

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLÍNICAS



TESIS DOCTORAL

**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
ANGIOGÉNESIS (CD-31 Y VEGF) Y LA OXIGENACIÓN TUMORAL**

MARTA LLORET SÁEZ - BRAVO

Las Palmas de Gran Canaria, Marzo del 2000

36/1999-00

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
UNIDAD DE TERCER CICLO Y POSTGRADO

Reunido el día de la fecha, el Tribunal nombrado por el Excmo. Sr. Rector Magfco. de esta Universidad, el/a aspirante expuso esta TESIS DOCTORAL.

Terminada la lectura y contestadas por el/a Doctorando/a las objeciones formuladas por los señores miembros del Tribunal, éste calificó dicho trabajo con la nota de Sobresaliente con laurea por unanimidad
Las Palmas de Gran Canaria, a 24 de marzo de 2000.

El/a Presidente/a: Dr.D. Luis Serra Majem,

El/a Secretario/a: Dra.Dña. Amina Lubrano Rosales,

El/a Vocal: Dr.D. Ferran Guedea Edo,

El/a Vocal: Dr.D. Alvaro Ruibal Morell,

El/a Vocal: Dra.Dña. Martina Gunderoth,

La Doctoranda: D^a. Marta Lloret Saez-Bravo,



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS Y DE LA SALUD

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 angiogénesis (CD-31 y VEGF) y la oxigenación tumoral.

Tesis

que, para optar al Grado de Doctor, presenta la Licenciada en Medicina y Cirugía D^a Marta Lloret Sáez-Bravo.

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 **D^a Marta Lloret Sáez-Bravo**, Licenciada en Medicina y Cirugía, ha realizado el trabajo de investigación correspondiente a la Tesis Doctoral ***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 angiogénesis (CD-31 y VEGF) y la oxigenación tumoral***, 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

Fdo: Prof. D. Pedro C. Lara Jiménez

Director de la tesis

D. Orlando Falcón Vizcaíno , Profesor Asociado de Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Ciencias Médicas y de la Salud de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria,

CERTIFICA:

Que **D^a Marta Lloret Sáez-Bravo**, Licenciada en Medicina y Cirugía, ha realizado el trabajo de investigación correspondiente a la Tesis Doctoral ***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 angiogénesis (CD-31 y VEGF) y la oxigenación tumoral***, 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

Fdo: Dr. Orlando Falcón Vizcaíno
Codirector de la tesis

AGRADECIMIENTOS:

Al Prof. Pedro C. Lara, por su amplia visión en el campo de la investigación y de la oncología clínica, siendo imprescindible su consejo en la realización de esta tesis. Por todo el tiempo dedicado, y por su confianza.

Al Dr. Orlando Falcón, cuya extensa y bien recogida experiencia en este tipo de pacientes, han sido primordiales durante todo el proceso de realización de este trabajo.

A los Servicios de Anatomía Patológica del Hospital Dr. Negrín y Hospital Materno-Infantil, especialmente al Dr. Carlos Santana, Dr. José de Lera y Dr. Agustín Rey, por su colaboración y tutela en los procedimientos histológicos utilizados, así como a Estibaliz Valdés, por su paciencia y dedicación en la enseñanza de las técnicas de laboratorio.

A la Dra. Rosa Apolinario y Dra. Sofía Pérez, predecesoras ambas de las líneas de investigación desarrolladas en esta tesis, por su colaboración en el estudio de la angiogénesis y la apoptosis, y por su apoyo a este proyecto.

Al Dr. Bernardino Clavo, por su colaboración, fundamental en el estudio de la oxigenación intratumoral.

A la Dra. Dolores Fiuza, por sus consejos en el análisis estadístico.

Al Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Materno-Infantil, en especial a la Dra. Amina Lubrano, Dr. Agustín Bonilla y Dr. Vicente Guillén.

Al Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Materno-Infantil.

A la Unidad de Investigación, Servicio de Física Médica y Servicio de Oncología Radioterápica del H. Dr. Negrín, por haber apoyado desde el principio este proyecto.

A todos los que han compartido conmigo este tiempo, que no nombro por ser demasiados y por no olvidar a ninguno, ya que sin su comprensión no habría sido posible la realización de esta tesis.

A mi familia
A mis amigos

INDICE	Páginas
CAPITULO I	
Introducción	1-80
CAPITULO II	
Objetivos Generales	81-82
CAPITULO III	
Carcinoma epidermoide localizado de cérvix tratado con radioterapia radical: factores clásicos de pronóstico y resultados terapéuticos	83-95
CAPITULO IV	
Determinación de SCC-Ag, Ca 125, CEA, β -HCG, Ca 15.3 y Ca 19.9 en el carcinoma epidermoide de cérvix tratado con radioterapia radical. Relación con factores clásicos de pronóstico, control local y supervivencia.	96-107
CAPITULO V	
Proliferación (IM, Ki67), apoptosis (IA) y genes reguladores (p53, bax y bcl-2) en carcinoma de cérvix: relación con factores pronósticos clásicos, control local y supervivencia.	108-121
CAPITULO VI	
Progresión tumoral en cáncer de cérvix. Angiogénesis y regulación génica. Hipoxia tumoral: relación con la proliferación y apoptosis.	122-138
CAPITULO VII	
Resumen y discusión general.	139-142
CONCLUSIONES	143-144
BIBLIOGRAFIA	145-160

Capítulo I

Introducción

1. EPIDEMIOLOGIA

El carcinoma de cérvix es la quinta neoplasia más frecuente en la población general. En la mayoría de países subdesarrollados es la neoplasia con mayor incidencia en mujeres, alcanzando una tasa de 26 casos nuevos/100000 habitantes/año en los países del Centro y Sur de América. En los países desarrollados la tasa de incidencia es menor, estimándose en menos de 15 casos nuevos al año/ 100000 habitantes (*Parkin et al, 1993*). España, junto con Israel, Kuwait e Irlanda, presenta una de las incidencias más bajas (5.7/100000hab/año) (*Whelan et al, 1990*), aunque en la provincia de Las Palmas es mayor (8.07/100000hab/año) (*Lubrano et al, 1999*). Con la introducción de la tinción de Papanicolau, se ha conseguido un aumento del diagnóstico precoz de la enfermedad, observándose en los países que llevan a cabo programas de screening adecuados, una disminución de la incidencia y de la mortalidad (*Wingo et al, 1995*). A pesar de esto, el cáncer de cérvix es la 2ª causa de muerte por cáncer en mujeres en todo el mundo (*Schöell et al, 1999*). La tasa de mortalidad en países subdesarrollados continúa siendo muy elevada (10-24 fallecimientos /100000 habitantes /año), particularmente en Latinoamérica, Africa, India y Este de Europa (*Pisani et al, 1993*). En países desarrollados está alrededor de 4 fallecimientos/100000 habitantes /año.

En contraste con otros tumores ginecológicos, el carcinoma de cérvix tiene una incidencia relativamente alta en mujeres de edad media. La enfermedad es poco frecuente en menores de 25 años, su incidencia va aumentando hasta los 35-39 años estabilizándose a los 65-69 años, y posteriormente disminuye. El pico de incidencia máximo en España está entre los 40-50 años (*Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia, 1997*).

Ackerman y del Regato (1977) han postulado una resistencia genética a los tumores de cérvix en las mujeres de raza judía, debido a la menor incidencia que se ha observado en ellas. Al principio se pensó en la circuncisión del varón judío como un factor de protección (*Terris et al, 1973*), pero no se ha demostrado que las mujeres de otras razas con parejas circuncidadas, presenten con menor frecuencia este tipo de tumores. La diferente incidencia observada en las mujeres en USA según el grupo étnico, es probablemente debida a factores de riesgo, que no están relacionados con la raza (*Schöell et al, 1999*).

La actividad sexual se considera un factor de riesgo, presentando mayor incidencia las mujeres que iniciaron relaciones sexuales a edad temprana, aquellas con historia de promiscuidad o que hubieran tenido un número elevado de gestaciones, así como la promiscuidad sexual del compañero (*Skegg et al, 1982*). En un estudio caso-control realizado en la India (*Agarwal et al, 1993*), 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 ó más mujeres, y cuando tenía historia de enfermedades de transmisión sexual. Se han estudiado otros factores incluido el tabaco, las inmunodeficiencias, los déficits de vitaminas A y C y el uso de anticonceptivos orales, sin llegar a resultados concluyentes (*Meanwell, 1991; Bosch et al, 1992; Agarwal et al, 1993*).

2. ETIOLOGIA

Los agentes causantes del cáncer de cérvix no son totalmente conocidos, a pesar de las numerosas teorías existentes, aunque sí se han demostrado factores predisponentes y asociados.

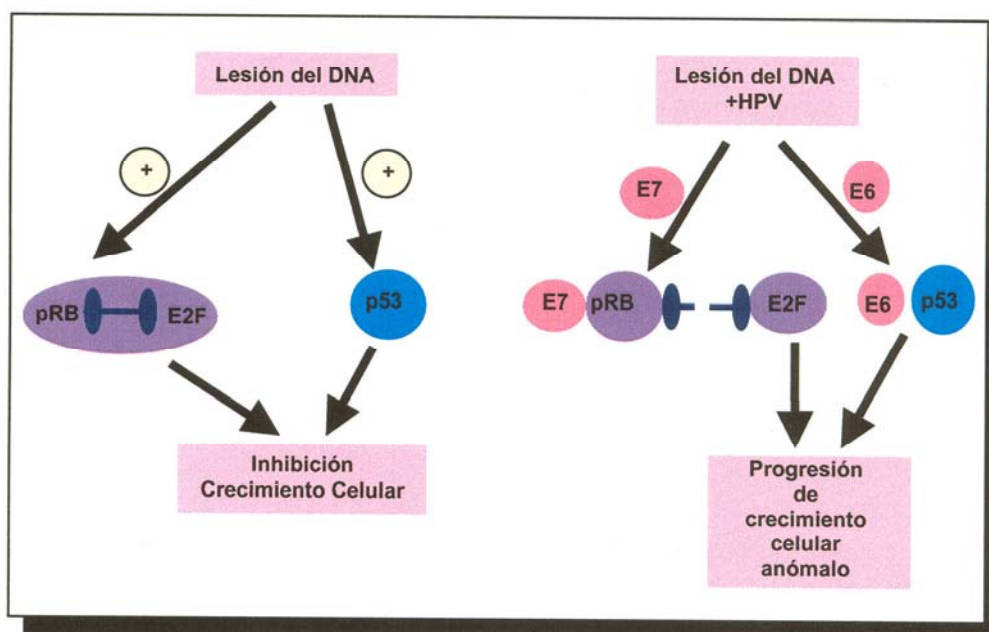
2.1 Virus. Se ha pensado en un agente transmitido por vía sexual como causa del carcinoma de cérvix. Se han identificado virus, como el herpes virus tipo II y el virus de Epstein-Barr, así como títulos elevados de anticuerpos contra los mismos, en un porcentaje mayor en las mujeres con cáncer de cérvix respecto a un grupo control, aunque sin que pueda establecerse un papel etiológico directo (*Kessler, 1990; Meanwell, 1991*).

Durante la última década, han sido numerosos los estudios que apuntan directamente al papilomavirus (HPV) como agente causal del carcinoma de cérvix (*zur Hausen, 1991; Bosch et al, 1995*). La familia papilomavirus está formada por un grupo de virus con más de 70 genotipos diferentes. Más de 35 tipos se relacionan con infecciones del tracto anogenital, y al menos 20 se asocian con cánceres invasivos. Sólo algunos de estos subtipos son frecuentes en el cáncer de cérvix. Se ha demostrado además, que la persistencia de la infección por HPV refleja la existencia de neoplasia intraepitelial, reforzando así la idea del

HPV, una de las infecciones más frecuentes de transmisión sexual, como causa central de neoplasia cervical (Ho et al, 1995). En la serie de Bosch et al (1995) con más de 1000 pacientes con carcinoma infiltrante de cérvix, el HPV 16 estaba presente en el 50%, seguido del HPV 18 (14%), HPV 45 (8%) y HPV 31 (5%). Los estudios más recientes han detectado DNA de distintos HPV de alto riesgo (especialmente los tipos 16 y 18) en el 90% de los carcinomas cervicales (Dellas et al, 1997; Lazo, 1999), proporcionando una fuerte evidencia del papel causal del HPV en el desarrollo de carcinoma de cérvix.

Los HPV codifican las proteínas E6 y E7, las cuales tienen capacidad para interactuar 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 disregulación 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 (Figura 1).

Figura 1: Alteración en el funcionamiento de p53 y pRb mediado por las proteínas E6 y E7 del HPV.



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 homocigota de p53-Arg tiene 7 veces más capacidad de desarrollar carcinoma de cérvix que la forma heterocigota Pro/Arg (*Storey et al, 1998*). Este hecho podría explicar porqué no todas las mujeres con infección por HPV desarrollan carcinoma de cérvix.

2.2 Alteraciones cromosómicas. El epitelio cervical puede ir acumulando mutaciones, progresando hacia lesiones malignas e invasivas. Las alteraciones genéticas que se encuentran en el carcinoma de cérvix, son debidas fundamentalmente a la incorporación del DNA del HPV en localizaciones cromosómicas específicas, aunque existen otras alteraciones que suceden de forma recurrente, y que son producidas por agentes desconocidos hasta el momento. Entre ellas, la que más frecuentemente se observa, es la pérdida de heterocigotidad cromosómica (LOH), especialmente la pérdida del brazo corto del cromosoma 3 y 5 (Tabla 1).

TABLA 1: Cromosomas con pérdida de heterocigotidad (LOH) en carcinoma de cérvix.

Estudios	Nº pacientes	LOH
Ku et al, 1997 Khono et al, 1993; Mitra et al, 1994; Karlsen et al, 1994; Mitra et al 1995; Mullokandov et al, 1996.	51	3p y 5p (30-60%)
Kersemaekers et al, 1998	64	11q (46%) 17q (38%) 3p (41%)
Huettner et al, 1998	58	3p, 6p, 11q (66%)

En el estudio de *Ku et al (1997)* se analizó la relación entre las alteraciones a nivel de 3p y 5p, y la inactivación de p53. La pérdida de heterocigotidad de 5p se correlacionó de forma significativa con la inactivación de p53 ($p < 0.001$), demostrada por mutación, delección o

degradación de p53, probablemente debida a infección por HPV. Esto apoya la hipótesis de la existencia de una vía p53-dependiente en la tumorigénesis del carcinoma de cérvix. La pérdida de heterozigotidad en 3p fue independiente de la inactivación de p53, lo que sugiere una vía p53-independiente, debida a la alteración de otros genes supresores todavía no identificados. Estos resultados han sido posteriormente confirmados por *Fogel et al (1998)* y *Lazo (1999)*. La existencia de vías independientes a p53, podría justificar la presencia de carcinoma de cérvix en ausencia de infección por HPV. Por otra parte, la presencia de lesiones cervicales que regresan espontáneamente (*zur Hausen, 1989*), sugieren la necesidad de otros factores, aparte de la infección de HPV, para desarrollar tumores invasivos.

La seropositividad para el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) se ha asociado a una alta incidencia (>40%) de lesiones intraepiteliales escamosas (SIL) y carcinoma invasivo de cérvix (*Maiman et al, 1993*). En parte es debido a un solapamiento de factores de riesgo de las dos enfermedades, aunque también las alteraciones en la inmunidad podrían tener un papel en el desarrollo del carcinoma cervical (*Schafer et al, 1991; Buehler et al, 1992*). Algunos autores han sugerido un curso de la enfermedad más agresivo en estas pacientes (*Schwartz et al, 1991; Serur et al, 1995*).

2.3 Hormonas. El cáncer de cérvix se puede inducir de forma experimental en animales, mediante la administración de hormonas y otros carcinógenos químicos.

Es conocida la asociación entre exposición prenatal a dietilestilbestrol y el desarrollo de adenocarcinoma de células claras de cérvix o vagina (*Herbst et al, 1978*), aunque con una incidencia baja (0.14-1.4 casos/1000 mujeres expuestas).

No se ha podido establecer una relación directa entre cáncer de cérvix y el uso de anticonceptivos. Sólo en el estudio de *Bosch et al (1992)* con 436 casos de carcinoma de cérvix y 387 controles, las mujeres infectadas por HPV que tomaban anticonceptivos orales, tenían un incremento de hasta 6.5 de riesgo relativo de padecer cáncer de cérvix. Se ha demostrado in vitro, que las hormonas esteroideas aumentan la expresión de E6 y E7 e interfieren en la resolución de lesiones cervicales HPV-inducidas. La significación clínica de estas observaciones tendrán que ser analizadas en estudios prospectivos (*von-Knebel-Doeberitz et al, 1997*).

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, a partir de lesiones epiteliales escamosas no invasivas. Estas lesiones se denominan actualmente lesiones intraepiteliales escamosas (SIL), y engloban los términos antiguos de displasia y neoplasia intraepitelial cervical (CIN), pudiendo ser de bajo grado (CIN I) y de alto grado (incluye CIN II y CIN III). El curso evolutivo del SIL es impredecible, pudiendo regresar, estacionarse o progresar, estando la probabilidad de evolución a carcinoma infiltrante, directamente relacionada con el grado de severidad de la lesión. Actualmente se cuestiona el concepto clásico según el cual, el SIL de bajo grado es el precursor del SIL de alto grado, y se sugiere que este último podría originarse "de novo" sobre el epitelio.

Cuando las células neoplásicas rompen la membrana basal se produce la invasión del estroma. El tiempo que se estima necesario para la progresión desde las lesiones iniciales a carcinoma invasivo varía de 10 a 20 años (*Barron et al, 1970*). La lesión puede seguir creciendo, manifestándose como una úlcera superficial, un tumor exofítico del exocérnix o como una infiltración extensa del endocérnix. 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 ha sido evaluada por *Landoni et al (1995)* en 230 piezas de histerectomía radical con linfadenectomía pélvica realizada en pacientes con estadio IB y IIA. El tumor se extiende desde el endocérnix 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.

El carcinoma de cérvix se extiende hacia el segmento uterino inferior y la cavidad endometrial en el 10-30% de las pacientes (*Pérez et al, 1981*).

La diseminación linfática y hematológica se produce dependiendo del estadio 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. Se ha visto una estrecha correlación entre la afectación de ganglios parametriales y de ganglios iliacos, de manera que, si los ganglios parametriales no están afectados la presencia de ganglios iliacos metastásicos es del 26%, mientras que asciende al 81% si los ganglios parametriales son positivos (*Girardi et al, 1989*). Estos datos podrían ser relevantes a la hora de decidir el tratamiento con irradiación.

La afectación ganglionar varía según los estadios y su porcentaje está en función del método con que se estudie (linfografía, cirugía, TAC) (Tabla 2).

TABLA 2: Incidencia de metástasis ganglionares por estadios en el carcinoma de cervix.

	Est IB	Est II	Est III	Est IVA
Morton et al, 1964	16%	32%	47%	
Fyles et al, 1995 (1)	27%	30%	33%	72%
Benedetti-Panici et al, 1996 (2)	14%	16%	28%	
Ogino et al, 1997 (3)		5.7%	18.1%	27.8%
Cosin et al, 1998 (2)	39%	43%	66%	66%

1: Por Linfografía

2: Por Cirugía

3: Por TAC

4. ESTADIAJE

El sistema de estadiaje inicial fue propuesto en 1929 por un subcomité de la Liga de Naciones, siendo revisado posteriormente en 1937 y 1950. Esta función fue asumida más tarde por la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO), en colaboración con la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC). Las dos últimas revisiones se hicieron en 1987 y en 1995, quedando la clasificación actual como podemos ver en la tabla 3.

En la revisión de 1987 se definió el estadio IA1 como invasión estromal microscópica ($\leq 3\text{mm}$), y el estadio IA2 como la invasión $\leq 5\text{ mm}$ en profundidad y $\leq 7\text{ mm}$ en extensión horizontal. *Kolstad et al (1989)* revisaron los resultados del tratamiento de 643 pacientes y los reestadiaron según la nueva clasificación como estadios IA1 y IA2. Tres de los 232 pacientes (1.3%) con estadio IA1 y doce de los 411 pacientes (2.9%) con estadio IA2 tuvieron recidiva local, confirmando la validez de la modificación de la clasificación. Además, la incidencia de metástasis ganglionares se relacionó con la profundidad de la invasión, siendo del 1% en el estadio IA1 y entre el 5-8% en el estadio IA2. El estadio IB incluye todos los tumores limitados al cérvix mayores que los definidos en el estadio IA2, desapareciendo el término de estadio IB oculto.

En la revisión de 1995 el estadio IB se subclasificó en dos grupos en función del tamaño del tumor, debido a las implicaciones pronósticas: IB1 para lesiones menores o iguales a 4 cm y IB2 para lesiones mayores de 4 cm (*Shepherd, 1995*). *Finan et al (1996)* publicaban los resultados tras histerectomía radical, de 181 pacientes con estadio IB1 ($<4\text{cm}$) y 48 pacientes con estadio IB2 ($>4\text{cm}$). La tasa de supervivencia a los 5 años fue del 90% para el estadio IB1 y del 72.8% para el estadio IB2 ($p<0.02$).

TABLA 3: Estadía del carcinoma de cérvix

AJC	FIGO		
TUMOR PRIMARIO (T)			
Tx		No se puede evaluar tumor 1º	
T0		No evidencia del tumor 1º	
Tis		Carcinoma in situ	
T1	I	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 IA 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
T3		III	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
	T3a	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)			
Los ganglios regionales incluyen paracervicales, parametriales, hipogástricos (obturador), iliacos comunes, internos y externos, presacos 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
M0			No existen metástasis a distancia
M1		IVB	Metástasis a distancia

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

El American Joint Committee on Cancer (AJCC) ha propuesto un sistema paralelo según TNM (tabla 3) que se correlaciona con el de la FIGO. En ambos sistemas se incluyen todos los tipos histológicos.

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 buloso de la vejiga y la inflamación de la mucosa rectal como criterios de afectación.

Se han observado diferencias entre el estadiaje clínico y el quirúrgico. *Van Nagell et al (1971)* fueron los primeros que reconocieron estas discrepancias. Según datos publicados la diferencia es de 17-38% en los estadios I, de 21-71% en los estadios II, y de 43-89% en estadios III, con una diferencia global de 21.4-38.6% (*Sudarsanam et al, 1978; Lagasse et al, 1980; Chung et al, 1981; Rabin et al, 1984*). En otras publicaciones estas diferencias no son tan importantes. En el estudio realizado por la Universidad de Washington en 64 pacientes con estadios IB- IIA tratadas con RT preoperatoria e histerectomía, sólo tres pacientes presentaron un estadio más avanzado en el momento de la cirugía (*Pérez et al, 1987*). Según *Massuger et al (1997)* la subclasificación en el estadiaje clínico depende en gran parte de la minuciosidad con que se haya realizado el estadiaje precirugía o la búsqueda de las metástasis en el momento de la laparotomía. La principal ventaja del estadiaje quirúrgico es que algunos factores de interés pronóstico, como la invasión vascular o linfática y la profundidad de la invasión estromal, sólo se pueden objetivar con el estudio patológico de la pieza.

La mayor certeza que el estadiaje quirúrgico ofrece sobre la extensión de la enfermedad, especialmente a los territorios paraaórticos, ha motivado su inclusión en protocolos ginecológicos (*Lagasse et al, 1980; DiSaia et al, 1987; Stehman et al, 1991*). Dentro de los estudios randomizados realizados por el Gynecology Oncology Group (GOG), el riesgo asociado a la afectación de ganglios paraaórticos en el análisis multivariante es de 11.0 para recidiva y de 6.2 para la supervivencia. Previamente se había demostrado una mayor

probabilidad de fallo extrapélvico en las pacientes con infiltración de ganglios paraaórticos (*Berman et al, 1984*). El conocimiento del estado ganglionar mediante cirugía, nos permitiría definir los volúmenes de irradiación con mayor precisión (*Bolla et al, 1996*) e incluso realizar linfadenectomía previa a la RT (*Potish, 1995; Cosin et al, 1998*). Sin embargo la tasa de morbilidad secundaria a estos procedimientos no es despreciable, a pesar de las nuevas técnicas empleadas, y no se ha demostrado que aumente la supervivencia en este grupo de pacientes, por lo que sólo estaría justificada su práctica dentro de protocolos de investigación (*Copeland, 1991; Christopherson, 1992*).

La biopsia del ganglio escaleno fue propuesta por *Buchsbaum (1979)* para determinar la extensión de la enfermedad. Este grupo publicó una serie de 23 pacientes con ganglios paraórticos positivos, a los que se había realizado biopsia del ganglio escaleno izquierdo, siendo en ocho (34.8%) el resultado positivo. Sin embargo, los resultados negativos obtenidos por otros grupos (*Pérez-Mesa y Spratt, 1976; Manetta et al, 1989*) motivaron el abandono de esta técnica.

5. CLASIFICACION PATOLOGICA

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

5.1 CARCINOMA EPIDERMOIDE

Son neoplasias infiltrantes compuestas exclusiva o casi exclusivamente por células escamosas malignas. Corresponden al 60-80% de todos los carcinomas de cervix.

Macroscópicamente, las lesiones precoces se localizan en el 98% de los casos en la zona de transición endo-exocervical. La colposcopia suele mostrar vasos tortuosos y atípicos, y puede observarse una induración focal, una ulceración focal o un área sobreelevada y granular fácilmente sangrante. 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 cervix macroscópicamente normal). Microscópicamente se

reconocen tres grandes categorías histológicas: carcinoma epidermoide queratinizante de células grandes (formación de perlas córneas), carcinoma epidermoide no queratinizante de células grandes (queratinización celular individual sin formación de perlas corneas) y carcinoma epidermoide no queratinizante de células pequeñas. El gradiente histológico clasifica los tumores en carcinoma bien diferenciado (grado 1), con extensa queratinización individual, células tumorales maduras y puentes intercelular; carcinoma moderadamente diferenciado (grado 2), con mayor pleomorfismo, escasa queratinización individual y ausencia de perlas córneas, y carcinoma pobremente diferenciado (grado 3) con gran pleomorfismo y escasa queratinización individual. Se puede ver también acantolisis, responsable de un patrón pseudoglandular, depósito de amiloide en el estroma, infiltrado eosinófilico intenso, y presencia focal de mucina intracitoplasmática. La inmunohistoquímica muestra positividad en casi el 100% de los casos para un amplio rango de queratinas, y un 90% de casos son positivos para el CEA. La mayoría presentan receptores de progesterona positivos.

Carcinoma Verrucoso

Variante altamente diferenciada del carcinoma epidermoide infiltrante, más típico de la vulva que del cervix uterino. Clínicamente simula un condiloma acuminado, por su aspecto verrucoso. Microscópicamente muestra un crecimiento exofítico con formación de amplias papilas sin tallo conectivo central (el condiloma si tiene), y grandes nidos epiteliales invadiendo de forma expansiva la base del tumor. El epitelio escamoso carece de atipia significativa y el índice mitótico es bajo. Este tumor recidiva pero no metastatiza, por lo que el tratamiento consiste en una amplia resección local.

Carcinoma Condilomatoso

Esta rara variante está descrita también en vulva y vagina. Histológicamente muestra una superficie de crecimiento condilomatoso (papilas con tallo conectivo central y atipia coilocítica), pero el margen profundo tiene los signos clásicos del carcinoma epidermoide infiltrante. Parece un tumor menos agresivo y de mejor pronóstico que el carcinoma epidermoide infiltrante.

Carcinoma Epidermoide Papilar (Transicional)

Es también una variante rara, con similar histología al carcinoma urotelial vesical, compuesto por proyecciones papilares revestidas con varias capas de células tumorales atípicas de aspecto basaloide, y con frecuentes figuras de mitosis. El componente infiltrante suele ser sólo evidentemente en la base del tumor, por lo que es necesario realizar biopsia

profunda con muestreo de la base, ya que si la biopsia es superficial puede revelar únicamente un carcinoma epidermoide papilar "in situ". El pronóstico es similar al del carcinoma epidermoide infiltrante.

5.2 ADENOCARCINOMA

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 cervix 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.

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.

Adenocarcinoma endometriode. 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.

Adenocarcinoma de células claras. Constituye el 4%, siendo más frecuente en mujeres jóvenes. Es un tumor exofítico, que se localiza preferentemente a nivel exocervical, en casos con antecedente de exposición al dietilbestrol. El pronóstico es algo mejor que el adenocarcinoma convencional.

Adenocarcinoma muy bien diferenciado o con mínima desviación (adenoma maligno). Representa el 1%. La malignidad viene expresada por la reacción desmoplásica del estroma periglandular y por la atipia de las glándulas situadas a más de 5 mm por debajo de la superficie endocervical. Su pronóstico es controvertido.

Adenocarcinoma seroso. Es extremadamente raro. Histológicamente es idéntico al adenocarcinoma seroso del ovario o del endometrio.

Adenocarcinoma villoglandular (papilar) bien diferenciado. Es muy poco frecuente. Son lesiones exofíticas que se asocian a SIL. Su pronóstico es excelente.

Adenocarcinoma mesonéfrico. Son tumores muy raros, originados de remanentes mesonéfricos. El diagnóstico se realizará cuando la mucosa endocervical esté respetada y no exista evidencia de exposición previa a dietilbestrol.

Carcinoma adenoide quístico y Carcinoma adenoide basal. Son variantes específicas del adenocarcinoma cervical, que tienden a afectar a mujeres negras postmenopáusicas, y que suelen asociarse a SIL.

5.3 OTROS TUMORES EPITELIALES

Carcinoma adenoescamoso. Representa entre el 5% y el 25% de todos los carcinomas cervicales, y se asocian al embarazo. La neoplasia combina un carcinoma epidermoide bien diferenciado con varios patrones de adenocarcinoma. El pronóstico es controvertido.

Carcinoma de células esmeriladas (Glassy cell carcinoma). Es considerado un tipo de carcinoma adenoescamoso pobremente diferenciado. Se da en mujeres jóvenes y a menudo se asocia a embarazo. Es un carcinoma de muy mal pronóstico.

Carcinoma mucoepidermoide. Se considera una forma de carcinoma adenoescamoso, con un componente epidermoide (frecuentemente un carcinoma epidermoide de células grandes no queratinizante) y un componente mucinoso, sin glándulas reconocibles (contiene células caliciformes y en anillo de sello cargadas de mucopolisacaridos).

Carcinoma linfoepitelioma-like. Histológicamente es similar a linfoepiteliomas de otras localizaciones. Tiene un mejor pronóstico que el carcinoma epidermoide infiltrante, con menor incidencia de metástasis ganglionares.

Carcinoma neuroendocrino. Corresponde a un pequeño número de carcinomas cervicales con grado variable de diferenciación neuroendocrina, detectable por criterios convencionales morfológicos, histoquímicos, inmunohistoquímicos y/o ultraestructurales. La edad de presentación es similar a la del carcinoma epidermoide y también existe asociación con infección por HPV (pero no con SIL). Se distinguen dos tipos básicos: el tumor carcinoide-like, histológicamente más agresivo que el tumor carcinoide clásico y de peor pronóstico, y el carcinoma de células pequeñas, con pronóstico similar al de otras localizaciones.

6 FACTORES PRONOSTICOS CLASICOS

6.1 FACTORES DEPENDIENTES DEL HUESPED

6.1.1 Edad / Estatus menopaúsico. No existe acuerdo sobre el valor pronóstico de la edad en el carcinoma de cérvix (Tabla 4). Para algunos autores la enfermedad es más agresiva y el peor pronóstico en las pacientes jóvenes, ya que tienen con mayor frecuencia tumores pobremente diferenciados (*Prempre et al, 1983; Dattoli et al, 1989*). Sin embargo, en los estudios de *Meanwell et al (1988)* y *Junor et al (1989)* se observaron mejores resultados en pacientes jóvenes, manteniéndose esta diferencia ($p < 0.001$), cuando se estratificaba a las pacientes por estadíos. En el análisis realizado por *Rutledge et al (1992)*, no se observó diferencia en la supervivencia en estadíos iniciales, pero si una tendencia a peor pronóstico en las mujeres menores de 35 años con estadíos avanzados.

TABLA 4: Valor pronóstico de la edad en el carcinoma de cérvix.

Año	Autores	Nº Pacientes		Pronóstico (en jóvenes)
		Jóvenes	Mayores	
1955	Decker et al	169	1282	Igual
1971	Kyriakos et al	59	Literatura	Igual
1977	Kjorstad	139	1863	Igual
1980	Stanhope et al	265	820	Peor
1982	Baltzer et al	187	793	Igual
1983	Prempre et al	94	467	Peor
1988	Meanwell et al	1605	8417	Mejor
1989	Dattoli et al	43	88	Peor
1989	Kaplan	22	83	Peor
1989	Junor et al	80	1508	Mejor
1992	Rutledge et al	250	250	Igual
1998	Mitchell et al	338	60	Igual

Las causas biológicas que podrían sustentar estos resultados, han sido analizadas de forma casi anecdótica. En el estudio de *Chen et al (1996)* se analizó la significación clínica de la cinética celular, en 153 pacientes con carcinoma cervical. Los tumores en mujeres menopaúsicas, presentaron de forma significativa mayor aneuploidía e índice de proliferación que las premenopaúsicas ($p < 0.001$), por lo que los autores concluían que la edad, pero sobretudo el estatus menopaúsico, podría influir en la ploidía del DNA y en la cinética tumoral, y consecuentemente en el estadio y en la afectación ganglionar. Sin embargo, en el estudio de *Garzetti et al (1997)* que estudia la proliferación tumoral mediante ki-67, las pacientes jóvenes presentaron tumores más proliferativos que las pacientes mayores ($p < 0.006$). Cuando se analiza el tipo de HPV y la frecuencia de p53 mutada (*Gostout et al, 1998*), no se ven diferencias en los tipos de HPV ni en las mutaciones de p53, en relación con la edad de las pacientes.

6.1.2 Anemia. *Hirst (1986)*, en una revisión de datos experimentales y fisiopatológicos, observó que tanto la duración como la severidad de la hipoxia, pueden ser importantes para determinar la supervivencia celular tras la irradiación. Así, los tumores con mayor proporción de células hipóxicas, son hasta tres veces más resistente a la irradiación que los bien oxigenados. La anemia es causa y a la vez, una medida indirecta de la hipoxia tumoral. Los estudios que relacionan la anemia con la respuesta a la RT son retrospectivos y no muestran resultados homogéneos (Tabla 5).

TABLA 5: Relación entre anemia y respuesta a RT en carcinoma cervical.

Estudios	Nº Ptes	Control Locorregional
Girinski (1989)	386	Peor*
Stehman (1991)	626	NS
Fyles (1995)	1003	Peor
Karolewski (1999)	413	Peor

* Sólo si HB < 10 durante el tto. NS: no significativo.

Se ha observado mayor incidencia de recidivas pélvicas (46%) y menor tasa de supervivencia en pacientes con Hb < 10-11 gr/dl, con respecto a aquellas que se diagnostican con niveles de hemoglobina mayores (16-24%) (*Vigario et al, 1973; Bush, 1986*). En un estudio retrospectivo de 386 pacientes con estadios avanzados, se observó

que la concentración de hemoglobina era factor pronóstico, pero únicamente durante el tratamiento, de manera que pacientes con un sólo valor por debajo de 10 gr/dl tenían un riesgo significativamente mayor de recidiva locorregional (*Girinski et al, 1989*). Estos resultados no han sido confirmados por otros autores (*Stehman et al, 1991*).

6.1.3 HTA. *Jenkin y Stryker (1968)*, basándose en estudios experimentales, en los que se observaba un incremento del daño vascular originado por la irradiación en ratas hipertensas, llevaron a cabo un estudio comparando pacientes con carcinoma de cérvix hipertensas o no tratadas con RT. Observaron mayor incidencia de recidivas pélvicas y menor número de complicaciones en las pacientes hipertensas (diastólica > 110 mmHg), sugiriendo una menor sensibilidad a la irradiación en estas pacientes. No se han realizado más estudios valorando este dato, ni se conocen las posibles explicaciones.

6.1.4 Temperatura. *Van Herik (1965)* publicó un estudio con 666 pacientes, en el que se observaba menor supervivencia en las 260 pacientes con temperatura oral mayor de 37.8°. De éstas, el 21.2% presentaban enfermedad inflamatoria pélvica y se encontró infección local en 6.9%. El pronóstico era peor si la duración de la fiebre superaba los siete días. En un estudio posterior de *Kapp y Lawrence (1984)* con 398 pacientes, se confirmó una menor supervivencia en aquellas con $T^a > 38.3^\circ$, y además una incidencia mayor de metástasis a distancia ($p < 0.005$). Tampoco se han realizado más estudios analizando la temperatura como factor pronóstico.

6.2 FACTORES DEPENDIENTES DEL TUMOR

El Estadío Clínico es el factor pronóstico independiente más relevante en la mayoría de estudios realizados (*Kapp et al, 1983; Hanks et al, 1983; Boronow, 1990; Scambia et al, 1994; Fyles et al, 1995; Gaarenstroom et al, 1995; Ngan et al, 1996*). En la tabla 6 podemos observar la supervivencia libre de enfermedad por estadios en pacientes tratados con RT radical en distintos centros. Sin embargo, existen otros factores dependientes de las características del tumor, que están adquiriendo importancia en los últimos años y están siendo objeto de estudio (Tabla 8).

Tabla 6: Supervivencia libre de enfermedad a 5 años según estadíos de la FIGO.

	IB	IIA	IIB	III	IVA
Kapp, 1983 (1)	85%	70%	58%	35%	20%
Hanks, 1983 (2)	87%		66% (3)	28%	
Grigsby, 1988 (1)	87.7%	70.9%	66.3%	36.7%	
Boronow, 1990 (1)	78%		57% (3)	31%	8%
Fyles, 1995 (1)	75%	75%	55%	38%	0%
Ogino, 1997 (1)			66%	51.5%	31.3%

1: Tto Radioterapia exclusiva; 2: Tto Cirugía con/sin Radioterapia; 3: se refiere a estadio IIA-IIB.

6.2.1 Volumen tumoral. Su influencia en el pronóstico de estas pacientes se puso de manifiesto inicialmente en los estadíos IB-IIA. *Piver y Chung (1975)* y *Van Nagell et al (1978)* observaron menor supervivencia y mayor incidencia de metástasis ganglionares y a distancia, en las pacientes tratadas con histerectomía radical que presentaban estadio IB-IIA bulky y barrell-shaped. Estos resultados han sido confirmados posteriormente por otros autores, tanto en series quirúrgicas como tras irradiación (*Fletcher et al, 1980; Eifel et al, 1994; Finan et al, 1996; Pérez et al, 1998; Lambin et al, 1998; Yuan et al, 1998*) (Tabla 7). Se pensó que la administración de dosis mayores de irradiación, o una combinación con histerectomía extrafascial podría mejorar el control de estos tumores pero, aunque los resultados publicados en este sentido no son uniformes, estos tratamientos no parecen influir en la supervivencia (*Pérez et al, 1985; Eifel et al, 1994*).

Tabla 7: Supervivencia libre de enfermedad en estadíos IB-IIA según tamaño tumoral.

	NºPtes	Estadio	Supervivencia en no-bulky	Supervivencia en bulky
Finan, 1996 (1)	229	IB	90%	72.8%
Pérez, 1998 (2)	493	IB	83%	54%
	151	IIA	78%	49%
Lambin, 1998 (3)	204	IB-IIA	81%	52%

1: Tto con Cirugía; 2: Tto con Radioterapia; 3: Tto con Cirugía+Radioterapia.

El tamaño tumoral también tiene importancia en los demás estadíos. *Kinney et al (1995)* en una revisión de 387 pacientes con estadio IA2 tratados con histerectomía radical, comprobaron que aquellas con un volumen tumoral menor de 4.19 cc, no presentaban metástasis ganglionares y la supervivencia a 5 años era del 97.6%. En los estadíos IIB-IIIB hay una diferencia significativa en la supervivencia libre de enfermedad a 5 años para

tumores mayores de 6 cm ($p < 0.001$), no objetivándose esta diferencia en otros estadios (Toita et al, 1995; Ogino et al, 1997). 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, 1997, Ogino et al, 1997, Lambin et al, 1998) (Tabla 8).

La importancia del tamaño tumoral motivó, que en la revisión de la clasificación de la FIGO de 1995, se subdividiera el estadio 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; Alvarez et al, 1989). Finan et al (1996) demostraron la validez de esta subclasificación, con una diferencia significativa en la supervivencia a 5 años ($p < 0.02$).

Se observa, además, una relación estrecha entre el tamaño tumoral y la incidencia de recidiva pélvica tras irradiación (Eifel et al, 1994; Ogino et al, 1997; Lambin et al, 1998). En el estudio de Pérez et al (1998), el tamaño tumoral influye en la recidiva local a 10 años en los estadios IB, pero no en el resto de estadios (Tabla 8).

6.2.2 Grado de Diferenciación. La relación entre la supervivencia y el grado de diferenciación en el carcinoma escamoso y el adenocarcinoma es controvertida. Mientras Reagan y Fu (1979), Swan y Roddick (1983) y Randall et al (1988) demostraron el valor pronóstico de la diferenciación histológica en pacientes tratados con radioterapia, otros como Goellner (1976) y Crissman et al (1987) no observaron ninguna correlación entre grado y supervivencia (Tabla 8). En dos series quirúrgicas (Lou et al, 1996; Yuan et al, 1998) con pacientes en estadio IA-IIIB, el grado de diferenciación fue considerado factor pronóstico desfavorable, indicándose tratamiento adyuvante con RT.

6.2.3 Histología. De igual forma, el carácter desfavorable adscrito a los tumores de tipo adenocarcinoma no ha podido ser uniformemente demostrado (Hopkins et al, 1991; Shingleton et al, 1995). Sin embargo, en estadios precoces I-IIA parece existir unanimidad en cuanto a su valor pronóstico. En los últimos años, se han llevado a cabo estudios que confirman el tipo histológico adenocarcinoma, como factor pronóstico desfavorable para la supervivencia en estadios I-IIA en el análisis multivariante, tanto en dos estudios con cirugía sólo (Zreik et al, 1996; Samlal et al, 1997) como en el estudio randomizado de Landoni et al (1997) que comparan cirugía vs RT (Tabla 8).

6.2.4 Afectación ganglionar. La afectación ganglionar, demostrada patológicamente, se asocia a tasas de supervivencia del 50% en casos de afectación pélvica o 25-40% si se afectan cadenas paraaórticas. Sin embargo, aquellas pacientes libres de metástasis ganglionares muestran supervivencias cercanas al 90% (*Tanaka et al, 1984; Delgado et al, 1990; Lambin et al, 1998*). Además, las tasas de recidiva y mortalidad se incrementan con el número de ganglios afectados. Así, *Berman et al (1990)* observaron un 35% de recidivas entre los pacientes con 1 ganglio positivo, 59% con 2 o 3 ganglios positivos, y 69% con 3 o más ganglios positivos. Las tasas de supervivencia a 5 años se asociaron de forma inversa al número de ganglios: 62% 1 ganglio, 36% 2 ganglios, 20% 3 o 4 ganglios, y ningún superviviente si se afectaban más de 4 ganglios.

En el análisis multivariante, la afectación ganglionar estimada por linfografía o cirugía en pacientes con estadíos I-II (*Landoni et al, 1997; Yuan et al, 1998*) o por TAC en pacientes con estadíos III-IVA (*Ogino et al, 1997*), fueron igualmente predictivos de supervivencia. Sólo el estudio de *Zreik et al (1996)* con pacientes en estadio I no logró demostrar esta relación (Tabla 8).

6.2.5 Afectación endometrial. Varios estudios retrospectivos han demostrado 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 por tumor (*Mitani et al, 1964; Pérez et al, 1981*). *Grimard et al (1988)* confirmaron estos resultados, pero sólo para el estadio IB, y *Noguchi et al (1988)* para los estadíos IB-IIB (Tabla 8).

6.2.6 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 (Tabla 8).

6.2.7 Afectación parametrial. La mayor extensión tumoral a parametrios (medial o lateral, uni o bilateral) se ha asociado a peor supervivencia en los estadíos IIB-IIIB ($p<0.02$) (*Pérez*

et al, 1998). *Delgado et al* (1989) observaron una supervivencia a 3 años en pacientes con extensión parametrial del 69.6%, frente 84.9% en aquellos sin extensión a parametrios. En el estudio de *Samlal et al* (1997), la afectación parametrial fue factor pronóstico independiente para supervivencia en el análisis multivariante en las pacientes con estadios IB-IIA, pero sólo si tenían ganglios positivos ($p < 0.003$) (Tabla 8).

6.2.8 Invasión linfática. En el estudio de *Buckley et al* (1996) con pacientes con estadio IA2 tratados con cirugía, se observó que los tumores con invasión linfática, presentaban una tendencia a mayor número de recidivas (9.7% vs 3.2%) y menor supervivencia (89% vs 96%) ($p < 0.058$), lo que en opinión de los autores obligaría a un tratamiento adyuvante. El estudio de este parámetro en otros estadios no ha mostrado ser relevante (*Lambin et al*, 1998; *Yuan et al*, 1998) (Tabla 8).

TABLA 8: Factores dependientes del tumor y su valor pronóstico para recidiva y supervivencia.

	RECIDIVA	SUPERVIVENCIA
Volumen Tumoral	AM: *Ogino, 1997; *Lambin, 1998 NS: *Pérez 1998	AM: **Landoni, 1997; *Ogino, 1997, &Lambin, 1998
Grado Diferenciación		AU: *Reagan, 1979; Swan, 1983; Randall, 1988 NS: *Goellner, 1976; Crissman, 1987
Tipo Histológico	AU: #Figge, 81	AM: *Zreik, 1996; *Samlal, 1997; **Landoni, 1997 NS: **Shingleton, 1995
Metástasis Ganglionares	AU: #Berman, 1990	AM: **Landoni, 1997; *Ogino, 1997; #Yuan, 1998 NS: *Zreik, 1996
Afectación Endometrial		AU: *Pérez et al, 1981; *Noguchi, 1988; *Grimard, 1988
Invasión Estromal		AM: *Samlal, 1997 (sólo si gg -) NS: #Buckley, 1996
Afectación Parametrial		AM: *Samlal, 1997 (sólo si gg+); AU: *Pérez, 1998
Invasión Linfática	AU: #Buckley, 1996	AU: #Buckley, 1996 NS: #Lambin, 1998; #Yuan, 1998

AM: Análisis multivariante. AU: Análisis univariante. NS: no significativo. * Tto con Cirugía. * Tto con Radioterapia. **Tto combinado según estadio. # Tto con braquiterapia seguida de cirugía.

A la vista de lo expuesto, si bien no existe una total homogeneidad en cuanto a los estudios publicados, podría concluirse que los factores pronósticos más ampliamente estudiados como volumen, grado y tipo histológico, así como la afectación ganglionar, parecen realmente influir en la supervivencia de estas pacientes. Las dificultades en la evaluación de dichos parámetros en estadios clínicos (pacientes sometidas a RT radical, con estimación clínica o radiológica del tamaño y la afectación ganglionar) frente a estadios patológicos

(pacientes con tratamiento quirúrgico), podrían justificar las diferencias observadas en algunas de las series anteriormente recogidas.

7 FACTORES PRONOSTICOS BIOLOGICOS

En el apartado anterior pudimos comprobar, que el estadio tumoral es el factor pronóstico más importante en el carcinoma invasivo de cérvix. Sin embargo, no es infrecuente encontrar discrepancias entre la evolución esperada en las pacientes, en base al estadio tumoral y factores histológicos, y la observada en la realidad. Pacientes con tumores del mismo tipo histológico e igual estadio, pueden tener una evolución muy diferente. Es evidente, que con independencia del tratamiento que reciban las pacientes, el resultado final obedece a una serie de propiedades o características biológicas de las células tumorales (*Carney DN, 1991*). Se han dedicado grandes esfuerzos en concretar los diversos aspectos de la biología tumoral en parámetros objetivos y cuantificables. La hipótesis es que la caracterización de las cualidades biológicas de cada tumor, propiciaría el empleo de una clasificación más acorde con su comportamiento y una selección más razonable de su tratamiento (*Lee JS et al, 1992*). La UICC introdujo en 1987, una clasificación nueva para los carcinomas tiroideos, en la que se tiene en cuenta la edad y los hallazgos histológicos. También la clasificación de los sarcomas de partes blandas, tumores óseos, próstata y neurológicos, tienen en cuenta el grado de diferenciación. El AJCC ha constituido una comisión para estudiar la formulación de sistemas de clasificación basados en los nuevos factores biológicos (*Fielding et al, 1993*). Es posible que este enfoque pueda ser aplicado en un futuro a otros tumores como el carcinoma de cérvix.

Los principales factores biológicos de carácter pronóstico, estudiados hasta ahora en el carcinoma de cérvix, comprenden marcadores antigénicos séricos, marcadores de proliferación tumoral y apoptosis, marcadores genéticos, y marcadores de metastatización. La hipoxia como factor pronóstico de respuesta al tratamiento y de supervivencia está siendo de gran interés en los últimos años.

7.1 MARCADORES SERICOS

Se define marcador tumoral como aquella sustancia producida por las células neoplásicas o inducidas por el organismo del huésped, ante la presencia de un tumor maligno. La medida de su concentración en suero u otros líquidos biológicos, o la detección de su presencia en los tejidos, reflejan el crecimiento o la actividad del tumor, y son útiles para establecer el pronóstico, realizar el seguimiento o comprobar la eficacia del tratamiento.

El valor de un marcador tumoral viene determinado por su sensibilidad y su especificidad. El marcador tumoral ideal sería el que tuviera el 100% de sensibilidad y especificidad; esto implicaría que todo paciente con tumor tendría un resultado positivo y que el sujeto sano tendría un resultado negativo.

La sensibilidad de un marcador tumoral (S) se define como el porcentaje de pacientes con tumor que tienen valores elevados del marcador (verdaderos positivos VP / VP+falsos negativos (FN)). La especificidad (E) se define como el porcentaje de pacientes sin enfermedad conocida, que muestran valores normales del marcador (verdaderos negativos (VN) / VN + falsos positivos (FP)). El valor predictivo positivo (VPP) se refiere al porcentaje de tumores entre todos aquellos que tienen valores elevados del marcador (VP/VP+FP). El valor predictivo negativo (VPN) se refiere al porcentaje de casos sin enfermedad entre todos aquellos que tienen valores normales del marcador (Tabla 9).

TABLA 9: Parámetros que definen un marcador tumoral.

	Tumor	Sanos
Positivos	VP	FP
Negativos	FN	VN

$$\begin{aligned}
 S &= VP/VP+FN \\
 E &= VN/VN+FP \\
 VPP &= VP/VP+FP \\
 VPN &= VN/VN+FN
 \end{aligned}$$

La sensibilidad y la especificidad también varían según el valor definido como positivo; es el llamado valor de referencia (VR). El aumento o disminución de este valor mejora un parámetro a expensas del otro. Por ejemplo, se puede elegir un VR alto para un test de screening, sacrificando sensibilidad por especificidad, o elegir un valor bajo para monitorizar pacientes con enfermedad conocida, ya que la sensibilidad sería lo importante. Por tanto, es prioritario conocer el valor de referencia seleccionado, cuando se analizan los resultados de los distintos estudios.

Otra de las características de un buen marcador tumoral, sería reflejar los cambios en el volumen tumoral durante la evolución de la enfermedad. Para poder realizar esta función, es necesario que todo el tumor o una proporción fija del tumor exprese niveles suficientes del marcador elegido. Sin embargo, se ha demostrado que existe heterogeneidad en la expresión de distintos antígenos utilizados como marcadores tumorales, tanto dentro del propio tumor, como entre el tumor primario y sus metástasis (Niloff JM, 1992).

Expondremos a continuación los marcadores séricos más relevantes estudiados en el carcinoma de cérvix.

7.1.1 ANTIGENO CARCINOMA DE CELULAS ESCAMOSAS

El TA-4, aislado del carcinoma cervical de células escamosas, fue descrito por primera vez por Kato y Torigoe en 1977. El antígeno del carcinoma de células escamosas (SCC-Ag) es una de las 14 subfracciones del TA-4, y disponemos de un radioinmunoanálisis específico para determinarlo. Han sido numerosos los trabajos que se han realizado sobre SCC-Ag y su relación con el carcinoma de cérvix, en cuanto al diagnóstico, resultados del tratamiento y seguimiento, así como con factores pronósticos clásicos (estadío, grado, histología) (tabla 10 y 11).

TABLA 10: SCC-Ag y su relación con diagnóstico, factores clásicos, seguimiento y supervivencia en carcinoma de cérvix tratado con Cirugía.

	Corte ng/ml	Nº ptes	Dx (%)	Estadío	Histol	Grado	Respuesta	Recidiva	Sensibilidad Recidiva %	Superviven cia
Crombach (1989)	2.5	517	55	Si			Si	Si	76	
Daver (1990)	2	128	72	Si			Si	Si	76	
Duk (1990)	2.5	451	64	Si	Si		Si	Si	85.5	Si (A.M)
Brioschi (1991)	2	125	62	Si		No	Si	Si	90	
Avall-Lundqvist (1992)	2.5	142	44.4	Si (1)	Si	No				Si (A.M)
Massuger (1997)	2.5	99	26	Si (2)	No	No	Si	No		
Lozza (1997)	2.5	116	57	Si	Si		Si	No	71	

1: Estadíos II vs III; 2: Estadíos I-II vs III-IV. A.M: análisis multivariante

TABLA 11: SCC-Ag y su relación con diagnóstico, factores clásicos, seguimiento y supervivencia en carcinoma de cérvix tratado con Radioterapia.

	Corte ng/ml	No Ptes	Dx %	Estadio	Histol	Grado	Respuesta	Recidiva (SCC post)	Sensibilidad Recidiva %	Supervive ncia
Geyer (1989)	1.5	122	76	Si			Si	Si	78	
Pectasides (1994)	2	120	60	Si	Si		Si	Si	92	
Bolli (1994)	1.5	103	53	Si			Si	Si	81	Sólo est I
Ngan (1996)	2.5	531	65	Si	Si	Si	Si	Si		Si (A.U)
Sproston (1995)	2.5	166	51	Si	Si	No	Si	Si		Si (A.U)
Hong (1997)	2	401	69	Si		No	Si	Si		Si (A.M)*

AU: análisis univariante. AM: análisis multivariante. * Sólo si SCC-Ag >10ng/ml.

El valor de referencia óptimo no está establecido. Se observan niveles elevados de SCC-Ag entre 2-4% de los individuos sanos y entre 16-19% de los pacientes con neoplasia cervical intraepitelial, en estudios que usan como VR 2.0-2.4 ng/ml (*Senikjian et al, 1987; Meier et al, 1989*). En un estudio realizado por nuestro grupo, usando como VR 1.5 ng/ml, resultado de los valores obtenidos en un grupo control, se observó una diferencia significativa en los niveles del marcador entre las pacientes con CIN III frente a las que presentaban carcinoma invasivo (7.4% vs 51%, $p<0.03$) (*Lara et al, 1995*). La sensibilidad de SCC-Ag para el diagnóstico de carcinoma invasivo está entre el 47-76% para un VR de 2.0 ng/ml (*Bae et al, 1997*), mientras que es del 26-65% si el VR elegido es de 2.5 ng/ml (*Sproston et al, 1995*). En el estudio de *Massuger et al (1997)* la sensibilidad fue del 26%, probablemente por ser la mayoría de los casos estadios iniciales. Por tanto, las diferencias observadas en la sensibilidad son debidas al número de pacientes con enfermedad avanzada de la serie y al valor de referencia elegido. Para un VR >2.5 ng/ml la especificidad es del 99% (*Massuger et al, 1997*).

Los niveles de SCC-Ag se correlacionan bien con la masa tumoral y por tanto con el estadio. Usando como valor de referencia 1.5-2.4 ng/ml, se encontraron valores altos de SCC-Ag en 30-44% de estadio I, 60-78% en estadio II, 75-88% en estadio III y 67-100% en estadio IV (*Meier et al, 1989; Holloway et al, 1989; Ngan et al, 1990; Bolli et al, 1994*).

Existen discrepancias en cuanto la relación de SCC-Ag con el tipo histológico y el grado de diferenciación (tabla 10 y 11). Los carcinomas escamosos de cérvix, en general, expresan mayor cantidad de SCC-Ag que los adenocarcinomas, alcanzando significación estadística en el estudio de *Avall-Lundqvist et al (1992)*. Otros parámetros histológicos como el tamaño tumoral, la invasión estromal o la afectación ganglionar han sido estudiados de forma aislada (*Duk et al, 1996; Massuger et al, 1997*). Hay que destacar el trabajo de *Bolger et al (1997)* con 220 pacientes tratadas con cirugía, en el que se observaron niveles elevados de SCC-Ag en las pacientes con ganglios positivos ($p < 0.001$), con un VPP del 100% en aquellas con SCC > 8.6 ng/ml.

Varios estudios han sugerido una buena relación entre los valores seriados de SCC-Ag y el status tumoral (tabla 10 y 11). La modificación de estos valores parece ser un indicador fiable de respuesta, progresión o recidiva. La determinación de SCC-Ag podría ser un parámetro de utilidad en la valoración de la respuesta al tratamiento. Sin embargo, un valor de SCC-Ag por debajo del valor de referencia no excluye la presencia de tumor. *Hong et al (1997)* determinaron el SCC-Ag pre- y post-radioterapia en 245 pacientes con carcinoma invasivo de cérvix, observando normalización del marcador en el 87% de las pacientes (VR < 2 ng/ml) en los tres meses siguientes a la irradiación; en el 91% de estas pacientes se objetivó remisión completa del tumor. La supervivencia, el control local y la enfermedad a distancia fueron peores en las pacientes en las que el SCC-Ag permaneció elevado tres meses después de finalizado el tratamiento. En el estudio de *Crombach et al (1989)* con 517 pacientes, los niveles de SCC-Ag durante el seguimiento se correlacionaron con el status tumoral en el 74% de los pacientes.

El SCC-Ag está elevado en el 71-92% de las pacientes con recidiva precediendo a la clínica un promedio de 3.3 meses (rango 1-7) (Tabla 10 y 11). No se ha observado correlación estadísticamente significativa entre los niveles de SCC-Ag pretratamiento y la probabilidad de recidiva (*Lozza et al, 1997; Massuger et al, 1997*), aunque en una revisión realizada por *Bruijn et al (1998)*, los valores elevados pretratamiento indicaban un riesgo de recidiva de 3.0 para los estadios IB-IIA. Sin embargo, la persistencia de valores elevados del marcador después de finalizado el tratamiento radioterápico, sí se ha relacionado con un mayor riesgo de recurrencia (*Crombach et al, 1989; Hong et al, 1997*). El número de pacientes con SCC-Ag elevado en el momento de la recidiva es mayor que al diagnóstico, de manera que es

muy importante la determinación de SCC-Ag durante el seguimiento, incluso en aquellas pacientes con valores normales al diagnóstico (*Bolli et al, 1994*).

El valor de SCC-Ag pretratamiento es factor pronóstico para la supervivencia en el análisis univariante en algunos estudios (*Sproston et al, 1995; Gaarenstroom et al, 1995; Ngan et al, 1996*). Sin embargo, la significación se pierde, cuando se incluye en el análisis estadístico el estadio clínico, lo que confirma la relación estrecha entre SCC-Ag y estadio. En los estudios de *Avall-Lundqvist et al (1992)* y *Duk et al (1996)*, SCC-Ag es factor pronóstico independiente para la supervivencia junto con el estadio en el análisis multivariante. Para *Hong et al (1997)* ésto se cumple para valores del marcador pretratamiento >10 ng/ml.

7.1.2 CA 125

El Ca 125 es una glicoproteína de elevado peso molecular (220-1000 kD) que se encuentra distribuida en los tejidos del adulto y del feto. Se puede detectar Ca 125, mediante técnicas de inmunohistoquímica, en los conductos müllerianos y en el epitelio celómico del feto, y en los tejidos derivados de los conductos müllerianos en el adulto (*Kabawatt et al, 1983*), incluidos el endocérnix, endometrio y trompas de Falopio. No se detecta en los ovarios normales del adulto.

El valor de referencia normal del Ca 125 está establecido en 35 U/ml, presentando el 1% de las mujeres sanas niveles superiores a este valor (*Bast et al, 1983*). Se observan niveles séricos elevados de Ca 125 en >80% de pacientes con carcinoma de ovario. También está elevado en el adenocarcinoma de trompas, endometrio y endocérnix (*Niloff et al, 1984*), y en otras patologías tanto malignas: páncreas, pulmón y colorrectal, como benignas: leiomiomas, adenomiosis y endometriosis. La determinación de Ca 125, ha demostrado ser de utilidad en el seguimiento del carcinoma de ovario y como factor pronóstico de supervivencia.

Se han realizado algunos trabajos que estudian la relación entre los niveles de Ca 125 en el carcinoma invasivo de cérvix y su relación con el diagnóstico, factores pronósticos clásicos,

resultados del tratamiento y supervivencia (tabla 12). Sin embargo, incluyen grupos heterogéneos de pacientes, en cuanto a tipo histológico y forma de tratamiento.

La sensibilidad de Ca 125 al diagnóstico varía entre 21-73% según las series (Tabla 12), siendo mayor en los adenocarcinomas que en tumores de estirpe epidermoide (Avall-Lundqvist *et al*, 1992; Borrás *et al*, 1995). Los niveles de Ca 125 no parecen relacionarse con la extensión de la enfermedad (Tabla 12). Sólo en el estudio más amplio realizado (Sproston *et al*, 1995), los estadios I tienen valores menores de Ca 125, que el resto de los estadios. Se ha observado una buena relación con la respuesta al tratamiento y con la recidiva. En el análisis multivariante, las pacientes con niveles elevados de Ca 125 tratadas con RT muestran peor supervivencia (Avall-Lundqvist *et al*, 1992; Sproston *et al*, 1995).

Se observa aumento de los niveles de Ca 125 cuando existe recidiva local o a distancia (Leminem *et al*, 1990; Goldberg *et al*, 1991).

TABLA 12: Ca 125 y su relación con diagnóstico, factores clásicos y seguimiento.

	Nº Ptes	Dx (%)	Estadio	Histol	Grado	Respuesta	Recidiva	Sensibilidad Recidiva (%)	Supervivencia
Leminem, 1990 (1)	33	73	No		Si	Si	Si	71	
Goldberg, 1991 (2)	64	30	No	No	No	Si	Si	100	
Avall-Lundqvist, 1992 (1)	142	22	No	Si	No				Si (AM) P<0.002
Sproston, 1995 (1)	158	22	Si (3)	No		Si	Si		Si (A.M) p<0.009
Borrás, 1995 (2)	96	21	No	Si		Si	Si		
Massuger, 1997 (2)	99	23	No	No	No	Si	Si		

1: Tto con Radioterapia. 2: Tto con Radioterapia/Cirugía. 3: Estadio I vs II-IV (p<0.05). AM: análisis multivariante.

7.1.3 ANTIGENO CARCINOEMBRIONARIO (CEA)

El antígeno carcinoembrionario (CEA) es un antígeno oncofetal que se encuentra en concentraciones elevadas durante el desarrollo embrionario y es prácticamente indetectable durante la vida adulta. Los valores considerados como normales dependen del laboratorio y varía entre 2.5-4 ng/ml, si bien valores más elevados (<10ng/ml) pueden detectarse en el 5-10% de los sujetos sanos fumadores. Incrementos leves de los niveles séricos pueden

encontrarse en patologías benignas (cirrosis hepática, insuficiencia renal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, diversa patología pulmonar). El CEA es el marcador más ampliamente utilizado en oncología, por estar elevado en numerosos tumores de estirpe epitelial en distintas localizaciones (pulmón, mama, colorrectal, cérvix, entre otros). Su especificidad se sitúa entre 89-98% (*Lam et al, 1992; Borrás et al, 1995*).

Al igual que otros marcadores tumorales, la sensibilidad diagnóstica del CEA varía según el valor de referencia elegido y los pacientes que integren la serie, pudiéndose detectar niveles elevados entre 15-50% en los distintos estudios publicados (Tabla 13). Si se toma como valor >2.5 ng/ml, la sensibilidad será del 30% (*Bae et al, 1997*). *Kjörstad y Orjasaester (1982)* usando el mismo valor de referencia, encontraron niveles elevados de CEA pretratamiento en cerca del 80%, aunque estos resultados no han sido repetidos en otros estudios.

La correlación entre los niveles de CEA y el estadio se ha demostrado en la mayoría de las series publicadas (Tabla 13). La relación entre la afectación ganglionar y los niveles de CEA es controvertida. Para *Leminem et al (1990)* existe una relación estadísticamente significativa ($p < 0.0008$) mientras que para otros no es significativa (*Bae et al, 1997*) o no existe (*Lam et al, 1992*).

TABLA 13: CEA y su relación con diagnóstico, factores clásicos y seguimiento.

	Nº ptes	Tto	Dx (%)	Estadio	Histología	Gg	Respuesta	Recidiva	Sensibilidad Recidiva (%)
Geyer (1989)	122	RT	50	Si			Si	Si	52
Hiura (1990)	136	RT/Cx		Si			Si	Si	
Leminem (1990)	27	RT	48	No		Si	Si	Si	36
Lam (1992)	395	RT/Cx	15.2	Si	Si	No			
Borrás (1995)	96	RT/Cx	33	Si	No		Si	Si	36
Bae (1997)	67	Qt+Cx	30	No *		Si	Si		

RT: tratamiento radical radioterapia. RT/Cx: tratamiento radioterapia o cirugía. Qt+Cx: tratamiento combinado quimioterapia+cirugía. * Incluidos estadios I y II solamente.

En todos los pacientes con enfermedad controlada, existe una disminución o estabilización de los niveles de CEA (Tabla 13), siendo esta disminución significativa en dos estudios (*Hiura et al, 1990; Borrás et al, 1995*). Existe un aumento de CEA en un 36-52% de las pacientes que recidivan (*Geyer et al, 1989; Leminem et al, 1990; Borrás et al, 1995*).

En el estudio de *Bae et al (1997)* se determinaron los niveles de SCC-Ag y CEA en 67 pacientes con carcinoma cervical, observando que tanto la sensibilidad diagnóstica como el valor pronóstico aumentan, cuando se tiene en cuenta la elevación de cualquiera de los dos marcadores.

7.1.4 β -Core /UGP / UGF

El fragmento β -core es una parte de la subunidad beta de la gonadotropina humana (HCG). Se produce y secreta en las células de tumores trofoblásticos, y también en tumores no trofoblásticos como el de cérvix. La cantidad de subunidad beta producida, no es suficiente para que se produzca un aumento significativo de HCG al unirse a la subunidad alfa. La subunidad beta se degrada continuamente y sus productos de degradación se pueden detectar óptimamente en orina. Su determinación se puede realizar por inmunohistoquímica, existiendo disponibles tres kits comerciales para medir el fragmento β -core como marcador tumoral: UGP (urinary gonadotropin peptide), UGF (urinary gonadotropin fragment) y β -core. Los tres kits han mostrado una eficacia similar, por lo que podemos denominar al marcador β -core/UGP/UGF (Cole et al, 1996). Así, aunque la mayoría de las publicaciones utilicen kits distintos en su determinación, los resultados son comparables (Tabla 14).

La sensibilidad diagnóstica varía según el valor de referencia elegido, siendo del 42-51% para carcinoma cervical (Cole et al, 1996). Los individuos sanos y con patología cervical benigna, presentan 7.4-11% falsos positivos.

La sensibilidad de β -core/UGP/UGF aumenta en estadios avanzados: 28% en est I, 57% en est II, 54% en est III y 73% en est IV (Cole et al, 1996). No se ha encontrado relación con otros factores clásicos pronósticos, excepto en el estudio de *Carter et al (1994)*, que muestra valores mayores de β -core en los tumores más indiferenciados (Tabla 14).

La determinación de β -core/UGP/UGF puede tener un papel importante como indicador pronóstico y permite la identificación de pacientes con alto riesgo de enfermedad agresiva (Carter et al, 1994). En este estudio, de las 14 pacientes con valores elevados

pretratamiento, 11 (79%) murieron por enfermedad, comparado con 1 de 21 (5%) pacientes que tenían valores normales al diagnóstico.

En pacientes que responden al tratamiento, los valores del marcador descienden o se estabilizan. En las recidivas y en la progresión de la enfermedad hay elevación en los niveles del marcador, con una sensibilidad del 72% en el estudio de *Nam et al (1990)*. Por tanto, la determinación de β -core-UGP/UGF puede ser de utilidad para valorar la respuesta al tratamiento y para el seguimiento del carcinoma de cérvix, con la ventaja que su determinación se hace en orina. La ausencia de β -core en orina pretratamiento es un factor favorable para supervivencia a 4 años ($p < 0.001$) (*Crawford et al, 1998*).

TABLA 14: β -Core/UGF/UGP y su relación con diagnóstico, factores clásicos y seguimiento.

	Técnica	Nº Ptes	Tto	Dx (%)	Estadío	Histol	Grado	Respuesta	Recidiva
Nam (1990)	UGF 3fmol/ml	21	RT	62	Si			Si	Si 72%
Kinugasa (1992)	β -core 0.2ng/ml	128	RT	45	Si	No		Si	Si
Neven (1993)	β -core 0.2ng/ml	141	RT/Cx	47	No		No	Si	
Carter (1994)	β -core 0.2ng/ml	61	RT/Cx	23	Si		Si		
Cole (1996)	UGP/ UGF / β -core	137	RT/Cx	43	Si	No		Si	Si

RT: tratamiento radical radioterapia. RT/Cx: tratamiento radioterapia o cirugía.

La determinación de HCG sérica ha sido también objeto de estudio, aunque sólo dos grupos han publicado resultados. *Chen et al (1994)* determinaron los niveles de HCG_s en 152 pacientes con carcinoma intraepitelial y carcinoma invasivo en estadios iniciales y en 56 pacientes sanas usadas como control, utilizando como punto de corte 0.2 mIU/ml. No se observaron diferencias significativas entre los valores de la población normal, carcinoma intraepitelial y carcinoma invasivo. La determinación de UGF ha mostrado mayor sensibilidad diagnóstica que la β -HCG sérica en el estudio de *Norman et al (1990)*.

7.1.5 ANTIGENO POLIPEPTIDICO TISULAR (TPA)

El antígeno polipeptídico tisular (TPA) se puede detectar en la mayoría de los tumores epiteliales. Su estudio en carcinoma de cérvix incluye grupos heterogéneos en cuanto pacientes y formas de tratamiento (Tabla 15). El valor de referencia normal es 95 U/ml. La

sensibilidad diagnóstica varía entre el 27 y el 50%. En general, se relacionan los valores de TPA con el estadio y la respuesta al tratamiento. En los estudios en que se analizó su relación con la supervivencia, fue factor pronóstico sólo en el análisis univariante (*Gaarenstroom et al, 1995; Sproston et al, 1995; Ngan et al, 1996*).

TABLA 15: TPA y su relación con diagnóstico, factores clásicos, seguimiento y supervivencia.

	Nº Ptes	Tto	Dx (%)	Estadio	Histol	Grado	Respuesta	Recidiva	Supervivencia
Hiura (1990)	136	RT/Cx		Si			Si	Si	
Gaarenstroom (1995)	78	RT/Cx	36	Si			Si	Si	Si (A.U)
Sproston (1995)	166	RT	37	Si	No	No	Si	No	Si (A.U)
Ngan (1996)	531	RT	50	Si		Si	Si	Si	Si (A.U)
Bonfrer (1997)	30	RT/Cx		No				No	

RT/Cx: tratamiento radioterapia o cirugía. RT: tratamiento radical radioterapia. AU: análisis univariante.

En diversos estudios se ha evaluado el TPA junto con el SCC-Ag, sin observarse un aumento en la sensibilidad diagnóstica, ni en la significación pronóstica, con respecto a los resultados de la determinación aislada de SCC-Ag (*Ferdeghini et al, 1993; Ngan et al, 1996; Bonfrer et al, 1997*), salvo quizás una mayor sensibilidad en las recidivas (*Ngan et al, 1996*).

7.1.6 CYFRA-21

La citoqueratina 19 puede expresarse en el carcinoma epidermoide y en el adenocarcinoma de cérvix, así como en adenocarcinomas de otras localizaciones (pulmón, mama, gastrointestinal, piel). Los fragmentos séricos de citoqueratina 19 se miden mediante Cyfra-21, por radioinmunoanálisis (RIA), aunque no hay un valor de referencia establecido. *Inaba et al (1995)*, tomando como valor de referencia 1.9 ng/ml, observaron una sensibilidad diagnóstica del 51.2%, similar a la observada por *Ferdeghini et al (1993)* con un valor de 1.06 ng/ml (52%).

El nivel de Cyfra-21 se relaciona con el estadio y el tamaño tumoral en el carcinoma de cérvix (Tabla 16). En la serie de *Gaarenstroom et al (1995)* se encontró, además, una correlación positiva entre los niveles de Cyfra-21 y la presencia de enfermedad extracervical

($p < 0.02$). En este estudio, además, los niveles de Cyfra-21 fueron factor predictivo de supervivencia en el análisis univariante.

TABLA 16: Cyfra-21 y su relación con factores clásicos y seguimiento.

	NºPtes	Tto	Dx (%)	Estadio	Histol	Respuesta	Recidiva	Supervivencia
Ferdeghini (1993)	56	RT/Cx	52	Si	No			
Gaarenstroom (1995)	78	RT/Cx	58	Si		Si	Si	Si A.U)
Nasu (1996)	41	RT		Si		Si	Si	
Tsai (1996)	87	RT/Cx	49	Si				
Bonfrer (1997)	30	RT/Cx		No			No	No

RT/Cx: tratamiento radioterapia o cirugía. RT: tratamiento radical radioterapia. AU: análisis univariante.

Se ha estudiado Cyfra-21 junto con otros marcadores como SCC-Ag y TPA. Para algunos autores la sensibilidad de Cyfra-21 es menor que la de SCC-Ag (*Nasu et al, 1996; Tsai et al, 1996; Bonfrer et al, 1997*), y no existe ventaja en la utilización de los dos marcadores frente a SCC-Ag sólo. En el estudio de *Gaarenstroom et al (1995)* se determinaron Cyfra-21, TPA y SCC-Ag, sin observarse ventajas en la utilización conjunta de los tres marcadores.

7.1.7 OTROS MARCADORES

El antígeno carbohidrato **Ca 19.9** es un marcador útil en el diagnóstico de los carcinomas digestivos, con menor sensibilidad que CEA, pero mayor especificidad. Se utiliza para la monitorización de los resultados del tratamiento y seguimiento en carcinomas colorrectal y de páncreas. Se detecta en el 61-69% de los carcinomas colorrectales, en el 76% de los carcinomas mucinosos de ovario y en el 27% de los carcinomas serosos. Se produce también en la mucosa del endocervix normal. Su valor de referencia se ha establecido en 25U/ml.

Hay pocos estudios de Ca 19.9 en carcinoma de cérvix. *Borras et al (1995)* en una serie con 96 pacientes, observaron niveles elevados de Ca 19.9 en 32% de los casos, con una especificidad del 98%. Existía una buena correlación con el estadio, y los niveles eran significativamente mayores, en pacientes con adenocarcinoma con respecto al carcinoma escamoso. Tanto en este estudio, como en el de *Fujii et al (1988)*, la sensibilidad de Ca 19.9 en los adenocarcinomas era superior a la de Ca 125. El aumento del marcador en los

adenocarcinomas, podría ser explicado por la producción mucinosa de las glándulas endocervicales. El análisis de Ca19.9 por métodos inmunohistoquímicos, en 103 pacientes con carcinoma de cérvix tratadas con RT, ha mostrado una supervivencia significativamente mayor a 5 años ($p < 0.01$) en las pacientes con expresión de Ca19.9 (Abe *et al*, 1999). El mismo estudio no encontró diferencia en la supervivencia cuando se determinaba el Ca 19.9 sérico.

En algunas enfermedades neoplásicas, se han encontrado alteraciones en la proporción de **IgG1 e IgG2** con respecto a la IgG global. En el estudio de *Schauenstein et al* (1996) se determina la IgG1 e IgG2 pretratamiento en 207 pacientes con carcinoma de cérvix, ovario o endometrio, comparándolas con un grupo control de 135 pacientes sanas y 52 pacientes con enfermedades ginecológicas benignas. El estudio concluye que la sensibilidad de IgG1 es mayor que la de los marcadores convencionales (SCC, Ca 125, CEA y TPA) para carcinoma de cérvix y endometrio, sobretodo en estadíos iniciales, y algo menor que Ca 125 en el carcinoma de ovario. El análisis combinado de IgG1, TPA y Ca 125 aumenta la sensibilidad diagnóstica en las tres localizaciones tumorales.

Los niveles de **IAP** (proteína ácida inmunosupresora) se han estudiado en 63 pacientes, siendo significativamente más altos en los pacientes con carcinoma de cérvix que en los sanos ($p < 0.01$). Al diagnóstico estaban elevados en el 50.7%. El SCC-Ag estaba elevado en el 73%, y la combinación de ambos, daba valores elevados al diagnóstico en el 87.3%. En el análisis multivariante el nivel sérico de IAP fué factor pronóstico independiente para supervivencia ($p < 0.049$), junto con la afectación ganglionar ($p < 0.007$) y el estadio ($p < 0.008$) (Battaglia *et al*, 1994).

Gitsch et al (1992) evaluaron la expresión de diversas **citoqueratinas** en 45 pacientes con cáncer de cérvix estadio III tratados con radioterapia exclusiva. Los casos con expresión de citoqueratina AE1/AE3 mostraban supervivencia significativamente mayor que los que no la expresaban. El grupo de mejor pronóstico era el que expresaba AE1/AE3 (Wilcoxon $p < 0.006$, log-rank $p < 0.03$).

Otros marcadores como **TATI** (tumor-associated trypsin inhibitor), **sIL-2R** (serum soluble interleukin 2 receptor) e **IL-6** (serum 6 interleukin) han sido evaluados en distintos estudios

(Leminem et al, 1990; Gitsch et al, 1992; Pectasides et al, 1994; Ferdeghini et al, 1993; Scambia et al, 1994), sin mostrar una utilidad añadida a los marcadores descritos previamente.

El antígeno carbohidrato (**Ca 15.3**) reacciona de forma específica con células neoplásicas mamarias. Su principal utilidad es la monitorización clínica de los carcinomas de mama, aunque también pueden detectarse aumentos en otras neoplasias epiteliales como carcinomas ováricos, tumores endometriales y carcinomas de células pequeñas pulmonares. No existen estudios publicados, en el momento actual, de este marcador en carcinoma de cérvix.

7.2 APOPTOSIS Y GENES RELACIONADOS

7.2.1 Historia y Concepto

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”).

Se destacó su presencia en la embriogénesis, en los tejidos maduros para mantener su tamaño, y en la atrofia de los órganos. A diferencia de la necrosis, en la que se produce una muerte pasiva o accidental, en la apoptosis la propia célula ejecuta una cascada de reacciones, que la conducen a la muerte activa o por suicidio. Se propuso que el inicio inadecuado o la inhibición de la apoptosis, podría influir en la génesis de enfermedades como el cáncer (Pérez, 1998).

La apoptosis es, por tanto, un proceso fisiológico con características morfológicas determinadas: condensación de cromatina con rotura del DNA internucleosomal, 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 proceso se completa en minutos, aunque pueden verse cuerpos apoptóticos durante 1 o 2 horas (*Wyllie et al, 1992*). 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 (microscopio 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 (*Mikulski, 1994*). En la necrosis se altera la permeabilidad de la membrana celular, se hincha la célula y se rompe, provocando reacción inflamatoria. El agente agresor suele provocar necrosis en áreas celulares extensas. La apoptosis se puede iniciar en cualquier fase del ciclo, dependiendo de la célula y del tipo de estímulo.

7.2.2 Regulación de Apoptosis

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 transmembranal, 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 determinados genes cuya expresión conduce, en un momento dado, generalmente a través de la síntesis enzimática, a la supervivencia o muerte celular. 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. 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.

Actualmente se conocen más de 30 genes implicados en la apoptosis, especialmente factores de transcripción, proteasas e inhibidores de proteasas. Expondremos a continuación los genes reguladores más conocidos y su papel en la apoptosis.

p53 está localizado en el brazo corto del cromosoma 17. Se le ha llamado el guardián del genoma porque vigila la integridad del mismo. Ante un daño del DNA, p53 se acumula y bloquea la progresión del ciclo celular en la fase G1, permitiendo su reparación e impidiendo la perpetuación de mutaciones. La detención del ciclo en G1-S se consigue estimulando la expresión de la proteína p21, que es una inhibidora de las ciclinas dependientes de kinasas e inhibe la actuación de PCNA sobre la DNA polimerasa delta. P21 está regulada por el gen Waf-cip 1, que se expresa en presencia de p53. Otro gen que se expresa ante un daño del DNA en células con p53 funcional es GADD45. Una vez reparado el daño, p53 precipita con otra proteína, mdm-2, que promueve la entrada de la célula en fase S. Si esta proteína se sobreexpresa, puede bloquear la actividad de p53, por lo que tendría el mismo efecto que una mutación del p53 (*Lane et al, 1993*). Por tanto Waf-cip1 y GADD 45 bloquean la progresión a través del ciclo celular para dar tiempo a la reparación del DNA, y mdm-2 conduce a la célula a la fase S. Si la célula no puede reparar el daño, p53 induce apoptosis. La presencia o ausencia de p53, determina la sensibilidad de una célula para sufrir apoptosis, tras el daño de su DNA.

La expresión de p53 salvaje (no mutada), es inversamente proporcional a la de bcl-2, y predomina en tejidos proclives a la muerte celular por apoptosis. P53 salvaje tiene una vida media muy corta y es prácticamente indetectable en los tejidos normales. Sin embargo, en más de la mitad de los tumores humanos se ha observado (mediante IHQ, ELISA, inmunoblot) un aumento dramático de la expresión de la proteína, debido a mutaciones que inducen alargamiento de su vida media, desde 6-20 minutos a 6 horas (*Levine et al, 1991*).

La función de p53 puede estar alterada por mutación del gen, por formación de complejos de la proteína con oncoproteínas virales como E6-HPV, o por estar secuestrada en el citoplasma, no pudiendo ejercer su función. El gen p53 se asocia a transformación celular in vitro y con neoplasia in vivo (*Nigra et al, 1989; Hollstein et al, 1991*).

Bcl-2 y genes relacionados, es una familia de genes que regulan de manera compleja la apoptosis, con funciones negativas y positivas sobre la misma.

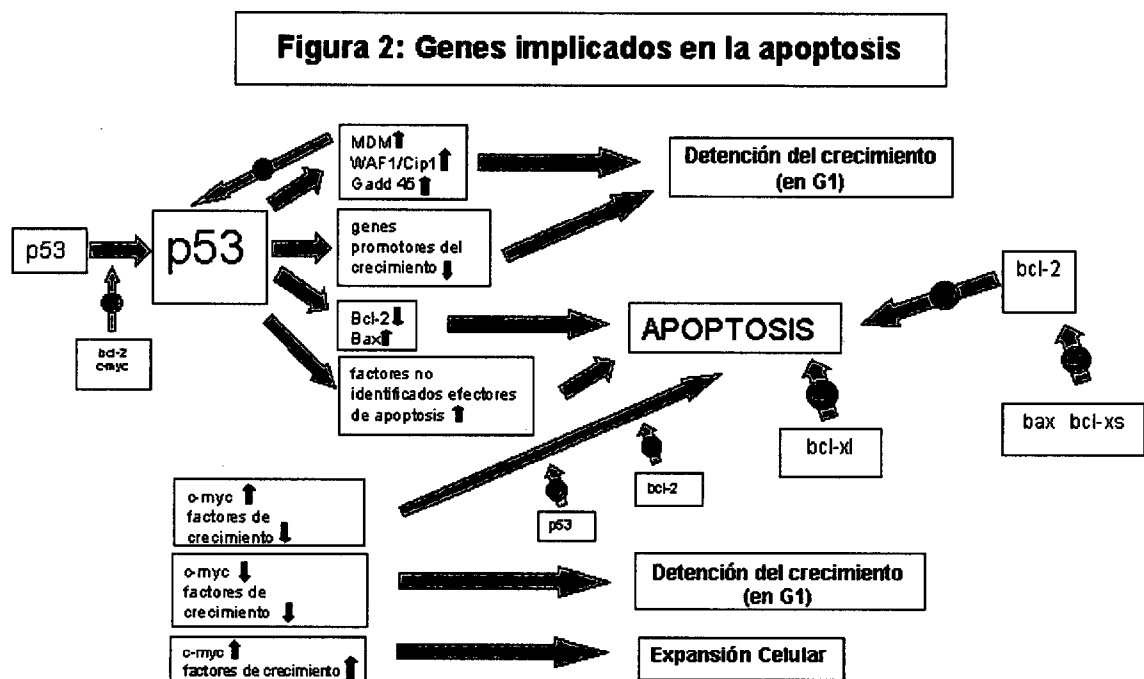
Bcl-2 se encuentra en el cromosoma 18, en el punto donde se inserta la traslocación de un gen del cromosoma 14 (gen codificador de la síntesis de la cadena pesada de la inmunoglobulina). Aunque la traslocación 14-18 mantiene intacta la región que codifica el gen bcl-2, sin embargo disregula su expresión, resultando en una síntesis aumentada de bcl-2. Sin embargo, también se ha demostrado una sobreexpresión de bcl-2 sin que exista esta traslocación (*Tjalma et al, 1998*).

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. 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*).

Bax (bcl-2 associated X protein) es una proteína cuyo gen codificador está en el cromosoma 19. In vivo puede heterodimerizarse con bcl-2. 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 (*Korsmeyer et al, 1993*). El gen bax es activado por p53. Otros genes relacionados con bcl-2 son bcl-xl (bcl-X Long), que inhibe la muerte celular tan eficazmente como bcl-2 (*Mikulski et al, 1994*), y bcl-xs (bcl-X short) y bcl-xB, que inhiben la expresión de bcl-2 y actúan de forma similar a bax (*Mikulski et al, 1994; Nuñez G y Clarke, 1994*).

c-myc es un gen regulador del crecimiento y de la diferenciación celular. Cuando hay expresión reducida de c-myc y escasos factores de crecimiento, se produce detención del crecimiento, pero si ambos están aumentados, se produce expansión celular. En ausencia de factores de crecimiento, c-myc induce apoptosis (Wyllie *et al*, 1992).

Existen diversas interacciones entre los genes previamente descritos. Así, p53 reprime la expresión de bcl-2 y activa la expresión de bax. Por otra parte, la sobreexpresión de bcl-2 puede suprimir parcialmente la apoptosis inducida por p53. Así mismo, bcl-2 y c-myc cooperan para bloquear la entrada en el núcleo de p53, evitando la apoptosis (Miyashita *et al*, 1994). Finalmente, bcl-2 es capaz de inhibir la apoptosis inducida por c-myc (Bissonette *et al*, 1992), mientras que la presencia de p53 es necesaria para la apoptosis inducida por c-myc (Hermeking y Eick, 1994). En el cuadro siguiente se observa de una forma gráfica los genes reguladores de la apoptosis y sus interrelaciones (Figura 2).



Otro gen involucrado en la regulación de la apoptosis es el gen retinoblastoma y su proteína supresora pRb. En condiciones normales, la proteína bloquea el ciclo celular de G1 a S mediante el secuestro del factor de transcripción E2F. Cuando pRb está alterada o ausente, libera E2F permitiendo la proliferación incontrolada. Algunas proteínas víricas, como E7 del HPV, son capaces de bloquear la pRb e inducen la proliferación celular. pRb es capaz de inhibir la proteína c-myc y actuar junto a p53, controlando el paso de G0 a G1.

Otras proteínas inductoras de la proliferación (Ras, Fos, Jun) participan en la apoptosis. De hecho, se sabe que uno de los inductores de la apoptosis es el exceso de proliferación (*Kerr et al, 1994*).

7.2.3. Apoptosis y Cáncer

Se puede establecer relación entre apoptosis y cáncer al menos en tres aspectos: oncogénesis, homeostasis tumoral y respuesta al tratamiento con radioterapia. El valor pronóstico de la apoptosis en los diferentes tumores es también motivo de estudio.

7.2.3.1 Apoptosis y Oncogénesis. El cáncer es consecuencia de una proliferación incontrolada de células con anomalías en su material genético. Las células aberrantes que escaparon a los mecanismos que tiene el organismo para evitar la enfermedad, no fueron eliminadas por apoptosis y perpetuaron las anomalías en su descendencia.

Estas células anómalas proliferan más de lo que mueren, lo que da lugar al crecimiento tumoral. El desequilibrio entre apoptosis/proliferación podría ser explicado en parte, por la alteración de los genes reguladores de estos procesos. De hecho, se ha descrito sobreexpresión de la proteína bcl-2 y disminución de la apoptosis en el carcinoma gástrico, colorrectal y próstata, tumores de origen queratinocítico, linfomas y leucemias, colangiocarcinomas (*Charlotte et al, 1994*), carcinoma de pulmón (*Pezzella et al, 1993*) y carcinoma renal (*Reed et al, 1994*).

En el carcinoma de cérvix se ha objetivado sobreexpresión de bcl-2 en pacientes con p53 anómala (*Liang et al, 1995*). La infección por HPV podría ser la causa de la inactivación de la p53 salvaje, mediante la formación de un complejo con la proteína HPV-E6. De hecho se ha encontrado una fuerte relación entre la presencia de E6 y bcl-2, así como una relación

inversa entre la presencia de p53 salvaje y carcinoma invasivo (*Pillai et al, 1996*). La transformación desde epitelio cervical normal a carcinoma invasivo, sería debida a la inactivación de p53 y a la sobreexpresión de bcl-2 tras infección por HPV (*Furuya et al, 1996*). Existen diferencias significativas en los niveles de bcl-2, entre las lesiones CIN III y CIN I/II y carcinoma infiltrante (*Saegusa et al, 1995*). Esto implicaría un papel importante de bcl-2 en la tumorigénesis cervical. Existe una mayor expresión, tanto de p53 como de mdm-2, en los carcinomas invasivos con respecto a las lesiones precancerosas (*Dellas et al, 1997*), aunque no ha sido corroborado por el estudio de *Slagle et al (1998)*, donde no se observaron diferencias en la expresión de p53 ni de c-myc (determinadas por IHQ) en 395 biopsias de cérvix que comprendían epitelio cervical normal y distintos grados de CIN.

7.2.3.2 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 privación 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*).

De la misma manera que ocurre en los tejidos sanos, existe una relación directa entre proliferación y apoptosis en los tejidos neoplásicos. Un tumor muy proliferante, suele tener una alta tasa de muerte celular por apoptosis. Esta relación apoptosis-mitosis se ha documentado en tumores de distintas localizaciones (mama: *Lipponen et al 1994*; vejiga: *Chyle et al 1996*; pulmón de células no pequeñas: *Komaki et al 1996*; próstata: *Vesalainen et al 1994* ...) y también en el carcinoma de cérvix (*Levine et al, 1995; Isacson et al, 1996; Tsang et al, 1999*). Se ha encontrado además 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 infracuantifica) (*Stauton y Gaffney, 1995*). 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*).

El papel que juega la apoptosis/proliferación durante la evolución desde displasia cervical a carcinoma invasivo, ha sido motivo de estudio. Para algunos autores, el grado de displasia cervical se relaciona de forma inversa con la apoptosis y de forma directa con la

proliferación, mientras que para otros existe una relación directa entre el grado de displasia, apoptosis y proliferación (Tabla 17).

TABLA 17: 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

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*).

7.2.3.3 Apoptosis y Radioterapia. Las radiaciones ionizantes (RI) inducen apoptosis como forma de muerte celular. La tasa de apoptosis inducida por una dosis de RI está relacionada directamente con la apoptosis espontánea (*Meyn et al, 1993*). De esta manera altas tasas de apoptosis pretratamiento predicen una buena respuesta a RT (*Kerr et al, 1994; Meyn et al, 1994*), en modelos animales.

También se ha demostrado que existe correlación entre la apoptosis inducida por RI y el retraso en el crecimiento tumoral, así como con la TCD50 (dosis de radiación a la cual el 50% del tumor es controlado localmente), lo que sugiere que la curabilidad del tumor, es proporcional a la susceptibilidad de éste para sufrir apoptosis (*Meyn et al, 1993*).

Existe 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.

Los estudios realizados sobre apoptosis, proliferación y respuesta a la RT en diversos tumores, han mostrado distintos resultados (Tabla 18).

TABLA 18: Apoptosis, proliferación y respuesta a Radioterapia.

	Nº Pacientes	Apoptosis/ Control Local	Apoptosis/ Supervivencia	Proliferación/ Supervivencia
Cérvix Levine (1995)	66	Peor (A.M)	Peor (A.M)	No
	Wheeler (1995)	44 (1)	No	No (2)
	Tsang (1999)	77	No	Peor si T<6cm
	Sheridan (1999)	34 (1)	No (3)	Peor si T<6cm
	Chung (1999)	48	Mejor (A.M)	No (2)
Vejiga Chyle (1996)	158	No	No	No
	Lara (1999)	53	Peor	Peor (AM) (4)
Laringe Lera (1998)	57	Peor	Peor (AM)	Peor

1: Tipo Histológico Adenocarcinoma. 2: Mejor supervivencia global. 3: Mejor supervivencia utilizando el cociente IA/IM, $p<0.03$.
4: T2 vs T3-4. AM: análisis multivariante.

Existen cinco estudios que relacionan apoptosis, proliferación y supervivencia en carcinoma de cérvix (Tabla18). *Levine et al (1994,1995)* 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. Esta correlación era independiente de la edad, estadio e IM. En el estudio de *Tsang et al (1999)*, la supervivencia no dependía de ninguno de estos parámetros cuando se valoraba toda la serie, pero si se tenía en cuenta el tamaño tumoral se veía que los tumores <6cm, con alto índice apoptótico y de proliferación, tenían peor respuesta a RT. Estos resultados son opuestos a los del estudio de *Chung et al (1999)*, en el que los tumores con alto IA se asociaban a una mayor supervivencia global ($p<0.005$), siendo el IA marginalmente significativo en el análisis multivariante para el control local ($p<0.057$). Cuando se analizaban adenocarcinomas de cérvix, los tumores con >IA presentaban una tendencia a una mayor supervivencia global ($p<0.056$), sin que existiera esta relación con el control local ni con la supervivencia causa específica (*Wheeler et al, 1995*). *Sheridan et al (1999)* 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 ($p < 0.03$).

La SF2 de cada tumor (fracción de supervivencia tras 2 Gy de dosis) es un parámetro que se mide *in vitro*, y se correlaciona con la posibilidad de control local y con la radiosensibilidad intrínseca en carcinoma de cérvix (*West et al, 1993; West and Hendry, 1992*). Los tumores con mayor radiosensibilidad ($SF2 < \text{mediana}$) tienen significativamente mejor supervivencia y control local que los menos radiosensibles ($SF2 > \text{mediana}$). En el estudio de *Levine et al (1995)*, los pacientes con bajo IA y baja SF2 tuvieron mejor control local y supervivencia (100% y 80% respectivamente) que aquellos con valores de IA y SF2 por encima de la mediana (46% y 25% respectivamente). Probablemente la apoptosis, al igual que la necrosis, aumenta en zonas hipovascularizadas al sufrir hipoxia celular. Se sabe que la hipoxia produce una respuesta a la RT hasta 3 veces menor, y ésto podría explicar por qué tumores con IA altos tienen menor respuesta a RT. La relación de la apoptosis con la proliferación podía justificar igualmente estos resultados (*Lera et al, 1998; Pérez et, 1998; Lara et al, 1999*).

El papel que los genes reguladores de la apoptosis tienen en la predicción del resultado clínico a la irradiación en cáncer de cérvix, ha sido analizado en tres estudios recientes. La modificación inducida en su expresión por la irradiación parecer tener relevancia pronóstica (Tabla 19).

TABLA 19: 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 (1998)	44		Aumenta	Aumenta

En el estudio de *Ohno et al (1998)* se estudió el IA y la expresión de bax a 0 Gy y después de 9 Gy. El IA aumentó de 0.22% a 1.20% respectivamente ($p < 0.004$), y la tasa de bax se incrementó de 15% a 60% ($p < 0.0126$). Se observó correlación entre la expresión de bax y apoptosis. Estos resultados son similares a los obtenidos por *Kokawa et al (1999)*, y sugieren que la proteína bax se asocia a la apoptosis inducida por tratamientos ionizantes y con una buena respuesta a la RT. En el estudio de *Harima et al (1998)* se estudiaron bax y

bcl-2 a 0 Gy y después de 10.8 Gy, observando un aumento significativo en ambos casos ($p < 0.003$ y $p < 0.0001$ respectivamente). Sin embargo, el incremento de bax se relacionó con buena respuesta al tratamiento, mientras que la elevación de bcl-2 resultó el factor pronóstico más adverso para la respuesta a la RT en el análisis multivariante.

7.2.3.4 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, los estudios a veces son contradictorios, debido probablemente a que la apoptosis es un fenómeno ligado a múltiples aspectos de la biología tisular, en concreto 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.

Uno de los aspectos que parece influir en la apoptosis es la proliferación. Como ya hemos visto anteriormente, existe relación directa entre apoptosis y proliferación (*Vesalainen et al, 1994; Levine et al, 1995; Chyle et al, 1996; Komaki et al, 1996*). En general, los niveles elevados de apoptosis se han relacionado con mayor extensión local y con tumores más indiferenciados (*Lipponen et al, 1994; Levine et al, 1994; Lipponen y Aaltomaa, 1994; Vesalainen et al, 1994; Aihara et al, 1995; Chyle et al, 1996*). La relación con metástasis ganglionares o a distancia (*Lipponen y Aaltomaa, 1994; Komaki et al 1996*) es más controvertida. En el carcinoma cervical se ha relacionado la apoptosis con la proliferación (*Levine et al, 1995; Isacson et al, 1996; Tsang et al, 1999*), pero sin encontrarse relación con factores clásicos de pronóstico, como el grado histológico y el estadio. Existe una relación entre genes reguladores de apoptosis y la extensión de la enfermedad, de manera que, tumores con mayor expresión de p53 se relacionan con estadios avanzados (*Avall-Lundqvist et al, 1997*) así como los que tienen sobreexpresión de c-myc (*Riou et al, 1990; Wu et al, 1996*). Sin embargo, la correlación es inversa entre bcl-2 y estadio, de manera que la sobreexpresión de bcl-2 predomina generalmente en los estadios iniciales (*Tjalma et al, 1998*).

Los tumores con alto índice apoptótico han tenido peor supervivencia en la mayoría de los estudios publicados: en vejiga (*Lipponen y Aaltomaa, 1994; Lara et al, 1999*); en mama (*Lipponen et al, 1994; Pérez et al, 1998*); urotelio alto (*Masuda et al, 1997*); próstata (*Vesalainen et al, 1994; Aihara et al, 1995*); laringe (*Lera et al, 1998*). En el carcinoma epidermoide de cérvix, los estudios de *Levine et al (1994 y 1995)* muestran un peor

pronóstico en aquellas pacientes con tumores con alto índice apoptótico, mientras que en el estudio de *Tsang et al (1999)* esto sucede sólo en los tumores <6cm. Cuando se estudian los adenocarcinomas de cérvix esta relación es inversa, de manera que los adenocarcinomas de cérvix con alto índice de apoptosis tendrían mayor supervivencia. Sin embargo, esta relación es evidente sólo cuando nos referimos a supervivencia global (*Wheeler et al, 1995*) o cuando se tiene en cuenta el IA/IM (*Sheridan et al, 1999*) (Tabla 18).

En cuanto la relación entre los genes reguladores de apoptosis y el pronóstico, los resultados son controvertidos. La expresión de **bcl-2** se relacionó con peor pronóstico en leucemia, linfoma y neuroblastoma (*Núñez y Clarke, 1994*) y en carcinoma de próstata (*Hockenberry et al, 1991; Colombel et al, 1993*). Sin embargo, en estudios con carcinoma de pulmón de células no pequeñas la sobreexpresión de bcl-2 se relacionó con una evolución menos agresiva de la enfermedad (*Pezzella et al, 1993; Apolinario et al, 1997*). En el carcinoma de mama los tumores que expresan bcl-2, asociados a la presencia de receptores de estrógeno y progesterona, se corresponden con tumores de menor grado (*Joensuu et al, 1994*). En el carcinoma de cérvix la sobreexpresión de bcl-2 se asociaría en dos estudios con mayor supervivencia, mientras que otros dos estudios muestran resultados opuestos (Tabla 20).

En relación con **p53**, un gran número de tumores como melanoma, pulmón, colon, vejiga y próstata, presentan un alto porcentaje de mutaciones de este gen, y esto se asocia con un peor pronóstico. En un estudio realizado por nuestro grupo en carcinomas del urotelio superior (*Rey et al, 1997*), se demostró que las alteraciones del p53 se asocian con una alta proliferación y peor supervivencia. En el carcinoma de cérvix, las mutaciones de p53 sólo se observan en el 7% de los casos (*Lazo, 1999*), por lo que la expresión de p53 es probablemente debida al alargamiento de su vida media al unirse a la proteína viral E6. En los ocho estudios realizados sobre p53 y carcinoma de cérvix, la expresión de la proteína se relaciona con peor supervivencia en el análisis univariante en tres estudios y no tiene relación con el pronóstico en los restantes (tabla 20).

Se ha estudiado la relación de otros genes con la supervivencia en carcinoma de cérvix. La expresión de bax no fue determinante en ninguno de las series analizadas, mientras que la

sobreexpresión de c-myc se asoció con peor pronóstico en los dos estudios realizados (Tabla 20).

TABLA 20: Relación de genes reguladores de apoptosis/proliferación con supervivencia en carcinoma cervical.

	Nº Ptes	Estadio (Tto)	p53	bax	bcl-2	c-myc
Riou (1990)	93	Ib-IIa (Cx±RT)				Peor (AM)
Oka (1993)	192	III (RT)	No			
Kainz (1995)	109	Ib-IIb (Cx)	No			
Uehara(1995)	259	Ib-IIa (Cx)		No	No	
Wu (1996)	48	I-IV (Cx, RT)				Peor
Dellas (1997)	76	Ib (Cx)	No			
Avall-Lundqvist (1997)	113	I-IV (Cx, RT)	Peor (AU)			
Tjalma (1997)	137	I-IV (Cx, RT)			Mejor (AM)	
Nakano (1998)	64	(RT)	No			
Rajkumar (1998)	40	IIB (RT)	No		Peor (A.U)	
Crawford (1998)	46	I-IV (Cx, RT)	Peor (AU)	No	Mejor (AU)	
Harima (1998)	44	RT		No	No	
Pillai (1999)	101	RT	No		Peor (A.U)	

AU: análisis univariante. AM: análisis multivariante. Cx: cirugía. RT: radioterapia.

7.2.4 MARCADORES DE PROLIFERACION TUMORAL

La capacidad proliferativa ha sido relacionada con la progresión y la supervivencia en gran variedad de tumores. La cuantificación de la proliferación tumoral se puede realizar por varios métodos, incluyendo la tinción con hematoxilina-eosina (IM), inmunohistoquímica (ki67, PCNA), y la citometría de flujo con técnicas de marcado con bromodeoxiuridina (BrdUrd).

El antígeno nuclear ki67 es una proteína que se expresa en las células en todas las fases del ciclo, excepto en G0, por lo que representa una estimación de la fracción del crecimiento tumoral. La relación entre proliferación tumoral (medida mediante la expresión de ki67) y la extensión tumoral (local, ganglionar), el grado histológico y la supervivencia, se ha estudiado en carcinoma de cérvix con resultados controvertidos (Tabla 21).

TABLA 21: 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
Oka (1996)	76	Si *	No	No
Camacho (1997)	35	Si *	No	No
Nakano (1998)	64			Mejor
Pillai (1998)	152			Mejor

*grado 2 vs 3

Sólo un estudio ha demostrado relación entre expresión de ki67 y extensión local o ganglionar de la enfermedad (Garzetti *et al*, 1995). En dos estudios se encuentra relación entre los niveles elevados de ki67 y tumores indiferenciados (Wong *et al*, 1991), mientras que en otros dos estudios esta relación no existe (Cole *et al*, 1992; Garzetti *et al*, 1995).

En relación a la supervivencia, los resultados tampoco son concluyentes, ya que en dos estudios los niveles elevados de ki67 se asociaron a peor supervivencia (Garzetti *et al*, 1995; Cung *et al*, 1994), en dos la relación fue inversa (Nakano *et al*, 1998; Pillai *et al*, 1998), y en tres no se demostró ninguna relación entre ki67 y supervivencia (Cole *et al*, 1992; Levine *et al*, 1995; Oka *et al*, 1996).

En nuestro grupo (Camacho *et al*, 1997) se ha determinado el ki67 en una serie preliminar de 35 pacientes con carcinoma de cérvix, sin encontrar relación con la edad, el estadio, ni con la supervivencia. Se observó una tendencia a relacionarse 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. Estos resultados son similares a los publicados por Oka *et al* (1996).

Mediante la citometría de flujo, utilizando técnicas de marcado con BrdUrd, podemos analizar la ploidía, la fracción de crecimiento tumoral (fracción de fase S) y el tiempo potencial de duplicación celular (Tpot). La relación directa con el tamaño tumoral (Tsang *et al*, 1999), no se ha confirmado en otros trabajos (Gasinska *et al*, 1999). En general, no se ha observado relación entre la ploidía tumoral y el pronóstico en carcinoma de cérvix (tabla 22).

Los estudios publicados sobre la relación de la fracción de fase S y el pronóstico muestran resultados contradictorios (tabla 22).

TABLA 22: Relación entre los resultados de la citometría de flujo y pronóstico en carcinoma de cérvix.

	Ptes	Ploidia	Fase S Aumentada
Strang (1987)	133	No	Peor supervivencia
Kristensen (1995)	465	No	No
Zölzer (1995)	25		No (*)
Bolger (1996)	121		Peor supervivencia (AM)
Gasinska (1999)	260	No	No

*: peor supervivencia sólo si disminuye la fase S durante el tratamiento ($p < 0.03$). AM: análisis multivariante.

La proliferación tumoral continúa durante la irradiación, siendo la tasa de repoblación al menos tan rápida, como la prevista mediante Tpot (tiempo potencial de duplicación) pretratamiento (*Durand, 1997*). En los dos estudios publicados sobre Tpot en carcinoma de cérvix tratado con RT, se demuestra que existe al menos una tendencia a menor supervivencia y a recidiva local en aquellas pacientes con un Tpot corto (*Tsang et al, 1995; Bolger et al, 1996*).

7.2.5 OTROS GENES RELACIONADOS

Ras es una familia de genes (H-ras, K-ras, N-ras). La activación del gen, tanto por mutación como por sobreexpresión, puede contribuir a la transformación neoplásica (*O'Brien et al, 1989; Barbacid et al, 1990*). En modelos experimentales se ha observado que HPV 16 coopera con el gen H-ras mutado en la transformación celular (*Storey et al, 1988; Dipaolo et al, 1989*).

En pacientes con carcinoma de cérvix, los estudios moleculares de la mutación de H-ras han mostrado resultados contradictorios (Tabla 23). Por métodos IHQ, la expresión de la proteína H-ras varía entre 12-80% (*Sagae et al, 1989; Symonds et al, 1992, Lee et al, 1996*). En el estudio de *Lee et al (1996)* se analizó H-ras por técnicas moleculares e inmunohistoquímicas en 27 pacientes, sin observarse correlación entre las dos técnicas (59% presentaban inmunorreactividad y el 22% mutaciones en el gen).

TABLA 23: Mutación de H-ras en carcinoma de cérvix.

	Nº Ptes	H-ras mutado
Riou, 1990	93	11%
Willis, 1993	15	7%
Van Le, 1993	72	No
Lee, 1996	27	22%

La mutación de H-ras se asocia con estadios avanzados en algunos estudios (*Riou et al, 1990*), aunque no ha sido confirmado en otros (*Willis et al, 1993; Lee et al, 1996*). Lo mismo sucede cuando se estudia la expresión de su proteína (*Sagae et al, 1989; Hayashi et al, 1991; Symonds et al, 1992; Lee et al, 1996*). No se ha encontrado relación entre la alteración de H-ras y supervivencia, por lo que los autores concluyen que, aunque la mutación de H-ras puede ser un suceso importante en la carcinogénesis cervical, su determinación no añade información pronóstica (*Lee et al, 1996*).

El oncogen **erbB-2/neu (Her-2)** es un protooncogen que codifica una proteína de la membrana (p185) que tiene actividad tirosin-kinasa. El producto de este oncogen es similar al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), y se piensa que funciona como tal. La oncoproteína puede ser estimulada para transmitir señales de regulación del crecimiento, por lo que se piensa que el oncogen juega un papel importante en la proliferación celular. La proteína Her-2 se observa por técnicas de IHQ en el citoplasma y la membrana de las células tumorales. Se expresa en el 42% de los carcinomas de cérvix, incrementándose su expresión en estadios más avanzados. La expresión no varía con el tipo histológico (*Hale et al, 1992; Nakano et al, 1997*). Su relación con otros parámetros de proliferación como ki-67 y pLM (índice mitótico de la población proliferante), fue analizada por *Nakano et al (1997)* en 64 pacientes con carcinoma de cérvix tratados con RT. Se observó relación inversa con ki-67 y directa con pLM.

La expresión de la oncoproteína Her-2 se ha asociado con peor pronóstico en varios tumores, particularmente en el carcinoma de mama. En el carcinoma de cérvix se ha demostrado también peor pronóstico en las pacientes con Her-2 positiva (*Hale et al, 1992; Oka et al, 1994; Wong et al, 1996; Nakano et al, 1997*), siendo esta diferencia significativa. Las pacientes con sobreexpresión de la oncoproteína tuvieron mayor número de recidivas

locales, debido a una resistencia de estas células a la radiación y/o al incremento de la repoblación durante la irradiación (Tabla 24).

TABLA 24: Relación de la expresión de erbB-2/neu (Her-2) con la supervivencia.

	Nº Ptes	Sobreexpresión de Her-2
Hale, 1992	62	Peor Supervivencia
Oka, 1994	192	Peor Supervivencia
Wong, 1996	70	Peor Supervivencia (*)
Nakano, 1997	64	Peor Supervivencia

*: determinación por PCR

La expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (**EGFR**) se relaciona con el tamaño tumoral en pacientes con carcinoma de cérvix, y existe una tendencia a mayor expresión en estadios avanzados sin que las diferencias sean significativas (Kim et al, 1996).

La familia de genes **nm23** (-H1, -H2, -H3b) generalmente se clasifican como genes supresores de metástasis. Se ha demostrado un pronóstico favorable en pacientes con sobreexpresión de nm23 en cáncer de mama (Bevilacqua et al, 1989), ovario (Mandai et al, 1994; Scambia et al, 1996), hepatocelular (Nakayama et al, 1992), próstata (Konishi et al, 1993) y en melanoma (Florenes et al, 1992). Sin embargo, en el neuroblastoma (Leone et al, 1993) la sobreexpresión de nm23 se asoció a diseminación metastásica y progresión de la enfermedad, por lo que, nm23 actuará por mecanismos distintos según los tumores (Tabla 25).

TABLA 25: Relación de la sobreexpresión de nm23 con la supervivencia en tumores de distintas localizaciones.

	Nº Ptes	Localización	Supervivencia
Bevilacqua, 1989	27	Mama	Mejor
Nakayama, 1992	30	Hepatocelular	Mejor
Konishi, 1993	80	Próstata	Mejor
Florenes, 1992	33	Melanoma	Mejor
Leone, 1993	75	Neuroblastoma	Peor
Mandai, 1994	45	Ovario	Mejor
Scambia, 1996	106	Ovario	Mejor

En el carcinoma de cérvix se ha observado correlación inversa entre la expresión de la proteína y la afectación ganglionar ($p < 0.007$) en el estudio de *Marone et al (1996)*. Similares resultados, pero sólo para el tipo histológico adenocarcinoma, se obtuvieron en el estudio de *Mandai et al (1995)*. Se necesitan más estudios que estudien la relación de nm23 con carcinoma de cérvix.

7.3 ANGIOGENESIS TUMORAL

La angiogénesis o neovascularización tumoral es un proceso necesario para la progresión y metastatización de los tumores (*Folkman, 1995*). La angiogénesis influye en el crecimiento tumoral no sólo mediante el efecto de perfusión, sino también por el efecto paracrino de las células endoteliales sobre las células tumorales. Así, la migración de las células endoteliales facilita la invasión local de las células tumorales, mediante la degradación de la matriz extracelular, y los nuevos vasos formados favorecen la entrada de células tumorales a la circulación, permitiendo las metástasis a distancia (*Vermeulen et al, 1996*). Los neovasos surgen siempre de capilares o vénulas preexistentes, nunca de arterias o arteriolas. *Brem et al (1972)* demostraron en neoplasias de distinta localización, que hay diferentes grados de vascularización, que varían no sólo de un tumor a otro, sino también dentro del mismo tumor. Posteriormente, *Révész et al (1989)* observaron en el carcinoma de cérvix, que esta diferencia era significativamente mayor entre tumores, que dentro del mismo tumor, por lo que se puede considerar que existe un patrón vascular característico en cada tumor.

Uno de los métodos para estimar la angiogénesis tumoral es la medición de los microvasos intratumorales. Estos microvasos pueden identificarse utilizando técnicas de IHQ que tiñen las células endoteliales. Dentro de los Ac disponibles para identificar células endoteliales se distinguen dos categorías: los marcadores pan-endoteliales y los que se unen de forma específica a endotelio proliferante (*Vermeulen et al, 1996*). Los más usados actualmente son los panendoteliales, entre los que se encuentran el anti-CD31, el anti-factorVIII y el anti-CD34. Los estudios que los comparan como medida de neovascularización, han demostrado en todos los casos, una mayor sensibilidad de CD-31, que marca hasta un tercio más de vasos y muestra una mayor capacidad pronóstica (*Parums et al, 1990; Horak*

et al, 1992; *Toi et al*, 1993; *Schmidt et al*, 1995). CD-31 reacciona frente al antígeno JC-70, que es una glicoproteína de membrana. En la actualidad se considera el marcador más sensible y específico de células endoteliales, a pesar de fijarse débilmente a fibroblastos, a algunas células tumorales y a células plasmáticas (*Horak et al*, 1992). Mediante IHQ podemos cuantificar microvasos, determinar la distancia intercapilar y la densidad intratumoral de microvasos (IMD), como medidas para estimar la vascularización intratumoral.

La mayoría de los tumores permanecen meses o años in situ, hasta que el tumor adquiere el fenotipo angiogénico. El cambio tumoral desde la fase prevascular a vascular, angiogénica o de diseminación, está regulada por factores estimulantes, como el factor de crecimiento endotelial (VEGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (b-FGF), y por factores inhibidores, como la trombospodina 1(TSP-1) y el interferón alfa. Los mecanismos que regulan el equilibrio entre estos factores, especialmente VEGF, están por definir. VEGF es una citoquina que potencialmente estimula la angiogénesis in vivo. En esferoides tumorales, su expresión aumenta en presencia de hipoxia y con la privación aguda de glucosa, revirtiéndose esta situación con hiperoxigenación y aporte de glucosa respectivamente (*Shweiki et al*, 1995). La expresión de VEGF está regulada también por la activación de oncogenes y mutación o delección de genes supresores (*Claffey et al*, 1996). La p53 mutada incrementa específicamente la inducción de VEGF y produce una importante reducción en la expresión de TSP-1 (*Kieser et al*, 1994; *Dameron et al*, 1994). La hipoxia induce la expresión de VEGF de forma independiente de p53, por lo que existen al menos dos vías independientes de activación del VEGF (*Agani et al*, 1997). En el carcinoma de pulmón de células no pequeñas existe una relación inversa entre la expresión de bcl-2 y VEGF, y relación directa entre la expresión de p53 y VEGF, siendo el VEGF factor pronóstico independiente para la supervivencia en el análisis multivariante (*Fontanini et al*, 1998).

La neovascularización se ha relacionado con la displasia y con el carcinoma invasivo de cérvix. El número de microvasos es proporcionalmente mayor en las displasias y en el carcinoma infiltrante que en los controles, y también es mayor en las pacientes que presentan recidivas (*Dellas et al*, 1997). Para *Ravazoula et al* (1996) esta relación existe, pero sin que la diferencia sea significativa entre displasia severa y carcinoma infiltrante, mientras que para *Abulafia et al* (1996) la diferencia entre carcinoma infiltrante y displasia es

significativa, sin existir diferencia entre displasia y epitelio cervical normal. La expresión de VEGF también se relaciona de forma directa, con el grado histológico de CIN y el carcinoma infiltrante (*Dobbs et al, 1997*). La angiogénesis, por tanto, es un suceso que ocurre desde el comienzo de los cambios displásicos en el cérvix.

Existen estudios que relacionan el número de vasos intratumorales y la expresión de VEGF en distintos tumores (*Toi et al, 1995; Maeda et al, 1996*). La densidad de microvasos se relaciona con la expresión de VEGF en carcinoma infiltrante de cérvix (*Dobbs et al, 1997; Tokumo et al, 1998; Kodama et al, 1999*), de manera que los tumores que expresan VEGF tienen una mayor densidad intratumoral de microvasos.

El estudio de la angiogénesis (medida como número de microvasos) en relación con factores pronósticos clásicos en el carcinoma cervical (Tabla 26), no ha mostrado correlación en la mayoría de las series publicadas (*Tjalma et al, 1998; Avall-Lundqvist et al, 1997; Bremer et al, 1996; Wiggins et al, 1995; Schlenger et al, 1995*). Sólo se ha visto de forma ocasional relación con invasión vascular (*Wiggins et al, 1995*), con afectación ganglionar (*Bremer et al, 1996*), con tamaño tumoral (*Avall-Lundqvist et al, 1997*) y con estadios iniciales (*Avall-Lundqvist et al, 1997; Kodama et al, 1999*). Con respecto a la expresión de VEGF, en dos estudios fue significativamente mayor en los adenocarcinomas (*Tokumo et al, 1998; Santin et al, 1999*), mientras que en el estudio de *Kodama et al (1999)* la expresión de VEGF era independiente del tipo histológico.

TABLA 26: Relación entre angiogénesis y factores pronósticos clásicos.

	Ptes	Método	Tipo Histológico	Tamaño T	Estadio	Inv. Vascular	Ganglios
Avall-Lundqvist (1997)	113	Antifactor-VIII	No	Si (1)	Si (2)	No	No
Wiggins (1995)	29	Antifactor-VIII			No	Si	No
Bremer (1996)	114	Antifactor-VIII					Si
Sundfor (1998)	38	Hematoxilina-Eosina					No
Tokumo (1998)	73	VEGF	Si	No	No		
Santin (1999)	8	VEGF	Si				
Kodama (1999)	66	VEGF	No	No	Si	No	No

(1) Sólo en estadios IB-IIA ($p < 0.05$). (2) Sólo entre estadios IB-IIA ($p < 0.01$).

El papel de la neovascularización tumoral en el desarrollo de metástasis ha sido comprobado en algunos estudios en tumores de mama (*Horak et al, 1992; Barbareschi et al, 1994*), pulmón (*Macchiarini et al, 1992; Apolinario et al, 1997*) y cabeza y cuello (*Gasparini et al, 1993*), mientras que otros estudios no mostraron relación en tumores de mama (*Charpin et al, 1995; Gouldine et al, 1995*) y colon (*Bossi et al, 1995*). En carcinoma de cérvix, el estudio de *Bremer et al (1996)* es el único que observa diferencias significativas en la vascularización de los tumores con y sin metástasis ganglionares.

La mayoría de los estudios publicados, coinciden en considerar la neovascularización como un factor pronóstico independiente de supervivencia en el carcinoma cervical (Tabla 27), de manera que, cuanto mayor es la vascularización menor es la supervivencia. En el estudio de *Avall-Lundqvist et al (1997)* no se encuentra esta relación, atribuyéndolo los autores a que en su serie sólo hay carcinomas escamosos y están incluidos todos los estadios, mientras que en otros estudios existen distintos tipos histológicos o sólo se incluyen estadios iniciales o avanzados. No existen estudios que valoren el papel de VEGF en la supervivencia en carcinoma de cérvix.

TABLA 27: Relación entre vascularización y supervivencia en carcinoma de cérvix.

	Nº Ptes	Método	Supervivencia causa-específica	Supervivencia global
Schlenger (1995)	42	antifactor-VIII	Si	Si
Rutgers (1995)	70	antifactor-VIII	No	No
Bremer (1996)	144	antifactor-VIII	Si (A.M)	
Dellas (1997)	58	Anti-CD-31		Si (A.M)
Avall-Lundqvist (1997)	113	Antifactor-VIII		No
Tjalma (1998)	114	Anti-CD-31		Si (A.M)
Obermair (1998)	166	Antifactor-VIII		Si (A.M)
Davidson (1998)	75	Anti-CD-31	Si (A.U)	
Cooper (1999)	74	antifactor-VIII		Si (A.M)

AM: análisis multivariante. AU: análisis univariante.

La importancia de la cuantificación de la actividad angiogénica tumoral radica, no sólo en su valor como factor pronóstico, sino también como predictor de respuesta al tratamiento. La baja densidad vascular intratumoral es un factor predictivo de resistencia a la radiación en carcinoma de cérvix (*Lyng et al, 1996*). Sin embargo, en el estudio de *Cooper et al (1999)* los tumores más vascularizados tuvieron una tendencia a peor control local.

La angiogénesis puede ser también evaluada por métodos bioquímicos, que detecten en suero u orina factores angiogénicos como el bFGF, que se ha encontrado elevado en la orina de pacientes en diversos tumores malignos (*Li et al, 1994*). Otras técnicas de uso clínico como la resonancia nuclear funcional, el eco doppler, la tomografía por emisión de positrones (PET), y la presión parcial intravascular e intersticial de oxígeno, también nos permiten evaluar la vascularización tumoral. *Hawighorst et al (1998)* estudiaron en pacientes con carcinoma cervical, la relación entre la vascularización medida mediante resonancia magnética dinámica y mediante métodos histomorfológicos (densidad microvasos y VEGF), encontrando relación entre los resultados de la resonancia y la densidad de microvasos, pero no con VEGF. También encontraron que la supervivencia se relacionaba mejor con los resultados de la resonancia, que con los resultados de los métodos histomorfológicos.

7.4 OXIGENACION TUMORAL

7.4.1 Introducción.

En 1909, Gotwald observó que la respuesta a la irradiación de la piel de su antebrazo era menor, cuando se aplicaba sobre un área con flujo sanguíneo reducido mediante compresión. En los años cincuenta, se realizaron numerosas observaciones clínicas y experimentales que demostraron que la oxigenación tumoral condicionaba la respuesta a radioterapia (*Gray, 1953*). Desde el punto de vista radiobiológico, los tejidos normales están bien oxigenados (20-40 mmHg). Sin embargo, los tumores poseen una fracción de células hipóxicas (pero viables) del 5-40%, que condiciona una peor oxigenación con respecto a los tejidos normales (*Lartigau et al, 1992*).

Entre los condicionantes de hipoxia tumoral existen diversos factores dependientes:

- 1. Del tumor.** La existencia de células tumorales distantes a los vasos, 100-180 micras, limita el intercambio de sustancias entre el tumor y los vasos sanguíneos (*Thomlinson, 1955*). Recientemente se ha confirmado la relación directa entre hipoxia y distancia intercapilar intratumoral en 30 pacientes diagnosticadas de carcinoma de cérvix (*West et al, 1999*).
- 2. De la vascularización tumoral.** La tortuosidad, el enlentecimiento y el estasis intermitente (*Chaplin, 1986*), limitan el aporte de cualquier sustancia y disminuye los

gradientes de concentración y el intercambio de moléculas por difusión (oxígeno y parte de los quimioterápicos). La ausencia de invasión y de mecanismos de autorregulación, la mayor presión con respecto a los capilares normales y la ausencia de linfáticos se traduce en hemoconcentración, aumento de la resistencia vascular y disminución de las propiedades reológicas de la sangre (Vaupel *et al*, 1989).

3. Del propio paciente. Los bajos niveles de hemoglobina (Dische *et al*, 1986) o la disminución de la capacidad del transporte de oxígeno por la sangre causada por el monóxido de carbono del tabaco (Overgaard, 1992), así como otras situaciones que puedan modificar el aporte de oxígeno a las células: funcionalismo cardio-respiratorio, vascular, etc...

La respuesta de los tumores a la RT está directamente relacionada con la oxigenación. Desde 1955 se ha venido observando de forma experimental, que los tumores tienen zonas de hipoxia y que éstas comprometen la eficacia del tratamiento con RT (Thomlinson and Gray, 1955). El mecanismo de acción de la RT consiste en la producción de fenómenos de ionización y excitación de átomos y moléculas. Esto provoca la formación de radicales libres que producen el efecto radiobiológico: reaccionan con otras moléculas alterando su estructura y/o función. La macromolécula (M) alcanzada por un radical libre se convertirá a su vez en un radical (M^{*}). Esta alteración puede revertirse gracias a los sistemas antioxidantes y de reparación de las células. Pero en presencia de oxígeno puede ser convertida en un radical peroxilo (M-O^{*}), que en el caso del ADN puede ser una transformación irreparable. Por tanto, en presencia de oxígeno "se fija el daño" causado por la irradiación, mientras que en ausencia de oxígeno el efecto radiobiológico disminuirá, al disminuir la formación de radicales peroxilo en las macromoléculas y estructuras celulares. La oxigenación es un factor pronóstico importante, no sólo por su influencia en la respuesta al tratamiento, sino porque además parece intervenir en la formación del tumor y su progresión. A nivel experimental se ha demostrado que la hipoxia produce una disminución de la tasa de proliferación celular, y posiblemente un aumento del potencial invasivo y metastásico (Höckel *et al*, 1993). Muchos de los genes involucrados en este complejo proceso están regulados por la hipoxia (Dachs *et al*, 1998). La hipoxia induce apoptosis en las células del epitelio cervical normal, pero no en las células con p53 anómala (p53 mutado o ligado a E6-HPV). De esta manera, la hipoxia seleccionaría las células que han perdido su potencial apoptótico, por mutaciones de p53 o sobreexpresión de bcl-2, lo que explicaría por

qué los tumores hipóxicos son más agresivos (*Graeber et al, 1996; Kim et al, 1997; Amellem et al, 1997*). La hipoxia incrementa la tasa de mutaciones y contribuye al desarrollo de un fenotipo más invasivo y metastásico (*Rockwell et al; 1997*). Ya ha sido comentado el papel de la hipoxia en la expresión de VEGF (apartado 7.3).

7.4.2 Detección de la Hipoxia Tumoral.

Está claramente establecido que los tumores hipóxicos son hasta 3 veces menos sensibles a la RT que los bien oxigenados (*Denekamp, 1989*). Los pacientes con tumores peor oxigenados, tendrían por tanto peor supervivencia. La inexistencia hasta hace poco tiempo, de métodos de uso clínico con los que medir la hipoxia tumoral, ha dificultado el conocimiento de la verdadera magnitud del problema. Sólo en los últimos 10 años, se han realizado algunos trabajos describiendo en humanos el valor predictivo del estudio de la oxigenación y el flujo sanguíneo en distintos tumores. Los métodos disponibles actualmente para medir el oxígeno, la hipoxia o parámetros relacionados con ellos, son variados (análisis histomorfométricos como la distancia entre vasos y la criospectrometría, marcadores de hipoxia como el nitroimidazole, roturas de cadenas de DNA y electrodos polarográficos de oxígeno) (*Raleigh et al, 1996*). Entre estos métodos destaca la cuantificación de la pO_2 intratumoral pretratamiento mediante electrodos polarográficos, con la que se ha demostrado una marcada disminución de la supervivencia en los tumores con baja oxigenación en cabeza y cuello (*Gatenby, 1988*) y en cérvix uterino (*Höckel, 1993; Sundfor et al, 1997*). En este sentido se celebró en USA una reunión de expertos del Instituto Nacional del Cáncer (*Stone, 1993*) sobre métodos para determinación de hipoxia en tumores humanos y su relación con la respuesta a RT. Sus "recomendaciones y declaración de necesidades" fueron:

1. La hipoxia es un factor predictivo de respuesta a RT, independiente del estadio y tamaño tumoral.
2. Urge establecer terapéuticas correctoras de hipoxia en esos pacientes.
3. Se recomienda que se estudien prioritariamente dos grupos de pacientes en los que está más claro el impacto negativo en la supervivencia: los tumores de cabeza y cuello y los de cérvix uterino.
4. La determinación de oxígeno mediante electrodos polarográficos es el método standard.

7.4.2.1. Sistemas de Electroodos Polarográficos. Los métodos polarográficos se han utilizado para medir la pO_2 tisular desde 1950, objetivándose hipoxia significativa en los tumores con respecto a los tejidos normales. Sin embargo, esta técnica era criticada debido a las modificaciones en la pO_2 originadas por la sonda al pasar por los tejidos, y a la consumición de O_2 por la parte sensible del electrodo. Estas causas potenciales de error pueden ser minimizadas con el sistema de Eppendorf, ya que dispone de electrodos con un diámetro de 0.5 mm y 0.3 mm en la punta, y de un microcátodo de oro de 17 micras (Figura 3). La lesión del tejido debido a la progresión del electrodo es bastante más pequeña, sin repercusión en las medidas de pO_2 . La reproductibilidad de este método ha sido puesta de manifiesto por *Lartigau et al (1992)*. El equipo Eppendorf de electrodos polarográficos, fue considerado por una comisión de expertos del National Cancer Institute (USA), el método standard para la determinación de la oxigenación tumoral (*Stone, 1993*), y más recientemente en el 43rd Annual Meeting of the Radiation Research Society como el método más seguro y reproducible en la medición de la oxigenación tumoral (San José, California, 1995).

El electrodo avanza en pasos de 0.7 mm, profundizando 1 mm y retrocediendo 0.3 mm en cada paso ("pilgrim step"), para minimizar artefactos por compresión vascular, tomando cada determinación en menos de 1.4 segundos. La pO_2 medida pertenece al espacio extracelular de un volumen de muestra de 12 micras de diámetro, que corresponde a 50-100 células por cada determinación, lo que le confiere una alta resolución espacial. En general, se realizan 200 determinaciones a partir de seis trayectos distintos del tumor, obteniéndose un histograma de pO_2 , con un rango de 0-100 mmHg (Figura 4). Antes y después de cada serie de medidas, se debe realizar calibración en una cámara que contiene suero fisiológico estéril al 0.9%, con pH=7.8. Por esta solución se hace pasar, a través de un filtro estéril, aire y nitrógeno al 100%. Se consigue así una alternancia de presiones parciales de oxígeno conocidas (21% y 0%). El equipo hace una interpolación entre la calibración previa y la posterior a las medidas, para corregirlas de forma automática.

A través del ánodo de la cámara, se genera un voltaje de polarización de 700 mV. La reducción electroquímica de las moléculas de oxígeno en el extremo del electrodo causa un incremento de la corriente. Este aumento, es proporcional al número de moléculas de oxígeno que son reducidas en la solución de electrolitos, y en su momento, a la del tejido donde se realiza la medida (técnica conocida como amperimetría).

La determinación de la pO_2 tumoral mediante esta técnica, permite conocer pacientes con tumores considerados menos sensibles a la radiación, debido a la hipoxia, que se podrían beneficiar del uso de sustancias radiosensibilizantes (entre ellas el oxígeno) o de la valoración de otros abordajes terapéuticos.

Figura 3: Detalle del sistema pO_2 Histogram (sistema 6600).

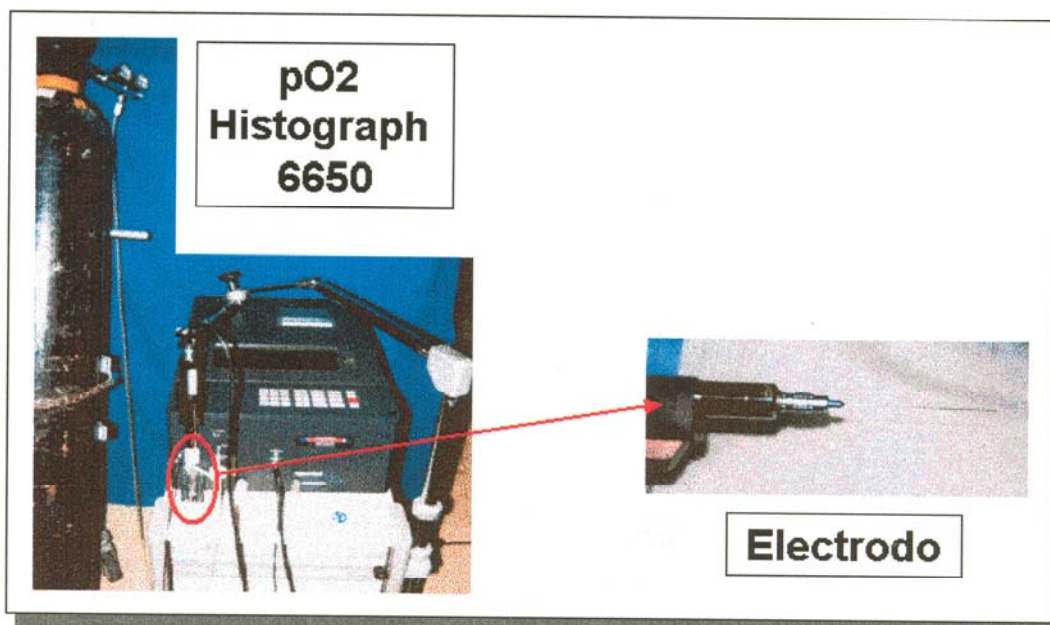
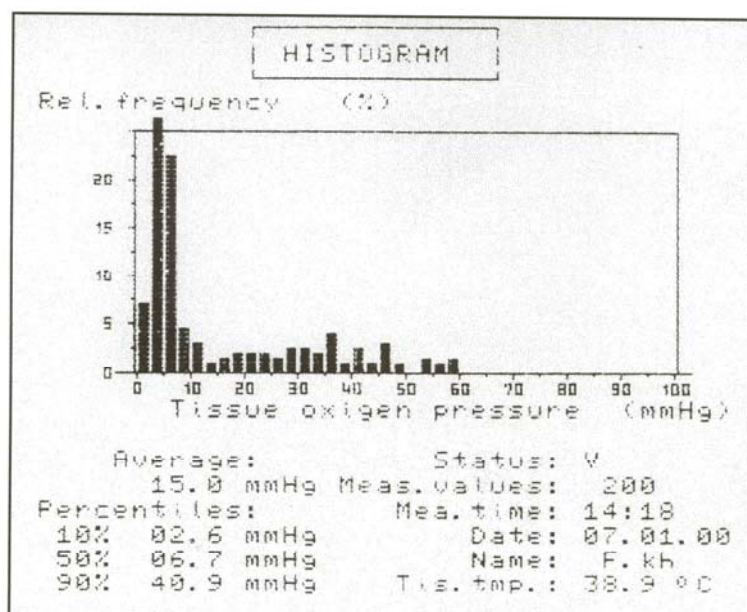


Figura 4: Histograma de pO_2 en un tumor epidermoide de cérvix.



Las principales limitaciones de esta técnica son: 1) no distinguir si la hipoxia corresponde a células viables o necróticas, y 2) en el equipo de Eppendorf el proceso de medida consume oxígeno, por lo que no sirve para monitorizar. Esta última circunstancia está solventada en otros equipos (LICOX, GMS), pero éstos tienen el inconveniente de no poseer movimiento automatizado.

7.4.2.2 Análisis histomorfométrico. La medida de la distancia entre los vasos intratumorales y la densidad vascular intratumoral son útiles en la estimación de la vascularización tumoral (apartado 7.5). Tienen la ventaja de realizarse mediante procedimientos que artefactan mínimamente los resultados. En un estudio reciente se ha visto que la hipoxia se correlaciona con la distancia intercapilar ($p < 0.003$, $r = 0.60$), pero no con la densidad vascular intratumoral (*West et al*, 1999). Con la crio-espectrometría, se puede determinar la hemoglobina existente en los microvasos tumorales en secciones tisulares congeladas. Es probablemente más válido que la histomorfometría, ya que combina la morfometría y la función de la hemoglobina. Su principal desventaja es la cantidad de tejido que se requiere para la técnica (*Raleigh et al*, 1996).

7.4.2.3 Marcadores de Hipoxia. El pimonidazole, un derivado del nitroimidazole, se está utilizando como marcador de hipoxia tisular en estudios con carcinoma de cérvix. El pimonidazole se une a las células hipóxicas, de manera similar a la de otros nitroimidazoles. Se administra por vía intravenosa y 24 horas después se hacen biopsias del tumor, procediéndose a preparar cortes para IHQ. Las células hipóxicas se detectan mediante Acs monoclonales que se unen al pimonidazole. Este método, tiene la ventaja añadida que la misma biopsia se puede utilizar para determinar otros parámetros por IHQ (*Kennedy et al*, 1997), y permite valorar si las áreas hipóxicas corresponden a necrosis o a células viables. Entre los inconvenientes principales están el ser una técnica invasiva y realizarse con fármacos que no poseen autorización para uso clínico habitual.

7.4.3 Estudios Actuales

La validez de las medidas de pO_2 como factor predictivo de respuesta, empieza por demostrar que la variación de la pO_2 intrapaciente es menor que la variación interpaciente. *Brizel et al* (1995) analizaron los resultados de las medidas de pO_2 tumoral realizadas en dos localizaciones distintas de cada tumor y en tres tipos histológicos distintos: cérvix,

metástasis ganglionares y sarcoma. La pO_2 media tumoral fue 4.5 mmHg, 12.6 mmHg y 18 mmHg, respectivamente ($p < 0.07$). La heterogeneidad intrapaciente, fue menor que la heterogeneidad interpaciente para todos los parámetros medidos. Esto ha sido confirmado por otros autores posteriormente (Lyng *et al*, 1997; Wong *et al*, 1997).

Es de suponer que exista una relación entre **oxigenación y vascularización intratumoral**. Sundfor *et al* (1997) determinaron en 19 pacientes con carcinoma de cérvix la pO_2 intratumoral mediante electrodos polarográficos, y posteriormente tomaron biopsia de la zona determinando la densidad vascular. Las zonas del tumor con mayor densidad vascular se correspondían con los mayores valores de pO_2 y viceversa, por lo que se puede decir que las medidas de pO_2 realizadas con electrodos polarográficos son consistentes con la apariencia histológica del tumor.

Se han publicado 4 estudios sobre la relación de la pO_2 intratumoral pretratamiento y **factores pronósticos clásicos** (Tabla 28). Sólo se encontró diferencia significativa en los valores de pO_2 pretratamiento entre las pacientes con/sin afectación ganglionar, tanto para la fracción de $pO_2 < 5$ mmHg ($p < 0.03$) como para la fracción de $pO_2 < 10$ mmHg ($p < 0.02$) (Sundfor *et al*, 1998), pero no con el resto de parámetros.

TABLA 28: Relación pO_2 y factores pronósticos clásicos en carcinoma de cérvix.

	Nº Ptes	Hb	Estadio	Tamaño T	Grado	Ganglios
Höckel (1993)	50	No	No	No	No	No
Hänsen (1996)	28		No	No		
Sundfor (1998)	38					Si *
Fyles (1998)	74		No			

* $p < 0.02$

La relación entre **hipoxia y apoptosis** se ha estudiado fundamentalmente a nivel experimental. Las células con p53 funcionante, son extremadamente sensibles a la hipoxia, iniciando el proceso de apoptosis, pero sólo un pequeño porcentaje de células con p53 anómalo inducen este proceso en condiciones de hipoxia (Graeber *et al*, 1996; Kim *et al*, 1997; Amellem *et al*, 1997). La hipoxia somete a los tumores a una presión fisiológica selectiva que permite la expansión de variantes celulares que han perdido su potencial apoptótico, por mutaciones de p53 o sobreexpresión de bcl-2. Estos resultados indican que

la apoptosis inducida por la hipoxia está mediada, fundamentalmente, por mecanismos independientes de p53 hasta ahora desconocidos (*Giaccia 1996*). En un estudio con 27 pacientes con carcinoma de cérvix se determinó la pO_2 intratumoral y el índice de apoptosis por morfología, por TUNEL y una combinación de ambas, sin encontrar ninguna correlación entre IA e hipoxia. Sin embargo, el IA presentó una fuerte correlación con la reoxigenación tumoral (cociente fracción hipóxica pre/post-tratamiento) (*Sheridan et al, 1999*).

La relación entre **hipoxia y proliferación** ha sido analizada en dos estudios. *Hänsen et al (1997)* en 28 pacientes con carcinoma de cérvix avanzado observaron que los tumores con valores de pO_2 por debajo de la mediana (19.7 mmHg) se relacionaban con una mayor fracción de fase S ($p < 0.002$), aunque no con la expresión de ki67, sugiriendo que los carcinomas cervicales avanzados tienen una actividad altamente proliferativa, que podría ser la responsable del desarrollo de la hipoxia. En el estudio de *Tsang et al (1999)* con 41 pacientes diagnosticadas de carcinoma de cérvix en distintos estadios, no se objetivó ninguna correlación entre los valores de pO_2 y la proliferación (LI BrdUrd), lo cual sugiere que son factores predictivos independientes y complementarios en el carcinoma de cérvix. La hipoxia se asocia a la progresión tumoral, probablemente, a través de la inducción de VEGF y consecuentemente a la neoformación de vasos y metástasis, aunque todavía no ha podido ser demostrado en tumores in vivo (*Raleigh et al, 1998*).

La medida del oxígeno intratumoral se ha estudiado en relación con la **respuesta a RT** (Tabla 29), encontrando que los tumores más oxigenados son los que presentan mejor respuesta (*Hänsen et al, 1996; Höckel et al, 1996; Sundfor et al, 1997; Fyles et al, 1998*). Además, los cambios en la pO_2 que ocurren durante la RT (reoxigenación) podrían ser predictivos de respuesta. En este sentido se han llevado a cabo dos estudios que no demuestran diferencias significativas entre los valores de pO_2 pre- y post-tratamiento (*Hänsen et al, 1996; Fyles et al, 1998*). En el estudio de *Hänsen et al (1996)* se midió la pO_2 pretratamiento, a los 20 Gy y post-tratamiento, a 28 pacientes con carcinoma de cérvix en estadios II-III que iban a ser tratadas con RT radical. Se observó que durante el tratamiento, algunos tumores mejoraron la oxigenación y en otros persistió la hipoxia, siendo estos últimos los que menor disminución de volumen tumoral presentaron al final de la RT.

TABLA 29: pO₂ pretratamiento en relación con respuesta, recidiva y supervivencia en carcinoma de cérvix.

	Nº ptes	Estadíos	Tratamiento	Respuesta	Recidiva	Supervivencia causa-específica
Hänsen (1996)	28	II-III	RTvs RT-INF [#]	Si		
Höckel (1996)	44	Ib-IIIb	Cx y/o RT±QT	Si		Si (AM)
Sundfor (1997)	38	Ib-IVa	RT-QT vs RT	Si		
Fyles (1998)	74	Ib-IIIb	RT	Si	Si	Si
Knocke (1999)	51	Ib-IVa	RT	Si	Si	Si

RT: radioterapia. Cx: cirugía. QT: quimioterapia. #: Interferón- α -2a (INF). AM: análisis multivariante.

La pO₂ intratumoral pretratamiento es un factor predictivo de **supervivencia causa-específica** (Höckel *et al*, 1993 y 1996; Fyles *et al*, 1998; Knocke *et al*, 1999), constituyendo el factor pronóstico independiente más importante en el análisis multivariante, por encima de factores clásicos como el estadio tumoral (Höckel *et al*, 1996) (Tabla 29). En el estudio de Fyles *et al* (1998), los tumores hipóxicos mayores de 5 cm presentaban una supervivencia libre de enfermedad significativamente peor que el resto de tumores ($p < 0.0001$). Se ha analizado también la relación entre pO₂ y recidiva, observándose que la posibilidad de recidiva es significativamente mayor en los tumores hipóxicos ($p < 0.02$) (Fyles *et al*, 1998), y que en las recidivas, la pO₂ es significativamente menor que en los tumores primarios ($p < 0.0013$) (Höckel *et al*, 1998).

8 TRATAMIENTO

Actualmente persiste la controversia sobre cuál es el tratamiento más adecuado en el carcinoma de cérvix, especialmente en los estadios iniciales. La comparación entre el tratamiento quirúrgico y el radioterápico es difícil, debido a la selección de las pacientes, a las diferencias en el estadiaje, que en las pacientes quirúrgicas se basa en los hallazgos de la laparotomía, y a las distintas técnicas de tratamiento utilizadas.

A continuación describiremos las conductas terapéuticas que se utilizan en los diferentes estadios.

8.1 CARCINOMA IN SITU

El tratamiento conservador es el tratamiento de elección, en la actualidad, para el carcinoma in situ, habiéndose abandonado la práctica rutinaria de histerectomía en estas pacientes. El tratamiento se puede realizar mediante distintas técnicas: conización, electrocauterio, criocirugía, vaporización con láser, conización con láser y con asa de diatermia. Las cuatro últimas son las más utilizadas en los últimos años, presentando distintas ventajas e inconvenientes en cuanto efectividad, manejo, complicaciones de la técnica y coste. La conización con asa de diatermia es una de las más ventajosas, ya que el tratamiento se hace con anestesia local, sin necesidad de hospitalización de la paciente, y permite el examen histológico con mínimos artefactos. Su efectividad, que depende del tamaño de la lesión, alcanza el 95%, encontrándose 1-2% de carcinomas microinvasivos en las piezas histológica. La criocirugía, aunque con mayor índice de complicaciones, es también utilizada con éxito en estas pacientes.

La radioterapia es una alternativa al tratamiento quirúrgico, y especialmente interesante en pacientes con contraindicaciones para la cirugía o cuando existe extensión hacia la pared vaginal o carcinoma in situ multifocal, tanto en cérvix como en vagina. En la serie presentada por la Washington University, se trataron 26 pacientes con carcinoma in situ mediante radioterapia intracavitaria, administrándose 45 Gy al punto A, sin objetivarse ninguna recidiva (*Grigsby et al, 1991*).

8.2 ESTADIO IA

La conización es obligada para hacer un diagnóstico más fiable. La profundidad de la invasión del estroma, se ha identificado como un factor pronóstico a tener en cuenta en la planificación del tratamiento (*Hasumi et al, 1980*).

Según *Kolstad (1989)*, las lesiones con invasión menor de 1 mm se tratarán con conización, dejando márgenes adecuados y haciendo un seguimiento cuidadoso. Cuando la profundidad de la invasión del estroma es menor de 3 mm (estadio IA1), la incidencia de metástasis ganglionares es menor o igual al 1%, por lo que la disección ganglionar o la irradiación

pélvica no son necesarias (*Fenell et al, 1978*), utilizándose la histerectomía abdominal como tratamiento standard. Con lesiones más extensas (estadío IA2), la histerectomía radical modificada con linfadenectomía pélvica es el tratamiento de elección. De esta manera el control local del tumor es prácticamente el 100%.

En los casos con contraindicaciones quirúrgicas, se podrían tratar con radioterapia intracavitaria administrando 60-75 Gy al punto A, en una o dos aplicaciones según la dosis total. En la Universidad de Washington, 13 pacientes tratadas con braquiterapia intracavitaria no presentaron recidiva, estando el 100% libres de enfermedad a los 5 años. De 21 pacientes tratadas con RT externa y braquiterapia, sólo una paciente diagnosticada por conización desarrolló recidiva pélvica y enfermedad a distancia. La tasa de supervivencia libre de enfermedad a los 5 años fué del 96% (*Grigsby et al, 1991*).

8.3 ESTADIOS IB Y IIA

Es en estos estadios donde existe mayor controversia sobre el tratamiento más adecuado. Se puede realizar cirugía, radioterapia o ambas. La elección terapéutica depende en gran parte de la institución, el ginecólogo y oncólogo radioterápico implicados, las condiciones generales de la paciente, y las características del tumor.

La cirugía consiste en una histerectomía radical modificada con linfadenectomía pélvica. En pacientes <40 años se pueden conservar los ovarios, dada la baja incidencia de metástasis ováricas (<1.5%). También se puede hacer una trasposición de ovarios si se va a administrar RT. La conservación de la función ovárica después de cirugía con trasposición de ovarios y RT es del 50% en la serie de *Feeney et al (1995)*, y sólo del 17% en el estudio de *Anderson et al (1993)*. Una de las ventajas de la cirugía, es la evaluación directa de la cavidad abdominal, lo que permitiría realizar un estadiaje más preciso. Sin embargo, no se ha demostrado que el estadiaje quirúrgico se relacione con un aumento en la supervivencia (*Copeland et al, 1991*).

El tratamiento radical con radioterapia consiste en la administración sobre volumen pélvico de 50-50.4 Gy, utilizando cuatro campos según técnica isocéntrica, con un fraccionamiento de 1.8-2 Gy/d, seguido de braquiterapia (30-40 Gy al punto A). La sobreimpresión de parametrios se realizará en casos con afectación extensa de los mismos, administrándose 10-16 Gy.

La supervivencia a 5 años con cirugía es 81-92% para los estadios IB y 68-79% para los estadios IIA. Con radioterapia la supervivencia a 5 años es de 86-92% en estadio IB y 75% en estadio IIA. Son numerosas las publicaciones que muestran los resultados con cirugía o con radioterapia radical y que apoyan las ventajas de cada tratamiento, sin encontrar diferencias significativas en el control local ni en la supervivencia entre ambos. Estas publicaciones en ocasiones no son comparables, por la distinta selección y número de pacientes estudiadas. *Zola et al (1989)* revisaron 152 publicaciones europeas y estadounidenses, previas a 1981, sobre los resultados del tratamiento en los estadios IA-IIB con cirugía, radioterapia o ambas. El 54% no comparaban el estudio con controles históricos o con pacientes control tratadas simultáneamente. Sólo el 37% (56 publicaciones) comparaban dos brazos de tratamiento, y sólo el 9% (14 publicaciones) comparaban tres brazos. El 46% analizaba factores pronósticos y tenía en cuenta la distribución de pacientes. Ninguna randomizaba varios tratamientos. Para los autores, la literatura existente no era concluyente para decidir el tratamiento más adecuado para cada paciente y proponía estudios prospectivos randomizados. *Piver et al (1988)* en una serie de pacientes con estadio IB trataban con cirugía radical los tumores < o igual a 3 cm y con RT si eran >3 cm o inoperables. La supervivencia a 5 años fue del 92.3% y 91.1%, respectivamente. Por tanto, los resultados son similares, aún cuando el grupo de RT tenía peor pronóstico que el quirúrgico, por lo que concluyen que con un grupo comparable de pacientes la radioterapia podría obtener mejores resultados. *Van Nagell et al (1979)* obtuvieron una tasa de recidivas similar (5%) en tumores <2 cm tratados con cirugía o con radioterapia, pero con tumores entre 2-5cm la tasa de recidiva fue del 24% con cirugía y del 11% con RT.

Existen tres estudios randomizados que comparan cirugía radical vs radioterapia radical en estadios I-II de cérvix (Tabla 30). En el estudio de *Landoni et al (1997)* el 64% del grupo de cirugía recibió RT adyuvante (108 de 169 pacientes) por presentar alguno de los siguientes factores de riesgo: estadio quirúrgico >T2a, estroma libre de infiltración < 3 mm, bordes afectados o ganglios infiltrados. Tanto la supervivencia global como la supervivencia libre de enfermedad y la tasa de recidivas fue similar en los dos grupos. Sin embargo, 48 pacientes (28%) del grupo quirúrgico presentó morbilidad severa comparado con 19 pacientes (12%) del grupo de radioterapia ($p < 0.0004$).

TABLA 30: Cirugía vs RT en el carcinoma de cérvix (estudios randomizados)

	Ptes	Estadio	Supervivencia
Newton (1975)	119	I	No diferencia
Morley y Seski (1976)	446	I	No diferencia
Landoni (1997)	343	Ib-IIa	No diferencia

Los tumores bulky y los barrel-shaped tienen una elevada incidencia de recidivas centrales, metástasis ganglionares pélvicas y paraaórticas, y diseminación a distancia (*Fletcher et al, 1980*). Con objeto de aumentar el control se han propuesto altas dosis de irradiación externa a la pelvis seguida de histerectomía extrafascial (*Nelson et al, 1975; Gallion et al, 1985*). *Thoms et al (1990)* publicaron los resultados de 363 pacientes con tumores bulky endocervicales tratados con intención radical, 246 pacientes con RT y 117 con RT seguida de cirugía. La supervivencia a 10 años fue del 45% y 64%, respectivamente. Esta diferencia fue debida al tamaño de las lesiones, ya que si se comparaba un subgrupo con características similares, 48 pacientes con RT y 45 pacientes con tratamiento combinado, la supervivencia y el control local eran comparables. En el estudio de *Landoni et al (1997)*, las pacientes con tumores mayores de 4 cm que habían sido tratadas sólo con RT, presentaron una mayor tasa de recidivas (70%) que las que habían recibido cirugía con RT adyuvante (53%), aunque no significativa desde el punto de vista estadístico. Para otros autores (*Weems et al, 1985; Pérez et al, 1986; Eifel et al, 1994*), se consiguen resultados similares a nivel de control local y supervivencia utilizando dosis altas de RT, siendo la principal causa de fallo las metástasis a distancia. Se han publicado recientemente los resultados de un estudio randomizado fase III, que demuestran un aumento significativo de la supervivencia a 3 años en aquellos tumores mayores de 5 cm y/o ganglios positivos al asociar QT-RT en estadios IB-IIA (apartado 8.6.2.2).

Radioterapia Postoperatoria

No existe unanimidad en la indicación de radioterapia adyuvante. En la Washington University se utilizan como criterios para irradiación después de histerectomía radical, la presencia de ganglios positivos, como factor de alto riesgo para recidiva locorregional, o la presencia de más de uno de los siguientes considerados de riesgo intermedio: márgenes de resección positivos o cercanos (<3mm), invasión estromal profunda, y permeación vascular

o linfática. En la tabla 31 se describen los criterios utilizados en distintas series quirúrgicas. Es posible que las pacientes con múltiples factores de riesgo intermedio tengan mayor riesgo que las pacientes con un sólo ganglio positivo (*Thomas et al, 1991*).

TABLA 31: Factores de riesgo tras cirugía en estadios I-II.

	Alto Riesgo	Riesgo Intermedio				
	Ganglios +	Márgenes Cx positivos o <3mm	Tamaño >4cm	Afectación endometrial	Invasión estromal >3mm	Invasión Vascular y/o linfática
Morley, 1976	Si	Si				
Delgado, 1989	Si	Si			Si	
Thomas, 1991	Si	Si		Si	Si	Si
Buckley, 1996						Si
Landoni, 1997	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Yuan, 1998	Si	Si	Si	Si	Si	No
van der Velden, 1999	Si	Si	No		No	No

La radioterapia postoperatoria se debe planificar con especial atención, ya que después de la histerectomía tanto la vejiga como el recto estarán más cerca del volumen blanco, la vascularización puede estar afectada por el tratamiento quirúrgico, y las adherencias quirúrgicas podrían producir la inmovilización de las asas del intestino delgado, que ocasionalmente pueden fijarse a la pelvis.

Recientemente se han publicado los resultados del protocolo 8797 del Southwest Oncology Group (SWOG), que demuestran un aumento significativo de la supervivencia a 3 años cuando se realiza como tratamiento adyuvante QT-RT vs RT sólo (apartado 8.6.2.2) (*Thomas et al, 1999*).

Radioterapia Preoperatoria

En algunos centros se realiza en los estadios Ib-IIa una aplicación intracavitaria preoperatoria de 50 Gy (al punto A) para aumentar la resecabilidad del tumor (*Rampone et al, 1973; Quigley et al, 1975*). La justificación para el tratamiento quirúrgico es la incapacidad para erradicar la enfermedad metastásica ganglionar mediante la irradiación. Sin embargo, en un estudio randomizado (*Pérez et al, 1987*) con 118 pacientes tratadas con RT exclusiva o con RT preoperatoria y cirugía, no se observaron diferencias en la supervivencia libre de enfermedad a 5 años.

8.4 ESTADIOS IIB, III Y IVA

Las pacientes con estadios IIB y III se tratan con radioterapia radical. Los estadios IVA (invasión rectal o vesical) se pueden tratar con radioterapia externa toda la pelvis, sobreimpresión de los parametrios y braquiterapia, o mediante exanteración pélvica (*Fletcher et al, 1971*).

Las pacientes con estadio IIB presentan una tasa de supervivencia a 5 años de 60-65%. La tasa de recidivas está en un rango entre 18-39% (*Marcial et al, 1983; Pérez et al, 1983*). Ocasionalmente se hace una histerectomía conservadora en pacientes con tumores barrel-shaped e infiltración medial, que regresan completamente tras altas dosis de RT.

Las pacientes con estadios III presentan una tasa de supervivencia a 5 años de 25-48% (*Pérez et al, 1983; Montana et al, 1986*). El porcentaje de recidivas pélvicas es del 40-50%. En el Patterns of Care Study (*Hanks et al, 1983*), la tasa de supervivencia a 5 años para los estadios III varía considerablemente según el centro donde se realice el tratamiento (60% vs 28%). Esta diferencia puede ser debida a la selección de la paciente, el nivel socioeconómico, la extensión de la enfermedad y la técnica y dosis de RT.

Las pacientes con estadios IVA presentan una tasa de supervivencia a 5 años de 18-34% tras RT, con un 75% de recidivas locales (*Million et al, 1972; Kramer et al, 1989*). La afectación parametrial es de gran importancia pronóstica, con supervivencia a 5 años del 46% frente al 5% según el grado de afectación. Se observa un alto porcentaje de complicaciones severas secundarias a RT.

8.5 MEJORA DE LOS RESULTADOS DE RADIOTERAPIA

8.5.1 Alteraciones del Fraccionamiento

Se ha realizado un estudio prospectivo randomizado (*Marcial et al, 1983*) con 301 pacientes en estadios IIB-IVA, comparando dos esquemas de RT en split-course vs RT convencional. El primer esquema consiste en administrar 25 Gy en dos semanas, un descanso de dos semanas y otros 25 Gy, con un fraccionamiento de 250 cGy/día, 5 días por semana. El esquema convencional consiste en 30 fracciones de 170 cGy/f en seis semanas hasta alcanzar 5100 cGy. En ambos casos se administraron 3000 cGy al punto A mediante

braquiterapia. El 95% de las pacientes completaron el tratamiento. No hubo diferencias en el control local ni en la supervivencia, aunque se observó una tendencia a mayor supervivencia en las pacientes tratadas en split-course. No hubo diferencia en la incidencia de complicaciones agudas y crónicas.

Los esquemas de hiperfraccionamiento (dos fracciones al día con igual duración del tratamiento) permiten administrar un 10% más de dosis, con disminución de los efectos tardíos, aunque con aumento de los efectos agudos. Con los esquemas de fraccionamiento acelerado se acorta la duración del tratamiento, permitiendo la redistribución celular pero con reparación mínima del daño subletal, por lo que las dosis totales deben disminuirse. En los dos estudios publicados la tolerancia al tratamiento fue buena, sin conseguirse un beneficio significativo en los resultados (*Wang et al, 1987; Komaki et al, 1994*).

8.5.2 Modificadores de la hipoxia y radiosensibilizadores

La respuesta a la irradiación depende de la oxigenación de los tejidos tumorales. Durante las últimas tres décadas se han probado numerosos procedimientos para intentar disminuir la hipoxia tumoral: cámaras hiperbáricas, respiración de carbógeno, transfusiones sanguíneas, eritropoyetina, modificadores de la afinidad de la hemoglobina, vasodilatadores, nicotinamida, etc. Los resultados han sido discordantes, en parte porque los estudios incluían pocos pacientes, o porque utilizaban esquemas inadecuados de irradiación. Hasta hace poco, no se ha podido valorar en clínica el grado de oxigenación tumoral, por lo que no se podía realizar una adecuada selección de pacientes, ni objetivar si se conseguía o no el perseguido aumento de oxigenación en el tumor.

A pesar de todo, un reciente meta-análisis confirma que todas estas medidas analizadas de forma conjunta, proporcionan un significativo aumento de control local, mejorando la supervivencia entre un 5% y un 8%, con independencia del nivel de oxigenación de los pacientes, que en esos años no podía ser determinado (*Overgaard, 1996*). En la tabla 32 podemos ver algunos de los estudios realizados con modificadores de respuesta, y sus resultados.

El uso de transfusiones para la corrección de la anemia es controvertido (tabla 32). *Sundfor et al (1997)* determinaron la pO_2 intratumoral en 19 pacientes con carcinoma escamoso de cérvix con estadios Ib-IVb, antes y después de transfusión sanguínea. El aumento en la concentración de Hb se relacionó con aumento en la oxigenación intratumoral en el 50% de los pacientes ($p < 0.001$), pero la distribución de los valores de pO_2 aumentó sólo en los

percentiles 50 sin cambiar en los percentiles 10, lo cual indica que la transfusión no puede reducir la fracción de células radorresistentes.

Otra forma de corregir la anemia es con eritropoyetina (EPO) (tabla 32). En un estudio in vitro, se demostró que la corrección de la anemia mediante EPO aumenta la radiosensibilidad, como resultado probablemente de un aumento del aporte de oxígeno a los tejidos tumorales (*Thews et al, 1998*).

Varios estudios randomizados han evaluado la eficacia de la utilización de oxígeno hiperbárico en distintos tumores, siendo los resultados en carcinoma de cérvix controvertidos (tabla 32). La morbilidad es significativamente mayor en aquellas pacientes tratadas con oxígeno hiperbárico (*Dische et al, 1999*).

La hipertermia ha sido propuesta también como radiosensibilizador, pero las limitaciones técnicas de su aplicación en pelvis, ha provocado la realización de pocos estudios en carcinoma de cérvix (tabla 32).

TABLA 32: Influencia de los modificadores de la hipoxia (excepto nitroimidazoles) en la respuesta a RT.

	Ptes	Estadíos	Transfusiones	EPO	O ₂ hiperbárico	Hipertermia
Bush, 1978	2803	IIb-III	Si			
Girinski, 1989	386	IIb-III	No			
Dusenbery, 1994	20	Ib-IIIb		Si		
Fletcher, 1977	233	IIb-IVa			No	
Watson, 1978	320	IIb-IVa			Si	
Brady, 1981	65	IIb-IVa			No	
Dische, 1999	327	IIb-III			No	
Hornback, 1986	79	IIIb				Si
Sharma, 1989	25	IIb-III				Si

Los nitroimidazoles son sustancias que actúan de forma similar al oxígeno, y han sido utilizados como radiosensibilizadores. La diferencia con el oxígeno es que los nitroimidazoles no se metabolizan rápidamente, por lo que pueden difundirse a través de las células alcanzando aquellas más distantes del suministro sanguíneo. Para que sean útiles es necesario que sean efectivos a concentraciones con toxicidad aceptable para los tejidos normales, y activos a las dosis utilizadas en RT fraccionada. Hasta el momento no se ha encontrado beneficio a su uso (Tabla 33), pero se continúan estudiando otras sustancias

más potentes y menos tóxicas como el etanidazole (SR2508), el pimonidazole (Ro-03-8799), y el RSU y análogos.

TABLA 33: Nitroimidazoles y respuesta a RT.

	Ptes	Fármaco	Estadíos	Respuesta	Toxicidad
Thomas (1980)	80	Metroimidazole	I-IV	No diferencia	No diferencia
Dische (1980)	10	Misonidazole	II-IV	Mejor	Neurotoxicidad
Leibel (1987)	119	Misonidazole	IIIb-IVa *	No diferencia	
Overgaard (1989)	331	Misonidazole	IIIb-IVa *	No diferencia	No diferencia

* Estudios randomizados

8.6 PAPEL DE LA QUIMIOTERAPIA

El uso de la quimioterapia (QT) en el carcinoma de cérvix ha estado limitado por distintas razones (*Tropé y Kristensen, 1997*):

- 1º Los excelentes resultados de la cirugía y de la RT en pacientes con estadíos iniciales.
- 2º Las pacientes con recidiva pélvica tras tratamiento presentan alteración de la circulación, por lo que la distribución de las drogas citotóxicas puede no ser la adecuada. Además, las células por sí mismas pueden ser resistentes después de la RT.
- 3º Las pacientes con RT previa tienen una reserva medular limitada y toleran peor tratamientos intensivos de QT, por lo que las dosis son con frecuencia subóptimas.
- 4º El carcinoma recidivado o avanzado se asocia con frecuencia a obstrucción ureteral y fallo renal. Esto hace que determinados agentes quimioterápicos no se puedan administrar debido a su nefrotoxicidad, y complica el uso de otros que se eliminan por vía renal.

A pesar de todas estas limitaciones, desde 1976 se está realizando un esfuerzo por evaluar el tratamiento citotóxico. Los resultados han definido dos situaciones en las que podría tener un papel el tratamiento quimioterápico:

- a) manejo del carcinoma avanzado o recidivado
- b) uso concomitante con RT, como radiosensibilizador

8.6.1 ENFERMEDAD AVANZADA O RECIDIVADA

De las 38 drogas citotóxicas propuestas en el carcinoma de cérvix, el cisplatino (CDDP) ha sido el más estudiado y el que mejores resultados ha obtenido, con una tasa de respuestas del 23%. Se observó ventaja en los estudios que utilizaban dosis altas, y la infusión continua en 24 horas demostró tener menos efecto emetizante que los que utilizaban infusión de 1mg/min (*Thigpen et al, 1989*).

Los agentes únicos producen respuestas en general parciales y cortas, por lo que son necesarios esquemas combinados para que tengan efecto en la supervivencia. Se han realizado numerosos estudios, pero con pocos pacientes y no randomizados.

Existen tres estudios fase II con CDDP-5FU: el estudio del Norwegian Radium Hospital-NRH (*Kaern et al, 1996*), *Rotmensch et al (1988)* y *Bonomi et al (1989)*. La tasa de RC fue similar (12%), pero si se incluían las pacientes que no completaron el tratamiento, la tasa de respuesta global fue del 49% para el primer grupo y del 22% en los otros dos. La diferencia es debida a los distintos criterios de selección de las pacientes. En el NRH sólo se incluyeron pacientes con recidiva después de seis meses de intervalo libre de enfermedad, mientras que los otros dos incluyeron tanto pacientes con enfermedad avanzada y metastásica, como aquellas con enfermedad persistente tras RT. En el estudio del NRH se estudió la importancia de la carga tumoral en el momento de la recidiva, sin observarse diferencias en la supervivencia. La localización de la recidiva fue importante, ya que la respuesta al tratamiento era mejor si la recidiva se producía fuera del área de irradiación. En este mismo estudio, fueron factores pronósticos independientes para la supervivencia, un intervalo libre de enfermedad prolongado, el estadio inicial, buen performance status y la presencia de una lesión única en el momento de la recidiva. A pesar de los distintos resultados en el control local, la supervivencia fue similar en los tres estudios.

El CDDP, sólo o en combinación, es el fármaco de elección en el tratamiento con QT para las pacientes con enfermedad avanzada o recidivada. Todavía permanece por aclarar el esquema y la dosis más adecuada. Está en marcha un estudio fase III del GOG (Gynecologic Oncology Group) comparando CDDP sólo o CDDP-Ifosfamida o CDDP-dibromodulcitol.

8.6.2 QUIMIOTERAPIA COMO RADIOSENSIBILIZANTE

La RT es el tratamiento habitual en la enfermedad localmente avanzada. Sin embargo, la tasa de fallos es elevada, y la supervivencia a 5 años para los estadios III y IVA es del 25%, sin haber cambiado desde 1950. La justificación del tratamiento combinado QT-RT sería un aumento del control local, disminución de las metástasis a distancia y un aumento de la supervivencia.

8.6.2.1 QT neoadyuvante

Las limitaciones teóricas al uso de QT neoadyuvante sería la resistencia cruzada (QT vs RT), el crecimiento acelerado del tumor, y la toxicidad del tratamiento quimioterápico que puede retrasar la RT definitiva. Existen estudios randomizados que analizan supervivencia a 3 años, sin objetivarse diferencias significativas (*Tierney et al, 1999*) en ambos brazos terapéuticos. Algunos de ellos se detallan en la Tabla 34.

TABLA 34: QT neoadyuvante en el tratamiento del carcinoma de cérvix (estudios randomizados).

	Nº Ptes	Estadio	Esquema de Tto	Supervivencia
Souhami(1991)	107	IIIb-IVa	RT vs QT-RT	Peor*
Chauvergne (1993)	151	IIb-III	RT vs QT-RT	NS
Sundfor (1996)	92	IIIb-IVa	RT vs QT-RT	NS
Kumar (1998)	184	IIb-IVa	RT vs QT-RT	NS

*p<0.02. Toxicidad severa.

8.6.2.2 QT-RT concomitante

La administración de QT concomitante con RT tiene ventajas teóricas sobre el uso de RT sólo. Ambos tratamientos pueden interactuar, incrementando la tasa de destrucción celular. Teóricamente, la QT actuaría sinérgicamente con la RT, inhibiendo la reparación del daño radioinducido y disminuyendo la fracción de células hipóxicas que son resistentes a la radiación. Aunque las dosis utilizadas en QT concomitante son inferiores a las utilizadas para tumores sólidos (dosis radiosensibilizantes), en principio serían suficientes para eliminar metástasis a distancia si estuvieran presentes (*Thomas et al, 1999*).

Basándose en estudios en animales, que demostraban un aumento de la eficacia de la RT al administrarse con hidroxurea, en 1970 el GOG inició un estudio de RT-hidroxurea vs RT-placebo en estadios IIB-IVA (*Hreshchyshyn et al, 1979*). A pesar de los problemas de planteamiento del estudio (no se había realizado estadiaje quirúrgico y la mitad de los pacientes no fueron evaluables para los resultados), se observó una ventaja en el grupo de RT-hidroxurea. En base a estos resultados, se inició un estudio randomizado por el GOG, seleccionando las pacientes con estadios IIB-IVA con ganglios paraórticos negativos (*Stehman et al, 1988*). Se hicieron dos grupos de tratamiento, RT-misonidazol vs RT-hidroxurea. Los análisis preliminares mostraron un intervalo libre de enfermedad mayor para las pacientes en el brazo de hidroxurea ($p < 0.008$), sobretodo en los estadios III-IVA, aunque sin diferencia en la supervivencia. Estos resultados apoyaron el uso de hidroxurea-RT, como grupo control en el manejo de carcinoma de cérvix localmente avanzado en estudios posteriores del GOG y otros grupos. La revisión de los estudios randomizados con QT-RT concomitante realizada por *Shingleton y Orr (1995)*, demostró que el tratamiento concomitante era eficaz en el carcinoma de cérvix pero, aunque la tasa inicial de respuestas era superior, el impacto en la supervivencia no estaba claro, especialmente en los estadios III y IV.

Por otro lado, estudios no randomizados mostraban una ventaja discreta en el uso de QT-RT postoperatoria en pacientes con estadio IB-IIA con ganglios positivos (*Hakes et al, 1987; Lai et al, 1989; Killackey et al, 1993*). Sin embargo los factores de riesgo en estos estudios eran variables, y sólo el 66-88% de las pacientes presentaban ganglios positivos. En el estudio randomizado de *Thomas et al (1994)* con 71 pacientes con estadios IB-IIA y ganglios positivos sometidas a cirugía, no se encontró ningún beneficio del tratamiento combinado frente RT sólo.

En 1999 se han publicado los resultados de cinco estudios randomizados fase III (tabla 35), que muestran una mejoría de la supervivencia y una disminución de la tasa de recidivas locales en pacientes con carcinoma de cérvix tratadas con QT-RT concomitante (*Thomas et al, 1999*).

En el estudio GOG#85 se incluyen 386 pacientes con estadios IIB-IVA, sin enfermedad ganglionar intraperitoneal ni paraaórtica documentada por exploración quirúrgica. El grupo a estudio recibe RT pélvica con 5-FU y CDDP seguida de braquiterapia, y el grupo control se trata con RT pélvica con hidroxurea y posteriormente braquiterapia. La dosis de RT es

similar en ambos brazos y varía según el estadio. Con un seguimiento de 8.4 años, la supervivencia a 3 años es del 67% en el grupo con CDDP-5FU, comparada con 57% para las pacientes con RT-hidroxiurea, siendo la diferencia estadísticamente significativa (*Whitney et al, 1999*).

En el estudio RTOG#9001 se incluyen 389 pacientes con carcinoma de cérvix en estadio IIB-IVA o estadio IB-IIA con ganglios positivos demostrados por biopsia y/o tamaño tumoral mayor de 5cm. Se compara el tratamiento con RT pélvica con 5-FU y CDDP seguido de braquiterapia, frente a RT pélvico-paraaórtica y braquiterapia. La dosis administrada a ganglios pélvicos y paraaórticos es de 4500 cGy, administrándose al punto A una dosis total de 8500 cGy. Duración media del tratamiento 58 días. El seguimiento medio fue de 43 meses, con una supervivencia a 3 años del 75% en el grupo con QT, comparada con el 63% del grupo de RT sólo (*Morris et al, 1999*).

El protocolo GOG#120 incluye 526 pacientes diagnosticadas de carcinoma de cérvix en estadios IIB-IVA, con estadiaje quirúrgico que permite descartar aquellas con enfermedad intraperitoneal y paraaórtica. Compara tres grupos. En el grupo I se administra CDDP semanal junto con RT pélvica, seguida de braquiterapia. En el grupo II se administra un ciclo de CDDP-5FU cada tres semanas, e hidroxiurea dos veces por semana durante las seis semanas de RT pélvica, seguido de braquiterapia. El grupo III recibe RT pélvica con hidroxiurea dos veces por semana y posteriormente braquiterapia. La dosis de RT y los campos de tratamiento son similares en los tres grupos y varía según el estadio. El estadio IIB recibe 4080 cGy con RT externa seguida de 4000 cGy al punto A. Los estadios III-IVA reciben 5100 cGy sobre volumen pélvico y 3000 cGy al punto A. Duración media del tratamiento 63 días. El seguimiento medio de la serie es de 34.7 meses, con una supervivencia a 3 años del 65% en los grupos I y II y del 47% en el grupo III, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (*Rose et al, 1999*).

El protocolo SWOG#8797 incluye 243 pacientes con carcinoma de cérvix en estadios IA2, IB y IIA sometidas a cirugía, con ganglios pélvicos positivos, afectación parametrial o márgenes quirúrgicos positivos. Se excluyen del estudio las pacientes con ganglios paraaórticos o ganglios ilíacos comunes afectados. Se compara un régimen con RT y CDDP-5FU frente RT pélvica. La RT es similar en ambos grupos, administrándose 4930 cGys sobre volumen pélvico, sin braquiterapia. La supervivencia a 3 años es del 87% en el grupo con QT, frente al 77% en el grupo de RT sólo, con un seguimiento medio de 43 meses, siendo la diferencia significativa (*Peters et al, in press*).

TABLA 35: Estudios Randomizados fase III con QT-RT vs RT en carcinoma epidermoide de cérvix.

Protocolo	Nº Ptes	Estadíos	Criterios de Inclusión	Tratamiento	Supervivencia 3 años
GOG # 85 (Whitney, in press)	386	IIB-IVA	No enf. Intraperitoneal y/o paraAo	RT-5FU-CDDP vs RT-hidroxiurea	67% vs 57%
RTOG # 9001 (Morris, 1999)	389	IB2-IVA	IB-IIA si T>5cm y/o gg +	RT-5FU-CDDP vs RT pelvis-paraAo	75% vs 63%
GOG # 120 (Rose, 1999)	526	IIB-IVA	No enf. Intraperitoneal y/o gg paraAo	RT-CDDP Vs RT-CDDP-5FU-hidroxiurea Vs RT-hidroxiurea	65% vs 65% vs 47%
SWOG # 8797 (Peters, in press)	243	IA2-IIA (postcirugía)	Gg +, parametrios+ y/o márgenes+ tras cirugía. Gg paraAo negativos.	RT-CDDP-5FU Vs RT	87% vs 77%
GOG # 123 (Keys, 1999)	368	IB2	Gg negativos	RT-CDDP Vs RT (HT extrafascial posterior en ambos grupos)	83% vs 74%

En el protocolo GOG#123 se seleccionan 368 pacientes con estadio IB2 y ganglios negativos, demostrados por técnicas radiológicas o quirúrgicas. En un grupo a estudio se administra RT externa con CDDP semanal seguido de braquiterapia, y en otro RT externa y braquiterapia. En ambos grupos se realiza una histerectomía extrafascial al terminar los tratamientos anteriores. La dosis de RT es similar en los dos grupos. Con un seguimiento de 35.7 meses, la supervivencia es del 83% en el grupo con CDDP y del 74% en el grupo con RT sólo, siendo la diferencia significativa (Keys *et al*, 1999).

Estos cinco estudios muestran que la QT basada en platino, administrada de forma concomitante con RT, prolonga la supervivencia en tres situaciones distintas: como tratamiento radical en el carcinoma localmente avanzado de cérvix (estadíos IIB-IVA) y estadíos I-IIA con ganglios positivos o tumores >5cm, como tratamiento adyuvante

postcirugía en los estadios I-IIA con factores de riesgo desfavorables, y como tratamiento neoadyuvante asociado a RT en los estadios IB2.

Sin embargo, estos esperanzadores resultados se deben interpretar con cautela (Thomas, 1999). En primer lugar, el beneficio observado del 10%, se ha valorado en un intervalo corto de tiempo (3 años), por lo que habrá que esperar a que transcurran 5 años para ver si se sigue manteniendo esta diferencia, ya que es el periodo en el que se producen la mayoría de las recidivas. En segundo lugar, las dosis de radiación fueron bajas en tres de los protocolos (RTOG#9001, GOG#120, SWOG#8797), y la duración del tiempo de tratamiento se prolongó más de 50 días (RTOG#9001, GOG #120), por lo que queda la duda del beneficio de la QT concomitante con un esquema óptimo de irradiación. En tercer lugar, los protocolos que incluyen pacientes con estadios avanzados, seleccionan aquellas con ganglios negativos, por lo que los resultados obtenidos no son extrapolables a todas las pacientes con estadios avanzados, ya que en un alto porcentaje presentarán afectación ganglionar metastásica (capítulo 1, apartado 3). Lo mismo ocurre en los estadios IA2-IIA postcirugía (SWOG#8797), excluyendo las pacientes con afectación de ganglios ilíacos comunes y/o paraaórticos, y en el protocolo#123 del GOG que excluye las pacientes con afectación ganglionar.

A pesar de lo anteriormente expuesto, el National Cancer Institute recomienda que se tenga en consideración la administración de QT concurrente con RT en todas aquellas pacientes con carcinoma de cérvix, que precisen tratamiento con RT. El esquema óptimo de QT todavía no ha sido definido, aunque se han obtenido resultados significativamente mejores con CDDP sólo o en combinación con 5FU o con 5FU-hidroxiurea. La toxicidad a largo plazo no está disponible, aunque no parece que vaya a tener consecuencias importantes. La toxicidad aguda varía según el esquema de QT y es menor en aquellos que utilizan un solo fármaco.

Aunque es necesario continuar con los estudios y analizar los resultados a más largo plazo, existe evidencia actualmente del beneficio del tratamiento concomitante con QT-RT en carcinoma de cérvix en grupos determinados de pacientes.

Capítulo II

Objetivos

El cáncer de cérvix sigue siendo una enfermedad frecuente, donde la extensión tumoral parece ser el principal factor pronóstico en base al cual se toman las decisiones terapéuticas, que ante la igualdad de resultados (cirugía vs radioterapia en estadios precoces), se eligen en función de los protocolos de la institución a la que el paciente acude. Por otra parte, existe un creciente cuerpo de conocimiento que parece hacernos ver un papel, en la mayoría de los casos, cada vez más relevante, para el estudio de características biológicas tumorales que podrían representar una base más sólida que la actual, para decidir el tratamiento individualizado de cada paciente.

Ante este escenario, iniciamos en 1991, un conjunto de acciones encaminadas a adquirir una experiencia propia en el campo de los tests predictivos en carcinoma de cérvix. La colaboración entre ginecólogos oncológicos, oncólogos radioterapeutas, patólogos e investigadores llevó a la definición de los siguientes objetivos:

- 1- Conocer los resultados del tratamiento del carcinoma de cérvix en nuestro medio, cuando se utiliza la irradiación como tratamiento radical exclusivo, y el valor de factores clásicos de pronóstico.
- 2- Definir el papel que un amplio panel de marcadores tumorales séricos podría tener en mejorar el valor predictivo de dichos factores clásicos.
- 3- Conocer los fenómenos de apoptosis (IA) y proliferación (IM, ki67) y la expresión de genes reguladores (p53, bax, bcl-2) en carcinoma de cérvix, su relación entre ellos y con otras características clínicas, así como su valor pronóstico.
- 4- Analizar la neoangiogénesis tumoral, su regulación mediante el factor de crecimiento endotelial (VEGF), y la oxigenación tumoral, con la intención de conocer su papel en la historia natural de esta enfermedad y su valor pronóstico.

Capítulo III

Carcinoma epidermoide localizado de cérvix tratado con radioterapia radical: factores clásicos de pronóstico y resultados terapéuticos.

CARCINOMA EPIDERMOIDE LOCALIZADO DE CERVIX TRATADO CON RADIOTERAPIA RADICAL: FACTORES CLASICOS DE PRONOSTICO Y RESULTADOS TERAPEUTICOS.

Antecedentes: El carcinoma de cérvix continúa siendo un tumor frecuente en la mujer, con un número importante de muertes debido a esta causa. La radioterapia es el tratamiento más utilizado en estos tumores. El estudio, en una serie homogénea de pacientes, de la influencia de factores clásicos de pronóstico (edad, estadio clínico, tamaño tumoral, grado histológico, afectación ganglionar) en relación con la respuesta, control local y supervivencia, nos permitirá la identificación de factores que deberían ser controlados en el diseño de futuros estudios.

Material y Métodos: Se han incluido entre diciembre-1977 y abril-1999, 204 pacientes diagnosticadas de carcinoma epidermoide de cérvix y tratadas con RT radical. Cincuenta y cuatro pacientes (26%) eran estadio Ib, 112 (55%) estadio II y 38 (19%) estadio III. El tamaño medio tumoral fue de 4.11 cm (1-9). La mayoría presentaban tumores grado II (43%) o III (45%). En 152 pacientes se evaluó la afectación ganglionar mediante TAC, que estuvo presente en 20 casos (13%). Se administraron 50 Gy sobre volumen pélvico, y posteriormente braquiterapia (30-40 Gy al punto A). En caso de afectación extensa parametrial, se administró un boost (10-16 Gy). Se analizó la relación entre las distintas variables, y su valor predictivo de respuesta a la RT, control local y supervivencia.

Resultados: El tamaño tumoral se relacionó directamente con el estadio ($p < 0.015$), y de forma inversa con la edad ($p < 0.0001$). Se observó diferencia significativa en la afectación ganglionar entre los estadios I vs II-III ($p < 0.02$). Ciento cincuenta y tres pacientes tuvieron respuesta completa (75%). El control local fue del 74%, 67% y 65% a 1, 5 y 10 años, respectivamente. Tanto la respuesta como el control local, se relacionaron estrechamente con el estadio y el tamaño tumoral, en el análisis multivariante (AM). La supervivencia causa-específica fue del 85%, 67% y 62% a 1, 5 y 10 años, respectivamente. La respuesta fue el principal factor predictivo de supervivencia en el AM, seguida del estadio.

Conclusiones: La extensión de la enfermedad (estadio clínico, tamaño tumoral) es el factor predictivo más relevante de respuesta completa, y ésta a su vez es el principal factor pronóstico de supervivencia, por su impacto en la esfera local del proceso. Sin embargo, pacientes con idéntica extensión y volumen de la enfermedad muestran evoluciones diferentes, por lo que la importancia de otras características biológicas tumorales en la respuesta a RT y en la supervivencia, será motivo de estudios posteriores.

Background: Cervix carcinoma is still a health care problem in our country. Radiation therapy is the main treatment. In this study we try to assess the role of classical prognostic factors (age, stage, tumor size, histologic grade, nodal invasion), in relation with clinical response, local control and survival. The identification of such factors would be useful for future studies.

Methods and Materials: Two hundred and four women diagnosed of localised squamous cervical carcinoma treated in our institution by radical radiotherapy, between December 1977 and April 1999, were included in this study. One hundred and four (26%) were stage Ib, 112 (55%) stage II and 38 (19%) stage III. The mean tumor diameter was 4.11 cm. Most of them were grade II (43%) and III (45%). One hundred and fifty two patients were evaluated for nodal invasion by CT scan, and 20 (13%) showed radiological positive nodes. Radiation treatment was given to the whole pelvis by four field technique up to a total dose of 50 Gy, 2Gy/fraction, and brachytherapy (30-40 Gy to point A). In case of extensive parametrial invasion, a boost of 10-16 Gy was given. The relation among those factors, and their predictive value for clinical response, local control and survival was analysed.

Results: Tumor size was related directly with clinical stage ($p < 0.015$), and inversely with age ($p < 0.0001$). A significant difference was observed in nodal infiltration between stage I versus stages II-III ($p < 0.02$). One hundred and three patients had complete response (75%). Local control to 1, 5 and 10 years was 74%, 67% and 65%, respectively. Both response and local control were close related with clinical stage and tumor size, in multivariate analysis. Disease-free survival to 1, 5 and 10 years was 85%, 67% and 65%, respectively. Response to treatment was the main predictive factor for survival in multivariate analysis, followed by clinical stage.

Conclusions: Local extent of the disease (clinical stage, tumor volume) is the most important predictive factor for response. Furthermore clinical response is the most important factor predicting survival, due to its impact in the local control of the disease. Unfortunately, patients with similar tumor size and local extent, showed different clinical outcomes. It is possible that other biological tumor characteristics would be important in predicting clinical response and survival. Such characteristics will be analysed in the following studies.

INTRODUCCION

El carcinoma invasivo de cérvix es todavía una enfermedad frecuente en nuestro medio (Lazo *et al*, 1999). El tratamiento en estadios precoces puede incluir la cirugía, la irradiación o la combinación de ambas. En estadios avanzados, la irradiación continúa siendo el tratamiento de elección.

La búsqueda de características tumorales que puedan clasificar a las pacientes en grupos de pronóstico, es una práctica clásica en Oncología. Así, entre los factores dependientes del huésped, la edad parece tener un controvertido papel pronóstico (Meanwell *et al*, 1988; Dattoli *et al*, 1989; Rutledge *et al*, 1992). Entre los factores dependientes del tumor se han estudiado el estadio, el tamaño tumoral, el grado histológico, el tipo histológico y la afectación ganglionar, entre otros. El estadio, definido según los criterios de la FIGO (International Federation of Gynecological Obstetrics), es el factor pronóstico más importante tanto para la respuesta al tratamiento, como para la supervivencia (Duk *et al*, 1990; Scambia *et al*, 1994; Gaarenstroom *et al*, 1995; Ngan *et al*, 1996). El tamaño tumoral adquiere especial importancia en el estadio I. En la última revisión de la FIGO, se ha introducido una subclasificación del estadio IB según el tamaño tumoral, debido a sus implicaciones pronósticas (Rotman *et al*, 1981; Alvarez *et al*, 1989; Finan *et al*, 1996). La FIGO no tiene en consideración el tamaño tumoral en otros estadios, aunque algunos autores han analizado su valor pronóstico (Toita *et al*, 1995; Fletcher *et al*, 1980; Eifel *et al*, 1994; Dubben *et al*, 1998). Otros factores dependientes del tumor, como el grado de diferenciación y el tipo histológico, han sido ampliamente analizados. Mientras Reagan y Fu (1979), Swan y Roddick (1973) y Randall *et al* (1988) demostraron el valor pronóstico de la diferenciación histológica en pacientes tratados con RT, otros como Goellner (1976) y Crissman *et al* (1987) no observaron ninguna correlación entre el grado de diferenciación y la supervivencia. El tipo histológico adenocarcinoma es factor de mal pronóstico para la supervivencia en estadios I-II (Landoni *et al*, 1997). Se ha comprobado que la supervivencia es menor en aquellas pacientes que presentan infiltración de los ganglios pélvicos, estudiados de forma histológica o clínica (linfografías, TAC) (Tanaka *et al*, 1994; Tinga *et al*, 1990; Delgado *et al*, 1990).

Por tanto, existen todavía controversias generalizadas sobre el papel, que factores comúnmente analizados, tienen en la predicción de resultados terapéuticos tras irradiación. En este capítulo analizamos de forma retrospectiva, los carcinomas epidermoides de cérvix

tratados mediante radioterapia (RT) radical en el Hospital Ntra Sra del Pino. La homogeneidad en cuanto al tratamiento y el tipo histológico de nuestra serie, nos permitirá reconocer de forma más evidente el valor de otros posibles factores pronósticos. Se analiza la influencia del estadio, el grado histológico, el tamaño tumoral, la afectación ganglionar y la edad en relación con la respuesta, el control local y la supervivencia. La evaluación estandarizada de estos factores, nos permitirá comparar los resultados obtenidos con los de otros centros y la identificación de factores que deberían ser controlados en el diseño de futuros estudios.

MATERIAL Y METODOS

Entre diciembre-1977 y abril-1999, 337 pacientes diagnosticadas de carcinoma infiltrante de cérvix han sido tratadas de forma conjunta por la Unidad de Oncología Ginecológica del H. Materno-Infantil y el Servicio de Oncología Radioterápica del H. Ntra Sra del Pino (Las Palmas de Gran Canaria). Se han revisado de forma retrospectiva las historias clínicas de todas las pacientes, siendo evaluadas hasta la última revisión o hasta su fallecimiento, con un seguimiento medio de las pacientes vivas de 67.8 meses (1-257). Se seleccionaron para nuestro estudio 204 pacientes que presentaban carcinoma epidermoide y que habían sido tratadas de forma radical con RT. El resto de pacientes (n=133), fueron excluidas por presentar histología no epidermoide (n=36), haber sido tratadas mediante cirugía con/sin RT (n=69), o haber recibido tratamiento paliativo debido al deterioro físico o a la progresión de la enfermedad durante el tratamiento (n=39).

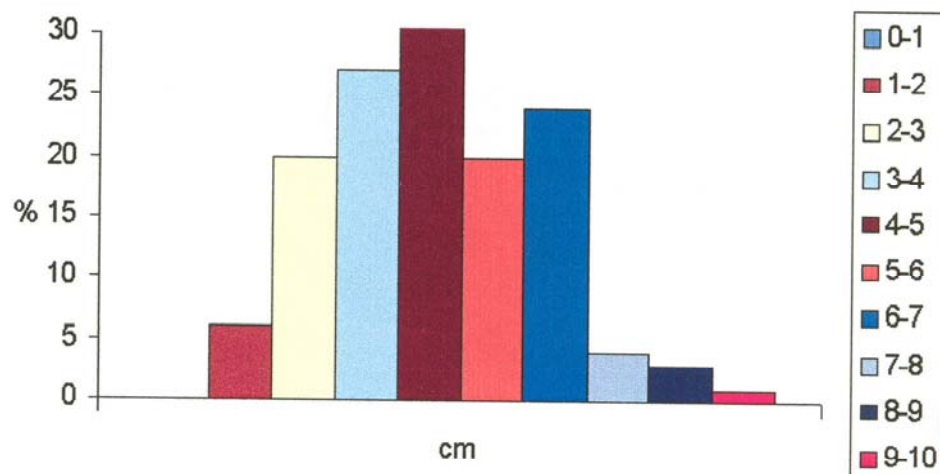
La evaluación pretratamiento en todas las pacientes consistió en historia clínica, exploración física general y ginecológica (especuloscopia, tacto vaginal y rectal), hemograma, bioquímica renal y hepática, y Rx de tórax. Se realizó TAC abdomino-pélvico con contraste para evaluar la extensión local y a órganos vecinos, utilizando desde 1977 cortes de 10 mm, y desde mayo-1995 cortes de 5mm, lo que permitía una mejor evaluación de los ganglios. La cistoscopia y rectoscopia se realiza en caso de sospecha de afectación vesical o rectal. El tamaño tumoral se midió mediante examen pélvico bimanual. En todos los casos se obtuvo confirmación histológica por biopsia. Las pacientes se estadiaron clínicamente según la clasificación de la FIGO vigente.

Las características de la serie se resumen en la tabla 1. La edad media de las pacientes es de 54.17 años (25-84). De las 204 pacientes, 54 presentan estadio Ib (26%), 112 estadio Ila-IIb (55%) y 38 estadio IIIa-IIIb (19%). El tamaño medio tumoral, se recogió en 151 pacientes, con una media de 4.11 cm y una mediana de 4 cm (histograma 1). La mayoría tienen tumores moderada (43%) o pobremente diferenciados (45%). En 152 pacientes se pudo evaluar la afectación ganglionar pélvica mediante TAC, que estuvo presente en 20 casos (13%).

TABLA 1: Características de la serie (n=204).

	N Casos (%)
Estadio	
IB	54 (26%)
II	112 (55%)
IIA	39 (19%)
IIB	73 (36%)
III	38 (19%)
IIIA	6 (3%)
IIIB	32 (16%)
Grado Histológico (n=186)	
I	22 (12%)
II	80 (43%)
III	84 (45%)
Ganglios (n=155)	
Negativos	134 (87%)
Positivos	21 (13%)
Tamaño Tumoral (cm) (n=156)	4.11 ± 1.60, rango 1-9, IC 95% 3.56-4.37, mediana 4 cm
Edad (años) (n=199)	54.17 ± 12.72, rango 25-84, IC 95% 52.39- 55.95, mediana 53 a

Histograma 1: Distribución del tamaño tumoral en nuestra serie. Los mayores porcentajes corresponden a los intervalos entre 3 y 7 cm.



Técnica de Tratamiento. Todas las pacientes se trataron mediante irradiación externa y braquiterapia intracavitaria. La irradiación externa se realizó utilizando 4 campos, según técnica en caja (dos campos AP-PA y dos campos laterales y opuestos). En los campos AP-PA el límite superior del campo se situó entre L5-S1, y el límite inferior en el borde inferior de la rama isquiopubiana. El límite inferior se confirmaba mediante la colocación de una sonda vaginal con extremo radiopaco. Los límites laterales se extendían 1-2 cm por fuera del marco óseo de la pelvis menor. En los campos laterales, los límites inferior y superior fueron iguales a los de los campos AP-PA, el límite anterior 1 cm por detrás del borde anterior de la rama pubiana, y el límite posterior englobando la cara anterior rectal. Se utilizó técnica isocéntrica, con un fraccionamiento de 1.8-2Gy/día. La dosis total administrada fue de 50-50.4 Gy. En las pacientes con afectación parametrial mayor del 1/3 proximal se administró un boost de 10-16 Gy, después o entre las aplicaciones de braquiterapia.

La braquiterapia intracavitaria se realizó en distintos centros, ya que no se disponía de dicha técnica en nuestro Servicio. Se utilizó braquiterapia de baja tasa de dosis (Cs-137) administrándose una dosis al punto A entre 30-40 Gy, dependiendo si se administraba en una o dos aplicaciones.

El seguimiento de las pacientes se realizó por la Unidad de Ginecología Oncológica del H. Materno-Infantil y el Servicio de Oncología Radioterápica del H. Ntra. Sra. del Pino (Las Palmas de Gran Canaria), llevándose a cabo cada 4 meses los dos primeros años y cada 6 meses en los tres años siguientes, pasando posteriormente a un control anual. La revisión

consiste en exploración física general y ginecológica con citología, hemograma, bioquímica y marcadores. En caso de sospecha se realiza biopsia y/o TAC abdomino-pélvico. Los datos de seguimiento se obtuvieron de las historias clínicas de las pacientes.

Análisis Estadístico. Se considera Respuesta aquellas pacientes que tras finalizar el tratamiento no presentan evidencia clínica y/o radiológica de enfermedad. Para el control local (C.L) se considera fallo, todas aquellas pacientes que no han respondido al tratamiento o que presentan recidiva local de la enfermedad después de haber realizado el tratamiento. Se contabiliza el tiempo de control local desde el final del tratamiento radioterápico hasta la recidiva o la última revisión. Para la supervivencia causa-específica se considera como fallo, todas aquellas pacientes que han fallecido por el tumor. Se contabiliza el tiempo desde el final de la RT hasta el fallecimiento, la última revisión o muerte de la paciente por otra causa. Para el análisis estadístico se utilizó el software SOLO. La comparación de variables continuas se realiza mediante la correlación de Pearson en caso de distribución normal, y el test de Spearman en caso de distribución no normal. La comparación entre una variable continua y una discreta se realiza mediante el test de Kruskal-Wallis (Anova test). Las variables discretas se comparan con el método de chi-cuadrado. Para el análisis multivariante de las variables dependientes se utilizó el test de regresión múltiple. Las curvas de control local y de supervivencia causa-específica se hicieron según el método de Kaplan-Meier. Se utilizó la mediana como punto de corte para convertir en discretas las variables continuas. Se empleó el log-rank test para el análisis univariante y el método de Cox para el análisis multivariante de supervivencia.

RESULTADOS

En las 204 pacientes fueron analizadas las siguientes variables: edad, estadio clínico, tamaño tumoral, grado histológico y afectación ganglionar al diagnóstico. La variable estadio se analizó como estadios I, II y III, y teniendo en cuenta los subestadios (IB, IIA, IIB, IIIA y IIIB). Los resultados de los análisis realizados con ambas clasificaciones, fueron similares en cuanto significación pronóstica, por lo que únicamente nos referiremos a estadio global. Se observó la existencia de una correlación inversa entre la edad y el tamaño tumoral, de manera que las pacientes más jóvenes tenían tumores de mayor tamaño ($p < 0.015$, $r = -0.20$).

El estadio clínico y el tamaño tumoral se correlacionaron de forma muy estrecha ($p < 0.0001$). La presencia de ganglios positivos presentaba una tendencia a relacionarse con el estadio ($p = 0.15$), siendo esta diferencia significativa cuando se comparaba el estadio I frente los estadios II-III ($p < 0.02$) (Tabla 2).

TABLA 2: Relación entre las distintas variables analizadas.

	Edad	Estadio	Grado	Tamaño	Ganglios
Edad	-----	$p = 0.92$	$p = 0.28$	$P < 0.015$ ($r = -0.20$)	0.45
Estadio	-----	-----	$p = 0.17$	$P < 0.0001$	0.02#
Grado	-----	-----	-----	$p = 0.20$	0.88
Tamaño	-----	-----	-----	-----	0.15

#Estadio I vs II-III

Ciento cincuenta y tres de las 204 pacientes obtuvieron remisión completa (RC) tras finalizar el protocolo de irradiación (75%). La probabilidad de obtener remisión completa de la enfermedad, estuvo relacionada con estadios precoces ($p < 0.00001$) y tumores de pequeño tamaño ($p < 0.0001$) en el análisis univariante. En la tabla 3 podemos ver la distribución de pacientes en RC según el estadio, el tamaño tumoral partido por la mediana, y la afectación ganglionar. En el análisis multivariante, sólo el estadio clínico se mostró como variable independiente ($p < 0.0008$) para la predicción de la respuesta clínica completa.

TABLA 3: Relación de la edad, estadio, grado histológico, tamaño tumoral y afectación ganglionar con la respuesta a RT.

	RC	Valor de p
Edad		P=0.58
≤53	76 (77.5%)	
>53	75 (74%)	
Estadio		P<0.00001
I	51 (95%)	
II	87 (78%)	
III	15 (40%)	
Grado Histológico		P=0.25
I	18 (72%)	
II	63 (78.7%)	
III	58 (69%)	
Tamaño		P<0.0001
< 4cm	52 (92.8%)	
≥ 4cm	63 (63%)	
Ganglios		P=0.14
Negativos	102 (76.5%)	
Positivos	12 (65%)	

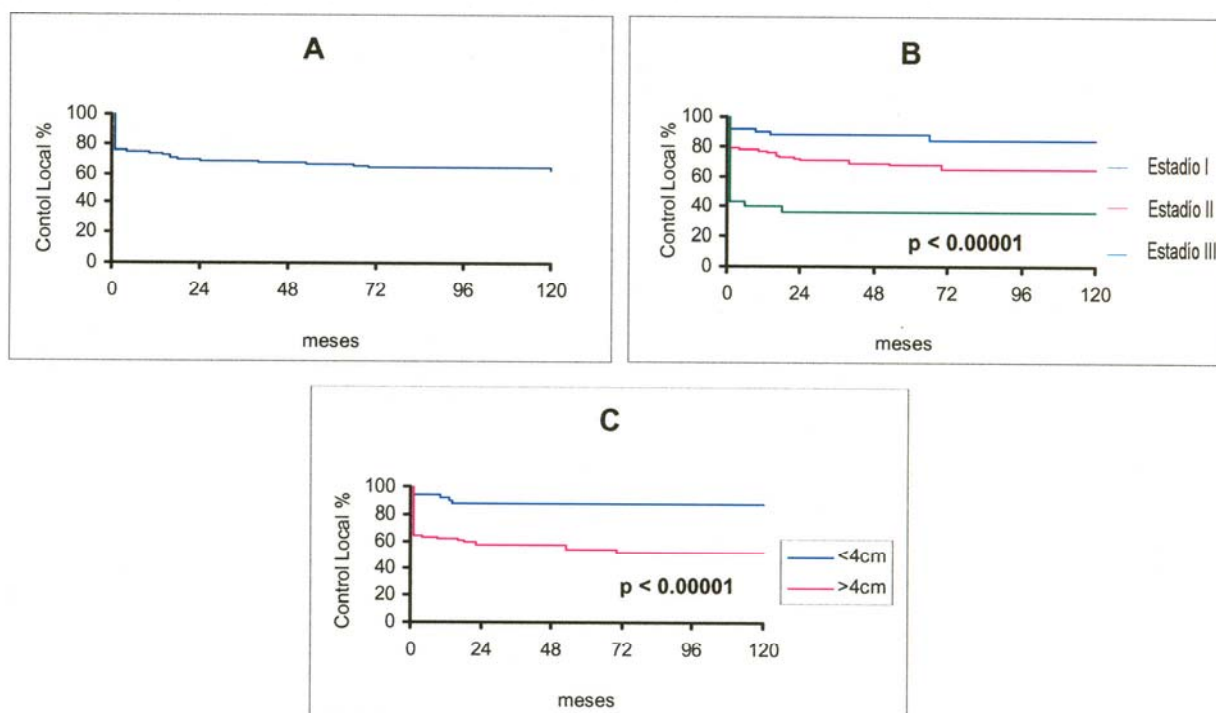
De las 153 pacientes que obtuvieron remisión completa inmediata, 15 (10.6%) recayeron dentro del campo de irradiación pélvico: 11 presentaron recidiva local, 1 recidiva local y ganglionar, y 3 recidiva ganglionar. Una de estas pacientes desarrolló de forma simultánea metástasis ganglionares paraaórticas y cervicales, y otra paciente presentó metástasis pulmonares al año de la recidiva local. La probabilidad de control local se ha estimado considerando como fallo de control local, las 51 pacientes sin respuesta inicial, más las 15 enfermas con recidiva locorregional posterior. Así, la tasa de control local para toda la serie fue del 74%, 67% y 65% a 1, 5 y 10 años (figuras 1 A-C). Sólo el estadio clínico ($p<0.00001$) y el tamaño tumoral ($p<0.00001$) estuvieron relacionados en el análisis univariante con el control local (tabla 4). En el análisis multivariante el estadio clínico ($p<0.032$, $r=0.57\pm0.27$) junto con el tamaño tumoral ($p<0.033$, $r=0.22\pm0.10$) mantuvieron la significación estadística.

control local (tabla 4). En el análisis multivariante el estadio clínico ($p < 0.032$, $r = 0.57 \pm 0.27$) junto con el tamaño tumoral ($p < 0.033$, $r = 0.22 \pm 0.10$) mantuvieron la significación estadística.

TABLA 4: Factores predictivos de control local y supervivencia (A.U).

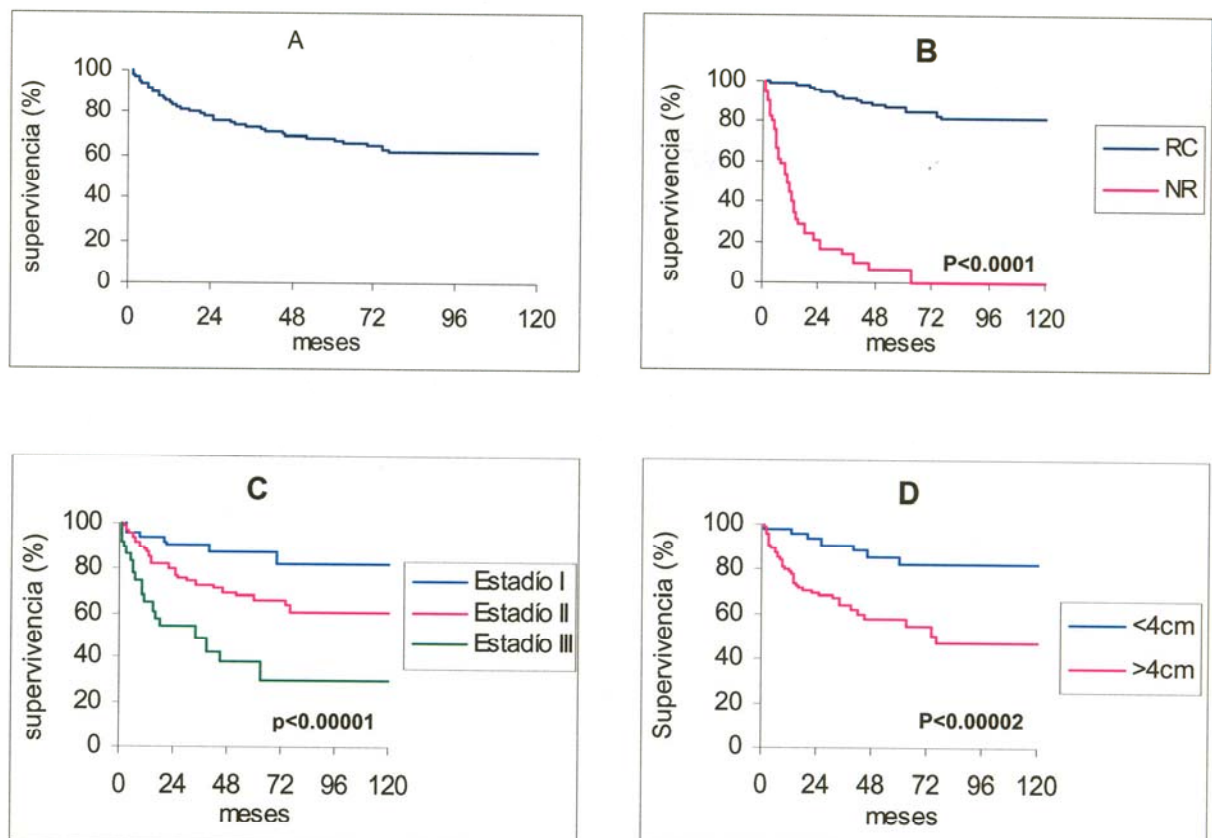
	Control Local Valor de p	Supervivencia Valor de p
Edad	NS	NS
Estadio	0.00001	0.00001
Grado	NS	NS
Tamaño	0.00001	0.0002
Ganglios	NS	NS
Respuesta		0.00001

Figura 1. A: Control local global de la serie. B: Control local según estadios. C: Control local según volumen.



La supervivencia causa-específica fue del 85%, 67% y 62% a 1, 5 y 10 años (figuras 2 A-D). De nuevo, el estadio clínico ($p<0.00001$) y el tamaño tumoral ($p<0.0002$) estuvieron relacionados en el análisis univariante con la probabilidad de supervivencia, observándose una tendencia a menor supervivencia en las pacientes con presencia de ganglios positivos ($p<0.13$) (tabla 3). La respuesta inmediata a la irradiación fue también un importante factor pronóstico ($p<0.00001$), falleciendo todos los pacientes que no obtuvieron respuesta completa con la irradiación. En el análisis multivariante, la variable más significativa fue la respuesta a la irradiación ($p<0.0001$, $r=3.02\pm0.39$). Cuando eliminamos esta variable del análisis, el único factor pronóstico de supervivencia es el estadio ($p<0.0003$, $r=0.96\pm0.26$).

Figuras 2. A: Supervivencia global. B: Supervivencia según respuesta a RT. C: Supervivencia según estadios. D: Supervivencia según tamaño tumoral.



DISCUSION

El carcinoma infiltrante de cérvix continúa siendo una enfermedad frecuente en nuestro medio. La irradiación es todavía el tratamiento de elección, asociado o no a otras armas terapéuticas. Por otra parte, el 80% de los tumores de cérvix son de tipo epidermoide. Por este motivo es por lo que hemos centrado nuestro estudio en este grupo de pacientes, lo que nos permitió el análisis de factores clásicos de pronóstico en una serie homogénea de casos.

En primer lugar, hemos podido observar una relación directa entre el tamaño del tumor y la extensión local (estadío clínico), así como con la afectación ganglionar estimada mediante TAC, fundamentalmente entre los estadios II-III. Este hecho, descrito de forma aislada por varios autores (*Landoni et al, 1995; Ogino et al, 1997*), alcanza una claridad muy significativa en nuestro estudio. Además, las mujeres de mayor edad portan tumores de menor tamaño, coincidiendo con otras publicaciones (*Prempee et al, 1983; Dattoli et al, 1989*), lo que podría influir en las tasas de control obtenidas. Las razones de carácter biológico que puedan explicar este hecho serán estudiadas en próximos análisis. Finalmente, el grado histológico no se ha relacionado con ninguno de los factores pronósticos estudiados (edad, estadío, tamaño, afectación ganglionar).

En cuanto a la influencia que estos factores pronósticos han tenido en los resultados terapéuticos tras irradiación radical, ésta ha sido muy relevante para la masa tumoral estimada mediante el tamaño tumoral y el estadío clínico. La mayor probabilidad de existencia de clones resistentes, hipoxia o alteraciones de la proliferación, reducen el control inducido por la radiación en estos tumores. La edad, la afectación ganglionar y el grado histológico no influyeron directamente en el control de estas pacientes.

La supervivencia causa-específica vino definida fundamentalmente por la respuesta tumoral obtenida tras irradiación, como no podía ser de otra forma en un tumor como el carcinoma epidermoide de cérvix, de crecimiento local y regional. Las pacientes que no obtuvieron remisión completa tras irradiación, fallecieron. Junto a un factor de carácter puramente local como la respuesta a irradiación, el estadío clínico y la presencia de adenopatías parecen ser útiles en predecir aquellos casos, que junto con grandes posibilidades de recidiva local, podían fallecer por diseminación de la enfermedad fuera del campo de irradiación. En nuestra serie hemos observado esa débil tendencia a peor supervivencia, en pacientes con

diseminación ganglionar estudiada mediante TAC, confirmando los estudios de *Ogino et al (1997)*.

Concluimos, que la extensión de la enfermedad, estimada mediante el estadio clínico y el tamaño tumoral, permanece como el principal factor predictivo en la obtención de remisión completa, y que ésta es a su vez el principal factor pronóstico de supervivencia, por su impacto en la esfera local del proceso. Sin embargo, la influencia que la enfermedad subclínica, fuera del campo de irradiación, tiene en la supervivencia, debe ser tomada en cuenta.

De cualquier forma, otras características biológicas de los tumores deben ser importantes en la predicción del resultado clínico tras tratamiento con radioterapia, ya que pacientes con idéntica extensión y volumen de enfermedad, muestran variaciones ostensibles en la obtención de remisión de la enfermedad, o supervivencia.

Capítulo IV

Determinación de SCC, Ca125, CEA, β -HCG, Ca15.3 y Ca19.9 en el carcinoma epidermoide de cérvix tratado con radioterapia radical. Relación con factores clásicos de pronóstico, control local y supervivencia.

DETERMINACION DE SCC, CA125, CEA, B-HCG, CA15.3 Y CA19.9 EN EL CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CERVIX TRATADO CON RADIOTERAPIA RADICAL. RELACIÓN CON FACTORES CLÁSICOS DE PRONÓSTICO, CONTROL LOCAL Y SUPERVIVENCIA.

Antecedentes: El estadio es el principal factor pronóstico en el carcinoma epidermoide de cérvix. Sin embargo, tumores con igual tamaño y extensión, presentan evoluciones distintas. El antígeno de células escamosas (SCC-Ag) es un marcador de reconocida utilidad en tumores epidermoides. Otros marcadores, como Ca 125, CEA, β -HCG, Ca 19.9 y Ca 15.3, han mostrado su valor en distintas estirpes histológicas. La determinación de estos marcadores séricos en una serie homogénea de pacientes, nos podría ayudar a la identificación de pacientes de bajo y de alto riesgo, lo que nos permitiría adecuar los tratamientos.

Material y métodos: Hemos incluido en este estudio 106 pacientes con diagnóstico de carcinoma epidermoide de cérvix, estadios Ib-IIIb, tratadas de forma radical con radioterapia (RT). Se realizó la determinación de una serie de marcadores séricos pretratamiento (SCC-Ag, Ca 125, CEA, β -HCG, Ca 19.9 y Ca 15.3), y del SCC-Ag post-tratamiento. Se estudió su relación con factores clínico-patológicos, así como su valor predictivo de respuesta, control local y supervivencia.

Resultados: El SCC-Ag pretratamiento se relacionó de forma estrecha con la extensión de la enfermedad (estadio, tamaño tumoral), sin observarse relación de ninguno de los demás marcadores con los factores clínico-patológicos estudiados. Setenta y seis pacientes obtuvieron remisión completa (71%). La posibilidad de respuesta clínica del tumor se relacionó con niveles bajos de Ca 125 ($p < 0.001$) y de forma directa con el SCC-Ag post-tratamiento ($p < 0.0002$). Este último, junto con Ca 125 y β -HCG, fueron predictivos en el análisis univariante (A.U) para el control local, sumándose a estos marcadores, el SCC-Ag pretratamiento y el Ca 19.9, como factores pronósticos de supervivencia. En el análisis multivariante, tanto del control local como de la supervivencia, el Ca 125 resultó ser la única variable pronóstica independiente ($p < 0.01$ y $p < 0.0043$, respectivamente).

Conclusión: Los niveles séricos de SCC-Ag se relacionan bien con la extensión tumoral, siendo útil en la definición de la extensión del tratamiento. Los niveles de Ca 125, que parecen responder a características biológicas propias del tumor, han sido más relevantes que el propio estadio en la predicción de los resultados clínicos. La intensificación de los protocolos terapéuticos en estos casos, podría ser prioritaria.

Background: Clinical stage is the main prognostic factor in squamous cervical carcinoma. Nevertheless, tumors with similar size and local extent, showed different evolution. The squamous cell antigen (SCC-Ag) is recognised as a useful marker in epidermoid tumors. Other markers, as Ca 125, CEA, β -HCG, Ca 19.9 and Ca 15.3, have shown their value in several histologic types tumors. The assessment of these tumoral markers in an homogeneous series of patients could help to identify low and high risk patients, who could be offered a more adequate treatment.

Methods and Material: One hundred and six patients diagnosed of localised squamous cervical carcinoma, stages Ib-IIIb, treated in our institution by radical radiotherapy, were included in this study. The pre-treatment assessment of SCC-Ag, Ca 125, CEA, β -HCG, Ca 19.9 and Ca 15 were carried out, and also SCC-Ag post-treatment. All of them were analysed in relation to clinical-pathological tumor characteristics, and as prognostic factors for clinical outcome, local control and survival.

Results: Pre-treatment SCC-Ag was strongly related to disease extension (clinical stage, tumor size), without relation between the other markers and the clinical-pathological tumor factors studied. Sixty six patients had complete response (71%). Clinical response was related to low levels of Ca 125 ($p < 0.001$) and post-treatment SCC-Ag ($p < 0.0002$). The last one, with Ca 125 and β -HCG, were significant predictive factors for local control in the univariate analysis. Added to these markers, pre-treatment SCC-Ag, CEA and Ca 19.9, as predictive factors for survival. In the multivariate analysis, Ca 125 was the only independent predictive factor for local control ($p < 0.01$) and for survival ($p < 0.0043$).

Conclusion: SCC-Ag serum levels are well related to local extent of the disease, and useful in the definition of treatment extent. Ca 125 serum levels, which seems to be related to biological tumor characteristics, has been more significant than clinical stage in predicting clinical outcomes. In these cases, the intensification of therapeutics protocols could be priority.

INTRODUCCION

El carcinoma de cérvix sigue siendo un tumor frecuente en nuestro medio (Lazo, 1999), siendo el estadio el factor pronóstico más importante. Sin embargo, pacientes con igual estadio y volumen tumoral pueden tener una evolución diferente. Es evidente, que con independencia del tratamiento que reciban las pacientes, el resultado final obedece a una serie de características biológicas propias de cada tumor.

Se define marcador tumoral, como aquella sustancia producida por las células neoplásicas o inducidas por el organismo del huésped, ante la presencia de un tumor maligno. La medida de su concentración en suero u otros líquidos biológicos, o la detección de su presencia en los tejidos, reflejan el crecimiento o la actividad del tumor, y podrían ser útiles para predecir el pronóstico, realizar el seguimiento o comprobar la eficacia del tratamiento.

El antígeno del carcinoma de células escamosas (SCC-Ag) es un marcador tumoral ampliamente estudiado en tumores (capítulo 1). Su sensibilidad varía entre 44-75%, dependiendo del valor de referencia elegido y del número de pacientes con enfermedad avanzada en la serie (Sproston *et al*, 1995; Bae *et al*, 1997). SCC-Ag se ha relacionado directamente con el estadio (Senikjian *et al*, 1987; Ngan *et al*, 1990). Su relación con el tipo histológico, el grado de diferenciación, el tamaño tumoral y la afectación ganglionar, es controvertida (Sproston *et al*, 1995; Ngan *et al*, 1996; Bolger *et al*, 1997). Varios estudios han sugerido una buena relación entre los valores seriados de SCC y el status tumoral (Bolli *et al*, 1994; Sproston *et al*, 1995; Hong *et al*, 1997). La modificación de estos valores parece ser un indicador fiable de respuesta, progresión o recidiva, independientemente del tratamiento realizado (cirugía y/o radioterapia).

Ca 125 es una glicoproteína de alto peso molecular, utilizada principalmente en el seguimiento del carcinoma de ovario. La sensibilidad diagnóstica en el carcinoma de cérvix es del 23% (Gadducci *et al*, 1990; Avall-Lundqvist *et al*, 1992). La mayor expresión de este marcador se ha relacionado con estadios avanzados (Sproston *et al*, 1995), tumores indiferenciados (Leminem *et al*, 1990), y peor control local tras irradiación (Sproston *et al*, 1995). No existen estudios de este marcador en series sólo con tumores epidermoides tratados con RT radical.

El antígeno carcinoembrionario (CEA) es una glicoproteína de alto peso molecular. Su sensibilidad diagnóstica en el carcinoma de cérvix varía entre el 15 y 50%, dependiendo del valor de referencia elegido. El valor de CEA está en relación directa

con el estadio (Hiura et al, 1990; Lam et al, 1992; Borrás et al, 1995), y se modifica con el curso clínico de la enfermedad (Leminem et al, 1990; Borrás et al, 1995).

El fragmento β -core es una parte de la subunidad beta de la gonadotropina coriónica humana (HCG). Su sensibilidad diagnóstica en carcinoma de cérvix es del 36-43%. Si bien la expresión en orina (β -core) es útil como marcador en el carcinoma de cérvix (Nam et al, 1990; Kinugasa et al, 1992; Cole et al, 1996), existe poca experiencia con β -HCG sérica (Norman et al, 1990; Chen et al, 1994).

Otros marcadores como Ca 19.9 y Ca 15.3, que han demostrado su valor predictivo en otros tumores (neoplasias digestivas, ovario, mama), han sido poco estudiados en el carcinoma invasivo de cérvix (Fujii et al, 1988; Borrás et al, 1995).

En la mayoría de las series publicadas, el valor predictivo de los marcadores tumorales se evalúa en pacientes con distintas histologías, y el tratamiento incluye cirugía y radioterapia como tratamiento exclusivo o combinado. En el presente estudio, se seleccionaron sólo pacientes con histología de carcinoma epidermoide tratados de forma radical con RT. Nuestros objetivos son el análisis de la sensibilidad al diagnóstico de un amplio grupo de marcadores tumorales séricos (SCC-Ag, Ca 125, CEA, β -HCG, Ca 19.9 y Ca 15.3), su relación con factores clásicos de pronóstico, y su capacidad predictiva de respuesta, control local y supervivencia.

MATERIAL Y METODOS

Pacientes

Entre enero-1992 y abril-1999 se llevó a cabo un estudio prospectivo para determinar el valor de SCC-Ag, Ca 125, CEA, β -HCG, Ca 19.9 y Ca 15.3 en el carcinoma epidermoide de cérvix localizado tratado con RT radical. Ciento seis pacientes fueron incluidas en el estudio, con un seguimiento medio en las pacientes vivas de 35.7 meses (1-257). Las pacientes se clasificaron según los criterios de la FIGO. La valoración se hizo mediante exploración física, incluyendo especuloscopia y palpación bimanual, TAC abdomino-pélvico y Rx de tórax; obteniendo confirmación histológica en todos los casos mediante biopsia. En los casos en que existía sospecha se realizó rectoscopia y cistoscopia (capítulo 1). La estimación del tamaño tumoral se realizó mediante examen pélvico bimanual.

Las características de la serie se encuentran en la tabla 1. La edad media del grupo fue 54.41 años, presentando la mayoría de las pacientes estadio IB-IIA, y grado histológico de diferenciación II-III. El tamaño tumoral medio fue 4.27 cm. Todas las

pacientes se trataron de forma radical con RT. Recibieron 50-50.4 Gy sobre volumen pélvico con un fraccionamiento de 1.8-2 Gy/d, utilizando cuatro campos según técnica en caja. Posteriormente se realizó braquiterapia intracavitaria, administrando 30-40 Gy sobre punto A en una o dos aplicaciones. En los casos con afectación parametrial mayor del 1/3 proximal se realizó un boost durante o después de la braquiterapia, administrándose 10-16 Gy según criterio clínico.

TABLA 1: Características de la serie (n=106).

	Nº Casos (%)
Estadio	
IB	33 (31)
II	49 (46)
IIA	19 (18)
IIB	30 (28)
III	24 (23)
IIIA	4 (4)
IIIB	20 (19)
Grado Histológico	
I	14 (13)
II	46 (44)
III	45 (43)
Desconocidas	1
Tamaño Tumoral (cm)	4.27 ± 1.61 (rango 1-8); IC 95% 3.94-4.59; mediana 4
Edad (años)	54.41 ± 12.21 (rango 26-78); IC 95% 52.05-56.78; mediana 53
Respuesta	
RC	76 (71)
NR/Progresión	30 (29)

RC: respuesta completa. NR: no respuesta.

Marcadores

Todos los marcadores se determinaron mediante la técnica de enzoinmunoensayo de micropartículas (MEIA) específica para cada uno de ellos (SCC-Ag, Ca 125, CEA, Ca 19.9, Ca 15.3 y β -HCG de ABBOT AXSYM System). Se emplearon 150 microlitros de suero para cada determinación. Se utilizó como control, suero de referencia. El SCC-Ag se determinó en todas las pacientes al diagnóstico y después de concluido el tratamiento radical. El resto de marcadores comenzaron a estudiarse con posterioridad, por lo que el número de pacientes incluidos en el estudio es menor, y también se realizó antes del inicio del tratamiento. El rango de normalidad quedó establecido en los niveles de referencia del laboratorio (tabla 2).

El protocolo de seguimiento incluía historia clínica, exploración física y citología con determinación de marcadores, cada 4 meses los dos primeros años, cada 6 meses del

tercero al quinto año, y después anualmente. También se determinaban en aquellas pacientes con sospecha de recidiva, antes y después del tratamiento de rescate.

Estadística

Para el análisis estadístico se utilizó el software SOLO. La comparación de variables continuas se realiza con la correlación de Pearson, si siguen una distribución normal, y con la correlación de Spearman, si no siguen una distribución normal. La comparación entre una variable continua y una discreta se hace con el test de Kruskal-Wallis (ANOVA test). Las variables discretas se comparan usando el método de chi-cuadrado. Para el análisis multivariante de las variables dependientes se utilizó el test de regresión múltiple. Las curvas de control local y de supervivencia causa-específica se hicieron según el método de Kaplan-Meier. Se utilizó el log-rank test para el análisis univariante y el método de Cox para el análisis multivariante de supervivencia. Los puntos de corte utilizados son los de referencia de nuestro laboratorio.

RESULTADOS

Se realizó determinación de SCC-Ag en las 106 pacientes al inicio del tratamiento. El estudio del resto de los marcadores se inició posteriormente en nuestro Centro, por lo que el número de determinaciones tiene que ser obligatoriamente inferior. El valor medio de SCC-Ag fue 7.61 ± 16.85 ng/ml (rango 0.2-118). El SCC-Ag estaba elevado (valor >1.5 ng/ml) en 73 pacientes, lo que representa una sensibilidad del 69%. El valor medio de Ca 125 fue 45.05 ± 191.1 U/ml (rango 1.77-1600), presentando 12 pacientes valores por encima del valor de referencia (>35 U/ml), lo que representa una baja sensibilidad (17%). Las características de todos los marcadores se detallan en la tabla 2.

TABLA 2: Descripción de los Marcadores.

	Nº ptes	Valor Referencia	Media $\pm$ DS	IC 95%	Rango	Mediana	Sensib. (%)
SCC-Ag	106	0-1.5	7.61 ± 16.85	4.36-10.86	0.2-118	2.6	73(69)
Ca 125	70	0-35	45.05 ± 191.1	-0.5-90.6	1.77-1600	11.3	12(17)
β-HCG	59	0-5	1.92 ± 3.88	0.91-2.93	0-26	0.56	7(12)
CEA	70	0-3	7.32 ± 30.99	-0.31-16.4	0-257	2	23(33)
Ca 15.3	64	0-28	17.51 ± 8.01	15.5-19.5	4.9-39	17.15	6(9.4)
Ca 19.9	68	0-37	18.91 ± 52.23	6.25-31.57	0-423.5	6.59	9(13.2)

Cuando se relacionan los valores de cada marcador con los distintos factores pronósticos (estadío, tamaño tumoral, grado histológico, edad y respuesta) (tabla 3), se observa una estrecha relación entre el valor de SCC-Ag y la extensión de la enfermedad ($p<0.009$), el tamaño tumoral ($p<0.06$, $r=0.18$), así como un incremento de los valores del marcador en pacientes de mayor edad ($p<0.03$, $r=0.21$). En el resto de los marcadores no se alcanza la significación estadística. Existe una tendencia a relacionarse β -HCG con la edad ($p<0.08$, $r=0.23$), y con el estadío ($p<0.086$). Al analizar la influencia de los marcadores tumorales en la respuesta, sólo el Ca 15.3 se relacionó de forma significativa con la obtención de respuesta a RT ($p<0.01$), mostrando el Ca 125 una tendencia ($p<0.07$). Si se transforman los marcadores en variables discretas (tomando como punto de corte el valor de referencia), el Ca 15.3 pierde significación, mientras el Ca 125 presenta una estrecha relación con la respuesta ($p<0.001$) (tabla 4).

TABLA 3: Relación de los marcadores con las distintas variables analizadas y la respuesta en el análisis univariante (valor de p).

	Grado	Estadío	Tamaño T	Ganglios	Edad	Respuesta
SCC-Ag	NS	0.009	0.06 ($r=0.18$)	NS	0.03 ($r=0.21$)	NS
Ca 125	NS	NS	NS	NS	NS	0.07
B-HCG	NS	0.086	NS	NS	0.08	NS
CEA	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ca 15.3	NS	NS	NS	NS	NS	0.01
Ca 19.9	NS	NS	NS	NS	NS	NS

TABLA 4: Relación de marcadores y respuesta (punto de corte: valor de referencia máximo del laboratorio).

Marcador	Respuesta (valor p)
SCC-Ag	0.12
Ca 125	0.001
Ca 15.3	0.74
Ca 19.9	0.45
β-HCG	0.11
CEA	0.65

En el análisis de regresión múltiple se incluyó el estadío clínico, grado histológico, tamaño tumoral, edad, SCC-Ag, Ca 125, B-HCG y Ca 15.3, observándose que ninguna de estas variables se relaciona de forma independiente con la respuesta.

De las 106 pacientes tratadas, 76 obtuvieron respuesta completa (71%). Se determinó el SCC-Ag post-tratamiento en 89 pacientes. El valor medio fue de 3.56 ± 16.17 ng/ml (rango 0-150 ng/ml), con una mediana de 0.9 ng/ml, encontrándose elevado en 22 pacientes. Cincuenta y nueve de las 70 pacientes con respuesta completa mostraron valores normales de SCC-Ag post-tratamiento ($p < 0.0002$). De las 22 pacientes con SCC-Ag post-tratamiento elevado, 11 habían conseguido respuesta completa, y en 11 no hubo respuesta o la enfermedad progresó (tabla 5).

TABLA 5: Relación de SCC-Ag post-tratamiento y Respuesta Clínica.

SCC-Ag post-tratamiento				
	Alto	Bajo		
Remisión Completa	11	59	70	P<0.0002
No Respuesta	11	8	19	

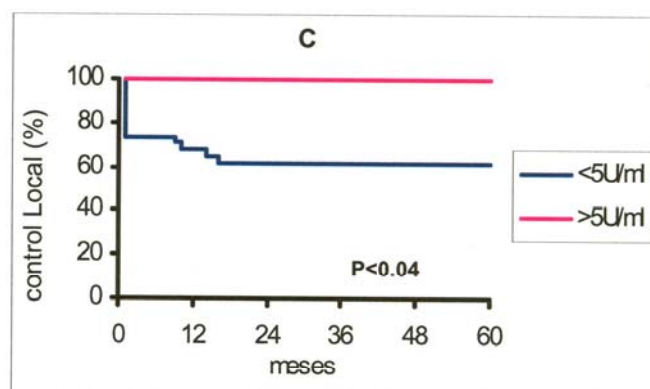
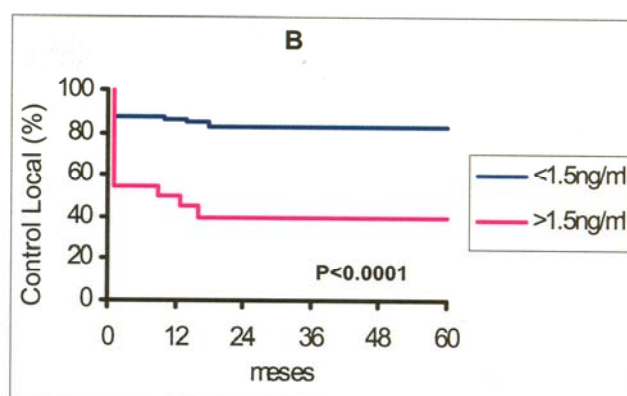
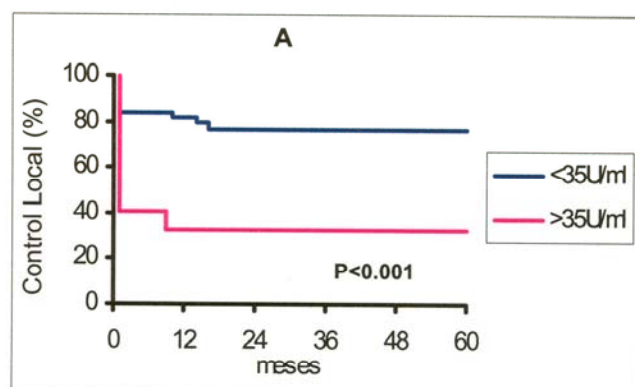
Se realizó a continuación el análisis de la evolución posterior de los casos con RC y SCC-Ag elevado o normal post-tratamiento. De las 11 pacientes con SCC-Ag alto post-tratamiento y RC, 2 pacientes presentaron recidiva local (18%), y de los 59 pacientes con SCC-Ag post-tratamiento dentro de límites normales y RC 3 recidivaron (5%), no alcanzando esta diferencia la significación estadística ($p=0.17$).

Treinta y cinco pacientes tuvieron fallo del control local en nuestra serie, correspondiendo 30, a fallos inmediatos (no respuesta) y 5 a recidivas de las 76 pacientes que habían conseguido RC. El control local a 1, 3 y 5 años fue del 67%, 60% y 60% (Figuras 1 A-C). La extensión de la enfermedad y el tamaño fueron factores predictivos importantes en el control de la enfermedad local. Los valores pretratamiento de Ca 125 ($p < 0.001$), de β -HCG ($p < 0.04$), de SCC-Ag ($p < 0.08$), pero especialmente del SCC-Ag post-tratamiento ($p < 0.0001$), fueron factores predictivos también de control local en nuestro estudio (tabla 6). En el análisis multivariante, se incluyeron todas las variables conocidas antes de iniciar el tratamiento. El Ca 125 fue el único factor pronóstico independiente ($p < 0.01$, coef. regresión 1.83 ± 0.76).

TABLA 6: Importancia de los distintos factores pronósticos y marcadores en el control local y la supervivencia en carcinoma epidermoide de cérvix tratado con RT.

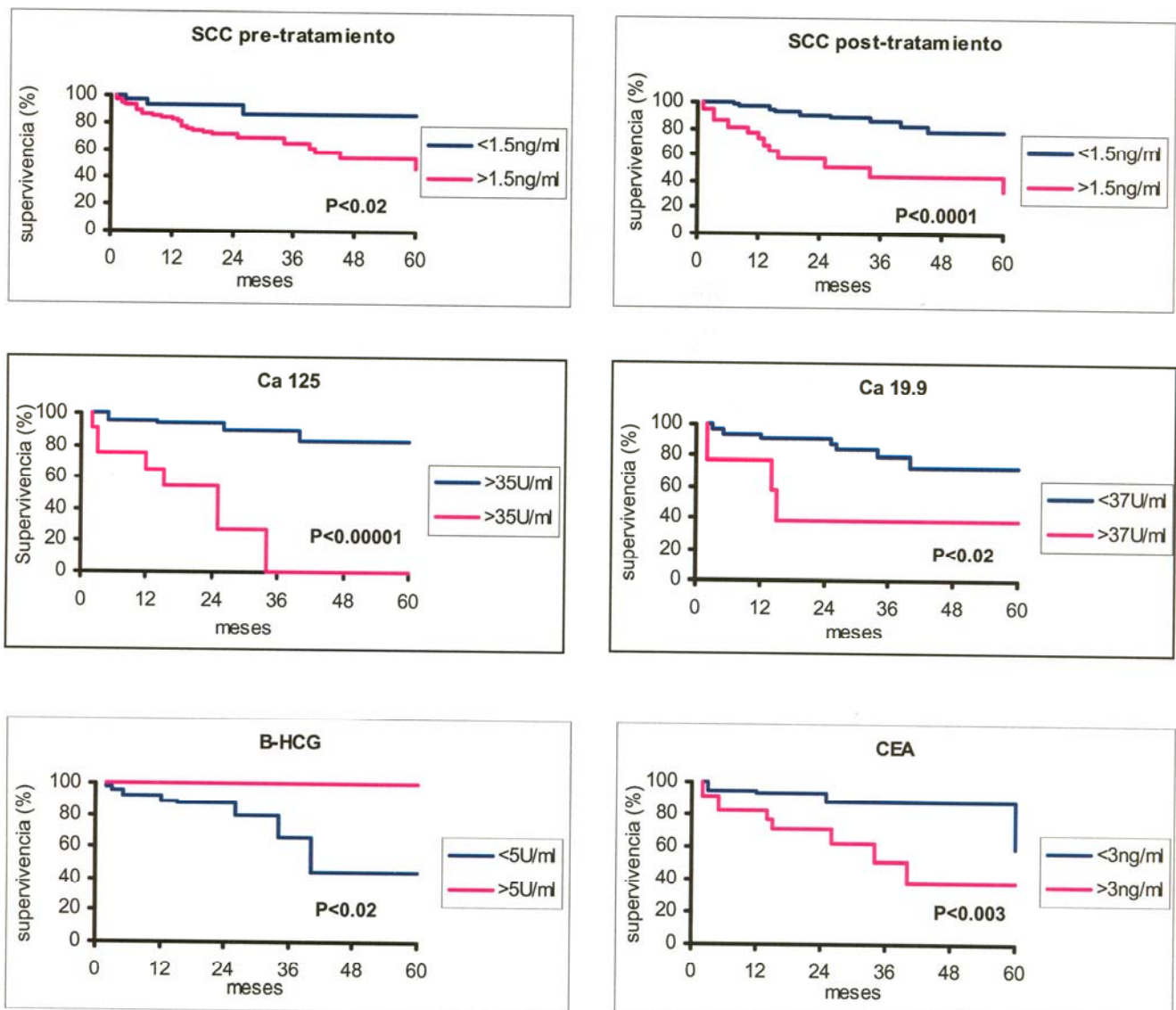
	Control Local (valor de p)	Supervivencia (valor de p)
Edad	NS	NS
Estadío	0.0001	0.0003
Grado	NS	NS
Tamaño	0.0009	0.01
Ganglios	NS	NS
SCC-Ag pre-tto	0.08	0.02
SCC-Ag post-tto	0.0001	0.0001
Ca 125	0.001	0.00001
β -HCG	0.04	0.02
CEA	NS	0.003
Ca 19.9	NS	0.02
Ca 15.3	NS	NS

Figuras 1: Relación de marcadores tumorales (A: Ca125, B: SCC-Ag post-tratamiento y C: β -HCG) con el control local.



De los 106 pacientes de nuestra serie, 30 fallecieron. La supervivencia actuarial en nuestro estudio fue del 86%, 71% y 59% a 1, 3 y 5 años. El estadio, el tamaño y los valores pretratamiento del Ca 125, SCC-Ag, Ca 19.9, β -HCG y CEA así como el valor de SCC post-tratamiento fueron factores predictivos de supervivencia en nuestro estudio (tabla 8) (Figura 2). En el análisis multivariante sólo el Ca 125 resultó ser variable pronóstica independiente de supervivencia ($p < 0.0043$, $r = 3.21 \pm 1.13$).

Figura 2. Relación de los marcadores tumorales con la supervivencia en carcinoma epidermoide de cérvix tratado con RT.



DISCUSION

La determinación de un amplio grupo de marcadores tumorales en una serie homogénea, en cuanto al tipo histológico y el tratamiento realizado, representa una buena oportunidad para conocer el valor real de los mismos.

La sensibilidad diagnóstica de SCC-Ag, utilizando como valor de referencia 1.5ng/ml, fue en nuestra serie del 69%. Tanto la sensibilidad como el VR es comparable a lo publicado por *Geyer et al (1989)*. En otros estudios la sensibilidad es menor, ya que el VR elegido fue >2 ng/ml (*Bolli et al, 1994; Hong et al, 1997*).

La sensibilidad del Ca 125 fue de 17%, algo inferior a lo observado en otros trabajos (*Sproston et al, 1995; Massuger et al, 1997*), probablemente por la ausencia de adenocarcinomas en nuestra serie. Es de resaltar la baja sensibilidad de la β -HCG sérica (12%), si se compara con la que se obtiene cuando se hace determinación en orina (40-65%) (*Neven et al, 1993; Cole et al, 1996*). Los demás marcadores están en el rango de sensibilidad de lo publicado (*Leminem et al, 1990; Borrás et al, 1995*).

En nuestro estudio en carcinoma epidermoide de cérvix, como ya habíamos observado en carcinoma de laringe (*Lara y Cuyás, 1995*), los niveles séricos de SCC-Ag se corresponden estrechamente con la masa tumoral, tanto en el momento del diagnóstico ($p < 0.009$) como tras tratamiento ($p < 0.0002$), permitiendo la sospecha de persistencia tumoral, aún en los casos de remisión completa clínica. Aunque en la mayoría de los trabajos publicados se observa una cierta relación entre el SCC-Ag pretratamiento y la respuesta obtenida con irradiación, ésta no es estadísticamente significativa (*Pectasides et al, 1994; Ngan et al, 1996; Sproston et al, 1995; Hong et al, 1997*). Sin embargo, el nivel de SCC-Ag post-tratamiento sí resultó predictivo de control local en análisis univariante ($p < 0.0001$). Efectivamente, las pacientes que mantenían niveles elevados del marcador tras el tratamiento, tuvieron menor tasa de control local.

Por otra parte, el Ca125 ha resultado ser un buen predictor de respuesta inmediata a RT y control local a largo plazo ($p < 0.001$ en ambos casos). Además, ha sido el principal factor pronóstico de supervivencia, aún mejor que el estadio clínico ($p < 0.0043$, coef reg 3.21 ± 1.13). Este hecho, ya publicado previamente en dos series de pacientes sometidas a cirugía y radioterapia, que incluían también adenocarcinomas (*Avall-Ludqvist et al, 1992; Sproston et al, 1995*), adquiere una especial relevancia en nuestra serie (tratamiento exclusivo con RT, sólo carcinomas

epidermoides), ya que todos los pacientes con Ca125 elevado fallecieron por su tumor, en un plazo relativamente corto de tiempo.

Otros marcadores como CEA, Ca 19.9 y β -HCG han sido predictivos de supervivencia en el análisis univariante. Estos marcadores, típicamente considerados de utilidad en tumores de estirpe adenocarcinoma, han sido útiles en la predicción de supervivencia de nuestra serie. Todos los pacientes con β -HCG elevado (7/59) tuvieron control local de la enfermedad a 5 años. Este hecho, merece en nuestra opinión un estudio más detallado, que incluya un mayor número de pacientes.

En conclusión, la expresión del marcador Ca 125 ha resultado ser el factor pronóstico más importante de nuestra serie, de forma comparable al estadio clínico. La asociación de este marcador a tumores de estirpe adenocarcinoma, de conocida tendencia a la metastatización, podría explicar en parte estos resultados. Esta característica biológica podría estar presente en los tumores que expresan Ca 125. Además, el papel que otros marcadores séricos, relacionados fundamentalmente con tumores de estirpe adenocarcinoma, han tenido en nuestra serie, parecen justificar esta hipótesis. Es posible que pacientes que portan tumores con niveles elevados de Ca 125 deban ser incluidos en tratamientos locales combinados, que pueden incluir la cirugía y/o la quimioterapia, aparte de la irradiación. El uso de quimioterapia con intención adyuvante podría ser considerada.

Capítulo V

Proliferación (índice mitótico, Ki67), apoptosis y genes reguladores (p53, bax y bcl-2) en carcinoma de cérvix: relación con factores pronósticos clásicos, control local y supervivencia.

PROLIFERACION (INDICE MITÓTICO, KI67), APOPTOSIS Y GENES REGULADORES (P53, BAX Y BCL-2) EN CARCINOMA DE CERVIX: RELACION CON FACTORES PRONOSTICOS CLASICOS, CONTROL LOCAL Y SUPERVIVENCIA.

Antecedentes: El cáncer es la consecuencia del desbalance entre apoptosis/proliferación, explicado en parte por la alteración de los genes reguladores de estos procesos. El estudio de estos fenómenos, nos podrían ayudar a identificar pacientes de bajo y de alto riesgo, para así seleccionar un tratamiento más adecuado, en pacientes con carcinoma infiltrante de cérvix.

Material y Métodos: En este estudio hemos incluido sesenta y cinco pacientes con carcinoma infiltrante localizado de cérvix. Catorce pacientes (23%) recibieron como tratamiento principal cirugía, y 47 (77%) radioterapia (RT). Cuatro pacientes no fueron tratadas por deterioro del estado general y progresión de la enfermedad. Se determinó mediante técnicas histológicas la proliferación (IM, ki67), apoptosis (IA) y genes reguladores (p53, bax, bcl-2). Se utilizó tinción de hematoxilina-eosina (IA, IM), y técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) para la determinación de ki67, 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: El estudio de la proliferación, apoptosis y genes reguladores, mostró una relación de la sobreexpresión de p53 y tumores indiferenciados ($p<0.003$) y/o altamente proliferativos ($p<0.0001$). La extensión de la enfermedad se relacionó con la proliferación tumoral, observándose relación directa entre el estadio y ki67 ($p<0.05$), y el tamaño tumoral y el IM ($p<0.02$). Los tumores de estirpe adenocarcinoma presentaron índices de apoptosis elevados y baja proliferación, siendo la relación inversa en los tumores epidermoides ($p<0.013$ y $p<0.037$, respectivamente). Se pudo valorar la respuesta en 45/47 pacientes tratadas con RT radical, presentando remisión completa 34 (75.5%). Los tumores más avanzados ($p<0.001$) y los más proliferativos ($p<0.05$) obtuvieron peor tasa de respuesta a la enfermedad. La proliferación estimada mediante ki67 y el estadio fueron factores predictivos significativos para el control local en el análisis univariante. Aquellas pacientes con sobreexpresión de bcl-2 y bajo índice proliferativo (ki67) muestran una débil tendencia a una mejor supervivencia.

Conclusión: La proliferación tumoral se muestra de utilidad en la predicción de los resultados clínicos en estas pacientes. Su determinación nos permitiría modificar los tratamientos hacia una mayor intensidad terapéutica, en pacientes que a pesar de tener tumores poco extendidos y por tanto buen pronóstico, muestren características de proliferación elevada que podrían modular sus expectativas de control.

Background: Cancer is the consequence of the misbalance between apoptosis/proliferation, explained partially by the alterations in regulator genes of these phenomenon. The study of these ones could help to identify low and high risk patients, and in this way select the more convenient treatment.

Methods and Material: Sixty five patients diagnosed of localised cervical carcinoma were included in this study. Fourteen patients (23%) received surgery as main treatment and 47 (77%) radiotherapy. Four patients were not treated due to progression of the disease and bad conditions. Proliferation (IM, ki67), apoptosis (AI) and regulator genes were determined by histologic techniques. Hematoxylin-eosin slides (AI, IM) and immunohistochemical techniques (IHQ) in the determination of ki67, p53, bax and bcl-2 oncoproteins were used. The relation among these parameters, with the classical prognostic factors were assessed, and as prognostic factors for response, local control and survival.

Results: There was a strong relation among p53 overexpression and undifferentiated and/or highly proliferating tumors ($p<0.003$, $p<0.0001$). Local extent of the disease was related to tumor proliferation: clinical stage and ki67 ($p<0.05$) and tumoral size and IM ($p<0.02$). Adenocarcinomas showed high apoptotic index and low proliferation, while the relation was inverse in epidermoid tumors ($p<0.013$ and $p<0.037$, respectively). Response to treatment was assessed in 45/47 patients treated by radical radiotherapy. Thirty four patients showed a complete response. The most extended and proliferatives tumors had the worst response to the treatment. Tumor proliferation assessed by ki67 and clinical stage were a significant predictive factors for local control in univariate analysis. Patients with bcl-2 overexpression and low proliferation index (ki67) show a weak relation with better survival.

Conclusions: Tumor proliferation is useful in predicting clinical outcomes in these patients. Patients with early tumors (good prognosis) but with high proliferation indexes, would have lower control rates than expected. Combination treatment could be indicated in such patients.

INTRODUCCION

El pronóstico del carcinoma invasivo de cérvix viene marcado por la extensión de la enfermedad al diagnóstico. Entre los factores más importantes están el estadio, el tamaño tumoral y la afectación ganglionar (*Riou et al, 1990; Deltas et al, 1997*). Sin embargo, no es raro ver en la práctica clínica que tumores con igual tamaño y estadio tengan evoluciones distintas. 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 se les pueda ofrecer un tratamiento más conservador, y pacientes con alto riesgo a los que se les planteen tratamientos más intensivos (*Avall-Lundqvist et al, 1997*).

El cáncer es la consecuencia de una proliferación incontrolada de células, con anomalías en su material genético. Las células anómalas proliferan más de lo que mueren, lo que da lugar al crecimiento tumoral. Este desequilibrio entre apoptosis/proliferación puede ser explicado en parte por la alteración de los genes reguladores de estos procesos.

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*). 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*). 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*). Esta relación podría ser inversa cuando se trata del tipo histológico adenocarcinoma (*Sheridan et al, 1999; Wheeler et al, 1995*).

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, 1998*). La expresión de los genes reguladores bax/bcl-2 han sido analizados en algunas series con resultados controvertidos (*Crawford et al, 1998; Tjalma et al, 1998; Harima et al, 1998*).

El Ag ki67 se expresa en el núcleo de las células en proliferación, excepto en aquellas que se encuentran en fase G0. El índice de proliferación tumoral estimado mediante

ki67, ha sido útil en la predicción de respuesta a irradiación en laringe (*Lera et al, 1998*) y en vejiga (*Lara et al, 1999*). Los resultados en carcinoma de cérvix son controvertidos (*Levine et al, 1995; Oka et al, 1996; Camacho et al, 1997; Pillai et al, 1998*). Tampoco se ha encontrado relación entre la proliferación estimada mediante el índice mitótico (IM) y la supervivencia (*Tsang et al, 1999*).

Estudiamos en este capítulo la apoptosis (IA), la proliferación tumoral estimada mediante IM y ki-67, y las proteínas reguladoras de la apoptosis (p53, bax, bcl-2) en el carcinoma invasivo de cérvix. Se analizará la relación entre estas variables, su relación con factores clásicos de pronóstico (estadío, volumen tumoral, edad, grado y tipo histológico), y su importancia en la predicción de supervivencia.

MATERIAL Y METODOS

Pacientes

Se ha analizado de forma retrospectiva la apoptosis, la proliferación tumoral y genes relacionados en carcinoma invasivo de cérvix. Se incluyeron 65 pacientes entre julio-87 y abril-99, con un seguimiento medio en las pacientes vivas de 32.4 meses (3-115). En todos los casos se había realizado una biopsia para confirmación histológica del diagnóstico que, una vez conservada en parafina, se utilizó para la determinación de técnicas de inmunohistoquímica (IHQ). 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 (capítulo III). La medida del tamaño tumoral se realizó mediante examen pélvico bimanual. Las características de la serie se detallan en la tabla 1. En 14 pacientes el tratamiento fue histerectomía radical tipo II-III con linfadenectomía pélvica (tipo Wertheim-Meigs), con preservación de ovarios en pacientes premenopáusicas. Ocho pacientes recibieron RT adyuvante. En 47 pacientes (77%) se realizó radioterapia (RT) radical. Se administraron 50 Gy sobre volumen pélvico, mediante 4 campos, utilizando técnica isocéntrica. Posteriormente se realizaron 1-2 aplicaciones de braquiterapia de baja tasa de dosis, administrándose 30-40 Gy al punto A. En 4 de estas pacientes se realizó cirugía de rescate por enfermedad residual, y en 6 se utilizó QT-RT concomitante (CDDP, dosis 40 mg/m²/semana). Cuatro pacientes no recibieron tratamiento por enfermedad avanzada y mal estado general.

TABLA 1: Características de la serie (n=65).

	Nº Casos (%)
Edad (años)	52.58±14.12; rango 27-78; mediana 51
Estadio	
IB	24 (37)
II	34 (52)
III	7 (11)
Tamaño (cm)	4.38±1.38; rango 2-7; IC95% 3.98-4.79; mediana 4
Tipo Histológico	
Epidermoide	51 (79)
Adenocarcinoma	14 (21)
Grado Histológico	
I	8 (13)
II	29 (47)
III	26 (40)
Desconocido	2
Tratamiento	
Cx ± RT	14 (23)
RT ± Cx ± QT	47 (77)
No tto	4

* Incluye 2 adenoescamosos. Cx: cirugía. RT: radioterapia. QT: quimioterapia.

Inmunohistoquímica

Para la realización de las distintas técnicas, se obtuvieron secciones de 4 micras a partir de los bloques de parafina, que se montaban en cristales polisíndados.

La identificación de células en apoptosis/mitosis, se realiza con la técnica de hematoxilina-eosina (Figura 1-A). Se eligieron aleatoriamente diez campos con objetivo de alto poder (400X), de manera que se contaban al menos 1000 células tumorales por cada sección. Se contaban el número total de figuras apoptóticas y mitóticas, obteniendo el porcentaje en cada caso, que vendrá definido como índice apoptótico (IA) e índice mitótico (IM). Los criterios utilizados para definir apoptosis y mitosis, fueron los descritos previamente por Kerr et al (1972) y Baak et al (1985).

Para el resto de técnicas, 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

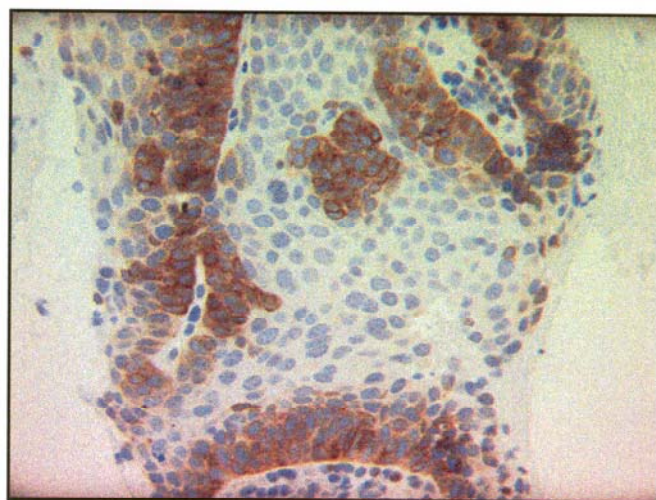
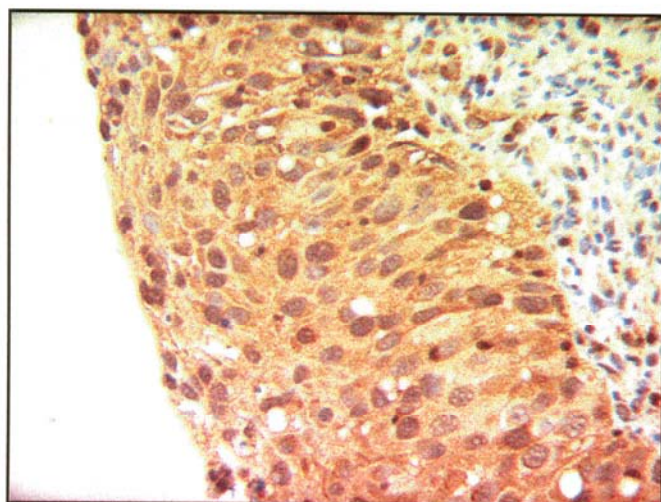
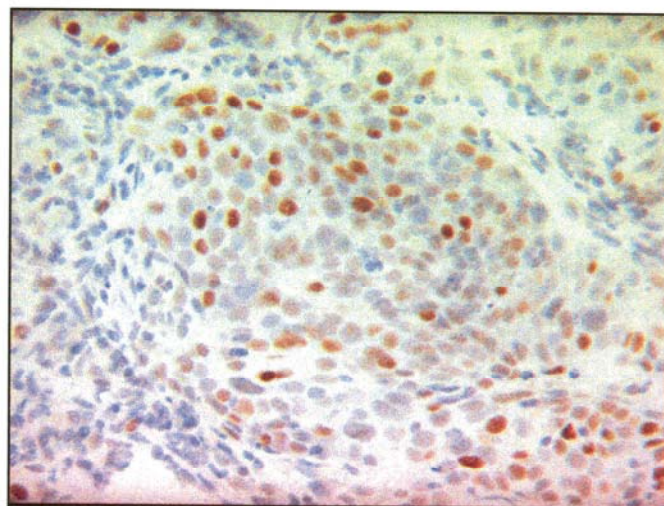
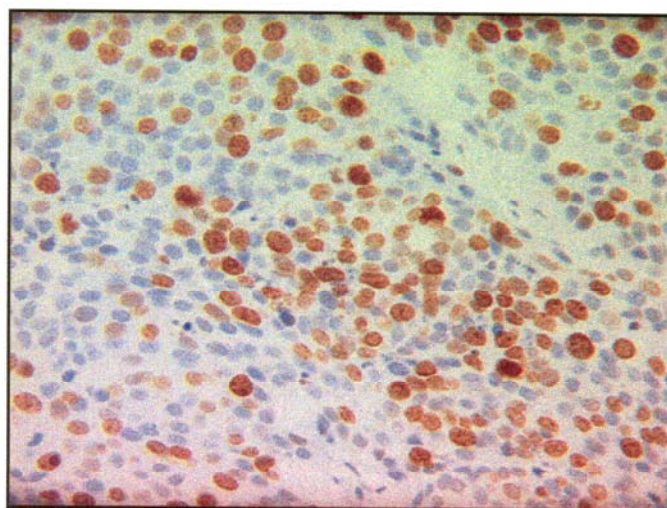
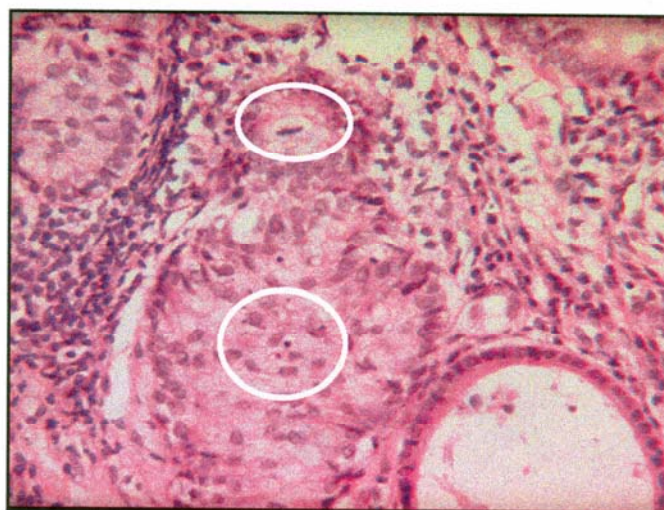
muestras, sumergiéndolas en una solución citrato durante 3 minutos a partir de la ebullición de la solución. Tras el lavado de las muestras con agua destilada, se bloquea la peroxidasa endógena mediante H_2O_2 diluida en solución salina buffer fosfato (PBS), durante 10 minutos. Una vez desparafinadas, 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), 3º Ac streptavidin-peroxidasa (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 estimación de la proliferación tumoral mediante Ki67 se utilizó el Ac monoclonal de ratón anti-MIB-1 (clona 1001, Dianova, Germany), en una dilución 1:100. Se incubó durante 24 horas a 4°C. La positividad consiste en la tinción en los núcleos de las células tumorales (Figura 1-B). La fracción de crecimiento del tumor se expresa como el porcentaje de núcleos teñidos. El índice de expresión de Ki67 se obtiene contando >1000 células con un objetivo de 400X, en las zonas de máxima expresión del marcador.

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 (Figura 1-C). Se estudia toda la sección, para encontrar la zona de mayor expresión, y se cuentan >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 policlonal de conejo anti-bax (clona SC-493, Santa Cruz Biotechnology, Inc) y el Ac monoclonal de ratón anti-bcl2 (clona 124, Dako Diagnosticos, SA). Se utilizó una dilución 1:50 en ambos casos, 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 (Figura 1 D-E). En ambos casos existe control interno positivo con la tinción de linfocitos. Se elige la zona de mayor expresión a 40X. Para la determinación de bax, se hace una estimación de las células teñidas y la intensidad de la tinción a 400X, dando valores de 0 a 3 (negativo, <30%, 30-70%, >70%). La expresión de bcl-2 se consideró positiva, si se observa tinción, o negativa, en caso contrario.

Figura 1: Técnicas de conteo utilizadas. A: apoptosis (A) y mitosis (M) con tinción de hematoxilina-eosina. B-E: ki67, p53, bax y bcl-2, mediante técnicas de inmunohistoquímica.



Estadística

Para el análisis estadístico se utilizó el software SOLO. La comparación de variables continuas se realiza mediante la correlación de Pearson, en caso de distribución normal, y el test de Spearman, en caso de distribución no normal. La comparación entre una variable continua y una discreta se realiza mediante el test de Kruskal-Wallis (Anova test). Las variables discretas se comparan con el método de chi-cuadrado. Para el análisis multivariante de las variables dependientes se utilizó el test de regresión múltiple. Las curvas de control local y de supervivencia causa-específica se hicieron según el método de Kaplan-Meier. Se utilizó la mediana como punto de corte, para convertir en discretas las variables continuas. Se empleó el log-rank test para el análisis univariante y el método de Cox para el análisis multivariante de curvas de supervivencia. Se utilizó la mediana como punto de corte para variables continuas.

RESULTADOS

Se determinó el IA, IM, ki67 y las proteínas relacionadas con apoptosis en 65 pacientes (tabla 2). El porcentaje de células en apoptosis fue de 0.4-6.89%, con una media de 1.87% y una mediana de 1.61% (n=63). La proliferación tumoral se estimó mediante el IM y ki-67. El porcentaje de células en mitosis varió entre 0.20-3.82%, con una media de 1.39% y una mediana de 1.28% (n=62). La proliferación estimada mediante ki67 presentó un valor medio de 36.78% de células tumorales teñidas, con una mediana de 35% (n=64). La positividad de p53 se detectó en 53 de las 65 muestras (81%), con una media de 17.96% de células teñidas. Bcl-2 se expresó en 11 de las 60 muestras estudiadas (18%), frente 63/65 (94%) que expresaron bax.

TABLA 2: Resultados obtenidos en la determinación de IA, IM, ki67 y p53 en nuestra serie.

	Media $\pm$ D.E. (Rango)	IC 95%	Mediana
IA (n=63)	1.87 $\pm$ 1.28 (0.4-6.89)	1.57-2.17	1.61
IM (n=62)	1.39 $\pm$ 0.76 (0.20-3.82)	1.20-1.59	1.28
Ki-67 (n=64)	36.78 $\pm$ 19.9 (0-78)	31.8-41.7	35
P53 (n=65)	17.96 $\pm$ 21.1 (0-96)	12.7-23.1	11

La proliferación estimada mediante ki67 se relacionó con la expresión alterada de p53 ($p<0.0001$, $r=0.46$) y de forma débil con bax ($p=0.10$). La apoptosis no se relacionó con los genes que la regulan, ni con la proliferación (tabla 3).

TABLA 3: Relación entre proliferación, apoptosis y genes reguladores (p53, bax, bcl-2).

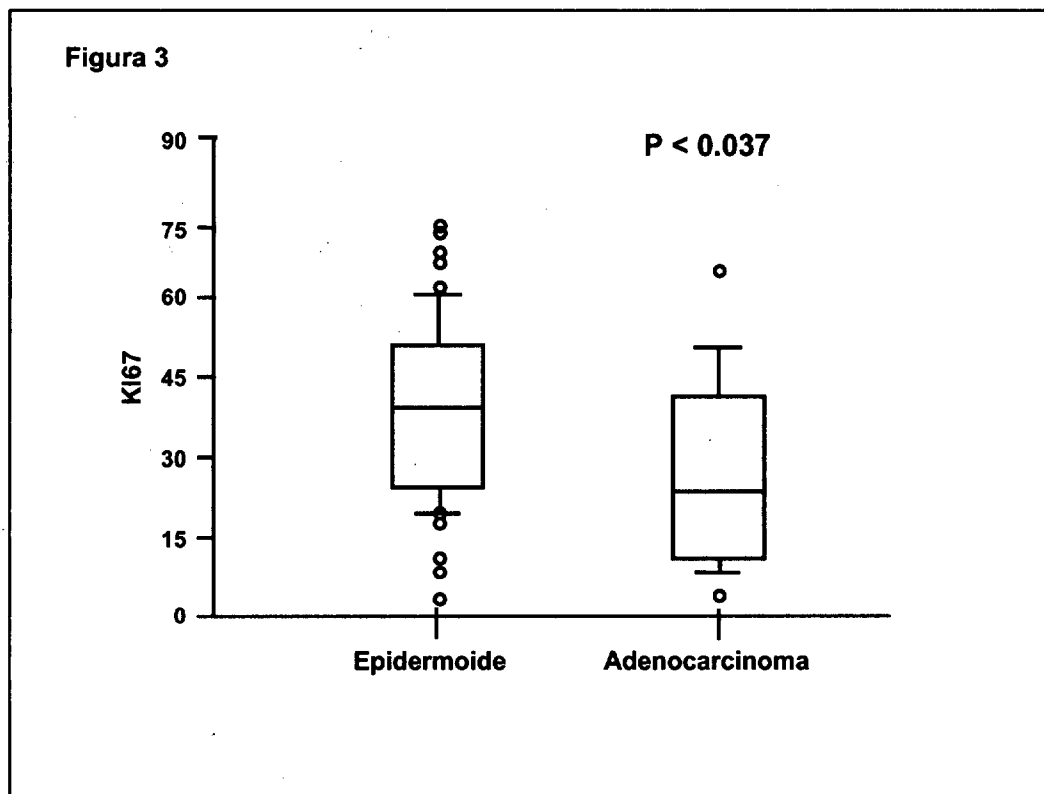
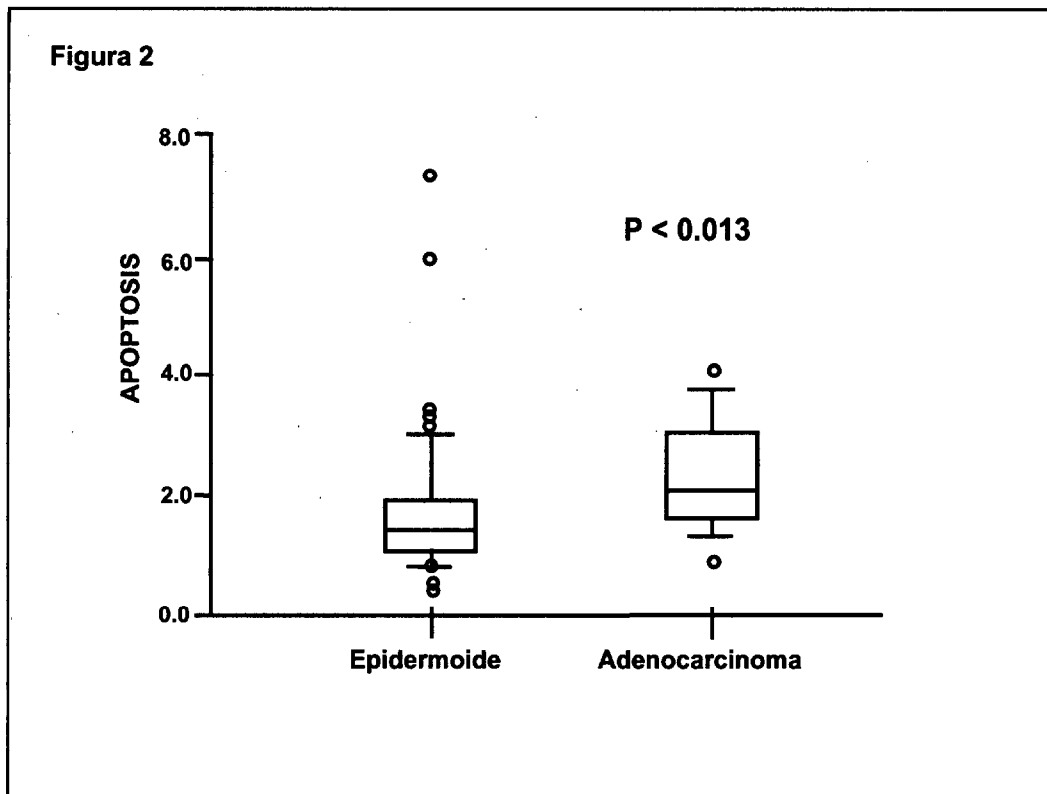
	IA	IM	Ki-67	P53	Bax	Bcl-2
IA	-----	0.77	0.46	0.60	0.72	0.12
IM	-----	-----	0.65	0.31	0.95	0.86
Ki-67	-----	-----	-----	0.0001 ($r=0.46$)	0.10	0.98
P53	-----	-----	-----	-----	0.71	0.82
Bax	-----	-----	-----	-----	-----	0.23

Todas estas variables se estudiaron en relación con factores clásicos de pronóstico (tabla 4). Los tumores más proliferativos mostraban mayor extensión de la enfermedad, de manera que altos IM se presentaban en tumores de mayor tamaño ($p<0.02$, $r=0.33$), y los estadios más avanzados se asociaban a altas tasas de ki67 ($p<0.05$). También se encontraron IA elevados en los estadios avanzados ($p<0.03$). La alteración de p53 fue más relevante en tumores más indiferenciados ($p<0.003$). Los fenómenos de apoptosis y proliferación, se producen de forma diferente en el tipo histológico adenocarcinoma (baja proliferación, alta apoptosis) frente al epidermoide (alta proliferación, baja apoptosis) ($p<0.037$, $p<0.013$) (Figuras 2 y 3). Además, las pacientes de mayor edad mostraron tumores más proliferativos ($p<0.02$, $r=0.29$).

TABLA 4: Relación de proliferación, apoptosis y genes reguladores con factores pronósticos clásicos.

	Edad	Estadio	Tamaño	Grado Hist	Tipo Hist
IA	0.61	0.03	0.68	0.51	0.013
IM	0.27	0.25	0.02 ($r=0.33$)	0.68	0.79
Ki67	0.02 ($r=0.29$)	0.05	0.49	0.69	0.037
P53	0.20	0.48	0.87	0.003	0.53
Bax	0.54	0.61	0.50	0.65	0.70
Bcl-2	0.18	0.39	0.04	0.62	0.75

Figura 2 y 3: Tasas de apoptosis (IA) y proliferación (estimada mediante ki67) según tipo histológico.



Se pudo valorar la respuesta en 45 de las 47 pacientes tratadas de forma inicial con RT. Se obtuvo remisión completa en 34 pacientes (75.5%). En 11 pacientes no se consiguió RC o la enfermedad progresó (24.5%). Los tumores más avanzados ($p<0.001$) y más proliferativos ($p<0.05$) obtuvieron peores tasas de respuesta de la enfermedad (tabla 5). El resto de los factores estudiados, no resultaron predictivos de respuesta a irradiación.

TABLA 5: Relación de la expresión de ki67 y del estadio con la respuesta a RT.

	Respuesta Completa	Valor de p
ki67		
≤35	20 (86%)	p<0.05
>35	3 (27%)	
Estadio		
I	12 (92%)	p<0.001
II	21 (80%)	
III	1 (16%)	

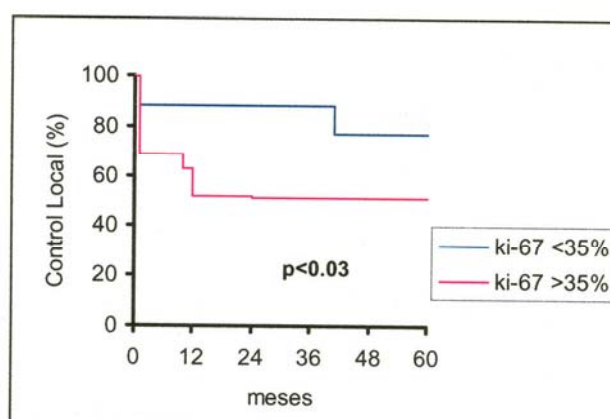
La proliferación estimada mediante ki67 ($p<0.03$) y el estadio ($p<0.0009$), fueron factores pronósticos en el análisis univariante para el C.L (tabla 6, Figura 4). En el análisis multivariante, se incluyen todas las variables analizadas, resultando el estadio como el único factor independiente de pronóstico ($p<0.009$, $r=1.39\pm0.53$).

Con respecto a la supervivencia, el grado histológico es el único factor pronóstico en el análisis univariante, mostrando una débil tendencia a una mejor supervivencia aquellas pacientes con sobreexpresión de bcl-2 ($p<0.09$) y bajo índice proliferativo (ki67) ($p=0.10$) (Figuras 5 A-B) (tabla 6). Las pacientes que tuvieron mayor expresión de bax, presentaron peor supervivencia, aunque de forma no significativa ($p=0.17$).

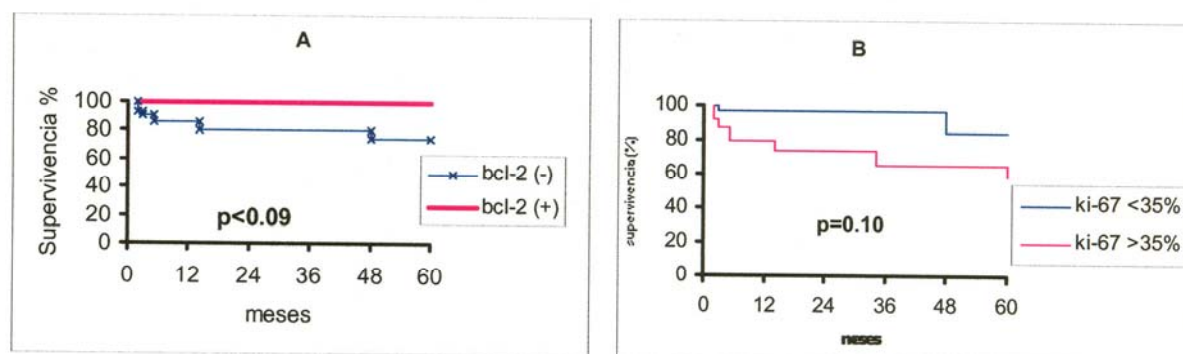
TABLA 6: Factores predictivos de Control Local y Supervivencia en el A.U.

	Control Local	Supervivencia
Edad	NS	NS
Estadío	0.0009	NS
Grado Histológico	NS	0.01
Tipo Histológico	NS	NS
Tamaño	NS	NS
IA	NS	NS
IM	NS	NS
Ki-67	0.03	0.10
P53	NS	NS
Bax	NS	NS
Bcl-2	NS	0.09

Figura 4: Control local y proliferación tumoral (ki67).



Figuras 5 A-B. Curvas de supervivencia en relación con la sobreexpresión de bcl-2 (A) y la expresión de ki67 (B).



DISCUSION

El cáncer de cérvix es un tumor de crecimiento local y regional, en el cual los tratamientos como la cirugía o la irradiación tienen un papel principal.

Si bien la extensión local de la enfermedad, es el factor pronóstico más conocido, es evidente que el fenotipo tumoral, definido por la capacidad proliferativa, o la expresión de oncoproteínas, permiten conocer la conducta biológica de un tumor concreto.

Los tumores mantienen en general una cierta relación entre proliferación y apoptosis, y además, altos índices de ambos procesos se relacionan con peores resultados clínicos (Levine et al, 1995).

En nuestra serie, no pudimos observar una relación directa entre los fenómenos de proliferación (estimada mediante ki67 o IM) y la apoptosis, como ha sido puesto de manifiesto en otras localizaciones tumorales (Pérez et al, 1998; Lera et al, 1998; Lara et al, 1999), o en otras series de carcinoma de cérvix (Levine et al, 1995; Isacson et al, 1996). Sin embargo, hemos obtenido indicios de cierta relación entre ellos, al obtener mayores tasas de apoptosis en tumores con mayor extensión local (estadío clínico), de forma similar a lo observado, para la proliferación estimada mediante ki67 (estadío clínico) o IM (tamaño tumoral). La debilidad de la relación apoptosis/proliferación observada en nuestra serie, podía venir dada por la diferente expresión de ambos procesos según la estirpe histológica. Así, los tumores epidermoides son más proliferativos y muestran menor apoptosis que los adenocarcinomas. Este hecho, ya descrito por nuestro grupo (Camacho et al, 1997) y por otros autores (Levine et al, 1995; Komaki et al, 1996; Sheridan et al, 1999), es de relevancia, dada la diferente conducta biológica que tienen ambos tipos tumorales.

La influencia de la edad en el pronóstico de las pacientes con carcinoma de cérvix ha mostrado resultados controvertidos (Meanwell et al, 1988; Dattoli et al, 1989; Junor et al, 1989; Rutledge et al, 1992; Garzetti et al, 1997). Las causas biológicas que podrían sustentar estos resultados, han sido analizadas de forma casi anecdótica (Chen et al, 1996; Garzetti et al, 1997). En nuestra serie se observa que las pacientes de mayor edad presentan tumores más proliferativos, con tasas elevadas de ki67.

El estudio de la expresión proteica de los genes que regulan los procesos de proliferación y apoptosis, ha tenido menor impacto pronóstico que el proceso en sí mismo. Sin embargo, hemos podido observar que tumores que sobreexpresaban p53, mostraban características de fenotipo tumoral agresivo (mayor proliferación, tumores indiferenciados). Así mismo, tumores con alta expresión de bax mostraron débil tendencia a mayor proliferación y peor supervivencia. Por otra parte, la alteración del

gen bcl-2, que es comúnmente observada en tumores de pequeño tamaño, se asocia a mayor supervivencia (*Tjalma et al, 1998*). De estos resultados parece deducirse que, efectivamente, los fenómenos de apoptosis y proliferación tienen aspectos reguladores comunes. Así, situaciones de alta proliferación, expresión de genes inductores de apoptosis (p53, bax), o no expresión de genes inhibidores de la misma (bcl-2), se asocian entre sí y con características desfavorables de pronóstico. Sin embargo, sólo la proliferación estimada mediante ki67 ha sido útil, junto al estadio, para predecir la respuesta a la irradiación y el control local de estas enfermas. La repoblación tumoral durante la irradiación, es una de las principales limitaciones para la curación de tumores por radioterapia, ya que el crecimiento tumoral entre fracciones de irradiación, disminuye la efectividad de la misma. No es la primera vez que observamos este fenómeno (*Lera et al, 1998; Lara et al, 1999*). La estimación de la proliferación mediante ki67 es en nuestra opinión un método fiable, sencillo y rápido (*Rey et al, 1997; Lara et al, 1999*), que tiene como característica fundamental, el que está al alcance de cualquier laboratorio de Patología, de un hospital medio. La información que proporciona es, en nuestra experiencia en cáncer de laringe o vejiga, tan relevante como otros factores clásicos de pronóstico. El cáncer de cérvix, es una localización tumoral, que incluye tumores de diferentes histologías, y en el que la hipoxia tumoral es más relevante que en otros tumores, pudiendo modular el papel que, por ejemplo, la proliferación puede tener en el control de la enfermedad a largo plazo.

En conclusión, el control local/regional del carcinoma de cérvix, parece venir claramente definido por la extensión de la enfermedad y la proliferación tumoral. Este hecho permitiría modificar los tratamientos hacia una mayor intensidad terapéutica, con combinación de tratamientos (cirugía + radioterapia+ quimioterapia) en pacientes, que a pesar de tener tumores aparentemente poco extendidos y por tanto de buen pronóstico, muestran características biológicas de proliferación elevada, que podrían modificar sus expectativas de control.

Capítulo VI

Progresión tumoral en cáncer de cérvix. Angiogénesis y regulación génica. Hipoxia tumoral: relación con la proliferación y la apoptosis.



PROGRESION TUMORAL EN CANCER DE CERVIX. ANGIOGENESIS Y REGULACION GENICA. HIPOXIA TUMORAL: RELACION CON LA PROLIFERACION Y LA APOPTOSIS.

Antecedentes: La angiogenesis o neovascularización, es un proceso necesario para la progresión y metastatización de los tumores. La hipoxia tumoral condiciona no sólo la respuesta a la radioterapia, sino que estimula el potencial invasivo y metastático de los tumores. La cuantificación de la angiogenesis y de la hipoxia tumoral, nos podría ser de utilidad en la identificación de pacientes de bajo riesgo, a los que se pueda ofrecer un tratamiento más conservador, y pacientes con alto riesgo a los que se planteen tratamientos más intensivos.

Material y métodos: En este estudio hemos incluido 66 pacientes con carcinoma infiltrante localizado de cérvix. Trece pacientes (21%) recibieron como tratamiento principal cirugía, y 49 (77%) radioterapia (RT). Cuatro pacientes no fueron tratadas por deterioro general y progresión de la enfermedad. Para la estimación de la angiogenesis se determinó la densidad intratumoral de microvasos (IMD) mediante el anticuerpo monoclonal CD-31 y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), mediante técnicas de inmunohistoquímica en muestras embebidas en parafina. La determinación de la presión de oxígeno intratumoral (pO_2) se realizó mediante técnica de electrodos polarográficos marca Eppendorf (pO_2 Histograph 6650), siendo incluidas 30 pacientes en el estudio. Los datos de oxigenación se definieron como la mediana de pO_2 y la fracción hipóxica (HP_{10}) (porcentaje de valores $<10\text{mmHg}$). Se analizó la relación entre los distintos parámetros de vascularización y oxigenación, así como con factores clásicos de pronóstico y con la proliferación (IM, ki67), apoptosis (IA) y genes relacionados. Se analizó además su importancia como factor predictivo de respuesta y de supervivencia.

Resultados: Se observó una correlación importante entre IMD y la expresión de VEGF ($p<0.03$), de manera que los tumores con mayor expresión de VEGF fueron los más vascularizados. No se observó relación con la oxigenación. La angiogenesis se relacionó con la proliferación y apoptosis. Así, los tumores con mayor expresión de VEGF presentaban sobreexpresión de p53 ($p<0.026$), aquellos con mayor IMD se relacionan con expresión elevada de bax ($p<0.05$), y se observó una relación inversa entre la expresión de bcl-2 con VEGF ($p<0.07$) e IMD ($p<0.06$). Los tumores más vascularizados se relacionaron con IM alto ($p<0.01$) y ki67 bajo ($p<0.01$). Con respecto a los factores clásicos de pronóstico, la edad se relacionó de forma inversa con la vascularización y oxigenación, presentando las pacientes de menor edad, tumores más vascularizados y mejor oxigenados ($p<0.02$ y $p<0.06$). El tipo histológico adenocarcinoma presentaba una tendencia a mayor vascularización y oxigenación, que los tumores epidermoides ($p<0.09$ y $p<0.03$). Se pudo valorar la respuesta a RT en 47/49 pacientes, obteniendo 36 (77%) remisión completa. Ninguno de los parámetros en relación con la angiogenesis fue predictivo de respuesta. En el análisis de supervivencia, sólo IMD dividido en tertiles alcanzaba significación estadística ($p<0.03$).

Conclusión: El papel de p53 y otros genes en la regulación de la angiogenesis y de sus genes indirectos ha sido comprobada en nuestra serie de tumores clínicos. La vascularización ha sido un factor predictivo de supervivencia. El estudio de la oxigenación refiere mayor número de pacientes para poder definir con mayor precisión su relación con otros factores de pronóstico.

Background: Angiogenesis is essential in tumors for progression and metastatization. Tumor hypoxia influences in radiotherapy outcomes, as well as invasive and metastatic potential of tumors. The assessment of angiogenesis and tumor hypoxia, could be useful to identify of low risk patients, who could be offered a more conservative treatment, and high risk patients who could be planned a more intensive therapy.

Methods and Material: In this study 66 patients diagnosed of localised invasive cervical carcinoma were included. Thirteen patients (21%) received, as main treatment, surgery and 49 (77%) radiotherapy. Four patients were not treated due to progression of the disease and bad conditions. Intratumoral microvessel density (IMD), as assessed by monoclonal antibody CD-31, and vascular endothelial growth factor (VEGF), were used for angiogenesis evaluation. Immunohistochemical techniques in paraffin embedded slides were used for this purpose. Intratumoral oxygen partial pressure (pO_2) is determined by use of the computerised polarographic electrode Eppendorf system (pO_2 Histograph 6650). Thirty patients were included in this study. The pO_2 measurements were defined as the pO_2 median and the hypoxic fraction (HP_{10}) (percentage of values $<10\text{mmHg}$). The relation between vascularisation and oxygenation parameters were analysed, as well as classical prognostic factors and proliferation (MI, ki67), apoptosis (AI) and related genes. Moreover, their influence as prognostic factors for response to the treatment and for survival were studied.

Results: An important correlation between IMD and VEGF expression was observed ($p<0.03$). Tumors with higher VEGF expression showed the highest vascularisation. No relation were observed with oxygenation. Angiogenesis was related to proliferation and apoptosis. In this way, tumors with higher VEGF expression had p53 overexpression ($p<0.026$), those with more IMD were related to high expression of bax ($p<0.05$), and an inverse relation between bcl-2 expression and VEGF ($p<0.07$) and IMD ($p<0.06$) were observed. Highly vascularised tumors were related to high MI ($p<0.01$) and low ki67 index ($p<0.01$). In relation with classic prognostic factors, age was related inversely to angiogenesis and oxygenation, with the highest values in the youngest patients ($p<0.02$, $p<0.06$). Histological type adenocarcinoma showed a trend to higher vascularisation and oxygenation, than epidermoid tumors ($p<0.09$, $p<0.03$). Response to radiotherapy could be assessed in 47/49 patients, and 36(77%) had complete response. Only IMD, cutted-off by the tertiles, was a predictive factor for survival ($p<0.03$).

Conclusions: The relevance of p53 and other genes in angiogenesis regulation (and related genes) have been demonstrated in our series in clinical tumors. Vascularisation has been a predictive factor for survival. More patients should be included in oxygenation measurements, to define accurately the relation with other prognostic factors.

INTRODUCCION

El carcinoma de cérvix continúa siendo una patología frecuente en nuestro medio, con una supervivencia global a 5 años del 60%. Cuando se produce el fallo local o a distancia, se asocia generalmente a un pronóstico sombrío (*Avall Lundqvist et al, 1997*). Existe, por tanto, la necesidad de identificar marcadores que reflejen la tasa de crecimiento y el potencial metastásico de cada tumor, de manera que se facilite la identificación de pacientes con bajo riesgo, a los que se les pueda ofrecer un tratamiento más conservador, y pacientes con alto riesgo a los que se les planteen tratamientos más intensivos (*Avall-Lundqvist et al, 1997*).

El crecimiento y la progresión tumoral dependen del desbalance entre proliferación y muerte celular (*Fontanini et al, 1998*). Además, el crecimiento tumoral es dependiente de la angiogénesis. El incremento de la proliferación celular necesita la inducción de nuevos capilares. Estos neovasos, además, aumentan la posibilidad de incorporación de las células tumorales al torrente circulatorio (*Folkman, 1995*). La adquisición del fenotipo angiogénico demarca dos fases en la evolución del tumor: la fase prevascular, conocida en tumores como el de cérvix, mama y vejiga, que puede durar años y se asocia a un crecimiento tumoral limitado y ninguna o escasas metástasis, y la fase vascular, que se caracteriza habitualmente por un crecimiento tumoral rápido y potencialmente metastásico (*Weidner et al, 1991*). La angiogénesis o neovascularización tumoral es, por tanto, un proceso necesario para la progresión y metastatización de los tumores.

Para la identificación y análisis de la neovascularización tumoral se pueden utilizar técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) frente a antígenos concretos. Existe una amplia variedad de anticuerpos (f-VIII, CD-31, CD-34). El anticuerpo monoclonal CD31 es capaz de identificar las células endoteliales, permitiéndonos la cuantificación de los vasos. Actualmente se considera el anticuerpo con mayor sensibilidad de los disponibles (*Parums et al, 1990; Horak et al, 1992; Schmidt et al, 1995*), aunque también se fija débilmente a fibroblastos, algunas células tumorales y plasmáticas (*Horak et al, 1992*). CD31 reacciona frente al Ag JC/70, una glicoproteína de membrana. La expresión de CD31 en carcinoma de cérvix es un factor pronóstico independiente para la supervivencia en algunos de los estudios realizados (*Dellas et al, 1997; Tjalma et al, 1998; Obermair et al, 1998*).

El desarrollo de la neovascularización está regulado por factores estimuladores (VEGF, b-FGF) e inhibidores (trombospondina, interferón alfa). El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) estimula la angiogénesis in vivo, y es probablemente el factor de crecimiento angiogénico más importante en tumores. El VEGF actúa

específicamente sobre las células endoteliales para inducir proliferación (*Dachs et al, 1998*). Su expresión aumenta en situaciones de hipoxia y con la privación de glucosa (*Shweiki et al, 1995*), siendo ambas situaciones frecuentes durante el crecimiento tumoral. De igual manera, la p53 anómala (presente en casi el 50% de los tumores humanos) es capaz de estimular la expresión de VEGF (*Kieser et al, 1994; Dameron et al, 1994*). No existen estudios publicados sobre el papel pronóstico de VEGF en carcinoma de cérvix.

La respuesta de los tumores a la radioterapia (RT) está relacionada directamente con la oxigenación, de manera que los tumores hipóxicos son 2.5-3 veces menos sensibles a la RT que los bien oxigenados. Se ha demostrado *in vitro*, que las consecuencias de la hipoxia son además de un aumento de la resistencia a la RT y a drogas, una disminución de la tasa de proliferación celular, y posiblemente un aumento del potencial invasivo y metastásico (*Höckel et al, 1993*). La hipoxia, además de estimular el VEGF, seleccionaría células con p53 no funcionante o con menor capacidad de apoptosis, lo que explicaría porqué tumores hipóxicos son más agresivos, con independencia del tratamiento utilizado (*Kim et al, 1997; Amellem et al, 1997*).

En los últimos años se dispone de métodos que nos permiten medir directamente la presión parcial de oxígeno (ppO₂) intratumoral. La técnica de electrodos polarográficos, ha sido considerada por el Instituto Nacional del Cáncer (USA), el método standard para la determinación de la oxigenación intratumoral. Los estudios realizados con esta técnica en tumores de cérvix, mama, y cabeza y cuello (*Pappova et al, 1982; Gatenby et al, 1988; Höckel et al, 1993; Sundfor et al, 1997*) han mostrado una correlación entre los bajos niveles de pO₂ y una pobre respuesta a RT.

Dadas las interacciones biológicas entre el desarrollo de neovasos y el crecimiento tumoral, invasión y metástasis, así como con la hipoxia, la cuantificación de la angiogénesis y la determinación de la oxigenación en los tumores clínicos podrían aportar datos muy útiles en relación con la evolución de la enfermedad. En este capítulo estimaremos la angiogénesis (CD31 y VEGF) y la oxigenación en el carcinoma invasivo de cérvix. Se estudiará la relación entre estas variables, su relación con factores pronósticos clásicos (estadío, volumen tumoral, edad, grado histológico) y con la proliferación, apoptosis y genes relacionados, así como su importancia como factor predictivo de respuesta y de supervivencia.

MATERIAL Y METODOS

Pacientes

Se incluyeron 66 pacientes entre julio-87 y abril-99. Todas las pacientes eran referidas desde el Comité de Tumores Ginecológicos en el que participan los Servicios de Oncología Ginecológica del H. Materno-Infantil, Oncología Médica del H. Ntra. Sra. del Pino y del H. Insular de Gran Canaria, y Oncología Radioterápica del H. Ntra. Sra. del Pino. En todos los casos se había realizado una biopsia para confirmación histológica del diagnóstico, que una vez conservada en parafina se utilizó para la determinación de técnicas de inmunohistoquímica (IHQ). Las pacientes se estadiaron siguiendo los criterios de la FIGO, realizándose exploración ginecológica y TAC abdomino-pélvico, y en los casos que fuera preciso rectoscopia y cistoscopia (capítulo 1). La estimación del tamaño tumoral se realizó mediante palpación bimanual. Todas las pacientes recibieron tratamiento radical con cirugía, RT o ambas. En 13 pacientes (21%) el tratamiento fue cirugía tipo Wertheim-Meigs (histerectomía abdominal con linfadenectomía pélvica), con preservación de ovarios en pacientes premenopáusicas. Siete pacientes recibieron RT adyuvante. En 49 pacientes (79%) se realizó RT radical. Se administraron 50 Gy sobre volumen pélvico, mediante 4 campos, utilizando técnica isocéntrica. Posteriormente se realizaron 1-2 aplicaciones de braquiterapia de baja tasa de dosis, administrándose 30-40 Gy al punto A. En 4 pacientes se realizó cirugía de rescate por enfermedad residual, y en 6 se utilizó QT-RT concomitante (CDDP, dosis 40 mg/m²/semana). Cuatro pacientes no recibieron tratamiento por enfermedad avanzada y mal estado general.

TABLA 1: Características de la serie (n=66).

	Nº Casos (%)
Estadio	
IB	24 (37)
II	34 (52)
III	8 (11)
Tipo Histológico	
Epidermoide	53 (80)
Adenocarcinoma*	13 (20)
Grado Histológico	
I	8 (13)
II	29 (45)
III	27 (42)
Desconocido	2
Tamaño (cm)	4.34±1.39; rango 2-7; IC 95% 3.78-4.79; mediana 4
Edad (años)	52.68±13.97; rango 27-78; mediana 51
Tratamiento	
Cx ± RT	13 (21)
RT ± QT ± Cx	49 (79)
No tratamiento	4

* Incluye 2 adenoescamosos. Cx: cirugía. RT: radioterapia. QT: quimioterapia.

Inmunohistoquímica

Para la realización de las distintas técnicas se obtuvieron secciones de 4 micras a partir de los bloques de parafina. Las muestras se desparafinan 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 inmunohistoquímica (IHQ) específica. En todas las técnicas se utilizó el kit de detección de DAKO LSBA (Carpintería, 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), 3º Ac streptavidin-peroxidasa (tiempo de incubación 30 minutos). El anticuerpo primario específico se pone después del blocking reagent. 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 valoración de la angiogénesis tumoral se utilizó el Ac monoclonal de ratón anti-CD31 (clona JC/70A, DAKO Diagnósticos, SA), que se expresa en las células endoteliales (Figura 1), y el Ac policlonal de conejo anti-VEGF (Santa Cruz Biotechnology, Inc), que se expresa en el citoplasma de las células tumorales (Figura 2). La proteína VEGF puede expresarse en algunas células epiteliales normales y en células inflamatorias, pero no en células endoteliales. La dilución utilizada para la detección de CD31 fue 1:50 y para el VEGF de 1:500, con un tiempo de incubación de 1 hora a temperatura ambiente en ambos casos. La valoración del CD31 se realizó siguiendo las recomendaciones internacionales (Vermeulen et al, 1996). Las áreas de mayor vascularización (hot spots) fueron seleccionadas a bajo aumento (40X). Los microvasos se contaron a mayor magnificación (400x), lo que representa un área de 0.18 mm² por campo. El resultado utilizado representa la suma de cuatro campos a 400X (área total: 0.72 mm²), y corresponde a la densidad intratumoral de microvasos (IMD). Cualquier célula endotelial o racimo de células endoteliales teñidas, claramente separadas de células tumorales o elementos conectivos, fue considerado un microvaso. No se realizan contajes en las zonas de necrosis ni en los bordes de la pieza. La valoración del VEGF se realizó eligiendo el campo de mayor expresión a 40X, estimando el porcentaje de células teñidas con 400X, dando lugar a cuatro grupos (0%, <30%, 30-60%, >60%). Se determinó la apoptosis, proliferación tumoral (índice de mitosis y ki67) y genes relacionados con apoptosis (p53, bax, bcl-2) mediante técnicas de IHQ descritas en el capítulo anterior (tabla 2).

TABLA 2: Técnicas utilizadas para la determinación de proliferación, apoptosis y genes relacionados y angiogénesis.

Determinación	Técnica (Ac)	Dilución y exposición	Tinción
CD-31	Dako Clona JC/70A mouse MC	1:50; 1 hora	Células Endoteliales
VEGF	Santa Cruz rabbit PC	1:500; 1 hora	Citoplasmática
Ki-67	Dianova1001mouse MC	1/100; 24 horas	Nuclear
P53	Biogenex D07mouse MC	1/100; 24 horas	Nuclear
Bax	Santa Cruz SC-493 rabbit PC	1/50 1 hora	Citoplasmática
Bcl-2	Dako 124 mouse MC	1/50 2 horas	Citoplasmática
IA	Hematoxilina-eosina		
IM	Hematoxilina-eosina		

Figura 1. Técnica de inmunohistoquímica, mediante CD-31, empleada en la valoración de la neovascularización tumoral.

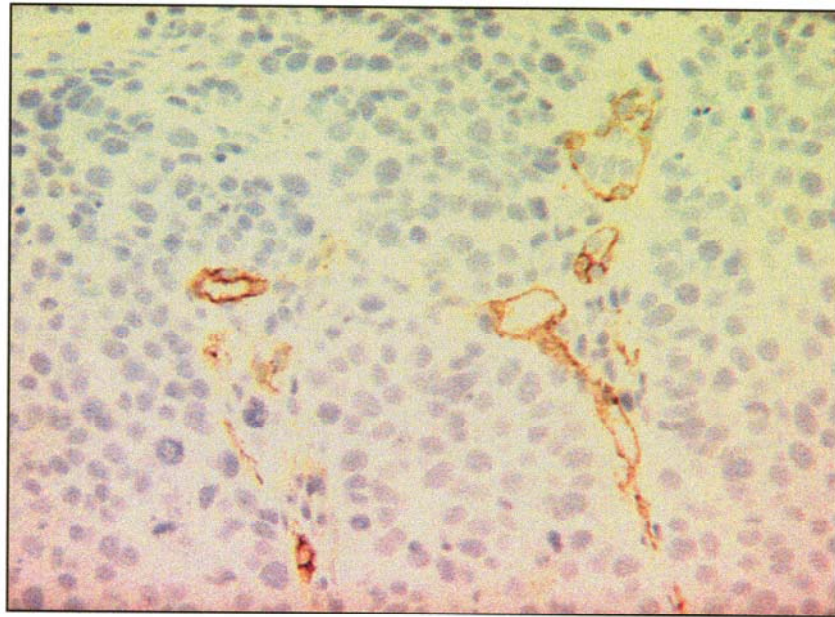
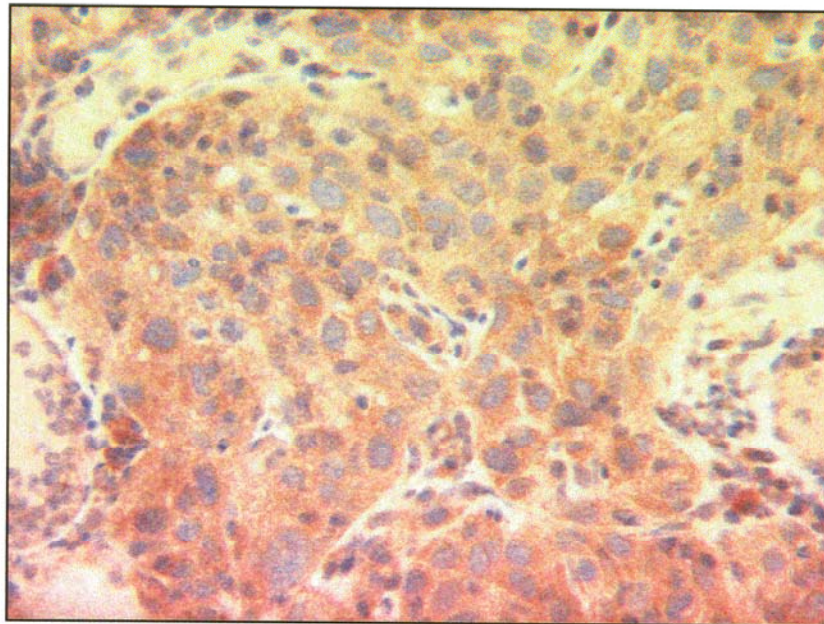


Figura 2. Técnica de inmunohistoquímica empleada en la valoración de VEGF: tinción citoplasmática.



Oxigenación

Se incluyeron 30 pacientes en el estudio de determinación de la oxigenación tumoral. Este estudio es financiado por una beca FIS (proyecto 98-1035: Factores predictores de respuesta a radioterapia en cáncer de cérvix), incluyendo pacientes desde marzo-1997 hasta marzo-1999. Se utilizó un sistema computarizado de electrodos polarográficos marca Eppendorf (pO_2 Histogram 6650). Este sistema produce una lesión mínima en los tejidos, sin repercusión en las medidas de pO_2 (Lartigau et al, 1992). El electrodo tiene un diámetro de 0.5 mm (0.3 mm en la punta), conteniendo un microcátodo de oro de 17 micras. El electrodo avanza en pasos de 0.7 mm, profundizando 1 mm y retrocediendo 0.3 mm ("pilgrim step"), para minimizar artefactos por compresión vascular. Cada determinación se realiza en menos de 1.4 segundos. La pO_2 medida, pertenece al espacio extracelular de un volumen de muestra de 12 micras de diámetro, correspondiendo a 50-100 células por cada determinación, lo que le confiere una alta resolución espacial. Antes y después de cada serie de medidas, se debe realizar la calibración en una cámara que contiene suero fisiológico estéril al 0.9%, con pH=7.8. Por esta solución se hace pasar, a través de un filtro estéril, aire y nitrógeno al 100%. Se consigue así una alternancia de presiones parciales de oxígeno conocidas (21% y 0%). El equipo hace una interpolación entre la calibración previa y la posterior a las medidas, para corregirlas automáticamente. En la calibración posterior se tiene también en cuenta la temperatura intratumoral, que se determina una vez finalizadas las medidas.

A través del ánodo de la cámara se genera un voltaje de polarización de 700 mV. La reducción electroquímica de las moléculas de oxígeno, en el extremo del electrodo, causa un incremento de la corriente. Este aumento, es proporcional al número de moléculas de oxígeno que son reducidas en la solución de electrolitos, y en su momento, a la del tejido que mida (técnica de amperimetría).

La técnica se realiza 1-7 días antes del inicio del tratamiento. La paciente se coloca en posición de litotomía (muslos flexionados 90°; abducción 45°; piernas en horizontal). Mediante un espéculo se localiza la lesión y se introduce el electrodo 5 mm en el seno del tumor, iniciándose la medición. La longitud del trayecto depende del tamaño del tumor (medido clínicamente) y generalmente se fija en 1.6-2cm. Se hacen 6 trayectos que corresponden a unas 200 medidas, obteniéndose un histograma de pO_2 con un rango de 0-100mmHg (Figura 3 y 4). La duración del procedimiento es de 15-20 minutos, sólo las medidas, y con ambas calibraciones varía entre 45-60 minutos. No precisa anestesia y se debe realizar con medidas de asepsia. Los datos de oxigenación se definen como la media, la mediana y como fracción hipóxica, definida esta última como el porcentaje de valores de $pO_2 < 10\text{mmHg}$ (HP_{10}).

Figura 3:
Histograma de
pO₂ en un tumor
bien oxigenado.

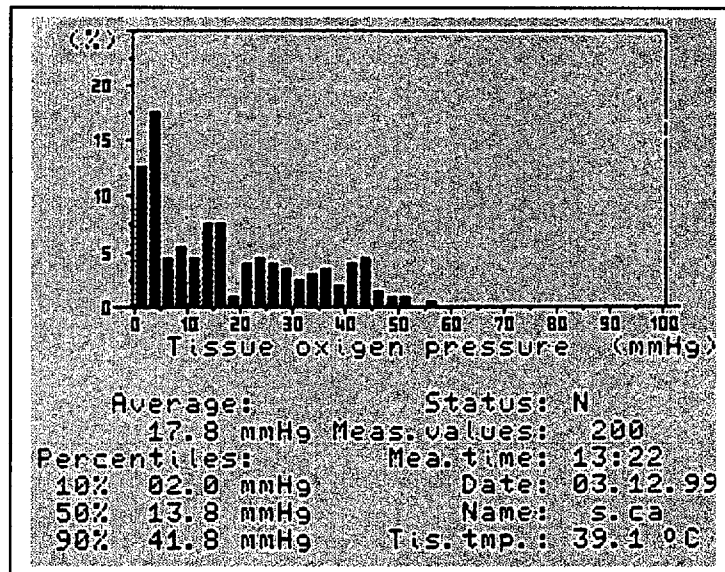
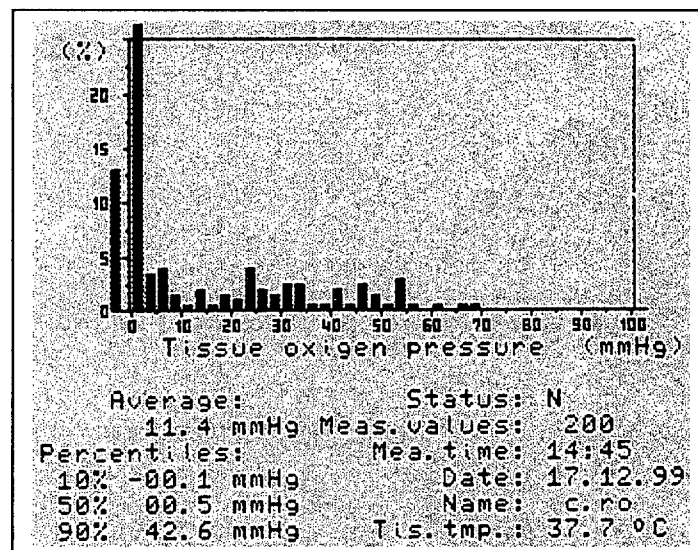


Figura 4:
Histograma de
pO₂ en un tumor
hipóxico.



Estadística

Para el análisis estadístico se utilizó el software SOLO. El análisis de la correlación de IMD y la expresión de VEGF con los factores clásicos de pronóstico se realizó mediante los test de correlación de Pearson, de Spearman, test de Chi² y Kruskal-Wallis. Los valores correspondientes a la mediana fueron utilizados como punto de corte en los análisis estadísticos. Las curvas de control local y de supervivencia causa-

específica se construyeron según el método de Kaplan-Meier y fueron comparadas con el log-rank test. Para el análisis multivariante se realizó un test de regresión múltiple de Cox.

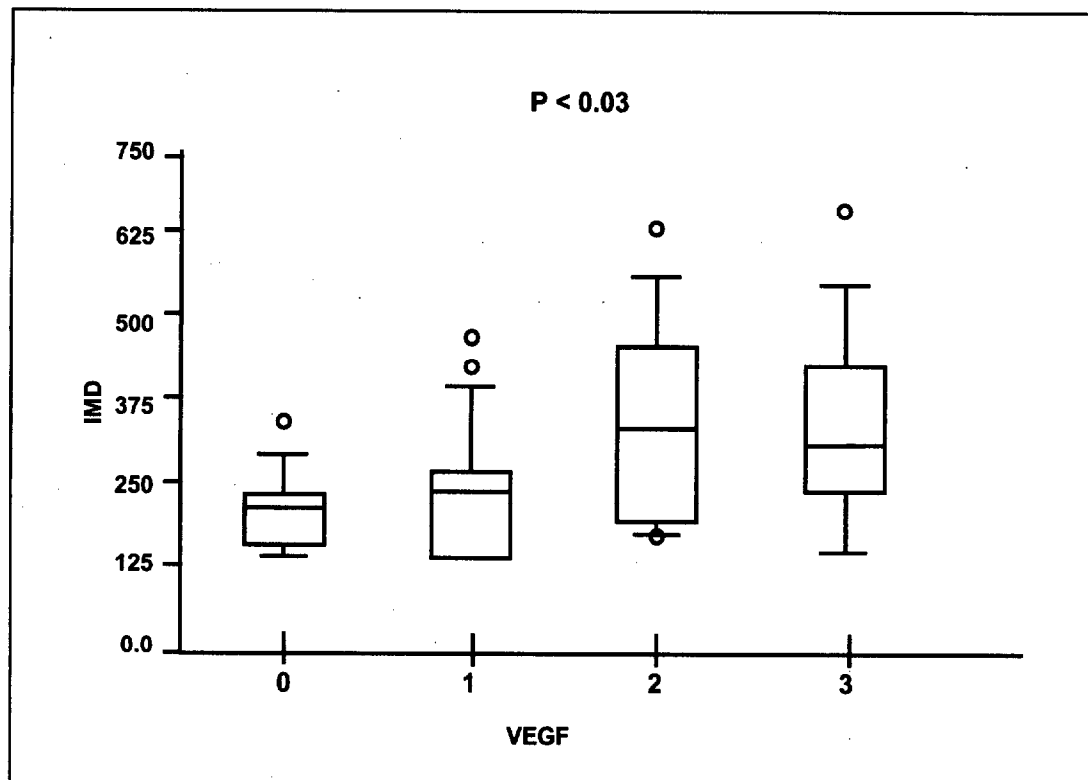
RESULTADOS

La expresión de VEGF se detectó en 50/66 casos (76%), expresándose en <30% de las células tumorales en 21 muestras (33%), entre 30-60% en 13 muestras (21%), y en >60% de las células tumorales en 14 (22%) de las muestras analizadas (tabla 3). Se pudo determinar el número de vasos en todas las muestras excepto en seis, por no ser valorables las tinciones. La densidad media intratumoral (vasos/0.72mm²) fue de 172.16 microvasos, con una mediana de 125. Los resultados de la determinación de la proliferación, apoptosis y genes reguladores se detallan en la tabla 3, y son similares a los previamente descritos (capítulo VI).

TABLA 3: Resultados obtenidos en la determinación de las distintas variables de nuestra serie.

	Media $\pm$ D.E. (Rango)	IC 95%	Mediana
IMD (n=60)	172.16 $\pm$ 171.52 (0-688)	128.44-217.08	125
IA (n=63)	1.82 $\pm$ 1.16 (0.38-6.89)	1.53-2.12	1.56
IM (n=62)	1.39 $\pm$ 0.77 (0.20-3.82)	1.22-1.61	1.28
Ki67 (n=63)	37.12 $\pm$ 19.9 (0-78)	31.81-41.83	35
P53 (n=65)	17.83 $\pm$ 21.15 (0-96)	12.6-23.07	10.6

Se observó una correlación importante entre la densidad de microvasos y la expresión de VEGF ($p < 0.03$), de manera que los tumores con mayor expresión de VEGF fueron los más vascularizados (Figura 5).

Figura 5: Relación entre la expresión de VEGF y angiogénesis.

La expresión de bax, bcl-2, p53, así como la proliferación (IM, ki67), se relacionó con la vascularización (tabla 4). Los tumores con mayor vascularización (IMD) expresaron más oncoproteína bax ($p < 0.05$), con tasas de proliferación (ki67) bajas ($p < 0.01$, $r = -0.32$) e IM elevados ($p < 0.01$, $r = 0.32$). La expresión de VEGF se relacionó directamente con p53 ($p < 0.026$). Los valores de bcl-2 presentaron una tendencia a relacionarse de forma inversa con la neovascularización tumoral, de manera que los tumores con menor expresión de VEGF y menor vascularización presentaban sobreexpresión de bcl-2 ($p < 0.07$ y $p < 0.06$, respectivamente).

TABLA 4: Relación entre vascularización y apoptosis, proliferación y genes reguladores (valor de p).

	IA	IM	Ki-67	P53	Bax	Bcl-2
VEGF	0.15	0.69	0.82	0.026	0.43	0.07
IMD	0.95	0.01 ($r = 0.32$)	0.01 ($r = -0.32$)	0.56	0.05	0.06

Se realizó el análisis de IMD y VEGF con respecto a los factores clásicos (edad, tamaño tumoral, estadio, grado y tipo histológico) (tabla 5). Se observó una correlación inversa entre la densidad de microvasos intratumoral y el VEGF con la edad, de manera que las pacientes más jóvenes presentaban tumores más vascularizados ($p < 0.02$, $r = -0.29$ y $p < 0.07$, respectivamente). Con respecto al tipo histológico, los tumores de tipo adenocarcinoma tienen una tendencia a una mayor expresión de VEGF que los epidermoides ($p < 0.09$). No se observa relación de la IMD con el tamaño, pero si dividimos la IMD en tertiles, observamos una tendencia a relacionarse directamente con el tamaño tumoral, presentando mayor densidad de microvasos aquellos tumores con mayor tamaño ($p < 0.07$).

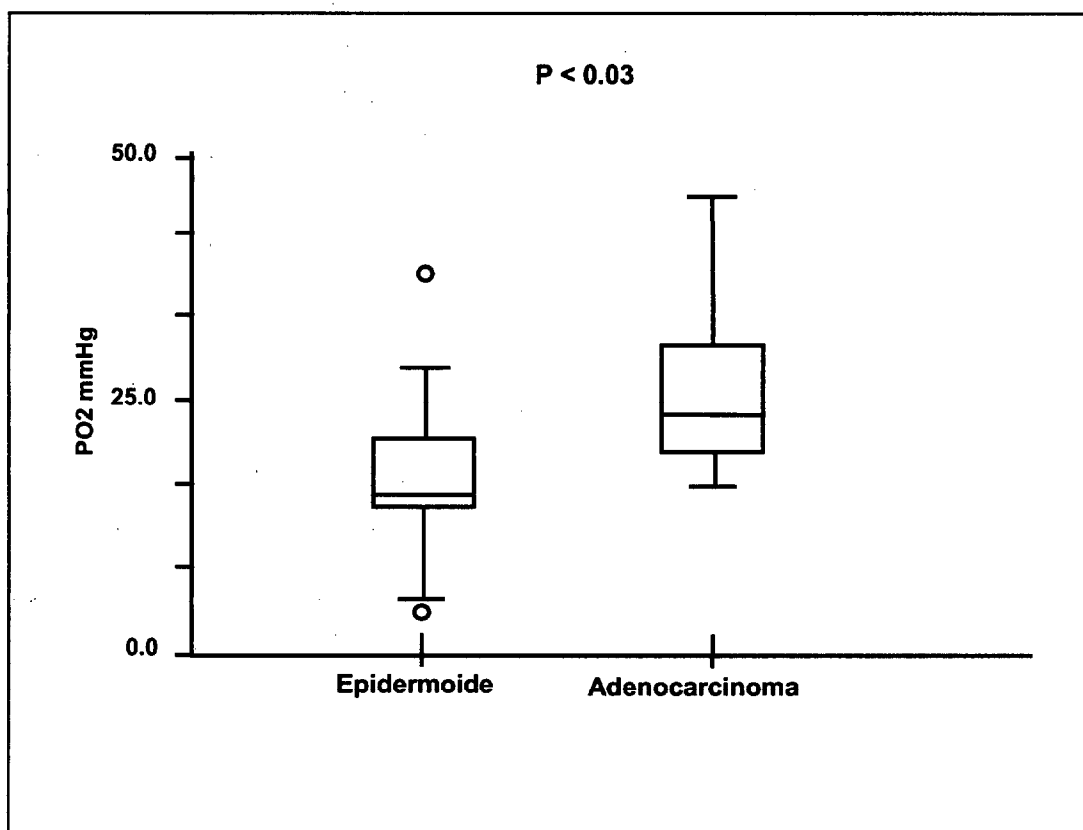
TABLA 5: Relación de la vascularización y oxigenación con factores pronósticos clásicos y respuesta (valor de p).

	Edad	Estadio	Tamaño	Grado Hist	Histolog	Respuesta
IMD	0.02 ($r = -0.29$)	0.83	0.07*	0.74	0.13	0.77
VEGF	0.07	0.13	0.97	0.73	0.09	0.32
O₂ median	0.06 ($r = -0.40$)	0.80	0.94	0.13	0.03	0.62
HP₁₀	0.09 ($r = 0.37$)	0.81	0.66	0.17	0.07	0.46

*IMD dividido en tertiles.

De las 30 pacientes incluidas en el estudio de oxigenación, se pudo realizar la determinación en 27 pacientes (tres no aceptaron el procedimiento por ansiedad). No se observaron complicaciones secundarias al procedimiento, siendo bien tolerada por todas las pacientes. Para estimar la oxigenación intratumoral, se eligió la mediana de las 200 determinaciones realizadas en cada paciente y el porcentaje de células con $pO_2 < 10 \text{ mmHg}$ (HP₁₀). Los valores de la mediana de pO_2 estuvieron entre 0.9-41.9 mmHg, con una media de 10.42 mmHg y una mediana de 5.4 (IC 95% 6.05-14.79). El porcentaje medio de células hipóxicas en los tumores fue del 59.95%, con una mediana de 55 (IC 95% 47.62-64.28). Ambos parámetros estaban estrechamente relacionados ($p < 0.00001$). No se encontró relación entre la oxigenación intratumoral y la vascularización, ni con ninguna de las oncoproteínas estudiadas. Se analizó la relación entre oxigenación y factores pronósticos clásicos (tabla 5), observándose una tendencia en las pacientes jóvenes a presentar tumores más oxigenados ($p < 0.06$). Además, los adenocarcinomas presentaban una mediana de pO_2 mayor ($p < 0.03$), es decir, estaban mejor oxigenados que los tumores epidermoides (Figura 6).

Figura 6: Oxigenación tumoral según tipo histológico.



Al concluir el estudio, se pudo valorar la respuesta en 47 de las 49 pacientes tratadas con radioterapia. En 36 pacientes (77%) se obtuvo RC, y en 11 pacientes no se consiguió RC o la enfermedad progresó. Ninguno de los parámetros de angiogénesis ni la oxigenación intratumoral, fueron predictivos de respuesta.

Para el análisis del control local se incluyeron los factores clásicos y las variables relacionadas con neovascularización (IMD y VEGF) y oxigenación (O_2 mediana y HP_{10}) (tabla 6). En el análisis univariante sólo el estadio ($p < 0.002$) fue factor predictivo para el control local.

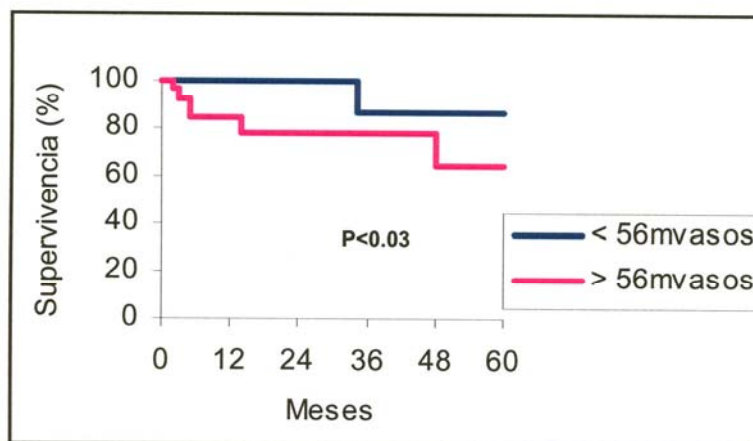
El seguimiento medio de las pacientes vivas fue de 31.8 meses (3-115 meses). El único factor pronóstico significativo de supervivencia fue la angiogénesis, si dividíamos el grupo en tertiles ($p < 0.03$) (Figura 7). Efectivamente, la supervivencia a 1, 3 y 5 años de las pacientes con bajo nivel de vascularización (< 56 microvasos) fue de 100%, 87% y 87%, respectivamente, frente a sólo el 84%, 78% y 65% en las pacientes con alta densidad vascular intratumoral (> 56 microvasos).

Tabla 6: Factores Predictivos de Control Local y Supervivencia.

	Control Local (valor de p)	Supervivencia (valor de p)
Edad	0.46	0.97
Estadío	0.001	0.19
Grado Histológico	0.61	0.09
Tipo Histológico	0.26	0.73
Tamaño	0.50	0.27
IMD	0.62	0.03*
VEGF	0.42	0.53
O ₂ median	0.64	0.38
HP ₁₀	0.79	0.24

IMD* dividido en tertiles.

Figura 7: Curva de supervivencia en relación con densidad intratumoral de microvasos, dividida por tertiles.



DISCUSION

La angiogénesis es un proceso necesario para la progresión de la enfermedad y el desarrollo de la invasión y metastatización. Este es un fenómeno de regulación compleja, íntimamente ligado a la expresión de genes activadores (VEGF, b-FGF) o inhibidores (TSP-1, IF- α). A su vez, estos genes están influidos en su expresión por genes reguladores de los procesos de proliferación y apoptosis (*Kieser et al, 1994; Dameron et al, 1994; Claffey et al, 1996*).

Efectivamente, la expresión del factor de crecimiento endotelial (VEGF) en los tumores de cérvix que componen nuestra serie, se ha relacionado con una mayor neovascularización (densidad intratumoral de microvasos) (*Dobbs et al, 1997; Tokumo et al, 1998; Kodama et al, 1999*), pero a su vez la expresión de VEGF era mayor en tumores con sobreexpresión de p53 o que no expresaban bcl-2, características ambas asociadas a fenotipos de progresión tumoral (capítulo 5). Parece confirmarse en nuestra serie de tumores clínicos, lo ya observado en modelos experimentales (*Claffey et al, 1996*), explicando además el papel favorable de la sobreexpresión de bcl-2 en cuanto a supervivencia observada en nuestra serie.

El fenómeno de angiogénesis estimado mediante CD-31, ha sido más evidente en tumores que sobreexpresaban bax y no sobreexpresaban bcl-2. Conceptualmente, por tanto, los peores resultados clínicos observados en situaciones relacionadas /coincidentes con alta apoptosis (p53 y bax sobreexpresados, bcl-2 no expresado) en tumores de cérvix (*Levine et al, 1995; Crawford et al, 1998; Pillai et al, 1999*) y en otras localizaciones (*Apolinario et al, 1997; Lera et al, 1998; Lara et al, 1999*), coinciden con una mayor expresión de factores de crecimiento y angiogénesis.

Niveles elevados de apoptosis se relacionan con elevada proliferación (*Levine et al, 1995; Chyle et al, 1996; Lera et al, 1998*), pudiendo ser simplemente una expresión más de un fenotipo agresivo. Sin embargo, podría representar un ejemplo de alteraciones microambientales que llevan a mayor muerte celular y a la aparición de clones que estimulan la vascularización, para escapar mediante la metastatización de un ambiente hostil.

Este hecho parece confirmarse cuando estudiamos la expresión de VEGF según la estirpe histológica. Los adenocarcinomas, tumores que mostraron mayores tasas de apoptosis que los epidermoides, también parecen expresar VEGF en mayor medida, hecho recientemente publicado por otros autores (*Tokumo et al, 1998; Santin et al, 1999*). Además los adenocarcinomas, no sólo de cérvix, sino de otras localizaciones (pulmón, próstata, mama), suelen mostrar mayores tasas de metastatización que los

tumores epidermoides (*Horak et al, 1992; Machiarini et al, 1992; Barbareschi et al, 1994*).

Una de las características del microambiente tumoral es el grado de hipoxia en el que viven las células de la neoplasia. La cantidad de oxígeno intratumoral podría modificar la expresión de factores reguladores de la progresión tumoral (*Höckel et al, 1993; Rockwell et al, 1997; Dachs et al, 1998*).

En nuestra serie no hemos podido encontrar relación entre hipoxia y alteración en la expresión génica de ciertos tumores, ni entre oxigenación y vascularización. Sin embargo, esa relación parece entorse de forma indirecta por la relación observada entre vascularización y oxigenación en función de la edad. Los tumores de las mujeres mayores eran de menor tamaño (capítulo 3), mostrando un menor número de vasos y menores tasas de oxigenación, lo que podía justificar las diferencias de conducta biológica, observada por algunos autores entre mujeres jóvenes o mayores (*Chen et al, 1996; Garzetti et al, 1997*).

Finalmente, la vascularización ha resultado ser un factor pronóstico relevante de supervivencia, incluso superior a algunos factores clásicos (*Dellas et al, 1997; Obermair et al, 1998; Cooper et al, 1999*). Se confirma por tanto en nuestra serie, el papel de la vascularización como marcador de progresión tumoral. La inclusión de un mayor número de casos en estudios de oxigenación tumoral, son imprescindibles para conocer la importancia real de este fenómeno, en la predicción de respuesta en los tratamientos oncológicos en carcinoma de cérvix.

Capítulo VII

Resumen y discusión general

El carcinoma de cérvix continúa siendo una neoplasia frecuente en nuestro medio. Las campañas de screening, mediante test de Papanicolaou y exploración ginecológica, han conseguido el diagnóstico y tratamiento de lesiones precursoras y del carcinoma en estadios iniciales. Sin embargo, a pesar de este esfuerzo, la tasa de incidencia continúa siendo elevada y la supervivencia global no se ha modificado en los últimos años. La radioterapia continúa siendo el tratamiento de elección en la mayoría de los estadios.

El estudio de determinadas características que nos ayuden a definir el curso evolutivo de un tumor en cada paciente en concreto, y que nos permita adaptar nuestros esquemas terapéuticos a la conducta de ese tumor, es una constante en la investigación oncológica actual.

En nuestra serie se analizó un grupo homogéneo de pacientes con carcinoma epidermoide de cérvix, tratadas de forma radical con radioterapia, lo que nos podría permitir reconocer con mayor claridad el papel de otros posibles factores pronósticos. Se pudo observar una relación directa entre el tamaño del tumor, el estadio clínico y la afectación ganglionar estimada por TAC, hecho que había sido descrito por algunos autores, pero que alcanza una claridad significativa en nuestro estudio. El análisis de estos factores en relación al control local, nos mostró el papel relevante de la masa tumoral, estimada mediante el tamaño tumoral y el estadio clínico. La supervivencia causa-específica a 1, 5 y 10 años fue del 85%, 67% y 62%, similar a las publicadas. El factor pronóstico más importante para la supervivencia, fue la respuesta tras la irradiación, como era de esperar en un tumor de crecimiento locorregional. Las pacientes que no obtuvieron respuesta tras la RT, fallecieron a corto plazo. Además de este factor de carácter puramente local, el estadio y la presencia de adenopatías resultaron de utilidad en la predicción de aquellos casos que, además de grandes posibilidades de fallo local, podían fallecer por diseminación de la enfermedad fuera del campo de tratamiento.

Los resultados de este primer análisis parecen confirmar, por tanto, la importancia de la extensión tumoral, en la respuesta a la irradiación y como factor predictivo de supervivencia. Sin embargo, pacientes con tumores del mismo tipo histológico e igual estadio, pueden tener una evolución muy diferente.

A continuación analizamos un subgrupo de pacientes en las que se estudió la expresión sérica de varios marcadores tumorales. El SCC-Ag estimado al momento del diagnóstico mostró una estrecha relación con el tamaño tumoral y el estadio, por lo

que su valor en la predicción de supervivencia se pierde en el análisis multivariante, a favor de la extensión de la enfermedad. Su determinación post-tratamiento se relacionó estrechamente con la existencia de enfermedad residual, clínica o subclínica. Así, la normalización de los niveles de SCC-Ag post-tratamiento se relacionó estrechamente con la obtención de remisión clínica completa ($p < 0.0002$). Lo más relevante de este análisis fue el impacto que, marcadores considerados propios de adenocarcinoma, como el Ca 125, el Ca 19.9 y el CEA, tuvieron en la supervivencia. El Ca 125 se relacionó con la respuesta a la irradiación, con el control local, pero especialmente con la supervivencia, siendo significativa esta relación en el análisis multivariante ($p < 0.0043$). Todas las pacientes con Ca 125 elevado pretratamiento, fallecieron en un corto plazo debido a su tumor. Esta relación, sugerida en estudios que incluían tumores de estirpe adenocarcinoma, permite identificar un grupo de alto riesgo en aquellas pacientes con Ca 125 elevado, que podría justificar la utilización de tratamientos más agresivos.

Sin embargo resultaba evidente, que era necesario analizar otras características biológicas, presentes en el mismo tumor, que pudieran ampliar nuestro conocimiento de la conducta biológica de los mismos. El estudio del papel que la proliferación (índice mitótico y ki67), la apoptosis (índice mitótico) y las oncoproteínas relacionadas (p53, bcl-2, bax) tienen en el carcinoma invasivo de cérvix, y su relación con la angiogénesis tumoral, representan un intento más de caracterizar cada caso concreto. Hemos podido observar que la expresión de los genes que regulan el fenómeno de la apoptosis se ha asociado a fenotipos agresivos (p53 y bax sobreexpresados, bcl-2 no expresado), confirmando lo ya observado por nuestro grupo y otros autores, en cuanto al papel pronóstico negativo que parece asociarse a tumores con alta tasa de apoptosis. De esta forma, los tumores de tipo histológico adenocarcinoma, que muestran una mayor tendencia a la metastatización, tenían una mayor tasa de apoptosis que los tumores epidermoides. A su vez, la proliferación mostraba características inversas. Altas tasas de apoptosis y de proliferación se han asociado en nuestra experiencia, con peores resultados clínicos tras irradiación en carcinoma de laringe y vejiga, en series ambas compuestas por una sola estirpe histológica (epidermoide, transicional). Sin embargo, en carcinoma de cérvix y pulmón, el papel de la apoptosis parece depender del tipo histológico. Ha sido la repoblación tumoral durante la irradiación, el único factor pronóstico junto al estadio, capaz de predecir el control inducido por irradiación, confirmándose una vez más, lo ya observado en otras localizaciones tumorales: la determinación de la proliferación mediante ki67 es un método fiable y sencillo, y al alcance de cualquier laboratorio.

Pero los genes que regulan estos procesos, se han mostrado relacionados con la adquisición de la capacidad angiogénica, paso previo para la metastatización. Así la sobreexpresión de p53 y la expresión normal de bcl-2 se han relacionado en nuestra serie de tumores clínicos con mayor expresión de VEGF, potente factor inductor de la neovascularización en modelos experimentales. Este a su vez ha inducido nuevos vasos, estimados mediante CD-31. Este fenotipo tumoral vascular (CD-31 positivo) se ha asociado también con sobreexpresión de bax y alteraciones de la proliferación. En conjunto, las pacientes que portaban tumores con alto número de neovasos, han tenido peor supervivencia en nuestra serie.

Los tumores con alta proporción de células hipóxicas, tienen bajas tasas de respuesta a radioterapia, pero sobre todo tienen bajas tasas de control, incluso con cirugía. Las alteraciones del microambiente tumoral, pueden llevar a una mayor expresión de VEGF, que permitan la aparición de neovasos, que se comportarían como vías de escape de las células tumorales, de un tumor primario con condiciones ambientales hostiles. Si bien no hemos podido encontrar una relación directa entre hipoxia y expresión de VEGF o CD-31, es verdad, que ambos procesos parecen relacionarse de forma indirecta en función de la edad o el tipo histológico. Efectivamente, las mujeres jóvenes o con tumores tipo adenocarcinoma, parecían mostrar tumores con mayor expresión de VEGF y/o vascularización y mayor oxigenación.

Concluyendo, los tumores de cérvix uterino tienen características biológicas complejas que pueden ser útiles, no sólo en cuanto a la ampliación del conocimiento y a la corroboración en la realidad clínica, de procesos definidos en modelos experimentales muy controlados, sino que nos permiten definir, que junto a la conocida extensión de la enfermedad, la expresión de Ca 125, la estimación de la proliferación y la neoformación vascular, pueden ser factores predictivos de utilidad para incrementar la individualización de los tratamientos y mejorar la supervivencia de nuestras enfermas.

Conclusiones

Conclusiones:

1. Dentro de los factores clásicos de pronóstico, el estadio clínico, según la clasificación de la FIGO, continúa siendo el factor clásico de pronóstico más relevante, tanto para el control local como para la supervivencia, en las pacientes con carcinoma epidermoide de cérvix tratadas de forma radical con radioterapia.
2. Los niveles séricos de SCC-Ag se relacionan bien con el volumen tumoral, siendo útil en la definición de la extensión del tratamiento, pero los niveles de Ca 125, parecen responder a características biológicas propias del tumor, que han sido más relevantes que el propio estadio en la predicción de los resultados clínicos. La intensificación de los protocolos terapéuticos en estos casos es prioritaria.
3. La proliferación, estimada mediante ki67, ha sido un factor predictivo de respuesta y control local, junto al estadio clínico. La repoblación tumoral durante la irradiación se comporta como un factor limitante de control local. La utilización de esquemas acelerados de fraccionamiento o la combinación con otras armas terapéuticas, podrían ser opciones alternativas a considerar.
4. El papel de la angiogénesis en el crecimiento tumoral e inicio de la cascada metastásica, ha sido puesta de manifiesto. La distinta participación de genes reguladores de estos procesos, indican la complejidad de análisis de los mismos.
5. Los adenocarcinomas de cérvix son tumores morfológica y biológicamente muy distintos a los tumores epidermoides de la misma localización. La diferente expresión de los fenómenos de apoptosis, proliferación, angiogénesis y oxigenación, justificarían la diferente conducta biológica atribuida a cada uno de estos tipos histológicos.



BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA:

- Abe A, Nakano T, Morita S, Oka K. Clinical evaluation of serum and immunohistochemical expression of SCC and Ca 19.9 in radiation therapy for cervical cancer. *Anticancer Res* 1999; 19 (1B):829-836.
- Abulafia O, Triest WE, Sherer DM. Angiogenesis in squamous cell carcinoma in situ and microinvasive carcinoma of the uterine cervix. *Obstet Gynecol* 1996; 88(6): 927-932.
- Ackerman LV, del Regato JA. *Cancer: Diagnosis, Treatment, and Prognosis*, pp 717-819. St Louis, CV Mosby, 1977.
- Agani F, Kirsch DG, Friedman SL, Kastan MB, Semenza GL. P53 does not repress hypoxia-induced transcription of the vascular endothelial growth factor gene. *Cancer Res* 1997; 57(20): 4474-4477.
- Agarwal SS, Sehgal A, Sardana S. Role of male behavior in cervical carcinogenesis among women with one lifetime sexual partner. *Cancer* 1993; 72: 1666-1669.
- Aihara M, Scardino PT, Truong LD. The frequency of apoptosis correlates with the prognosis of Gleason grade 3 adenocarcinoma of the prostate. *Cancer* 1995; 75: 522-529.
- 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.
- Amellem O, Stokke T, Sandvik JA, Smedshammer L, Pettersen EO. Hypoxia-induced apoptosis in human cells with normal p53 status and function, without any alteration in the nuclear protein level. *Exp Cell Res* 1997; 232(2): 361-370.
- Anderson B, LaPolla J, Turner D. Ovarian transposition in cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1993; 49:206-214.
- Atlas TNM. Cuello Uterino. En: Hermanek P, Hutter RVP, Sobin LH, Wagner G, Wittekind Ch, eds. Cuarta edición. Springer-Verlag Ibérica S.A., 1998; 228-238.
- Apolinario RM, van der Valk P, de Jong H, Deville W, van der Oude J, Dingemans AM, et al. Expression of p53, bcl-2, bax and CD-31 in patients with radically resected non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1997; 15: 2456-2466.
- Avall-Lundqvist EH, Silfversward C, Aspenblad U, Nilsson BR, Auer GU. The impact of tumour angiogenesis, p53 overexpression and proliferative activity (MIB-1) on survival in squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* 1997; 33(11):1799-1804.
- Avall-Lundqvist EH, Sjoval K, Nilsson BR, Eneroth PH. Prognostic significance of pretreatment serum levels of squamous cell carcinoma antigen and Ca 125 in cervical carcinoma. *Eur J Cancer* 1992; 28A(10): 1695-1702.
- Bae SN, Namkoong SE, Jung JK, Kim CJ, Park JS, Kim JW, et al. Prognostic significance of pretreatment squamous cell carcinoma antigen and carcinoembryonic antigen in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 1997; 64(3): 418-424.
- Baltzer J, Lohe KJ, Kopcke W. Histological criteria for the prognosis in patients with operated cell carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 1982; 13: 184-194.
- Barbacid B. Ras oncogene: Their role in neoplasia. *Eur J Clin Invest* 1990; 20: 225-235.
- Barbareschi M, Palma PD, Bevilacqua P. Invasive node-negative breast carcinoma: multivariate analysis of the prognostic value of peritumoral vessel invasion compared with that of conventional clinico-pathologic features. *Anticancer Research* 1994; 14: 2229-2236.
- Barron BA, Richart RM. Statistical model of the natural history of cervical carcinoma:II. Estimates of the transition time from dysplasia to carcinoma in situ. *J Natl Cancer Inst* 1970; 1025-1030.
- Bast RC Jr, Klug TI, St John E. A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 1983; 309: 883.
- Battaglia F, Scambia G, Panici PB, Castelli M, Ferrandina G, Foti E, et al. Immunosuppressive acidic protein (IAP) and squamous cell carcinoma antigen (SCC) in patients with cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1994; 53(2): 176-182.
- Benedetti-Panici P, Maneschi F, Scambia G. Lymphatic spread of cervical cancer: an anatomical and pathological study based on 225 radical hysterectomies with systematic pelvic and aortic lymphadenectomy. *Gynecol Oncol* 1996; 62: 19-24.
- Berman ML, Bergen S, Salazar H: Influence of histological features and treatment on the prognosis of patients with cervical cancer metastatic to pelvic lymph nodes. *Gynecol Oncol* 1990; 39: 127-131.
- Berman ML, Keys H, Creasman W. Survival and patterns of recurrence in cervical cancer metastatic to periaortic lymph nodes: a Gynecologic Group study. *Gynecol Oncol* 1984; 19: 8-16.
- Bevilacqua G, Sobel ME, Liotta LA, Steeg PS. Association of low nm23 RNA levels in human primary infiltrating ductal breast carcinomas with lymph-node involvement and other histopathological indicators of high metastatic potential. *Cancer Res* 1989; 49: 5185-5190.
- Bissonette RP, Echevarri F, Mahboubi A, Green DR. Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature* 1992; 359: 552-554.
- Bolger BS, Dabbas M, Lopes A, Monaghan JM. Prognostic value of preoperative squamous cell carcinoma antigen level in patients surgically treated for cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1997; 65 (2): 309-313.
- Bolger BS, Symonds RP, Stanton PD, MacLean AB, Burnett R, Kelly P, et al. Prediction of radiotherapy response of cervical carcinoma through measurement of proliferation rate. *Br J Cancer* 1996; 32(5): 1223-1226.
- Bolla M, Salvat J, Sarrazin R, Fyon JF, Berland E, Schmidt MH, et al. Feasibility of retroperitoneal pelvic lymph node exploration in cervical carcinoma. Assessment of morbidity in 33 cases treated by

- combined radio-surgery or definitive radiotherapy. *Radiother Oncol* 1996; 40 (3): 233-239.
- Bolli JA, Doering DL, Bosscher JR, Day TG Jr, Rao CV, Owens K, et al. Squamous cell carcinoma antigen: clinical utility in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 1994; 55(2): 169-173.
- Bonfrer JM, Gaarenstroom KN, Korse CM, Van Bunningen BN, Kenemans P. Cyfra-21, in monitoring cervical cancer: a comparison with tissue polypeptide antigen and squamous cell carcinoma antigen. *Anticancer Res* 1997; 17(3C): 2329-2334.
- Bonn D, Bradbury J. The warts and all aproach to tackling cervical cancer. *The Lancet* 1998; 351: 810.
- Bonomi P, Blessing J, Ball H. A phase II evaluation of cisplatin and 5fluorouracil in patients with advanced squamous cell carcinoma of the cervix: a Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecol Oncol* 1989; 34: 357-359.
- Boronow RC. Advances in diagnosis, staging, and management of cervical and endometrial cancer, stages I y II. *Cancer* 1990; 65:648-659.
- Borras G, Molina R, Xercavins J, Ballesta A, Iglesias J. Tumor antigens Ca 19.9, Ca 125 and CEA in carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 1995; 57(2): 205-211.
- Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, and the International Biological Study of Cervical Cancer (IBSCC) Study Group: Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: A worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 796-802.
- Bosch FX, Muñoz N, Sanjosé S, Izarzugaza I, Gili M, Viladía P, et al. Risk factors for cervical cancer in Colombia and Spain. *Int J Cancer* 1992; 52: 750-758.
- Bossi P, Viale G, Lee AKC. Angiogenesis in colorectal tumors: microvessel quantitation in adenomas and carcinomas with clinicopathological correlations. *Cancer Res* 1995; 55:5049-5053.
- Brady LW, Plenk HP, Hanley JA, Glassburn JR, Kramer S, Parker RG. Hyperbaric oxygen therapy for carcinoma of the cervix stages IIB, IIIA, IIIB and IVA: results of a randomized study by the Radiation Therapy Oncology Group. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1981; 7 (8): 991-998.
- Brem S, Cotran R, Folkman J. Tumor angiogenesis: A quantitative method for histologic grading. *J Natl Cance Inst* 1972; 48: 347-356.
- Bremer GL, Tiebosch AT, van der Putten HW, Schouten HJ, de Haan J, Arends JW. Tumor angiogenesis: an independent prognostic parameter in cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174 (1 pt 1): 126-131.
- Brioschi PA, Bischof P, Delafosse C, Krauer F. Squamous cell carcinoma antigen (SCC-A) values related to clinical outcome of preinvasive and invasive cervical carcinoma. *Int J Cancer* 1991; 47(3): 376-379.
- Brizel DM, Rosner GL, Prosnitz LR. Patterns and variability of tumor oxygenation in human soft tissue sarcomas, cervical carcinomas, and lymph node metastases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 32: 1121-1125.
- Buchsbaum HJ. Extrapelvic lymph node metastases in cervical carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 1979; 133: 814-824.
- Buckley S, Tritz D, van Lee L. Lymph node metastases and prognosis in patients with stage IA cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1996; 60: 97.
- Buckley SI, Tritz DM, van Le L, Higgins R, Sevin BU, Veland FR, et al. Lymph node metatases and prognosis in patients with stage IA2 cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1996; 63(1): 4-9.
- Buehler JW, Hanson DL, Chu SY. The reporting of HIV/AIDS deaths women. *Am J Public Health* 1992; 82:1500.
- Bush RS, Jenkin RDT, Alt WEC. Definitive evidence for hypoxic cells influencing cure in cancer therapy. *Br J Cancer* 1978; 37: 302-306.
- Bus RS. The significance of anemia in clinical radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol. Phys* 1986; 12: 2047-2050.
- 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.
- Carney DN. Lung cancer biology. *Eur J Cancer* 1991; 27: 366-369.
- Carter PG, Iles RK, Neven P, Ind TE, Shepherd JH, Chard T. The prognostic significance of urinary beta core fragment in premenopausal women with carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 1994; 55(2): 271-276.
- Chaplin DJ. Acute hypoxia in tumors: Implications for modifiers of radiation effects. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1986; 12: 1279-1282.
- Charlotte F, L'Hermine A, Martin N. Immunohistochemical detection of bcl-2 protein in normal and pathological human liver. *Am J Pathol* 1994; 144: 460.
- Charpin C, Devictor B, Bergeret D. CD31 quantitative immunocytochemical assays in breast carcinoma. Correlation with current prognostic factors. *Am J Clin Pathol* 1995; 103:443-448.
- Chauvergne J, Lhomme C, Rohart J, Heron JF, Ayme Y, Goupil A, et al. Neoadjuvant chemotherapy of stage IIB or III cancers of the uterine cervix. Long-term results of a multicenter randomized trial of 151 patients. *Bull Cancer* 1993; 80(12): 1069-1079.
- Chen TM, Chen YH, Wu ChCh, Chen ChA, Chang ChF, Hsieh ChY. Factor influencing tumor cell kinetics in cervical cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996; 122: 504-508.
- Chen RJ, Huang SC, Chen CK, Chang DY, Yen ML, Chow SN, et al. Measurement of human chorionic gonadotropin by carboxyl terminal peptide assay in patients with cervical neoplasm. *J Formos Med Assoc* 1994; 93(11-12): 916-920.
- Christopherson WA. The spread and staging of cervical carcinoma. In: Lurain JR, Sciarra JJ, eds. *Gynecology and Obstetrics*. Philadelphia: JB Lippincott, 1992.

- Chung CK, Nahrías WA, Zaino R, Stryker JA, Mortel R. Histologic grade and lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 1981; 12:348.
- Chung EJ, Seong J, Yang WI, Park TK, Kim JW, Suh CO, et al. Spontaneous apoptosis as a predictor of radiotherapy in patients with stage IIB squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Acta Oncol* 1999; 38(4):449-454.
- Chyle V, Pollack A, Czerniak B, Stephens LC, Zagars GK, Terry NH, et al. Apoptosis and downstaging after preoperative radiotherapy for muscle-invasive bladder cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996; 35(2): 281-287.
- Claffey KP, Robinson GS. Regulation of VEGF/VPF expression in tumor cells: consequences for tumor growth and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1996; 15(2): 165-176.
- Coia L, Won M, Lanciano R. The Patterns of Care Outcome Study for cancer of the uterine cervix: Results of the Second National Practice Survey. *Cancer* 1990; 66: 2451-2456.
- Cole DJ, Brown DC, Crossley E, Alcock CJ, Gatter KC. Carcinoma of the cervix uteri: an assesment of the relationship of tumour proliferation to prognosis. *Br J Cancer* 1992; 65(5): 783-785.
- Cole LA, Tanaka A, Kim GS, Park S-Y, Koh MW, Schwartz PE, et al. B-core fragment (B-core/UGP/UGF), a tumor marker: a 7-year report. *Gynecol Oncol* 1996; 60: 264-270.
- Colombel M, Symmans F, Gil S. Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein bcl-2 in hormone refractory human prostate cancer. *Am J Pathol* 1993; 143: 390-400.
- Cooper RA, West CM, Wilks DP, Logue JP, Davidson SE, Roberts SA, et al. Tumour vascularity is a significant prognostic factor for cervix carcinoma treated with radiotherapy: independence from tumour radiosensitivity. *Br J Cancer* 1999; 81(2):354-358.
- Copeland LJ. Staging laparotomy. In: Greer BE, Berek JS, eds. *Gynecology oncology: treatment rationale and techniques*. New York: Elsevier, 1991; 3.
- Cosin JA, Fowler JM, Chen MD, Paley PJ, Carson LF, Twiggs LB. Pretreatment surgical staging of patients with cervical carcinoma. *Cancer* 1998; 82(11):2241-2248.
- Crawford RA, Caldwell C, Iles RK, Lowe D, Shepherd JH, Chard T. Prognostic significance of the bcl-2 apoptotic family of proteins in primary and recurrent cervical cancer. *Br J Cancer* 1998; 78(2): 210-214.
- Crawford RA, Iles RK, Carter PG, Caldwell CJ, Shepherd JH, Chard T. The prognostic significance of beta human chorionic gonadotrophin and its metabolites in women with cervical carcinoma. *J Clin Pathol* 1998; 51(9): 685-688.
- Crissman JD, Budhraj 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.
- Crombach G, Wurz H, Herrmann F, Kreienberg R, Mobus V, Schmidt-Rhode P, et al. The importance of the SCC antigen in the diagnosis and follow-up of cervix carcinoma. A cooperative study of the Gynecologic Tumor Marker Group (GTMG). *Dtsch Med Wochenschr* 1989; 114(18): 700-705.
- Dachs GU, Chaplin DJ. Microenvironmental control of gene expression: implications for tumor angiogenesis, progression, and metastasis. *Semin Radiat Oncol* 1998; 8(3): 208-216.
- Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblast by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 1994; 265:1582-1584.
- Dattoli MJ, Gretz HF III, Beller U. Analysis of multiple prognostic factors in patients with stage IB cervical cancer: Age as a major determinant. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989; 17: 41-47.
- Daver A, Dalifard I, Pons Anicet D, Krebs BP, Gosselin P, Cazin JL, et al. Diagnostic value of SCC-TA4 determination in 4 localizations of epidermoid cancers. An experience of the FNCLCC subgroup of radioanalysis. *Bull Cancer* 1990; 77(8): 781-792.
- Davidson B, Goldber I, Gotlieb WH, Lerner-Geva L, Ben-Baruch G, Kopolovic J. Ulex Europeus lectin and anti-CD31 staining in squamous cell carcinoma of the uterine crvix: potential prognostic markers. *Int J Gynecol Pathol* 1998; 17(3):205-210.
- De Bruijn HW, Duk JM, van der Zee AG, Pras E, Willemse PH, Boonstra H, et al. The clinical value of squamous cell carcinoma antigen in cancer of the uterine cervix. *Tumour Biol* 1998; 19(6):505-516.
- Decker DG, Fricke RE, Pratt JH. Invasive carcinoma of the cervix in young women. *JAMA* 1955; 158: 1417-1420.
- 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.
- Dellas A, Moch H, Schultheiss E, Feichter G, Almendral AC, Gudat F. Angiogenesis in cervical neoplasia: microvessel quantitation in precancerous lesions and invasive carcinomas with clinicopathological correlations. *Gynecol Oncol* 1997; 67 (1): 27-33.
- Dellas A, Schultheiss E, Almendral A, Gudat F, Oberholzer M, Feichter G, et al. Altered expression of mdm-2 and its association with p53 protein status, tumor cell proliferation rate and prognosis in cervical neoplasia. *Int J Cancer* 1997; 74: 421-425.
- Denekamp J. Physiological hypoxia and its influence on radiotherapy. The biological basis of Radiotherapy, 2nd ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B V, 1989; 115-134.
- Dipaolo JA, Woodworth CDE, Pepescu NC, Notario V, Doniger J. Induction of human cervical squamous cell carcinoma by transfection with human papillomavirus 16 DNA and viral Harvey ras. *Oncogen* 1989; 4: 395-399.
- DiSaia PJ, Bundy BN, Curry SL. Phase III study of the treatment of women with cervical cancer, stage IIB,

- IIIB and IV (confined to the pelvis and/or periaortic nodes) with radiotherapy alone versus radiotherapy plus immunotherapy with *Corynebacterium parvum*: a GOG study. *Gynecol Oncol* 1987; 36: 395-397.
- Dische S, Saunders MI, Sealy R, Werner ID, Verma N, Foy Ch, et al. Carcinoma of the cervix and the use of hyperbaric oxygen with radiotherapy: a report of randomised controlled trial. *Radiother Oncol* 1999; 53: 93-98.
- Dische S. Misonidazole in the clinic at Mount Vernon. *Cancer Clin Trials* 1980; 3: 175-178.
- Dobbs SP, Hewett PW, Johnson IR, Carmichael J, Murray JC. Angiogenesis is associated with vascular endothelial growth factor expression in cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 1997; 76(11): 1410-1415.
- Dubben HH, Thames HD, Beck-Bornholdt HP. Tumor volume: a basic and specific response predictor in radiotherapy. *Radiother Oncol* 1998; 47(2): 167-174.
- Duk JM, de Bruijn HW, Groenier KH, Hollema H, ten Hoor KA, Krans M, et al. Cancer of the uterine cervix: sensitivity and specificity of serum squamous cell carcinoma antigen determinations. *Gynecol Oncol* 1990; 39(2): 186-194.
- Duk JM, Groenier KH, de Bruijn HW, Hollema H, ten-Hoor KA, Van der Zea AG, et al. Pretreatment serum squamous cell carcinoma antigen: a newly identified prognostic factor in early stage cervical carcinoma. *J Clin Oncol* 1996; 14(1): 11-118.
- Durand RE. Tumor repopulation during radiotherapy: quantitation in two xenografted human tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997; 32(5): 803-808.
- Dusenbery KE, Mc Guire WA, Holt PJ. Erythropoietin increases hemoglobin during radiation therapy for cervical cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994; 29: 1079-1084.
- Eifel PJ, Morris M, Wharton JT. The influence of tumour size and morphology on the outcome of patients with FIGO stage in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994; 29: 9-16.
- Eifel PJ, Thoms WW Jr, Smith TL. The relationship between brachytherapy dose and outcome in patients with bulky endocervical tumors treated with radiation dose. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994; 28: 113-118.
- Feeney DD, Moore DH, Look KY. The fate of the ovaries after radical hysterectomy and ovarian transposition. *Gynecol Oncol* 1995; 56: 3-7.
- Fenell RH. Microinvasive carcinoma of the uterine cervix. *Obstet Gynecol Surv* 1978; 33: 406-411.
- Ferdegini M, Gadducci A, Annichiarico C, Prontera C, Malagnino G, Castellani C, et al. Serum Cyfra-21 assay in squamous cell carcinoma of the cervix. *Anticancer Res* 1993; 13(5C): 1841-1844.
- Fielding LP, Hensen DE. Multiple prognostic factors and outcome analysis in patients with cancer. *Cancer* 1993; 71: 2426-2429.
- Finan MA, DeCesare S, Fiorica JV. Radical hysterectomy for stage IB1 vs IB2 carcinoma of the cervix: Does the new staging system predict morbidity and survival? *Gynecol Oncol* 1996; 62: 139-147.
- Fletcher GH, Lindberg RD, Caderao JB, Wharton RJ. Hyperbaric oxygen as a radiotherapeutic adjuvant in advanced carcinoma of the uterine cervix: preliminary results of a randomized trial. *Cancer* 1977; 39: 617-623.
- Fletcher GH. Cancer of the uterine cervix: Janeway Lecture. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 1971; 111: 225-242.
- Fletcher GH. Textbook of Radiotherapy, 3rd ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1980; 720-773, 812-828.
- Florenes VA, Aamdal S, Myklebost O, Maelansmo GM, Bruland DS, Fodstad D. Levels of nm23 messenger RNA in metastatic malignant melanomas: inverse correlation to disease progression. *Cancer Res* 1992; 52: 6088-6091.
- Fogel S, Riou G. The early HPV16 proteins can regulate mRNA levels of cell cycle genes in human cervical carcinoma cells by p53-independent mechanisms. *Virology* 1998; 244 (1): 97-107.
- Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995; 333: 1757-1763.
- Fontanini G, Boldrini L, Vignati S, Chiné S, Basolo F, Silvestri V, et al. Bcl-2 and p53 regulate vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis in non-small cell lung carcinoma. *Eur J Cancer* 1998; 34(5): 718-723.
- Fujii S, Konishi I, Nanbu Y, Nonogaki H, Kobayashi F, Sagawa N, et al. Analysis of the levels of Ca 125, CEA and Ca 19.9 in the cervical mucus for detection of cervical adenocarcinoma. *Cancer* 1988; 62:541-547.
- Fukuda K, Kojiro M, Chiu JF. Demonstration of extensive chromatin cleavage in transplanted Morris hepatoma 7777 tissue: Apoptosis or necrosis? *Am J Pathol* 1993; 142: 935-946.
- Furuya H, Yabushita H, Noguchi M, Nakanishi M. Apoptosis and cell growth fraction in normal, dysplastic and neoplastic squamous epithelium of uterine cervix. *Nippon Rinsho* 1996; 54(7): 1916-1921.
- Fyles AW, Milosevic M, Pintilie M, Hill RP. Cervix cancer oxigenation measured following external radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 42 (4): 751-753.
- Fyles AW, Pintilie M, Kirkbride P. Prognostic factors in patients with cervix cancer treated by radiation therapy: Results of a multiple regression analysis. *Radiother Oncol* 1995; 35:107-117.
- Fyles AW, Milosevic M, Wong R, Kavanagh MC, Pintilie M, Sun A, et al. Oxygenation predicts radiation response and survival in patients with cervix cancer. *Radiother Oncol* 1998; 48: 149-156.
- Gaarenstroom KN, Bonfrer JM, Kenter GG, Korse CM, Hart AA, Trimbos JB, et al. Clinical value of pretreatment serum Cyfra 21-1, tissue polypeptide antigen, and squamous cell carcinoma antigen levels in patients with cervical cancer. *Cancer* 1995; 76(5): 807-813.
- Gadducci A, Ferdegini M, Prontera C, Giordano M, Cristofani P, Bianchi R, et al. A comparison of pretreatment serum levels of four tumor markers in patients with endometrial and cervical carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol* 1990; 11: 283-288.

- Gallion HN, Van Nagell JR, Donalson GS. Combined radiation therapy and extrafascial hysterectomy in the treatment of stage IB barrel-shaped cervical cancer. *Cancer* 1985; 56: 262-265.
- Garzetti G, Ciavattini A, Lucarini G, Goteri G, De Nicolis M, Biagini G. MIB 1 immunostaining in cervical carcinoma of young people. *Gynecol Oncol* 1997; 67(2):184-187.
- 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.
- Gasinska A, Urbanski K, Jakubowicz J, Klimek M, Biesaga B, Wilson G. Tumour cell kinetics as a prognostic factor in squamous cell carcinoma of the cervix treated with radiotherapy. *Radiother Oncol* 1999; 50:77-84.
- Gasparini G, Weidner N, Maluta S. Intratumoral microvessel density and p53 protein: correlation with metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 1993; 55:739-744.
- Gatenby RA. Oxygen distribution in squamous cell carcinoma: metastases and its relationship to outcome of radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1988; 12: 831-838.
- Geyer H, Schworer D, Pfeleiderer A. SCC (squamous cell carcinoma) antigen as a tumor marker in cervix cancers. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 1989; 49(3): 266-271.
- Giaccia AJ. Hypoxic stress proteins: survival of the fittest. *Semin Radiat Oncol* 1996; 6(1):46-58.
- Girardi F, Lichtenegger W, Tamussino K. The importance of parametrial lymph nodes in the treatment of cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1989; 34: 206-211.
- Girinski T, Pejovic Lenfant MH, Bourhis J, Campana F, Cosset JM, Petit C, et al. Prognostic value of hemoglobin concentrations and blood transfusions in advanced carcinoma of the cervix treated by radiation therapy: results of a retrospective study of 386 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989; 16: 37-42.
- Gitsch G, Kainz C, Joura E, Frohlich B, Bieglmayer C, Tatra G. Squamous cell carcinoma antigen, tumor associated trypsin inhibitor and tissue polypeptide specific antigen in follow up of stage III cervical cancer. *Anticancer Res* 1992; 12(4): 1247-1249.
- Goellner JR. Carcinoma of the cervix: clinicopathologic correlation of 196 cases. *Am J Clin Pathol* 1976; 66: 775-785.
- Goldberg GL, Sklar A, O'Hanlan KA, Levine PA, Runowicz CD. Ca 125: a potential prognostic indicator in patients with cervical cancer? *Gynecol Oncol* 1991; 40(3): 222-224.
- Gostout BS, Podratz KC, McGovern RM, Persing DH. Cervical cancer in older women: a molecular analysis of human papillomavirus types, HLA types, and p53 mutations. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179(1): 56-61.
- Gouldine H, Abdul-Rashid NF, Robertson JF. Assessment of angiogenesis in breast carcinoma: an important factor in prognosis? *Hum Pathol* 1995; 26(11):1196-2000.
- Graeber TG. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 1996; 379 (6650):88-91.
- Gray DJ. The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br J Radiol*, 1953; 26: 638-648.
- Grigsby PW, Perez CA, Kuske RR. Adenocarcinoma of the uterine cervix: lack of evidence for a poor prognosis. *Radiother Oncol* 1988; 12: 289-296.
- Grigsby PW, Perez CA. Radiotherapy alone for medically inoperable carcinoma of the cervix: stage IA and carcinoma in situ. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991; 21: 375-378.
- Grimard L, Genest P, Girard A. Prognostic significance of endometrial extension in carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 1988; 31: 301-309.
- Hakes T, Nori D, Lewis JL. Adjuvant cisplatin/bleomycin (C/B) for high risk stage IB/IIA cervix carcinoma patients: a pilot study. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1987; 6: 116 (abstr 455).
- Hale RJ, Buckley CH, Fox H, Williams J. Prognostic value of c-erbB-2 expression in uterine cervical carcinoma. *J Clin Pathol* 1992; 45: 594-596.
- Hanks GE, Herring DE, Kramer S. Patterns of care outcome studies. Results of the national practice in cancer of the cervix. *Cancer* 1983; 51(5): 959-967.
- Hänsen G, Hänsen K, Dunst J. Oxygen status of cervical cancers prior and during definitive radiotherapy possible impact of pretreatment with INF- α -2a/Retinol acid on oxygenation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996; 36 (1)S. Abst 2095.
- Hänsen G, Hintner I, Krause V, Wohlrab W, Dunst J. Intratumor pO₂, S-phase fraction and p53 status in cervix carcinomas. *Strahlenther Onkol* 1997; 173(7): 385-387.
- Harima Y, Oka A, Nagata K, Harima K, Tanaka Y, Shikata N. Bax and bcl-2 expression predict response to radiotherapy in human cervical cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 1998; 25(9): 1273-1277.
- Hasumi K, Sakamoto A, Sugano H. Microinvasive carcinoma of the uterine cervix. *Cancer* 1980; 45: 928-931.
- Hawighorst H, Knapstein PG, Knopp MV, Weikel W, Brix G, Zuna I, et al. Uterine cervical carcinoma: comparison of standard and pharmacokinetic analysis of time-intensity curves for assessment of tumor angiogenesis and patient survival. *Cancer Res* 1998; 58(16): 3598-3602.
- Hayashi Y, Hachisuga T, Iwasaka T, Fukuda K, Okuma Y, Yokohama M. Expression of ras oncogene product and EGF receptor in cervical squamous cell carcinomas and its relationship to lymph node involvement. *Gynecol Oncol* 1991; 40: 147-151.
- Herbst AL, Cole P. Epidemiologic and clinical aspects of clear cell adenocarcinoma in young women. In: Herbst AL, ed. *Intrauterine Exposure to Diethylstilbestrol in the Human*. American College of Obstetrics and Gynecology, 1978; 2-7.
- Hermeking H, Eick D. Mediation of c-myc induced apoptosis by p53. *Science* 1994; 265: 2091-2092.

- Hirst DG. Anemia: a problem or an opportunity in radiotherapy? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1986; 12: 2009-2017.
- Hiura M, Yorishima M, Tanaka M, Yokoyama T, Myoga H, Chiba T, et al. A clinical study on multiple tumor markers following therapy in patients with uterine cervical carcinoma. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 1990; 42(5): 471-478.
- Ho GY, Burk RD, Klein S. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 1365-1371.
- Höckel M, Schelenger K, Mitze M. Hypoxia and radiation response in human tumors. *Semin Radiat Oncol* 1996; 6: 3-9.
- Höckel M, Schlenger K, Höckel S, Aral B, Schaffer U, Vaupel P. Tumor hypoxia in pelvic recurrences of cervical cancer. *Int J Cancer* 1998; 79(4): 365-369.
- Höckel M, Vormdran B, Schlenger K, Baussmann E, Knapstein PG. Tumor oxygenation: a new predictive parameter in locally advanced cancer of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 1993; 51(2): 139-140.
- Höckel M. Intratumoral pO₂ predicts survival in advanced cancer of the uterine cervix. *Radiother Oncol*, 1993; 26: 45-50.
- Hockenberry 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.
- Holloway RW, To A, Moradi M, et al. Monitoring the course of the cervical carcinoma with the squamous cell carcinoma serum radioimmunoassay. *Obstet Gynecol* 1989; 74: 944.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B. P53 mutation in human cancers. *Science* 1991; 253: 49-53.
- Hong JH, Tsai ChSh, Chang JT, Wang ChCh, Lai ChH, Tseng ChJ, et al. The prognostic significance of pre- and post-treatment SCC levels in patients with squamous cell carcinoma of the cervix treated by irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997; 39(2) S: 172.
- Hopkins MP, Morley GW. A comparison of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix. *Obstet Gynecol* 1991; 77: 912-917.
- Horak ER, Leck R, Klenk N. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastasis and survival in breast cancer. *Lancet* 1992; 340: 1120-1124.
- Hornback NB, Shupe RE, Shidnia H. Advanced stage IIIB carcinoma of the uterine cervix treated by hyperthermia and radiation. *Gynecol Oncol* 1986; 23: 160-167.
- Hreshchysyn MM, Aron BS, Boronow RC. Hydroxyurea or placebo combined with radiation to treat stages IIIB and IV cervical cancer confined to the pelvis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1979; 5: 317-322.
- Huettner PC, Gerhard DS, Li L, Gersell DJ, Dunnigan K, Kamarasova T, et al. Loss of heterozygosity in clinical stage IB cervical carcinoma: relationship with clinical and histopathologic features. *Hum Pathol* 1998; 29(4): 364-370.
- Inaba N, Negishi Y, Fukasawa I, Okajima Y, Ota Y, Tanaka K, et al. Cytokeratin fragment 21-1 in gynecologic malignancy: comparison with cancer antigen 125 and squamous cell carcinoma-related antigen. *Tumour Biol* 1995; 16(6): 345-352.
- Isacson C, Kessis TD, Hedrick L, Cho KR. Both cell proliferation and apoptosis increase with lesion grade in cervical neoplasia but do not correlate with human papillomavirus type. *Cancer Res* 1996; 56(4): 669-674.
- Jenkin RDT, Stryker JA. The influence of the blood pressure on survival in cancer of the cervix. *Br J Radiol* 1968; 41: 913-920.
- Joensuu H, Pylkkanen L, Tikkanen S. Bcl-2 protein expression and long term survival in breast cancer. *Am J Pathol* 1994; 145: 1191.
- Junor EJ, Symonds RP, Watson ER, Lamont. Survival of younger cervical carcinoma patients treated by radiotherapy in the West of Scotland 1964-1984. *Br J Gynecol* 1989; 96: 522-528.
- Kabawatt SE, Bast RC Jr, Bhan AK, et al. Tissue distribution of a coelomic-epithelium-related antigen recognized by the monoclonal antibody OC 125. *Int J Gynecol Pathol* 1983; 2: 275.
- Kaem J, Tropé C, Sundfor K. Cisplatin/5fluorouracil treatment of recurrent cervical carcinoma. A phase II study with long-term follow-up. *Gynecol Oncol* 1996; 60: 387-399.
- Kainz C, Kohlberger P, Gitsch G. Mutant p53 in patients with invasive cervical cancer stages IB to IIB. *Gynecol Oncol* 1995; 57: 212-214.
- Kainz C, Speiser P, Wanner C, et al. Prognostic value of tumour microvessel density in cancer of the uterine cervix stage IB and IIB. *Anticancer Res* 1995; 15: 1549-1552.
- Kaplan. Investigation of age as a prognostic factor in early invasive cancer of the cervix: Implications for nursing. *Cancer* 1989; 12 (3): 177-182.
- Kapp DS, Fischer D, Gutierrez E, Kohorn EI, Schwartz PE. Pretreatment prognostic factors in carcinoma of the uterine cervix: a multivariable analysis of the effect of age, stage, histology and blood counts on survival. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1983; 9(4): 445-455.
- Kapp DS, Lawrence R. Temperature elevation during brachytherapy for carcinoma of the uterine cervix: adverse effect on survival and enhancement of distant metastases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1984; 10: 2281-2292.
- Karlson F, Rabbitts PH, Sundresan V, Hagmar B. PCR-RFLP studies on chromosome 3p in formaldehyde-fixed, paraffin-embedded cervical cancer tissues. *Int J Cancer* 1994; 58: 787-792.
- Karolewski K, Korzmioedki S, Sokolowski A, Urbanski K and Kojs Z. Prognostic significance of pretherapeutic and therapeutic factors in patients with advanced cancer of the uterine cervix treated with radical radiotherapy alone. *Acta Oncologica* 1999; 38: 461-468.
- Kato H, Torigoe T. Radioimmunoassay for tumor antigen of human cervical squamous cell carcinoma. *Cancer* 1977; 40: 1621.

- Kelland LR, Steel GG. Differences in radiation response among human cervix carcinoma cell lines. *Radiother Oncol* 1988; 13: 225-232.
- Kennedy AS, Raleigh JA, Perez GM, Calkins DP, Thrall DE, Novotny DB, et al. Proliferation and hypoxia in human squamous cell carcinoma of the cervix: first report of combined immunohistochemical assays. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997; 37(4): 897-905.
- Kerr JFR, Searle J. A suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal-cell carcinomas that contain numerous mitotic figures. *J Pathol* 1972; 107: 41-44.
- Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73: 2013-2026.
- Kersemakers AM; Hermans J; Fleurer GJ; van-de-Vijver MJ. Loss of heterozygosity for defined regions on chromosomes 3, 11 and 17 in carcinomas of the uterine cervix. *Br J Cancer* 1998; 77 (2): 192-200.
- Kessler II. Epidemiological aspects of uterine cervix cancer. In: Lurain JR, Sciarra J, eds. *Gynecology and Obstetrics*. Philadelphia: JB Lippincott, 1990; 1.
- Keys HM, Bundy BN, Stehman FB, Muddersbach LI, Chafe WE, Suggs Ch L, et al. Cisplatin, radiation, and adjuvant hysterectomy compared with radiation and adjuvant hysterectomy for bulky stage Ib cervical carcinoma. *N Eng J Med* 1999; 340: 1154-1161.
- Khono T, Takayama H, Hamaguchi M, Takano H, Yamaguchi N, Tsuda H, et al. Deletion mapping of chromosome 3p in human uterine cervical cancer. *Oncogene* 1993; 8: 1825-1832.
- Kieser A, Weich HA, Brandner G. Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene* 1994; 9: 963-969.
- Killackey MA, Boardman L, Carroll DS. Adjuvant chemotherapy and radiation in patients with poor prognostic stage IB/IIA cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1993; 49: 377-379.
- Kim CY, Tsai MH, Osmanian C, Graeber TG, Lee JE, Giffard RG, et al. Selection of human cervical epithelial cells that possess reduced apoptotic potential to low-oxygen conditions. *Cancer Res* 1997; 57(19): 4200-4204.
- Kim JW, Kim YT, Kim DK. Expression of epidermal growth factor receptor in carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 1996; 60: 283-287.
- Kinney WK, Hodge DO, Egorshin EV. Identification of a low-risk subset of patients with stage IB invasive squamous cancer of the cervix possibly suited to less radical surgical treatment. *Gynecol Oncol* 1995; 57: 3-6.
- Kimugasa M, Nishimura R, Hasegawa K, Okamura M, Kimura A, Ohtsu F, et al. Assessment of urinary beta-core fragment of hCG as a tumor marker of cervical cancer. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 1992; 44(2): 188-194.
- Kjörstad KE, Orjasaeter H. The prognostic value of CEA determinations in the plasma of patients with squamous cell cancer of the cervix. *Cancer* 1982; 50: 283-287.
- Kjörstad KE. Carcinoma of the cervix in the young women. *Obstet Gynecol* 1977; 50: 28-30.
- Knocke TH, Weitmann HD, Feldmann HJ, Selzer E, Pötter R. Intratumoral pO₂-measurements as predictive assay in the treatment of carcinoma of the uterine cervix. *Radiother Oncol* 1999; 53: 99-104.
- Kodama J, Seki N, Tokumo K, Hongo A, Miyagi Y, Yoshinouchi M. Vascular endothelial growth factor is implicated in early invasion in cervical cancer. *Eur J Cancer* 1999; 35(3): 485-489.
- Kokawa K, Shikone T, Otani T, Nakano R. Transient increases of apoptosis and Bax expression occurring during radiotherapy in patients with invasive cervical carcinoma. *Cancer* 1999; 86(1): 79-87.
- Kolstad P. Follow-up study of 232 patients with stage Ia1 and 411 patients with stage Ia2 squamous cell carcinoma of the cervix (microinvasive carcinoma). *Gynecol Oncol* 1989; 33: 265-272.
- Komaki R, Fujii T, Perkins P. Apoptosis and mitosis as prognostic factors in pathologically staged N1 non-small cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996; 36(3): 601-605.
- Konishi N, Nakaoka S, Tsuzuki T, Maysumoto K, Kitahori Y, Hiasa Y, et al. Expression of nm23-H1 and nm32-H2 proteins in prostate carcinoma. *Cancer Res* 1993; 54: 1050-1054.
- 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.
- Kramer C, Deschel RE, Goldberg N. Radiation treatment of FIGO stage IVA carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 1989; 32: 323-326.
- Kristensen GB, Kaern J, Abeler VM. No prognostic impact of flow-cytometric measured DNA ploidy and S-phase fraction in cancer of the uterine cervix: a prospective study of 465 patients. *Gynecol Oncol* 1995; 57: 79-85.
- Ku WH, Liu IL, Yen MS, Chang-Chien CC, Yue CT, Ng HT, et al. Genomic deletion and p53 inactivation in cervical carcinoma. *Int J Cancer* 1997; 72: 270-276.
- Kumar L, Grover R, Pokharel YH, Chander S, Kumar S, Singh R, et al. Neoadjuvant chemotherapy in locally advanced cervical cancer: two randomised studies. *Aust N Z J Med* 1998; 28(3): 387-390.
- Kyriakos M, Kempson RL, Pérez CA. Carcinoma of the cervix in young women. *Obstet Gynecol* 1971; 38: 930-944.
- Lagasse LD, Creasman WT, Shingleton HM, Ford JH, Blessing JA. Results and complications of operative staging in cervical cancer: experience of the gynecologic oncology group. *Gynecol Oncol* 1980; 9: 90-98.
- Lai CH, Lin TS, Soon YK. Adjuvant chemotherapy after radical hysterectomy for cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1989; 35: 193-198.
- Lam CP, Yuan CC, Jeng FS, Tsai LC, Yeh SH, Ng HT. Evaluation of carcinoembryonic antigen, tissue polypeptide antigen, and squamous cell carcinoma

- antigen in the detection of cervical cancers. *Chung Hua Hsueh Tsa Chih Taipei* 1992; 50(1): 7-13.
- Lambin P, Kramar A, Haie-Meder Ch, Castaigne D, Scalliet P, Bouzy J, et al. Tumour size in cancer of the cervix. *Acta Oncológica* 1998; 37(7-8): 729-734.
- Landoni F, Bocciarelli 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.
- Landoni F, Maneo A, Colombo A, Placa F, Milani R, Perego P, et al. Randomised study of radical surgical vs radiotherapy for stage IB-IIA cervical cancer. *Lancet* 1997; 350: 535-540.
- Lane DP. A death in the life of p53. *Nature* 1993; 362: 786-787.
- Lara PC, Rey-Baltar D, Rivera D, Apolinario R, Alarcón I, Rodríguez T, et al. Antígeno de células escamosas (SCC-Ag) y cáncer de cérvix uterino. Modificaciones inducidas por la irradiación. *Neoplasia* 1995; 12(3):91-95.
- Lara PC, Cuyás JM. The role of squamous cell carcinoma antigen in the management of laryngeal and hypopharyngeal cancer. *Cancer* 1995; 76(5):758-764.
- Lara PC, Pérez S, Rey A, Santana C. Apoptosis in carcinoma of the bladder: relation with radiation treatment results. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999; 43(5): 1015-1019.
- Lartigau E, Vitu L, Haie Meder C, Cosset MF, Delapierre M, Gerbaulet A, et al. Feasibility of measuring oxygen tension in uterine cervix carcinoma. *Eur J Cancer* 1992; 28A (8/9): 1354-1357.
- Lazo PA. The molecular genetics of cervical carcinoma. *Br J Cancer* 1999; 80 (12): 2008-2018.
- Lee JH, Lee SK, Yang Mh, Ahmeed MM, Mohiuddin M, Lee EY. Expression and mutation of H-ras in uterine cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1996; 62 (1): 49-54.
- Lee JS, Hong WK. Prognostic factors in lung cancer. *N Engl J Med* 1992; 327: 47-48 (Edit)
- Leibel S, Bauer M, Wasserman T. Radiotherapy with or without misonidazole for patients with stage IIIB or stage IVA squamous cell carcinoma of the uterine cervix: preliminary report of a Radiation Therapy Oncology Group randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1987; 13: 541-549.
- Leminem A. Tumor markers Ca 125, carcinoembryonic antigen and tumor-associated trypsin inhibitor in patients with cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1990; 39(3): 358-363.
- Leone A, Seeger RC, Hong CM, Arboleda MJ, Brodeur GM, Stram D, et al. Evidence for nm23 RNA overexpression, DNA amplification and mutation in aggressive childhood neuroblastomas. *Oncogene* 1993; 8: 855-865.
- Lera J, Lara P, Pérez S, Cabrera JL, Santana C. Tumor proliferation, p53 expression and apoptosis in laryngeal cancer. Relation to radiation treatment results. *Cancer* 1998; 83:2493-2501.
- Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 1991; 351: 453-456.
- Levine EL, Davidson SE, Roberts SA, Chadwick C, Potten CS, West CML. Apoptosis as predictor of response to radiotherapy in cervical carcinoma. *Lancet* 1994; 344: 472.
- 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.
- Li VW, Folkerth RD, Watanabe H. Microvessel count and cerebrospinal fluid basic fibroblast growth factor in children with brain tumors. *Lancet* 1994; 344: 82-86.
- Liang XH, Mungal S, Ayscue A, Meissner JD, Wodnicki P, Hockenbery D, et al. Bcl-2 protooncogene expression in cervical carcinoma cell lines containing inactive p53. *J Cell Biochem* 1995; 57: 509-521.
- Lindell A. Carcinoma of the uterine cervix: Incidence of age. A statistical study. *Acta Radio* 1952;Suppl 92: 1-102.
- Lipponen PK, Aaltomaa S, Kosma VM, Syrjänen K. Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *Eur J Cancer* 1994; 30A (14): 2068-2073.
- Lipponen PK, Aaltomaa S. Apoptosis in bladder cancer as a related to standard prognostic factors and prognosis. *J Pathol* 1994; 173: 333-339.
- Lou H, Chen Y, Sun H. Prognostic factors affecting the results of surgical treatment of cervical cancer. *Chung Hua Chung Liu Tsa Chih* 1996; 18 (1): 64-66.
- Lozza L, Merola M, Fontanelli R, Stefanon B, Seregini E, Bombardieri E, et al. Cancer of the uterine cervix: clinical value of squamous cell carcinoma antigen (SCC) measurements. *Anticancer Res* 1997; 17(18): 525-529.
- Lubrano A, López Bonilla A, Rubio MJ, Santana Melián S, Arencibia A, et al. Prevalencia del cáncer de cérvix en la provincia de Las Palmas. Reunión Nacional de la Sección de Ginecología y Patología Mamaria de la SEGO. 1999. (Abstr).
- Lyng H, Sundfor K, Tropé C, Rofstad EK. Oxygen tension and vascular density in human cervix carcinoma. *Br J Cancer* 1996; 74:1559-1563.
- Lyng H, Sundfor K, Rofstad EK. Oxygen tension in human tumours measured with polarographic needle electrodes and its relationship to vascular density, necrosis and hypoxia. *Radiother Oncol* 1997; 44(2): 163-169.
- Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ. Relation of neovascularization to metastasis of non-small cell lung cancer. *Lancet* 1992; 340:145-146.
- Maeda K, Chung Y, Ogawa Y, et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer* 1996; 77: 858-863.
- Maiman M, Fruchter RG, Guy L, Cuthill S, Levine P, Serur E. Human immunodeficiency virus infection and invasive cervical carcinoma. *Cancer* 1993; 71:402.
- Mandai M, Konishi I, Koshiyama M, Mori T, Arai S, Tashiro H, et al. Expression and metastasis-related nm23-H1 and nm23-H2 genes in ovarian carcinomas:

- correlation with clinicopathology, EGFR, c-erbB-2 and c-erbB-3 genes, and sex steroid receptor expression. *Cancer Res* 1994; 54: 1825-1830.
- Mandai M, Konishi I, Koshiyama M. Altered expression of nm34-H1 and c-erbB-2 proteins have prognostic significance in adenocarcinoma but not in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Cancer* 1995; 75: 2523-2529.
- Manetta A, Podczaski ES, Larson JE. Scalene lymph node biopsy in the preoperative evaluation of patients with recurrent cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1989; 33: 332-334.
- Marcial VA, Amato D, Marks RD. Split-course versus continuous pelvis irradiation in carcinoma of the uterine cervix: a prospective randomized clinical trial of the Radiation Therapy Oncology Group. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1983; 9: 431-436.
- Marone M, Scambia G, Ferrandina G, Giannitelli C, Benedetti-Panici P, Iacovella S, et al. Nm 23 expression in endometrial and cervical cancer: inverse correlation with lymph node involvement and myometrial invasion. *Br J Cancer* 1996; 74: 1063-1068.
- Massuger LF, Koper NP, Thomas CM, Dom KE, Schijf CP. Improvement of clinical staging in cervical cancer with serum squamous cell carcinoma antigen and Ca 125 determinations. *Gynecol Oncol* 1997; 64(3): 473-476.
- Masuda M, Takano Y, Iki M, Tomoyuki A, Hashiba T, Noguchi S, Hosaka M. Apoptosis in transitional cell carcinoma of the renal pelvis and ureter: association with proliferation, bcl-2 and prognosis. *J Urol* 1997; 118: 750-753.
- Meanwell CA, Kelly KA, Wilson S. Young age as a prognostic factor in cervical cancer: analysis of population based on data from 10022 cases. *Br J Med* 1988; 296: 386-391.
- Meanwell CA. The epidemiology and etiology of cervical cancer. In: Blackledge GRP, Jordan JA, Shingleton HM, eds. *Textbook of Gynecology Oncology*. Philadelphia: WB Saunders, 1991; 250.
- Meier W, Eirmann W, Stieber P, et al. Experiences with SCC antigen, a new tumor marker for cervical carcinoma. *J Cancer Clin Oncol* 1989; 25: 1955.
- Meyn RE, Stephens LC, Ang KK, Hunter NR, Brock WA, Milas L, et al. Heterogeneity in the development of apoptosis in irradiated murine tumours of different histologies. *Int J Radiat Biol* 1993; 64: 583-591.
- Meyn RE, Stephens LC, Hendry JH. Workshop report: radiation-induced apoptosis, 5-8 May 1994, Round Top, Texas, USA. *Int J Radiat Biol* 1994; 66: 655-659.
- Meyn RE, Stephens LC, Voehringer DW, Story MD. Biochemical modulation of radiation induced apoptosis in murine lymphoma cells. *Radiat Res* 1993; 136: 327-334.
- Mikulski SM. Pathogenesis of cancer in view of mutually opposing apoptotic and anti-apoptotic growth signals (Review). *Int J Oncol* 1994; 4: 1257-1263.
- Million RR, Rutledge F, Fletcher GH. Stage IV carcinoma of the cervix with bladder invasion. *Am J Obstet Gynecol* 1972; 113: 239-246.
- 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.
- Mitra AB, Murty VVVS, Li RG, Pratap M, Luthra UK, Chaganti RSK. Allelotype analysis of cervical carcinoma. *Cancer Res* 1994; 54: 4481-4487.
- Mitra AB, Murty VVVS, Singh V, Li R, Pratap M, Sodhani P, et al. Genetic alterations at 5p15: a potential marker for progression of precancerous lesions of the uterine cervix. *J Nat Cancer Inst* 1995; 87: 742-745.
- Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wong HG, Lin HK, Liebermann DA, et al. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 1994; 9: 1799-1805.
- Montana GS, Fowler WC, Varia MA. Carcinoma of the cervix stage III: Results of radiation therapy. *Cancer* 1986; 57: 148-154.
- Morley GW, Seski JC. Radical pelvic surgery versus radiation therapy for stage I carcinoma of the cervix (exclusive of microinvasion). *Am J Obstet Gynecol* 1976; 126: 785-798.
- Morris M, Eifel PJ, Lu J, Grigsby PW, Levenback Ch, Stevens RE, et al. Pelvic radiation with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer. *N Engl J Med* 1999; 340: 1137-1143.
- Morton DG, Lagasse LD, Moore JG. Pelvic lymphadenectomy following radiation in cervical carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 1964; 88: 932-938.
- Mullokandov MR, Kholodilov NG, Atkin NB, Burk RD, Johnson AB, Klinger HP. Genomic alterations in cervical carcinoma: losses of chromosome heterozygosity and human papillomavirus tumor status. *Cancer Res* 1996; 56: 197-205.
- Nakano T, Oka D. Differential values of Ki67 index and mitotic index of proliferating cell population. An assessment of cell cycle and prognosis in radiation therapy for cervical cancer. *Cancer* 1993; 72: 2401-2408.
- Nakano T, Oka K, Ishikawa A, Morita S. Correlation of cervical carcinoma c-erb B-2 oncogene with cell proliferation parameters in patients treated with radiation therapy for cervical carcinoma. *Cancer* 1997; 79(3): 513-520.
- 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.
- Nakayama T, Ohtsuru A, Nakao K, Shima M, Nakata K, Watanabe K, et al. Expression in human hepatocellular carcinoma of the nucleoside diphosphate kinase, a homologue of the nm23 gene product. *Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1349-1354.
- Nam JH, Chang KC, Chambers JT, Schwartz PE, Cole LA. Urinary gonadotropin fragment, a new tumor marker. III. Use in cervical and vulvar cancers. *Gynecol Oncol* 1990; 38(1): 66-70.

- Nasu K, Etoh Y, Yoshimatsu J, Matsu T, Narahara H, Miyakawa I. Serum levels of cytokeratin 19 fragments in cervical cancer. *Gynecol Obstet Invest* 1996; 42(4): 267-270.
- Nelson AJ, Fletcher GH, Wharton T. Indications for adjuvant conservative extrafascial hysterectomy in selected cases of carcinoma of the uterine cervix. *Am J Roentgenol Radium Ther Natl Med* 1975; 123: 91-99.
- Neven P, Iles RK, Lee CL, Hudson CN, Shepherd JH, Chard T. Urinary chorionic gonadotropin subunits and beta core in nonpregnant women. *Cancer* 1993; 71(12): 4124-4130.
- Newton M. Radical hysterectomy or radiotherapy for stage I cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1975; 28: 322-331.
- Ngan HY, Cheung AN, Lauder IJ, Wong LC, Ma HK. Prognostic significance of serum tumor markers in carcinoma of the cervix. *Eur J Gynaecol Oncol* 1996; 17(6): 512-517.
- Ngan HYS, Chan SYW, Wong LC, et al. Serum squamous cell carcinoma antigen in the monitoring of radiotherapy treatment response in carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 1990; 37: 260.
- Nigra JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. *Nature* 1989; 342: 705-708.
- Niloff JM, Klug TL, Schaetzel E. Elevation of serum Ca 125 in carcinomas of the fallopian tube, endometrium and endocervix. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 148: 1057.
- Niloff JM. Principles and Practice of Gynecologic Oncology. Lippincott Company, 1992: 137-138.
- Noguchi H, Shiozawa I, Kitahara T. Uterine body invasion of carcinoma of the uterine cervix as seen from surgical specimens. *Gynecol Oncol* 1988; 30: 173-182.
- Norman RJ, Buck RH, Aktar B, Mayet N, Moodley J. Detection of a small molecular species of human chorionic gonadotropin in the urine of patients with carcinoma of the cervix and cervical intraepithelial neoplasia: comparison with other assays for human chorionic gonadotropin and its fragments. *Gynecol Oncol* 1990; 37(2): 254-259.
- Núñez G, Clarke MF. The bcl-2 family of proteins: regulators of cell death and survival. *Trends Cell Biol* 1994; 4: 399-403.
- Obermair A, Wanner Ch, Bilgi S, Speiser P, Kaider A, Reinthaller A, et al. Tumor angiogenesis in stage IB cervical cancer: Correlation of microvessel density with survival. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178(2): 314-319.
- O'Brien TJ, Bannon GA, Bard DS, Hardin JW, Quirk JG. Expression of the ras oncogene in gynecologic tumors. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 160: 344-352.
- Okino 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.
- Ohno T, Nakano T, Niibe Y, Tsujii H, Oka K. Bax protein expression correlates with radiation-induced apoptosis in radiation therapy for cervical carcinoma. *Cancer* 1998; 83(1): 103-110.
- Oka K, Nakano T, Arai T. C-erbB-2 oncoprotein expression is associated with poor prognosis in squamous cell carcinoma of the cervix. *Cancer* 1994; 73: 668-671.
- Oka K, Nakano T, Arai T. P53CM1 expression is not associated with prognosis in uterine cervical carcinoma. *Cancer* 1993; 72(1): 160-164.
- 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.
- Overgaard J, Bentzen SM, Kolstad P. Misonidazole combined with radiotherapy in the treatment of carcinoma of the uterine cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989; 16: 1069-1072.
- Overgaard J, Horsman MR. Modification of hypoxia-induced radioresistance in tumors by the use of oxygen and sensitizers. *Seminars in Radiation Oncology*, 1996; 6(1): 10-21.
- Overgaard J. Tumour oxygen unloading capacity in patients with squamous cell carcinoma in head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1992; 22: 407-410.
- Pappova N, Siracka E, Vacek A, Durkovsky J. Oxygen tension and prediction of the radiation response. Polarographic study in human breast cancer. *Neoplasia* 1982; 29: 669-674.
- Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int J Cancer* 1993; 54: 594-606.
- Parums DV, Cordell JL, Micklem K. JC70: a new monoclonal antibody that detects vascular endothelial associated antigen on routinely processed tissue sections. *J Clin Pathol* 1990; 43: 752-757.
- Pectasides D, Economides N, Bourazanis J, Pozadzizou P, Gogou L, Koutsouba P, et al. Squamous cell carcinoma antigen, tumor-associated trypsin inhibitor, and carcinoembryonic antigen for monitoring cervical cancer. *Am J Clin Oncol* 1994; 17(4): 307-312.
- Pérez CA, Breaux S, Madoc-Jones H. Radiation therapy alone in the treatment of carcinoma of the uterine cervix. I. Analysis of complications. *Cancer* 1983; 51: 1393-1402.
- 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.
- Pérez CA, Camel HM, Kao MS, Askin F. Randomized study of preoperative radiation and surgery or irradiation alone in the treatment of stage IB and IIA carcinoma of the uterine cervix: Final Report. *Gynecol Oncol* 1987; 27: 129-140.
- Pérez CA, Camel HM, Walz BJ. Radiation therapy alone in the treatment of carcinoma of the uterine cervix: a 20-year experience. *Gynecol Oncol* 1986; 23: 127-140.

- Pérez CA, Grigsby PW, Chao KS, Mutch DG, Lockett MA. Tumor size, irradiation dose, and long-term outcome of carcinoma of the uterine cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 41(2):307-317.
- Pérez CA, Kao MS. Radiation therapy alone or combined with surgery in barrel-shaped carcinoma of the uterine cervix (stages IB, IIA, IIB). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1985; 11: 1903-1909.
- Pérez-Mesa C, Spratt JS. Scalene node biopsy in the pretreatment staging of the carcinoma of the cervix uteri. *Am J Obstet Gynecol* 1976; 125: 93-95.
- Pérez S. Tesis doctoral: Apoptosis tumoral: Relación con la proliferación (IM, ki67) y genes reguladores (p53, c-erb-2). Predicción de respuesta a la irradiación y supervivencia. Apoptosis en cáncer de mama operable. Relación con los receptores hormonales, Índice de proliferación ki67, p53 y sobreexpresión de c-erb-2. 1998; 61-73.
- Pérez S. Tesis doctoral: Apoptosis tumoral: Relación con la proliferación (IM, ki67) y genes reguladores (p53, c-erb-2). Predicción de respuesta a la irradiación y supervivencia. Apoptosis en carcinoma de urotelio superior. Relación con la proliferación, expresión de p53 y supervivencia. 1998; 75-86.
- Peters WA III, Liu PY, Barret R, et al. Cisplatin, 5-fluorouracil plus radiation therapy are superior to radiation therapy as adjunctive in high-risk, early-stage carcinoma of the cervix after radical hysterectomy and pelvic lymphadenectomy: report of a phase III intergroup study. Presented at the 30th Annual Meeting of the Society of Gynecologic Oncologists, San Francisco, 1999.
- Pezzella F, Gatter K. What is the value of bcl-2 protein detection for histopathologist? *Histopathology* 1995; 26: 89-93.
- Pezzella F, Turley H, Kuzu I, Tungekar MF. Bcl-2 protein in non-small cell lung carcinoma. *N Engl J Med* 1993; 329: 690.
- Pillai MR, Halabi S, McKalip A, Jayaprakash PG, Rajalekshmi TN, Nair MK, et al. The presence of human papillomavirus 16/18 E6, p53, and bcl-2 protein in cervicovaginal smears from patients with invasive cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996; 5(5): 329-335.
- Pillai MR, Jayaprakash PG. Bcl-2 immunoreactivity but not p53 accumulation associated with tumour response to radiotherapy in cervical carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999; 125(1): 55-60.
- 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.
- Pisani P, Parkin DM, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality. Implications for prevention and projections of future burden. *Int J Cancer* 1993; 55: 891-903.
- Piver MS, Chung WS. Prognostic significance of cervical lesion size and pelvic node metastases in cervical carcinoma. *Obstet Gynecol* 1975; 46: 507-510.
- Piver MS, Marchetti DL, Patton T. Radical hysterectomy and pelvic lymphadenectomy versus radiation therapy for small(<3cm) stage IB cervical carcinoma. *Am J Clin Oncol* 1988; 11: 21-24.
- Potish RA. Surgical staging, extended field radiation, and enteric morbidity in the treatment of cervix cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 31:1009-1010.
- 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.
- Quigley MM, Knab DR, McMahan ER. Carcinoma of the cervix: a third treatment. *Obstet Gynecol* 1975; 45: 650-655.
- Rabin S, Browde S, Nissenbaum M, Koller AB, DeMoor NG. Radiotherapy and surgery in the management of stage IB and IIA carcinoma of the cervix. *S Afr Med J* 1984;65:374.
- Raff MC. Social control on cell survival and cell death. *Nature* 1992; 356:397-399.
- Rajkumar T, Rajan S, Baruah RK, MajhiU, Selvaluxmi G, Vasanthan A. Prognostic significance of bcl-2 and p53 protein expression in stage IIB and IIIB squamous cell carcinoma of the cervix. *Eur J Gynaecol Oncol* 1998; 19(6):556-560.
- Raleigh JA, Calkins Adams DP, Rinker LH, Ballenger CA, Weissler MC, Fowler WC Jr, et al. Hypoxia and vascular endothelial growth factor expression in human squamous cell carcinomas using pimonidazole as a hypoxia marker. *Cancer Res* 1998; 58(17): 3765-3768.
- Raleigh JA, Dewhirst MW, Thrall DE. Measuring tumor hypoxia. *Semin Radiat Oncol* 1996; 6 (1): 37-45.
- Rampone JF, Klem V, Kolstad P. Combined treatment of stage IB carcinoma of the cervix. *Obstet Gynecol* 1973; 41: 163-167.
- Randall ME, Constable WC, Hahn SS. Results of radiotherapeutic management of carcinoma of the cervix with emphasis on the influence of histologic classification. *Cancer* 1988; 62: 48-53.
- Ravazoula P, Zolota V, Hatjicondi O, Sakellariopoulos G, Kourounis G, Maragoudakis ME. Assessment of angiogenesis in human cervical lesions. *Anticancer Res* 1996; 16(6B): 3861-3864.
- Reagan JW, Fu YS. Histologic types and prognosis of cancers of the uterine cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1979; 5: 1015-1020.
- Reed JC. Bcl-2 and the regulation of cell death. *J Cell Biol* 1994; 124: 1-6.
- Révész L, Siracka E, Siracky J, Delides G, Paviaki K. Variation of vascular density within and between tumors of the uterine cervix and its predictive value for radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989; 16: 1161-1163.
- Rey A, Lara P, Redondo E, Valdés E, Apolinario RM. Overexpression of p53 in transitional cell carcinoma of the renal pelvis and ureter. Relation to tumor proliferation and survival. *Cancer* 1997; 79: 2178-2185.
- Riou GF, Bourhis J, Le MG. The c-myc proto-oncogen in invasive carcinomas of the uterine cervix: clinical relevance of overexpression in early stages of the cancer. *Anticancer Res* 1990; 10: 1225-1232.

- Riou GF, Le MG, LeDoussal V. c-myc protooncogene expression and prognosis in early carcinoma of the uterine cervix. *Lancet* 1988; 2: 761-763.
- Rockwell S. Oxygen delivery: implications for the biology and therapy of solid tumors. *Oncol Res* 1997; 9(6-7): 383-390.
- Rose PG, Bundy BN, Watkins EB, Thigpen JT, Deppe G, Maiman MA, et al. Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer. *N Eng J Med* 1999; 340: 1144-1153.
- Rotman M, John M, Boyce J. Prognostic factors in cervical carcinoma: implications in staging and management. *Cancer* 1981; 48: 560-567.
- Rotmensch J, Senekjian EK, Javaheri G. Evaluation of bolus cisplatin and continuous 5fluorouracil infusion for metastatic and recurrent squamous cell carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 1988; 29: 76-81.
- Rutgers JL, Mattox TF, Vargas MP. Angiogenesis in uterine cervical squamous cell carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 1995; 14(2): 114-118.
- Rutledge FN, Fletcher GH, MacDonald EJ. Pelvic lymphadenectomy as an adjunct to radiation therapy in treatment for cancer of the cervix. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 1965; 93: 607-614.
- 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.
- 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.
- Sagae S, Kuzumaki N, Hisada T, Mugikura Y, Kudo R, Hashimoto M. Ras oncogene expression and prognosis of invasive squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Cancer* 1989; 63: 1577-1582.
- Samlal RA, van der Velden J, Schilthuis MS, Gonzalez D, Ten Kate FJ, Hart AA, et al. Identification of high risk groups among node positive patients with stage IB-IIA cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1997; 64 (3): 463-467.
- Samlal RA, van der Velden J, Ten Kate FJ, Schilthuis MS, Hart AA, Lammes FB. Surgical pathological factors that predict recurrence in stage IB and IIA cervical carcinoma patients with negative pelvic lymph nodes. *Cancer* 1997; 80 (7): 1234-1240.
- Santin AD, Hermonat PL, Ravaggi A, Pecorelli S, Cannot MJ, Parham GP. Secretion of vascular endothelial growth factor in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Obstet Gynecol* 1999; 94(1): 78-82.
- Scambia G, Benedetti-Panici P, Foti E, Amoroso M, Salerno G, Ferrandina G, et al. Squamous cell carcinoma antigen: prognostic significance and role in monitoring of neoadjuvant chemotherapy response in cervical cancer. *J Clin Oncol* 1994; 12(11): 2309-2316.
- Scambia G, Ferrandina G, Marone M, Benedetti-Panici P, Giannitelli C, Piantelli M, et al. Nm23 in ovarian cancer: correlation with clinical outcome and other clinico-pathological and biochemical prognostic parameters. *J Clin Oncol* 1996; 14: 334-342.
- Schafer A, Friedmann W, Mielke M, Schwartlander B, Koch MA. The increased frequency of cervical dysplasia-neoplasia in women infected with the human immunodeficiency virus is related to the degree of immunosuppression. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164:593.
- Schauenstein E, Lahousen M, Weblacher M, Steinschifter W, Estelberger W, Schauenstein K. Selective decrease in serum immunoglobulin G1. A tissue nonspecific tumor marker detecting early stages of gynecologic malignant disease with high efficiency. *Cancer* 1996; 78(3): 511-516.
- Schlenger K, Höckel M, Mitze M. Tumor vascularity: a novel prognostic factor in advanced cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1995; 59: 57-66.
- Schmidt D and von Hochstetter AR. The use of CD31 and collagen IV as vascular markers. A study of 56 vascular lesions. *Path Res Pract* 1995; 191: 410-414.
- Schöell W, Janicek MF, Mirhashemi R. Epidemiology and biology of cervical cancer. *Sem Surg Oncol* 1999; 16:203-211.
- Schwartz LB, Carcangiu ML, Bradham L, Schwartz PE. Rapidly progressive squamous cell carcinoma of the cervix coexisting with human immunodeficiency virus infection: clinical opinion. *Gynecol Oncol* 1991; 41:255.
- Selvakumaran M, Lin HK, Miyashita R. Immediate early up-regulation of bax expression by p53 but not TGF beta1: a paradigm for distinct apoptotic pathways. *Oncogene* 1994; 9: 1791-1798.
- Senikjian EK, Young JM, Weissner Pa, et al. An evaluation of squamous cell carcinoma antigen in patients with cervical squamous cell carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 157: 433.
- Serur E, Frutcher RG, Maiman M, McGuire J, Arrastia CD, Gibbon D. Age, substance abuse, and survival of patients with cervical carcinoma. *Cancer* 1995; 75:2530.
- Sharma S, Patel FD, Sandhu APS. A prospective randomized study of local hyperthermia as a supplement and radiosensitizer in the treatment of carcinoma of the cervix with radiotherapy. *Endocuriether Hypertherm Oncol* 1989; 5: 151-159.
- Sheets EE, Crum CP, Yeh J. Association between cervical neoplasia and apoptosis as detected by in situ nuclear labeling. *Gynecol Oncol* 1996; 63(1): 94-100.
- Shepherd JH. Staging announcement: FIGO staging of gynecologic cancers. Cervical and vulva. *Int J Gynecol Cancer* 1995; 5: 319.
- Sheridan MT, Cooper RA, West CML. A high ratio of apoptosis to proliferation correlates with improved survival after radiotherapy for cervical adenocarcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999; 44(3): 507-512.
- Sheridan MT, Cooper RA, West CML. Spontaneous apoptosis correlates with reoxygenation following radiotherapy for cervical carcinoma. *Radiation Research* 1999; 1:259 (Abs TM12).
- Shingleton HM, Bell MC, Fremgen A, Chmiel JS, Russell AH, Jones WB, et al. Is there really a difference in survival of women with squamous cell carcinoma, adenocarcinoma, and adenosquamous cell

- carcinoma of the cervix? *Cancer* 1995; 76 (Supl): 1948-1955.
- Shingleton HM, Orr JW. *Cancer of the cervix: other treatments*. Philadelphia: PA Lippincott, 1995; 201-223.
- Shoji Y, Saegusa M, Takano Y, Ohbu M, Okayasu I. Correlation of apoptosis with tumour cell differentiation, progression, and HPV infection in cervical carcinoma. *J Clin Pathol* 1996; 49(2): 134-138.
- Shweiki D, Neeman M, Itin A, Keshet E. Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(3): 768-772.
- Skegg DCG, Corwin PA, Paul C. Importance of the male factor in cancer of the cervix. *Lancet* 1982; II:581.
- Slagle BL, Kaufman RH, Reeves WC, Icenogle JP. Expression of ras, c-myc and p53 proteins in cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer* 1998; 83(7): 1401-1408.
- Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia. Documentos de Consenso. S.E.G.O., 1997; 117-118.
- Souhami L, Gil RA, Allan SE. A randomized trial of chemotherapy followed by pelvic radiation therapy in stage IIIB carcinoma of the cervix. *J Clin Oncol* 1991; 9: 970-977.
- Sproston ARM, Roberts SA, Davidson SE, Hunter RD, West CML. Serum tumor markers in carcinoma of the uterine cervix and outcome following radiotherapy. *Br J Cancer* 1995; 72: 1536-1540.
- Stanhope CR, Smith JP, Wharton JT, Rutledge FN, Fletcher GH, Gallagher HS. Carcinoma of the uterine cervix. The effect of age on survival. *Gynecol Oncol* 1980; 10: 188-193.
- Staunton MJ, Gaffney EF. Tumor type is a determinant of susceptibility to apoptosis. *Am J Clin Pathol* 1995; 103: 300-307.
- Stehman FB, Bundy RN, Keys H. A randomized trial of hydroxyurea vs misonidazole adjunct to radiation therapy in carcinoma of the cervix: a preliminary report of a Gynecologic Oncology Group Study. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 159: 87-94.
- Stehman FR, Bundy BN, DiSaia PH. Carcinoma of the cervix treated with radiation therapy: I. A multivariate analysis of prognostic variables in the Gynecologic Oncology Group. *Cancer* 1991; 67: 2776-2785.
- Stone HB. Oxygen in human tumors: correlations between methods of measurement and response to therapy. *Radiat Res*, 1993; 136: 422-434.
- 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.
- Strang P, Eklund GM, Stendhal U. S-phase rate as a predictor of early recurrences in carcinoma of the uterine cervix. *Anticancer Res* 1987; 7: 807-810.
- Sudarsanam A, Charyulu K, Belinson J. Influence of exploratory celiotomy on the management of carcinoma of the cervix. *Cancer* 1978; 41:1049.
- Sundfor K, Högberg T, Tropé C. Radiotherapy and neoadjuvant chemotherapy for cervical carcinoma. A randomized multicenter study of sequential cisplatin and 5fluorouracil and radiotherapy in advanced cervical carcinoma stage IIB and IVA. *Cancer* 1996; 77: 2371-2378.
- Sundfor K, Lyng H, Kongsgard U, Tropé C, Rofstad E. Polarographic measurements of pO₂ in cervix carcinoma. *Gynecol Oncol* 1997; 64: 230-236.
- Sundfor K, Lyng H, Rofstad EK. Tumour hypoxia and vascular density as predictors of metastasis in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Br J Cancer* 1998; 78(6): 822-827.
- Swan DS, Roddick JW. A clinical-pathological correlation of cell type classification for cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1973; 116: 666-670.
- Symonds RP, Habeshaw T, Paul DJ, Darling KA, Burnett RA, et al. No correlation between ras, c-myc and c-jun protooncogene expression and prognosis in advanced carcinoma of the cervix. *Eur J Cancer* 1992; 28A: 1615-1617.
- Tanaka Y, Sawada S, Murata R. Relationship between lymph node metastases and prognosis in patients irradiated postoperatively for carcinoma of the uterine cervix. *Acta Radiol* 1984; 23: 455-459.
- Terris M, Wilson F, Nelson JH Jr. Relation of circumcision in carcinoma of the cervix. *Am J Obstet Gynecol* 1973; 117: 1056-1066.
- Thews O, Koenig R, Kutzner J, Kelleher DK, Vaupel P. Impact of anemia correction by erythropoietin treatment on radiosensitivity. Radiation Research Society and North American Hypertermia Society. 1998. Programm and Abstracts. P22-428 abstr.
- Thigpen JT, Blessing JA, DiSaia PJ. A randomized comparison of a rapid versus prolonged (24 hour) infusion of cisplatin in therapy of squamous cell carcinoma of the uterine cervix: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 1989; 32: 198-202.
- Thomas GM, Dembo AJ. Is there a role for adjuvant pelvic irradiation therapy after radical hysterectomy in early stage cervical cancer? *Int J Gynecol Cancer* 1991; 1: 1-8.
- Thomas GM, Rauth AM, Bush RS. A toxicity study of daily dose metronidazole with pelvic irradiation. *Cancer Clin Trials* 1980; 3: 223-230.
- Thomas GM, Stehman B. Early invasive disease: risk assesment and management. *Semin Oncol* 1994; 21: 17-24.
- Thomas GM. Improved treatment for cervical cancer: concurrent chemotherapy and radiotherapy. *N Eng J Med* 1999; 340(15) Edit:1198-1199.
- Thomlinson RH, Gray LH. The histological structure of some human lung cancers and the possible

- implications for radiotherapy. *Br J Cancer*, 1955; 9: 539-549.
- Thoms WW, Eifel PJ, Delclos L. Bulky endocervical carcinomas of the uterine cervix: a 23 year experience at the MD Anderson Cancer Center. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990; 19 (suppl 1): 127.
- Tierney JF, Stewart LA, Parmar MK. Can the published data tell us about the effectiveness of neoadjuvant chemotherapy for locally advanced cancer of the uterine cervix? *Eur J Cancer* 1999; 35(3): 406-409.
- 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 W, De Cuyper E, Weyler J, Van Marck E, De Pooter C, Albertyn G, et al. Expression of bcl-2 in invasive and in situ carcinoma of the uterine cervix. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178(1 Pt 1): 113-117.
- Tjalma W, Van Marck E, Weyler J, Dirix L, Van Daele A, Goovaerts G, et al. Quantification and prognostic relevance of angiogenic parameters in invasive cervical cancer. *Br J Cancer* 1998; 78(2): 170-174.
- Tjalma W, Weyler J, Goovaerts G, De Pooter C, Van Marck E, van Dam P. Prognostic value of bcl-2 expression in patients with operable carcinoma of the uterine cervix. *J Clin Pathol* 1997; 50: 33-36.
- Toi M, Inada K, Hoshina S, Suzuki H, Kondo S, Tominaga T. Vascular endothelial growth factor and platelet-derived endothelial cell growth factor are frequently coexpressed in highly vascularized human breast cancer. *Clin Cancer Res* 1995; 1: 961-964.
- Toi M, Kashitani J, Tominaga T. Tumor angiogenesis is an independent prognostic indicator in primary breast carcinoma. *Int J Cancer* 1993; 55:371-374.
- Toita T, Nakano M, Higashi M. Prognostic value of cervical size and pelvic lymph node status assessed by computed tomography for patients with uterine cervical cancer treated by radical radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 33: 843-849.
- Tokumo K, Kodama J, Seki N, Nakanishi Y, Miyagi Y, Kamikura S, et al. Different angiogenic pathways in human cervical cancers. *Gynecol Oncol* 1998; 68(1): 38-44.
- Tropé C, Kristensen G. Current status of chemotherapy in gynecologic cancer. *Semin Oncol* 1997; 24(5), suppl 15: 1-22.
- Tsai SC, Kao CH, Wang SJ. Study of a new tumor marker cyfra 21-1, in squamous cell carcinoma of the cervix, and comparison with squamous cell carcinoma antigen. *Neoplasma* 1996; 43(1): 27-29.
- Tsang R, Fyles AW, Milosevic M, Levin W, Manchul LA, Pintilie M. Interrelationship of proliferation and hypoxia in carcinoma of the cervix. *Radiat Research* 1999; 112:260 (Abs TM14).
- Tsang R, Wong CS, Fyles AW, Levin W, Manchul LA, Milosevic M, et al. Tumour proliferation and apoptosis human uterine cervix carcinoma II: correlation with clinical outcome. *Radiat Oncol* 1999; 50-101.
- Tsang RW, Fyles AW, Kirkbride P, Levin W, Manchul LA, Milosevic MF, et al. Proliferation measurements with flow cytometry Tpot in cancer of the uterine cervix: correlation between two laboratories and preliminary clinical results. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 32(5): 1319-1329.
- Uehara T, Kuwashima Y, Izumo T, Kishi K, Shiromizu K, Matsuzawa M. Expression of the proto-oncogene bcl-2 in uterine cervical squamous cell carcinoma: its relationship to clinical outcome. *Eur J Gynaecol Oncol* 1995; 16(6): 453-460.
- Van der Velden J, Samlal R, Schilthuis MS, González DG, ten Kate FJ, Lames FB. A limited role for adjuvant radiotherapy after the Wertheim/Okabayashi radical hysterectomy for cervical cancer confined to the cervix. *Gynecol Oncol* 1999; 75(2): 233-237.
- Van Herik M. Fever as a complication of radiation therapy for carcinoma of the cervix. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 1965; 43: 104-109.
- Van Le L, Stoerker J, Rinehart CA, Fowler WC. H-ras codon 12 mutations in cervical dysplasia. *Gynecol Oncol* 1993; 49: 181-184.
- Van Nagell JR Jr, Donaldson ES, Wood EG. The significance of vascular invasion and lymphocytic infiltration in invasive cervical cancer. *Cancer* 1978; 41: 228-234.
- Van Nagell JR, Rayburn W, Donaldson ES. Therapeutic implications of patterns of recurrence in cancer of the uterine cervix. *Cancer* 1979; 44: 2354-2361.
- Van Nagell JR, Roddick JW, Lowin DM. The staging of cervical cancer: inevitable discrepancies between clinical staging and pathological findings. *Am J Obstet Gynecol* 1971; 110: 973-978.
- Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res*, 1989; 49: 6449-6465.
- Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988; 335: 440-442.
- Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P, et al. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an International Consensus on Methodology and Criteria of Evaluation. *Eur J Cancer* 1996; 32^a (14): 2474-2484.
- Vesalainen S, Lipponen P, Talja M. Histological grade, perineural infiltration, tumour-infiltrating lymphocytes and apoptosis as determinants of long-term prognosis in prostatic adenocarcinoma. *Eur J Cancer* 1994; 30A: 1797-1803.
- Vigario G, Kurohara SS, George FW III. Association of hemoglobin levels before and during radiotherapy with prognosis in uterine cervix cancer. *Radiology* 1973; 106: 649-652.
- Von Knebel Doeberitz M, Spitkovsky D, Ridder R. Interactions between steroid hormones and viral oncogenes in the pathogenesis of cervical cancer. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1997; 81: 233-239.
- Wang CC. Altered fractionation radiation therapy for gynecologic cancers. *Cancer* 1987; 60: 2064-2067.
- Watson ER, Halnan KE, Dische S. Hyperbaric oxygen and radiotherapy: a Medical Research Council trial in

- carcinoma of the cervix. *Br J Radiol* 1977; 51: 879-887.
- Weems DH, Mendenhall WM, Vova FJ. Carcinoma of the intact uterine cervix, stage IB-IIA-B, >6cm in diameter: Irradiation alone vs preoperative irradiation and surgery. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1985; 11: 1911-1914.
- Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis: correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324: 1-8.
- West C, Cooper R, Logue J, Davidson S, Hunter R. Hypoxia and vascularity in cervix tumours. *Rad Research* 1999; 1: 262, TM20 (abs).
- West CML, Davidson SE, Roberts SA, Hunter RD. Intrinsic radiosensitivity as a predictor of patient response to radiotherapy. *Br J Cancer* 1993; 68: 819-823.
- West CML, Hendry JH. Intrinsic radiosensitivity as a predictor of patient response to radiotherapy. *Br J Radiol Suppl* 1992; 24: 146-152.
- Wheeler JA, Stephens LC, Tornos C. ASTRO Research Fellowship: Apoptosis as a predictor of tumor response to radiation in stage IB cervical carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 32: 1487-1493.
- Whelan SL, Parkin DM, Masuyer E (eds). Patterns of cancer in five continents. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1990.
- Whitney CW, Sause W, Bundy BN, et al. A randomized comparison of fluorouracil plus cisplatin versus hydroxyurea as an adjunct to radiation therapy in stages IIB-IVA carcinoma of the cervix with negative para-aortic lymph nodes. *J Clin Oncol* (in press).
- Wiggins DL, Granai CO, Steinhoff MM. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1995; 56: 353-356.
- Willis G, Jennings B, Ball RY, New EN, Gibson I. Analysis of ras point mutations and human papillomavirus 16 and 18 in cervical carcinoma and their metastases. *Gynecol Oncol* 1993; 49: 359-364.
- Wingo PA, Tong T, Bolden S. Cancer statistics, 1995. *CA* 1995; 45:8.
- Wong RK, Fyles A, Milosevic M, Pintilie M, Hill RP. Heterogeneity of polarographic oxygen tension measurements in cervix cancer: an evaluation of within and between tumor variability, probe position, and track depth. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997; 39(2): 405-412.
- Wong WS, McGuire LJ. Tumor growth fraction in cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1991; 40 (1): 48-54.
- Wong YF, Chung TK, Cheung TH, Lam SK, Tam DS, Lu HJ, et al. HER-2/neu amplification in cervical cancer in Chinese women of Hong-Kong and China. *J Obstet Gynecol Res* 1996; 22 (2): 171-175.
- Wu HJ. The expression of c-myc protein in uterine cervical cancer: a possible prognostic indicator. *Nippon-Sanka-Fujinka-Gakkai-Zasshi* 1996; 48(7): 515-521.
- Wunsch H. Why HPV is bad for only some women. *The Lancet* 1998; 351: 1563.
- Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68: 251-306.
- Wyllie AH. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: An overview. *Cancer Metast Rev* 1992; 11: 95-103.
- Yuan CC, Wang PH, Lai CR, Yen MS, Chen CY, Yuang CM. Prognosis-predicting system based on factors related to survival of cervical cancer. *Int J Gynaecol Obstet* 1998; 63(2):163-167.
- Zola P, Volpe T, Castelli G. Is the published literature a reliable guide for deciding between alternative treatments for patients with early cervical cancer? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989; 16: 785-797.
- Zolzer F, Alberti W, Pelzer T, LambertiG, Hulskamp FH, Streffer C. Changes in S-phase fraction and micronucleus frequency as prognostic factors in radiotherapy of cervical carcinoma. *Radiother-Oncol* 1995; 36(2): 128-132.
- Zreik TG, Chambers JT, Chambers SK. Parametrial involvement, regardless of nodal status: a poor prognostic factor for cervical cancer. *Obstet Gynecol* 1996; 87 (5 Pt 1): 741-746.
- zur Hausen H. Papillomavirus in anogenital cancer as a model to understand the role of viruses in human cancers. *Cancer Res* 1989; 4677-4681.
- zur Hausen H. Viruses in human cancers. *Science* 1991; 254: 1167-1172.