell survival and cell death. Nature 1992; 356:397-399.

Ramsay J., Birrel G. Normal tissue radiosensitivity in breast cancer patients. Int J Radiol, 31:339-344; 1995.

Rana R, Vitale M, Mazzotti G, Manzoli L, Papa S. Radiosensitivity of human natural killer

cells: binding and cytotoxic activities of natural killer cell subsets. Radiat Res 1990;124(1):96-102.

Reagan JW, Fu YS. Histologic types and prognosis of cancers of the uterine cervix. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1979; 5: 1015-1020.

Reinmuth N, Fan F, Liu W, Parikh AA, Stoeltzing O, Jung YD, Bucana CD, Radinsky R, Gallick GE, Ellis LM. Impact of insulin-like growth factor receptor-l function on angiogenesis, growth, and metastasis of colon cancer. Lab Investig 2002.82:1377-1389

Reinmuth N, Liu W, Fan F, Jung YD, Ahmad SA, Stoeltzing O, Bucana CD, Radinsky R, Ellis LM. Blockade of insulin-like growth factor I receptor function inhibits growth and angiogenesis of colon cancer. Clin Cancer Res.2002.8:3259-3269

repopulation during radiotherapy. Acta Oncologica, 27:131-146, 1988.

Rodemann HP., Peterson HP., Schwenke K., Von Wangenheim KH. Terminal differentiation of human fibroblasts is induced by radiation. Scanning Microscopy, 1991; 5: 1135-1142.

Rotman M, John M, Boyce J. Prognostic factors in cervical carcinoma: implications in staging and management. Cancer 1981; 48: 560-567.

Ruiz de Almodovar JM, Nuñez MI, McMillan TJ, Olea N, Mort C, Villalobos M, Pedraza V, Steel GG.Initial radiation-induced DNA damage in human tumour cell lines: a correlation with intrinsic cellular radiosensitivity. Br J Cancer. 1994;69(3):457-62.

Russell NS., Lara PC., Grunmels A., Hart AM., Coco-Martin JM., Bartelink H., Begg AC. In vitro differentiation characteristics of human skin fibroblasts: correlation with radiotherapy induced breast fibrosis in patients. In J Radiat Biol, 1998; 73 (6): 661-670.

Rutledge FN, Mitchell MF, Nunsell S. Youth as a prognostic factor in carcinoma of the cervix: a matched analysis. Gynecol Oncol 1992; 44: 123-130.

Ryan KM et al: regulation and function of the p53 tumor supresor protein. Curr Opin Cell Biol 13:332-337, (2001).

Saegusa M, Takano Y, Hashimura M, Shoji Y, Okayasu I. The possible role of bcl-2 expression in the progression of tumors of the uterine cervix. Cancer 1995; 76(11): 2297-2303.

Safwat A, Bentzen SM, Turesson I, Hendry JH. Deterministic rather than stochastic factors explain most of the variation in the expression of skin telangiectasia after radiotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2002;52(1):198-204.

Saibishkumar EP, Patel FD, Ghoshal S, Kumar V, Karunanidhi G, Sharma S. Results of salvage radiotherapy after inadequate surgery in invasive cervical carcinoma patients: A retrospective analysis. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2005;63(3):828-833

Santopietro R, Shabalova I, Petrovichev N, Kozachenko V, Zakharova T, Pajanidi J, Podistov J, Chemeris G, Sozaeva L, Lipova E, Tsidaeva I, Ivanchenko O, Pshepurko A, Zakharenko S, Nerovjna R, Kljukina L, Erokhina O, Branovskaja M, Nikitina M, Grunberga V, Grunberg A, Juschenko A, Cintorino M, Tosi P, Syrjanen K, Syrjanen S. Cell cycle regulators p105, p107, Rb2/p130, E2F4,p21CIP1/WAF1, Cyclin A in predicting cervical intraepithelial neoplasia, high-risk human papillomavirus infections and their outcome in women screened in three new independent states of the former Soviet Union.Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2006;15(7):1250-1256.

Schiffman M, Castle PE. Human papillomavirus: epidemiology and public health. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127:930–4.

Schmitz A, Bayer J, Déchamps N, Thomas G. Intrinsic susceptibility to radiation-induced apoptosis of human lymphocyte subpopulations. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2003;57(3):769-778

Seki H, Iwai K, Kanegane H, Konno A, Ohta K, Ohta K, Yachie A, Taniguchi N, Miyawaki T. Differential protective action of cytokines on radiation-induced apoptosis of peripheral lymphocyte subpopulations. Cell Immunol. 1995 Jun;163(1):30-6.

Seki H., Kanegane H., Iwai K., Konno A., Ohta K., Yachie A., Taniguchi N., Miyawaki T. Ionizing radiation induces apoptotic cell death in human TcR-γ/δ<sup>+</sup> T and natural killer cells without detectable p53 protein.Eur.J.Immunol.1994,24:2914-2917.

Sheng-Tanner X, Bump EA, Hedley DW. An oxidative stress-mediated death pathway in irradiated human leukemia cells mapped using multilaser flow cytometry. Radiat Res. 1998;150(6):636-647

Shingleton HM, Orr JW. Cancer of the cervix: other treatments. Philadelphia, PA, Lippincot 1995; pp 201-223.

Shiohara S, Shiozawa T, Miyamoto T, Feng YZ, Kashima H, Kurai M, Suzuki A, Konishi I.

Expression of cyclins, p53, and ki-67 in cervical squamous cell carcinomas: overexpression of cyclin A is a poor prognostic factor in stage lb and II disease. Virchows Arch. 2005;446(6):626-633.

Sigal A, Rotter V: Oncogenic mutations of the p53 tumor supresor : the demons of the guardian of the genome. Cancer Res 2000; 60:6788-6793.

Skomedal H, Forus A, Holm R. Deregulation of D-type cyclins in uterine cancers. Cyclin D1/D3 is differentially expressed in cervical cancer. Anticancer Res 2003.23: 3929-3936

Skomedal H, Kristensen GB, Lie AK, Holm R. Aberrant Expresión of the cell cycle associated proteins TP53, MDM2, p21, p27, cdk4, cyclin D1, Rb, and EGFR in cervical carcinomas. Gynecol Oncol. 1999 .73(2):223-228

Slonina D, Klimek M, Szpytma T, Gasinska A. Comparison of the radiosensitivity of normal-tissue cells with normal-tissue reactions after radiotherapy. Int J Radiat Biol. 2000;76(9):1255-1264.

Southern SA, Herrington CS. Differential cell cycle regulation by low-and high-risk human papillomaviruses in low-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. Cancer Res 1998. 58: 2941-2945

Steller MA, Delgado CH, Bartels CJ, Woodworth CD, Zou Z. Overexpression of the insulin-like growth factor-1 receptor and autocrine stimulation in Human cervical cancer cells. Cancer Res 1996.56(8):1761-1765.

Stewart CC, Stevenson AP, Habbersett RC.The effect of low-dose irradiation on unstimulated and PHA-stimulated human lymphocyte subsets Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.

Stoeltzing O, Liu W, Reinmuth N, Fan F, Parikh AA, Bucana CD, Evans DB, Semenza GL, Ellis LM. Regulation of hypoxia inducible factor-1 alpha, vascular endothelial growth factor, and angiogenesis by an insulin-like growth factor-I receptor autocrine loop in human pancreatic cancer. Am.J Pathol 2003. 163: 1001-1011

Storey A, Pim D, Murray A, Osborn K, Banks L, Crawford L. Comparison of the in-vitro transforming activities of human virus types. EMBO J 1988; 7: 1815-1820.

Storey A, Thomas M, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, Breuer J, et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. Nature 1998;393 (6682): 229-234.

Stull MA, Richert MM, Loladze AV, Wood TL. Requirement for IGF-I in epidermal growth factor-mediated cell cycle progression of mammary epithelial cells. Endocrinology 2002.143:1872-1879

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N,, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Constantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular Characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. Nature 1999;397:441-446.

Suzuki Y, Nakano T, Kato S, Ohno T, Tsujii H, Oka K. Immunohistochemical study of cell cycle-associated proteins in adenocarcinoma of the uterine cervix treated with radiotherapy alone: P53 status has a strong impact on prognosis\_Int J Radiat Oncol Biol Phys.2004;60(1):231-236.

Suzuki M, Tsukagoshi S, Saga Y, Ohwada M, Sato I. Assessment of proliferation index with MIB-1 as a prognostic factor in radiation therapy for cervical cancer. Gynecologic oncology 2000;79:300-304.

Suzuki Y, Nakano T, Kato S, Ohno T, Tsujii H, Oka K. Immunohistochemical study of cell cycle-associated proteins in adenocarcinoma of the uterine cervix treated with radiotherapy alone: P53 status has a strong impact on prognosis. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2004; 60(1):231-236

Swan DS, Roddick JW. A clinical-pathological correlation of cell type classification for cervical cancer. Am J Obstet Gynecol 1973; 116: 666-670.

Tepper AD, de Vries E, van Blitterswijk WJ, Borst J. Ordering of ceramide formation, caspase activation, and mitochondrial changes during CD95- and DNA damage-induced apoptosis.

Tinga DJ, Timmer PR, Bouma J. Prognostic significance of single versus multiple lymph node metastases in cervical carcinoma stage IB. Gynecol Oncol 1990; 39: 175-180.

Tjalma WA, Arbyn M, Paavonen J, van Waes TR, Bogers JJ. Prophylactic human papillomavirus vaccines: the beginning of the end of cervical cancer.Int J Gynecol Cancer. 2004;14(5):751-61.

Trotti A, Byhardt R, Stetz R, Gwede C, Corn B, Fu K, Gunderson L, Mc Cormick B, Morris M, Rich T, Shipley W, Curran W. Common toxicity criteria: versión 2.0 an improved referente for grading the acute effects of cancer treament: impact on radiotherapy Int J Radiat Oncol Biol Phys 2000;47(1):13-47

Trotti A, Colevas AD, Setser A, Rusch V, Jaques D, Budach V, Budach V, Langer C, Murphy B, Cumberlin R, Coleman CN, Rubin P. CTCAE v3.0: development of a comprehensive grading system for the adverse effects of cancer treatment. Semin Radiat Oncol 2003;13(3):176-181.

Tsang RW, Fyles AW, Kirkbride P, Levin W, Manchul LA, Rawlings GA., Banerjee, D., Pintilie, M., Wilson, G.D. Proliferation measurements with flow cytometry Tpot in cencer of the uterine cervix: preliminary results. Int J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 32:1319-1329, 1995.

Tsang RW, Juvet S, Pintilie A, Hill RP, Wong CS, Milosevic M, Chapman W, Fyles AW.Pretreatment proliferation parameters do not add predictive power to clinical factors in cervical cancer treated with definitive radiation therapy. Clin Cancer Res 2003; 9:4387-4395.

Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? Genes Cells. 1998;3(11):697-707

Tucker S. L., Geara F. B., Peters L. J. and Brock W. A. How much could the radiotherapy dose be altered for individual patients, based on a predictive assay of normal-tissue radiosensitivity? Radiother. Oncol, 1996; 38: 103-113.

Tucker S. L., Turesson I. and Thames H. D. Evidence for individual differences in the radiosensitivity of human skin. Europ. J. Cancer, 1992; 28 A: 1783-1791.

Tucker SL, Chan KS. The selection of patients for accelerated radiotherapy on the basis of tumor growth kinetics and radiosensitivity. Radiother. Oncol., 18:197-211,1990.

Turesson I, Nyman J, Holmberg E, Oden A. Prognostic factors for acute and late skin reactions in radiotherapy patients.Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1996;36(5):1065-75.

Turesson I. Individual variation and dose dependency in the progression rate of skin telangiectasia.Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1990 Dec;19(6):1569-74.

Turesson I. The progresión rate of late radiation effects in normal tissue and its impact on dose-response relationships. Radiother. Oncol, 1989; 15: 217-226.

Uriel T et al: Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. Embo J 22:5612-5621, (2003).

Van de putte G, Kristensen GB, Lie AK, Baekelandt M, Holm R. Cyclins and proliferation markers in early squamous cervical carcinoma. Gynecol Oncol.2004;92(1):40-6

Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoitic cell survival and cooperates with c-myc to inmortalize pre-B cells. Nature 1988; 335: 440-442.

Verheij M, Bose R, Lin XH, Yao B, Jarvis WD, Grant S, Birrer MJ, Szabo E, Zon Ll, Kyriakis JM, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Kolesnick RN. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. Nature. 1996;380(6569):75-9

Voudsen KH and Lu X: Live or let die: The cell's response to p53. Nat Rev Cancer 2002;2:594-604

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N.Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol. 1999 Sep;189(1):12-9.

Walker JR, Corpina RA, Goldberg J.Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair.Nature. 2001 Aug 9;412(6847):607-14.

Wen B, Deutsch E, Marangoni E, Frascona V, Maggiorella L, Abdulkarim. Tyrphostin AG 1024 modulates radiosensitivity in human breast cancer cells. Br J cancer 2001.85: 2017-2021

Werner H, Shalita-Chesner M, Abramovitch S, Idelman G, Shaharabanigargir L, Glaser T. Regulation of the insulin-like growth factor-I receptor gene by oncogenes and antioncogenes: implications in human cancer. Mol Genet Metab 2000.71: 315-320

West C., Davidson S., Elyan S., Swindel R., Roberts S., Orton C., Coyle C., Valentine H., Wilks D., Hunter R., Hendry J. The intrinsic radiosensitivity of normal and tumor cells. Int. J. Radiat. Biol, 1998; 73(4): 409-13.

West CM, Davidson SE, Elyan SA et al. Lymphocyte radiosensitivity is a significant prognostic factor for morbidity in carcinoma of the cervix. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2001; 51(1):10-5.

Westwick JK, Bielawska AE, Dbaibo G, Hannun YA, Brenner DA.Ceramide activates the stress-activated protein kinases. J Biol Chem. 1995;270(39):22689-92

Widel M, Jedrus S, Lukaszczyk B, Raczek-Zwierzycka K, Swierniak A. Radiation-induced micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes is correlated with normal tissue damage in patients with Cervical Carcinoma undergoing radiotherapy. Radiation Research 2003;159:713-721.

Wilson GD, Dische S, Saunders MI. Studies with bromodeoxyuridine in head and neck cancer and accelerated radiotherapy. Radiother. Oncol., 36:189-197,1995.

Withers H. R. Biologic basis of radiation therapy. In: C. A. Pérez and L. W. Brady (eds). Principles and practice of radiation therapy (2<sup>nd</sup> ed), pp 64-98, JB Lippincot, Philadelphia (1992).

Withers HR, TaylorJMG, Maciejewski, B. The hazard of accelerated tumour clonogen Wong WS, McGuire LJ. Tumor growth fraction in cervical carcinoma. Gynecol Oncol 1991; 40 (1): 48-54.

Wong WS, McGuire LJ. Tumor growth fraction in cervical carcinoma. Gynecol Oncol 1991; 40 (1): 48-54.

Xu et al: Two molecularly distinct G82)/M checkpoints are induced by ionizing irradiation. Moll Cell Biol 22:1049-1059, (2002).

Yamada S, Durante M, Ando K, Furusawa Y, Kawata T, Majima H, Tsujii H. Complex-type chromosomal exchanges in blood lymphocytes during radiation therapy correlate with acute toxicity Cancer Lett. 2000 Mar 31;150(2):215-21

Yamasaki L. Role of the RB tumor suppressor in cancer. Cancer treat Res.2003;115:209-39

Yazdi PT, Wang Y, Zhao S, Patel N, Lee EY, Qin J.I: SMC-1 is a downstream effector in the ATM/NBS1 branch of the human S-phase Checkpoint. Genes Dev 16:571-582. (2002)

Yeoh E, Horowitz M, Russo A, Muecke T, Ahmad A, Robb T, Chatterton B. A retrospective study of the effects of pelvic irradiation for carcinoma of the cervix on gastrointestinal function. Int J Radiat Oncol Biol Phys.1993; 26(2):229-237.

Zhao H, Dupont J, Yakar S, Karas M, LeRoith D.PTEN inhibits cell proliferation and induces apoptosis by downregulating cell surface IGF-IR expression in prostate cancer cells.Oncogene. 2004 Jan 22;23(3):786-94.