

**Papel de MVP en la
reparación del ADN, la
progresión tumoral y la
hipoxia en carcinoma
cervical: impacto pronóstico**

Fausto Góes Fontes Neto

Tesis Doctoral

**Universidad de Las Palmas de Gran Canaria
Diciembre de 2010**



PROGRAMA DE DOCTORADO
CÁNCER: BIOLOGÍA Y CLÍNICA

Título

**Papel de MVP en la reparación del ADN, la progresión
tumoral y la hipoxia en carcinoma cervical: impacto
pronóstico**

Memoria que para optar al grado de Doctor por la Universidad de Las Palmas de Gran
Canaria presenta el Licenciado

Fausto Góes Fontes Neto

Director

Dr. Pedro Carlos Lara Jiménez

Profesor Titular de Cancerología General de la ULPGC

Codirectores

Dra. Marta Lloret Sáez-Bravo

Profesora Asociada de Cancerología General de la ULPGC

Dr. Luis Alberto Henríquez Hernández

Profesor Asociado de Toxicología de la ULPGC

Este trabajo ha sido financiado por el Instituto Canario de Investigación del Cáncer (ICIC)



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
Departamento de Ciencias Clínicas

PEDRO CARLOS LARA JIMÉNEZ, PROFESOR TITULAR DE CANCEROLOGÍA GENERAL DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLÍNICAS, FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado **“PAPEL DE MVP EN LA REPARACIÓN DEL ADN, LA PROGRESIÓN TUMORAL Y LA HIPOXIA EN CARCINOMA CERVICAL: IMPACTO PRONÓSTICO”**, ha sido realizado por **D FAUSTO GÓES FONTES NETO**, en el Departamento de Ciencias Clínicas de la Universidad de Las Palmas, bajo su dirección y asesoramiento técnico y científico, y que una vez revisada la presente Memoria, la encuentra apta para su defensa ante tribunal.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, extiende el presente certificado en Las Palmas de Gran Canaria a siete de octubre de dos mil diez.

Fdo: **Pedro Carlos Lara Jiménez**

MARTA LLORET SÁEZ-BRAVO, PROFESORA ASOCIADA DE CANCEROLOGÍA GENERAL DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLÍNICAS, FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado **“PAPEL DE MVP EN LA REPARACIÓN DEL ADN, LA PROGRESIÓN TUMORAL Y LA HIPOXIA EN CARCINOMA CERVICAL: IMPACTO PRONÓSTICO”**, ha sido realizado por **D FAUSTO GÓES FONTES NETO**, en el Departamento de Ciencias Clínicas de la Universidad de Las Palmas, bajo su dirección y asesoramiento técnico y científico, y que una vez revisada la presente Memoria, la encuentra apta para su defensa ante tribunal.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, extiende el presente certificado en Las Palmas de Gran Canaria a siete de octubre de dos mil diez.

Fdo: Marta Lloret Sáez-Bravo

LUIS ALBERTO HENRÍQUEZ HERNÁNDEZ, PROFESOR ASOCIADO DE TOXICOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLÍNICAS, FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado **“PAPEL DE MVP EN LA REPARACIÓN DEL ADN, LA PROGRESIÓN TUMORAL Y LA HIPOXIA EN CARCINOMA CERVICAL: IMPACTO PRONÓSTICO”**, ha sido realizado por **D FAUSTO GÓES FONTES NETO**, en el Departamento de Ciencias Clínicas de la Universidad de Las Palmas, bajo su dirección y asesoramiento técnico y científico, y que una vez revisada la presente Memoria, la encuentra apta para su defensa ante tribunal.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, extiende el presente certificado en Las Palmas de Gran Canaria a siete de octubre de dos mil diez.

Fdo: Luis Alberto Henríquez Hernández

Dedico esta tesis a mi novia Cyntia, mi hija Myla, mis padres Suzana y Fausto, mis hermanos Rodrigo y Caroline, mi sobrina Laís, mis tíos Ricardo y Virginia y a todos los míos. Siempre estuvieron conmigo aún en la distancia.

A D. Holmes Andrade, al Dr. Luis Gustavo Rosa Ferreira y al Dr. Wanderley Fraga (*in memoriam*).

Agradecimientos

Agradecimientos

Al profesor Dr. Pedro Carlos Lara Jiménez, director principal de esta Tesis Doctoral, por la confianza, ejemplo, estímulo, dedicación y competencia, además de una magnífica dirección de este estudio multidisciplinar, lo que propició el desarrollo de esta Tesis.

Al Instituto Canario de Investigación del Cáncer (ICIC), con especial mención al profesor Dr. Nicolás Díaz Chico, por haber sido un factor imprescindible para la realización de este trabajo.

A los co-directores de esta Tesis Doctoral, Dr. Luís Alberto Henríquez Hernández y Dra. Marta Lloret Saéz-Bravo por la amistad y apoyo personal y la primorosa co-orientación de este estudio.

A los doctores Beatriz Pinar Sedeño, Maria Auxiliadora Cabezón Pons, Gustavo González Machín, Bernardino Clavo Varas, Ana Ruíz Alonso, Elisa Bordón Rodríguez, Cristina Bilbao Sieyro, Agustín Rey, Jose Carlos Rodríguez Gallego y Maria Antonia Hernández Martín, por el incentivo y la colaboración directa, permitiendo un magnífico trabajo en equipo.

A Araceli Caballero, de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, por ayudar a dar sentido a los datos encontrados en este trabajo.

A todo el equipo del Laboratorio de Inmunología del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, por el cariño, auxilio, comprensión y por *soportarme* durante tanto tiempo.

A todo el personal del Servicio de Oncología Radioterápica del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, en especial a Maria Dolores Rey-Baltar (Lola) por sus grandes consejos.

A los increíbles profesores que tuve durante mi formación, ellos fueron los que despertaron mi inquietud por los caminos de la ciencia: Lúcia Castro, Adhemar Longatto, Rita Goreti do Amaral, Silvia Helena Rabelo dos Santos, Márcia Cirilo.

A mis amigos Eduardo Simas, Plínio Lawinsky, Alfredo Luxán y Valéria Mariotti.

A los pacientes, sus historias personales con el eterno “plantar cara” a los desafíos diarios y sus estimulantes ganas por la vida.

A todos los amigos, profesores, médicos y personal que ayudaron en la realización de este trabajo y cuyos nombres no fueron mencionados. Deseo transmitirles mis más sinceros agradecimientos.

Índice

ÍNDICE

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN	1
1. EPIDEMIOLOGIA	1
2. ETIOLOGIA	3
2.1. Potencial oncogénico del virus del Papiloma Humano (HPV)	3
2.1.1. Proteínas que participan en la replicación de ADN viral	4
3. FACTORES PRONÓSTICOS CLÁSICOS	7
3.1. Edad	7
3.2. Anemia	7
3.3. Volumen tumoral	8
3.4. Grado de diferenciación e histología	8
3.5. Afectación ganglionar	9
3.6. Otros factores pronósticos	10
4. FACTORES PRONÓSTICOS BIOLÓGICOS	11
4.1. Proliferación celular en cáncer de cérvix uterino	11
4.2. Proliferación tumoral y radioterapia	13
4.3. Proteínas reguladoras de la proliferación celular	16
4.3.1. Receptor para crecimiento dependiente de insulina (IGF1-R)	16
4.3.2. Ciclina D1	19
4.4. Proteínas reguladoras de la apoptosis en cáncer de cérvix uterino	21
4.4.1. Proteínas reguladoras	23
4.5. Hipoxia en cáncer de cérvix uterino	27
4.5.1. Detección de hipoxia tumoral	29
4.5.2. Estudios actuales	30
4.6. Relación entre hipoxia y otros mecanismos celulares	32
4.7. Angiogénesis en cáncer de cérvix uterino	37
4.7.1. Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)	38
4.7.2. Medida de densidad de microvasos (MVD)	41
4.8. Invasión y metástasis	45
4.8.1. Proteínas de adhesión celular	45
4.8.2. Rotura de la membrana basal	46
4.8.3. Adhesión de la célula tumoral a la matriz extracelular	47
4.8.4. Inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-1)	48
4.9. Reparación del daño al ADN tras la radiación	52
4.9.1. Proteína Ku70/80	55
4.9.2. Proteína Ku70/80 y radioterapia	56
4.10. Proteínas de resistencia a drogas	59
4.10.1. LRP/MVP	64

4.10.2. LRP/MVP y Radioterapia	73
4.10.3. MVP modula otros mecanismos celulares	74

CAPITULO II

OBJETIVOS	79
-----------	----

CAPITULO III

PAPEL DE MVP SOBRE LA REPARACIÓN NO HOMÓLOGA Y LA APOPTOSIS ATRAVÉS DE LA REGULACIÓN NEGATIVA DE Ku70/80 Y BAX EN CARCINOMAS CERVICALES

RESUMEN/ABSTRACT	83
INTRODUCCIÓN	85
MATERIALES Y MÉTODOS	89
RESULTADOS	90
DISCUSIÓN	92
	96

CAPITULO IV

LA QUIMIO/RADIO RESISTENCIA INDUCIDA POR LA HIPOXIA TUMORAL ESTÁ MEDIADA POR LA SOBREEXPRESIÓN DE MVP Y LA INHIBICIÓN DE Ku70/80 EN CARCINOMAS CERVICALES

RESUMEN/ABSTRACT	99
INTRODUCCIÓN	101
MATERIALES Y MÉTODOS	105
RESULTADOS	107
DISCUSIÓN	111
	114

CAPITULO V

LA SOBREEXPRESIÓN DE MVP Y/O IGF-1R INDUCE RADIO-RESISTENCIA EN PACIENTES AFECTOS DE CARCINOMA CERVICAL TRATADOS CON RADIO Y QUIMIOTERAPIA

RESUMEN/ABSTRACT	119
INTRODUCCIÓN	121
MATERIALES Y MÉTODOS	125
RESULTADOS	126
DISCUSIÓN	129
	132

CAPITULOS VI

CONCLUSIONES	137
--------------	-----

CAPITULO VII

BIBLIOGRAFÍA	143
--------------	-----

Introducción

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1. EPIDEMIOLOGÍA

El carcinoma cervical ocupa una posición relevante como causa de mortalidad, especialmente en países menos desarrollados (Todd et al., 2004). Datos de la Organización Mundial de Salud registraron en el año de 2005 más de 500.000 nuevos casos de carcinoma cervical en todo el mundo, de los cuales el 90% ocurrieron en países en desarrollo. Según la misma organización, en el año de 2007 fallecieron cerca de 260.000 mujeres víctimas de esa enfermedad. (O.M.S., 2007).

El principal motivo de la morbilidad-mortalidad por el carcinoma cervical en países en vía de desarrollo, resulta de la inexistencia o ineficacia de programas para la detección y tratamiento prematuro de las lesiones precursoras, de forma que las mayores tasas de incidencia de esa patología son observadas en Melanesia (Papua Nueva Guinea, Islas Solomon, Fiji y Vanuatu en Oceanía), África, América Central e América del Sur (Program For Appropriate Technology In Health, 2000). En los países desarrollados, donde existen eficientes programas para la prevención del carcinoma cervical, el cáncer invasor es relativamente raro, siendo las lesiones precursoras un desafío para la sanidad pública (Bosch y De San José, 2003; Arbyn et al., 2009). La tasa estimada de incidencia del carcinoma cervical, ajustada para edad, es de 11.3 por cada 100.000 mujeres, lo que muestra un claro contraste con los países emergentes, cuyas tasas se elevan a 18.7 por cada 100.000 mujeres (Ferlay et al., 2001). Estas diferencias son observadas igualmente si se analiza la incidencia de este tipo tumoral en diferentes países europeos. Así, Finlandia y Malta registran los niveles más bajos de incidencia (<5 casos por cada 100.000 habitantes); España, Suecia, Reino Unido, Italia, Grecia, entre otros registran niveles entre 5-10 casos por cada 100.000 habitantes; Dinamarca, Portugal y Alemania posee niveles entre 10-15 casos por cada 100.000 habitantes; los países de Europa del Este, menos desarrollados económicamente, tales como Eslovenia, República Checa, Bulgaria, Lituania, Polonia o Estonia tienen niveles entre 15-20 casos por cada 100.000 habitantes; y es Rumania el único país europeo con tasas de incidencia superiores a los 20 casos por cada 100.000 habitantes (Arbyn et al., 2007). Estas diferencias en la

incidencia, incluso en la mortalidad, son debidas posiblemente a los deficientes programas de detección precoz que hay en estos países (Arbyn et al., 2009).

La tasa de incidencia del carcinoma cervical crece rápidamente a partir de los 25-30 años. En los países más desarrollados, se observa una incidencia de 23 por cada 100.000 mujeres mayores de 45 años. Este dato contrasta con lo observado en países no desarrollados, cuyas tasas se elevan a 53/100.000 mujeres entre los 45 y 54 años; 65/100.000 mujeres entre 55 y 64 años y de aproximadamente 53/100.000 mujeres tras los 65 años de edad (Bosch y De San José, 2003).

Las tasas de incidencia y mortalidad por cáncer cervical en Brasil en el año 2000, ajustadas para la edad, fueron de 31.2/100.000 mujeres y de 11.5/100.000 mujeres, respectivamente (Ferlay et al., 2001). En el año 2003 se estimó la incidencia de 16.480 nuevos casos de este tipo tumoral en mujeres brasileñas, con exitus por la enfermedad en 4.110 mujeres. En ese mismo año, el carcinoma cervical sería la tercera causa más frecuente de cáncer entre las mujeres brasileñas, siendo apenas menor que las neoplasias malignas de la piel y el cáncer de mama, y se situaría como la cuarta causa más importante de muerte por cáncer entre las mujeres, detrás de los cánceres de mama, pulmón y colorrectales (Brasil, 2003). Las estimaciones para el año 2005 comprendían tasas de incidencia de 22.1/100.000 mujeres (Brasil, 2004). Para 2008 los números la incidencia fueron de (19/100.000) mujeres (INCA, 2008). Por fin, para el año 2010, se estima que el número de nuevos casos de cáncer de cérvix esperado en este país, sea de 18.430, con un riesgo estimado de 18 casos para cada cien mil mujeres (INCA, 2010).

En la provincia de Las Palmas, la incidencia de este tumor está por encima de la media nacional. Así, en el año 2003, la incidencia del cáncer de cérvix fue similar a la del cáncer de endometrio, con una prevalencia de 8/100.000 mujeres/año (Lloret et al., 2004). En España, los aumentos de la mortalidad observados para el cáncer de cérvix hasta principios de los años 90 muestran una tendencia decreciente en los últimos dos décadas; siendo que en el cáncer uterino se ha observado un descenso paulatino desde el año 1975, seguramente debido a los programas de cribado bien organizados y establecidos, además de las mejoras en los diagnósticos y tratamientos (Llorca et al., 2006; Domenech et al., 2009)

2. ETIOLOGÍA

2.1. Potencial oncogénico del Virus del Papiloma Humano (HPV)

La infección por el HPV ocurre generalmente durante la actividad sexual, cuando el virus penetra a través de los microtraumas causados en el epitelio genital, particularmente a nivel de la zona de unión de los epitelios malpighiano y cilíndrico, conocido como unión escamo-columnar (JEC). Ésta es la zona anatómica del cuello uterino donde las células se muestran en mayor actividad de proliferación. Este contacto inicial permite la exposición al virus de las células basales que, por estar en constante proliferación, colabora con la multiplicación del genoma viral que hace uso del aparato génico del huésped para su multiplicación. (Gavillon et al., 2010).

El virus penetra en la célula a través de cualquier tipo de solución de continuidad de la piel o mucosas y, por medio de una serie de reacciones, estimula el crecimiento de las células superficiales a partir de la replicación de las células basales. El crecimiento se hace por expansión clonal, pudiendo generar formaciones verrugosas en el epitelio. (Burd, 2003; Pereyra y Parellada, 2003).

Una vez infectadas, las células epiteliales son transformadas por el HPV pudiendo aparecer fenómenos de hiperplasia. A medida que los virus maduran y sus partículas se agrupan, se produce una migración hacia la superficie. En consecuencia, se pueden encontrar virus completos en los estratos epiteliales superiores (Bibbo y Longatto, 2001). La asociación del HPV con las verrugas y las neoplasias genitales, ha quedado demostrada por la presencia de ADN y ARN del virus, en un alto porcentaje de los carcinomas epidermoides de cérvix, vagina y pene (Bibbo y Longatto, 2001).

La unión del virus a la célula basal ocurre por intermedio de la proteína L1, presente en la cápside viral y en el extremo carboxi-terminal del receptor celular. La proteína ha sido aislada para los tipos virales 16-33 y con α -6-integrina para HPV 6. (Giroglou et al., 2001; Evander et al., 1997, Bousarghin et al., 2003). Tras la unión, se produce una internalización al citoplasma de la célula huésped. (Bousarghin et al., 2003).

Durante el ciclo viral, se puede definir una infección productiva y otra no productiva. La primera, se trata de una infección en la que se amplifica la expresión de los genes virales tempranos (a través de la región codificante (URR)), los cuales permiten producir grandes cantidades de copias del ADN viral. Esto ocurre cuando las

células basales en proliferación migran a los estratos parabasal y espinoso. (Frattini et al., 1994; Doorbar et al., 2000). En la infección no productiva, el genoma del virus se encuentra en la forma episomal o extracromosómica. En ese caso, el material genético del virus se encuentra localizado en los estratos basales, generando un bajo número de copias (entre 30 y 50 copias) por célula infectada. (Ruesch et al., 1998; Holmgren et al., 2005; Del Vecchio et al., 1992). Se ha sugerido que durante esta fase, el ADN viral podría estar difusamente distribuido por las células basales en proliferación y que la generación de un bajo número de copias impediría que el material genético del HPV fuera reconocido por los mecanismos de respuesta inmune (Ling Peh et al., 2002).

2.1.1. Proteínas que participan en la replicación de ADN viral

Se han identificado dos proteínas virales que son productos completos de los genes E1 y E2. Las proteínas E1 son multiméricas con actividad ATPasa y helicasa con capacidad para unirse a las llamadas “regiones de origen de replicación” (ORI) contenidas en sitios específicos del ADN viral, formando un complejo de iniciación con la proteína E2, ciclinas (especialmente la E), quinasas dependientes de ciclinas (CDK) y α -DNA polimerasa. Este complejo se produce en la región p68, y participan además otras proteínas de la célula huésped (Conger et al., 1999; Masterson et al., 1998; Ciang et al., 1992; Ustav et al., 1991). El producto del gen E2 es una proteína dimérica activadora de la transcripción que se une a la proteína E1, formando un complejo proteico. Durante la formación de este complejo, E2 es fosforilado por acción de kinasas, generando mayor control transcripcional (Penrose et al., 2000). Además, se ha observado que la proteína E2 puede inhibir al promotor P97 del HPV 16 y al promotor P105 del HPV 18, que se localizan cerca de la región TATAbox, responsable de la transcripción de las proteínas E6/E7 y de esa forma, reduciendo significativamente la síntesis de los productos de los genes E6 y E7 (Desaintes et al., 1997). Se ha observado además que la proteína E2 actúa directamente promoviendo la síntesis de la proteína p53, favoreciendo la detención del ciclo celular entre las fases G1 y la apoptosis (Webster et al., 2000). La detención del ciclo celular en G2 se produce a través de la unión de su región intermediaria a ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas, así como por el bloqueo de E7 (Raj et al., 2004). La integración viral ocurre debido a un clivaje entre los genes E1/E2, con la consecuente interrupción de lo control transcripcional ejercido por el gene E2. (Villa et al., 1998; Kalantari et al., 2001).

Aproximadamente el 30% del contenido proteico celular está constituido por la expresión de las proteínas E1-E4 cuando las células están infectadas por el virus (Davy et al., 2002; Raj et al., 2004). Estas proteínas forman complejos hexaméricos que, a través de su región N-terminal, se une a la red de citoqueratina celular produciendo su desestabilización. También producen cambios en el potencial de la membrana mitocondrial y otras alteraciones a nivel celular (Wang et al., 2004). El resultado de todos estos procesos, lleva a la desestructuración celular por la inestabilidad del citoesqueleto, produciendo daño mitocondrial y del metabolismo energético (Raj et al., 2004).

La transformación de las células infectadas como consecuencia de la integración del genoma viral en la célula huésped ocurre a nivel del estrato espinoso. Este proceso conduce a una inhibición del promotor P97 o P105, responsables de mantener bloqueada la expresión de las proteínas E6 y E7, por lo que en última instancia se genera la síntesis sin restricción de estas proteínas virales (Bosch et al., 2002). La proteína E6 está compuesta de 150 aminoácidos y su función es de primordial importancia para garantizar la multiplicación de la progenie viral (Hausen et al., 2000), formando un complejo con el gen P53 y la enzima ubiquitina ligasa generando su degradación (Nakahara et al., 2002).

El producto del gen p53 (localizado en el cromosoma 17), es la proteína p53 que, en condiciones normales permite detener el ciclo celular en la fase G1 en el caso de que sea detectada alguna alteración perjudicial para la célula y, de esa manera, impedir la proliferación de células potencialmente dañinas para el organismo. Esta función de p53 es mediada por el complejo p21cip1/WAF1 que inhibe las CDKs y activa el mecanismo de inducción de la apoptosis mediada por Bax. Por lo tanto, cuando la función protectora de p53 es alterada, en este caso por la acción de la proteína viral E6 del HPV, la célula dañada sigue viva y en proliferación, garantizando la multiplicación intracelular del virus (Hausen et al., 2000). Diversos trabajos demuestran una asociación entre p53 mutado y diversas enfermedades malignas (Lane DP, 1992/1993), así como la mayor eficiencia en la interacción de las proteínas E6 y E7 de los HPV 16 y 18 relacionados con cáncer (Efeyan y Serrano, 2007).

La principal función de la proteína E7 del HPV de alto riesgo, es desregular el ciclo celular de la célula infectada, principalmente por la inducción de la transición de la fase G0/S. Esta desregulación se produce por la activación de

diversos genes celulares mediados por E7 así como por la interacción de esa proteína con las proteínas que regulan el ciclo celular (Kisseljev et al., 2000). Se sabe que existe una interacción entre la proteína E7 de los HPV de alto riesgo con las proteínas de la familia retinoblastoma (pRB), lo que permite que E2F (una familia de factores de transcripción) cumpla su papel en la activación constitutiva de los factores transcripcionales, llevando a la progresión del ciclo celular (Zur et al., 2000). Por lo tanto, la unión de E7 con pRb permite la expresión de genes como c-myc, α -DNA-polimerasa, PCNA, Ki-67, proteína de manutención de minicromosomas (MCM), p16, ciclina A y E, incluso la inactivación de p21 y p27 (Zur et al., 2000; Middleton et al., 2003).

Otra importante proteína producida por el genoma viral es la E5. Se trata de una proteína hidrofóbica que puede expresarse tanto en la membrana celular como en el aparato de Golgi o el retículo endoplasmático (Conrad et al., 1993). Poco se sabe acerca de E5, aunque se ha sugerido que juegue algún papel en la estimulación de la proliferación celular, interactuando con factores de crecimiento epidérmico, derivados de plaquetas, factor p 185-neu y factor estimulantes de colonias (Gu et al., 1995).

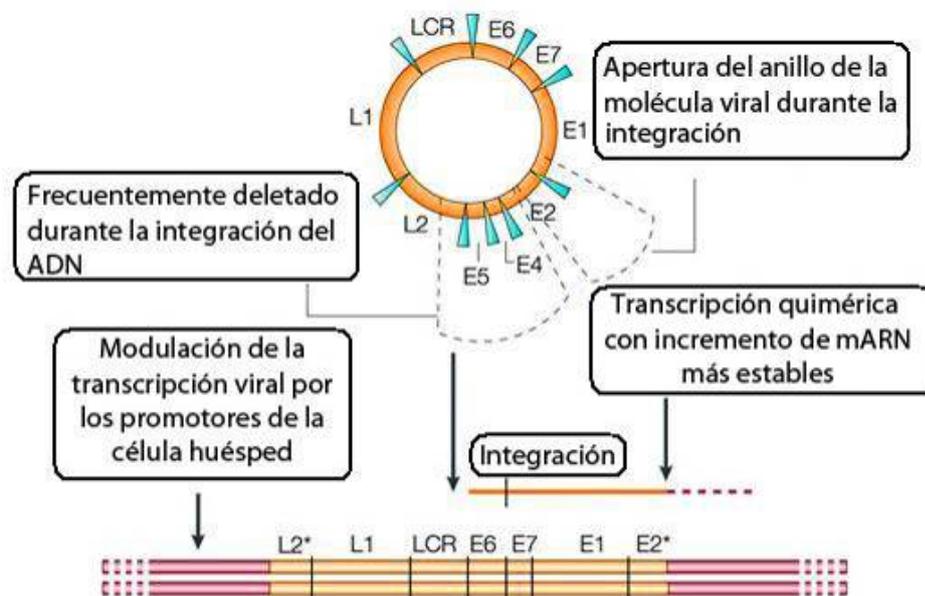


Figura 1. Mecanismo de acción del virus del papiloma humano.

Harald zur Hausen, 2002 (*Nature Reviews Cancer*. 2:342-350)

El aparato génico de HPV asociado al genoma de la célula infectada caracteriza el potencial oncogénico del virus. Los productos virales de los oncogenes E6 y E7 son los principales protagonistas cuando reaccionan con las

proteínas controladoras del ciclo celular p53 y pRb, respectivamente. En respuesta a esa interacción, la célula infectada se transforma primero y se maligniza después.

3. FACTORES PRONOSTICOS CLASICOS

3.1. Edad

El valor pronóstico de la edad en el carcinoma de cérvix no está del todo constatado. En un estudio realizado en 1300 pacientes con carcinoma de cérvix el pronóstico no cambiaba con independencia de la edad (Kyriakos et al., 1971; Berkowitz et al., 1979). No obstante, los resultados son contradictorios. Así, Prempreet et al observaron una menor supervivencia en mujeres menores de 35 (Prempreet et al., 1983). Esta contradicción puede explicarse por el análisis de Rutledge, que demostró una interacción entre la edad y el estadio en 250 pacientes menores de 35 años elegidos al azar e individuos controles (Rutledge et al., 1992). En otro estudio se evaluó 398 pacientes en estadio I y III de carcinoma cervical tratados con radioterapia. Los pacientes se dividieron en dos grupos, uno con pacientes de 35 a 69 años y otro con pacientes mayores de 70 años. Aunque la supervivencia libre de enfermedad a los 5 años y la supervivencia causa-específica eran comparables en los dos grupos, la recidiva tumoral y la muerte por cáncer era más frecuentes en el segundo grupo de pacientes (Mitchell et al., 1998). En otro reciente estudio, donde se incluyeron 125 pacientes con carcinoma cervical, las mujeres mayores de 65 años de edad tuvieron un aumento de riesgo de muerte de 3.39 veces, en comparación con las pacientes más jóvenes, después de ajustar por etapa avanzada de la enfermedad y la modalidad de tratamiento (Federico et al., 2010).

3.2. Anemia

Diversos estudios han corroborado el impacto pronóstico de la anemia en el cáncer cervical (Petersen et al., 1995; Grogan et al., 1999; Caro et al., 2001). Sin embargo, otros estudios han observado que el papel de la anemia resulta de una asociación con otras variables clínicas como el volumen tumoral, y que la anemia no ejerce un impacto independiente (Fyles et al., 2000). En un estudio retrospectivo realizado en siete centros de Canadá, se observó que la anemia durante la radioterapia era más importante que los niveles de hemoglobina (Hb) antes del tratamiento (Grogan et al., 1999). Posteriormente en un otro estudio realizado en 87 pacientes con cáncer de

cérvix, el nivel de hemoglobina durante la radioterapia fue el factor pronóstico más importante para la supervivencia y control local de la enfermedad (Dunst et al., 2003).

3.3. Volumen tumoral

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

El tamaño del tumor (diámetro clínico) está fuertemente asociado con el pronóstico en pacientes tratadas con radiación o cirugía. Son numerosos los estudios publicados que tratan de establecer una relación entre el tamaño y el volumen tumoral con el pronóstico del paciente (Dubben et al., 1998). Ambas variables han aparecido como factor independiente de supervivencia incluso en análisis multivariante (Landoni et al., 1995; Ogino et al., 1997).

La importancia del tamaño tumoral en el pronóstico del cáncer cervical es tan importante que motivó que en la revisión de la clasificación hecha por la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) en 1995, se subdividiera el estadio IB en función de dicha variable, tanto por la mayor incidencia de metástasis ganglionares y extrapélvicas como por la menor supervivencia (Rotman et al., 1981; Álvarez et al., 1989). En un estudio reciente se analizaron 179 pacientes con carcinoma cervical avanzado tratados con radioterapia donde se observó que el volumen tumoral estaba asociado de forma significativa con la supervivencia global ($P = 0.004$) (Narayan et al., 2006).

3.4. Grado de diferenciación e histología

La relación entre la supervivencia y el grado de diferenciación en el carcinoma escamoso y el adenocarcinoma cervical es controvertida, aunque en estudios recientes esta relación parece sólida (Yeh et al., 1999), especialmente para el adenocarcinoma (Grisaru et al., 2001; Chargui et al., 2006).

Por lo general se considera que los adenocarcinomas tienen un peor pronóstico que los carcinomas escamosos (Davy et al., 2003), aunque este hecho no está absolutamente demostrado (Hopkins et al., 1991; Shingleton et al., 1995; International

Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, 2006). Alfsen y colaboradores analizaron 417 pacientes con adenocarcinoma y 88 con carcinoma de células no escamosas de cérvix, observando que el carcinoma de células pequeñas era el único subgrupo con importancia pronóstica independiente en pacientes con adenocarcinomas de cérvix uterino ($P < 0.001$) (Alfsen et al., 2001).

3.5. Afectación ganglionar

El estado de afectación de los ganglios linfáticos tiene gran importancia en la progresión de la enfermedad y en la supervivencia (Stehman et al., 1991). En función de los ganglios afectados y su localización, el pronóstico puede variar considerablemente.

- Ganglios parametrales: la enfermedad parametrial con ausencia de ganglios pélvicos positivos, tiene escasa repercusión en la supervivencia (72% a los 5 años), pero si se asocia con ganglios pélvicos positivos, la supervivencia se reduce en un 44%. La existencia de afectación parametrial y de ganglios pélvicos positivos reduce la supervivencia en un 50% comparada con pacientes con ganglios negativos y sin afectación parametrial.

- Ganglios pélvicos: En el estadio IB (FIGO), la presencia de ganglios pélvicos afectados reduce la supervivencia en un 32% (de una supervivencia media del 89% para los ganglios negativos a un 57% cuando son positivos). El impacto en la supervivencia depende prioritariamente del número, la localización y la posibilidad de resección de los ganglios afectados. En el estudio realizado por Uno et al., el estado de los ganglios pélvicos tuvo un impacto significativo en la supervivencia. La supervivencia global a los 5 años en pacientes con ganglios positivos y negativos fue de 52% y 89%, respectivamente ($P = 0.0005$). La supervivencia libre de enfermedad a los 5 años en pacientes con ganglios negativos, uno positivo y dos o más positivos fue de 83%, 61% y 31%, respectivamente ($P = 0.0001$) (Uno et al., 2005).

- Ganglios aórticos: la presencia de ganglios aórticos afectados es del 18% en casos de tumores localmente avanzados y ejerce un efecto en la supervivencia mayor que en el caso de ganglios pélvicos. Las metástasis paraórticas confieren un pronóstico desfavorable con supervivencias cercanas al 40% (Odunski et al., 2001).

3.6. Otros factores pronósticos

Grado de extensión tumoral: Se ha observado que el carcinoma de cérvix se extiende dentro del segmento uterino inferior y la cavidad endometrial en el 10-30% de los pacientes (Pérez et al., 1981). Se ha observado un descenso en la supervivencia y un aumento en la incidencia de metástasis, en aquellas pacientes con afectación endometrial por invasión del estroma endometrial o reemplazamiento del endometrio normal por carcinoma cervical (Pérez et al., 1998).

Grado de invasión estromal: Se ha establecido una relación entre la profundidad de la invasión estromal y la supervivencia. Así, la supervivencia es del 86-94% en aquellos tumores con menos de 10 mm de invasión estromal; 71-75% en el caso de 11-20 mm; y del 60% de supervivencia para los tumores con más de 20 mm de infiltración estromal (Delgado et al., 1989). Samlal y colaboradores confirmaban estos resultados en una serie de pacientes con estadios IB-IIA y ganglios negativos ($p < 0.01$) (Samlal et al., 1997). Sin embargo, cuando se analizaban las pacientes con ganglios positivos, la invasión estromal perdía significación en el análisis multivariante. En un estudio posterior, la invasión estromal fue el único factor pronóstico de relevancia (Van de Putte et al., 2004).

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

Marcadores tumorales: Los marcadores moleculares, en relación con otros de tipo clínico, podrían aportar información relevante a la hora de definir el tratamiento más adecuado; y podrían además proporcionar información importante relativa a la supervivencia, la recaída y el pronóstico en general. Algunos de esos marcadores tumorales son: MVP, Ku70/80, p53, pRb, BAX, BCL2, IGF-1R entre otros.

4. FACTORES PRONÓSTICOS BIOLÓGICOS

4.1. Proliferación celular en cáncer de cérvix uterino

El cáncer es una proliferación descontrolada de células con anomalías en su material genético (Lara et al., 2004). La proliferación celular está sometida, en primer término, a la presencia de factores externos como son los factores de crecimiento y las interacciones con otras células y nutrientes. Los factores de crecimiento son generalmente proteínas que actúan mediante uniones de alta afinidad a receptores, cuya función principal es la del control externo del ciclo celular, mediante el abandono de la quiescencia celular (G0) y la entrada en la fase G1 del ciclo celular, pudiendo realizar su función como inductores (IGF-1) o supresores (TGF β) de la proliferación celular, promoviendo la diferenciación celular, la movilidad y la adhesión celular entre otros fenómenos. Estos factores de crecimiento actúan sobre la célula a través de mecanismos endocrinos, paracrinos o autocrinos. Cuando el factor de crecimiento se une a su receptor, se inicia una cascada de procesos bioquímicos, denominados sistemas de transducción de señales, que permiten la llegada de esta señal proliferativa hasta el núcleo. Allí, por inducción de la expresión de diversos mediadores, incluidas las ciclinas (especialmente la ciclina D), se favorece la proliferación celular. Sin embargo, cuando la señal proliferativa llega al núcleo, la división celular queda regulada por los llamados puntos de control del ciclo celular o *check-points*, que impiden la progresión de células dañadas y mantienen la homeostasis celular (Ivanchuk et al., 2004).

El ciclo celular se divide en fases: La fase S y la fase M son fases que corresponden a la síntesis de ADN y mitosis. Ambas fases están separadas por la fase G1 (fase de crecimiento plástico de la célula) y G2 (fase de preparación para la división celular). Existe una gran variedad de proteínas que controlan y coordinan el ciclo celular. Las principales son las quinasas dependientes de ciclina (CDKs), que presentan en dos subunidades:

- subunidad catalítica con actividad quinasa, que permite fosforilar proteínas
- subunidad de unión al sustrato (Ciclinas)

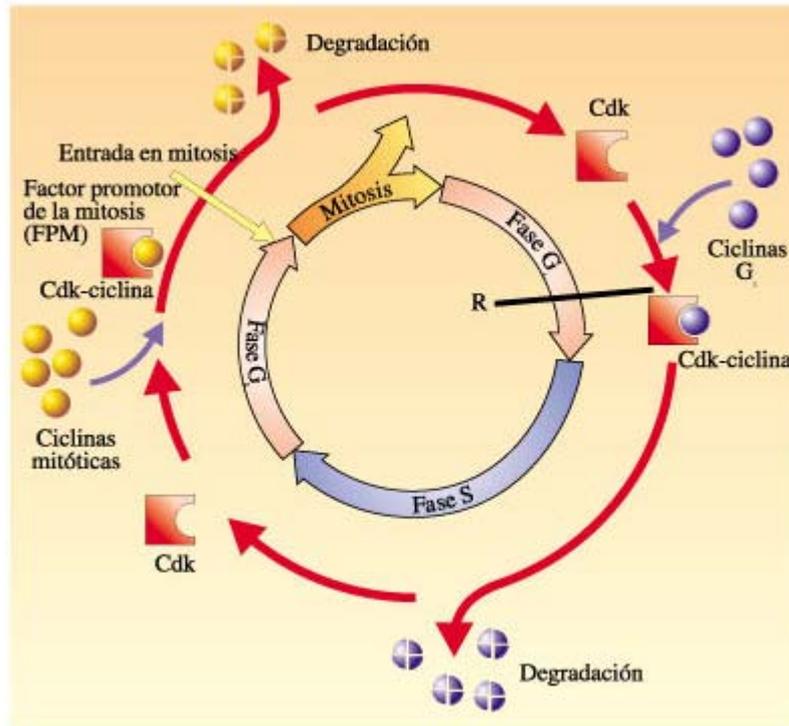


Figura 2. Ciclo celular y principales proteínas involucradas en el mismo.

(Disponible en: http://www.fisicanet.com.ar/biologia/informacion_genetica/ap1/ciclo_celular03.jpg)

Las ciclinas son necesarias en diferentes momentos del ciclo celular, fluctuando sus niveles en las distintas fases del mismo. La fosforilación/defosforilación de la proteína codificada por el gen retinoblastoma (pRb) constituye el evento central en la regulación de este punto de control (*restriction checkpoint*). Cuando pRb está hipofosforilada inhibe a E2F, evitando que ésta induzca la expresión de genes que regulan la síntesis de ADN. La fosforilación de pRb impide su unión a E2F, que queda libre para promover la síntesis de ADN. Este punto de restricción está regulado por las CDKs, que a su vez se encuentran reguladas por inhibidores (CDKIs) y otros moduladores (Ivanchuk et al., 2004; DeWolf y Gaston, 2004).

La síntesis de ciclina D es inducida por factores de crecimiento, y disminuida por inhibidores de la proliferación. La formación del complejo ciclina D-CDK4/6 provoca la fosforilación de pRb y posterior liberación de E2F. Además, el complejo ciclina D-CDK4/6 secuestra a los inhibidores de CDK2, lo que reduce el efecto inhibitorio de los inhibidores de ciclinas sobre la ciclina E-CDK2, incrementando la capacidad de fosforilación de CDK2 sobre pRb y favoreciendo la proliferación celular (Masamha y Benbrook, 2009).

4.2. Proliferación tumoral y radioterapia

La proliferación celular durante la radioterapia hace que aumente el tiempo de tratamiento global, fenómeno que se ha visto asociado a un peor control tumoral en carcinomas de cabeza y cuello (Withers et al., 1988; Wilson et al., 1995) y cérvix uterino (Fyles et al., 1992; Lanciano et al., 1993). La medida del índice de proliferación tumoral antes de comenzar el tratamiento radioterápico, define un parámetro que refleja la extensión de la repoblación tumoral durante el tratamiento (Fowler et al., 1992; Tsang et al., 1995). La determinación de este parámetro, se ha usado para identificar pacientes que podían ser tratados con radioterapia acelerada (Tucker et al., 1990). La repoblación del tumor durante el tratamiento radioterápico, reduce la tasa de control tumoral inducido por la irradiación, ya que hasta un tercio de la radiación administrada en cada fracción de radioterapia, se emplea en controlar la repoblación tumoral que surge desde la fracción administrada el día anterior. Por ello, en los tumores altamente proliferativos, este fenómeno será más relevante, obteniéndose peor control tras irradiación. La proliferación tumoral continúa incluso durante la irradiación (Durand, 1997).

Se han realizado diferentes estudios sobre el índice de proliferación pretratamiento mediante diferentes técnicas. Por citometría de flujo y marcaje con bromodeoxi-uridina (BrdUrd) es posible conocer el grado de ploidía, la fracción de crecimiento tumoral (fracción de fase S), y el tiempo potencial de duplicación celular (Tpot). Por inmunohistoquímica se detectan proteínas de proliferación endógenas como Ki-67 o el antígeno nuclear celular proliferante (PCNA). Mediante el uso de la tinción con hematoxilina-eosina se determina el Índice Mitótico (IM).

En los estudios de Tsang y Bolger se demostró que había una supervivencia y mayor recidiva local en aquellas pacientes con un Tpot corto (Tsang et al., 1995; Bolger et al., 1996). Sin embargo, en un estudio posterior en donde se midió la incorporación de bromodeoxiuridina y Tpot por citometría de flujo en 101 pacientes con cáncer de cérvix, se observó que ninguno de los parámetros de proliferación pretratamiento, tenía significación pronóstica asociada a la respuesta clínica (Tsang et al., 2003). Los estudios realizados mediante Tpot han resultado mayoritariamente ineficaces para predecir adecuadamente el curso clínico de los pacientes, ya que la proliferación celular está equilibrada por la pérdida celular y esta medida no tiene en consideración las pérdidas celulares del tumor. Por otro lado, la citometría de flujo (técnica usada para determinar el

Tpot) dificulta el análisis de los resultados al no poder separarse adecuadamente las células pertenecientes al tejido sano de las células que componen el tumor (particularmente en tumores diploides) (Begg et al., 1985; Tsang et al., 1999).

Los estudios de inmunohistoquímica permiten cuantificar la proliferación de las células tumorales. La determinación de la proliferación celular mediante la evaluación de la expresión de la proteína Ki-67 es una de las más exploradas. El antígeno Ki-67 es una proteína nuclear de 395 a 345 kD expresada en células en fase G1, S, G2 y M del ciclo celular, pero ausente en células en fase G0. Este hecho permite que, tras su determinación en el tumor, pueda ser estimada la fracción de crecimiento de éste. Los pacientes que presentan un alto porcentaje de células tumorales proliferantes tienen una peor respuesta a la radioterapia, particularmente si el tumor es lo suficientemente radioresistente como para que la proliferación se mantenga incluso durante el tratamiento (Durand et al., 2004). Sin embargo, estos resultados no han sido reproducidos por todos los autores. Así, en tumores de cabeza y cuello tratados exclusivamente con radioterapia, niveles elevados de proliferación estimados mediante Tpot (Corvo et al., 1994), Ki-67 (Homma et al., 1999; Couture et al., 2002) o PCNA (Gasparini et al., 1995), mostraron mejores tasas de respuesta inmediata a la radiación y mayor supervivencia. La relación entre proliferación tumoral (valorada mediante la expresión de ki-67), extensión tumoral (local, ganglionar) y supervivencia ha sido estudiada mediante Ki-67 en carcinoma de cérvix (Tabla 1).

Dos estudios han demostrado relación entre la expresión de Ki-67 y el grado de extensión local o ganglionar de la enfermedad (Garzetti et al., 1995; Lloret et al., 2001). En relación a la supervivencia, los resultados no son concluyentes ya que en cinco estudios los niveles elevados de Ki-67 se asociaron a peor supervivencia (Garzetti et al., 1995; Padovan et al., 2000; Ho et al., 2000; Liu et al., 2001), mientras que en otros tres trabajos la relación fue inversa (Nakano et al., 1998; Pillai et al., 1998; Suzuki et al., 2000). En la mayoría de los estudios no se pudo demostrar relación alguna entre Ki-67 y supervivencia (Camacho et al., 1997; Lloret et al., 2001; Davidson et al., 2000; Graflund et al., 2002; Van de Putte et al., 2004; Shiohara et al., 2005). En el estudio de Oka, Ki-67 a 9 Gy de dosis se relacionaba con la supervivencia libre de metástasis ($p = 0.045$), siendo un factor predictivo de buen pronóstico en pacientes con carcinoma de células escamosas (Oka et al., 2000). En el estudio de Padovan se observó una relación entre el estadio y la expresión de Ki-67 (Padovan et al., 2000). La mayoría de los pacientes en estadio IB eran negativos para Ki-67. Por otro lado, todos los casos con estadio IV eran positivos para Ki-67. En el estudio preliminar publicado por Camacho en 35 pacientes con

carcinoma de cérvix se observó una correlación entre el grado histológico y la expresión de Ki-67, sobre todo en pacientes con grado II vs. grado III (Camacho et al., 1997). El índice medio de expresión del marcador fue del 32.46% para los adenocarcinomas y significativamente más bajo para los carcinomas epidermoides (48.4%). Este resultado podría justificar la diferente conducta y respuesta a los tratamientos entre ambos tipos histológicos.

Tabla 1. Resumen de estudios que relacionan la proliferación tumoral con otra serie de variables clínicas

Estudio	Nº Pacientes	Grado Histológico	Extensión (Local/Gg)	Supervivencia
Wong (1991)	31	Si		
Cole (1992)	28	No	No	No
Garzetti (1995)	57	No	Si	Peor
Levine (1995)	66			No
Camacho (1997)	35	Si (1)	No	No
Nakano (1998)	64			Mejor
Pillai (1998)	152			Mejor
Oka (2000)	75			Mejor*
Padovan (2000)	86			Peor
Davidson (2000)	49			No
Ho (2000)	97			Peor
Suzuki (2000)	67			Mejor
Lloret (2001)	65	No	Si	No
Liu (2001)	124			Peor
Graflund (2002)	141		No	No
Kamer (2003)	23		No	
Van de putte (2004)	221			No
Ancuța (2009)	61	No	No	No

* 9Gy de dosis. (1) Grado 2 vs. 3.

En un estudio posterior realizado por nuestro grupo (Lloret et al., 2001), en una serie de 65 casos, los carcinomas epidermoides eran más proliferativos y mostraban menores tasas de apoptosis que los adenocarcinomas. En un otro trabajo de Oka et al, resultados similares fueron observados (Oka et al., 1996). Además, en este estudio, la proliferación tumoral estimada mediante Ki67 fue útil, junto con el estadio clínico, en la predicción de la respuesta a la irradiación y en el control local de las pacientes, demostrando ser un método fiable en la predicción de la respuesta y control local en tumores tratados con radioterapia. Otros autores no han observado correlación alguna

entre Ki-67 y recidiva ($p > 0,05$), Ki-67 y supervivencia libre de enfermedad ($P > 0,05$), y grado histológico e invasión ganglionar (Ancuta et al., 2009).

4.3. Proteínas reguladoras de la proliferación celular

Son muchos los genes y proteínas relacionadas con la regulación de la proliferación celular en los procesos neoplásicos. Centraremos el estudio en el análisis de dos modelos adecuados y poco estudiados en carcinoma de cérvix uterino. Por un lado el receptor para el factor de crecimiento dependiente de insulina (IGF-1) y por otro, el efector más importante de esa cadena de transducción de señales desde el receptor hasta el núcleo, las ciclinas (Ciclina D1).

4.3.1. Receptor para crecimiento dependiente de insulina (IGF1-R)

El receptor para el factor de crecimiento dependiente de insulina (IGF-1R) participa en el crecimiento celular y juega un papel importante en el proceso metastático, regulando la migración celular, la invasión y la angiogénesis. Es una proteína transmembranal con actividad tirosina-quinasa que se expresa en muchos tipos celulares. Su estructura consiste en dos cadenas extracelulares alfa y dos subunidades transmembranales beta, las cuales están unidas por puentes disulfuro para formar un receptor homodímero complejo. El dominio de unión al ligando está presente en la subunidad extracelular alfa. Las subunidades beta comprenden una región yuxtamembranal, un dominio intracelular tirosina-quinasa y un dominio carboxilo terminal con funciones de interacción proteica (Hubbard & Till, 2000).

La unión del ligando (IGF-1) al receptor (IGF-1R) es de alta afinidad, generando un cambio conformacional en el receptor, seguido por una autofosforilación de tres residuos tirosina dentro del dominio quinasa. Esto produce un aumento en la actividad catalítica, seguido por fosforilaciones adicionales de residuos tirosina en la región yuxtamembranal y residuos serina y tirosina localizados en el carboxilo terminal que conducen a la activación de distintas rutas de señalización. Una de estas rutas comprende la activación de segundos mensajeros tipo Ras, Raf y MAPK, principal ruta de transducción mitógena. También se activan otras rutas de señalización responsables de la transducción de señales antiapoptóticas que implican, por ejemplo, a PI3K (Lin, 1999). La activación de esta vía de señalización inhibe la apoptosis y estimula la proliferación celular (Navarro y Baserga, 2001). Además, el IGF-1R activado

regula la adhesión, organización del citoesqueleto y migración a través de la interacción con moléculas de adhesión e integrinas (Gray et al., 2003).

El IGF-1R se ha asociado con fenómenos de angiogénesis en varios tipos tumorales, ya que su activación aumenta la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). En pacientes con cáncer de mama metastático, se ha observado un elevado nivel de IGF-1 y VEGF en suero, comparado con controles y pacientes sin enfermedad metastásica (Coskun et al., 2003). La inhibición de IGF-1R en varias líneas tumorales produjo una disminución en la expresión de VEGF, de la angiogénesis y la metástasis (Reinmuth et al., 2002; Stoeltzing et al., 2003). Además, en relación con VEGF, IGF-1R parece ser crucial en el crecimiento independiente de anclaje, una propiedad única de las células tumorales. Esta independencia se adquiere cuando se produce un incremento de IGF-1R en la superficie celular (Baserga, 1999). De esta forma, la metástasis adquiere mayor independencia de anclaje y mayor dependencia de IGF-1R comparado con el tumor primario. Recientemente, algunos estudios han observado que la pérdida de oncogenes supresores así como la activación de proto-oncogenes, está relacionada con la función y la actividad de IGF-1R (Werner et al., 2000; Girnita et al., 2003; Zhao et al., 2004). Estos estudios demuestran la existencia de una ruta p53/MDM2/IGF-1R. El aumento de MDM2 en el núcleo celular inactiva a p53, lo que puede contribuir a un crecimiento avanzado de las células tumorales por sobreexpresión de IGF-1R. También se ha visto que IGF-1R juega un importante papel en la señalización intracelular, interaccionando con el receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Adams et al., 2004). En cultivos epiteliales humanos hay un efecto sinérgico de IGF-1 y EGF en la promoción de la síntesis de ADN, aunque en ausencia de IGF-1, EGF carece de efecto (Stull et al., 2002). Tanto IGF-1 como EGF inducen la expresión de ciclinas D (Mawson et al., 2005), pero únicamente IGF-1 activa a la ciclina E, la cual se requiere para atravesar el *checkpoint* G1-S. De este modo, IGF-1 no sólo estimula la progresión del ciclo celular en células epiteliales humanas, sino que es esencial para que la progresión mediada por EGF atraviese el *checkpoint* G1-S (Zhang et al., 2005).

Existe una relación entre determinados receptores para factores de crecimiento y la radioresistencia de la célula tumoral. La transducción de la señal radioinducida interacciona con las rutas de señalización de IGF-1R, que siguen a la activación de PI3K. Se ha identificado a IGF-1R como una proteína capaz de

inducir radioresistencia en cáncer de mama, ya que la inhibición de la función de IGF-1R incrementa la respuesta del tumor a la irradiación en cánceres de mama y colon (Wen et al., 2001). Cosaceanu estudió la expresión de IGF-1R en líneas de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). La inhibición de IGF-1R combinada con la irradiación, dio lugar a un incremento en la muerte celular radioinducida en 5 de 6 líneas de cáncer NSCLC, normalmente resistentes a la radiación ionizante (Cosaceanu et al., 2005). Entre los receptores tirosina-quinasa, IGF-1R es particularmente importante por su efecto anti-apoptótico frente a la radiación (Kulik et al., 1997). Se ha sugerido que el gen ataxia telangiectasia mutada (ATM) puede ser un posible mecanismo que explique la influencia de IGF-1R en el bloqueo de la radiosensibilidad. Distintos estudios han mostrado que la inhibición de IGF-1R incrementa la radiosensibilidad, y que esta inhibición está directamente conectada con la expresión y señalización de ATM (Macaulay et al., 2001; Peretz et al., 2001). No se conocen muy bien los mecanismos biológicos por los cuales este tratamiento combinado induce un efecto antitumoral. Existe la posibilidad de que otros mecanismos de IGF-1R induzcan radioresistencia, incluyendo la modificación de la modulación de la radiosensibilidad a través de la regulación de Ku86 mediada por P38 quinasa (Cosaceanu et al., 2006).

Desde el punto de vista pronóstico, son pocos los estudios realizados hasta el momento que incluyan series amplias de pacientes. En un estudio que analizó el valor pronóstico de IGF-1R en 126 pacientes con cáncer de mama y donde se consideró como positivos aquellos casos con un porcentaje de tinción mayor del 4%, el 39% de los pacientes eran IGF-1R positivos, siendo que la expresión del marcador se relacionaba significativamente con peor supervivencia, especialmente para pacientes con receptor estrogénico negativo. (Railo et al., 1994). En otro estudio más reciente, se analizó la expresión de IGF-1R en 210 pacientes con cáncer de mama, encontrando un porcentaje de esta proteína de un 43% de los casos, pero sin asociación con parámetros clínico patológicos (edad, grado histológico, presencia o ausencia de metástasis ganglionares linfáticas axilares) ni con la supervivencia libre de enfermedad (Shimizu et al., 2004). En una serie de 101 casos de pacientes con sarcoma de partes blandas, se ha observado una asociación entre una alta expresión de IGF-1R (presente en el 48% de los casos) con una mejor supervivencia y un bajo desarrollo de metástasis. No se observó relación con Ki67, p53 y sí con BCL-2 (Ahlén et al., 2005). En carcinoma colorrectal, los dos estudios publicados muestran tasas de expresión de IGF-1 cercanas al 100% (Peters et al., 2003; Nakamura et al., 2004),

sin relación con otros factores pronósticos; y en uno de ellos, la expresión de IGF-1R resultó ser un factor pronóstico desfavorable (Nakamura et al., 2004).

Existen pocos estudios sobre la expresión de IGF-1R en carcinoma cervical. Steller observó que la expresión del IGF-1R estaba aumentada de tres a cinco veces en el tumor que en células normales y que dicho incremento en la expresión era un componente importante que controlaba la proliferación en células de carcinoma cervical (Steller et al., 1996). Efectivamente, estudios recientes demuestran que IGF-1R parece tener un papel relevante en la estimulación de la invasión y la proliferación tumoral en células de cáncer de cérvix (Shen et al., 2006). En un estudio realizado en 32 pacientes con carcinoma de cérvix, se observó una alta expresión de IGF-1R en el 87,5% de los casos, pero ninguna relación entre la expresión de IGF-1R y la edad, estadio y grado histológico de la paciente. En esta misma serie, los tumores de endometrio y epiteliales de ovario expresaban IGF-1R en el 91,3% y 80% de los casos (Hirano et al., 2004). En un estudio realizado sobre 60 pacientes con carcinoma cervical seguidas durante siete años, se observó que altos niveles de expresión de IGF-1R se relacionaban significativamente con un menor control local de la enfermedad, debido probablemente a fenómenos de quimio-radio-resistencia tumoral (Lloret et al., 2007).

El bloqueo genético de IGF-1R en líneas celulares de cáncer de colon humano incrementa la eficacia a la quimioterapia por aumento de la tasa de apoptosis (Adachi et al., 2002). Además, usando anticuerpos antagonistas de IGF-1R se incrementa el porcentaje de respuesta del tratamiento combinado con 5-fluorouracilo (5-FU) y radioterapia externa en células de cáncer de colon (Perer et al., 2000). Actualmente hay en marcha nuevos estudios que pretenden incrementar la radiosensibilidad tumoral bloqueando los receptores de IGF-1R, pero también modificando otras dianas terapéuticas como HDAC, HSP90, PI3K y Ras (Chinnaiyan et al., 2006).

4.3.2. Ciclina D1

Como otras ciclinas, la ciclina D1 está implicada en el avance de la progresión del ciclo celular. Alcanza su pico de expresión durante la fase G1, al mismo tiempo que mantiene los niveles de CDK. El complejo ciclina D1-CDK4/6 fosforila pRb para liberar las células que están en fase G1 y favorecer la entrada en la fase S del ciclo celular. Este paso es impedido por los inhibidores de

quinasas dependientes de ciclinas (CDKI), como las proteínas p15, p16, p18 y p19, que interfieren de forma selectiva sobre el complejo ciclina D1-CDK4/6. La ruta CDKI/ciclinaD1/CDK4/pRb es uno de los puntos de control de la proliferación celular. Las alteraciones de esta ruta podrían acelerar la proliferación celular, aumentar la inestabilidad genómica y favorecer el desarrollo de células cancerígenas.

En general, el aumento en la expresión de ciclina D1 se asocia con un peor pronóstico en carcinoma de células escamosas de diferentes localizaciones: cáncer esofaríngeo, cabeza y cuello, pancreático, tiroides y pulmón (Michalides et al., 1997; Ishikawa et al., 1998; Caputi et al., 1999). Sin embargo, en carcinoma cervical, esta asociación no es tan clara debido a que la expresión de ciclina D1 se encuentra disminuida por la acción del virus HPV (Bae et al., 2001). En un estudio publicado por Skomedal, se observó un aumento en la expresión de ciclina D1 en el 3% de los pacientes (Skomedal et al., 1999). Por su parte, Cho observó en carcinoma de células escamosas invasivo, una expresión significativamente baja ($p = 0.004$), especialmente cuando se asociaba con el HPV (Cho et al., 1997). Sin embargo, en un estudio posterior, se observó un aumento en la expresión de ciclina D1 en el 33.3% de los tejidos de carcinoma cervical (Cheung et al., 2001). Se ha observado expresión de ciclina D1 en lesiones intraepiteliales de bajo grado infectadas por HPV de bajo riesgo, pero no en lesiones infectadas por HPV de alto riesgo (Southern et al., 1998). Según Cheung, la baja expresión de ciclina D1 puede deberse a que en el carcinoma cervical la proteína E7 de HPV puede inactivar a pRb. Por ello, las mutaciones y/o amplificaciones de los reguladores del gen Rb, tales como ciclina D1, son poco frecuentes en cáncer cervical (Cheung et al., 2001). En un estudio posterior se observó que en carcinoma de cérvix, la ciclina D3 puede compensar los bajos niveles de ciclina D1, mientras que en otros tipos de cáncer, ambas isoformas pueden contribuir al fenotipo neoplásico (Skomedal et al., 2003).

En pacientes con cáncer cervical en estadio temprano, la expresión de ciclina D1 no se correlaciona con los factores pronósticos de la enfermedad. Sin embargo, la expresión de ciclina D1 se correlacionaba con una baja supervivencia libre de enfermedad ($p = 0.017$), una baja supervivencia global ($p = 0.018$), y era un factor pronóstico para la recidiva de la enfermedad ($p = 0.0004$) (Bae et al., 2001). En otro estudio, 106 pacientes con carcinoma de células escamosas de cérvix uterino se correlacionaba con un peor pronóstico de la enfermedad

(Cheung et al., 2001). Bahnassy observó que la expresión de ciclina D1 se relacionaba con el tamaño tumoral y con el estadio, así como con la supervivencia global ($p = 0.011$). Concluyeron que el estadio (FIGO), ciclina D1, p53, Ki67 y p27 eran los principales factores pronóstico de la enfermedad (Bahnassy et al., 2007). En la misma línea, se ha observado también una correlación positiva entre la ciclina D1 y la proteína Ki-67, en 103 pacientes con carcinoma de células escamosas de cérvix uterino (Shiohara et al., 2005). No obstante, no se observó significación pronóstica en la expresión de ciclina D1 en 53 casos de adenocarcinomas de cérvix uterino (Suzuki et al., 2004).

Tabla 2. Relación de ciclina D1 con supervivencia en carcinoma epidermoide cervical

	Nº de pacientes	Tratamiento	Estadio	Ciclina D1/ Supervivencia
Skomedal (1999)	61		I-IV	No
Bae (2001)	28	CX	Ib-IIa	Si
Cheung (2001)	106	CX	I-IV	Si
Suzuki (2004)*	53	RT	I-IVa	No
Shiohara (2005)	103	CX,RT/QT	Ib+II/III+IV	No
Bahnassy (2006)	43	No	I-IV	No
Bahnassy (2007)	43	No	I-IV	Si

*Adenocarcinoma. CX: cirugía, RT: radioterapia, QT: quimioterapia

En un estudio con 43 pacientes con carcinoma cervical, el incremento de la ciclina D1 se asoció significativamente al tamaño tumoral ($p = 0.003$) y al estadio FIGO ($p = 0.008$), comportándose como un factor de mal pronóstico (Bahnassy et al., 2006). En un estudio posterior del mismo autor, se encontró asociación significativa entre el tamaño tumoral ($p = 0.033$), el estado de diferenciación celular ($p = 0.047$), la afección ganglionar ($p = 0.021$), el estadio FIGO ($p = 0.011$), la alta expresión de Ki-67 ($p = 0.034$), ciclina D1 ($p = 0.011$) y p53 ($p = 0.04$), y la reducción de p27KIP1 ($p = 0.023$); con una menor supervivencia global. En análisis multivariable, FIGO, Ki-67, ciclina D1, p53 y p27KIP1 fueron significativas (Bahnassy et al., 2007).

4.4. Proteínas reguladoras de la apoptosis en cáncer de cérvix uterino

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 y que constituían una nueva forma de muerte celular diferente

a la conocida hasta ese momento, la necrosis (Majno y Joris, 1995). En los años 70, Allison Crawford definió la “muerte celular programada en los tejidos normales durante la embriogénesis y el desarrollo”, concluyendo que este proceso era el mismo descrito por Flemming. Se le denominó apoptosis (del griego “cayendo”), para subrayar esa eliminación celular aislada (“como caen las hojas de los árboles”). Se postuló que el inicio inadecuado, o la inhibición, de la apoptosis podría influir en la génesis de enfermedades como el cáncer.

Durante la apoptosis se produce i) la condensación de la cromatina con rotura del ADN internucleosomal (aproximadamente cada 180 pares de bases), ii) la condensación citoplasmática y iii) el encogimiento celular (manteniéndose las organelas prácticamente intactas). El fenómeno se puede observar por microscopía óptica 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 ADN). La apoptosis se puede iniciar en cualquier fase del ciclo, dependiendo de la célula y del tipo de estímulo.

Durante la apoptosis, la célula sufre el daño principalmente a nivel del núcleo, sin producirse reacción inflamatoria y generalmente de forma aislada (Mikulski, 1994). Se caracteriza por ser un proceso biológico ordenado, que resulta necesario para evitar la sobreproducción celular, siendo de vital importancia durante la morfogénesis. Los términos apoptosis y muerte celular programada, son a menudo utilizados como sinónimos. Sin embargo, hay otros procesos de muerte celular como son la autofagia y la necrosis, en los que se han identificado a nivel molecular componentes que justifican la existencia de un programa de ejecución. A pesar de la idea de que la muerte celular programada genéticamente requiere de la síntesis proteica, todos estos procesos (apoptosis, autofagia, necrosis) parecen estar listos previamente para ser ejecutados, lo que sugiere que la definición de muerte celular programada englobaría todos los casos (Lockshin & Zakeri, 2001).

Durante la necrosis, la muerte va acompañada de un aumento del volumen celular, vacuolización del citoplasma, aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática y lisis nuclear, sin fragmentación específica de la cromatina. Esta forma de muerte celular, se produce en respuesta a daños importantes causados por isquemia e hipoxia severas o por exposición a dosis elevadas de compuestos genotóxicos, que afectan al metabolismo energético celular. La muerte celular por autofagia es un proceso menos estudiado, que se caracteriza por la destrucción de componentes celulares dentro

de la célula en vacuolas autofágicas. Las características morfológicas de la autofagia incluyen vacuolización, degradación del contenido citoplásmico y ligera condensación de la cromatina (Fink & Cookson, 2005).

4.4.1. Proteínas reguladoras

El proceso de apoptosis tiene una regulación compleja. En principio, cualquier célula tiene capacidad para entrar en apoptosis. La pérdida de integridad de las uniones intercelulares, las hormonas y factores de crecimiento, los impactos ambientales (agentes químicos, radiaciones ionizantes e isquemia) y el sistema inmune, son algunos de los desencadenantes extracelulares de la apoptosis. Estos agentes actúan a través de receptores de membrana, receptores intracelulares o de manera directa sobre el núcleo, dando lugar a la liberación o inhibición de reacciones intracelulares que conducen a la fragmentación del material genético y a la muerte celular (Raff, 1992).

Existen decenas de genes implicados en la apoptosis. Los genes cuya expresión promueven la supervivencia celular, disminuyendo la susceptibilidad a la apoptosis, se llaman oncogenes, destacando entre ellos Bcl-2. Aquellos que promueven la apoptosis se les denominan genes supresores, entre los que destaca p53 y el gen del retinoblastoma. La mutación y/o el cambio en la expresión 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. Anomalías o ausencia de Bcl-2 podrían dar como resultado un acortamiento de la supervivencia celular. Sin embargo, un incremento en su expresión produciría un alargamiento de la misma, mientras que mutaciones o ausencia de p53 producirían una ausencia de muerte celular por apoptosis. De manera didáctica, el daño nuclear inducido aumentará la expresión de p53. Su mensaje apoptótico será alentado por Bax y contrarrestado por Bcl-2. p53 centraliza la coordinación de otros procesos relacionados con el daño celular, como son la reparación de daños en las bases o roturas dobles de cadena, la progresión del ciclo celular y la muerte por apoptosis. A p53 se la conoce comúnmente como el “guardián del genoma”, porque mantiene la estabilidad genética celular (Levine et al., 1991). Su relación con el cáncer es bien conocida, tanto por su frecuencia de alteraciones

(más del 50% de los tumores muestran alteraciones en p53), como por la frecuencia de aparición de tumores en personas con mutaciones germinales de p53 (Síndrome Li-fraumeni). Además, en tumores sin mutaciones del gen, la función de p53 puede estar alterada debido a su secuestro citoplasmático por oncoproteínas virales (HPV-E6) (Morris, 2002).

P53 es una proteína de 393 aminoácidos cuyo gen codificador se encuentra en el cromosoma 17 y que puede ser dividida en varios dominios discretos (May & May, 1999):

- En el dominio N-terminal se encuentran:
 - Dominio transactivador (TA), en el cual las interacciones entre proteínas, facilitan o bloquean la capacidad de transactivación de p53.
 - Región poliprolina, que podría mediar las funciones apoptóticas de p53 y la supresión del crecimiento celular independiente de transcripción.
 - Nuclear Export Signal (NES), relacionada con el transporte de p53 desde el núcleo al citoplasma para su degradación mediada por MDM-2.
- El dominio central contiene:
 - La secuencia específica de unión al ADN, que permite la unión de p53 con los sitios promotores de genes diana como p21 (WAF1/Cip1).
 - Cuatro regiones conservadas que regulan las interacciones proteína-ADN.

En esta región ocurren más del 90% de las mutaciones identificadas en cánceres humanos. Algunas mutaciones limitan la actividad de transcripción de p53 y otras tienen la capacidad de transactivar genes específicos como c-Myc (proliferación celular), MDR-1 (resistencia a drogas), tolerancia al estrés celular, radioresistencia relacionada con mejoras en la capacidad de reparación del ADN o inhibición de la apoptosis (Sigal et al., 2000). Además, se producen uniones a otras proteínas de tipo i) inhibidoras de p53 (SV40 Large T antigen protein), ii) favorecedoras de la misma (P53BP1/2) o iii) proteínas de reparación (BRCA1, BLM y Rad51) que facilitan la reparación homóloga de las roturas dobles de cadena del ADN inducidas por acción de la radiación.

- El dominio C-terminal incluye:
 - Un dominio de oligomerización que permite la óptima configuración de p53 en forma de tetrámeros.

- Una región de señalización de localización nuclear (NLS) relacionada con la translocación de p53 desde el citoplasma al núcleo.
- Una región de unión con secuencias no específicas de ADN y roturas dobles de cadena inducidas por radiación ionizante, permitiendo el reconocimiento del ADN dañado y favoreciendo su papel en la reparación del daño mediado por XPD, XPB, BLM, Rad51, etc. (Cuddihy y Bristol, 2004).

En condiciones fisiológicas, p53 muestra bajos niveles de la proteína con una vida media corta (10-20 minutos). El recambio viene controlado por la proteólisis inducida por MDM-2. En caso de daño al ADN, p53 se acumula y se activa, desarrollándose un complejo sistema de regulación (Ashcroft & Voudsen, 1999).

La proteína Bcl-2 consta de 239 aminoácidos y su gen codificador está en el cromosoma 18. Contiene cuatro dominios estructuralmente conservados: BH1, BH2, y BH3 que son necesarios para interactuar con otros miembros de la familia Bcl-2, y dominio BH4 que media las funciones de control del ciclo celular. Existe un dominio transmembranal de gran importancia funcional, necesario para la localización subcelular de Bcl-2 (Belka & Budach, 2002).

En condiciones normales, la expresión de Bcl-2 disminuye cuando las células están maduras o cuando tienen que ser eliminadas, mientras que se expresa en células que deben sobrevivir (células hematopoyéticas precursoras y células del sistema nervioso). Bcl-2 tiene un importante papel en la embriogénesis, donde la mayoría de las células expresan altos niveles de esta proteína (Jacobson et al., 1997). En general, las células que expresan Bcl-2 bloquean la apoptosis y promueven la supervivencia celular, facilitando la adquisición de mutaciones y la transformación maligna (Vaux et al., 1988; Pezzella & Gatter, 1995). Bcl-2 inhibe la apoptosis (Hockenbery et al., 1991) bloqueando el citocromo C liberado por la mitocondria durante la ruta de apoptosis mitocondrial (Brustugun et al., 1998).

Bax (*Bcl-2 associated X protein*) es una proteína cuyo gen codificador está en el cromosoma 19. Aunque posee una alta homología con la proteína Bcl-2, carece del dominio BH4. Participa en la ruta de apoptosis mitocondrial induciendo la liberación del citocromo C. Bax se asocia con el complejo del poro de la mitocondria, que participa en la regulación del Ca²⁺ de la matriz, pH, potencial de

membrana mitocondrial, etc. La proteína Bax se une a un componente de este complejo induciendo la apertura del poro con la consiguiente rotura del potencial de membrana mitocondrial y la liberación de moléculas pro-apoptóticas como el citocromo C (Marzo et al., 1998; Narita et al., 1998; Susin et al., 1999). Bcl-2 interactúa con Bax a nivel de la mitocondria modulando la inactivación de Bax a través de la heterodimerización. Cuando la proteína Bcl-2 está en exceso forma homodímeros Bcl-2/Bcl-2 y heterodímeros Bcl-2/Bax, quedando 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; Petros et al., 2004).

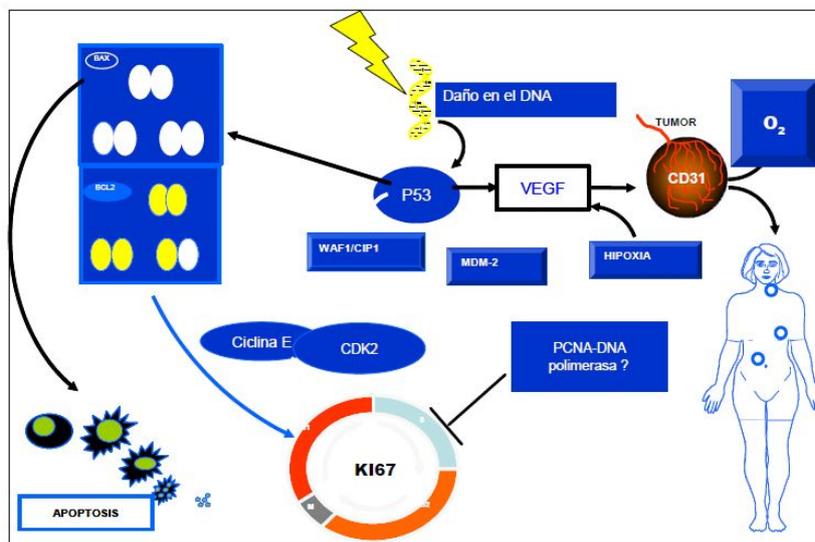


Figura 3. Principales factores que influyen el ciclo celular y la apoptosis. (Disponible en: www.biocancer.com)

Bax, Bcl2 y p53, son las principales proteínas involucradas en la apoptosis. No obstante, recientemente se ha descrito el papel que estas moléculas pueden tener en los procesos de reparación del ADN. Aparte de Bcl2, Ku70 es capaz de secuestrar a Bax desde la mitocondria, provocando una regulación negativa de la apoptosis. El mecanismo a través del cual se produce este fenómeno es el de ubiquitinación (Chang et al., 2008). Ku70 es una proteína fundamental en los procesos de reparación no homóloga del ADN, y se la considera además un relevante supresor de Bax (Sawada et al., 2003). Bcl2 por su parte, es capaz de inhibir los procesos de reparación homóloga reduciendo la actividad de la proteína Ku (Ku70/80). Bcl2 desorganiza de manera directa el complejo Ku/DNA-Pkcs, tanto in vivo como in vitro. Así, la supresión de la vía de reparación no homóloga al ADN por Bcl2 conduce a la acumulación de daño en el ADN, inestabilidad

genómica, y aumento de la probabilidad de desarrollo de procesos carcinogénicos (Wang et al., 2008).

4.5. Hipoxia en cáncer de cérvix uterino

El microambiente tumoral está constituido por el flujo sanguíneo, la microcirculación, el aporte de oxígeno y nutrientes, el pH residual y el estado bioenergético y metabólico del tumor. Este microambiente influye en las características biológicas de los tumores, condicionando la tasa de proliferación celular, la capacidad de reparación de la lesión sub-letal o potencialmente letal, la inducción de la apoptosis, el potencial de invasión metastásico y angiogénico, la expresión de genes responsables de la resistencia a drogas, etc. También influye en la respuesta de los tumores al tratamiento radioterápico y/o quimioterápico (Lavey y Dempsey, 1993; Kumar, 2000).

Entre un 50 y un 70% de los pacientes oncológicos, se someten a radioterapia en alguna fase de la enfermedad, con el objetivo de maximizar el control loco-regional del tumor y aumentar la supervivencia. Algunos estudios han demostrado que cerca de un 60% de los tumores de cérvix localmente avanzados, tienen áreas de tejido con hipoxia, las cuáles están heterogéneamente distribuidas dentro de la masa tumoral (Vaupel et al., 2001, Höckel et al., 2001). Aquellos pacientes con niveles elevados de hipoxia intratumoral, presentan un peor control de la enfermedad y una menor supervivencia que aquellos pacientes con tumores mejor oxigenados, en igualdad de estadio y tamaño tumoral (Lartigau, 2007). La hipoxia tumoral hace más resistentes a los tumores sólidos, frente a la radioterapia y quimioterapia, a través de mecanismos directos, indirectos o ambos:

- Mecanismo directo: la hipoxia puede inducir directamente resistencia a la radioterapia por privación del oxígeno molecular.

- Mecanismo indirecto: las moléculas de O_2 reaccionan rápidamente con los radicales libres producidos por la radiación, produciendo fenómenos de ionización y excitación de átomos y moléculas originando radicales altamente reactivos, tales como los radicales peróxido ($RO_2\cdot$), hidroxilo ($OH\cdot$) y superóxido ($O_2\cdot^-$), que causan la destrucción de las biomoléculas con la consecuente muerte celular generada por el efecto radiobiológico inicial (Wolff, 1981; Hellman y Rosenberg, 1999).

Por tanto, en presencia de oxígeno, el daño causado al ADN por la radiación se mantiene, mientras que en ausencia de oxígeno el efecto radiobiológico disminuye, debido a que decrece la formación de radicales altamente reactivos en las macromoléculas y estructuras celulares.

La hipoxia tumoral depende de distintos factores: tamaño tumoral, tipo histológico, estadio, aporte de hemoglobina y extensión de la necrosis. La hipoxia aparece cuando el tamaño del tumor supera la capacidad de la micro-circulación del mismo para aportar el oxígeno necesario a las células tumorales. Varios estudios muestran que el grado de hipoxia es mayor en la área tumoral que en los tejidos adyacentes normales (Clarke y Pallister, 2005; Varlotto y Stevenson, 2005). La relación entre hipoxia tumoral y evolución o gravedad del proceso neoplásico se puede explicar por 3 hipótesis:

- 1) La hipoxia puede inducir cambios en la expresión de las proteínas dependientes de oxígeno tumoral, resultando en estímulo de la angiogénesis y aumento del potencial de crecimiento del tumor y de la metastatización.
- 2) La hipoxia impediría la formación de moléculas reactivas de oxígeno que, cuando están sometidas a la radioterapia, causan daños en el ADN de las células tumorales. De esta manera, la reducción de los niveles de oxígeno contribuye a la resistencia frente a la radioterapia.
- 3) La hipoxia puede producir un crecimiento acelerado de las células tumorales resistentes a la apoptosis, dificultando el proceso de curación y control de la enfermedad (Clarke y Pallister, 2005). La hipoxia tumoral podría aumentar la expresión del gen supresor p53, un fenotipo celular que presenta un mayor potencial de malignidad (Littlewood, 2001). También se ha descrito que determinados factores relacionados con la perfusión, difusión o anemia, pueden producir hipoxia (Höckel et al., 2001; Vaupel et al., 2001 y 2002).

La hipoxia relacionada con la perfusión (aguda) se produce por una circulación sanguínea inadecuada en los tejidos. La microvascularización de los tumores posee anomalías estructurales y funcionales generando una red vascular desorganizada con dilataciones, formas tortuosas y alargadas, ausencia de regulación del flujo, etc. La hipoxia relacionada con la difusión (crónica) ocurre por el aumento de la distancia de difusión. Como resultado se produce un inadecuado suplemento de O₂ en las células distantes (>70µm) de los vasos sanguíneos nutricios. La hipoxia relacionada con la

anemia es consecuencia de un transporte de O₂ reducido debido a la anemia inducida por la terapia o asociada al tumor.

La presencia de hipoxia está asociada a un peor control local y a una menor supervivencia libre de enfermedad en pacientes con carcinoma cervical (Vaupel y Mayer, 2005). El grado de oxigenación, el estadio y la concentración inicial de hemoglobina son factores significativamente relevantes en la respuesta al tratamiento (Knocke et al., 1999) (Tabla 3). En un estudio con 87 pacientes con carcinoma cervical que recibieron radioterapia externa más braquiterapia, se observó que en 20 pacientes que presentaban los niveles de hemoglobina por encima de 13g/dl (hasta 19,8g/dl), la tasa de fallos locales en 3 años era del 6%; del 15% en 47 pacientes con hemoglobina entre 11 y 13g/dl; y de 67% en 20 pacientes con hemoglobinas inferiores a 11g/dl ($p = 0.0001$). Además, los pacientes con bajas presiones parciales de O₂ (pO₂) también tuvieron menores tasas de supervivencia global a 3 años, comparado con pacientes con mayores niveles de pO₂ (Dunst et al., 2003). En otro estudio, los niveles de hemoglobina se relacionaban tanto con el pronóstico y evolución del paciente como con el volumen tumoral. Pacientes con niveles de hemoglobina inferiores a 13gr/dl tuvieron un pronóstico desfavorable, tendiendo a agravarse cuando los valores estaban por debajo de los 12 gr/dl (Martin et al., 2003).

4.5.1. Detección de hipoxia tumoral

Está claramente fundamentado que los tumores hipóxicos son hasta 3 veces menos sensibles a la radioterapia que los bien oxigenados (Denekamp et al., 1989). Los pacientes con tumores peor oxigenados tendrían, por tanto, peor supervivencia y no sólo son más resistentes a la radioterapia, sino que además son más resistentes a otras formas de tratamiento, puesto que son tumores más agresivos y con más facilidad para metastatizar (Rofstad et al., 2000; Vaupel et al., 2001).

La agresividad biológica intrínseca de los tumores hipóxicos se explica, en parte, por el aumento del número de genes inducidos por hipoxia a través de la activación del factor de transcripción HIF-1. La proteína HIF-1 se estabiliza en condiciones hipóxicas y se une a otros elementos responsables de hipoxia en muchos genes (eritropoyetina, VEGF, y el transportador de glucosa GLUT-1), permitiendo la inducción de eritropoyesis, angiogénesis y glicólisis, respectivamente. La anhidrasa carbónica asociada al tumor (CAs) es un gen responsable de HIF. La proteína CA IX es intensamente inducida por la hipoxia en

un amplio rango de tipos celulares (Wykoff et al., 2000). La expresión de todos estos genes (HIF-1 α , GLUT-1, CA IX, VEGF) serían de utilidad como marcadores intrínsecos de hipoxia en cáncer cervical y fueron motivo de estudio de los trabajos de Airley et al., 2001, y Loncaster et al., 2001. Hutchison por su parte analizó la expresión del factor HIF-1 α y su relación con la respuesta a la radioterapia en 99 pacientes con carcinoma avanzado de cérvix. La expresión de HIF-1 α no era un factor pronóstico para la supervivencia libre de enfermedad, supervivencia libre de metástasis o supervivencia libre de recidiva local. Se asoció la alta expresión de HIF-1 α con una peor respuesta en tumores pequeños y con una mejor respuesta en los tumores de mayor tamaño ($p = 0.046$) (Hutchison et al., 2004). En otro trabajo, donde se analizó la expresión de HIF-1 α para valorar la hipoxia tumoral, no se encontró relación entre HIF-1 α , pO_2 e hipoxia; demostrando que el factor HIF-1 α no podía considerarse como un buen marcador de hipoxia en carcinoma de cérvix avanzado (Mayer et al., 2004).

Son muchos los métodos desarrollados durante los últimos años para medir la oxigenación tumoral aplicable en la clínica (Raleigh et al., 1996). Entre ellos se encuentran: análisis histomorfométricos, crioespectrometría, microelectrodos de oxígeno, marcadores de hipoxia, detección de roturas de cadena de ADN (Comet assay), y medición de marcadores endógenos (que funcionan como “sustitutos” de hipoxia, ya que son una medida indirecta de ésta; HIF-1 α , Glut-1, VEGF, CA IX, PAI-1). El valor pronóstico de la oxigenación tumoral medida por la presión parcial de oxígeno (pO_2) está considerado como el método estándar para la determinación de la hipoxia tumoral. Ha sido valorada su precisión en un gran número de estudios y en una variedad de tipos tumorales tratados con radioterapia exclusiva, radioterapia combinada con cirugía o únicamente con cirugía (Höckel et al., 2001, Loncaster et al., 2001; Fyles et al., 2002).

4.5.2. Estudios actuales

La medida de pO_2 como factor predictivo de respuesta clínica se encuentra actualmente validado. La variación de la pO_2 intrapaciente es menor que la variación interpaciente, lo que permite dar solidez a los estudios realizados usando esta técnica. Las medidas de pO_2 tumoral realizadas en dos localizaciones distintas de cada tumor y en tres tipos histológicos distintos: La pO_2 media tumoral

en tres tipos histológicos distintos tumorales (cervix, metástasis ganglionares y sarcoma) fue de 4.5 mmHg, 12.6 mmHg y 18 mmHg, respectivamente ($p < 0.07$) en un importante estudio publicado por Brizel. Es más, la heterogeneidad intrapaciente fue menor que la heterogeneidad interpaciente para todos los parámetros medidos (Brizel et al., 1995). Estos resultados se confirmaron con posterioridad por otros autores (Lyng et al., 1997; Wong et al., 1997).

Por otro lado, se ha visto que existe relación entre de la pO_2 intratumoral antes del tratamiento y factores pronósticos clásicos en carcinoma de cervix uterino (Tabla 3). Dos de estos estudios encontraron diferencias significativas en los valores de pO_2 pre-tratamiento entre las pacientes con o sin afectación ganglionar pero no con el resto de los parámetros. Sundfjør encontró significación pronóstica para la fracción de $pO_2 < 5$ mmHg ($p < 0.03$) (Sundfjør et al., 1998). En el estudio de Pitson se observó que el tamaño tumoral y la pO_2 fueron las únicas variables que podían predecir la respuesta de la enfermedad metastásica ($p = 0.009$ y 0.017 , respectivamente). Además, se observó un mayor riesgo en la metástasis ganglionar o a distancia en pacientes con tumores hipóxicos, con independencia del tamaño tumoral (Pitson et al., 2001).

Tabla 3. Relación entre pO_2 y factores pronósticos clásicos en carcinoma de cervix

	Nº de	Hb	Estadío	Tamaño	Grado	Ganglios
	pacientes			(T)		
Höckel (1993)	50	No	No	No		
Hänsgen (1997)	28		No		No	
Sundfjør (1998)	38	No	No	No	No	Si *
Cooper (1999)	19			No		
Pitson (2001)	128			No		Si*
Fyles (2002)	106			Si		Si*
Fyles (2006)	107			Si		Si*

* $pO_2 < 5$ mmHg

Algo parecido se observó en un estudio posterior, donde se vio que existía una correlación entre el estadio ganglionar y la oxigenación ($p = 0.006$), siendo $pO_2 < 5$ mmHg un factor predictivo independiente de la respuesta clínica en pacientes con ganglios negativos ($p = 0.007$) (Fyles et al., 2002). En un estudio prospectivo realizado en 107 pacientes con carcinoma de cervix, se observó que el tamaño tumoral ($p = 0.009$), la presencia de afectación ganglionar pélvica ($p = 0.0004$) y la presión del fluido intersticial (IFP) ($p = 0.0005$), eran factores

predictivos de la supervivencia libre de enfermedad. El análisis también mostró una interacción entre el estadio ganglionar y la oxigenación ($p = 0.03$) (Fyles et al., 2006).

4.6. Relación entre hipoxia y otros mecanismos celulares

Hipoxia y apoptosis (p53, Bax y Bcl2). En condiciones normales, p53 se mantiene a bajos niveles en el citoplasma celular debido a una rápida degradación mediada por MDM2 (que regula la actividad de p53 vía ubiquitina/proteosoma). p53 es estabilizada por medio de modificaciones post-trasduccionales (fosforilaciones y acetilaciones) en respuesta a estrés celular derivado del daño al ADN, la hipoxia, la depleción de ribonucleótidos o la activación de oncogenes entre otros. Así, p53 se convierte en una proteína funcional, capaz de unirse a los elementos de respuesta de otros genes, para regular su transcripción e iniciar los programas celulares de detención del ciclo celular, reparación del daño al ADN y/o apoptosis. Se ha observado una relación entre hipoxia y apoptosis. La hipoxia celular induce la expresión de p53 en cultivos celulares. Así, células con p53 normal responden a condiciones de hipoxia induciendo apoptosis, mientras que células con p53 anómalo no mueren por apoptosis y son capaces de crecer bajo estas condiciones (Graeber et al., 1996; Giaccia et al., 1998; Amellem et al., 1997; Zölzer y Streffer, 2002).

Kim publicó un interesante trabajo efectuado en linajes de células cervicales que expresaban HPV16, concluyendo que las células derivadas de carcinoma cervical fueron sustancialmente menos sensibles a la apoptosis inducida por hipoxia, lo que sugiere que la integración del ADN viral puede llevar a la inmortalización de la célula infectada por el virus (Kim et al., 1997).

También se han llevado a cabo diferentes estudios a este respecto a nivel clínico. Se ha observado una asociación entre p53 y la hipoxia tumoral en 70 pacientes con carcinoma de cérvix localmente avanzado. Los tumores hipóxicos tuvieron expresión significativamente mayor de p53 en relación a los carcinomas no hipóxicos ($p = 0.012$). Además, la detección de p53 e hipoxia tumoral no tuvo impacto pronóstico cuando se analizaron por separado. Sin embargo, se asociaban con un peor pronóstico de la enfermedad cuando se analizaron conjuntamente. Estos datos sugieren que la hipoxia tumoral podría inducir el crecimiento de células con una p53 anómala (Haensgen et al., 2001). También se ha visto una relación entre el índice apoptótico y los cambios en la oxigenación tumoral pos-radioterapia ($p = 0.002$) (Sheridan et al., 2000).

La hipoxia puede inducir apoptosis a través de un mecanismo en el que están implicados el aumento de la permeabilidad de la membrana de las mitocondrias, la subsecuente inhibición de la cadena transportadora de electrones y el citocromo C. Esto provoca la activación de Bax (y Bak) que produce la salida del citocromo C al citosol. De esta manera se ha observado que aquellas células deficientes en Bax son resistentes a la apoptosis dependiente de la hipoxia (McClintock et al., 2002). Por otro lado, se ha observado que las células pueden desarrollar mayor resistencia a la apoptosis bajo condiciones de hipoxia severa (Dong et al., 2003). La traslocación de Bax a la mitocondria se ve suprimida en estados de hipoxia, lo que lleva a una reducción de citocromo C en el citosol, inhibiendo la cascada de señalización que conduce a la muerte celular (Greijer et al., 2004).

Aunque es controvertida, existe una relación entre la proteína antiapoptótica Bcl2 y la sobre-expresión de HIF-1 en distintos tipos tumorales (Bos et al., 2001; Koukourakis et al., 1997). Los tumores que sobre-expresan HIF-1 tienen un comportamiento clínico más agresivo que puede ser explicado, al menos en parte, por una mayor resistencia a la apoptosis. HIF-1 puede iniciar la cascada de apoptosis dependiente de hipoxia mediante el aumento de la expresión de las proteínas que se unen a Bcl2 (BNIP3 y NIX), así por tanto a Bcl2 (Greijer et al., 2004).

Hipoxia y reparación del ADN (Ku70/80).

El complejo Ku, formado por los monómeros Ku70 y Ku80, tiene un papel muy importante en la reparación no homóloga del daño al ADN. Se ha observado que los niveles de expresión de Ku70 aparecen aumentados en el núcleo y periferia de regiones infartadas del cerebro de ratas recién nacidas sometidas a isquemia (Meng et al., 2009). Los niveles altos de Ku se mantenían en aquellas células que se encontraban en proliferación y por tanto, reparando el daño producido por el infarto isquémico. Las evidencias clínicas acerca de la relación existente entre la hipoxia y Ku son prácticamente nulas. No obstante, en nuestro grupo hemos publicado reciente un trabajo que relaciona ambas variables. Así, observamos que la hipoxia bloquea los mecanismos de reparación no homóloga del ADN a través de la disminución de la expresión de Ku70/80 (Lara et al., 2008). No obstante, la relación existente entre la reparación no homóloga y la hipoxia es controvertida. Aún así, existen diferentes trabajos que establecen una relación entre ambas variables (Meng et al., 2005; Sprong et al., 2006). La combinación de este fenómeno con otros, como el incremento de la angiogénesis o la alteración en p53, podrían ser responsables de la progresión tumoral del carcinoma de cervix.

Hipoxia y angiogénesis (VEGF). La relación entre hipoxia y angiogénesis está perfectamente documentada en la bibliografía. La ausencia de oxígeno promueve el aumento de HIF-1 α que a su vez provoca el aumento de VEGF (Park et al., 2007). Este factor de crecimiento sería el responsable del aumento de la angiogénesis para contrarrestar la hipoxia. A nivel clínico, se ha observado que el incremento de la angiogénesis en condiciones de hipoxia, unido a otros fenómenos como la disminución de la expresión de Ku70/80, podrían ser responsables de la progresión tumoral en pacientes con cancer cervical (Haensgen et al., 2001; Lara et al., 2008). HIF regula la expresión de más de sesenta proteínas relacionadas con diversos aspectos de la biología del cáncer, incluyendo supervivencia, invasión y angiogénesis (Quintero et al., 2004; Cao et al., 2004).

Hipoxia y proliferación celular. Los tumores con valores de pO₂ por debajo de la mediana (19.7 mmHg) parecen tener una mayor fracción de células en fase S ($p < 0.002$) sin modificación de la expresión de ki67 (Hänsngen et al., 1997). Varia extrajo la misma conclusión al observar un gran número de células en fase "S" en tumores cervicales en condiciones de hipoxia (Varia et al., 1998). Por otro lado, en el estudio de Tsang, con 43 pacientes con carcinoma de cérvix en distintos estadios, no se encontró ninguna correlación entre los valores de pO₂ y la proliferación, lo cual sugería que son factores predictivos independientes en este tipo tumoral (Tsang et al., 2000). Se ha observado que el estado de oxigenación pre-tratamiento puede predecir la supervivencia global, la supervivencia libre de enfermedad, y/o el control local en pacientes con cáncer cervical (Höckel et al., 1993; Fyles et al., 1998; Knocke et al., 1999; Sundfør et al., 2000; Fyles et al., 2002; Hill et al., 2003).

Los hallazgos referidos al estado de oxigenación tumoral y el progreso de la enfermedad tumoral son numerosos. Así, un estudio sobre la relevancia clínica de pO₂ en pacientes sometidos a cirugía o radioterapia en cáncer de cérvix uterino avanzado mostró que, tras 19 meses de seguimiento, el nivel de pO₂ ≤ 10 mmHg permitía discriminar pacientes con cáncer cervical hipóxicos de los no hipóxicos. Aquellos pacientes con pO₂ > 10 mmHg tuvieron tasas de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global significativamente mayores que los pacientes con valores de pO₂ menores. El nivel de oxigenación tumoral, expresado como pO₂ media, era el factor pronóstico independiente más fuerte para la supervivencia global ($p = 0.006$ y $p = 0.004$ respectivamente) y supervivencia libre de enfermedad ($p = 0.011$ y $p = 0.008$ respectivamente) (Höckel et al., 1993). El mismo autor, estudiando 103 pacientes con carcinoma avanzado de cérvix, encontró peores datos de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global en

pacientes con hipoxia tumoral, así como peor respuesta al tratamiento en pacientes con tumores hipóxicos (Höckel, 1996). Posteriormente, el mismo grupo observó que los tumores cervicales hipóxicos y con bajos índices de apoptosis mostraban gran capacidad de extensión linfática y de recurrencia con independencia del tratamiento; demostrando, por lo tanto, el comportamiento agresivo de esos tumores (Höckel et al., 1999). Por su parte, Fyles confirmó la relación entre hipoxia, recaída y supervivencia en pacientes con cáncer cervical (Fyles et al., 1998).

Knocke et al, comparando pacientes con tumores en distinto grado de oxigenación ($pO_2 \pm 10\text{mmHg}$), encontraron que la supervivencia libre de enfermedad era distinta entre ambos grupos de enfermos (34 vs. 69%, respectivamente ($p < 0.02$)). Además, el nivel de oxigenación, estadio y concentración inicial de hemoglobina se mostraron significantes en relación a la respuesta al tratamiento. También encontraron que la presencia de hipoxia está asociada con un peor control local así como menor respuesta a la radioterapia en pacientes con carcinoma cervical (Knocke et al., 1999). Los resultados relativos a la relación existente entre la hipoxia y el control de la enfermedad han sido reproducidos por otros autores. Presiones parciales de oxígeno $< 5\text{mmHg}$, en 40 pacientes con cáncer de cérvix uterino, se correlacionaban significativamente con esta variable. Aquellos pacientes que presentaban estos bajos niveles de oxigenación antes de iniciar el tratamiento tuvieron una mayor probabilidad de control después de 50 meses de seguimiento que pacientes con mayor $pO_2 < 5\text{mmHg}$ ($p < 0.001$). La oxigenación pre-tratamiento era el factor predictivo más importante para el control de la enfermedad, más importante que la oxigenación después de 2 semanas de radioterapia o los cambios en la oxigenación durante este tiempo. También encontraron relación significativa con la supervivencia libre de enfermedad ($p = 0.004$) y la supervivencia global ($p < 0.0001$) (Lyng et al., 2000). En análisis multivariante, Rofstad y colaboradores encontraron que los valores de pO_2 por debajo del 5 mmHg eran el único factor predictivo significativo para el control loco-regional, la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global. El fracaso del tratamiento fue principalmente resultado de la hipoxia inducida por la radiación (Rofstad et al., 2000). Estudiando 40 pacientes, Sundfjør y colaboradores encontraron que la peor respuesta al tratamiento se asociaba con la baja tensión de oxígeno en tumor primario en los pacientes con carcinoma cervical avanzado. También identificaron los valores de pO_2 por debajo de 5 mmHg como un importante factor pronóstico para el control loco-regional, la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global (Sundfjør et al., 2000). La supervivencia libre de progresión tumoral, tras 3 años de seguimiento para los pacientes con tumores con niveles de oxigenación

por debajo de 5 mmHg fue de un 37%, en comparación con el 67% observado en aquellos pacientes con tumores mejor oxigenados ($p = 0.004$) (Fyles et al., 2002).

Hill midió los niveles de hipoxia tumoral antes y durante el tratamiento, y los relacionó con las medidas de Tpot y LI (*Labelling Index*) en pacientes con cáncer de cérvix uterino tratados con radioterapia radical. Observó una relación entre la medida de pO_2 antes del tratamiento y la respuesta al mismo, aunque la re-oxigenación no mostró ninguna relación (Hill et al., 2003). Por otro lado, Nordmark et al, en un estudio prospectivo, analizaron el valor pronóstico del oxígeno antes del tratamiento y no encontraron relación alguna entre la hipoxia y el control loco-regional o la supervivencia global. Solo el tamaño del tumor (por arriba de 5 cm) y bajos niveles de hemoglobina pre-tratamiento mostraron relación con una peor supervivencia global (Nordmark et al., 2006).

Tabla 4. pO_2 antes del tratamiento en relación con respuesta, recidiva y supervivencia libre de enfermedad en carcinoma de cérvix

	Nº de pacientes	Estadio	Tratamiento	Respuesta	Recidiva	Supervivencia libre de enfermedad
Höckel (1996)	103	Ib-IVb/IIa-IVa	Cx y/o RT con/sin QT	Si		Si (AM)
Fyles (1998)	74	IIa/Ib-IIIb	RT		Si	Si (AU)
Knocke (1999)	51	IIa, IIIa/Ib-IVb	RT	Si		Si
Lyng (2000)	40	IIa-IVa/Ib-IIIb	RT		Si	Si (AU)
Rofstad (2000)	32	IIa-IVa/Ib-IIIb	RT	Si		Si (AM)
Sundfør (2000)	40	IIa-IVa/Ib-IIIb	RT	Si		Si (AM)
Fyles (2002)	106	IIa/Ib-IIIb	RT	Si		Si(AM)*
Hill (2003)	28	Ib-IIIb	RT	Si		Si (AM)*
Nordmark (2006)	127	Ib-IV	RT, Cx, QT			No (AU, AM)

RT: radioterapia. Cx: cirugía. QT: quimioterapia. AM: análisis multivariante. AU: análisis univariante. *Solo en pacientes con ganglios negativos.

4.7. Angiogénesis en cáncer de cérvix uterino

Las bases moleculares de la carcinogénesis y la metástasis han sido objeto de extensos estudios. La metástasis es la causa más importante en el fallo de los tratamientos oncológicos y, por consiguiente, de la muerte del paciente (Bibbo & Longatto, 2001). A través de un proceso lento y extremadamente complejo, las células neoplásicas adquieren la capacidad para escapar del tumor, entrar en el torrente sanguíneo y asentarse en otra zona del organismo. Este fenómeno necesita de la acumulación de distintas alteraciones genéticas y celulares, que llevarán a una pérdida del control del crecimiento celular, desregulación de la motilidad, proteólisis, modificación de la respuesta inmune y la angiogénesis. Las células tumorales interactúan con la matriz celular a través de distintas glicoproteínas específicas, que actúan como receptores de superficie. Las células permanecen ancladas a su matriz celular a través de proteínas como las caderinas. Distintas enzimas glicolíticas y las proteasas, como las metaloproteinasas, las serinas proteasas, el uPA (*urokinase plasminogen activator*) y sus inhibidores (PAI-1,2,3) y las catepsinas, tienen un papel fundamental en la degradación de la membrana basal, en la migración celular y en la angiogénesis durante el fenómeno metastásico. Finalmente, para que la metástasis se complete, las células tumorales necesitan desprenderse de su tejido original, invadir el tejido adyacente y entrar en el sistema circulatorio (linfático o sanguíneo); sobrevivir a la respuesta del sistema inmunitario, llegar a otro órgano, extravasar el intersticio y después de inducir la angiogénesis, multiplicarse para formar una colonia metastásica (Meyer & Hart, 1998).

La entrada de las células tumorales dentro de los vasos sanguíneos, da lugar al inicio de la diseminación de las células cancerígenas desde el tumor primario a otros órganos. Esta primera fase no depende solo de las propiedades invasivas intrínsecas de la célula tumoral sino también de la presencia de una red vascular que forme parte del estroma. El crecimiento estimulado de nuevos vasos sanguíneos puede originarse de dos formas diferentes:

- 1.- El aumento del número de vasos sanguíneos aumenta el área de contacto entre las células tumorales y las rutas de escape potencial, de este modo se aumenta la probabilidad de extravasación.
- 2.- Los vasos sanguíneos tumorales desarrollan una morfología distinta al sistema vascular fisiológico facilitando la entrada de las células. Estos vasos son más largos, tortuosos y presentan huecos debido al *fraccionamiento* de la membrana basal y a un revestimiento incompleto de los pericitos.

La propagación hematogena de las células cancerígenas puede ocurrir como resultado de la metástasis linfática, no solo sanguínea. Debido a que el sistema linfático drena al sistema venoso, y a que los ganglios linfáticos generan vasos sanguíneos aferentes y eferentes, las células tumorales circulantes por la linfa pueden entrar en la circulación sistémica sanguínea (Carmeliet et al., 2000).

La angiogénesis está regulada por factores pro y anti-angiogénicos secretados por el tumor (Folkman et al., 2003). Está principalmente inducida por rutas de señalización transformante y por la hipoxia tumoral, lo que provoca el aumento en la expresión de factores angiogénicos tales como VEGF y PLGF. Además, varios tipos de células del estroma tumoral parecen contribuir en la angiogénesis:

- Las **células endoteliales** secretan factores angiogénicos que afectan al estado de activación del endotelio y su diferenciación dentro de los vasos maduros.
- Los **macrófagos y células mastoides** secretan factores angiogénicos (VEGF, FGF-2, TGF- β y IL-8, y MMPs) que activan formas latentes de estos factores de crecimiento.
- Los **fibroblastos** asociados al cáncer secretan factores de crecimiento adicionales.
- Las **citoquinas y quimioquinas** modulan la matriz extracelular y las células del sistema inmune o de la homeostasis tisular (Bergers et al., 2003; Joyce et al., 2005).

4.7.1. Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)

VEGF es considerado uno de los factores más importantes en la angiogenesis tumoral, y es el único mitógeno que actúa sobre las células endoteliales de los vasos sanguíneos. Se une a dos receptores tirosina kinasa: VEGFR-1 y VEGFR-2, siendo este último el principal mediador de los efectos mitogénicos, angiogénicos y de incremento de la permeabilidad de VEGF. VEGFR-1 tiene capacidad para secuestrar a VEGF y prevenir su interacción con VEGFR-2 (Ferrara et al., 2004). Hay datos que sugieren que VEGFR-1 desempeña un rol relevante en la hematopoyesis y en el reclutamiento de monocitos y otras células que pueden residir en los vasos tumorales y promover la angiogénesis (Hattori et al., 2002; Gerber et al., 2002). VEGFR-1 está relacionado con la inducción de metaloproteinasas de la matriz (MMPs) y con la liberación

paracrina de factores de crecimiento desde células endoteliales (Le couter et al., 2003).

La expresión génica de VEGF se ve aumentada por la hipoxia, a través de HIF-1 (Safran et al., 2003); así como por otras citoquinas como β FGF (*fibroblast growth factor beta*), factor de crecimiento tumoral (TGF α) y factor de crecimiento epidérmico (EGF). La mutación de p53 disminuye la transcripción de VEGF (Bouvet et al., 1998), lo que provoca una inhibición de la angiogénesis. Altos niveles de VEGF están relacionados con una peor respuesta en varios tipos tumorales incluyendo ovario (Paley et al., 1997; Yamamoto et al., 1997), mama (Linderholm et al., 1998), y pulmón (Fontanini et al., 1999). Sin embargo, el estudio de su expresión en relación a factores pronósticos clásicos en el carcinoma cervical no ha mostrado correlación en la mayoría de las series publicadas (Tabla 5).

Tabla 5. Relación entre angiogénesis y factores pronósticos clásicos

		Nº de pacientes	Tipo Histológico	Tamaño (T)	Estadio	Invasión Vascular	Ganglios
Tokumo	(1998)	73	Si	No	No		
Santin	(1999)	8	Si				
Kodama	(1999)	66	No	No	Si	No	No
Loncaster	(2000)	100	No		No		
Tjalma	(2000)	152	Si		No		
Cheng	(2000)	135		Si		Si	Si
Lee	(2002)	117	No				Si
Mitsuhashi	(2005)	78	Si	Si	Si		No
Goncharuk	(2009)	75	Si		Si		Si

En pacientes con estadio IB y IIA de cáncer cervical, la cantidad de proteína VEGF aumentaba de forma significativa con el aumento del tamaño tumoral ($p = 0.013$), la invasión linfovascular ($p = 0.003$) y la metástasis ganglionares pélvica ($p = 0.003$) (Cheng et al., 2000). En pacientes con cáncer cervical estadio IB se observó que la metástasis ganglionar pélvica era significativamente más prevalente en pacientes con alta intensidad de VEGF que en aquellos con baja intensidad (Lee et al., 2002).

Los datos referidos a la relación entre VEGF y el tipo histológico no son del todo claros. Se ha observado que la expresión de VEGF aparece aumentada en

los adenocarcinomas en comparación con los carcinomas epidermoides (Tokumo et al., 1998), aunque estos resultados son contradictorios (Tjalma et al., 2000, Mitsuhashi et al., 2005). Se ha observado que los niveles de VEGF son mayores en los pacientes que en los controles sanos ($p = 0.0002$). Además, en carcinomas epidermoides, las concentraciones de VEGF aumentaron significativamente (pacientes frente a controles $p < 0.0001$), al contrario que en los adenocarcinomas (pacientes frente a controles $p = 0.298$). Los niveles de VEGF estaban directamente relacionados con el tamaño del tumor y con el estadio, pero no con la metástasis ganglionar (Mitsuhashi et al., 2005). Por su parte, los estudios de Loncaster y Lee no encontraron diferencias significativas entre la expresión de VEGF y el tipo histológico (Loncaster et al., 2000; Lee et al., 2002). En un reciente estudio, Goncharuk y colaboradores demostraron que la expresión de VEGF se correlaciona con el estadio (FIGO) de la enfermedad (RR = 0,52, $p < 0.05$) y con el tipo histológico (la expresión de VEGF fue detectado en el 55,3% de los carcinomas de células escamosas y en el 68,4% de los adenocarcinomas). También se observó correlación entre la sobreexpresión de VEGF y el estado de los ganglios linfáticos de la pelvis (RR = 0,39, $p < 0.05$). No se estableció asociación alguna entre la expresión de VEGF y metástasis a distancia ($p > 0.05$) (Goncharuk et al., 2009).

Los niveles de VEGF aumentan progresivamente desde el epitelio normal a carcinoma de células escamosas invasivo ($p < 0.0001$), y se correlaciona con la proliferación (PCNA) en carcinoma in situ ($p < 0.01$) y carcinoma microinvasivo ($p < 0.05$) (Fujiwaki et al., 2000). Dai y colaboradores analizaron la expresión de VEGF en relación a diferentes tipos patológicos del cérvix, observándose una mayor expresión de la proteína en carcinoma de cérvix en comparación con el tejido normal, el tejido inflamatorio y la neoplasia intraepitelial CIN ($p < 0.001$) (Dai et al., 2005).

En cuanto a la relación de VEGF con la supervivencia en carcinoma de cérvix, la mayoría de los estudios encuentran una relación significativa (Tabla 6). Estadios tempranos de carcinoma de cérvix presentan una expresión aumentada de VEGF, conformando un factor pronóstico independiente de supervivencia libre de enfermedad ($p < 0.001$) y de supervivencia global ($p = 0.045$) (Cheng et al., 2000; Loncaster et al., 2000; Lee et al., 2002; Gaffney et al., 2003), aunque hay resultados contradictorios (Tjalma et al., 2000). Kang y Hong mostraron en su estudio que la tasa de supervivencia a cinco años era de un 89% para el grupo

VEGF negativo frente a un 47% para el grupo VEGF positivo ($p = 0,02$) (Kang y Hong, 2004). En un estudio reciente donde se analizaron 150 pacientes con carcinoma de células escamosas y 152 CIN, se observó que VEGF-C mostraba un incremento lineal de su expresión, siendo menor para los CIN de bajo grado, aumentando en los CIN grado III y alcanzando los niveles mayores en cáncer. No obstante, VEGF-C no tuvo valor pronóstico para la supervivencia (Branca et al., 2006).

Tabla 6. Relación entre VEGF y supervivencia en carcinoma de cérvix

	Nº de pacientes	Estadio	Supervivencia libre de enfermedad	Supervivencia global
Hawighorst (1998)	57	IA-IVB		No (AU)
Cheng (2000)	135	IB-IIA	Si (AM)	Si (AM)
Loncaster (2000)	100	IB-IIIB	Si (AU)	Si (AU)
Tjalma (2000)	152	IA-IVB		No (AU)
Lee (2002)	117	IB	Si (AM)	Si (AM)
Gaffney (2003)	55	IB-IVA	Si (AM)	Si (AM)
Ryu (2003)	47	I-IV		No (AU) *
Kang & Hong (2004)	42	IB-IV		Si (AU)
Gombos (2005)	111	IA-IB-IIA		Si (AU)
Branca M (2006)	302	I-IV		No (AU /AM)

AM: análisis multivariante. AU: análisis univariante. * Adenocarcinoma.

4.7.2. Medida de densidad de microvasos (MVD)

La medición de microvasos intratumorales, constituye uno de los métodos utilizados para estimar la angiogénesis tumoral. Estos microvasos pueden identificarse utilizando técnicas de inmunohistoquímica que tiñen las células endoteliales. Mediante inmunohistoquímica (IHQ) es posible estimar la

vascularización intratumoral i) cuantificando microvasos, ii) determinando la distancia intercapilar y iii) la densidad de microvasos (MVD). Los anticuerpos más usados para ellos son los de tipo panendotelial, entre los que se encuentran el anti-CD31, el anti-factor VIII y el anti-CD34. El CD-31 identifica vasos largos y pequeños en el tejido normal y tumoral. El antígeno CD34 marca células endoteliales neoplásicas, aunque puede marcar, además, tumores vasculares, capa de músculo de la aorta, fibroblastos, estroma cervical, células linfáticas del endotelio y adipocitos, pudiendo interferir por tanto en el conteo de microvasos. El anticuerpo antifactor VIII detecta capilares pudiendo teñir además vasos linfáticos (Vieira et al., 2004).

La angiogénesis valorada mediante MVD ha sido asociada con el pronóstico. Los tumores con una alta densidad de microvasos, tienen un peor pronóstico frente a los que tienen una menor densidad (Abulafia et al., 2000; Lenczewski et al., 2002). Los estudios de angiogénesis en los que se utiliza MVD en relación con factores pronósticos clásicos en el carcinoma cervical, no han mostrado correlación en la mayoría de las series publicadas (Tabla 7). En tres estudios se ha encontrado relación entre MVD y la presencia de afectación ganglionar (Bremer et al., 1996; Lenczewski et al., 2002; Cantu et al., 2003). Hockel y colaboradores analizaron el potencial angiogénico de las células neoplásicas y su posible relación con la malignidad del tumor y la vascularización primaria del tejido huésped en pacientes con cáncer cervical.

Tabla 7. Relación entre MVD y factores pronósticos clásicos

	Nº de pacientes	Método	Tipo Histológico	Tamaño (T)	Estadio	Invasión Vascular	Ganglios
Wiggins (1995)	29	Antifactor-VIII			No	Si	No
Bremer (1996)	144	Antifactor-VIII					Si
Avall-Lundqvist (1997)	113	Antifactor-VIII	No	Si (1)	Si (2)	No	No
Kaku (1998)	53(3)	Antifactor-VIII			No	No	No
Zaghloul (2000)	40	Antifactor-VIII	No		No		
Höckel (2001)	52	Antifactor-VIII		Si			
Lenczewski (2002)	73	CD34				Si	Si
Cantu (2003)	118	CD34					Si
En-Lin S (2010)	159	CD34				Si	Si

(1) Estadios IB-IIA ($p < 0.05$), (2) sólo entre estadios IB-IIA ($p < 0.01$), (3) adenocarcinomas.

La densidad vascular del tumor periférico se relacionaba con la densidad vascular del estroma cervical normal y no dependía del tamaño tumoral, mientras que la densidad vascular del tumor era independiente de la densidad vascular del estroma cervical normal y disminuía con el aumento del tamaño tumoral (Höckel et al., 2001). Además, se vio que MVD era un factor pronóstico significativo para la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad (Fox et al., 2001). En el estudio de En-Lin y colaboradores, los niveles de expresión de MVD y VEGF se correlacionaron positivamente con la expresión de EFEMP1 (*Epidermal growth factor-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1*), una proteína que participa en el proceso angiogénico que además parece estar relacionada con metástasis a ganglios linfáticos, invasión vascular y con una pobre supervivencia global (En-Lin S et al., 2010).

La mayoría de los estudios publicados coinciden en considerar la neovascularización como un factor pronóstico independiente de la supervivencia en carcinoma cervical (Tabla 8). Así, cuanto mayor es la vascularización, menor es la supervivencia (Bremer et al., 1996; Dellas et al., 1997; Tjalma et al., 1998; Obermair et al., 1998), aunque hay trabajos publicados en los que no se estableció dicha relación (Avall-Lundqvist et al., 1997; Hawighorst et al., 1998).

En el estudio de Cantu et al. se analizó la expresión de MVD en 118 pacientes con carcinoma epidermoide cervical en estadio II-III tratados con radioterapia. La supervivencia libre de enfermedad era menor para el estadio IIA con MVD>20 y para el estadio IIB ($p = 0.0193$, $p < 0.05$, respectivamente), pero no para los pacientes con estadio IIIB ($p = 0.1613$). Además, se observaba una menor supervivencia global en pacientes con MVD>20 ($p = 0.0316$). Aquellos pacientes con estadio IIA-B y MVD>20 presentaban una supervivencia global menor ($p = 0.0008$, $p < 0.05$, respectivamente). No ocurría lo mismo para el estadio IIIB ($p = 0.14$). Los pacientes menores de 40 años y MVD>20 tenían peor supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad ($p = 0.0029$) (Cantu et al., 2003). En adenocarcinomas precoces de cérvix uterino, los pacientes con altos niveles de MVD tenían una peor supervivencia libre de enfermedad ($p = 0.018$) y supervivencia global ($p = 0.019$) que pacientes con un bajo MVD (Kaku et al., 1998). Estudios posteriores han confirmado estos resultados (Lee et al., 2004). Zaghloul y colaboradores analizaron 40 pacientes con carcinoma de cérvix escamoso tratados con radioterapia y observaron que la supervivencia libre de

enfermedad a los 3 años era del 18% para aquellos pacientes que tenían una medida de MVD por encima de la media, mientras que fue de 86% para aquellos pacientes con MVD por debajo de la media. Además, observaron una fuerte correlación entre el estadio IA y el nivel de MVD. Así, aquellos pacientes en estadio IA y baja expresión de MVD tenían una supervivencia libre de enfermedad a los 3 años del 100% (Zaghloul et al., 2000).

Tabla 8. Relación entre MVD y la supervivencia

		Nº de pacientes	Método	Supervivencia causa-específica	Supervivencia global
Schlenger	(1995)	42	Antifactor-VIII	Si (AU/M)	Si (AU/M)
Rutgers	(1995)	70	Antifactor-VIII	No (AU)	No (AU)
Bremen	(1996)	144	Antifactor-VIII	Si (AM)	
Avall-Lundqvist	(1997)	113	Antifactor-VIII	No (AU)	No (AU)
Dellas	(1997)	138	Anti-CD31		Si (AM)
Obermair	(1998)	166	Antifactor-VIII		Si (AM)
Tjalma	(1998)	134	Anti-CD31		Si (AM)
Davison	(1998)	75	Anti-CD31	Si (AU)	
Hawighorst	(1998)	33	Antifactor-VIII		No (AU)
Kaku	(1998)	56	Antifactor-VIII	Si (AU)	Si (AU)
Cooper	(1999)	74	Antifactor-VIII		Si (AM)
Tjalma	(2000)	152	Anti-CD31		Si (AU)
Zaghloul	(2000)	40	Antifactor-VIII	Si (AU)	
Cantu	(2003)	118	CD34	Si (AB)	Si (AB)
Lee	(2004)	39	CD34		Si (AM)

AM: análisis multivariante. AU: análisis univariante.

Varios estudios han mostrado una correlación entre la MVD y la expresión de VEGF (Tokumo et al., 1998; Fujimoto et al., 1998), aunque hay autores que no han encontrado esa relación (West et al., 2001). Se ha visto que una elevada expresión de VEGF se asociaba a bajos niveles de MVD en pacientes con cáncer cervical invasivo (Tjalma et al., 2000). Además, hay estudios en donde se observa una relación significativa entre MVD, el estadio IA, la proliferación y la hipoxia tumoral.

4.8. Invasión y metástasis

El fenotipo tumoral invasivo se caracteriza por la expresión de varias clases de moléculas entre las que se incluye receptores de adhesión celular (caderinas e integrinas), metaloproteinasas de la matriz (MMPs) y otras proteinasas (factores de crecimiento y sus receptores) (Cairns et al., 2003). Estas moléculas pueden modificar la composición de la matriz extracelular circundante y pueden modular la expresión génica en células vecinas no neoplásicas (Duffy et al., 1996). Durante la progresión y metástasis, se producen una serie de procesos entre las células del tumor y su estroma, principalmente mediados por el contacto directo célula-célula, citoquinas y factores de crecimiento. Tal señalización puede activar el microambiente tumoral desarrollando cambios morfológicos que dan lugar a la invasión y metástasis (Mueller et al., 2004).

4.8.1. Proteínas de adhesión celular

Las células epiteliales presentan una gran variedad de interconexiones moleculares. Una de estas conexiones, específica de la membrana celular, se denomina *unión adherente*. Las moléculas responsables de dicha adherencia son las caderinas (Bibbo & Longatto, 2001).

En mamíferos se identifican tres tipos de caderinas: E-caderina (epitelial), N-caderina (nervioso y muscular) y P-caderina (placentaria). Las mutaciones en el gen de la E-caderina se relacionan con neoplasias de células aisladas, como los carcinomas difusos de estómago y el carcinoma lobulillar de mama (Machado, 1999). La fracción extracelular de E-caderina forma interuniones con las moléculas de E-caderina de las células vecinas, mientras que su porción intracitoplasmática se une al citoesqueleto a través de las cateninas. De éstas, la β -catenina es la responsable de la unión con la actina del citoesqueleto (Barth et al., 1997). La β -catenina es la mediadora entre el sistema de adherencia celular y otras proteínas relevantes en cáncer tipo c-erbB2 (Bibbo & Longatto, 2001). C-erbB2 es responsable de la fosforilación de la β -catenina, alterando su conexión a la E-caderina, disminuyendo la adherencia celular y favoreciendo la invasión. La pérdida de función (o de expresión) de las caderinas determina la pérdida de adhesión de células y su desprendimiento del tumor, facilitando, de esa manera, el escape de esas células hacia los tejidos circundantes. El gen de la E-caderina es un *supresor de tumores* que aparece mutado en un 40-60% de los carcinomas lobulillares de mama (Bibbo & Longatto, 2001). En muchos cánceres de origen

epitelial, la adhesión célula-célula mediada por la E-caderina se pierde con la progresión tumoral, correlacionándose con tumores de alto grado, así como con una peor supervivencia del paciente (Hirohashi et al., 1998).

La pérdida de interacción de E-caderina con el citoesqueleto produce cambios en la actividad de la familia de las GTPasas RhoA, más concretamente Rac1, Cdc42 y RhoA, así como la reorganización de la actina del citoesqueleto. Cdc42 y RhoA ejercen actividades pro-migratorias. Rac induce lamelipodios que permite el tropismo celular, Cdc42 une la actina dentro del filopodio y Rho ensambla la actina dentro de fibras tensas (Kopfstein y Chirstofori et al., 2006). En este proceso y en otras fases de la cascada metastásica, intervienen factores derivados del huésped, factores derivados del sistema del complemento, péptidos del colágeno, trombospondina y factores dependientes de las células tumorales (Hart et al., 1996).

4.8.2. Rotura de la membrana basal

La rotura de la membrana basal es un proceso activo que requiere de la síntesis de enzimas proteolíticas. La lisis se produce en una zona localizada y cercana a la superficie tumoral. El grupo de proteinasas envueltas en el remodelado de la matriz extracelular comprende cuatro familias de proteínas; serina, cisteína, aspártico y metaloproteinasas.

1. **Serinproteasas:** son activadores del plasminógeno a plasmina. Actúan favoreciendo la degradación de las glucoproteínas de la matriz.
2. **Metaloproteínas:** la más estudiada es la colagenasa, secretada por los fibroblastos, que degrada el colágeno intersticial y el de la membrana basal.
3. **Cisteinproteasas:** entre ellas se encuentra la catepsina, que posee actividad endopeptidasa. Los niveles de catepsina secretados en carcinoma de mama están relacionados con su potencial metastásico (Bibbo & Longatto, 2001).
4. **Aspártico:** Varias integrinas (familia de moléculas que participan de la adhesión celular) se unen al ligando a través del ácido aspártico que forma parte de una secuencia arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) o de otros péptidos que contienen dicha secuencia. Cambios en la conformación o secuencia del RGD modifican o inhiben las propiedades de adhesión celular (Yamada et al., 1991).

El sistema del plasminógeno, está relacionado con la fibrinólisis y la degradación de la matriz extracelular por activación de las metaloproteinasas de la matriz. Las células endoteliales quiescentes expresan constitutivamente t-PA (activador de plasminógeno tisular). Los fenómenos de proteólisis se previenen por la expresión concomitante de PAI-1 (inhibidor del activador del plasminógeno). Cuando las células endoteliales migran, se sobreexpresa uPA, uPAR y PAI-1. Dependiendo de la situación, PAI-1 se expresa tanto por las células endoteliales como por las no endoteliales (estromal o epitelial), donde juega un papel en la preservación de la integridad de la matriz (Bibbo & Longatto, 2001).

Las células tumorales penetran en los vasos sanguíneos y linfáticos en forma de agregados homo o heterotópicos. A través de estos vasos van a circular interactuando con otras células sanguíneas. El 80% de las células llegarán a los tejidos periféricos y sólo el 0.01% conseguirán formar colonias metastásicas. (De vita et al., 2000).

4.8.3. Adhesión de la célula tumoral a la matriz extracelular

La extravasación de las células tumorales es un prerrequisito durante la metástasis hematógica. Las células tumorales se adhieren a la membrana endotelial provocando la retracción del endotelio. Tras la extravasación, las células invasoras se adhieren inmediatamente a la membrana basal, donde son cubiertas por las células endoteliales, quedando, por lo tanto, aisladas de la circulación. A las 8-24 horas degradan la membrana y la atraviesan, invadiendo el tejido al que llegan (Leber y Efferth et al; 2009). En este proceso están implicadas distintas glicoproteínas presentes en la matriz extracelular, como las integrinas, que se unen a distintas proteínas del estroma como la fibronectina, fibrina, vitronectina, colágeno tipo I y trombospondina. De forma general, las células neoplásicas producen menos integrina que las células normales, lo que facilitará su motilidad dentro de los vasos y, por consiguiente, el aumento de la capacidad de invasión. Sin embargo, algunos estudios apuntan que las células neoplásicas elaboran nuevas integrinas que, paradójicamente, ayudarían en la motilidad y facilitarían la interacción de las células tumorales con las proteínas de la matriz (Nicolson, 1998). Cuando la célula tumoral llega a un órgano secundario, el factor tisular, a través de la activación de trombina, dispara la formación de fibrina. En sinergia con otras proteínas de adhesión tales como la vitronectina, la laminina y la fibronectina, la fibrina forma una matriz provisional que sostiene la angiogénesis

y el crecimiento del tumor. Estos componentes de la matriz controlan la proliferación celular, la migración, la supervivencia y la apoptosis a través de interacciones con moléculas de adhesión expresadas en la superficie celular, que producen la proliferación de las células tumorales, formando colonias. Este fenómeno es favorecido por factores de crecimiento y estimulantes de la angiogénesis. La metástasis puede permanecer subclínica durante años dependiendo del equilibrio entre la proliferación, la apoptosis y la actividad angiogénica (De Vita et al., 2001). Para que la metástasis pueda tener lugar, se deben superar las defensas inmunológicas del huésped. Los mediadores básicos del sistema de defensa son los linfocitos T y B. Las células T citotóxicas CD8+ junto con las *natural killers* (NKs) son los efectores de la eliminación de la célula tumoral. Las células *T helper* CD4+ juegan un papel importante en la inducción de la inmunotolerancia, la cual no sólo permite el crecimiento del tumor sino también propicia la metástasis (Curiel et al., 2004).

4.8.4. Inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1)

El potencial invasivo de las células tumorales deriva de su capacidad para inducir la formación de nuevos vasos y su capacidad de degradar la membrana basal y los componentes de la matriz extracelular. El sistema activador del plasminógeno está implicado en los procesos de remodelación del tejido y juega un papel importante en la invasión tumoral y la metástasis. Las principales proteínas integrantes de este sistema son: el activador del plasminógeno tipo urokinasa (uPA), los inhibidores del activador del plasminógeno tipo 1 y tipo 2 (PAI-1 y PAI-2) y el receptor específico (uPAR).

PAI-1 tiene numerosas y complejas funciones. Principalmente controla la actividad proteolítica e influyen en la migración celular y la promoción o inhibición de la célula tumoral indiferenciada a través de la interacción con vitronectina. En varios cultivos celulares y modelos animales se ha encontrado que PAI-1 tiene un efecto pro-angiogénico, controla la migración celular y protege la matriz extracelular de una degradación excesiva (Rakic et al., 2003). El efecto de PAI-1 es dosis dependiente, siendo pro-angiogénico a concentraciones fisiológicas y antiangiogénico a niveles altos de expresión, aunque los resultados son contradictorios (Devy et al., 2002; Bajou et al., 2004). El efecto pro-angiogénico y pro-migratorio de PAI-1 concuerda con los datos clínicos que indican que una alta expresión tumoral de PAI-1 se correlaciona con un peor pronóstico en una

variedad de tumores (Andreasen et al., 2000; Foekens et al., 2000; Rakic et al., 2003; Allgayer et al., 1998; Stephens et al., 1998; Look et al., 2002). En un estudio en donde se analizaron 2780 pacientes con cáncer de mama, PAI-1 fue un factor predictivo de peor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global en pacientes con ganglios negativos y positivos (Foekens et al., 2000). Estos datos concuerdan con los publicados por Hansen, donde se observó que el nivel de PAI-1 era un marcador pronóstico de la supervivencia libre de enfermedad en pacientes con cáncer de mama primario (Hansen et al., 2003). En el estudio de Pappot et al., pacientes de cáncer de pulmón con alta expresión de PAI-1 y baja expresión del complejo uPA-PAI-1, mostraban peor supervivencia (riesgo relativo = 3.06, $p= 0.01$) (Pappot et al., 2006). En cáncer de cabeza y cuello, altos niveles de PAI-1 estaban asociados con una menor supervivencia libre de enfermedad ($p < 0.01$). El único factor relacionado con la supervivencia global fue la invasión perineural ($p = 0.045$). La combinación de altos niveles de PAI-1 y la invasión perineural eran predictivos de un menor intervalo libre de enfermedad ($p = 0.01$) (Speleman et al., 2007).

Tabla 9. Relación entre PAI-1 y supervivencia en distintos tipos tumorales

	Nº de pacientes	Tipo de tumor	Supervivencia libre de enfermedad	Supervivencia Global
Kobayaski (1994)	62	Cérvix	Si (AM)	Si (AM)
Allgayer (1998)	203	Gástrico	Si (AM)	Si (AM)
Stephens (1998)	131	Ovario	Si (AM)	Si (AM)
Foekens (2000)	2780	Mama	Si (AM)	Si (AM)
Look (2002)	8377	Mama	Si (AM)	Si (AM)
Hansen (2003)	228	Mama	Si (AU)	Si (AU)
Hazelbag (2004)	108	Cérvix	Si (AM)	Si (AM)
Hundsorfer (2005)	153	Cavidad Oral	Si (AM)	
Pappot (2006)	99	Pulmón		Si (AU)
Speleman (2007)	46	Cabeza y Cuello	Si (AU)	
Di Bernardo (2009)	698	Pulmón		Si (A.M)
Colin (2009)	52	Glioblastoma		Si(A.U)

AM: análisis multivariante. AU: análisis univariante.

Hay muy pocos estudios acerca del valor pronóstico de PAI-1 en cáncer cervical. En pacientes con lesiones epiteliales escamosas y carcinoma invasivo de cérvix, el aumento del nivel de PAI-1 en estadios II-IV de carcinoma invasivo demostraba el papel de estos componentes en la invasión y metástasis tumoral

(Daneri et al., 1998). Riethdorf y colaboradores observaron que PAI-1 aumentaba significativamente en carcinoma de células escamosas invasivo de cérvix, en comparación con las lesiones intraepiteliales escamosas (Riethdorf et al., 1999). Un número muy limitado de estudios relacionan la expresión de PAI-1 con una peor supervivencia en carcinoma de cérvix. Kobayashi y colaboradores analizaron la expresión de PAI-1 en un grupo de 62 pacientes en estadio II de cáncer cervical y observaron que el porcentaje de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global era peor en pacientes con altos niveles de PAI-1 que en aquellos que no expresaban la proteína (Kobayashi et al., 1994). Estudios más recientes en carcinoma escamoso, observaron que el marcaje de PAI-1 en células de carcinoma cervical se asociaba con peor supervivencia global ($p = 0.04$) y supervivencia libre de enfermedad ($p = 0.02$). En un subgrupo de pacientes con metástasis nodo linfática negativa, PAI-1 era un factor predictivo de peor supervivencia global ($p = 0.04$) y supervivencia libre de enfermedad ($p = 0.03$). Además, el marcaje de PAI-1 estaba relacionado de forma significativa con el estadio ($p = 0.04$), siendo mayor el porcentaje de PAI-1 en el grupo perteneciente al estadio IB2 (grupo que, además, tenía el peor porcentaje de supervivencia). También se encontró que un alto marcaje de PAI-1 estaba relacionado con la presencia de metástasis a distancia ($p = 0.01$) y recidiva de la enfermedad ($p = 0.01$) (Hazelbag et al., 2004). En un trabajo reciente en pacientes con glioblastoma, Colin y colaboradores encontraron que la sobreexpresión de PAI-1 influía significativamente sobre la supervivencia global ($p = 0.012$) (Colin et al., 2009). Más aún, PAI-1 se mostró fuertemente asociada con la supervivencia global en 698 pacientes con cáncer pulmonar (Di Bernardo et al., 2009).

- Proliferación y apoptosis

Altos niveles de expresión de PAI-1 favorecen una respuesta proliferativa de células. Esto se ha observado tras la lesión exógena de vasos sanguíneos (Peng et al., 2002). Las células de la capa muscular de los vasos sanguíneos que sobreexpresan PAI-1 son resistentes a la apoptosis y presentan mayores tasas de proliferación (Schneider et al., 2004). PAI-1 tiene capacidad para inhibir a caspasa-3 (Zoellner et al., 1998), lo que llevaría a una inhibición de FLIP (*FLICE-like inhibitory protein*). FLIP, a través de vías de señalización dependientes de Fas, provocan la inducción de la proliferación de linfocitos (Lens et al., 2002). Además, se han establecido conexiones con NF-kappaB y Erk (Kataoka et al., 2002).

Hay evidencias que sostienen que PAI-1 podría estar relacionado con la regulación de la apoptosis en células sanas y tumorales. Más concretamente, parece que esta proteína es un factor que favorece la supervivencia de las células tumorales (Kwaan et al., 2000), lo que ayuda a entender por qué los tumores que sobre-expresan PAI-1 tienen un peor pronóstico. Se ha observado que esta acción está relacionada con cambios en los niveles de expresión de proteínas anti- y pro-apoptóticas de la familia Bcl-2 (Soeda et al., 2001). Aquellas líneas celulares de fibrosarcoma deficientes en PAI-1 crecen de manera más moderada que las no deficientes (Rømer et al., 2005). No obstante, las vías de señalización intracelular que median la acción anti-apoptótica de PAI-1 son desconocidas. Se sabe que PI3K/Akt está involucrado (Rømer et al., 2008). Es más, el silenciamiento de PAI-1 reduce el nivel de activación de Akt y hace a las células más sensibles a la apoptosis (Romer et al., 2008). No obstante, otros estudios han encontrado una relación inversa entre PAI-1 y Akt (Balsara et al., 2006; Kortlever et al., 2006). El tipo celular y la malignidad de la célula puede condicionar la acción final de PAI-1 sobre Akt.

- Hipoxia y angiogénesis

Los niveles de expresión de PAI-1 pueden verse intensamente aumentados bajo condiciones de hipoxia (Gertler et al., 1993), aunque los mecanismos postulados para explicar este fenómeno son varios. Se han identificado en la proteína distintos elementos de respuesta a hipoxia que sirven como lugar de unión para HIF-1 (Kietzmann et al., 1999; Zhang et al., 2004). A través del factor de transcripción SP1, existe un vínculo con otras vías de señalización mediadas por Smad3 y TGF β , relacionadas con la modulación de la maquinaria transcripcional de la célula (Datta et al., 2000). La inhibición del sistema Erk MAP kinasa suprime la inducción de la expresión de PAI, sin modificar los niveles de HIF, cosa que no ocurre si lo que se inhibe es el sistema PI3 kinasa que afecta a ambos factores de transcripción (Zhang et al., 2004). Se ha observado en línea celular de hepatocito humano (HepG2), que IGF-1 es capaz de aumentar la expresión de PAI-1 a través de un mecanismo que incluye el aumento de los elementos de respuesta a hipoxia y de los niveles de HIF (Dimova et al., 2005). La inhibición de PI3 kinasa y de Erk1/2 kinasa, así como la inducción del dominante negativo Raf-1, eran capaces de suprimir el efecto inductor iniciado por IGF-1 (Dimova et al., 2005). Por el contrario, el factor estimulante USF-2A parece competir con HIF-1 por los elementos de respuesta a hipoxia de PAI-1, disminuyendo su expresión (Samoylenko et al., 2001). Por último, el factor de transcripción Net, parece ser

capaz de inhibir la expresión de PAI-1 en condiciones de hipoxia, aunque el mecanismo de acción aún es desconocido y se desconoce realmente el papel que esta molécula tiene (Fink et al., 2002; Gross et al., 2007). En cualquier caso, todos estos estudios moleculares se han llevado a cabo en distintas líneas celulares, y poco se sabe del efecto *in vivo* global.

Los niveles de PAI-1 aparecen alterados en distintas patologías asociadas con la remodelación vascular. Existen diversos estudios que han sugerido que PAI-1 tiene un efecto estimulante sobre la angiogénesis (Isogai et al., 2001). En líneas celulares deficientes de PAI, la angiogénesis queda totalmente abolida, y puede ser restablecida mediante a adición exógena de PAI (Devy et al., 2002). La acción angiogénica de PAI parece ser dual y dosis-dependiente, de tal manera que a concentraciones fisiológicas parece tener un efecto pro-angiogénico, mientras que a altas concentraciones el efecto es anti-angiogénico (Devy et al., 2002).

4.9. Reparación del daño al ADN tras la radiación

Las alteraciones en la secuencia del ADN pueden producirse por causas intrínsecas (errores en la replicación) o por cambios químicos espontáneos generados en las bases nitrogenadas. Los cambios más importantes se producen por errores ocasionados por i) agentes ambientales (químicos, radiación), ii) agentes biológicos (virus) y iii) otros agentes generados dentro de la célula durante el metabolismo (p.e.: especies reactivas del oxígeno). La reparación del daño es determinante para la supervivencia de la célula. Los defectos en la reparación del ADN pueden generar importantes alteraciones genéticas asociadas con múltiples enfermedades entre las que se encuentra el cáncer.

Los tipos de daño que sufre el ADN son: formación de dímeros, formación de aductos, daño oxidativo de una base, entrecruzamientos intra e inter-catenarios, entrecruzamientos DNA-proteína, roturas simples y doble de la cadena de ADN. En una población celular normal el número de células debe mantenerse estable de manera que las pérdidas celulares por agresiones sean compensadas por la producción de nuevas células, a este comportamiento se le denomina cinética celular. Solo en los embriones y en los tumores existe un aumento real de células. La "Teoría del blanco" define la respuesta celular a la irradiación, y asume tres postulados: i) en las células de los organismos vivos existe una zona sensible denominada blanco celular (ADN), ii) la

ionización del blanco lleva a la inactivación de la célula irradiada y iii) la interacción entre radiación y blanco celular es de tipo probabilística. Las células eucariotas tienen una gran capacidad para reparar el daño que la radiación produce sobre el ADN, por ello cada impacto sobre la célula no lleva a la muerte de la misma (hacen falta varios impactos). Por ello, las lesiones que la radiación produzca sobre una célula pueden ser de varios tipos:

Lesiones subletales: La lesión producida, no conlleva la muerte celular, sino que esas lesiones pueden ser reparadas por mecanismos enzimáticos.

Lesiones letales: No pueden ser reparados. Son lesiones irreversibles que conllevan la muerte celular.

Lesiones potencialmente letales: La lesión es grave y de muy difícil reparación. La reparación de los daños va a depender de los requerimientos de dicha célula (si se encuentra en reposo en mitad del ciclo celular, fundamentalmente).

Así, dosis bajas de radiación sólo producen unas cuantas lesiones letales y producen muchas lesiones subletales que son fácilmente reparadas. A medida que aumentamos la dosis de radiación administrada, se produce un mayor número de lesiones letales, debido a la mayor acumulación de lesiones subletales, lo que conlleva igualmente a la muerte celular.

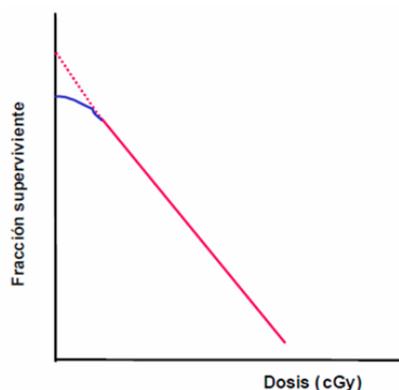


Figura 4. Curva de supervivencia a la radiación de una población de células eucariotas.

Existen distintos mecanismos de reparación del daño. Cada proceso de reparación posee un componente de reconocimiento del daño que es específico para cada tipo de lesión (Friedberg et al., 2003). Las bases dañadas pueden ser reparadas por excisión de un nucleótido (NER), por excisión de una base (BER) o mediante reparación mal emparejada (*mismatch repair* (MMR)). El daño inducido por la radiación en el DNA

implica, la expresión de dos protein-quinasas: ATM (*Ataxia Teleangiectasia mutated*) y ATR (*ATM and Rad3-related*). ATM es el mediador más importante del daño inducido por radiaciones ionizantes. ATR es el principal mediador del daño inducido por radiación ultravioleta. Una vez se ha producido el daño, ATM y ATR acumulan y activan a p53, uno de los principales reguladores del punto de restricción o "check point G1", que a su vez induce la sobreexpresión de p21/cip, un inhibidor de ciclina E/Cdk2, lo que induce la detención del ciclo celular en G1. Pero ATM y ATR también inducen el bloqueo del *checkpoint* en fase S, a través de la inactivación de Cdc25, un factor liberador de los complejos ciclina E/Cdk2 y ciclina A/Cdk2. Una vía alternativa con un mecanismo poco claro, es la que incluye la formación de una macroproteína (*BRCA 1-associated genome surveillance complex*) formada por ATM, NSB1 (*Nijmegen Break Syndrome*) y BRCA 1. Finalmente, el *checkpoint* de fase G2 es regulado primariamente por ATR, a través de la activación de chks1, que inhibe Cdc25 y por tanto mantiene inhibido el complejo ciclina B1/Cdk1, impidiendo la síntesis de DNA (Sun & Yang, 2010).

La radiación ionizante produce una variedad de daños en el ADN tales como: daño oxidativo de una base, roturas dobles y simples de cadena (DSB y STB), así como múltiples daños locales a través de interacciones directas e indirectas. Las lesiones más complejas (DSB y lugares de daño múltiple) requieren de otras estrategias de reparación denominadas recombinación homóloga (HR) y no homóloga (NHEJ). La diferencia fundamental entre estos mecanismos de reparación es que la recombinación homóloga (HR) promueve una reparación del daño de manera precisa, copiando la información intacta de una cadena de ADN molde homóloga no dañada; mientras que NHEJ es un mecanismo independiente de la homología que simplemente une extremos rotos. NHEJ es el mecanismo predominante responsable de la reparación de la mayoría de las roturas dobles de cadena en las células somáticas. La proteína de reparación del daño, Ku, en este sistema de reparación es absolutamente esencial para el mantenimiento de la estabilidad genómica. Se ha visto que Ku participa en los mecanismos de proliferación y supervivencia de las células cancerígenas. La expresión de Ku se encuentra controlada de tal forma que la sobreexpresión de la proteína promueve fenotipos oncogénicos (incluyendo hiperproliferación y resistencia a la apoptosis), mientras que la baja/nula expresión de Ku conduce a una inestabilidad genómica y oncogénesis. Tales observaciones indican que Ku puede actuar tanto como oncoproteína como supresor tumoral (Gullo et al., 2006).

4.9.1. Proteína Ku70/80

La recombinación no homologa (NHEJ) necesita de proteínas de unión terminal que funcionan como factores de reparación. En este proceso participa la proteína Ku, formada por Ku70 y Ku80 (para algunos autores ku86), que junto con DNA-PKcs forman el complejo DNA-PK. La proteína heterodimérica Ku se encarga de unirse a los cortes del ADN sin discriminar la naturaleza del corte, y activa a DNA PKcs para que realice la reparación (Walker et al., 2001). Ku está presente de forma abundante en el núcleo, y además de estar implicada en la reparación del ADN, realiza funciones de mantenimiento de los telómeros y la apoptosis.

Koike observó que Ku70 podía translocarse al núcleo sin necesidad de heterodimerización con Ku80 y de forma independiente a la autofosforilación con DNA-PK (Koike et al., 2000). Se ha sugerido que la amplificación y sobreexpresión de Ku70 puede modificar la función de Ku70 en el complejo DNA-PK, afectando el mantenimiento de la estabilidad genómica y la reducción de frecuencia de mutaciones (Leskov et al., 2003). Por su parte Myung et al, mostraron que la pérdida de Ku86 (o Ku80) producía retraso en el crecimiento, hipersensibilidad a la radiación ionizante, aumento de los niveles de p53 y acortamiento de telómeros (Myung et al., 2004).

Proliferación y apoptosis. Se ha demostrado que la proteína Ku puede estar presente en otras estructuras subcelulares. Ku70 inhibe la apoptosis uniéndose a la proteína pro-apoptótica Bax e inhibiendo su translocación a la mitocondria. Por lo tanto, Ku70 tiene una función citoprotectora en el citosol controlando la localización de Bax (Sawada et al., 2003; Chang et al., 2008). Bcl-2 regula negativamente la reparación de las roturas dobles de cadena de ADN interaccionando con los mecanismos de reparación no homóloga donde Ku70/80 es clave (Wang et al., 2008). Esta función antiapoptótica está mediada por el dominio carboxilo terminal de Ku70 y es independiente de Ku80. Además, la proteína Ku participa en los fenómenos de adhesión célula-célula y célula-matriz, participando en los procesos proteolíticos extracelulares a través de su interacción específica en la superficie celular a través de la metaloproteasa 9. Esto sugiere que la función de Ku en la superficie celular puede ser importante en la invasión tumoral (Muller et al., 2005).

El papel de Ku70/80 en la proliferación celular y regulación del ciclo de las células es menos evidente, existiendo muy poca bibliografía al respecto. El heterodímero Ku70/80 + DNA-PKcs aumenta la acción de la ADN ligasa IV. Esta proteína es importante para los fenómenos de reparación no homóloga (Espejel et al., 2002). Se ha observado que NHEJ puede ser un mecanismo responsable en la formación de las uniones de telómeros, fase esencial en el ciclo celular (Critchlow y Jackson, 1998), protegiendo a los segmentos finales de los cromosomas de posibles fusiones. Utilizando técnicas de inmunoprecipitación de cromatina, se ha observado que Ku70/80 y DNA-PKcs tienen un papel protector sobre los telómeros, y a la postre, sobre el ciclo celular (d'Adda di Fagagna et al., 2001; Hsu et al., 1999). Ku70/80 puede tener cierta importancia en los procesos de reparación de los telómeros antes del inicio de cada ciclo celular (Lansdorp, 2000).

Hipoxia y angiogénesis. La relación entre la depleción de oxígeno y los niveles de Ku70/80 es controvertida desde el momento en que hay trabajos publicados que no han observado modulación alguna de NHEJ por la hipoxia (Bindra et al., 2004; Sprong et al., 2006). No obstante, otros autores han reportado modulación de la expresión de genes relacionados con NHEJ, entre los que estarían Ku, DNA-PKcs y ADN ligasa, entre otros (Meng et al., 2005). En un estudio realizado por nuestro grupo en pacientes con cáncer cervical, se observó una disminución de los niveles de proteína de Ku70/80 en cortes de tejido de aquellos pacientes que presentaban mayores niveles de hipoxia (Lara et al., 2008). Además, se observó una estrecha relación entre la hipoxia y la angiogénesis, probablemente mediada por VEGF. La inhibición de NHEJ a través de la disminución de Ku, unido a un aumento de la angiogénesis, podrían ser importantes mecanismos relacionados con la promoción y progresión tumoral.

4.9.2. Proteína Ku70/80 y radioterapia

Los fenómenos que dañan el genoma inducen rutas que activan mecanismos de reparación del ADN, producen parada del ciclo celular y desencadenan la apoptosis. Entre los tipos de daño inducidos por la radiación ionizante, las roturas dobles de cadena (DSB) son las más letales.

Brown et al, investigaron los efectos de la radiación gamma sobre los niveles celulares de la proteína Ku, observándose que la irradiación producía una

estimulación de los niveles celulares de Ku70 (que se acumulaba en el núcleo) pero no de Ku80. Además observaron que el aumento de Ku70 tras la irradiación utilizaba mecanismos dependientes de p53 y ATM. Sin embargo, la activación de DNA-PK no requería del aumento en los niveles de Ku70 (Brown et al., 2000). Los estudios que han analizado la relación entre el heterodímero Ku y la respuesta a la radiación ionizante en distintos tipos tumorales han dado resultados controvertidos.

En un estudio realizado por Bjork-Eriksson, se evaluó la relación entre la expresión de los componentes de DNA-PK y la radiosensibilidad celular mediante la determinación de la fracción de supervivencia tumoral (SF2) en cánceres de cabeza y cuello. No se encontró relación alguna entre SF2 y la expresión de DNA-PKcs o Ku70/80, lo que descartaba la determinación de la expresión inmunohistoquímica de DNA-PK en este tipo tumoral como ensayo predictivo de radiosensibilidad tumoral (Bjork-Eriksson et al., 1999). Sakata et al, analizaron la expresión de Ku70, Ku85, DNA-PKcs, XRCC4 y Nbs1 en tejido normal y tumoral (laringe, orofaringe, pulmón, mama, páncreas, entre otros) de 134 pacientes que desarrollaron diferente radiosensibilidad sin encontrar diferencias en la expresión de las proteínas entre el tejido canceroso y su tejido normal correspondiente, ni entre los tejidos tumorales con distinta radiosensibilidad (Sakata et al., 2001). Sin embargo, la expresión de Ku70 y la actividad DNA-PK se correlacionaba con la sensibilidad a la radiación en líneas celulares de cáncer esofágico (Zhao et al., 2000). En pacientes con carcinoma rectal, la sobreexpresión de las proteínas Ku70 y Ku80 se correlacionaba con la radio-resistencia tumoral (Komuro et al., 2002), y en un estudio posterior se observó que una alta proporción de células tumorales de carcinoma nasofaríngeo Ku70 positivas eran responsables del fenotipo radio-resistente de las células tumorales, reflejando la capacidad de Ku para reparar el daño del ADN en las células tumorales (Lee et al., 2005). En los estudios realizados en carcinoma de cérvix, tampoco se observa una clara relación entre la expresión del heterodímero y la respuesta a la radiación ionizante. Mediante análisis por microarrays se identificó un grupo de genes relacionados con la radiosensibilidad en carcinoma de células escamosas de cérvix, comparando los perfiles de expresión de 9 tumores radio-sensibles y 10 radio-resistentes obtenidos por biopsia antes del tratamiento. Las células deficientes en XRCC5 (gen que codifica para la proteína Ku80) eran hipersensibles a la radiación ionizante. De este modo, la sobreexpresión de este gen se observaba en células de cáncer radio-resistentes, siendo XRCC5 uno de

los genes más importantes en la determinación del destino de las células cuando se encuentran bajo estrés causado por la radiación (Kitahara et al., 2002).

Algunos estudios, relacionan la expresión del heterodímero Ku con la supervivencia en carcinoma cervical (Tabla 10). Wilson et al., observaron en 53 pacientes con cáncer de cérvix uterino una relación entre la radiosensibilidad tumoral (medida mediante SF2) y la expresión de Ku70 ($p = 0.057$) y Ku80 ($p=0.19$). Todos los tumores con baja expresión de Ku70 y Ku80 eran radiosensibles. Además, se observó una mayor supervivencia en pacientes con baja expresión de Ku70 ($p = 0.046$). Esta diferencia también se observó para Ku80 pero no era estadísticamente significativa ($p = 0.087$). El hecho de que pacientes con una baja expresión de Ku70 tengan un mejor pronóstico de la enfermedad sugiere que los tumores con capacidad para reparar el daño son los que sobreviven y proliferan después del tratamiento (Wilson et al., 2000). Harima, por su parte, observó en 89 pacientes con carcinoma de cérvix uterino una diferencia significativa en la supervivencia global entre los pacientes que no expresaban Ku80 y aquellas que expresaban la proteína ($p = 0.04$). Aunque no se examinaron los niveles de Ku70, la estabilidad del polipéptido Ku80 es dependiente de la expresión de Ku70 en cáncer cervical. De este modo, en tejidos donde se expresaba Ku80 se admitía que Ku70 se expresaba de forma similar (Harima et al., 2003). En pacientes con carcinoma endometrial, aunque la supervivencia libre de enfermedad era significativamente mayor en pacientes con niveles por debajo del valor medio de Ku70 ($p < 0.05$), la supervivencia global no mostró diferencias significativas (Saygili et al., 2004).

Tabla 10. Relación entre Ku70/80 y supervivencia en distintos tipos tumorales.

	Nº de pacientes	Marcador	Tipo de tumor	Supervivencia libre de enfermedad	Supervivencia global
Wilson (2000)	77	Ku70	Cérvix		Peor (AU)
Komuro (2002)	96	Ku70/86	Rectal	Peor (AU)	
Friedberg (2003)	79	Ku86	Amígdala	Mejor (AU)	
Harina (2003)	89	Ku80	Cérvix		Peor (AU)
Saygili (2004)	81	Ku70	Endometrio	Peor (AU)	No (AU)
Grabsch (2006)	242	Ku70/80	Colorrectal	No	No
Pavón (2008)	75	Ku70	Cabeza/cuello	Mejor (AU)	Mejor (AU)

AM: análisis multivariante. AU: análisis univariante.

En 66 pacientes con carcinoma nasofaríngeo tratados con radioterapia, se observó que la tasa de control locoregional a los 5 años era significativamente mayor en el grupo de pacientes con una baja expresión de Ku ($p = 0.0042$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas respecto a la supervivencia libre de enfermedad entre ambos grupos (Lee et al., 2005). En un estudio reciente realizado en carcinoma colorrectal no se encontró relación significativa entre Ku70/Ku80 y la supervivencia (Grabsch et al., 2006). Pavón y colaboradores observaron que los pacientes que expresaban altos niveles de Ku70 mostraban una mayor supervivencia libre de recurrencia local y una mayor supervivencia global (Pavón et al., 2008).

En cuanto a la relación de Ku con factores clásicos de pronóstico, en la mayoría de los estudios no se observa relación significativa (Wilson et al., 2000; Harima et al., 2003). En el estudio de Korabiowska en pacientes con carcinoma de la cavidad oral, se observó una relación entre Ku70/80 y el grado tumoral así como con la afectación ganglionar. La expresión de Ku70 se observó en un 87.5% de los tumores de grado 1 y de grado 3 y en el 82.9% de carcinomas de grado 2. Ku80 se observó en el 87.5% de los tumores de grado 1, 82.9% de grado 2 y en todos los tumores de grado 3. Se observaron células Ku70 positivas en el 90.5% de los tumores sin afectación ganglionar y en un 80% de los tumores con afectación ganglionar. Además, se vieron relaciones similares en la expresión de Ku80 (Korabiowska et al., 2006). En cuanto a la relación con otros marcadores pronósticos no se han encontrado diferencias significativas. En el estudio de Wilson et al., se analizó la relación entre Ku y Ki67 sin observarse correlación entre la proliferación tumoral y la expresión de Ku70 o Ku80 (Wilson et al., 2000).

4.10. Proteínas de resistencia a drogas

Las células tumorales insensibles a las drogas antineoplásicas poseen un fenotipo de resistencia a drogas. Las proteínas que pueden estar envueltas en esta resistencia están asociadas al transporte de xenobióticos: P-glicoproteína, la proteína 1 de resistencia a multidroga, la proteína de resistencia en cáncer de mama y la proteína relacionada con la resistencia en pulmón (LRP).

Varios mecanismos pueden contribuir a que se desarrolle una quimio-resistencia:

- Amplificación o aumento de la expresión de la familia P-glicoproteína de transportadores de membrana (Ej: MDR1, MRP, LRP), los cuales favorecen la eliminación de la quimioterapia.
- Cambios en las proteínas celulares envueltas en la detoxificación (ej: Dihidrofulato reductasa, metalotioneínas, glutathion S-transferasa pi) o activación de drogas quimioterapéuticas (DT-diaporasa, citocromo P-450 reductasa).
- Cambios en moléculas envueltas en la reparación del ADN (ej: DNA topoisomerasa II, p21WAF1/CIP1).
- Activación de oncogenes tal como Her-2/neu, Bcl-2, Bcl-XL, c-myc, ras, MDM2 o mutación de p53.

A la proteína LRP se la llamó posteriormente proteína *vault* mayor (MVP). MVP es el componente principal de las partículas vaults multiméricas. En su forma humana, el complejo Vault está compuesto por partículas de ribonucleoproteína que se encuentran en el citoplasma de las células eucarióticas y que se constituye por múltiples copias de tres proteínas: la proteína vault de mayor peso molecular (MVP) y dos proteínas vault menores (VPAAP y TEP1), además de moléculas de ARN sin traducir. MVP supone más del 70% de la masa total del complejo (Steiner et al., 2006).

Los estudios de vaults en mamíferos ha puesto de manifiesto que el complejo contiene al menos, cuatro componentes distintos (Kedersha et al., 1986): tres proteínas de alto peso molecular y varias moléculas pequeñas de ARN no traducido. La proteína Mr100.000 (masa relativa), conocida como *major vault protein* (MVP), domina la estructura y constituye más del 70% de la masa molecular del complejo. Dos proteínas adicionales, Mr193.000 y 240.000, componen las proteínas menores de vaults. Se ha observado que la subunidad Mr193.000 presenta actividad poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP), motivo por el cual ha esta unidad se la ha llamado vault PARP (VPAAP o p193) (Kickhoefer et al., 1999). La subunidad Mr240.000 presenta cierta similitud con la proteína asociada a la telomerasa 1 (TEP1) (Kickhoefer et al., 1999). Además, esta subunidad de vault es compartida con al menos otro complejo de ribonucleoproteína, el complejo telomerasa. Por último, la vault ARN (vARN) representa aproximadamente el 5% de la masa total de vaults (Kedersha et al., 1986). Un modelo estequiométrico ha propuesto que cada partícula de vaults se compone por 96 moléculas de MVP, 8 moléculas de VPAAP, 2 moléculas de TEP1 y al menos seis moléculas de vARN (Kong et al., 2000).

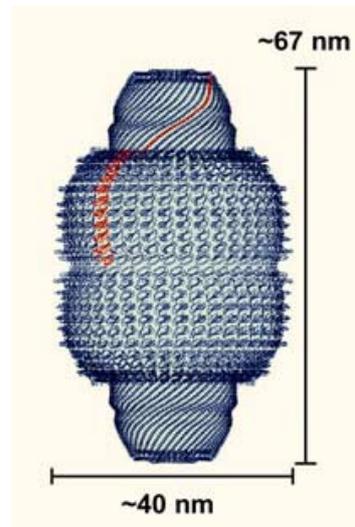


Figura 5. Estructura de Vault presente en hígado de rata (resolución, 3.5 Å).

H Tanaka *et al.*, 2009 (*Science*, **323**: 384–388)

El gen humano para el MVP, localizado en el cromosoma 16p13.1-p11.2 (Slovak *et al.*, 1995), se expresa de manera diferencial en los diferentes tejidos. Así, los tejidos que presentan mayores niveles de MVP son pulmón, hígado e intestinos; mientras que por otro lado, el músculo esquelético y el cerebro presentan niveles relativamente bajos de esta proteína. Es de destacar que el supresor de tumores PTEN parece interactuar tanto con MVP como con vaults (Yu *et al.*, 2002).

El gen que codifica para la proteína Mr193.000, llamada VPARP, se encuentra en el cromosoma humano 13q11 (Still *et al.*, 1999) y está heterogéneamente expresada en los tejidos humanos. El mayor nivel de VPARP se detecta en el tejido renal (van Zon *et al.*, 2003). La proteína VPARP humana es también conocida como PH5P (Jean *et al.*, 1999) y ADPRTL1 (Still *et al.*, 1999). Contiene una región de unos 300 aminoácidos (aminoácidos 257-563) que presenta un 28% de secuencia idéntica con el dominio catalítico de la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP1) (van Zon *et al.*, 2003). Se ha demostrado que VPARP cataliza la ribosilación ADP de sí mismo y, en menor medida de MVP (Kickhoefer *et al.*, 1999). Aún no se conoce la importancia de la actividad de VPARP para la función de vaults. Es importante destacar que las partículas del complejo vaults mantienen esta actividad enzimática. La Poli ADP-ribosilación de las proteínas constituye una modificación postraduccional reversible que juega un papel importante en el mantenimiento de la estabilidad genómica del ADN (Smith, 2001).

Se ha establecido que la proteína menor de vault (Mr240.000) es idéntica a la proteína asociada a la telomerasa 1 (TEP1). El gen TEP1 en humanos ha sido localizado por inmunofluorescencia de hibridación in situ (FISH) en el cromosoma 14q11.2 (Saito et al., 1997). El papel de TEP1 dentro del complejo telomerasa no está claro, sin embargo, se ha demostrado que TEP1 interactúa específicamente con la ARN telomerasa (Harrington et al., 1997; Nakayama et al., 1997).

Vaults ARN (vARN) constituye menos del 5% de la masa del complejo y se cree que es una partícula funcional más que un componente estructural, ya que la degradación de la vARN no afecta a la estructura de vaults (Kedersha et al., 1986; Kedersha et al., 1991; Kickhoefer et al., 1993; Kong et al., 2000). El gen vARN es diferente para cada especie, presentando desde 86 hasta 141 bases. De la misma manera, los niveles de expresión varían en organismos distintos. Las ratas y los ratones sólo expresan una vARN única de 141 bases, mientras que las ranas toro (*Rana catesbeiana*) expresan dos tipos de vARN de 89 y 94 bases. Curiosamente, los seres humanos presentan tres tipos de vRNAs (hvg1, hvg2 y hvg3) de 98, 88 y 88 bases, respectivamente. La razón exacta de la existencia de múltiples vRNAs en algunas especies es desconocida (van Zon et al., 2003). Se ha demostrado que los tres vRNAs humanos están vinculados al complejo vault en una proporción que no refleja sus niveles de expresión. Al parecer, los vARNs humanos individuales poseen afinidades diferentes para con TEP1. La mayor parte de vARN asociados a vaults son del tipo hvg1, y sólo pequeñas cantidades de hvg2 y hvg3 (van Zon et al., 2003). Curiosamente, en al menos tres líneas celulares resistentes a múltiples drogas, el tipo hvg3 está consistentemente asociado en comparación con sus contrapartes sensibles a los medicamentos (van et al., 2001). Esto sugiere que la proporción en que los tipos de vARN aparecen asociados a vaults puede ser de importancia funcional. Además, es interesante destacar, respecto a la función de la vARNs, su asociación con el complejo vaults en distintas líneas celulares humanas de cáncer.

Algunos estudios indican que MVP podría estar implicado en las reacciones de tipo inmunológico. Así, se ha observado un significativo aumento de los niveles de expresión de vRNA en respuesta a la infección por el virus de Epstein-Barr (EBV) (Mrazek et al., 2007; Motsch et al., 2007). También se ha sugerido que la inducción de vARN juega un papel importante en la inmunidad innata (Taganov et al., 2006), así como en los fenómenos de transformación maligna (Volinia et al., 2006). Experimentos FISH contra hvg1 han demostrado una localización cerca del núcleo de las células B infectadas por el EBV. Esta observación llevó a los autores a especular acerca de la posibilidad de

que vARN/vaults podrían estar implicadas en la defensa anti-viral a través de un mecanismo de transporte núcleo-citoplasmático (Berger et al., 2009).

Tanto los macrófagos como las células dendríticas son células que expresan altos niveles de vaults (Izquierdo et al., 1996; Schroeijers et al., 2002; Sunnaram et al., 2003). Distintos estudios han puesto de manifiesto que existe una alta expresión de MVP/vaults durante la maduración de las células dendríticas a partir de monocitos derivados de la sangre, las células mononucleares CD34+ o células de leucemia mieloide crónica (Schroeijers et al., 2002). En este estudio, la aplicación de anticuerpos anti-MVP llevó a una reducida viabilidad de las células dendríticas maduras productoras de lipopolisacáridos y del factor de necrosis tumoral (TNF α). Además, bloqueó la expresión de marcadores de la diferenciación/maduración celular, la capacidad de inducir la proliferación de células T antígeno-específicas y la liberación de interferón gama. Estos hallazgos sugieren un papel central de vaults en el apoyo a la maduración de células dendríticas y, en consecuencia, de las respuestas inmunes.

Recientemente se ha publicado una nueva función de vaults para la inmunidad innata, donde MVP/vaults eran proteínas esenciales para la resistencia del huésped contra la infección pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa* basado en la efectiva internalización y el despacho del agente patógeno (Kowalski et al., 2007). Los mecanismos moleculares que subyacen a este importante papel de MVP en la inmunidad innata son confusos hasta ahora. Entretanto, se sugiere que podrían estar implicadas cualquiera de las funciones de regulación del citoesqueleto necesarios para la formación de lípidos, o los impactos sobre las vías de señalización como la MAPK (Berger et al., 2009).

Como se ha dicho anteriormente, estudios en donde se analizó la expresión de MVP/LRP demostraron un incremento en la expresión de la proteína en muchas líneas celulares de cáncer quimio-resistentes, así como en muestras de tumores primarios de diferentes orígenes histogenéticos. Además, varios estudios clínico-patológicos mostraron que la expresión de MVP es un factor pronóstico independiente de peor respuesta a la quimioterapia y/o supervivencia global y/o libre de enfermedad. La estructura en forma de barril y la localización subcelular del complejo vault, contribuirían a su función en el transporte intracelular. Mossink et al, postularon que vaults contribuye a la resistencia a droga a través de distintos mecanismos: i) transportando al agente químico fuera de sus dianas intracelulares, ii) secuestrándolo dentro de vesículas exocitóticas, iii) participando en la compartimentación intracelular y/o transporte de biomoléculas. Además, vaults

tendrían un importante papel en el mantenimiento de la estabilidad genómica (Mossink et al., 2003).

Además de su función como transportadora, Vaults y MVP se han asociado a varios procesos celulares propios del desarrollo tumoral, como la movilidad y la diferenciación celular. Se ha observado una relación entre la expresión de MVP y el grado de la enfermedad en ciertos tipos de cáncer, lo que sugiere una participación directa en el desarrollo y progresión tumoral. Aún se postula que MVP podría estar involucrada en importantes rutas de señalización celular, incluyendo las rutas PI3K/Akt y la MAPK (Steiner et al., 2006).

4.10.1. LRP/MVP

Vaults transportan drogas y otros xenobióticos lejos de sus dianas subcelulares mediante mecanismos de extrusión de estas sustancias desde el núcleo o el secuestro de las mismas en vesículas de exocitosis. En tal escenario, vaults podrían funcionar como transportadores citoplasmáticos y/o nucleares de fármacos asociadas a la membrana, quizá relacionándose con otras proteínas transportadoras de la familia ABC presente en las distintas membranas intracelulares. Por otra parte, las características y la localización de dos proteínas de vaults menores, TEP1 y VPARP, posiblemente implique que vaults cumpliría alguna función en la protección del genoma y, por lo tanto, contribuiría a constituir un perfil de farmacorresistencia (Marieke et al., 2003).

Las proteínas de resistencia a multidrogas (MDR), entre las que se encuentran Pgp, LRP y MVP, realizan una serie de funciones relacionadas con los procesos de detoxificación celular. Así, aumentan la actividad detoxificadora de las enzimas glutatión S-transferasa (GST) y 06-alquilguanina-ADN alquiltransferasa; altera la actividad de la enzima topoisomerasa 11; y aumenta la expresión génica de la metalotioneínas (Vendrik et al., 1992; Mattern et al., 1993). Estas proteínas de resistencia a droga, están presentes en distintos tejidos normales y malignos. En las células normales, la mayoría de estas proteínas presentan un papel protector contra las sustancias tóxicas. Hay evidencias que sugieren que las células conservan esta función también cuando adquieren un fenotipo maligno, manteniendo e incluso potenciando la capacidad celular para eliminar compuestos de tipo quimioterápico (Mattern et al., 1993).

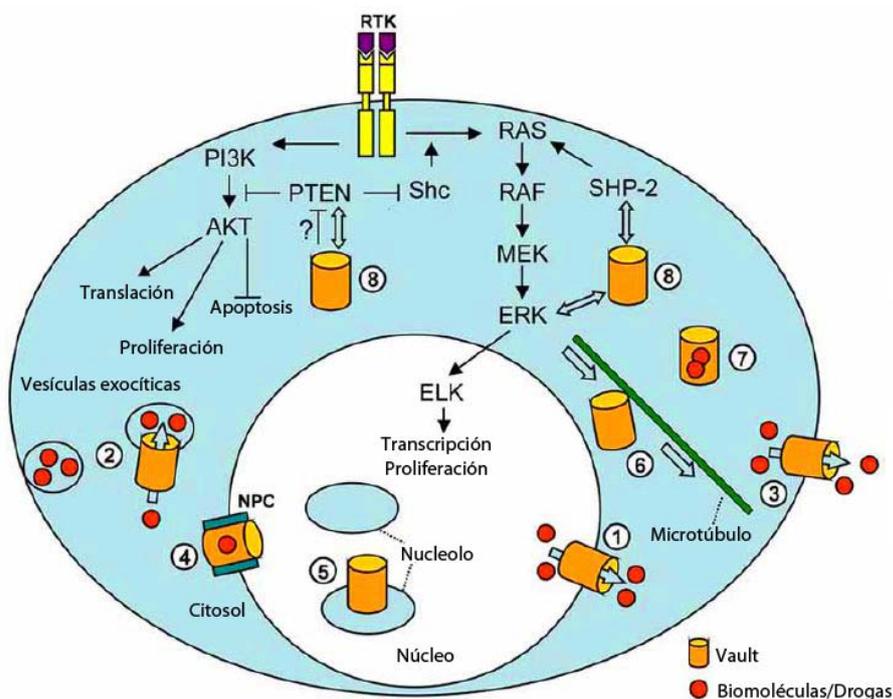


Figura 6. Representación esquemática propuesta para las funciones de Vault, incluyendo los procesos de transporte (1-6), captura de drogas (7) y modulación de la señal de transducción (8). Leyenda: (Transporte \Rightarrow), (Estimulación \rightarrow), (Interacción \Leftrightarrow), (Inhibición \perp) (Steiner et al., 2006).

Las partículas vaults realizan una multitud de funciones celulares que están fundamentadas por su distinta morfología, la estructura de múltiples componentes, y la interacción con otras proteínas; además de haberse observado en extensas investigaciones en cultivos celulares y modelos animales, así como en muestras clínicas (Steiner et al., 2006).

La cavidad central de vaults es lo suficientemente grande como para incluir complejos de hasta 330 Å de diámetro (Kong et al., 1999), o para secuestrar a cientos de proteínas menores. En los vaults del erizo de mar parecen haber componentes adicionales de proteínas en el rango de peso molecular de 14-55 kDa, que podrían corresponder a una función específica y exclusiva en esa especie (Stewart et al., 2005). Por ello, la criomicrografía de las vaults del erizo de mar (Stewart et al., 2005) y de rata (Kong et al., 1999), contienen a menudo mayor densidad dentro de la cavidad central en forma de barril, que se ha atribuido al contenido molecular de las distintas masas por partícula (Steiner et al., 2006).

En un estudio elaborado por Chugani et al. se encontró una pequeña porción de las vaults de la rata, asociados con la envoltura nuclear y, posiblemente, con el complejo del poro nuclear (NPC), lo que sugiere que vaults actuarían como lanzaderas entre el núcleo y el citoplasma (Chugani et al., 1993). La masa, el diámetro y la forma de vaults son similares a las que presenta la clavija central de la NPC. Hasta hace muy poco, sin embargo, vaults no había sido detectada dentro de la NPC. Utilizando microscopía crioinmuno-electrónica e inmuno-tinción, Slesina et al. fueron los primeros en localizar a MVP dentro de NPC, proporcionando un indicio más para comprender las funciones de MVP/vaults y su relación con las NPC (Slesina et al., 2005).

Hasta ahora, muy pocos estudios han podido asignar una función para las partículas vaults. Es el caso de la acción en el receptor de estrógeno (Abbondanza et al., 1998), los ribosomas (Hamill et al., 1997), PTEN (Yu et al., 2002), y SHP-2 (Kolli et al., 2004). Abbondanza et al., utilizando vaults purificadas a partir de células MCF-7 de cáncer de mama, observó la presencia del receptor de estrógenos en estas preparaciones. Además, el tratamiento de células con estradiol resultó en una mayor cantidad de MVP presente en el extracto nuclear y co-immunoprecipitación con el receptor de estrógeno. Estos interesantes resultados sugieren que vaults puede tener un papel en el transporte núcleo-citoplasmático del receptor de estrógenos (Abbondanza et al., 1998). También se ha observado que vaults podrían desempeñar un papel en el ensamblaje de ribosomas y/o transporte de los ribosomas del núcleo (Hamill et al., 1997). De hecho, varios informes recientes indican que parte de los MVP celulares sí están presentes en el núcleo delular (Cheng et al., 2000; Slesina et al., 2005; Stewart et al., 2005), coincidiendo con el modelo inicial de vaults como vehículos de transporte entre el citoplasma y el núcleo (Chugani et al., 1993).

Además de la función como transportador núcleo-citoplasma, también se han sugerido otras funciones de transporte para vaults como la importación vesicular en el contexto de la exocitosis (Suprenant, 2002; Mossink et al., 2003) y a lo largo del citoesqueleto (Herrmann et al., 1999; Eichenmuller et al., 2003). Por ejemplo, en las extensiones neuríticas de células PC12 diferenciadas, hubo una casi total coincidencia entre la disposición de microtúbulos y la localización de vaults. Además, se observó cierto grado de coincidencia entre vaults y otros marcadores vesiculares (Herrmann et al., 1999). Distintos estudios realizados con microscopía inmuno-electrónica revelaron una estrecha asociación entre MVP y

vesículas sináptica en las terminales nerviosas colinérgicas de la raya eléctrica (Herrmann et al., 1996). Sin embargo, en todos estos casos, la naturaleza de la función sigue siendo un enigma.

Un estudio realizado en células de carcinoma de faringe, la cuales presentaban alta expresión de LRP, demostró una posible participación de esta proteína en el transporte nucleocitoplasmático de drogas, dando como resultado la presencia de un fenotipo de resistencia a multidroga (MDR). Tanto las células de carcinoma de faringe sensibles como las resistentes fueron sometidas a diferentes concentraciones de benzopireno y de doxirrubina. Tras verificar la distribución intracelular de estas drogas por microscopia de fluorescencia, se observó que las células sensibles presentaban un acúmulo más pronunciado en el núcleo (lugar de acción de estas drogas), que en el citoplasma, lo que resulta en una mayor sensibilidad a estos agentes. Por otro lado, las células resistentes presentaban mayor acúmulo en el citoplasma, alejándose, por lo tanto, de su sitio de acción. Este experimento, así como otros, sugieren que MVP puede ser muy relevante en el desarrollo del fenotipo MDR (Cheng et al., 2002). Por su parte, Silva et al. publicaron que líneas celulares resistentes a múltiples drogas (pulmón, mieloma y carcinoma de mama), presentaban niveles elevados de MVP. Es más, se ha demostrado recientemente que el MVP no es suficiente para originar al fenotipo MDR aisladamente. De hecho, vaults constituye un complejo de múltiples subunidades que necesitan interactuar para generar el fenotipo MDR (Siva et al., 2001).

La proteína MVP puede ser encontrada fisiológicamente en el colon, pulmones, túbulos contornados proximales renales y corteza adrenal (Filipits et al., 2000). Además, se expresa intensamente en tejidos expuestos a agentes xenobióticos durante largos plazos; como el epitelio bronquial, la corteza adrenal y los macrófagos (Van Zon et al., 2003). MVP puede generar mayor o menor sensibilidad a la quimioterapia en distintos tipos tumorales, principalmente en el pulmón, así como en leucemias, linfomas y tumores sólidos (Raaijmakers et al., 1998; Mossink et al., 2003; Schneider et al., 2001). También participa en la resistencia a la adriamicina, y se cree que pueda estar asociado con los fenómenos de resistencia algunos casos de neoplasias mamarias; aunque los mecanismos de acción subyacentes no han sido claramente dilucidados (Schneider et al., 2000).

Estudios en mielomas y otras neoplasias humanas, han visto relación entre la expresión de MVP y la resistencia a agentes alquilantes como el melfalano en el caso del mieloma múltiple (Mossink et al., 2003; Raaijmakers et al., 1998). Además, la expresión de MVP en células tumorales está asociada a la resistencia a doxorubicina, vincristina, carboplatino, etoposideo, paclitaxel y gramicidina D (Filipits et al., 2000). La expresión de MVP también ha sido asociada a una respuesta deficiente a la quimioterapia y a una menor supervivencia en caso de linfomas de células B, lo que sugiere que esta proteína pueda ser un factor de resistencia clínicamente relevante en casos de linfoma (Filipits et al., 2000). En el caso de leucemia mieloide aguda, se ha observado que existe una co-expresión de Pgp, MRP1 y MVP. Generalmente las peores respuestas al tratamiento y menores tasas de supervivencia son observadas en pacientes que co-expresaron estas proteínas. Además, el mejor pronóstico lo tenían aquellos pacientes negativos para esta co-expresión (Mossink et al., 2003). La existencia de la co-expresión de estas proteínas ya fue descrita previamente por otros autores en pacientes con carcinomas de ovario (Moran et al., 1997).

En relación a los tumores sólidos, la expresión de MVP fue abordada en cáncer de ovario, mama y en neoplasias de epitelio bronquial, colon, recto, melanoma, osteosarcoma y neuroblastoma (Mossink et al., 2003). Así, pocos estudios han evaluado el papel de MVP en tumores sólidos. En el cáncer de ovario avanzado FIGO estadio III/IV, el 77% de los pacientes expresaban MVP en el momento del diagnóstico. También se ha observado una cifra similar en el mismo tipo de tumor localizado en estadios iniciales (FIGO estadio I/II). En el cáncer de ovario avanzado, se ha encontrado una correlación entre la expresión de MVP y la falta de respuesta al tratamiento así como con una supervivencia global más corta. Este resultado no se reprodujo en el cáncer de ovario en etapas tempranas. Por contra, la expresión MVP en cáncer de ovario en fase inicial se asoció con las variables de pronóstico más favorables (Izquierdo et al., 1995; Artes et al., 1999).

En el caso del cáncer de mama, en dos estudios en que se utilizó la inmunohistoquímica para valorar la expresión MVP, se observó que la expresión varió de un 69 hasta un 75% sin diferencias significativas entre las muestras obtenidas al momento del diagnóstico o en recaída después de la quimioterapia (Linn et al., 1997). Un segundo estudio obtuvo resultados similares: 68% de los

pacientes con media/alta expresión de MVP (Pohl et al., 1999). Sin embargo, en ningún caso se observó correlación significativa con la evolución clínica.

Otros tejidos que expresan un alto nivel de MVP son el epitelio bronquial, el intestino/recto, colon y otros tejidos epiteliales. En los cánceres derivados de estos tejidos, se constata una expresión variable de MVP. Por ejemplo, en el cáncer pulmonar de células no pequeñas y el de células pequeñas, la expresión es variable, siendo la más alta en el cáncer de pulmón de células no pequeñas quimiorresistentes (Dingemans et al., 1996). Al igual que en otros estudios, no se observó correlación con los parámetros clínicos o patológicos (Dingemans et al., 1996; Volm et al., 1997).

En los tumores colorrectales se ha observado que la expresión de MVP aumenta en las lesiones premalignas, así como en el adenoma de colon y el carcinoma de colon agresivo, lo que sugiere una asociación de este marcador con la agresividad de la patología (Izquierdo et al., 1996; Meijer et al., 1999).

Otros tumores en los que se ha reportado la expresión de MVP son el melanoma, el osteosarcoma y el neuroblastoma (Ramani y Dewchand, 1995). En el melanoma, se ha observado una alta expresión que parece corresponder con el comportamiento agresivo del tumor, como en el melanoma coroidal primario (Schadendorf et al., 1995; van der Pol et al., 1997). Puesto que este tipo de tumor rara vez responde a la quimioterapia, la importancia de la resistencia a drogas sigue siendo poco clara. En el osteosarcoma, la expresión de MVP se correlaciona con fallo del tratamiento quimioterápico y una baja supervivencia (Uozaki et al., 1997).

En el estudio de Izquierdo et al., en donde se midió la expresión inmunohistoquímica de LRP en tejidos normales y en 28 tipos tumorales, se observó que la frecuencia de LRP variaba según la quimiosensibilidad de los diferentes tipos de tumores (Izquierdo et al., 1996):

- Bajas tasas en cáncer testicular, neuroblastoma y leucemia mieloide aguda.
- Tasas intermedias en cáncer ovárico.
- Altas tasas en cáncer de colón, de riñón y en carcinoma pancreático.

Un estudio posterior realizado en pacientes con cáncer de mama evidenció altos niveles de LRP/MVP en tumores primarios operables, tumores localmente avanzados, tumores localmente avanzados tras ser tratados con quimioterapia, y en tumores metastáticos resistentes a antraciclinas. No obstante, no se observó relación alguna con la respuesta clínica o patológica a la quimioterapia (Linn et al., 1997).

LRP/MVP se expresa mayoritariamente en la superficie de las criptas de las células epiteliales de colon. Cuando estas células sufren un proceso carcinogénico, se produce un aumento rápido y abrupto de los niveles de expresión de esta proteína, que se incrementan en los adenomas y tienen su máximo nivel en los carcinomas. Así, en cáncer de colon, la sobre-expresión de LRP/MVP constituye un marcador de fenotipo agresivo y un factor de peor pronóstico (Meijer et al., 1999).

Vaults está presente en todos los tejidos humanos, aunque se expresa mayoritariamente en células y tejidos crónicamente expuestos a xenobióticos, como el pulmón, las células epiteliales, el tracto digestivo y los macrófagos (Schroeijers et al., 2002). Esta distribución evidencia el papel que vaults tiene en la defensa de estos órganos y células frente a componentes tóxicos. Se estima que existen entre 10.000 y 100.000 copias de esta proteína por célula (Kickhoefer et al., 1998). Aunque su función principal es la de detoxificación, hay estudios que han sugerido que las vaults podrían estar involucradas en fenómenos de transporte de distintos sustratos (Herrmann et al., 1999; Li et al., 1999), como el receptor de hormonas esteroideas (Abbondanza et al., 1998) o de ribosomas (Hamill et al., 1997). Además, la expresión de MVP y de otros componentes de vaults reflejaron el papel que tienen en la quimioresistencia de muchas líneas de células tumorales (Kickhoefer et al., 1998; Schroeijers et al., 2000; Siva et al., 2001). Se observaron niveles elevados de MVP en líneas celulares resistentes a varias clases de agentes citotóxicos. En cáncer de pulmón no microcítico, los niveles de expresión de MVP determinados por la proteína y ARN mensajero se correlacionaron con la resistencia al cisplatino, pero no se correlacionaron con otros citotóxicos (Berger et al., 2000). Para medir el papel directo de vaults en la resistencia a drogas se estabilizaron líneas celulares de carcinoma ovárico A2780 mediante transfección con la proteína MVP. Aunque los niveles de MVP aumentaron, no fueron capaces de conferir resistencia a ciertas drogas (Scheffer et al., 1995). Estudios posteriores en la misma línea celular transfectada

mostraron que las células presentaban niveles elevados de TEP1 y VPARP, además de un número elevado de partículas vault intactas (Silva et al., 2007). Estos autores concluyeron que vaults podía ser necesaria pero no suficiente para conferir una resistencia a droga (Tabla 11).

La hipótesis de que la expresión de MVP refleja una ruta de resistencia a multidroga, ha llevado al estudio de la expresión de dicha molécula en tumores humanos. Estos estudios pretenden comprobar si la expresión de MVP es capaz de predecir la respuesta clínica tras la quimioterapia. En cáncer de ovario avanzado, los pacientes con tumores LRP positivos tuvieron una peor respuesta a la quimioterapia ($p = 0.004$) y una menor supervivencia libre de enfermedad ($p = 0.003$) y supervivencia global que los pacientes LRP negativos (Izquierdo et al., 1995). Dos estudios en cáncer de mama encontraron una alta expresión de la proteína pero sin correlación con la respuesta clínica (Linn et al., 1997; Pohl et al., 1999). En los tumores colorrectales se ha observado una creciente expresión de MVP, que se ve aumentado desde lesiones premalignas a carcinoma de colon invasivo, lo cual indica que MVP podría estar asociado con el grado de la enfermedad (Izquierdo et al., 1996; Meijer et al., 1999). En osteosarcoma, la expresión de MVP estaba correlacionada con características de la quimioterapia y con una peor supervivencia (Uozaki et al., 1997). Se ha encontrado una relación entre LRP y ciertos factores pronósticos en carcinoma ovárico. En el estudio de Arts et al, realizado con 115 pacientes con carcinoma ovárico, se observó una asociación entre LRP y factores pronósticos favorables incluyendo el estadio tumoral ($p < 0.01$) y el grado tumoral ($p < 0.05$). Sin embargo, no se encontró relación entre la expresión de LRP y la supervivencia global o libre de enfermedad (Arts et al., 1999). En un estudio posterior realizado en 29 pacientes con carcinoma epitelial ovárico, no se observaron diferencias significativas en la expresión de LRP cuando se compararon grupos quimiosensibles con quimiorresistentes. Sin embargo, se observaron diferencias en la expresión de LRP en pacientes con cáncer ovárico frente a individuos normales (Goff et al., 2001). Pohl et al. analizaron la expresión de LRP en 68 pacientes con carcinoma colorrectal observando que era un factor pronóstico independiente del grado histológico, tamaño tumoral, desarrollo de nodo linfático y metástasis a distancia. No se observaron diferencias entre la supervivencia de pacientes con tumores LRP positivos y LRP negativos. Sin embargo, pacientes con alta expresión de LRP tenían una mayor supervivencia (Pohl et al., 2001). En cáncer de vejiga se ha encontrado una asociación entre la expresión de LRP/MVP y peor respuesta a la

quimioterapia neoadyuvante, además de una baja probabilidad de conservación de la vejiga después del tratamiento ($p = 0.035$) (Diestra et al., 2003). En cuanto al carcinoma de cérvix hasta el momento no se han realizado estudios que relacionen la expresión de LRP/MVP con el pronóstico de la enfermedad. En carcinoma de orofaringe, una alta expresión de MVP se relacionaba con una peor supervivencia y menor respuesta a la radioterapia (Silva et al., 2007). También se han realizado estudios para analizar la capacidad predictiva de las proteínas reguladoras de distintos procesos celulares en la resistencia a droga. Volm et al. analizaron en 94 carcinomas de pulmón microcíticos, la expresión de proteínas de resistencia, factores proliferativos y factores angiogénicos, relacionándolos con la resistencia a droga. Para medir la actividad proliferativa se determinó la expresión de PCNA, Ciclina A, ciclina D y Cdk2. Sólo se observó relación entre la expresión de Cdk2 ($p = 0.04$) y PCNA ($p = 0.05$) y la respuesta a doxorubicina "in vitro". De los factores apoptóticos analizados, sólo Fas/CD95 se asociaba significativamente con la respuesta a droga ($p = 0.007$). El índice apoptótico ($p = 0.03$) y VEGF ($p = 0.004$) también revelaron una correlación significativa con la resistencia a drogas (Volm et al., 2000). Ciertos estudios han demostrado que los agentes que dañan el ADN ejercen su efecto genotóxico induciendo el ciclo celular y la apoptosis. Aunque el efecto de p53 en la respuesta a la quimioterapia en células de cáncer de pulmón microcítico sea controvertido, se ha observado tanto una disminución (Rusch et al., 1995; Kawasaki et al., 1997) como un aumento (Brattstrom et al., 1998) de la sensibilidad a droga asociada a mutaciones de p53. Harada et al. analizaron el valor predictivo de p53, Bcl-2 y LRP en la respuesta a la quimioterapia en 57 pacientes con cáncer de pulmón no microcítico. En los carcinomas de células no escamosas, la expresión de p53 se asoció con la respuesta a la quimioterapia ($p = 0.03$), y la expresión de LRP se correlacionó inversamente con la respuesta a la quimioterapia en carcinomas epidermoides ($p = 0.02$). No se observó relación entre Bcl-2 y la respuesta a la quimioterapia, ni entre la expresión de LRP, Bcl-2, p53 y factores clásicos de pronóstico (Harada et al., 2003).

Tabla 11. Relación entre LRP/MVP respuesta y supervivencia en distintos tipos tumorales

		Nº de pacientes	Tipo de tumor	Respuesta a quimioterapia	Supervivencia libre de enfermedad	Supervivencia global
Izquierdo	(1995)	57	Carcinoma Ovárico	Si	Si	Si
Schadendorf	(1995)	71	Melanoma	Si		
Ramani	(1995)	21	Neuroblastoma			No
Dingemans	(1996)	36	NSCLC	No		No
Linn	(1997)	70	Cáncer de mama	No		
Uozaki	(1997)	60	Osteosarcoma	Si		Si
Arts	(1999)	115	Carcinoma Ovárico	No	No	No
Pohl	(1999)	99	Cáncer de mama	No	No	No
Volm	(2000)	87	NSCLC	Si		No
Goff	(2001)	29	Carcinoma Ovárico	No		
Pohl	(2001)	68	Colorrecto	No		
Diestra	(2003)	83	Vejiga	Si		
Harada	(2003)	57	NSCLC	Si		
Silva	(2007)	78	HNSCC	Si		Si

4.10.2. LRP/MVP y Radioterapia

Hasta ahora se ha podido observar el papel de MVP en la resistencia a drogas en varias líneas celulares así como en carcinoma ovárico, leucemia mieloide aguda, y otros tipos tumorales. Sin embargo, se conoce poco sobre su posible papel en la resistencia a la radiación. En el estudio de Shimamoto et al., realizado en líneas de cáncer colorrectal humano, los niveles de MVP aumentaban después del tratamiento con agentes que dañaban el ADN (bromuro de etidio y radiación ultravioleta), sugiriendo que el daño producido aumentaba la actividad promotora de MVP (Shimamoto et al., 2006). Recientemente se ha realizado un estudio en 78 biopsias de pacientes con carcinoma epidermoide de cabeza y cuello que recibieron radioterapia radical, en donde se analizó el posible papel de LRP en la resistencia a la radiación. En pacientes con cáncer de lengua, una alta expresión de LRP se asociaba con un peor pronóstico de la enfermedad ($p < 0.0001$) demostrando que LRP no sólo juega un papel importante en la

resistencia a drogas sino también en la resistencia a la radioterapia (Silva et al., 2007).

4.10.3. MVP modula otros mecanismos celulares

MVP posee un papel fundamental y esencial como proteína de resistencia a drogas. No obstante, en los últimos años, se ha observado que MVP podría estar involucrado en otros procesos celulares diferentes. Los niveles de expresión de *Y-box-binding protein-1* (YB-1), proteína importante para la proliferación celular y la reparación del ADN, parece correlacionarse significativamente con los niveles de expresión de MVP ($p = 0.0044$) en tumores de rhabdomyosarcoma embrional (Oda et al., 2008). MVP parece inhibir la apoptosis celular y favorecer la proliferación celular (Steiner et al., 2006). MVP inhibe a fosfatasa homóloga de tensina (PTEN) que a su vez están relacionadas con el aumento de PI3K/Akt. Este dímero inhibe la apoptosis inhibiendo a su vez a la proteína pro-apoptótica BAD (Rodemann et al., 2007). MVP también está relacionado con src, que se encuentra en la vía de señalización del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Silva et al., 2007). Esta proteína aumenta la proliferación celular a través de la vía de señalización dependiente de Erk/MAPK (Rodemann et al., 2007), y previene la apoptosis mediando la inhibición del eje COP-1/p53 (Lloret et al., 2008). Se ha observado además que los niveles de expresión de MVP están relacionados con los de IGF-1R en pacientes con cáncer cervical (Lloret et al., 2008), lo que lleva a la célula a aumentar su proliferación y a inhibir su apoptosis. El papel que MVP parece tener en los fenómenos de carcinogénesis, puede estar mediado por su relación con la proteína-asociada a telomerasa (TEP-1) (Miwa y Masutani, 2007), así como con la relación existente con los procesos de remodelación de la cromatina (Emre et al., 2004). PARP-1, una proteína *vault*, inhibe a Ku70/80, promoviendo la reparación homóloga sobre la no homóloga (NHEJ) (Hochegger et al., 2006). Aunque la trascendencia y relevancia de MVP en particular, y de las proteínas *vault* en general, sobre otros mecanismos celulares diferentes a la resistencia a drogas debe ser demostrada, parece evidente que esta proteína se encuentra en medio de procesos relevantes para la célula, tales como la proliferación y la apoptosis, que por otra parte son mecanismos claves en los fenómenos de carcinogénesis.

El receptor de estrógeno es la proteína reponsable de la acción biológica del estradiol. La unión a secuencias específicas presentes en la región reguladora

de genes, conocida como elemento de respuesta hormonal, constituye un evento obligatorio en el mecanismo hormonal de la acción (Beato, 1989). La ocupación del sitio de unión de la hormona modula la accesibilidad del dominio de unión al ADN de los receptores con el ADN, y el inicio de la transcripción (Tora et al., 1989; Beato et al., 1995). En el estudio de Abbondanza et al., se ponía de manifiesto que el receptor de estrógeno podría interactuar con MVP y, por lo tanto, representar otra forma de control para la acción regulatoria hormonal a través de MVP (Abbondanza et al., 1998).

Estudios anteriores han evidenciado que la mayoría de las partículas vaults parecen estar en el citoplasma, aunque una pequeña cantidad (0,5%) se asocia con la envoltura nuclear en cortes de tejido (Kedersha y Roma, 1986; Kedersha et al., 1990), y con complejos de poro nuclear (NPCs) (Chugani et al., 1993). La simetría y la geometría de las partículas vaults ha llevado a pensar que ellas pueden ser el conector central/transportista de los NPCs (Kedersha et al., 1991), y, como tal, podrían desempeñar un papel en el transporte nucleocitoplásmico (Chugani et al., 1993).

En el trabajo de Hamill et al, donde se buscaba establecer una función más clara para las partículas vaults y otras partículas de ribonucleoproteínas del transporte nucleocitoplásmico, se concluyó que vaults podrían jugar un papel en el ensamblaje de los ribosomas y/o en el transporte de los ribosomas del núcleo. Vaultes y los ribosomas pueden interactuar a través de unos débiles puentes intermedios con mARN. Si esa interacción de vaults con el ribosoma está mediada por mARN o proteínas asociadas con el mARN, la pérdida de mARN podría destruir el ribosoma y la interacción con vaults. En ese mismo trabajo, se demostró por inmunotinción la presencia de vaults en la superficie nuclear, además de una fuerte reactividad en el nucleolo (el sitio de unión en la subunidad ribosomal). Una posibilidad a partir de estos resultados podría ser que vaults estarían involucradas en el montaje y/o transporte de las subunidades ribosomales nucleocitoplásmicas (Hamill et al., 1997).

Objetivos

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

1. Investigar el papel de MVP en el control de la reparación de daño radio-inducido, la apoptosis y la proliferación, buscando posibles causas de la inestabilidad génica, la progresión tumoral y la resistencia a los tratamientos en pacientes con carcinoma cervical.
2. Investigar el papel de MVP y genes de reparación del daño radio-inducido en relación con la hipoxia tumoral y la angiogénesis neoplásica.
3. Estudiar el papel predictivo de MVP e IGF-1R en la respuesta clínica a la radio-quimioterapia en pacientes afectos de cáncer localizado de cervix uterino.

MAIN GOALS

1. To explore the role of MVP in the control of the DNA repair mechanisms due to radio-induced cell damage, apoptosis and cell proliferation.
2. To investigate the role of MVP and gene repair of radio-induced cell damage in relation to tumoral hypoxia and angiogenesis.
3. To know the predictive role of MVP and IGF-1R in the clinical response to radio-chemotherapy in localized cervical cancer patients.

CAPÍTULO III

PAPEL DE MVP SOBRE LA REPARACIÓN NO HOMÓLOGA Y LA APOPTOSIS A TRAVÉS DE LA REGULACIÓN NEGATIVA DE Ku70/80 y BAX EN CARCINOMAS CERVICALES

CAPÍTULO III

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue el de investigar el papel de la expresión de MVP, la reparación no homóloga (NHEJ) mediada por Ku70/80, y los genes relacionados en la regulación de la apoptosis y la proliferación, en relación con las alteraciones en la estabilidad genética, la progresión tumoral, y la resistencia a los tratamientos oncológicos en pacientes con carcinoma cervical. Para ello, se incluyeron en el estudio ciento dieciséis pacientes consecutivos con carcinoma de cuello uterino localizado, entre julio de 1997 y diciembre de 2003. Los pacientes se clasificaron de acuerdo a la nomenclatura TNM. Cuarenta pacientes tenían enfermedad en estadio I, 45 en estadio II, y 31 en estadio III / IVA. La mayoría de los pacientes tenían tumores escamosos (98 casos), siendo los grados II (52 casos) y III (45 casos) los más abundantes en la muestra. Se estudió la expresión de MVP, Ku70/80, IGF-1R (Insulin-like Growth Factor-1 receptor), BAX (proteína BCL2 X-asociado), BCL-2 (B-cell CLL/lymphoma 2) p53, y Ki67 en el tejido tumoral incluido en parafina mediante inmunohistoquímica.

Según esto, los tumores que sobreexpresaban MVP (65 de 116 casos) presentaron niveles bajos de Ku70/80 ($p = 0.013$) así como niveles bajos de expresión de Bax ($p < 0.0001$). Además, la baja expresión de Ku70/80 estaba fuertemente relacionada con BAX suprimida ($p < 0.001$) y, en menor medida, con la expresión aumentada de Bcl-2 ($p = 0.042$), p53 alterada ($p = 0.038$), y con el aumento de la proliferación ($p = 0.002$).

Con lo expuesto, es posible sugerir la existencia de un mecanismo de regulación temprana que favorece la reparación homóloga o no homóloga (NHEJ) en un primer momento, mediados por MVP junto a otros factores aún por elucidar. Si MVP está sobreexpresada, la reparación no homóloga (NHEJ) puede ser suprimida por medio de varios mecanismos, dando como resultado inestabilidad genómica. Estos mecanismos pueden estar asociados con la decisión de las células dañadas de sobrevivir y proliferar, lo que favorece la progresión tumoral y reduce la respuesta del tumor al tratamiento oncológico a través del desarrollo de fenotipos resistentes. No obstante, se hacen necesarios estudios clínicos adicionales para comprobar esta hipótesis.

Summary

MAJOR VAULT PROTEIN MAY AFFECT NONHOMOLOGOUS END-JOINING REPAIR AND APOPTOSIS THROUGH KU70/80 AND BAX DOWNREGULATION IN CERVICAL CARCINOMA TUMORS

Purpose: We investigated the relationship between major vault protein (MVP) expression, the nonhomologous end-joining (NHEJ) repair gene Ku70/80, and related genes involved in the regulation of apoptosis and proliferation to shed light on the possible causes of genetic instability, tumor progression, and resistance to oncologic treatment in patients with clinical cervical cancer.

Methods and Materials: One hundred sixteen consecutive patients with localized cervix carcinoma were prospectively included in this study from July 1997 to Dec 2003. Patients were staged according to the tumor, node, metastasis (TNM) classification. Forty patients had Stage I disease, 45 had Stage II, and 31 had Stage III/IVA. Most patients had squamous tumors (98 cases) and Grades II (52 cases) and III (45 cases) carcinomas. Expression of MVP, Ku70/80, Insulin-Like Growth Factor-1 receptor (IGF-1R), BCL2-associated X protein (BAX), B-cell CLL/lymphoma 2 (BCL-2), p53, and Ki67 was studied by using immunohistochemistry in paraffin-embedded tumor tissue.

Results: Tumors overexpressing MVP (65 of 116 cases) showed low levels of Ku70/80 ($p = 0.013$) and BAX expression ($p < 0.0001$). Furthermore, low Ku70/80 expression was strongly related to suppressed BAX ($p < 0.001$) and, to a lesser extent, upregulated BCL-2 ($p = 0.042$), altered p53 ($p = 0.038$), and increased proliferation ($p = 0.002$).

Conclusion: We hypothesize that an early regulatory mechanism favors homologous or NHEJ repair at first, mediated by vaults along with other factors yet to be elucidated. If vaults are overexpressed, NHEJ repair may be suppressed by means of several mechanisms, with resultant genomic instability. These mechanisms may be associated with the decision of damaged cells to survive and proliferate, favoring tumor progression and reducing tumor response to oncologic treatment through the development of resistant cell phenotypes. Additional clinical studies are necessary to test this hypothesis.

INTRODUCCIÓN

Las partículas *vaults* son ribonucleoproteínas con una estructura en forma de barril que está compuesta por tres proteínas: major vault protein (MVP), vault poly(ADP-ribosa) polimerasa, proteína-1 asociada a telomerasa (TEP1) y pequeñas estructuras de ARN no traducible. La sobre-expresión de MVP parece estar asociada con la resistencia a la quimioterapia (Steiner et al., 2006). Además, también se ha observado una peor respuesta al tratamiento radioterápico en pacientes con niveles altos de MVP (Silva et al., 2007).

La expresión de MVP parece estar asociada con el desarrollo y progresión del tumor, probablemente inhibiendo la apoptosis y favoreciendo la proliferación celular a través de distintas rutas (Steiner et al., 2006):

- MVP inhibiría los homólogos de tensina y fosfatasa (PTEN) incrementando los niveles de fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K) mediante la inhibición de la apoptosis facilitada por Akt, a través de la inhibición de BCL-2 unido a su agonista de muerte celular, la proteína (BAD) (Rodemann et al., 2007). Ese proceso también está relacionado con src, cuando es el factor de crecimiento epidérmico (EGF) quien señala la ruta.
- MVP incrementa la proliferación a través de la ruta de mitógeno activado por proteína quinasa (MAPK) mediada por Erk.
- MVP impediría la apoptosis inhibiendo a COP-1 (constitutivo fotomorfogénico-1) a través de p53 (Lloret et al., 2008).

Por otra parte, altos niveles de expresión del receptor para el factor-1 de crecimiento insulínico (IGF-1R) en tumores conduciría a un incremento de la proliferación así como a una reducción de la apoptosis a través de las rutas PI3K y MAPK (Lloret et al., 2008; Rodemann et al., 2007).

MVP se expresa inmediatamente tras el daño al ADN inducido por radiación (Bottke et al., 2008). Las proteínas *vaults* parecen estar involucradas en los procesos de carcinogénesis (Miwa et al., 2007; Emre et al., 2004), probablemente a través de sus funciones en la remodelación de la cromatina (Emre et al., 2004).

Ante un daño a la molécula de ADN, la poli (ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1) conduce a la célula a una reparación homologa, evitando la reparación no homologa

(NHEJ) mediante la supresión de Ku70/80 (Hochegger et al, 2006). Ku70/80 es clave en la ruta de reparación no homologa que se activa cuando se producen roturas doble de la cadena de ADN (DSBs) inducidas por radiación. Ku70/80 parece tener un importante papel como regulador de la apoptosis a través de las interacciones de BCL-2 asociado a proteína X (BAX) (Chang et al., 2008; Wang et al., 2008).

En este estudio se investigó la relación existente entre la expresión de MVP, NHEJ, Ku70/80 y genes relacionados en la regulación de la apoptosis y la proliferación, buscando posibles causas de la inestabilidad génica, la progresión tumoral y la resistencia a los tratamientos en pacientes con carcinoma cervical.

MATERIALES Y MÉTODOS

PACIENTES. En este estudio participaron ciento dieciséis mujeres diagnosticadas con carcinoma cervical localizado y tratadas en nuestro Servicio desde julio de 1997 a diciembre de 2003. Todas las pacientes incluidas en este trabajo dieron su libre consentimiento para la participación de este estudio, que fue previamente aprobado por el Comité Ético de Investigación de nuestra Institución.

La edad media de las pacientes incluidas en este estudio fue de 52.80 ± 14.05 años (mediana de 51 años en un rango de 27-89 años). El *estadiaje* clínico se realizó mediante especuloscopia, examen bimanual, cistoscopia o rectoscopia. Todas las pacientes fueron exploradas mediante tomografía axial computarizada abdomino-pélvica y radiografía de tórax. Las pacientes fueron clasificadas en base al sistema de clasificación TNM (Cervix uteri, 2002). De acuerdo con los criterios citados, cuarenta pacientes presentaban estadio I, cuarenta y cinco tenían estadio II y treinta y una pacientes se encontraban en estadio III/IVA. La mayoría de las pacientes tenían tumores de tipo escamoso (98 casos) así como carcinomas de grados II-III (97 casos). La media de volumen tumoral fue de 4.23 ± 1.67 cm (Tabla 1).

Tabla 1: Características de los pacientes

Característica	Pacientes (%)
Edad (años)	
≤52	60 (51.7)
>52	56 (48.3)
Estadio	
I	40 (35)
II	45 (43)
III-IVA	31 (22)
Histología	
<i>Escamoso</i>	98 (89)
<i>Adenocarcinoma</i>	18 (11)
Grado Histológico	
I	19 (6.5)
II	52 (44.8)
III	45 (38.7)

INMUNOHISTOQUIMICA. Las oncoproteínas tumorales seleccionadas fueron estudiadas mediante técnica de inmunohistoquímica (Lloret et al., 2008). Se tomaron secciones de tejido tumoral de unos 4-mm aproximadamente, incluidos en parafina, que fueron incubados durante 1 hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda en presencia del anticuerpo primario (Tabla 2).

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en este estudio

Proteína	Clon	Casa comercial
MVP	Ab-2 Clone 1032	Neomarkers, Fremont, CA
IGF-1R	Ab1 Clone 24-31	Neomarkers, Fremont, CA
Ku70/80	Clone 162	Neomarkers, Fremont, CA
BAX	Policlonales	Dako, Carpintería, CA
BCL-2	Clone 124	Dako, Carpintería, CA
P53	Clone DO-7	Novocastra Laboratories Ltd., U.K.
Ki67	Clon Mib-1	Master Diagnóstica, Granada, ES

Tras esta primera incubación, se procedió a la incubación del tejido en presencia de un anticuerpo secundario biotinado (Dako kit de detección, LSBA) durante 30 minutos. Tras esto, el complejo peroxidasa-estreptavidina-biotina fue usado después.

La expresión de los marcadores celulares fue valorada por observadores que desconocían las características clínicas de las pacientes, en las zonas de máxima expresión del marcador en al menos 10 campos de alta potencia (Objetivas de 400X). La expresión de MVP, BAX, BCL-2 e IGF-1R se valoró de forma semi-cuantitativa. Así, la tinción BAX y BCL-2 se clasificó como negativo o positivo, mientras que la de MVP e IGF-1R se clasificó como bajo (negativo o ligeramente positivo) o alto (fuertemente positivo) (Lloret et al. 2008). La tinción para Ki67, Ku70/80, y p53 se observó en el núcleo y se valoraron como porcentaje de células teñidas, contabilizándose hasta 1.000 células para cada paciente.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS. Las correlaciones entre las variables clínicas e histopatológicas fueron analizadas utilizando el test de chi-cuadrado para el caso de variables categóricas. El t test y el análisis de varianza fueron usados en el caso de variables continuas que mostraban una distribución normal. Los tests de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis fueron utilizados cuando las variables continuas presentaban una distribución no normal. Las correlaciones entre las variables que se distribuyeron de forma normal fueron determinadas mediante el coeficiente de Pearson, mientras que las correlaciones entre las variables distribuidas de manera no normal se determinaron mediante el test de Spearman. Los análisis se realizaron en el programa estadístico SPSS, versión 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL)

RESULTADOS

Se procedió a la determinación de todos los marcadores inmunohistoquímicos en los 116 casos estudiados. Se observó un aumento de la proliferación celular, evaluada por la expresión de la proteína Ki67: media, 58.27% \pm 25.68%; mediana, 65%, rango, 0-98%. Por otro lado, observamos que la expresión de p53 alterada fue de media 40.53% \pm 26.53%; mediana, 37.75%; rango, 0-98%. Parece existir una fuerte y clara correlación entre el aumento de la proliferación tumoral y la expresión de p53 alterada (coeficiente regresión de Spearman = 0.505; $p < 0.0001$), de tal manera que a mayores niveles de expresión de Ki67 más cantidad de p53 alterado (Figura 1a).

La mayoría de las muestras presentaron una tinción positiva para BAX (82 de 116 casos, 70.6%) y una tinción negativa para BCL2 (61 de 116 casos, 52.6%). Se observó una correlación inversa entre la expresión de BAX y de BCL-2 ($p = 0.005$, Tabla 1).

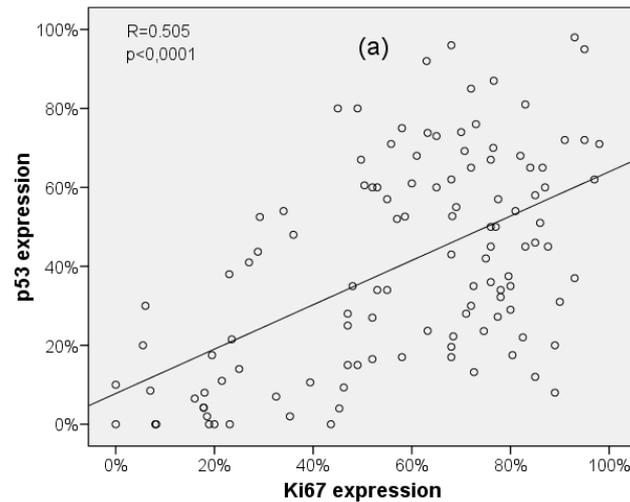


Figura 1a. Correlación entre los niveles de expresión de Ki67 y p53 (expresado en porcentaje). Se observa una correlación positiva con una R de Spearman de 0.505 y una $p < 0.0001$.

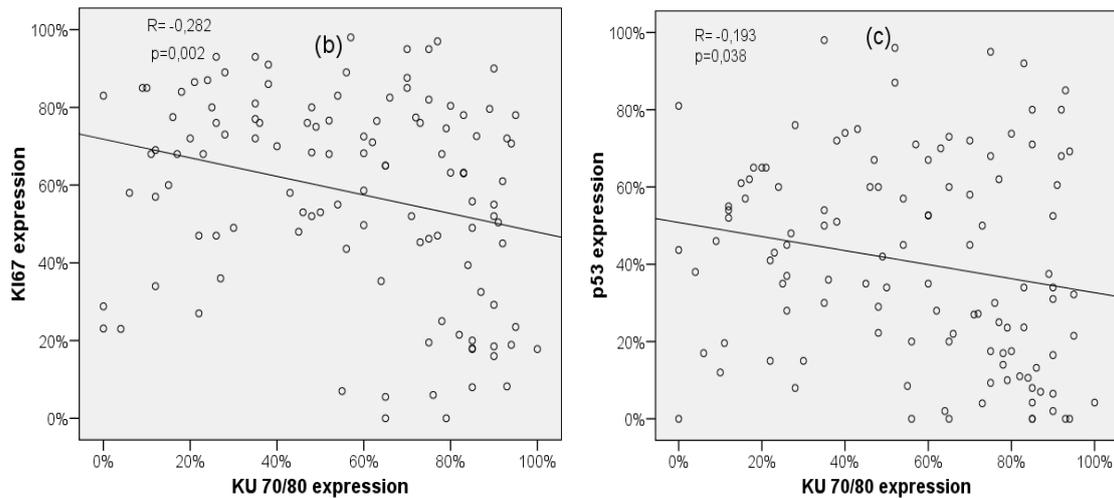
Tumores con BAX negativo mostraron mayores niveles de proliferación celular medido como porcentaje de Ki67 (69.92% vs. 53.44%, $p = 0.001$); y mayores niveles de expresión de p53 alterada (51.14% vs. 36.12%, $p = 0.005$), que en tumores que expresaban BAX (positivo). En el mismo análisis, los tumores que expresaban positivamente BCL-2 también mostraron mayores niveles de expresión de p53 alterada (47.45 vs. 34.28%, $p = 0.007$) y de proliferación (66.15% vs. 51.17%, $p = 0.003$), que los tumores BCL-2-negativo (Tabla 1).

Por su parte, los niveles de expresión de Ku70/80 fueron de media $56.60\% \pm 28.23\%$; mediana 61% y rango 0-100%. Los niveles de expresión de Ku70/80 estaban inversamente relacionados con la proliferación celular (coeficiente regresión de Spearman, -0.282 ; $p = 0.002$; figura. 1b), y con la expresión alterada de p53 (coeficiente regresión de Pearson, -0.193 ; $p = 0.038$; (figura. 1c). Además, la baja expresión de Ku70/80 estaba fuertemente relacionada con BAX negativo ($p < 0.001$) y, en menor medida, con BCL-2 positiva ($p = 0.042$, Tabla 1).

Tabla 1. Expresión de oncoproteínas en tumores cervicales

		KI67 (%)	P53 (%)	KU70/80 (%)	BAX		BCL2	
					Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
MVP	Bajo (51)	48.95±25.95	36.89±28.14	63.92±26.94	3	31	31	20
	Alto (65)	65.59±23.14	43.38± 25.05	50.86± 28.09	48	34	30	35
		P<0.0001	p = 0.193	p = 0.013	p < 0.0001		p = 0.117	
IGF-IR	Bajo (51)	54.20±26.24	42.36±28.02	61.58±27.73	9	25	34	17
	Alto (65)	61.47±24.97	39.09±25.44	52.69±28.22	42	40	27	38
		p = 0.097	p = 0.512	p = 0.092	p = 0.015		p = 0.007	
BAX	Negativo (34)	69.92±23.08	51.14±23.52	40.44±25.88	—	—	11	23
	Positivo (82)	53.44±25.27	36.12±26.59	63.30±26.53	—	—	50	32
		p = 0.001	p = 0.005	p < 0.0001			p = 0.005	
BCL-2	Negativo (61)	51.17±27.53	34.28±26.79	61.65±28.61	11	23	—	—
	Positivo (55)	66.15±21.03	47.45±24.68	51.00±26.97	50	32	—	—
		p = 0.003	p = 0.007	p = 0.042	p = 0.005			

Abreviaciones: MVP: major vault protein; IGF-1R = Insulin-Like Growth Factor-1 receptor; BAX = BCL2-associated X protein; BCL-2=B-cell CLL/lymphoma 2. Values expressed as mean ±SD.



Figuras 1b y 1c. Correlación entre los niveles de expresión de Ku70/80 con Ki67 (a) y p53 (b) (expresado en porcentaje). Se observa una correlación negativa con una R de Spearman de -0.282, p = 0.002 y de -0.193, p = 0.038 respectivamente.

En lo referente a MVP, los tumores que sobreexpresan MVP (65 de 116, 56.0%) presentaban una mayor tasa de proliferación (65.59% vs. 48.95%, p <0.0001), pero sin relación alguna con la expresión de p53 (p > 0.05). La expresión de Bax (48 vs. 3, p <0.0001) y Ku70/80 (50.86% vs. 63.92%, p = 0.013) fue suprimida en estos tumores con sobreexpresión de MVP (Tabla 1).

IGF-1R aparecía sobreexpresado en 65 de los 116 casos (56.0%). Aquellos pacientes que sobreexpresan IGF-1R sobreexpresaban también BCL-2 (38 vs. 27, $p = 0.007$). De manera contraria, observamos una relación inversa con la supresión de BAX (42 vs. 9, $p = 0.015$) [Tabla 1](#). Además, observamos una relación positiva entre la expresión de MVP e IGF-1R, de tal manera que los pacientes que sobreexpresaban una proteína presentaban igualmente sobreexpresión de la otra ($p < 0.0001$, dato no mostrado).

La edad, características histológicas, grado, volumen tumoral y estadio clínico fueran factores independientes de la expresión de las oncoproteínas. Curiosamente, 15 de los 18 tumores de adenocarcinoma, mostraron altos niveles de MVP en comparación con 50 de 98 tumores escamosos ($p = 0.011$). La expresión de p53 alterada fue ligera y directamente relacionada con la edad ($p = 0.042$). La expresión de Ku70/80 se mostró inversamente relacionada con el grado histológico ($p = 0.020$).

En el análisis de regresión logística binaria, la expresión de BAX fue el factor independiente más relevante relacionado con MVP ($p = 0.005$; riesgo relativo, 10.330; intervalo de confianza (IC95%) 2.06 a 51.74), seguida por la proliferación tumoral ($p = 0.007$; riesgo relativo, 1.037; IC95% 1.010 – 1.065) y los tumores de tipo adenocarcinoma ($p = 0.008$; riesgo relativo, 15.097; IC95% 2.02 – 112.71) ([Tabla 2](#)).

Tabla 2. Relacion de BAX con MVP, Proliferación tumoral y adenocarcinoma

	P	Riesgo Relativo	IC95%
BAX vs.MVP (-)	0.005	10.330	2.06 - 51.74
BAX vs.Proliferación Tumoral (-)	0.007	1.037	1.010 - 1.065
BAX vs. Adenocarcinoma (-)	0.008	15.097	2.02 - 112.71
(-) Relación inversa.			

DISCUSIÓN

En este estudio se mostró que MVP puede tener un papel favoreciendo el aumento de la inestabilidad genética mediante la reducción de la reparación del ADN dañado por medio de NHEJ y disminuyendo la expresión Ku70/80. La progresión y la resistencia a la quimioterapia y la radioterapia también pueden ser activadas mediante la supresión de BAX y/o la inducción de IGF-1R, resultando en una mayor proliferación celular y reducción de la apoptosis causada por una regulación positiva de BCL-2 y la sobreexpresión de p53 alterada.

La resistencia a la radioterapia en el ámbito clínico como resultado de MVP (Silva et al., 2007) puede tener otras causas además de la proliferación y la inhibición de la apoptosis. Un tercer mecanismo propuesto es que MVP también puede regular la reparación de DSB mediante la supresión de la reparación mediada por NHEJ. Aunque tanto la reparación homóloga cuanto la reparación NHEJ estén relacionadas con la reparación del DSB, este último es más frecuente cuando el daño al ADN es inducido por la radiación. Las proteínas *Vaults* pueden estar implicadas en la modificación de reparación NHEJ a través de varios posibles mecanismos:

1. Competición de la proteína poli (ADP-ribosilación) con Ku para la reparación DSB, previniendo la reparación dirigida NHEJ/Ku.
2. La activación de las rutas PI3K/Akt y Erk/MAPK podrían aumentar la radio-resistencia a través de la regulación de los genes de reparación por NHEJ. Se ha observado que Akt interactúa con la ADN-proteína-quinasa C (PKC) (Toulany et al., 2008); y que p38 MAPK también interactúa con Ku (Cosaceanu et al., 2007) en la reparación NHEJ.
3. Los procesos de remodelación de la cromatina pueden estar también implicados, ya que se ha visto que MVP está positivamente regulado en células tratadas con inhibidores de la histona deacetilasa (Steiner et al., 2006), que, por el contrario, inhiben la reparación del ADN mediada por Ku (Chen et al., 2007).

MVP parece regular negativamente el gen proapoptótico BAX por sí mismo y a través de su relación con Ku70/80. Curiosamente, se ha visto que Ku es un regulador central de la apoptosis mediante la interacción con BAX (Chang et al., 2008) y BCL-2

que, a su vez, se ha demostrado que tiene capacidad para suprimir a Ku70/80 y, de esta manera, inhibir la reparación NHEJ (Wang et al., 2008). Por lo tanto, la decisión de la célula para repararse o someterse a la apoptosis parece tener lugar en los momentos iniciales tras el daño al ADN. La inestabilidad genética como consecuencia de la supresión de Ku, llevando a una reparación defectuosa al ADN dañado por DSBs, (Teoh et al., 2008) es seguido por la progresión del tumor a través de la reducción de la apoptosis de las células alteradas y una mayor proliferación.

La expresión de IGF-1R está fuertemente relacionada con MVP. Se ha observado que los altos niveles de IGF-1R se asocian a un peor pronóstico en pacientes con carcinoma de cervix tratados con quimioterapia (Lloret et al., 2008). El IGF-1R coopera con el MVP en la prevención de la apoptosis, mediando una regulación positiva de BCL-2 y, en menor medida, disminuyendo BAX. Sin embargo, también puede afectar a la reparación NHEJ través de las vías AKT/p38MAPK, principalmente mediante la modificación de la expresión de Ku (Cosaceanu et al., 2007).

En conclusión y a la vista de los resultados obtenidos, se puede suponer que exista un mecanismo temprano de regulación que favorece la reparación homóloga o reparación NHEJ en un primer momento, mediados por *vaults* y por otros factores aún por elucidar. Si las proteínas *vaults* están sobreexpresadas, la reparación NHEJ puede ser suprimida por varios mecanismos, por lo que la inestabilidad genómica pueda surgir, ya sea porque la reparación de daños DSB mediante la reparación homóloga es impedida, o bien porque la reparación NHEJ es defectuosa. Estos eventos están asociados con la decisión de las células dañadas de sobrevivir y proliferar, lo que favorece la progresión del tumor y la reducción de la respuesta al tratamiento oncológico debido al desarrollo de fenotipos resistentes.

CAPÍTULO IV

**LA QUIMIO/RADIO RESISTENCIA
INDUCIDA POR LA HIPOXIA TUMORAL
ESTÁ MEDIADA POR LA
SOBREEXPRESIÓN DE MVP Y LA
INHIBICIÓN DE Ku70/80 EN
CARCINOMAS CERVICALES**

CAPÍTULO IV

Resumen

La hipoxia puede inhibir la reparación no homóloga del ADN a través de la disminución de la expresión de Ku70/80 que, combinado con un aumento de la angiogénesis y la expresión de p53 alterada, resultaría en un aumento de la progresión tumoral en los carcinomas cervicales.

La molécula de oxígeno modula la respuesta del tumor a la radioterapia. Para inducir la muerte celular en condiciones de hipoxia son necesarias dosis más altas de radiación. La hipoxia puede inhibir la reparación no homóloga del ADN a través de la baja expresión de Ku70/80. En los tumores clínicos, la hipoxia induce resistencia a los fármacos a través de mecanismos que no están claramente elucidados. Las *Vaults* son partículas de ribonucleoproteínas con una estructura semejante a un barril sin tapas y compuesto por tres proteínas: MVP (*major vault protein*), poli (ADP-ribosa) polimerasa, proteína-1 asociada a la telomerasa y pequeños ARN no traducibles. La sobreexpresión de MVP se ha asociado con resistencia a la quimioterapia. Además, se ha relacionado con un peor pronóstico en pacientes tratados únicamente con radioterapia. El objetivo del presente estudio fue evaluar la posible relación existente entre la expresión de MVP y la hipoxia tumoral en los tumores cervicales. Se procedió a la determinación de la expresión de MVP, p53, angiogénesis y oxigenación tumoral en cuarenta y tres pacientes consecutivos con diagnóstico de carcinoma localizado del cuello uterino. Se observó una relación entre la alta expresión MVP y la hipoxia severa, en comparación con aquellos tumores que expresaron bajos niveles de MVP ($p = 0.022$). Los tumores que sobreexpresaban MVP también mostraron un aumento significativo de la angiogénesis ($p = 0.003$). Además, el estudio demostró por primera vez que la hipoxia tumoral severa se asociaba con una alta expresión de MVP en los tumores cervicales. Debido a que la quimioterapia es actualmente un tratamiento estándar para este tipo de pacientes, la regulación de MVP por la hipoxia es de fundamental importancia. A la vista de los presentes resultados se podría sugerir que la hipoxia aislada no induce el aumento de la inestabilidad genética, las propiedades oncogénicas y de metástasis, sino que lo hace a través de la asociación observada con la expresión de MVP, lo que podría desarrollar una nueva vía de resistencia a los tratamientos quimio y radioterápicos.

Summary

RADIO-QUIMIO RESISTANCE INDUCED BY TUMORAL HYPOXIA IS REGULATED FOR MVP OVER-EXPRESSION AND Ku70/80 INHIBITION IN CERVICAL CANCER PATIENTS

Hypoxia may inhibit the NHEJ DNA repair through downregulating Ku70/80 expression and combined with an increased angiogenesis and altered p53 expression would be responsible for tumor progression in cervical carcinoma.

Oxygen molecule modulates tumour response to radiotherapy. Higher radiation doses are required under hypoxic conditions to induce cell death. Hypoxia may inhibit the non-homologous end-joining DNA repair through down regulating Ku70/80 expression. Hypoxia induces drug resistance in clinical tumours, although the mechanism is not clearly elucidated. Vaults are ribonucleoprotein particles with a hollow barrel-like structure composed of three proteins: major vault protein (MVP), vault poly(ADP-ribose) polymerase, and telomerase associated protein-1 and small untranslated RNA. Over-expression of MVP has been associated with chemotherapy resistance. Also, it has been related to poor outcome in patients treated with radiotherapy alone. The aim of the present study was to assess the relation of Major Vault Protein expression and tumor hypoxia in clinical cervical tumors. MVP, p53 and angiogenesis, together with tumor oxygenation, were determined in forty-three consecutive patients suffering from localized cervix carcinoma. High MVP expression was related to severe hypoxia compared to low MVP expressing tumors ($p = 0.022$). Tumors over-expressing MVP also showed increased angiogenesis ($p = 0.003$). Besides it, in this study we show for the first time that severe tumor hypoxia is associated with high MVP expression in clinical cervical tumors. Up-regulation of MVP by hypoxia is of critical relevance as chemotherapy is currently a standard treatment for those patients.

From our results it could be suggested that hypoxia not only induces increased genetic instability, oncogenic properties and metastatization, but through the correlation observed with MVP expression, another pathway of chemo and radiation resistance could be developed.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad multifactorial, extremadamente compleja en su origen y progresión. Los procesos carcinogénicos vienen marcados por factores genéticos, epigenéticos y ambientales. Durante el proceso carcinogénico las células tumorales adquieren un incremento en el número de alteraciones genéticas. Tales cambios genéticos incluyen translocaciones cromosómicas, expresión amplificada de genes, mutaciones intra-génicas y silenciamiento genético. Independientemente de los factores que influyan, su intensidad y la combinación entre ellos, en última instancia lo que se necesita es un incremento en el número de alteraciones genéticas que afecten específicamente a diferentes oncogenes. Todos estos cambios génicos pueden resultar en la activación de oncogenes o bien en la inactivación de genes supresores tumorales (Huang et al., 2007). Aunque los factores genéticos son los que tradicionalmente han tenido mayor relevancia, cada vez se le da más importancia a la influencia que el medio externo (factores exógenos o medioambientales) tenga sobre la integridad de la información genética y la estabilidad génica en general. Así, la exposición de la célula a, por ejemplo, hipoxia, puede generar determinados cambios genéticos permanentes que a su vez pueden derivar en el desarrollo de alteraciones genéticas subsecuentes, incremento del potencial de progresión de las células tumorales, e incluso, resistencia a los tratamientos oncológicos (Huang et al., 2007).

La hipoxia parece estar relacionada con el incremento espontáneo de daños al ADN, con la inhibición de los procesos de reparación, el deterioro de la manutención celular y la pérdida de la integridad del ADN. Además, parece acelerar la progresión tumoral mediante la alteración de la expresión de p53 y el incremento de la angiogénesis (Lara et al., 2008; Wood, 1996). La desregulación de las rutas de reparación del ADN puede contribuir a incrementar la inestabilidad genética inducida por la hipoxia tumoral (Bindra et al., 2007). Las células presentan eficientes mecanismos de reparación de daño al ADN. Cada día, las diferentes células del organismo son dañadas en su material genético. La capacidad de reparación de estas lesiones es alta, y generalmente las células continúan viviendo sin mayores consecuencias. Es más, en caso de imposibilidad para reparar una lesión, las células disponen de otras vías para evitar que células con su material genético dañado se dupliquen (por ejemplo, apoptosis). Estos mecanismos para reparar el daño del ADN se ponen en marcha antes de que se produzcan mutaciones (Wood, 1996). La inestabilidad genética tumoral inducida por la hipoxia provoca una importante desregulación de los sistemas de reparación del ADN. La expresión de genes que participan en los procesos de reparación homóloga (BRCA1 y RAD51), así como

genes relacionados con la reparación del ADN (MLH1 y MSH2), aparece inhibida como respuesta celular a la hipoxia (Bindra et al., 2007). Esta respuesta es extensible para los genes asociados a la reparación no homóloga (NHEJ), que también sufren un proceso de inhibición de su expresión ante condiciones hipóxicas (Meng et al., 2005). No obstante, esta relación entre NHEJ e hipoxia no ha sido observada en otros trabajos publicados (Sprong et al., 2006). Ku 70/80 constituye un complejo clave en la vía de la reparación no homóloga que se pone en marcha cuando se producen, por ejemplo, roturas dobles de cadena durante la emisión de radiación ionizante. Los niveles de expresión de Ku se han relacionado con la supervivencia en pacientes tratados con radioterapia, aunque los resultados son bastante controvertidos (Beskow et al., 2006; Wilson et al., 2000). Se ha observado que aquellos pacientes con carcinoma cervical y sobre-expresión de MVP, muestran además bajos niveles de Ku70/80 y BAX (Lloret et al., 2009). La alta expresión de MVP parece estar asociada con la supresión de la reparación no homóloga y la subsecuente inestabilidad genómica (Lloret et al., 2009). La combinación de estos mecanismos podrían ser los responsables de la progresión tumoral en los carcinomas cervicales. No obstante, la alta expresión de MVP también ha sido asociada con la reducción, a largo plazo, del control local en pacientes que presentaban respuesta clínica completa a los tratamientos radio-quimioterápicos (Lloret et al., 2008).

En la actualidad se usan distintas técnicas para medir los niveles de hipoxia en tumores a nivel clínico. Uno de los métodos más extendido es el método polarográfico eppendorf (Lara et al., 2008; Tatum et al., 2006). En pacientes con carcinoma cervical, la hipoxia está a menudo asociada a una baja respuesta al tratamiento así como a una baja supervivencia (Hockel et al., 1996; Fyles et al., 1998). Los tumores hipóxicos poseen una mayor probabilidad de recidiva e incluso muerte (Fyles et al., 1998), y a menudo muestran resistencia a los tratamientos quimioterápicos (Sasabe et al., 2007). La quimio-resistencia podría ser explicada por los altos niveles de MVP. MVP se ve inducido a través del factor inductor de hipoxia-1 (HIF-1), tal y como se ha demostrado previamente en estudios *in vitro* (Lelong-Rebel et al., 2008).

La progresión tumoral inducida por la hipoxia (Hockel et al., 1996) también está relacionada con la expresión alterada de p53 (Koumenis et al., 2001) y el aumento de la angiogénesis (Choi et al., 2003). El conjunto de estas modificaciones en el genoma celular pueden favorecer la aparición de propiedades oncogénicas y comportamiento metastático en las células afectadas. En pacientes con cáncer de cuello uterino, la hipoxia se asocia con la reducción de la respuesta al tratamiento y la disminución de las tasas de supervivencia (Fyles et al., 1998). En este sentido se ha observado que los

tumores cervicales hipóxicos, valorados mediante técnica de Eppendorf polarográfico, presentan incrementada la expresión de p53 (Haensgen et al., 2001) y de los niveles de angiogénesis (Lyng et al., 1997; West et al., 2001), aunque el número de estudios es escaso.

El principal objetivo del presente estudio, fue valorar la relación entre la expresión de MVP y la hipoxia en tumores cervicales, así como estudiar la relación de la expresión de la proteína Ku70/80 en la reparación no homologa (NHEJ) y la hipoxia tumoral en los carcinomas cervicales. La angiogénesis y la expresión de la proteína p53 también fueron analizadas en relación con la progresión tumoral inducida por hipoxia.

MATERIALES Y MÉTODOS

PACIENTES. El estudio contó con la participación de cuarenta y tres pacientes diagnosticadas con carcinoma localizado del cuello uterino, que fueron prospectivamente reclutadas entre julio de 1997 septiembre de 2001 (Lara et al., 2008). Las pacientes fueron diagnosticadas en los hospitales Universitario Materno-Infantil, Universitario Dr. Negrín y Universitario Insular de Las Palmas de Gran Canaria; y tratadas con radioterapia en nuestro Servicio. Las pacientes recibieron previamente el consentimiento informado por escrito, donde se detallaban todas las bases del estudio. El trabajo fue aprobado por el Comité Ético de Investigación de nuestra Institución.

La edad media de los pacientes fue de 49.48 ± 12.79 años (mediana 48, rango 29-81 años). El *estadiaje* clínico se realizó mediante especuloscopia, examen bimanual, cistoscopia o rectoscopia. Todas las pacientes fueron exploradas mediante tomografía axial computarizada abdomino-pélvica y radiografía de tórax. Las pacientes fueron clasificadas en base al sistema de clasificación TNM (Cervix uteri, 2002). De acuerdo con los criterios citados, 14 pacientes tenían enfermedad en estadio I, 22 pacientes presentaban estadio II y 7 estadio III-IVA. La mayoría de los pacientes presentaron tumores de tipo histológico escamosos (38 casos) en grado II (19 casos) y III (19 casos). Los detalles clínico-patológicos de los individuos en estudio se encuentran resumidos en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de los pacientes

Características	Pacientes (%) (n = 43)	Bajo MVP (n = 23)	Alto MVP (n = 20)	P
Edad	49.48 ± 12.79 (29–81)	49.47 ± 13.68 (29–81)	49.50 ± 12.04 (32–72)	0.325
Estadio				
I	14 (32.5)	5	9	
II	22 (51.2)	13	9	
III	7 (16.3)	5	2	0.228
Histología				
Epidermoide	38 (88.4)	23	15	
Adenocarcinoma	5 (11.6)	0	5	0.011
Grado				
I	5 (11.6)	3	2	
II	19 (44.2)	10	9	
III	19 (44.2)	10	9	0.952
P53	39.15 ± 27.62 (0–92)	37.53 ± 28.04 (0–92)	41.02 ± 27.74 (0–81)	0.685
Densidad Vascular Media (MVD)	49.62 ± 33.98 (0–160)	35.89 ± 22.55 (0–113)	65.41 ± 38.38 (12–160)	0.003
Fracción de Hipoxia	35.89 ± 26.80 (0–91.30)	27.26 ± 22.96 (0–66.30)	45.82 ± 28.00 (0–91.30)	0.022
pO2 medio	7.61 ± 8.98 (0–41.90)	7.84 ± 7.85 (0–24.30)	7.36 ± 10.34 (0–41.90)	0.863

La media ± de desviación estándar y el rango están incluidos, así como p53, la densidad vascular, fracción de hipóxica y la mediana de pO2.

INMUNOHISTOQUIMICA. Las muestras de tejido fijado en parafina de las biopsias de los tumores estaban disponibles para todas las pacientes del estudio y se utilizó para el análisis inmunohistoquímico el bloque de tumor más representativo. En una de las secciones se omitió el anticuerpo primario, para usar dicha sección como control negativo, en cada serie de cortes. Como control positivo, se utilizó una sección fuertemente positiva para la oncoproteína en cuestión (Figura 1). La expresión de MVP, Ku70/80, la angiogénesis tumoral (determinada por expresión de CD-31) y la expresión de p53, se evaluaron mediante inmunohistoquímica. Los datos de p53 y de angiogénesis

fueron obtenidos de nuestros archivos (Lara et al, 2008). Los bloques fueron manejados tal y como se describe a continuación, y se usó el anticuerpo secundario específico correspondiente para cada proteína (Tabla 2).

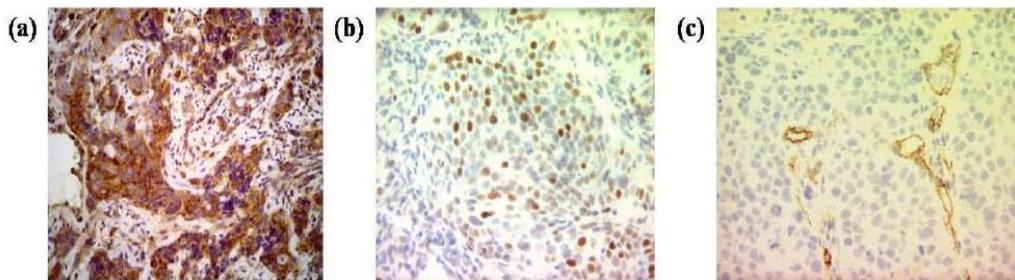


Figura 1. Microfotografías representativas de las determinaciones de MVP (a), p53 (b) y microvasos (c), por técnicas de inmunohistoquímica.

Los bloques se cortaron en secciones de 4 μ m que se montaron en portaobjetos, desparafinados, rehidratados y pre-tratados con tampón citrato a pH 6 en una olla a presión durante 3 min. Después de lavar, la actividad de la peroxidasa endógena fue bloqueada por el tratamiento con peróxido de hidrógeno 0,9% durante 10 min. A continuación, las secciones se lavaron y se incubaron para los anticuerpos secundarios específicos durante una hora. Seguidamente se usó un anticuerpo secundario biotinado (DAKO kit de detección, LSBA, Carpintería, CA) que fue incubado durante 30 min y después un complejo preparado con peroxidasa-estreptavidina biotinada (DAKO, LSBA, Carpintería, CA). Tal y como se ha descrito previamente, la tinción fue revelada con un sustrato tetrahydroclorhidro-diaminobencidina (DAKO, DAB cromógeno, Carpintería, CA) y rápidamente contrastados con hematoxilina de Harris. En una de las secciones se omitió el anticuerpo primario, para usar dicha sección como control negativo, en cada serie de cortes. Como control positivo, se utilizó una sección fuertemente positiva para la oncoproteína en cuestión. La tinción de Ku70/80 y p53 observado en el núcleo, se valoró en las zonas de máxima expresión del marcador en al menos 10 campos de gran aumento (400 X) y como porcentaje de células teñidas. Hasta 1000 células se contaron en cada paciente. La angiogénesis se estimó por tinción de CD-31 como densidad vascular media (MVD), según criterios estándar (Apolinario et al., 1997). Así, las áreas del tumor con intensa vascularización (o puntos calientes), se identificaron mediante microscopía de luz con una ampliación de baja potencia (100 X). Los microvasos individuales se contaron usando un aumento de alta potencia (400 X Área, 0,18 mm²). El valor fue representado por la suma del conteo de vasos de cuatro campos de estos 400 X (0,72 mm² de la superficie total).

La determinación de MVP fue revelada mediante el uso de sustrato diaminobencidina tetra-clorhidrato (DAB cromógeno, Dako), seguido por la luz de contratincción con hematoxilina de Harris, tal y como se ha descrito previamente (Lloret et al., 2009).

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en este estudio

Proteína	Clon	Casa comercial
MVP	Ab-2 Clon 1032	Neomarkers, Fremont, CA
CD-31	Clon JC/70A	Dako, Carpintería, CA
Ku70/80	Clon 162	Neomarkers, Fremont, CA
P53	Clon DO-7	Novocastra Laboratories Ltd., U.K.

DETERMINACIÓN DE HIPOXIA TUMORAL. La oxigenación tumoral fue medida por un dispositivo de Eppendorf, siguiendo criterios estándar, tal y como se ha descrito anteriormente (Clavo et al., 2003; Lara et al., 2008). Se utilizó un sistema de sonda polarográfica “pO₂ Histogram” (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). En cada serie de mediciones obtenidas por el tumor, se registraron 200 mediciones para los valores de pO₂ con un mínimo de 6 pistas de electrodos diferentes. Se obtuvieron de manera agrupada y para cada paciente: registros de los niveles de oxigenación tumoral, de la mediana de pO₂ y del porcentaje de los valores de pO₂ <10 y <5 mmHg. Los datos de hipoxia tumoral fueron re-analizados para detectar los casos de hipoxia severa y los porcentaje de los valores de pO₂ <2.5 mmHg (valor representado por HF2.5). Los datos derivados de la inmunohistoquímica y de la hipoxia tumoral se segregaron, para garantizar un análisis ciego de los pacientes.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el programa informático SPSS 13.0. Las variables dicotómicas o categóricas (clínicas e histopatológicas) se analizaron mediante el test de Chi cuadrado (χ^2). Las variables continuas fueron estudiadas para valorar el tipo de distribución (normal vs. no normal) mediante el test de Kolmogorov-Smirnoff. Las variables continuas de distribución normal se analizaron mediante estudios de correlación de Pearson, mientras que se usó la correlación de Spearman en el caso de variables continuas no normales. Los análisis de relación entre categóricas y continuas se realizaron mediante las pruebas de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis en caso de distribución no normal, y prueba T y pruebas de

ANOVA para las variables que mostraban una distribución normal. Los análisis estadísticos se hicieron de manera ciega, de tal forma que no se pudiera relacionar el resultado de la evaluación de la inmunotinción y/u oxigenación tumoral con la respuesta clínica del paciente

RESULTADOS

Se llevaron a cabo en los 43 pacientes, las determinaciones de todos los marcadores inmunohistoquímicos así como los valores de hipoxia. La expresión media de Ku70/80 fue $62.41 \pm 27.16\%$ (mediana 70%, rango 0-94%). La densidad vascular media (MVD) fue de $49.62 \pm 33.98\%$ (mediana 41%, rango 0-160). La expresión de p53 mostró un valor promedio de $39.15 \pm 27.62\%$ (mediana 35%, rango 0-92%). Por su parte, la expresión de MVP se consideró baja (negativo/ligeramente positivo) en 23 casos, y alta (fuertemente positiva) en los 20 casos restantes (Tabla 1).

La hipoxia tumoral también fue medida en todos los pacientes. Así, la media de la pO₂ tumoral fue de 7.1 ± 8.98 (mediana de 4.40 rango 0-41.9). La fracción de hipoxia tumoral <10 mmHg (HF10) presentó un promedio de $61.10 \pm 21.77\%$ (mediana 63%, rango 0-96%). Los valores de la fracción media de hipoxia tumoral <5 mmHg (HF5) fueron 51.84 ± 23.53 (mediana de 52.50%, rango 0-95%). Los valores HF10 y HF5 estaban estrechamente relacionados ($r = 0.883$, $p < 0.0001$). Los valores HF10 y HF5 también se mostraban estrechamente relacionados con los valores de pO₂ media ($r = -0.796$, $p < 0.0001$ y $r = -0.892$, $p < 0.0001$, respectivamente). Por último, la fracción de hipoxia tumoral media (HF 2.5) fue de 35.89 ± 26.80 (mediana de 35.20%, rango 0-91.30%).

La expresión de MVP fue independiente de las variables clínicas e histológicas, salvo para los tumores caracterizados histológicamente como adenocarcinomas. De hecho, los tumores de adenocarcinoma (5 casos incluidos en el estudio) sobreexpresaban MVP, mientras que de los 38 tumores epidermoides 15 sobreexpresaban MVP ($p = 0.011$). Por otro lado, la alta expresión de MVP estaba relacionada con altos niveles hipoxia, según lo determinado por el aumento de las fracciones hipóxicas HF (2.5) ($45.82 \pm 28.00\%$) en comparación con los tumores de baja expresión de MVP ($27.26 \pm 22.96\%$) ($p = 0.022$) (Figura 2a). Los tumores que sobreexpresaban MVP también mostraron aumento de la angiogénesis (65.41 ± 38.38) en comparación con los casos de baja expresión de dicha oncoproteína, donde los

valores de MVD fueron de $35.89 \pm 22.55\%$ ($p = 0.003$) (Figura 2b). La expresión de MVP fue independiente de la expresión de la proteína p53.

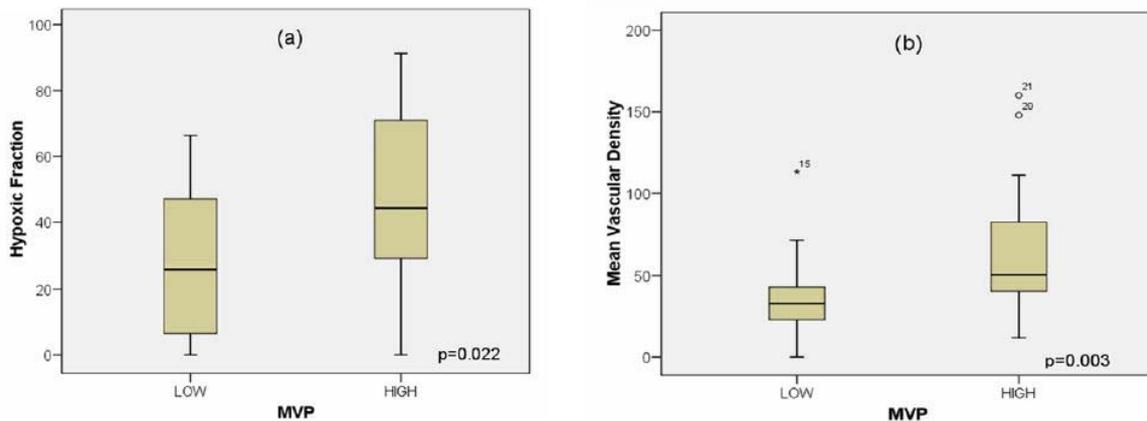


Figura 2. Relación entre los niveles de expresión de MVP con (a) la fracción de hipoxia tumoral y (b) la densidad media vascular (MVD).

La expresión de Ku70/80 y la hipoxia tumoral no se relacionaron con ninguna de las variables estudiadas. Sólo la expresión de p53 se asoció de forma marginal a la edad avanzada ($p = 0.049$), y al alto grado de diferenciación ($p = 0.034$).

La baja expresión de Ku70/80 estaba relacionada con la hipoxia, determinada por los bajos valores medios pO₂ tumoral ($r = 0.403$, $p = 0.008$) (Figura 3a) y mayor fracciones hipóxica HF10 ($r = -0.313$, $p = 0.041$) y HF5 ($r = -0.289$, $p = 0.060$). El aumento de la angiogénesis, medida como MVD, estaba relacionada con la hipoxia, determinada por los bajos valores medios de pO₂ tumoral ($r = -0.363$, $p = 0.017$) (Figura 3b) y mayor HF10 ($r = 0.381$, $p = 0.012$) y HF5 ($r = 0.392$, $p = 0.009$). También se observó alteración de la expresión de p53, principalmente en los tumores hipóxicos ($r = -0.341$, $p = 0.025$), HF10 ($r = 0.218$, $p = 0.206$) y HF5 ($r = 0.160$, $p = 0.186$) (Figura 3c).

Se observó una disminución de la tinción de Ku70/80 en aquellas células que distaban más de los vasos sanguíneos (Figura 4a); mientras que la tinción de p53 no estaba relacionada con la arquitectura vascular (Figura 4b) ($p < 0.05$). Los tumores con una alta expresión de Ku70/80 mostraron bajos niveles de p53 aunque esta relación no alcanzó significación estadística en esta serie de pacientes ($p = 0.08$).

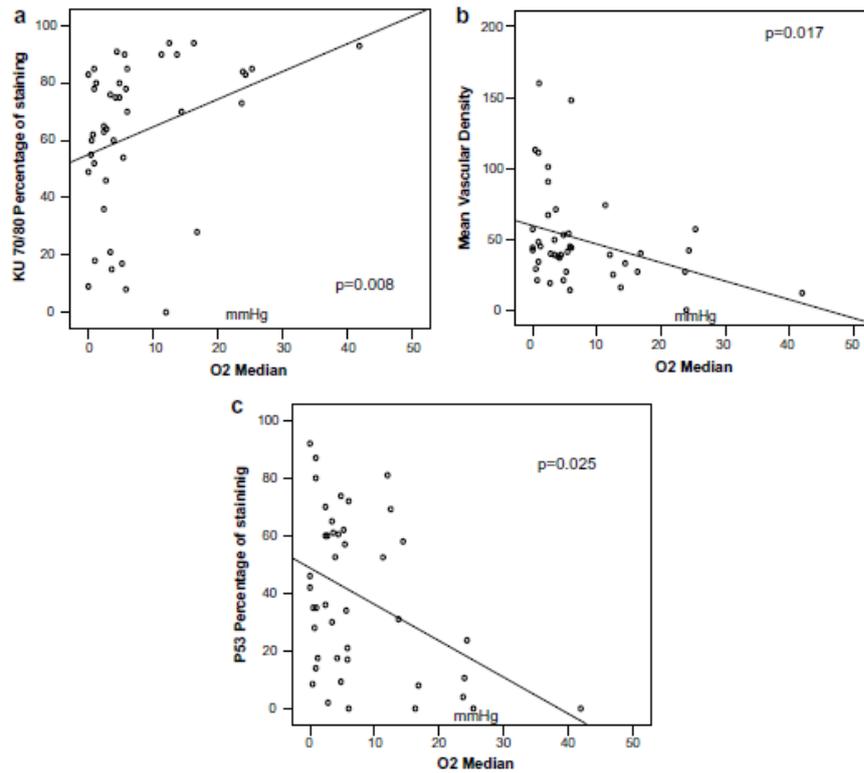


Figura 3. Relación entre la mediana de la pO₂ y (a) la expresión de Ku70/80, (b) la densidad vascular media (MVD) y (c) la expresión de p53.

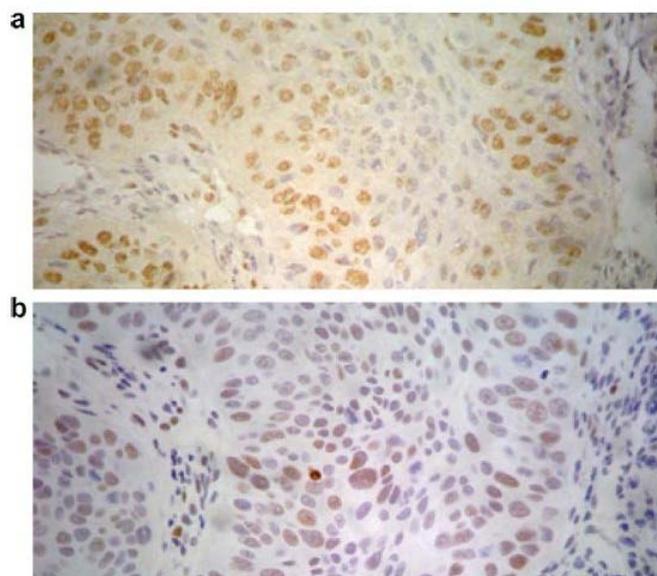


Figura 4. Relación entre la cantidad de microvasos tumorales con (a) la expresión de Ku70/80 y (b) la expresión de p53.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se ha demostrado por primera vez que la hipoxia tumoral severa se relaciona con altos niveles de expresión de MVP en tumores cervicales clínicos. MVP se expresa en distintos sitios y, además de la resistencia a la quimioterapia, se sabe que ésta proteína está implicada en la regulación de varios procesos celulares entre los que destaca i) mecanismos de transporte, ii) transmisiones de señal y iii) la respuesta inmune (Berger et al., 2009). Estudios previos han demostrado que las proteínas *Vaults* están positivamente reguladas en diferentes líneas celulares cancerígenas resistentes a diferentes drogas (Izquierdo et al., 1996), así como en modelos de resistencia a fármacos (Izquierdo et al., 1996; Siva et al., 2001). De esta manera, se ha observado niveles elevados de MVP en numerosas líneas celulares expuestas a un amplio panel de medicamentos citostáticos (por ejemplo, doxorubicina, metotrexato, vincristina o cisplatino) (Lange et al., 2000). Por el contrario, el factor de necrosis tumoral o TNF provoca una inhibición de la transcripción MVP (Stein et al., 1997). En este sentido, hay evidencias científicas de una relación entre la expresión de MVP y la resistencia a los fármacos en oncología clínica (Mossink et al., 2003; Izquierdo et al., 1998). Esta relación ha sido también explorada en el caso particular de los tumores de cuello uterino (Lloret et al., 2008) y en relación a la respuesta clínica al tratamiento radio-quimioterápico (Silva et al., 2007). MVP parece regular negativamente al gen pro-apoptótico BAX, a través de su relación con Ku70/80. Ku70/80 son los genes clave en la vía de reparación NHEJ activada por dobles roturas en la cadena de ADN, inducidas por ejemplo, por radiación. Se ha observado que existe una asociación entre la expresión de Ku70/80 y la supervivencia en aquellos pacientes tratados con radioterapia (Beskow et al., 2006; Wilson et al., 2000). Ku70/80 es un regulador central de la apoptosis mediante la interacción con BAX (Amsel et al., 2008) y BCL-2 que, a su vez, se ha observado que inhibe a Ku, evitando de esta manera la reparación NHEJ (Wang et al., 2008). En este estudio, se mostró por primera vez que la hipoxia tumoral reduce la expresión de Ku70/80 en los tumores cervicales, lo que confirma anteriores estudios preclínicos sobre el papel de la hipoxia en favor del aumento de la inestabilidad genética a través de la reducción de la reparación del daño al ADN. Estos resultados también sugieren que la supresión de la reparación del ADN inducida por hipoxia afecta a todos los mecanismos de reparación conocidos (Huang et al., 2007), incluida la reparación por escisión de nucleótidos (NER), MMR, HR y NHEJ.

En el ámbito clínico, la inducción de MVP por la hipoxia es de suma importancia ya que la quimioterapia es actualmente un tratamiento estándar para estos pacientes. Por

otro lado, la hipoxia inhibe la reparación NHEJ del ADN a través de la inhibición de Ku70/80 (Lara et al., 2008). La regulación negativa de la reparación de roturas dobles de cadena (DSB) por la hipoxia es de fundamental importancia ya que algunos tratamientos oncológicos como la radioterapia, inducen la muerte de células tumorales por DSB del ADN. Aunque tanto la reparación homóloga cuanto la reparación no homóloga (NHEJ) están relacionadas con la reparación DSB, el segundo mecanismo ocurre más frecuentemente después de que la radiación genere daño al ADN. Los estudios preclínicos sobre el papel de la hipoxia en células de cáncer mostraron que la reducción de la pO₂ es un factor que favorece la quimio-resistencia (Sasabe et al., 2007; Cosse et al., 2008). En el cáncer, la hipoxia es un factor pronóstico adverso asociado con la progresión tumoral y la resistencia al tratamiento (Shannon et al., 2003). La hipoxia induce adaptaciones celulares que comprometen la efectividad de la quimioterapia. La captación de drogas por las células en zonas hipóxicas se ve afectada por la falta de oxígeno. Algunos medicamentos quimioterapéuticos requieren oxígeno para generar radicales libres que contribuyen a su citotoxicidad. Por otra parte, la expresión de varios genes que controlan la supervivencia de las células tumorales está regulada por la hipoxia (por ejemplo, factores de crecimiento que regulan la formación de nuevos vasos sanguíneos, y factores de transcripción sensibles a la hipoxia que modulan la expresión de genes). El factor de transcripción inducible por hipoxia-1 (HIF-1) es uno de los principales mediadores de la homeostasis en los tejidos humanos expuestos a la hipoxia y está implicado en casi todos los procesos de la expresión génica rápida en respuesta a niveles bajos de oxígeno (Adams et al., 2009). HIF-1 alfa está sobreexpresado en la mayoría de los cánceres humanos comunes y sus metástasis, debido a la presencia de hipoxia intratumoral y como resultado de mutaciones en genes que codifican oncoproteínas y genes supresores de tumores (Semenza, 2000; Zhong et al., 1999). En la actualidad, los autores están de acuerdo en que se produce una amplia regulación negativa de los genes relacionados con HR bajo condiciones de hipoxia. Algunos de esos genes son: XRCC2, XRCC3, BRAC2, RAD51C Rad51, RAD52, Rad54, BRCA1, BRCA2 (Huang et al., 2007; Meng et al., 2005; Sprong et al., 2006). Se ha demostrado que la reparación homóloga de las DSB está regulada negativamente por la hipoxia, y que a su vez podría ser regulada positivamente por la represión de BRCA1 a través de E2F (Huang et al., 2007).

En este punto es interesante plantear la hipótesis de qué ocurriría si se inhibiera la expresión de HIF-1, y de cómo ese hecho podría afectar a los fenómenos de quimioresistencia. Esta hipótesis abriría el debate de la posibilidad de revertir la quimioresistencia, fenómenos que podrían ser muy interesante a nivel clínico (Lelong-

Rebel et al., 2008). La manipulación farmacológica de HIF-1 puede ofrecer un nuevo enfoque terapéutico para enfermedades como el cáncer, especialmente en combinación con agentes anti-angiogénicos (Bergers et al., 1999), que reducirían aún más la oxigenación tumoral. Los resultados clínicos previos muestran una estrecha relación de la hipoxia clínica y el aumento de la angiogénesis y, en menor medida, con la alteración de la oncoproteína p53 (Lara et al., 2008). La respuesta clínica en pacientes que padecen tumores tratados esencialmente con radiación (como son el de cuello uterino y el cáncer de cabeza y cuello), depende, al menos en parte, de esos parámetros. La presencia de hipoxia, angiogénesis y alteración de p53 podrían conducir a las células tumorales a otras alteraciones, como el aumento de la inestabilidad genética, cambios en las propiedades oncogénicas, resistencia al tratamiento y mayor capacidad para metastatizar.

Por otra parte, se ha demostrado que el gen ATM de la ataxia telangiectasia mutada, que desempeña un papel central en la respuesta al daño al ADN mediante la fosforilación de genes efectores como el Chk2 (que actúan inhibiendo la progresión del ciclo celular en respuesta a la activación de ATM), se activa por la hipoxia como respuesta al daño sobre ATM quinasa, pero no en relación con ATM quinasa y Rad3 (ATR). La proteína Chk2 es inducida por distintas señales de daño tales como radiaciones ionizantes, rayos UV, etc (Gibson et al., 2006; Zhou et al., 2000; Hangaishi et al., 2002; Tort et al., 2002)

La regulación negativa del gen de la reparación no homologa (NHEJ) por la hipoxia es un tema controvertido (Meng et al., 2005; Sprong et al., 2006). Las primeras publicaciones del grupo de *Glazer* no mostraron cambios de los genes NHEJ en condiciones de hipoxia (Bindra et al., 2004). Pero una reciente publicación de este grupo define claramente un conjunto de genes que mostraron una disminución de su expresión en genes relacionados con NHEJ (por ejemplo, Ku70, ADN-PKcs, DNA ligasa IV, XRCC4) tanto en condiciones normales, como en malignas (Meng et al., 2005). Un estudio posterior en líneas de células de hámster chino deficiente en la recombinación homóloga mostró una disminución del ratio de mejora de oxígeno (OER) (Sprong et al., 2006). Por el contrario, el OER para la línea de DNA PKcs con deficiencia fue comparable a los controles de tipo salvaje. Sin embargo, las dos estirpes celulares de anemia de Fanconi también mostraron una reducción significativa en el OER. Pacientes con anemia de Fanconi mostraron defectos tanto en la reparación homóloga como en la no homóloga (Casado et al., 2005). En la presente serie de pacientes, la expresión tumoral de Ku70/80 está relacionada con la hipoxia también en el ámbito clínico. La hipoxia parece afectar

ampliamente los sensores del daño al ADN y a los genes transductores de señales, mostrando un escenario impresionante de reparación de células defectuosas, en el que la NHEJ también se ve afectada.

La inestabilidad genética causada por defectos en reparación inducida por hipoxia podría reducir la respuesta del tumor a la radiación a través del desarrollo de fenotipos de células resistentes. La proliferación y progresión tumoral, como se muestra en los tumores hipóxicos, podrían estar relacionados con el incremento en la expresión de E2F y también con la expresión de p53 alterada y la angiogénesis (Koumenis et al., 2001; Choi et al., 2003). Los resultados clínicos muestran una estrecha relación positiva entre la hipoxia y la angiogénesis y en menor medida con la alteración de la expresión de la oncoproteína p53. De hecho, la hipoxia parece inducir selectivamente el crecimiento del tumor, eliminando por apoptosis las células con p53 de tipo salvaje y por tanto favoreciendo la expansión clonal de las células p53 mutadas (Haensgen et al., 2001). Por otra parte, la hipoxia es un fuerte estímulo para la expresión de VEGF que, a su vez, es un importante factor angiogénico. Los pocos estudios clínicos publicados sobre el tema son controvertidos (Lyng et al., 1997; West et al., 2001). En el trabajo de West, no se observó relación entre hipoxia y la expresión de factores angiogénicos, entre los que estaba VEGF. En el estudio de Lyng, se observó una amplia heterogeneidad intratumoral respecto a la distribución del pO_2 . En los tumores cervicales, las regiones tumorales con densidad vascular, definida como la longitud vascular por unidad de volumen del tejido, se encontraba en el rango de 47-77 mm/mm³, y mostraron mayores niveles de pO_2 que las regiones tumorales con densidad vascular en el rango de 20-47 mm/mm³. Así mismo, estas últimas mostraron mayor pO_2 que las regiones con densidad vascular del tumor en el rango de 0-20 mm/mm³.

Los resultados de este trabajo podrían sugerir que la hipoxia no está únicamente relacionada con los fenómenos de aumento de la inestabilidad genética, las propiedades oncogénicas o la metastatization, como ha sido sugerido previamente por numerosos autores. Sino que también podría estar detrás de los fenómenos de quimio-resistencia, debido fundamentalmente al nexo establecido entre la hipoxia y la expresión de MVP. Según este y otros estudios, lo esperado en los tumores de cuello uterino sería un aumento de la inestabilidad genética, de las propiedades oncogénicas, de la resistencia al tratamiento y de la mayor capacidad para realizar metástasis. Por otra parte, la regulación negativa del proceso de reparación de DSB, la expresión de p53 alterada y el aumento de la angiogénesis, son de destacada relevancia para predecir la respuesta

clínica en pacientes que padecen tumores que son tratados principalmente por radiación (es decir, de cuello uterino y cáncer de cabeza y cuello).

En conclusión, la hipoxia inhibe la reparación NHEJ del ADN, disminuyendo la expresión Ku70/80, lo que combinado con un aumento de la angiogénesis y la expresión de p53 alterada crearía un ambiente propicio que favorecería a los mecanismos responsables de la progresión tumoral en el carcinoma de cuello uterino.

CAPÍTULO V

LA SOBREEXPRESIÓN DE MVP Y/O IGF-1R INDUCE RADIO-RESISTENCIA EN PACIENTES AFECTOS DE CARCINOMA CERVICAL TRATADOS CON RADIO Y QUIMIOTERAPIA

CAPÍTULO V

Resumen

El presente trabajo objetivó evaluar la expresión de MVP en los pacientes con carcinoma cervical tratados por radio-quimioterapia, y valorar su relación con factores pronósticos clínicos y patológicos así como su papel en la predicción de la respuesta clínica. Además, se valoró la relación de la expresión de IGF-1R en esta cohorte de pacientes. Para ello, se incluyeron en este estudio prospectivo, sesenta pacientes diagnosticados de carcinoma cervical localizado, en el período comprendido entre julio de 1999 y diciembre de 2003. El seguimiento se cerró en noviembre de 2007. Los tumores se clasificaron en base a los criterios TNM. Todos los pacientes recibieron radiación pélvica a una dosis total de 45-64.80 Gy en fracciones de 1.8-2 Gy al día, seguido de braquiterapia y quimioterapia con cisplatino concomitante a una dosis de 40 mg/m²/semana. La expresión de MVP se estudió mediante inmunohistoquímica en tejido tumoral incluido en parafina.

Se observó que MVP se expresaba en 58 pacientes (96.7%) y no se encontró relación con las variables clínico-patológicas en estudio. La alta expresión MVP estaba relacionada con la alta expresión IGF1-R ($p = 0.023$). Se observó respuesta completa tras el tratamiento en 50 pacientes (83.3%). El estadio clínico de la enfermedad y la respuesta clínica a la radio-quimioterapia fueron los factores pronósticos más importantes relacionados con la supervivencia. Los tumores que presentaban fuerte expresión de MVP e IGF-1R se relacionaban significativamente con una baja supervivencia libre de enfermedad local y regional ($p = 0.006$), una menor supervivencia libre de enfermedad a distancia ($p = 0.050$), menor supervivencia libre de enfermedad ($p = 0.006$), y menor supervivencia causa específica ($p = 0.007$) en pacientes que tuvieron una respuesta completa.

Según esto, se puede concluir que la expresión de MVP e IGF-1R parece ser importante para los tumores cervicales clínicos y confieren un menor control local a largo plazo en pacientes que alcanzaron una respuesta clínica completa a la radio-quimioterapia.

Summary

MVP EXPRESSION IS RELATED TO IGF1-R IN CERVICAL CARCINOMA PATIENTS TREATED BY RADIOCHEMOTHERAPY

Objective. To assess the expression of MVP in cervix carcinoma patients treated by radiochemotherapy, its relation to clinical and pathologic prognostic factors and its role in predicting clinical outcome. In addition the relation to IGF-1R expression in this cohort of patients will be explored.

Materials and methods. Sixty consecutive patients suffering from localized cervix carcinoma were prospectively included in this study from July 1999 to December 2003. Follow-up was closed in November 2007. Patients were staged following the TNM classification. All patients received pelvic radiation (45–64.80 Gy in 1.8–2 Gy fractions) followed brachytherapy and concomitant cisplatin at 40 mg/m²/week doses. MVP expression was studied by immunohistochemistry in paraffin-embedded tumour tissue.

Results. MVP was expressed in 58 patients (96.7%) and no relation was found with clinicopathological variables. High MVP expression was related to high IGF1-R expression ($p=0.023$). Complete response after treatment was observed in 50 patients (83.3%). Clinical stage of the disease and clinical response to radiochemotherapy were the most important prognostic factors related to survival. High MVP and IGF-1R tumour expression was strongly related to poor local and regional disease-free survival ($p=0.006$), distant disease-free survival ($p=0.050$), disease-free survival ($p=0.006$), and cause-specific survival ($p=0.007$) in patients achieving a complete response.

Conclusion. MVP and IGF-1R expression were related in clinical cervical tumours and confer reduced long-term local control in patients who achieved clinical complete response to radiochemotherapy.

INTRODUCCIÓN

La quimioterapia y la radioterapia constituyen la base del tratamiento para el carcinoma cervical no metastásico. No obstante, para optimizar los resultados clínicos, cada día más se busca individualizar los tratamientos, para lo cual es imprescindible estudiar diferentes factores biológicos inherentes al individuo y al tumor con capacidad para modificar la respuesta clínica del tratamiento aplicado.

Tal y como se ha detallado anteriormente, las proteínas *Vaults* son partículas de ribonucleoproteínas presentes en el citoplasma de las células eucariotas y que poseen una estructura semejante a un barril, con un hueco central. Están compuestas por tres proteínas y pequeños fragmentos de RNA no traducidos (vRNA). El principal componente de *Vaults* es la proteína MVP (*Major Vault proteins*) que tiene un peso de con 110 kDa. Las dos proteínas menores son el vault poly(ADP-ribose) polymerase (VPARP) con 193 kDa y *telomerase-associated protein-1* (TEP1) con 240 kDa (Kickhoefer et al., 1999). La función principal de MVP es el transporte de sustancias. Esta proteína media algunos fenómenos de resistencia a drogas, y aparece sobre-expresada en diferentes líneas celulares multi-resistentes a quimioterápicos. La sobreexpresión de MVP se ha asociado a la resistencia a múltiples fármacos (MDR), mediante el transporte de drogas que lleva el fármaco para lejos de sus dianas intracelulares y por el secuestro de las drogas (Mossink et al., 2003). Por ello, la sobreexpresión de MVP podría ser usada como marcador clínico de resistencia a drogas. En este sentido, los niveles de expresión de MVP se han correlacionado con el grado de quimiorresistencia de células tumorales de diferentes orígenes (Izquierdo et al., 1996). Es más, la expresión de MVP se ha asociado con un fenotipo maligno en algunos tipos de cáncer, lo que indica una participación directa en el desarrollo del tumor y la progresión del mismo (Steiner et al., 2006). Se ha señalado también que MVP interactúa con PTEN (Minaguchi et al., 2006) y Erk (Xiang et al., 2006), lo que indica que MVP podría estar implicado en la regulación de la apoptosis y la proliferación por la vía PI3K/Akt y MAPK. MVP es también un sustrato de src y está fosforilado por EGF (Kim et al., 2006).

MVP se ha asociado también con la resistencia a la radioterapia (Fichtner et al., 2003), probablemente debido a su papel en la prevención de la apoptosis mediante la inhibición del eje COP-1/p53 (Yi et al., 2005; Dornan et al., 2006). El papel de MVP en la predicción de la respuesta a la radioterapia ha sido recientemente observado en un estudio donde se vio que MVP se relacionaba con un peor pronóstico en 78 pacientes diagnosticados de carcinoma orofaríngeo y tratados con radioterapia (Silva et al., 2007)

El receptor para el factor de crecimiento dependiente de insulina (IGF-1R), es un receptor transmembranal de tipo tirosina kinasa que es activado por sus ligandos endógenos IGF1 e IGF2. La activación del receptor es determinante en los procesos de crecimiento celular y metabolismo anabólico. La activación de IGF-1R conduce a la activación de diversos mensajeros intracelulares tipo ras, raf y de la vía MAPK, mediante procesos de fosforilación y defosforilación. El resultado es una mayor tasa de proliferación celular y una activación de otras vías de señalización celular tipo PI3K, que resulta en la prevención de la apoptosis (Baserga et al., 2003). Además del crecimiento celular y la inhibición de la apoptosis, la activación de IGF-1R se ha asociado con el incremento de la resistencia a los tratamientos quimio y radioterápicos. En ese mismo estudio, la baja la expresión de IGF-1R se correlacionó, a largo plazo, con la mejor supervivencia libre de enfermedad Locales y Regionales ($p = 0,045$), supervivencia libre de enfermedad ($p = 0,045$), supervivencia causa específica ($p = 0,032$) y supervivencia global ($p = 0,021$) en todos los pacientes que consiguieron una respuesta completa. (Lloret et al., 2007)

Dado que tanto MVP como IGF-1R parecen inducir resistencia a los tratamientos oncológicos, se podría pensar acerca de la posibilidad de una relación entre MVP y IGF-1R. En la actualidad no existen suficientes datos sobre el papel pronóstico de MVP en pacientes con carcinoma cervical ni tampoco sobre su relación con IGF-1R. Por ello, el objetivo del presente estudio fue el de i) evaluar la expresión de MVP en pacientes con carcinoma de cuello uterino tratado con radio-quimioterapia, ii) estudiar su relación con factores pronósticos clínicos y patológicos y iii) su papel en la predicción de la respuesta clínica. Paralelamente, iv) se exploró la relación de la expresión de IGF-1R en una cohorte de pacientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

PACIENTES. Se incluyeron en este estudio sesenta mujeres que padecían cáncer de cuello uterino, diagnosticadas y tratadas con radioterapia y quimioterapia en el Hospital Universitario Dr. Negrín de Las Palmas de Gran Canaria. Las pacientes fueron reclutadas entre julio de 1999 y diciembre 2003 previa firma del consentimiento informado. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación de nuestra Institución. Las pacientes fueron seguidas hasta noviembre de 2007, con un promedio de seguimiento de 67.69 ± 16.17 meses (mediana 68, rango 20-95 meses).

El estadio clínico se realizó mediante especuloscopia, examen bimanual y cistoscopia o rectoscopia cuando fuera necesario. Todas las pacientes fueron exploradas mediante tomografía axial computarizada abdomino-pélvica y radiografía de tórax. Los pacientes, que se encontraban en una edad media de 51.50 ± 12.10 años, fueron clasificadas siguiendo el criterio de clasificación TNM (Cervix uteri, 2002). Veintiuna pacientes se encontraban en estadio I de la enfermedad, 26 en estadio II, 12 en estadio III y una en estadio IVA. La mayoría de las pacientes presentaban tumores escamosos (54 casos) en grado III (29 casos) (Tabla 1).

Tabla 1: Características de los pacientes	
Característica	Pacientes (n = 60) (%)
Edad (años)	51.50 ± 12.10
Estadio	
I	21 (35)
II	26 (43.4)
III	12 (20)
IVA	1 (1.6)
Histología	
Epidermoide	54 (90)
Adenocarcinoma	6 (10)

PROTOCOLO DE TRATAMIENTO. Todas las pacientes fueron remitidas al Servicio de Oncología Radioterápica del Hospital Universitario de Gran Canaria, Dr. Negrín para recibir terapia de radiación externa en la pelvis. Se usó una técnica de cuatro campo con una dosis media de 50.44 ± 2.41 Gy, en fracciones de 1.8-2 Gy cada día. Además, se realizó tratamiento con braquiterapia, donde se administró una baja tasa de dosis a una dosis media de 29.70 ± 7.28 Gy (mediana 30 Gy) en 16 casos; y una alta tasa de dosis a una dosis media de 24.61 ± 3.83 Gy (mediana 25 Gy) en 43 casos. Una paciente no recibió braquiterapia y fue tratada únicamente por radioterapia externa a una dosis total de 64.80 Gy. Todas las pacientes recibieron quimioterapia concomitante con cisplatino en dosis semanales de 40 mg/m^2 durante la radioterapia pélvica.

La respuesta clínica completa al tratamiento se evaluó 6-9 semanas después de finalizado el tratamiento, siguiendo los criterios de la UICC (The International Union Against Cancer), WHO (World Health Organization) y RECIST (Criterios de Evaluación de Respuesta en Tumores Sólidos) (Therasse et al., 2000). El seguimiento fue realizado por

personal especializado en ginecología y oncología a intervalos periódicos. Los pacientes se evaluaron cada tres meses durante los dos primeros años, cada seis meses hasta los 5 años, y a partir de ahí se procedió a una evaluación anual.

INMUNOHISTOQUÍMICA. La expresión MVP se estudió en la cohorte de pacientes mediante inmunohistoquímica tal y como se ha reseñado en capítulos anteriores (Lloret et al., 2007). Las secciones de tejidos fijados en parafina de las biopsias tumorales fueron incubadas con anticuerpos monoclonales anti-MVP de ratones (LRP / MVP Ab-2, Clon 1032, Neomarkers, CA) a una dilución 1:100 e incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Tras esto, se procedió a una incubación con un anticuerpo secundario biotinilado (DAKO kit de detección, LSBA, Carpintería, CA) y un complejo peroxidasa-estreptavidina biotinilado (Dako, LSBA, Carpintería, CA). La tinción fue revelada (DAKO, DAB cromógeno, Carpintería, CA) y contrastada con hematoxilina de Harris. En una de las secciones se omitió el anticuerpo primario, para usar dicha sección como control negativo, en cada serie de cortes. Como control positivo, se utilizó una sección fuertemente positiva para la oncoproteína en cuestión. La tinción de MVP, observada en el citoplasma celular, se realizó a ciegas, desconociéndose las características clínicas de los pacientes así como la respuesta clínica. La determinación se hizo en las zonas de máxima expresión del marcador en al menos 10 campos de gran aumento (400 X). Se adoptó una nomenclatura semiquantitativa tal como sigue: negativo, (-); poco positivo, (+); moderadamente positivo, (++); y fuertemente positivo, (+++). Los datos sobre la expresión de IGF-1R se obtuvieron de nuestros archivos (Lloret et al., 2007), siguiendo el mismo protocolo para la tinción y la puntuación, tal y como se describió previamente.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS. El análisis estadístico se realizó mediante el software SPSS 15,0. La respuesta clínica tras el tratamiento se evaluó de inmediato (6-9 semanas después del final de la radioterapia), usándose las siguientes nomenclaturas: respuesta clínica completa (RC), Supervivencia libre de enfermedad loco-regional (LRDFS), supervivencia libre metástasis a distancia (SLM), Supervivencia libre de enfermedad (DFS) y supervivencia absoluta (SA).

RESULTADOS

Se llevó a cabo la determinación de la expresión de MVP para los 60 casos estudiados. Observamos una asociación positiva entre la expresión de ésta oncoproteína e IGF-1R, de tal manera que los tumores que presentaban altos niveles de expresión de MVP también tenían altos niveles de expresión de IGF-1R (χ^2 test, $p = 0.023$) (Tabla2).

Tabla 2. Relación de la expresión de MVP y IGF-1R en tumores cervicales

		MVP				Total
		(-)	(+)	(++)	(+++)	
IGF-1R	(-)	1	2	1	0	4
	(+)	0	0	2	6	8
	(++)	1	4	0	8	13
	(+++)	0	5	4	26*	35
Total		2	11	7	40	60

*P = 0.023

Cincuenta pacientes tuvieron respuesta completa después del tratamiento (83.3% del total de individuos estudiados). La supervivencia libre de enfermedad loco-regional (LRDFS), la supervivencia libre de metástasis a distancia (DMFS), la supervivencia libre de enfermedad (DFS) y la supervivencia absoluta a los 5 años fueron de 73%, 91.9%, 73% y 72.3% respectivamente. No se observó asociación alguna entre la expresión de MVP y la evolución clínica de los pacientes (Tabla 3). La respuesta clínica al tratamiento fue el único factor predictivo relevante en relación a la supervivencia global, en análisis multivariante ($p < 0.0001$, Exp (B) 32.835; I.C95%:5.697-189 .251).

Se analizó el papel de MVP en relación al control local a largo plazo y a la supervivencia en aquellos pacientes que tuvieron respuesta clínica completa tras finalizar el tratamiento radioterápico. Todos aquellos pacientes con respuesta clínica completa que además presentaban expresión negativa o débilmente positiva para MVP ($n = 17$ pacientes) se mostraron libres de recidiva local, metástasis o muerte relacionada con la enfermedad; frente a 6 de los 33 pacientes que respondieron teniendo tumores con MVP fuertemente positivo.

Tabla 3. Relación de variables pronósticas y respuesta al tratamiento

Variable	Respuesta	LRDFS	DMFS	DFS	Supervivencia
Edad	P = 0.908	P = 0.458	P = 0.261	P = 0.465	P = 0.467
Estadio	P = 0.007	P < 0.0001	P = 0.172	P < 0.0001	P < 0.0001
Histología	P = 0.248	P = 0.015	P = 0.207	P = 0.015	P = 0.012
Grado	P = 0.982	P = 0.661	P = 0.350	P = 0.662	P = 0.610
MVP	P = 0.806	P = 0.193	P = 0.659	P = 0.190	P = 0.202
IGF-1R	P = 0.198	P = 0.779	P = 0.10	P = 0.790	P = 0.803
Respuesta tumoral	–	–	P = 0.091	–	P < 0.0001*

P = 0.0001 (Regresión de Cox).

Los resultados mostraron una tendencia a la significación estadística para la supervivencia libre de enfermedad loco-regional (LRDFS) ($p = 0.087$), la supervivencia libre de enfermedad (DFS) ($p = 0.081$) y la supervivencia global ($p = 0.087$) (datos no mostrados en la Tabla 3). Estos resultados son similares a otros obtenidos previamente en relación a IGF-1R. (Lloret et al., 2007). De hecho, 19 pacientes que tuvieron respuesta clínica completa y que presentaban además niveles negativos o débilmente positivos de expresión de IGF-1R, estaban libres de enfermedad local, a distancia o enfermedad relacionada con la muerte. La expresión de IGF-1R fue marginalmente predictiva para la supervivencia libre de enfermedad loco-regional (LRDFS) ($p = 0.052$), la supervivencia libre de enfermedad (DFS) ($p = 0.051$) y la supervivencia cáncer específica (CES) ($p=0.049$) (datos no mostrados en la Tabla 3).

Los análisis combinados de la expresión de MVP y IGF-1R en los tumores, mostraron que los 27 pacientes que presentaron respuesta completa y que además tenían negativos o débilmente positivos niveles de expresión tanto de MVP como de IGF-1R, estaban libres de enfermedad local, recaída o muerte relacionada a la enfermedad, en comparación con los seis de los 23 pacientes portadores de MVP y el IGF-1R fuertemente positiva, que tuvieron respuesta completa. Es más, observese que 10

pacientes con altos niveles de MVP y bajos niveles de IGF-1R, así como 8 pacientes con bajos niveles de MVP y altos niveles de IGF-1R, estaban también libres de enfermedad siempre y cuando hubieran tenido respuesta clínica completa al tratamiento. Los análisis de Long Rank para las curvas de supervivencia fueron especialmente relevantes y significativos para los casos de supervivencia libre de enfermedad loco-regional (LRDFS) ($p = 0.006$), supervivencia libre de enfermedad a distancia DDFS ($p = 0.050$), supervivencia libre de enfermedad (DFS) ($p = 0.006$) y supervivencia absoluta ($p = 0.007$) (Figura 1).

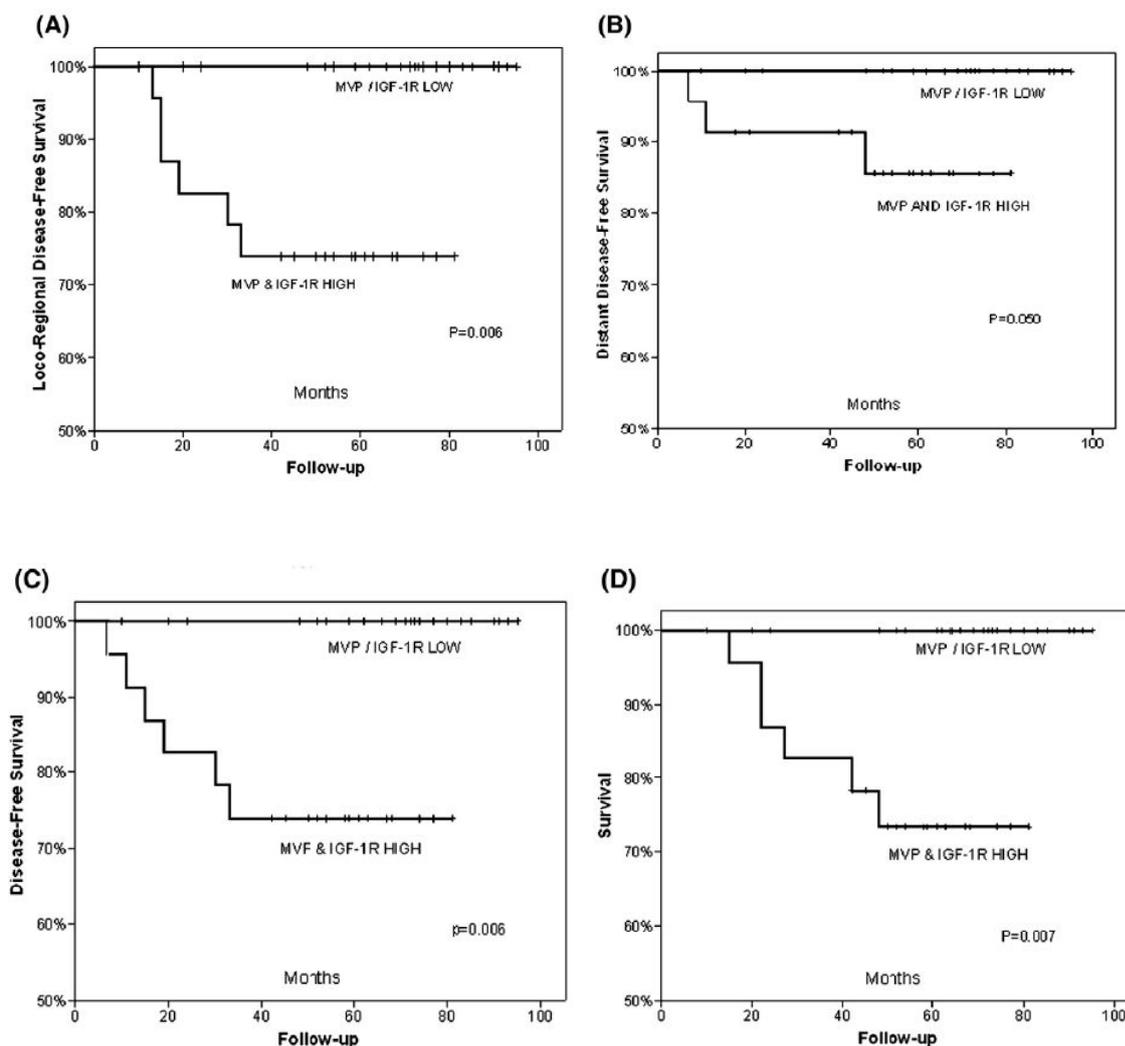


Figura 1. Relación entre los niveles de expresión de MVP e IGF-1R en pacientes con respuesta clínica completa para (A) la supervivencia libre de enfermedad loco-regional (LRDFS), (B) supervivencia libre de enfermedad a distancia DDFS, (C) supervivencia libre de enfermedad (DFS) y (D) supervivencia absoluta

DISCUSIÓN

Esta es la primera evidencia clínica de que existe una fuerte relación directa entre la expresión de IGF-1R y MVP, lo que sugiere que ambos genes se expresan habitualmente en los mismos tumores y, más interesante aún, que ambos necesitan expresarse para conferir quimio-radio-resistencia. Observamos excelentes cifras de supervivencia en el subgrupo de pacientes con bajos niveles de MVP y/o niveles bajos de IGF-1R que mostraron una vez que se obtuvo una respuesta completa al tratamiento. Por el contrario, no detectamos ninguna ventaja en aquellos pacientes con ambos marcadores negativos en comparación con aquellos con un marcador negativo.

No hay datos disponibles sobre el papel de MVP en el carcinoma cervical o en los fenómenos de respuesta a la quimio-radioterapia. No obstante, se podría pensar que tanto MVP como IGF-1R incrementan la proliferación celular posiblemente a través de la activación de Src (Kim et al., 2006), PTEN (Minaguchi et al., 2006), o ERK (Xiang et al., 2006), asociado a una inhibición de la apoptosis a través del eje COP1/P53 ATM (Dornan et al., 2006). Este conjunto de procesos podrían conducir al desarrollo de resistencia tumoral a los agentes que dañarían al ADN, generando la subsecuente resistencia al tratamiento.

Estos resultados mimetizan un reciente estudio publicado por Silva et al. donde el MVP se comportó como un fuerte predictor de la respuesta clínica en 78 pacientes con cáncer orofaríngeo. En este estudio se tuvo en cuenta que pueden haber diferencias significativas en la respuesta al tratamiento aunque las características tumorales y de tratamiento sean semejantes. De esta forma, se investigó la potencial asociación entre la expresión MVP y la respuesta al tratamiento en un grupo de pacientes con carcinoma orofaríngeo tratados con radioterapia. En un análisis multivariante, se mostró por primera vez que la elevación de la expresión de MVP estaba asociada con la resistencia a la radioterapia de los pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y el cuello (HNSCC). Para este estudio, todos los pacientes recibieron radioterapia radical en el lugar principal de la afectación y, dependiendo del estado de los ganglios del cuello, también se sometieron a una disección cervical. De esta cohorte de pacientes, ninguno había recibido quimioterapia. En conclusión, la capacidad de predecir la respuesta al tratamiento, especialmente en relación a la respuesta a la radioterapia, podría aportar nuevos datos en el camino de la individualización del manejo de pacientes, facilitando la

elección de la modalidad de tratamiento primario o si se requiere o no tratamiento adyuvante (Silva et al., 2007).

El presente estudio sugiere que los niveles de expresión combinados de MVP/IGF-1R pueden ser importantes para predecir la respuesta clínica en pacientes con cáncer cervical, aunque estos resultados preliminares deben ser confirmados en ensayos clínicos que incluyan un tamaño muestral mayor. Por otro lado, nuevos estudios que incluyen los marcadores PTEN, p53 y PI3K, son también necesarios para definir con precisión el papel de estas oncoproteínas en vías moleculares comunes de señalización.

CONCLUSIONES

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

1. Las partículas vaults, junto con otros factores aún por dilucidar, parecen ejercer algún papel en los mecanismos de reparación homóloga y no homóloga de daño al ADN. Si las vaults están sobreexpresadas, la reparación NHEJ puede ser suprimida a través de varios mecanismos. La inestabilidad genómica podría tener su origen en una inhibición de la reparación homóloga tras roturas dobles de la cadena de ADN, o por defectos en la reparación no homóloga. Estos eventos están asociados con la decisión de las células dañadas de sobrevivir y proliferar, lo que favorece la progresión del tumor y reduce la respuesta del tumor al tratamiento oncológico a través del desarrollo de fenotipos resistentes.
2. La hipoxia inhibe la reparación NHEJ del ADN por la disminución de la expresión de Ku70/80 combinado con un aumento de la angiogénesis y la inducción de la expresión de p53 alterada, por lo que aumenta la inestabilidad genómica.
3. La hipoxia en combinación con altos niveles de expresión de MVP podría estar relacionada con el desarrollo de nuevas vías de quimio-resistencia.
4. La combinación de la expresión de MVP/IGF-1R puede ser importante para predecir la respuesta clínica en pacientes con carcinoma cervical, aunque estos resultados preliminares deben ser confirmados por un ensayo clínico más grandes. Por otro lado, nuevos estudios incluyendo marcadores PTEN, P53 y PI3K serían necesarios para definir con precisión el papel en común de estas proteínas con las vías moleculares.

Conclusions

1. Vaults, together with other factors, may play a role in the homologous and nonhomologous end joining repair to the DNA. NHEJ repair system seems to be suppressed when vaults are overexpressed. Genome instability could be caused by an inhibition of the homologous repair mechanisms after double strand breaks of the DNA or by defects in the NHEJ repair. These events may be associated with the decision of the damaged cells to survive and proliferate, favoring tumour progression and reducing tumour response to treatment developing resistance phenotypes.
2. Hypoxia inhibits NHEJ repair of the DNA through the inhibition of Ku70/80 expression, together with an increment of angiogenesis and induction of altered p53. These events produce, at least, genome instability.
3. Hypoxia and high MVP expression may be associated with new mechanisms for the development of chemoresistance.
4. MVP/IGF-1R expression may be of relevance for predicting clinical response in cervical cancer patients, although additional clinical studies are necessary to test this hypothesis. PTEN, P53 or PI3K should be included in those studies to better understand the common roles that these proteins seem to have.

Bibliografía

(INCA) Instituto Nacional do Câncer-Estimativa da Incidência de Câncer para 2008 no Brasil e nas cinco Regiões. Ministério da Saúde do Brasil. Disponible en: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=1793 . Acceso en 04 de abril de 2010.
(INCA) Instituto Nacional do Câncer-Incidência de Câncer no Brasil Estimativa 2010 -Síntese de resultados e comentarios; Ministério da Saúde do Brasil. Disponible en: http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=5 . Acceso en 04 de abril de 2010.
Abbondanza C, Rossi V, Roscigno A, et al.: Interaction of vault particles with estrogen receptor in the MCF-7 breast cancer cell. <i>J Cell Biol</i> 1998, 141:1301–1310.
Abulafia O, Sherer DM. Angiogenesis in the uterine cervix <i>Int J Gynecol Cancer</i> . 2000;10(5):349-357.
Adachi Y, Lee CT, Coffee K, Yamagata N, Ohm JE, Park KH, Dikov MM, Nadaf SR, Arteaga CL, Carbone DP. Effects of genetic blockade of the insulin-like growth factor receptor in human colon cancer cell lines. <i>Gastroenterology</i> 2002;123(4):1191-204.
Adams TE, Mckern NM, Ward CW. Signalling by the type 1 Insulin-like growth factor receptor: Interplay with the epidermal growth factor receptor. <i>Growth Factors</i> 2004; 22(2):89-95.
Ahlén J, Wejde J, Brosjö O, von Rosen A, Weng WH, Girnita L, Larsson O, Larsson C. Insulin-like growth factor type 1 receptor expression correlates to good prognosis in highly malignant soft tissue sarcoma. <i>Clin Cancer Res</i> 2005;11(1):206-16.
Airley R, Loncaster J, Davidson S, Bromley M, Roberts S, Patterson A, Hunter R, Stratford I, West C. Glucose transporter glut-1 expression correlates with tumor hypoxia and predicts metastasis-free survival in advanced carcinoma of the cervix. <i>Clin Cancer Res</i> . 2001;7(4):928-34.
Alfsen GC, Kristensen GB, Skovlund E, Pettersen EO, Abeler VM. Histologic subtype has minor importance for overall survival in patients with adenocarcinoma of the uterine cervix: a population-based study of prognostic factors in 505 patients with nonsquamous cell carcinomas of the cervix. <i>Cancer</i> 2001;92(9):2471-83.
Allgayer H, Babic R, Grützner KU, Beyer BC, Tarabichi A, Schildberg FW, Heiss MM. Tumor-associated proteases and inhibitors in gastric cancer: analysis of prognostic impact and individual risk protease patterns <i>Clin Exp Metastasis</i> . 1998;16(1):62-73.
Álvarez 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. <i>Gynecol Oncol</i> 1989;35(2): 130-5.

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. <i>Exp Cell Res.</i> 1997 May 1;232(2):361-70.
Andreasen PA, Egelund R, Petersen HH. The plasminogen activation system in tumorgrowth, invasion, and metastasis. <i>Cell Mol Life Sci.</i> 2000;57(1):25-40.
Arbyn M, Autier P, Ferlay J. Burden of cervical cancer in the 27 member states of the European Union: estimates for 2004. <i>Ann Oncol.</i> 2007 Aug;18(8):1423-5.
Arbyn M, Raifu AO, Weiderpass E, Bray F, Anttila A. Trends of cervical cancer mortality in the member states of the European Union. <i>Eur J Cancer.</i> 2009 Oct;45(15):2640-8.
Arbyn M, Rebolj M, De Kok IM, Fender M, Becker N, O'Reilly M, Andrae B. The challenges of organising cervical screening programmes in the 15 old member states of the European Union. <i>Eur J Cancer.</i> 2009 Oct;45(15):2671-8.
Arts HJ, Katsaros D, de Vries EG, Massobrio M, Genta F, Danese S, Arisio R, Scheper RJ, Kool M, Scheffer GL, Willemse PH, van der Zee AG, Suurmeijer AJ. Drug resistance-associated markers P-glycoprotein, multidrug resistance-associated protein 1, multidrug resistance-associated protein 2, and lung resistance protein as prognostic factors in ovarian carcinoma. <i>Clin Cancer Res.</i> 1999;5(10):2798-2805.
Ashcroft M, Voudsen KH. Regulation of p53 stability. <i>Oncogene</i> 1999; 18(53): 7637-43.
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 cervical carcinoma. <i>Eur J Cancer.</i> 1997; 33(11):1799-1804.
Bae DS, Cho SB, Kim YJ, Whang JD, Song SY, Park CS, Kim DS, Lee JH. Aberrant expression of cyclin D1 is associated with poor prognosis in early stage cervical cancer of the uterus. <i>Gynecol Oncol</i> 2001; 81(3):341-7.
Bahnassy AA, Zekri AR, Alam El-Din HM, Aboubakr AA, Kamel K, El-Sabah MT, Mokhtar NM. The role of cyclins and cyclins inhibitors in the multistep process of HPV-associated cervical carcinoma. <i>J Egypt Natl Canc Inst.</i> 2006 Dec;18(4):292-302.
Bahnassy AA, Zekri AR, Saleh M, Lotayef M, Moneir M, Shawki O. The possible role of cell cycle regulators in multistep process of HPV-associated cervical carcinoma. <i>BMC Clin Pathol.</i> 2007 May 24;7:4.
Bajou K, Maillard C, Jost M, Lijnen RH, Gils A, Declerck P, Carmeliet P, Foidart JM, Noel A. Host-derived plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) concentration is critical for in vivo tumoral angiogenesis and growth. <i>Oncogene</i> .2004;23(41):6986-90.

Balsara RD, Castellino FJ, Ploplis VA. A novel function of plasminogen activator inhibitor-1 in modulation of the AKT pathway in wild-type and plasminogen activator inhibitor-1-deficient endothelial cells. <i>J Biol Chem.</i> 2006 Aug 11;281(32):22527-36.
Barth AI, Näthke IS, Nelson WJ. Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. <i>Curr Opin Cell Biol.</i> 1997 Oct; 9(5):683-90
Baserga R. The IGF-I receptor in cancer research. <i>Exp Cell Res</i> 1999; 253(1):1-6.
Beato M, Chalepakis G, Schauer M, Slater EP. DNA regulatory elements for steroid hormones. <i>J Steroid Biochem.</i> 1989 May;32(5):737-47.
Beato M, Herrlich P, Schütz G. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. <i>Cell.</i> 1995 Dec 15;83(6):851-7.
Begg AC, McNally NJ, Shrieve DC, Karcher H. A method to measure the duration of DNA synthesis and the potential doubling time from a single sample. <i>Cytometry</i> 1985;6(6):620-6.
Belka C, Budach W. Anti-apoptotic BCL-2 proteins: structure, function and relevance for radiation biology. <i>Int J Radiat Biol</i> 2002; 78(8): 643-58.
Berger W, Elbling L, Micksche M Expression of the major vault protein LRP in human non-small-cell lung cancer cells: activation by short-term exposure to antineoplastic drugs. <i>Int J Cancer.</i> 2000; 88(2):293-300.
Berger W, Steiner E, Grusch M, Elbling L, Micksche M. Vaults and the major vault protein: novel roles in signal pathway regulation and immunity. <i>Cell Mol Life Sci.</i> 2009 Jan;66(1):43-61.
Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. <i>Nat Rev Cancer.</i> 2003 ;3(6):401-410.
Berkowitz RS, Ehrmann RL, Lavizzo-Mourey R, Knapp RC. Invasive cervical carcinoma in young women. <i>Gynecol Oncol</i> 1979;8(3):311-6.
Bibbo M, Longatto A. Aspectos Clínicos e Laboratoriais dos derrames cavitários: Conduta Terapêutica e Avaliações Diagnósticas e Prognósticas. Fernando C. Schmitt & Carla Costa. <i>Biologia Celular.</i> 1th ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2001.
Bindra RS, Schaffer PJ, Meng A, Woo J, Måseide K, Roth ME, Lizardi P, Hedley DW, Bristow RG, Glazer PM. Down-regulation of Rad51 and decreased homologous recombination in hypoxic cancer cells. <i>Mol Cell Biol.</i> 2004 Oct;24(19):8504-18.
Bjork-Eriksson T, West C, Nilsson A, Magnusson B, Svensson M, Karlsson E, Slevin N, Lewensohn R, Mercke C. The immunohistochemical expression of DNA-PKCS and Ku (p70/p80) in head and neck cancers: relationships with radiosensitivity. <i>Int J Radiat Oncol Biol Phys.</i> 1999; 45(4):1005-1010.

Bolger BS, Symonds RP, Stanton PD, MacLean AB, Burnett R, Kelly P, Cooke TG. Prediction of radiotherapy response of cervical carcinoma through measurement of proliferation rate. <i>Br. J. Cancer</i> 1996; 74(8):1223-6.
Bos R, Zhong H, Hanrahan CF, Mommers EC, Semenza GL, Pinedo HM, Abeloff MD, Simons JW, van Diest PJ, van der Wall E. Levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha during breast carcinogenesis. <i>J Natl Cancer Inst.</i> 2001 Feb 21;93(4):309-14.
Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. <i>J Clin Pathol</i> 2002; 55:244-65.
BOSCH, F. X.; DE SANJOSE, S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer--burden and assessment of causality. <i>J Natl Cancer Inst Monogr</i> , 31:3-13, 2003.
Bousarghin L, Touzé A, Sizaret PY, Coursaget P. Human Papillomavirus Types 16, 31, and 58 Use Different Endocytosis Pathways To Enter Cells. <i>J Virol</i> 2003; 77: 3846-50.
Bouvet M, Ellis LM, Nishizaki M, Fujiwara T, Liu W, Bucana CD, Fang B, Lee JJ, Roth JA. Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer down-regulates vascular endothelial growth factor expression and inhibits angiogenesis in human colon cancer <i>Cancer Res.</i> 1998;58(11):2288-2292.
Branca M, Giorgi C, Santini D, Di Bonito L, Ciotti M, Benedetto A, Paba P, Costa S, Bonifacio D, Di Bonito P, Accardi L, Favalli C, Syrjänen K; HPV-Pathogen ISS Study Group. Aberrant expression of VEGF-C is related to grade of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and high risk HPV, but does not predict virus clearance after treatment of CIN or prognosis of cervical cancer. <i>J Clin Pathol.</i> 2006;59(1):40-7.
Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativas 2005: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2004. 94pg.
BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer – INCA. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2003. 92p.
Brattström D, Bergqvist M, Lamberg K, Kraaz W, Scheibenflug L, Gustafsson G, Inganäs M, Wagenius G, Brodin O. Complete sequence of p53 gene in 20 patients with lung cancer: comparison with chemosensitivity and immunohistochemistry. <i>Med Oncol.</i> 1998;15(4):255-61.
Bremer GL, Tiebosch AT, van der Putten HW, Schouten HJ, de Haan J, Arends JW. Tumor angiogenesis: an independent prognostic parameter in cervical cancer. <i>Am J Obstet Gynecol.</i> 1996; 174(1 Pt 1):126-131.
Brizel DM, Rosner GL, Prosnitz LR. Patterns and variability of tumor oxygenation in human soft tissue sarcomas, cervical carcinomas, and lymph node metastases. <i>Int J Radiat Oncol Biol Phys.</i> 1995; 32:1121-1125.

Brown KD, Lataxes TA, Shangary S, Mannino JL, Giardina JF, Chen J, Baskaran R. Ionizing radiation exposure results in up-regulation of Ku70 via a p53/ataxia-telangiectasia-mutated protein-dependent mechanism. <i>J Biol Chem.</i> 2000;275(9):6651-6656.
Brustugun OT, Fladmark KE, Doskeland SO, Orrenius S, Zhivotovsky B. Apoptosis induced by microinjection of cytochrome c is caspase-dependent and is inhibited by Bcl-2. <i>Cell Death Differ.</i> 1998 Aug; 5(8): 660-8. Erratum in: <i>Cell Death Differ</i> 1999 Mar; 6(3): 301.
Burbridge MF, Coge F, Galizzi JP, Boutin JA, West DC, Tucker GC. The role of the matrix metalloproteinases during in vitro vessel formation. <i>Angiogenesis.</i> 2002; 5(3):215-226.
BURD ME. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. <i>Clin. Microbiol.</i> 2003;16:1-17.
Cairns RA, Khokha R, Hill RP. Molecular mechanisms of tumor invasion and metastasis: an integrated view. <i>Curr Mol Med.</i> 2003;3(7):659-71.
Cantu De León D, Lopez-Graniel C, Frias Mendivil M, Chanona Vilchis G, Gomez C, De La Garza Salazar J. Significance of microvascular density (MVD) in cervical cancer recurrence. <i>Int J Gynecol Cancer.</i> 2003 Nov-Dec;13(6):856-62.
Cao Z, Fang J, Xia C, Shi X, Jiang BH. trans-3,4,5'-Trihydroxystibene inhibits hypoxia-inducible factor 1alpha and vascular endothelial growth factor expression in human ovarian cancer cells. <i>Clin Cancer Res.</i> 2004 Aug 1;10(15):5253-63.
Caputi M, Groeger AM, Esposito V, Dean C, De Luca A, Pacilio C, Muller MR, Giordano GG, Baldi F, Wolner E, Giordano. A prognostic role of cyclin D1 in lung cancer. Relationship to proliferating cell nuclear antigen. <i>Am J Respir Cell Mol Biol</i> 1999; 20(4):746-50.
Carmeliet P, Collen D. Molecular basis of angiogenesis. Role of VEGF and VE-cadherin. <i>Ann N Y Acad Sci.</i> 2000; 902:249-262.
Caro JJ, Salas M, Ward A, Goss G. Anemia as an independent prognostic factor for survival in patients with cancer: a systemic, quantitative review. <i>Cancer</i> 2001;91(12):2214-21.
Chang HW, Roh JL, Jeong EJ, Lee SW, Kim SW, Choi SH, Park SK, Kim SY. Wnt signaling controls radiosensitivity via cyclooxygenase-2-mediated Ku expression in head and neck cancer. <i>Int J Cancer.</i> 2008 Jan 1;122(1):100-7.
Chargui R, Damak T, Khomsi F, Ben Hassouna J, Chaieb W, Hechiche M, Gamoudi A, Boussem H, Benna F, Rahal K. Prognostic factors and clinicopathologic characteristics of invasive adenocarcinoma of the uterine cervix. <i>Am J Obstet Gynecol</i> 2006;194(1):43-8.
Cheng SH, Lam W, Lee AS, Fung KP, Wu RS, Fong WF. Low-level doxorubicin resistance in benzo[a]pyrene-treated KB-3-1 cells is associated with increased LRP expression and altered subcellular drug distribution. <i>Toxicol Appl Pharmacol.</i> 2000 Apr 15;164(2):134-42.

Cheng WF, Chen CA, Lee CN, Wei LH, Hsieh FJ, Hsieh CY Vascular endothelial growth factor and prognosis of cervical carcinoma. <i>Obstet Gynecol.</i> 2000; 96(5 Pt 1):721-726.
Cheung TH, Yu MM, Lo KW, Yim SF, Chung TK, Wong YF. Alteration of cyclin D1 and CDK4 gene in carcinoma of uterine cervix. <i>Cancer Lett</i> 2001; 166(2):199-206.
Chinnaiyan P, Allen GW, Harari PM. Radiation and new molecular agents, part II: targeting HDAC, HSP90, IGF-1R, PI3K, and Ras. <i>Semin Radiat Oncol</i> 2006; 16(1):59-64. Review.
Cho NH, Kim YT, Kim JW. Correlation between G1 cyclins and HPV in the uterine cervix. <i>Int J Gynecol Pathol</i> 1997; 16(4):339-47.
Choi YS, Yi CM, Sin JI, Ye GW, Shin IH, Lee TS. Impact of hemoglobin on survival of cervical carcinoma patients treated with concurrent chemoradiotherapy is dependent on lymph node metastasis findings by magnetic resonance imaging. <i>Int J Gynecol Cancer.</i> 2006;16(5):1846-54.
Chugani DC, Rome LH, Kedersha NL. Evidence that vault ribonucleoprotein particles localize to the nuclear pore complex. <i>J Cell Sci.</i> 1993 Sep;106 (Pt 1):23-9.
Ciang C-M, Ustav M, Stenlund A, et al: Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 89:5799-5803, 1992.
Clarke H, Pallister CJ. The impact of anaemia on outcome in cancer. <i>Clin Lab Haematol</i> 2005;27(1):1-13.
Colin C, Voutsinos-Porche B, Nanni I, Fina F, Metellus P, Intagliata D, Baeza N, Bouvier C, Delfino C, Loundou A, Chinot O, Lah T, Kos J, Martin PM, Ouafik L, Figarella-Branger D. High expression of cathepsin B and plasminogen activator inhibitor type-1 are strong predictors of survival in glioblastomas. <i>Acta Neuropathol.</i> 2009 Dec;118(6):745-54.
Conger KL, Liu J-S, Kuo S-R, Chow LT, Wang TSF. Human Papillomavirus DNA Replication. <i>J Biol Chem</i> 1999; 274(5): 2696-705.
Conrad M, Bubb VJ, Schlegel R. The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. <i>J Virol</i> 1993;67:6170-8.
Corvo R, Sanguineti G, Scala M, Garaventa G, Santelli A, Barbieri M, Vitale V. Primary site as predictive factor of local control in advanced head and neck tumors treated by concomitant boost accelerated radiotherapy. <i>Tumori</i> 1994;80(2):135-8.
Cosaceanu D, Budiou RA, Carapancea M, Castro J, Lewensohn R, Dricu A. Ionizing radiation activates IGF-1R triggering a cytoprotective signaling by interfering with Ku-DNA binding and by modulating Ku86 expression via a p38 kinase-dependent mechanism. <i>Oncogene</i> 2006.

Cosaceanu D, Carapancea M, Castro J, Ekedahl J, Kanter L, Lewensohn R, Dricu A. Modulation of response to radiation of human lung cancer cells following insulin-like growth factor 1 receptor inactivation. <i>Cancer Letters</i> 2005; 222(2):173-81.
Coskun U, Gunel N, Sancak B, Gunel U, Onuk E, Bayram O, Yilmaz E, Candan S, Ozkan S. Significance of serum vascular endothelial growth factor, insulin-like growth factor-I levels and nitric oxide activity in breast cancer patients. <i>Breast</i> 2003; 12(2):104-10.
Coskun U, Gunel N, Toruner FB, Sancak B, Onuk E, Bayram O, Cengiz O, Yilmaz E, Elbeg S, Ozkan S. Serum leptin, prolactin and vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in patients with breast cancer. <i>Neoplasma</i> . 2003; 50(1):41-46.
Couture C, Raybaud-Diogene H, Tetu B, Bairati I, Murry D, Allard J. p53 and ki-67 as markers of radioresistance in head and neck carcinoma. <i>Cancer</i> 2002; 94(3):713-22.
Creasman WT, Kohler MF. Is lymph vascular space involvement an independent prognostic factor in early cervical cancer? <i>Gynecol Oncol</i> 2004;92(2):525-9.
Critchlow SE, Jackson SP. DNA end-joining: from yeast to man. <i>Trends Biochem Sci</i> . 1998 Oct;23(10):394-8.
Cuddihy AR, Bristol RG. The p53 protein family and radiation sensitivity: Yes or no? <i>Cancer Metastasis Rev</i> 2004; 23(3-4): 237-57.
Curiel TJ, Morris C, Brumlik M, Landry SJ, Finstad K, Nelson A, Joshi V, Hawkins C, Alarez X, Lackner A, Mohamadzadeh M. Peptides identified through phage display direct immunogenic antigen to dendritic cells. <i>J Immunol</i> . 2004 ;172(12):7425-31.
d'Adda di Fagagna F, Hande MP, Tong WM, Roth D, Lansdorp PM, Wang ZQ, Jackson SP. Effects of DNA nonhomologous end-joining factors on telomere length and chromosomal stability in mammalian cells. <i>Curr Biol</i> . 2001 Aug 7;11(15):1192-6.
Dai Y, Zhang X, Peng Y, Wang Z. The expression of cyclooxygenase-2, VEGF and PGs in CIN and cervical carcinoma. <i>Gynecol Oncol</i> . 2005;97(1):96-103.
Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. <i>Science</i> . 1994; 265(5178):1582-1584.
Daneri-Navarro A, Macias-Lopez G, Ocegüera-Villanueva A, Del Toro-Arreola S, Bravo-Cuellar A, Perez-Montfort R, Orbach-Arbouys S. Urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitors (PAI-1 and PAI-2) in extracts of invasive cervical carcinoma and precursor lesions. <i>Eur J Cancer</i> . 1998 ;34(4):566-9.
Datta PK, Blake MC, Moses HL. Regulation of plasminogen activator inhibitor-1 expression by transforming growth factor-beta -induced physical and functional interactions between smads and Sp1. <i>J Biol Chem</i> . 2000 Dec 22;275(51):40014-9.

Davidson B, Goldberg I, Lerner-Geva L, Gotlieb WH, Ben-Baruch G, Novikov I, Kopolovic J. Expression of topoisomerase II and ki-67 in cervical carcinoma-clinicopathological study using immunohistochemistry. <i>APMIS</i> 2000; 108: 209-15.
Davy CE, Jackson DJ, Wang Q, Raj K, Masterson PJ, Fenner NF et al. Identification of a G2 Arrest Domain in the E1-E4 Protein of Human Papillomavirus Type 16. <i>J Virol</i> 2002; 76(19): 9806-18.
Davy ML, Dodd TJ, Luke CG, Roder DM. Cervical cancer: effect of glandular cell type on prognosis, treatment, and survival. <i>Obstet Gynecol</i> 2003;101(1):38-45.
De Vita V, Hellman S, Rosenberg SA. <i>Cancer-Principles and Practice of Oncology</i> . Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins, 2001; Vol 1; 134-149. 5Th Edition.
Del Vecchio AM, Romanczuk H, Howley PM, Baker CC. Transient Replication of Human Papillomavirus DNAs. <i>J Virol</i> 1992; 66(10): 5949-58.
Delgado G, Bundy BN, Fowler WC Jr, Stehman FB, Sevin B, Creasman WT, et al. A prospective surgical pathological study of stage I squamous carcinoma of the cervix: a Gynecologic Oncology Group study. <i>Gynecol Oncol</i> 1989;35(3):314-20.
Dellas A, Moch H, Schultheiss E, Feichter G, Almendral AC, Gudat F, Torhorst J. Angiogenesis in cervical neoplasia: microvessel quantitation in precancerous lesions and invasive carcinomas with clinicopathological correlations. <i>Gynecol Oncol</i> . 1997; 67(1):27-33.
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.
Desaintes C, Demeret C, Goyat S, Yaniv M, Thierry F. Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis. <i>EMBO J</i> 1997; 16(3):504-14.
Devy L, Blacher S, Grignet-Debrus C, Bajou K, Masson V, Gerard RD, Gils A, Carmeliet G, Carmeliet P, Declerck PJ, Noel A, Foidart JM. The pro- or antiangiogenic effect of plasminogen activator inhibitor 1 is dose dependent. <i>FASEB J</i> . 2002;16(2):147-54.
DeWolf WC, Gaston SM. The cell cycle and its relevance to the urologist. <i>J Urol</i> 2004;171(4):1674-1681.
Di Bernardo MC, Matakidou A, Eisen T, Houlston RS; GELCAPS Consortium. Plasminogen activator inhibitor variants PAI-1 A15T and PAI-2 S413C influence lung cancer prognosis. <i>Lung Cancer</i> . 2009 Aug;65(2):237-41.
Diestra JE, Condom E, Del Muro XG, Scheffer GL, Perez J, Zurita AJ, Munoz-Segui J, Vignes F, Scheper RJ, Capella G, Germa-Lluch JR, Izquierdo MA. Expression of multidrug resistance proteins P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1, breast cancer resistance protein and lung resistance related protein in locally advanced bladder cancer treated with neoadjuvant chemotherapy: biological and clinical implications. <i>J Urol</i> . 2003; 170 (4 Pt1):1383-1387.

Dimova EY, Möller U, Herzig S, Fink T, Zachar V, Ebbesen P, Kietzmann T. Transcriptional regulation of plasminogen activator inhibitor-1 expression by insulin-like growth factor-1 via MAP kinases and hypoxia-inducible factor-1 in HepG2 cells. <i>Thromb Haemost.</i> 2005 Jun;93(6):1176-84.
Dingemans AM, van Ark-Otte J, van der Valk P, Apolinario RM, Scheper RJ, Postmus PE, Giaccone G. Expression of the human major vault protein LRP in human lung cancer samples and normal lung tissues. <i>Ann Oncol.</i> 1996 Aug;7(6):625-30.
Domenech, A.C;Pérez-Gómez,B;Aragonés N;Pollán M;López-Abente G; Vigilancia Epidemiológica del Cáncer-Monitorización de la situación del cáncer en España. CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA INSTITUTO DE SALUD CARLOS III. Madrid, Junio 2009.
Dong Z, Wang JZ, Yu F, Venkatachalam MA. Apoptosis-resistance of hypoxic cells: multiple factors involved and a role for IAP-2. <i>Am J Pathol.</i> 2003 Aug;163(2):663-71.
Doorbar J, Elston RC, Napthine S, Raj K, Medcalf E, Jackson D, et al. The E1-E4 Protein of Human Papillomavirus Type 16 Associates with a Putative RNA Helicase through Sequences in Its C Terminus. <i>J Virol</i> 2000; 74(21): 10081-95.
Dubben HH, Thames HD, Beck-Bornholdt HP. Tumor volume: a basic and specific response predictor in radiotherapy. <i>Radiother Oncol</i> 1998;47(2):167-74.
Duffy MJ. The biochemistry of metastasis. <i>Adv Clin Chem.</i> 1996;32:135-66.
Dunst J, Kuhnt T, Strauss HG, Krause U, Pelz T, Koelbl H, Haensgen G. Anemia in cervical cancers: impact on survival, patterns of relapse, and association with hypoxia and angiogenesis. <i>Int J Radiat Oncol Biol Phys</i> 2003;56(3):778-87.
Durand RE, Aquino-Parsons C. Predicting response to treatment in human cancers of the uterine cervix: sequential biopsies during external beam radiotherapy. <i>Int J Radiat Oncol Biol Phys</i> 2004; 58(2):555-60.
Durand RE. Tumor repopulation during radiotherapy: Quantitation in two xenografted human tumors. <i>Int J Radiat Oncol Biol Phys</i> 1997;39(4):803-8.
Efeyan A, Serrano M. p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. <i>Cell Cycle.</i> 2007 2;6(9):1006-10.
Eichenmüller B, Kedersha N, Solovyeva E, Everley P, Lang J, Himes RH, Suprenant KA. Vaults bind directly to microtubules via their caps and not their barrels. <i>Cell Motil Cytoskeleton.</i> 2003 Dec;56(4):225-36.
Emre N, Raval-Fernandes S, Kickhoefer VA, Rome LH. Analysis of MVP and VPARP promoters indicates a role for chromatin remodeling in the regulation of MVP. <i>Biochim Biophys Acta.</i> 2004 Apr 16;1678(1):33-46.

En-Lin S, Sheng-Guo C, Hua-Qiao W. The expression of EFEMP1 in cervical carcinoma and its relationship with prognosis. <i>Gynecol Oncol.</i> 2010 Apr 6.
Espejel S, Franco S, Sgura A, Gae D, Bailey SM, Taccioli GE, Blasco MA. Functional interaction between DNA-PKcs and telomerase in telomere length maintenance. <i>EMBO J.</i> 2002 Nov 15;21(22):6275-87.
Evander M, Fraser IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NA. Identification of the alpha 6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. <i>J Virol</i> 1997; 71(3): 2449-56.
Federico C, Alleyn J, Dola C, Tafti S, Galandak J, Jacob C, Bhuiyan A, Cheng J. Relationship among age, race, medical funding, and cervical cancer survival. <i>J Natl Med Assoc.</i> 2010 Mar;102(3):199-205.
FERLAY, J.; BRAY, F.; PISANI, P.; PARKIN, D.M. <i>Globocan 2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, Version 1.0.</i> IARC Cancer Base No. 5. Lyon, IARC Press. 2001.
Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. <i>Endocr Rev.</i> 2004;25(4):581-611.
Filipits M, Stranzl T, Pohl G, Heinzl H, Jäger U, Geissler K, Fonatsch C, Haas OA, Lechner K, Pirker R. Drug resistance factors in acute myeloid leukemia: a comparative analysis. <i>Leukemia.</i> 2000 Jan;14(1):68-76.
Fink SL and Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. <i>Infect Immun</i> 2005; 73(4): 1907-16.
Fink T, Kazlauskas A, Poellinger L, Ebbesen P, Zachar V. Identification of a tightly regulated hypoxia-response element in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-1. <i>Blood.</i> 2002 Mar 15;99(6):2077-83.
Foekens JA, Peters HA, Look MP, Portengen H, Schmitt M, Kramer MD, Brüner N, Jänicke F, Meijer-van Gelder ME, Henzen-Logmans SC, van Putten WL, Klijn JG. The urokinase system of plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients. <i>Cancer Res.</i> 2000;60(3):636-43.
Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process. <i>Curr Mol Med.</i> 2003;3(7):643-651.
Fontanini G, Boldrini L, Chine S, Pisaturo F, Basolo F, Calcinai A, Lucchi M, Mussi A, Angeletti CA, Bevilacqua G. Expression of vascular endothelial growth factor mRNA in non-small-cell lung carcinomas. <i>Br J Cancer.</i> 1999; 79(2):363-369.
Fowler JF, Lindstrom MJ. Loss of local control with prolongation in radiotherapy. <i>Int J. Radiat. Oncol. Biol. Phys</i> 1992; 23 (2):457-67.

Fox SB, Gasparini G, Harris AL. Angiogenesis: pathological, prognostic, and growth-factor pathways and their link to trial design and anticancer drugs. <i>Lancet Oncol.</i> 2001; 2(5):278-89.
Frattini MG, Laimins LM. Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 1994; 91: 12398-02.
Fregnani JH, Soares FA, Novik PR, Lopes A, Latorre Mdo R. [Unusual risk factors for lymph node metastasis in cancer of the uterine cervix]. <i>Rev Assoc Med Bras.</i> 2007;53(4):338-43.
Friedberg EC. DNA damage and repair. <i>Nature.</i> 2003; 421(6921):436-437.
Fujimoto J, Ichigo S, Hirose R, Sakaguchi H, Tamaya T. Expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its mRNA in uterine endometrial cancers. <i>Cancer Lett.</i> 1998 Dec 11;134(1):15-22.
Fujiwaki R, Hata K, Iida K, Maede Y, Miyazaki K. Vascular endothelial growth factor expression in progression of cervical cancer: correlation with thymidine phosphorylase expression, angiogenesis, tumor cell proliferation, and apoptosis. <i>Anticancer Res.</i> 2000; 20(2B):1317-1322.
Fyles A, Keane TJ, Barton M, Simm J. The effect of treatment duration in the local control of cervix cancer. <i>Radiother Oncol</i> 1992; 25(4):273-9.
Fyles A, Milosevic M, Hedley D, Pintilie M, Levin W, Manchul L, Hill RP. Tumor hypoxia has independent predictor impact only in patients with node-negative cervix cancer. <i>J Clin Oncol.</i> 2002;20(3):680-7.
Fyles A, Milosevic M, Pintilie M, Syed A, Levin W, Manchul L, Hill RP. Long-term performance of interstitial fluid pressure and hypoxia as prognostic factors in cervix cancer. <i>Radiother Oncol.</i> 2006;80(2):132-7.
Fyles AW, Milosevic M, Pintilie M, Syed A, Hill RP. Anemia, hypoxia and transfusion in patients with cervix cancer: a review. <i>Radiother Oncol</i> 2000;57(1):13-9.
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. <i>Radiother Oncol.</i> 1998;48:149-156.
Gaffney DK, Haslam D, Tsodikov A, Hammond E, Seaman J, Holden J, Lee RJ, Zempolich K, Dodson M. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and vascular endothelial growth factor (VEGF) negatively affect overall survival in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy. <i>Int J Radiat Oncol Biol Phys.</i> 2003; 56(4):922-928.
Garzetti G, Ciavattini A, Lucarini G, Goteri G, de Nictolis M, Muzzioli M. MIB-1 immunostaining in stage I squamous cervical carcinoma: relationship with natural killer activity. <i>Gynecol Oncol</i> 1995; 58(1): 28-33.

Gasparini G, Bevilacqua P, Bonoldi E, Testolin A, Galassi A, Verderio P, Boracchi P, Guglielmi RB, Pezzella F. Predictive and prognostic markers in a series of patients with head and neck squamous cell invasive carcinoma treated with concurrent chemoradiation therapy. <i>Clin Cancer Res</i> 1995;1(11):1375-83.
Gavillon N, Vervaet H, Derniaux E, Terrosi P, Graesslin O, Quereux C. . [How did I contract human Papillomavirus (HPV <i>Gynecol Obstet Fertil</i> . 2010;38(3):199-204.
Gerber HP, Malik AK, Solar GP, Sherman D, Liang XH, Meng G, Hong K, Marsters JC, Ferrara N. VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. <i>Nature</i> . 2002;417(6892):954-958.
Gertler JP, Perry L, L'Italien G, Chung-Welch N, Cambria RP, Orkin R, Abbott WM. Ambient oxygen tension modulates endothelial fibrinolysis. <i>J Vasc Surg</i> . 1993 Dec;18(6):939-45; discussion 945-6.
Giaccia AJ, Kastan MB. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. <i>Genes Dev</i> . 1998;12(19):2973-83.
Girnita L, Girnita A, Larsson O. Mdm2-dependent ubiquitination and degradation of the insulin-like growth factor 1 receptor. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 2003; 100(14):8247-52.
Giorgioulou T, Florin L, Schäfer F, Streeck RE, Sapp M. Human Papillomavirus Infection Requires Cell Surface Heparan Sulfate. <i>J Virol</i> 2001; 75(3): 1565-70.
Goff BA, Paley PJ, Greer BE, Gown AM Evaluation of chemoresistance markers in women with epithelial ovarian carcinoma. <i>Gynecol Oncol</i> . 2001; 81(1):18-24.
Gombos Z, Xu X, Chu CS, Zhang PJ, Acs G. Peritumoral lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor C expression in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. <i>Clin Cancer Res</i> . 2005;11(23):8364-71.
Goncharuk IV, Vorobjova LI, Lukyanova NY, Chekhun VF. Vascular endothelial growth factor expression in uterine cervical cancer: correlation with clinicopathologic characteristics and survival. <i>Exp Oncol</i> . 2009 Sep;31(3):179-81.
Grabsch H, Dattani M, Barker L, Maughan N, Maude K, Hansen O, Gabbert HE, Quirke P, Mueller W. Expression of DNA double-strand break repair proteins ATM and BRCA1 predicts survival in colorectal cancer. <i>Clin Cancer Res</i> . 2006;12(5):1494-1500.
Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. <i>Nature</i> . 1996;379(6560):88-91.

Graflund M, Sorbe B, Bryne M, Karlsson M. The prognostic value of a histologic grading system, DNA profile, and MIB-1 expression in early stages of cervical squamous cell carcinomas. <i>Int J Gynecol Cancer</i> 2002; 12(2):149-57.
Gray SG, Stenfeldt Mathiasen I, de Meyts P. The insulin-like growth factors and insulin-signalling systems: an appealing target for breast cancer therapy? <i>Horm Metab Res</i> 2003; 35 (11-12):857-71.
Greijer AE, van der Wall E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. <i>J Clin Pathol.</i> 2004 Oct;57(10):1009-14.
Grigiene R, Aleknavicius E, Kurtinaitis J. [Prognostic value of anemia for patients with cervical cancer treated with irradiation] <i>Medicina (Kaunas).</i> 2005;41(11):916-24.
Grigiene R, Valuckas KP, Aleknavicius E, Kurtinaitis J, Letautiene SR. The value of prognostic factors for uterine cervical cancer patients treated with irradiation alone. <i>BMC Cancer.</i> 2007 Dec 22;7:234.
Grisaru D, Covens A, Chapman B, Shaw P, Colgan T, Murphy J, DePetrillo D, Lickrish G, Laframboise S, Rosen B. Does histology influence prognosis in patients with early-stage cervical carcinoma? <i>Cancer</i> 2001;92(12):2999-3004.
Grogan M, Thomas GM, Melamed I, Wong FL, Pearcey RG, Joseph PK, Portelance L, Crook J, Jones KD. The importance of hemoglobin levels during radiotherapy for carcinoma of the cervix. <i>Cancer</i> 1999;86(8):1528-36.
Gross C, Dubois-Pot H, Wasyluk B. The ternary complex factor Net/Elk-3 participates in the transcriptional response to hypoxia and regulates HIF-1 alpha. <i>Oncogene.</i> 2008 Feb 21;27(9):1333-41.
Gu Z, Matlashewski G. Effect of Human Papillomavirus Type 16 Oncogenes on MAP Kinase Activity. <i>J Virol</i> 1995; 69(12): 8051-6.
Gullo C, Au M, Feng G, Teoh G. The biology of Ku and its potential oncogenic role in cancer. <i>Biochim Biophys Acta.</i> 2006; 1765(2):223-234.
Haensgen G, Krause U, Becker A, Stadler P, Lautenschlaeger C, Wohlrab W, Rath FW, Molls M, Dunst J. Tumor hypoxia, p53, and prognosis in cervical cancers. <i>Int J Radiat Oncol Biol Phys.</i> 2001;50(4):865-72.
Hamill DR, Suprenant KA: Characterization of the sea urchin major vault protein: a possible role for vault ribonucleoprotein particles in nucleocytoplasmic transport. <i>Devel Biol</i> 1997, 190:117–128.
Hangaishi A, Ogawa S, Qiao Y, Wang L, Hosoya N, Yuji K, Imai Y, Takeuchi K, Miyawaki S, Hirai H. Mutations of Chk2 in primary hematopoietic neoplasms. <i>Blood.</i> 2002 Apr 15;99(8):3075-7.

Hansen S, Overgaard J, Rose C, Knoop A, Laenkholm AV, Andersen J, Sørensen FB, Andreassen PA. Independent prognostic value of angiogenesis and the level of plasminogen activator inhibitor type 1 in breast cancer patients. <i>Br J Cancer</i> .2003;88(1):102-8.
Hänsgen G, Hintner I, Krause V, Wohlrab W, Dunst J. Intratumor pO ₂ , S-phase fraction and p53 status in cervix carcinomas. <i>Strahlenther Onkol</i> . 1997;173(7): 385-387.
Harada T, Ogura S, Yamazaki K, Kinoshita I, Itoh T, Isobe H, Yamashiro K, Dosaka-Akita H, Nishimura M Predictive value of expression of P53, Bcl-2 and lung resistance-related protein for response to chemotherapy in non-small cell lung cancers. <i>Cancer Sci</i> . 2003; 94(4):394-399.
Harima Y, Sawada S, Miyazaki Y, Kin K, Ishihara H, Imamura M, Sougawa M, Shikata N, Ohnishi T. Expression of Ku80 in cervical cancer correlates with response to radiotherapy and survival. <i>Am J Clin Oncol</i> . 2003; 26(4):e80-5.
Harrington L., McPhail T., Mar V., Zhou W., Oulton R., Bass M. B. et al. (1997) A mammalian telomerase-associated protein [see comments]. <i>Science</i> 275: 973–977.
Hart IR. Cell adhesión, Motility and Cancer, capítulo 10. En <i>Molecular Biology for Oncologists</i> , editado por Yarnold JR, Stratton M y McMillan TJ. Chapman y Hall, 2ª edición, 1996. 103-111.
Hattori K, Heissig B, Wu Y, Dias S, Tejada R, Ferris B, Hicklin DJ, Zhu Z, Bohlen P, Witte L, Hendrikx J, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Werb Z, Lyden D, Rafii S Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment <i>Nat Med</i> .2002; 8(8):841-849.
Hausen H. Papillomaviruses Causing Cancer: Evasion From Host-Cell Control in Early Events in Carcinogenesis. Review. <i>JNCI</i> 2000; 92(9): 690-8.
Hawighorst H, Knapstein PG, Knopp MV, Weikel W, Schaeffer U, Zuna I, Schönberg SO, Essig M, Hoffmann U, Brix G, van Kaick G. [Angiogenesis of cervix carcinoma. Contrast enhanced dynamic MRI, histologic quantification of capillary density and lymphatic system infiltration] <i>Radiologe</i> . 1998; 38(1):50-57.
Hazelbag S, Kenter GG, Gorter A, Fleuren GJ. Prognostic relevance of TGF-beta1 and PAI-1 in cervical cancer. <i>Int J Cancer</i> . 2004;112(6):1020-8.
Hellman S, Rosenberg S. A. <i>Cancer principles and practise of oncology</i> , J.B. Lippincott: Philadelphia, 1999.
Herrmann C, Golkaramnay E, Inman E, et al.: Recombinant major vault protein is targeted to neuritic tips of PC12 cells. <i>J Cell Biol</i> 1999, 144:1163–1172.
Herrmann C, Volkandt W, Wittich B, Kellner R, Zimmermann H. The major vault protein (MVP100) is contained in cholinergic nerve terminals of electric ray electric organ. <i>J Biol Chem</i> . 1996 Jun 7;271(23):13908-15.

Hill RP, Fyles W, Milosevic M, Pintilie M, Tsang RW. Is there a relationship between repopulation and hypoxia/reoxygenation? Results from human carcinoma of the cervix. <i>Int J Radiat Biol.</i> 2003;79(7):487-94.
Hirano S, Ito N, Takahashi S, Tamaya T. Clinical implications of insulin-like growth factors through the presence of their binding proteins and receptors expressed in gynaecological cancers. <i>Eur J Gynaecol Oncol</i> 2004; 25(2):187-91.
Hirohashi S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. <i>Am J Pathol.</i> 1998;153(2):333-9.
Ho DM, Hsu CY, Chiang H. MIB-1 labeling index as a prognostic indicator for survival in patients with FIGO Stage IB Squamous cell carcinoma of the cervix. <i>Gynecologic oncology</i> 2000; 76(1):97-102.
Hochegger H, Dejsuphong D, Fukushima T, Morrison C, Sonoda E, Schreiber V, Zhao GY, Saberi A, Masutani M, Adachi N, Koyama H, de Murcia G, Takeda S. Parp-1 protects homologous recombination from interference by Ku and Ligase IV in vertebrate cells. <i>EMBO J.</i> 2006 Mar 22;25(6):1305-14.
Höckel M, Knoop C, Schlenger K, Vorndran B, Baussmann E, Mitze M, Knapstein PG, Vaupel P. Intratumoral pO ₂ predicts survival in advanced cancer of the uterine cervix. <i>Radiother Oncol.</i> 1993;26(1):45-50.
Höckel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. <i>Cancer Res.</i> 1996 ;56(19):4509-15.
Höckel M, Schlenger K, Höckel S and Vaupel P. Hypoxic Cervical Cancers with Low Apoptotic Index Are Highly Aggressive <i>Cancer Research.</i> 1999; 59, 4525-4528.
Höckel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. <i>J Natl Cancer Inst.</i> 2001;93(4):266-76.
Höckel S, Schlenger K, Vaupel P, Höckel M. Association between host tissue vascularity and the prognostically relevant tumor vascularity in human cervical cancer <i>Int J Oncol.</i> 2001;19(4):827-832.
Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer S. Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 1991; 88 (16):6961-5.
Holmgren SC, Patterson NA, Ozbun MA, Lambert PF. The Minor Capsid Protein L2 Contributes to Two Steps in the Human Papillomavirus Type 31 Life Cycle. <i>J Virol</i> 2005; 79(7): 3938-48.

<p>Homma A, Furuta Y, Oridate N, Nakano Y, Kohashi G, Yagi K, Nagahashi T, Yagi K, Nagahashi T, Fukuda S, Inoue K, Inuyama Y. Prognostic significance of clinical parameters and biological markers in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck treated with concurrent chemoradiotherapy. <i>Clin Cancer Res</i> 1999;5(4):801-6.</p>
<p>Hopkins MP, Morley GW. A comparison of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix. <i>Obstet Gynecol</i> 1991;77(6):912-7.</p>
<p>Hsu HL, Gilley D, Blackburn EH, Chen DJ. Ku is associated with the telomere in mammals. <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i>. 1999 Oct 26;96(22):12454-8.</p>
<p>http://www.fisicanet.com.ar/biologia/informacion_genetica/ap1/ciclo_celular03.jpg</p>
<p>Hubbard SR, Till JH. Protein tyrosine kinase structure and function. <i>Annu Rev Biochem</i> 2000; 69:373-98.</p>
<p>Hutchison GJ, Valentine HR, Loncaster JA, Davidson SE, Hunter RD, Roberts SA, Harris AL, Stratford IJ, Price PM, West CM. Hypoxia-inducible factor 1alpha expression as an intrinsic marker of hypoxia: correlation with tumor oxygen, pimonidazole measurements, and outcome in locally advanced carcinoma of the cervix. <i>Clin Cancer Res</i>. 2004;10(24):8405-12.</p>
<p>International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Comparison of risk factors for invasive squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix: collaborative reanalysis of individual data on 8,097 women with squamous cell carcinoma and 1,374 women with adenocarcinoma from 12 epidemiological studies. <i>Int J Cancer</i>. 2007, 15;120(4):885-91.</p>
<p>Ishikawa T, Furihata M, Ohtsuki Y, Murakami H, Inoue A, Ogoshi S. Cyclin: D1 overexpression related to retinoblastoma protein expression as a prognostic marker in human oesophageal squamous cell carcinoma. <i>Br J Cancer</i> 1998; 77(1):92-7.</p>
<p>Isogai C, Laug WE, Shimada H, Declerck PJ, Stins MF, Durden DL, Erdreich-Epstein A, DeClerck YA. Plasminogen activator inhibitor-1 promotes angiogenesis by stimulating endothelial cell migration toward fibronectin. <i>Cancer Res</i>. 2001 Jul 15;61(14):5587-94.</p>
<p>Ivanchuk SM, Rutka JT. The cell cycle: accelerators, brakes, and checkpoints. <i>Neurosurgery</i> 2004;54(3):692-699; discussion 699-700.</p>
<p>Izquierdo MA, Scheffer GL, Flens MJ, Giaccone G, Broxterman HJ, Meijer CJ, van der Valk P, Scheper RJ. Broad distribution of the multidrug resistance-related vault lung resistance protein in normal human tissues and tumors. <i>Am J Pathol</i>. 1996; 148(3):877-887.</p>
<p>Izquierdo MA, van der Zee AG, Vermorken JB, van der Valk P, Belien JA, Giaccone G, Scheffer GL, Flens MJ, Pinedo HM, Kenemans P, et al. Drug resistance-associated marker Lrp for prediction of response to chemotherapy and prognoses in advanced ovarian carcinoma. <i>J Natl Cancer Inst</i>. 1995; 87(16):1230-1237.</p>

Izquierdo, M. A., Scheffer, G. L., Flens, M. J., Shoemaker, R. H., Rome, L. H., and Scheper, R. J. (1996) Relationship of LRP-human major vault protein to in vitro and clinical resistance to anticancer drugs. <i>Cytotechnology</i> 19, 191–197.
Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. <i>Cell</i> 1997; 88 (3):347-54.
Jean L., Risler J. L., Nagase T., Coulouarn C., Nomura N. and Salier J. P. (1999) The nuclear protein PH5P of the inter-alpha-inhibitor superfamily: a missing link between poly(ADP-ribose) polymerase and the inter-alpha-inhibitor family and a novel actor of DNA repair? <i>FEBS Lett.</i> 446: 6–8.
Joyce JA. Therapeutic targeting of the tumor microenvironment <i>Cancer Cell.</i> 2005; 7(6):513-520.
Kader AS, Lim JT, Berthelet E, Petersen R, Ludgate D, Truong PT. Prognostic significance of blood transfusions in patients with esophageal cancer treated with combined chemoradiotherapy. <i>Am J Clin Oncol.</i> 2007;30(5):492-7.
Kaku T, Hirakawa T, Kamura T, Amada S, Kinukawa N, Kobayashi H, Sakai K, Ariyoshi K, Sonoda K, Nakano H. Angiogenesis in adenocarcinoma of the uterine cervix <i>Cancer.</i> 1998; 83(7):1384-1390.
Kalantari M, Blennow E, Hagmar B, Johansson B. Physical state of HPV16 and chromosomal mapping of the integrated form in cervical carcinomas. <i>Diagn Mol Pathol.</i> 2001;10(1):46-54.
Kang JO, Hong SE. The prognostic effect of VEGF expression in squamous cell carcinoma of the cervix treated with radiation therapy alone. <i>J Korean Med Sci.</i> 2004; 19(5):693-697.
Kataoka T, Ito M, Budd RC, Tschopp J, Nagai K. Expression level of c-FLIP versus Fas determines susceptibility to Fas ligand-induced cell death in murine thymoma EL-4 cells. <i>Exp Cell Res.</i> 2002 Feb 15;273(2):256-64.
Kawasaki M, Nakanishi Y, Kuwano K, Yatsunami J, Takayama K, Hara N. The utility of p53 immunostaining of transbronchial biopsy specimens of lung cancer: p53 overexpression predicts poor prognosis and chemoresistance in advanced non-small cell lung cancer. <i>Clin Cancer Res.</i> 1997; 3(7):1195-1200.
Kedersha NL, Heuser JE, Chugani DC, Rome LH. Vaults. III. Vault ribonucleoprotein particles open into flower-like structures with octagonal symmetry. <i>J Cell Biol.</i> 1991 Jan;112(2):225-35.
Kedersha NL, Miquel MC, Bittner D, Rome LH. Vaults. II. Ribonucleoprotein structures are highly conserved among higher and lower eukaryotes. <i>J Cell Biol.</i> 1990 Apr;110(4):895-901.
Kedersha NL, Rome LH. Isolation and characterization of a novel ribonucleoprotein particle: large structures contain a single species of small RNA. <i>J Cell Biol.</i> 1986 Sep;103(3):699-709.

Kerr JF, Searle J. A suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal-cell carcinomas that contain numerous mitotic figures. <i>J Pathol</i> 1972; 107(1):41-4.
Kickhoefer V. A., Searles R. P., Kedersha N. L., Garber M. E., Johnson D. L. and Rome L. H. (1993) Vault ribonucleoprotein particles from rat and bullfrog contain a related small RNA that is transcribed by RNA polymerase III. <i>J. Biol. Chem.</i> 268:7868–7873.
Kickhoefer V. A., Siva A. C., Kedersha N. L., Inman E. M., Ruland C., Streuli M. et al. (1999) The 193-kD vault protein, VPARP, is a novel poly(ADP-ribose) polymerase. <i>J. Cell Biol.</i> 146: 917–928.
Kickhoefer V. A., Stephen A. G., Harrington L., Robinson M. O. and Rome L. H. (1999) Vaults and telomerase share a common subunit, TEP1. <i>J. Biol. Chem.</i> 274: 32712–32717.
Kickhoefer VA, Rajavel KS, Scheffer GL, Dalton WS, Scheper RJ, Rome LH. Vaults are up-regulated in multidrug-resistant cancer cell lines. <i>J Biol Chem.</i> 1998 Apr 10; 273(15):8971-4.
Kietzmann T, Roth U, Jungermann K. Induction of the plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by mild hypoxia via a hypoxia response element binding the hypoxia-inducible factor-1 in rat hepatocytes. <i>Blood.</i> 1999 Dec 15;94(12):4177-85.
Kim CY, Tsai MH, Osmanian C, Graeber TG, Lee JE, Giffard RG, DiPaolo JA, Peehl DM, Giaccia AJ. Selection of human cervical epithelial cells that possess reduced apoptotic potential to low-oxygen conditions. <i>Cancer Res.</i> 1997 Oct 1;57(19):4200-4.
Kim HJ, Kim WC. Pretreatment tumor diameter/volume and pelvic lymph node status assessed by magnetic resonance imaging for uterine cervical carcinoma treated with concurrent chemotherapy and radiotherapy. <i>J Obstet Gynaecol Res.</i> 2008 Aug;34(4):529-37.
Kim YT, Kim SW, Yoon BS, Cho HJ, Nahm EJ, Kim SH, Kim JH, Kim JW. Effect of intravenously administered iron sucrose on the prevention of anemia in the cervical cancer patients treated with concurrent chemoradiotherapy. <i>Gynecol Oncol.</i> 2007;105(1):199-204.
Kisseljov FL. Virus-associated human tumors: cervical carcinomas and papilloma viruses. <i>Biochemistry.</i> 2000;65(1):68-77. Translated from <i>Biokhimiya.</i> 2000;65(1):79-91.
Kitahara O, Katagiri T, Tsunoda T, Harima Y, Nakamura Y. Classification of sensitivity or resistance of cervical cancers to ionizing radiation according to expression profiles of 62 genes selected by cDNA microarray analysis. <i>Neoplasia.</i> 2002; 4(4):295-303.
Knocke TH, Weitmann HD, Feldmann HJ, Selzer E, Pötter R. Intratumoral pO ₂ -measurements as predictive assay in the treatment of carcinoma of the uterine cervix. <i>Radiother Oncol.</i> 1999;53(2):99-104.
Kobayashi H, Fujishiro S, Terao T Impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type 1 on prognosis in cervical cancer of the uterus. <i>Cancer Res.</i> 1994;54(24):6539-48.

Koike M, Shiomi T, Koike A. Ku70 can translocate to the nucleus independent of Ku80 translocation and DNA-PK autophosphorylation. <i>Biochem Biophys Res Commun.</i> 2000; 276(3):1105-1111.
Kolli S, Zito CI, Mossink MH, Wiemer EA, Bennett AM. The major vault protein is a novel substrate for the tyrosine phosphatase SHP-2 and scaffold protein in epidermal growth factor signaling. <i>J Biol Chem.</i> 2004 Jul 9;279(28):29374-85.
Komuro Y, Watanabe T, Hosoi Y, Matsumoto Y, Nakagawa K, Tsuno N, Kazama S, Kitayama J, Suzuki N, Nagawa H. The expression pattern of Ku correlates with tumor radiosensitivity and disease free survival in patients with rectal carcinoma. <i>Cancer.</i> 2002; 95 (6):1199-1205.
Kong L. B., Siva A. C., Kickhoefer V. A., Rome L. H. and Stewart P. L. (2000) RNA location and modeling of a WD40 repeat domain within the vault. <i>RNA</i> 6: 890–900.
Kong LB, Siva AC, Rome LH, Stewart PL. Structure of the vault, a ubiquitous cellular component. <i>Structure.</i> 1999 Apr 15;7(4):371-9.
Kopfstein L, Christofori G. Metastasis:cell-autonomous mechanisms versus contributions by the tumor microenvironment. <i>Cell Mol Life Sci.</i> 2006;63(4):449-68.
Korabiowska M, Voltmann J, Honig JF, Bortkiewicz P, Konig F, Cordon-Cardo C, Jenckel F, Ambrosch P, Fischer G. Altered expression of DNA double-strand repair genes Ku70 and Ku80 in carcinomas of the oral cavity. <i>Anticancer Res.</i> 2006; 26(3A):2101-2105.
Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, Merry DE, Oltvai ZN. Bcl-2/bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. <i>Sem Canc Biol</i> 1993; 4(6): 327-32.
Kortlever RM, Nijwening JH, Bernards R. Transforming growth factor-beta requires its target plasminogen activator inhibitor-1 for cytostatic activity. <i>J Biol Chem.</i> 2008 Sep 5;283(36):24308-13.
Koukourakis MI, Giatromanolaki A, O'Byrne KJ, Whitehouse RM, Talbot DC, Gatter KC, Harris AL. Potential role of bcl-2 as a suppressor of tumour angiogenesis in non-small-cell lung cancer. <i>Int J Cancer.</i> 1997 Dec 19;74(6):565-70.
Kowalski, M. P., Dubouix-Bourandy, A., Bajmoczy, M., Golan, D. E., Zaidi, T., Coutinho-Sledge, Y. S., Gygi, M. P., Gygi, S. P., Wiemer, E. A., and Pier, G. B. (2007) Host resistance to lung infection mediated by major vault protein in epithelial cells. <i>Science</i> 317, 130–132.
Kulik G, Klippel A, Weber MJ. Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase and Akt. <i>Mol Cell Biol</i> 1997; 17(3):1595-606.
Kwaan HC, Wang J, Svoboda K, Declerck PJ. Plasminogen activator inhibitor 1 may promote tumour growth through inhibition of apoptosis. <i>Br J Cancer.</i> 2000 May;82(10):1702-8.
Kyriakos M, Kempson RL, Pérez CA. Carcinoma of the cervix in young women. I. Invasive carcinoma. <i>Obstet Gynecol</i> 1971;38(6):930-44.

Lanciano RM, Pajak TF, Martz K, Hanks GE. The influence of treatment time on outcome for squamous cell cancer of the uterine cervix treated with radiation: a patterns-of-care study. <i>Int J. Radiat. Oncol. Biol. Phys</i> 1993; 25(3):391-7.
Landoni F, Bocciolone L, Perego P. Cancer of the cervix, FIGO stages IB and IIA: patterns of local growth and paracervical extension. <i>Int J Gynecol Cancer</i> 1995; 5(5):329-34.
Lane DP: Cancer: A death in the life of p53. <i>Nature</i> 362:786-787, 1993.
Lane DP: Cancer: p53, guardian of the genome. <i>Nature</i> 358:15-16, 1992.
Lansdorp PM. Repair of telomeric DNA prior to replicative senescence. <i>Mech Ageing Dev.</i> 2000 Sep 1;118(1-2):23-34.
Lara P.C, Navarro D, Lloret M. Proliferación tumoral. <i>Biocancer.com</i> 2004; volumen 1.
Lara PC, Lloret M, Clavo B, Apolinario RM, Bordón E, Rey A, Falcón O, Alonso AR, Belka C. Hypoxia downregulates Ku70/80 expression in cervical carcinoma tumors. <i>Radiother Oncol.</i> 2008 Nov;89(2):222-6.
Lartigau E. [Angiogenesis and radiotherapy (vessels, anaemia, oxygen and radiosensitivity)] <i>Bull Cancer.</i> 2007;94 Spec No:S197-202.
Lavey R, Dempsey H. Erythropoietin increases haemoglobin in cancer patients during radiation therapy. <i>Int J Radiation Oncology Biol Phys</i> 1993;27: 1147- 1152.
Le Couter J, Moritz DR, Li B, Phillips GL, Liang XH, Ge r b e r HP, H i l l a n K J , F e r r a r a N. Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. <i>Science.</i> 2003;299(5608):890-893.
Leber MF, Efferth T. Molecular principles of cancer invasion and metastasis (review). <i>Int J Oncol.</i> 2009 Apr;34(4):881-95.
Lee IJ, Park KR, Lee KK, Song JS, Lee KG, Lee JY, Cha DS, Choi HI, Kim DH, Deung YK. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in Stage IB carcinoma of the uterine cervix <i>Int J Radiat Oncol Biol Phys.</i> 2002;54(3):768-779.
Lee JS, Choi YD, Lee JH, Nam JH, Choi C, Lee MC, Park CS, Juhng SW, Kim HS, Min KW Expression of cyclooxygenase-2 in adenocarcinomas of the uterine cervix and its relation to angiogenesis and tumor growth <i>Gynecol Oncol.</i> 2004;95(3):523-529.
Lee KA, Kang JW, Shim JH, Kho CW, Park SG, Lee HG, Paik SG, Lim JS, Yoon DY. Protein profiling and identification of modulators regulated by human papillomavirus 16 E7 oncogene in HaCaT keratinocytes by proteomics. <i>Gynecol Oncol.</i> 2005; 99(1):142-152.

Lee SW, Cho KJ, Park JH, Kim SY, Nam SY, Lee BJ, Kim SB, Choi SH, Kim JH, Ahn SD, Shin SS, Choi EK, Yu E. Expressions of Ku70 and DNA-PKcs as prognostic indicators of local control in nasopharyngeal carcinoma. <i>Int J Radiat Oncol Biol Phys.</i> 2005; 62 (5):1451-1457.
Lenczewski A, Terlikowski SJ, Sulkowska M, Famulski W, Sulkowski S, Kulikowski M. Prognostic significance of CD34 expression in early cervical squamous cell carcinoma. <i>Folia Histochem Cytobiol.</i> 2002;40(2):205-206.
Lens SM, Kataoka T, Fortner KA, Tinel A, Ferrero I, MacDonald RH, Hahne M, Beermann F, Attinger A, Orbea HA, Budd RC, Tschopp J. <i>Mol Cell Biol.</i> 2002 Aug;22(15):5419-33.
Leskov KS, Klokov DY, Li J, Kinsella TJ, Boothman DA. Synthesis and functional analyses of nuclear clusterin, a cell death protein. <i>J Biol Chem.</i> 2003;28;278(13):11590-600.
Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumor suppressor gene. <i>Nature</i> 1991; 351(6326): 453-6.
Li JY, Volkandt W, Dahlstrom A, et al.: Axonal transport of ribonucleoprotein particles (vaults). <i>Neuroscience</i> 1999, 91:1055–1065.
Linderholm B, Tavelin B, Grankvist K, Henriksson R. Vascular endothelial growth factor is of high prognostic value in node-negative breast carcinoma. <i>J Clin Oncol.</i> 1998;16(9):3121-3128.
Ling Peh W, Middleton K, Christensen N, Nicholls P, Egawa K, Sotlar K, et al. Life Cycle Heterogeneity in Animal Models of Human Papillomavirus- Associated Disease. <i>J Virol</i> 2002; 76(20): 10401-16.
Linn SC, Pinedo HM, van Ark-Otte J, van der Valk P, Hoekman K, Honkoop AH, Vermorken JB, Giaccone G. Expression of drug resistance proteins in breast cancer, in relation to chemotherapy. <i>Int J Cancer.</i> 1997; 71(5):787-795.
Littlewood T J. Erythropoietin for the treatment of anemia associated with hematological malignancy. <i>Hematological Oncology.</i> 2001;19:19-30.
Liu SS, Tsang BK, Cheung AN, Xue WC, Cheng DK, Ng TY, Wong LC, Ngan HY. Anti-apoptotic proteins, apoptotic and proliferative parameters and their prognostic significance in cervical carcinoma. <i>Eur J Cancer</i> 2001; 37(9):1104-10.
Llorca, J, P Rodriguez-Cundin, T Dierssen-Sotos, D Prieto-Salceda, 2006, Cervical cancer mortality is increasing in Spanish women younger than 50: <i>Cancer letters</i> , v. 240, p. 36-40.
Lloret M, Apolinario R, Clavo B, Santana C, Falcón O, Lara P.C .Proliferación tumoral en cáncer de cérvix. Angiogenesis y regulación génica. Hipoxia tumoral: relación con la proliferación y la apoptosis. <i>Carcinoma infiltrante de Cérvix: de los aspectos clínicos a la investigación aplicada.</i> Editorial Bristol-Myers, S.A 2001; D.L:M-15738. Capítulo 4:73-87.
Lloret M, Pérez S, Santana C, Lera J, Rey A, Falcón O, Lara P.C. 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. Carcinoma infiltrante de Cérvix: de los aspectos clínicos a la investigación aplicada. Editorial Bristol-Myers,S.A 2001; D.L:M-15738.Capítulo 3:53-69.
Lloret M, Lara PC, Bordón E, Pinar B, Rey A, Falcón O, Molano F, Hernández MA. IGF-1R expression in localized cervical carcinoma patients treated by radiochemotherapy. <i>Gynecol Oncol.</i> 2007 Jul;106(1):8-11.
Lloret M, Lara PC, Bordón E, Rey A, Falcón O, Apolinario RM, Clavo B, Ruiz A. MVP expression is related to IGF1-R in cervical carcinoma patients treated by radiochemotherapy. <i>Gynecol Oncol.</i> 2008 Sep;110(3):304-7.
Lockshin RA, Zakeri Z. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. <i>Nat Rev Mol Cell Biol</i> 2001; 2(7): 545-50.
Loncaster JA, Cooper RA, Logue JP, Davidson SE, Hunter RD, West CM Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is a prognostic factor for radiotherapy outcome in advanced carcinoma of the cervix. <i>Br J Cancer.</i> 2000;83(5):620-625.
Loncaster JA, Harris AL, Davidson SE, Logue JP,Hunter RD, Wycoff CC, Pastorek J, Ratcliffe PJ,Stratford IJ, West CM. Carbonic anhydrase (CA IX) expression, a potential new intrinsic marker of hypoxia: correlations with tumor oxygen measurements and prognosis in locally advanced carcinoma of the cervix. <i>Cancer Res.</i> 2001;61(17):6394-9.
Look MP, van Putten WL, Duffy MJ, Harbeck N, Christensen IJ, Thomssen C, Kates R, Spyrtos F, Fernö M, Eppenberger-Castori S, Sweep CG, Ulm K, Peyrat JP, Martin PM et al..Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients. <i>J Natl Cancer Inst.</i> 2002;94(2):116-28.
Lyng H, Sundfjør K, Rofstad EK. Oxygen tension in human tumours measured with polarographic needle electrodes and its relationship to vascular density, necrosis and hypoxia. <i>Radiother Oncol.</i> 1997;44(2): 163-169.
Lyng H, Sundfjør K, Tropé C, Rofstad EK. Disease control of uterine cervical cancer: relationships to tumor oxygen tension, vascular density, cell density, and frequency of mitosis and apoptosis measured before treatment and during radiotherapy. <i>Clin Cancer Res.</i> 2000;6(3):1104-12.
Macaulay VM, Salisbury AJ, Bohula EA, Playford MP, Smorodinsky NI, Shiloh Y, Downregulation of the type 1 insulin-like growth factor receptor in mouse melanoma cells is associated with enhanced radiosensitivity and impaired activation of Atm kinase. <i>Oncogene</i> 2001; 20(30):4029-40.
Machado JC, Soares P, Carneiro F, Rocha A, Beck S, Blin N, Berx G, Sobrinho-Simões M.E-cadherin gene mutations provide a genetic basis for the phenotypic divergence of mixed gastric carcinomas. <i>Lab Invest</i> 1999; 79(4):459-65.
Majno G,Joris I.Apoptosis, Oncosis, and Necrosis.An overview of cell death. <i>A J P</i> 1995; 146:3-15.

<p>Martin-Loeches M, Ortí RM, Asins E, Llixiona J. The prognostic implications of anaemia in the outcome of patients with early stages of uterine cervix carcinoma. <i>Arch Gynecol Obstet.</i> 2003;267(3):121-5.</p>
<p>Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jurgensmeier JM, Susin SA, Vieira HL, Prevost MC, Xie Z, Matsuyama S, Reed JC, Kroemer G. Bax and adenine nucleotide translocator cooperative in the mitochondrial control of apoptosis. <i>Science</i> 1998; 281(5385):2027-31.</p>
<p>Masamha CP, Benbrook DM. Cyclin D1 degradation is sufficient to induce G1 cell cycle arrest despite constitutive expression of cyclin E2 in ovarian cancer cells. <i>Cancer Res.</i> 2009, 15;69(16):6565-72.</p>
<p>Masterson PJ, Stanley MA, Lewis AP, Romanos MA. A C-Terminal Helicase Domain of the Human Papillomavirus E1 Protein Binds E2 and the DNA Polymerase α-Primase p68 Subunit. <i>J Virol</i> 1998;72(9): 7407-19.</p>
<p>Mattern J, Volm M: Multiple pathway drug resistance(Review). <i>Int J Oncol</i> 1993, 2:557-561.</p>
<p>Mawson A, Lai A, Carroll JS, Sergio CM, Mitchell CJ, Sarcevic B. Estrogen and insulin/IGF-1 cooperatively stimulate cell cycle progression in MCF-7 breast cancer cells through differential regulation of c-Myc and cyclin D1. <i>Mol Cell Endocrinol</i> 2005;229(1-2):161-73.</p>
<p>May P and May E: Twenty years of p53 research. Structural and functional aspects of the p53 protein. <i>Oncogene</i> 1999;18(53):7621-36.</p>
<p>Mayer A, Wree A, Höckel M, Leo C, Pilch H, Vaupel P. Lack of correlation between expression of HIF-1α protein and oxygenation status in identical tissue areas of squamous cell carcinomas of the uterine cervix. <i>Cancer Res.</i> 2004;64(16):5876-81.</p>
<p>McClintock DS, Santore MT, Lee VY, Brunelle J, Budinger GR, Zong WX, Thompson CB, Hay N, Chandel NS. Bcl-2 family members and functional electron transport chain regulate oxygen deprivation-induced cell death. <i>Mol Cell Biol.</i> 2002 Jan;22(1):94-104.</p>
<p>Meijer GA, Schroeijers AB, Flens MJ, Meuwissen SG, van der Valk P, Baak JP, Scheper RJ. Increased expression of multidrug resistance related proteins Pgp, MRP1, and LRP/MVP occurs early in colorectal carcinogenesis. <i>J Clin Pathol.</i> 1999; 52(6):450-454.</p>
<p>Memarzadeh S, Natarajan S, Dandade DP, Ostrzega N, Saber PA, Busuttil A, Lentz SE, Berek JS. Lymphovascular and perineural invasion in the parametria: a prognostic factor for early-stage cervical cancer <i>Obstet Gynecol</i> 2003;102(3):612-9.</p>
<p>Meng AX, Jalali F, Cuddihy A, Chan N, Bindra RS, Glazer PM, Bristow RG. Hypoxia down-regulates DNA double strand break repair gene expression in prostate cancer cells. <i>Radiother Oncol.</i> 2005 Aug;76(2):168-76.</p>

Meng S, Lin L, Lama S, Qiao M, Tuor UI. Cerebral expression of DNA repair protein, Ku70, and its association with cell proliferation following cerebral hypoxia-ischemia in neonatal rats. <i>Int J Dev Neurosci.</i> 2009 Apr;27(2):129-34.
Meyer T, Hart IR. Mechanisms of tumour metastasis. <i>Eur J Cancer.</i> 1998 ;34(2):214-221.
Michalides RJ, Van veelen NM, Kristel PM, Hart AA, Loftus BM, Hilgers FJ, Balm AJ. Overexpression of cyclin D1 indicates a poor prognosis in squamous cell carcinoma of the head and neck. <i>Arch Otolaryngol Head Neck Surg</i> 1997; 123(5):497-502.
Middleton K, Peh W, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Nakahara T, et al. Organization of Human Papillomavirus Productive Cycle during Neoplastic Progression Provides a Basis for Selection of Diagnostic Markers. <i>J Virol</i> 2003; 77(19): 10186-201.
Mikulski SM. Pathogenesis of cancer in view of mutually opposing apoptotic and anti-apoptotic growth signals (Review). <i>Int J Oncol</i> 1994;4:1257-63.
Mitchell PA, Waggoner S, Rotmensch J, Mundt AJ. Cervical cancer in the elderly treated with radiation therapy. <i>Gynecol Oncol</i> 1998;71(2):291-98.
Mitsuhashi A, Suzuka K, Yamazawa K, Matsui H, Seki K, Sekiya S. Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C levels as tumor markers in patients with cervical carcinoma. <i>Cancer.</i> 2005;103(4):724-30.
Miwa M, Masutani M. PolyADP-ribosylation and cancer. <i>Cancer Sci.</i> 2007 Oct;98(10):1528-35.
Moran E, Cleary I, Larkin AM, Amhlaioibh RN, Masterson A, Scheper RJ, Izquierdo MA, Center M, O'Sullivan F, Clynes M. Co-expression of MDR-associated markers, including P-170, MRP and LRP and cytoskeletal proteins, in three resistant variants of the human ovarian carcinoma cell line, OAW42. <i>Eur J Cancer.</i> 1997 Apr;33(4):652-60.
Morris SM: a role for p53 in the frequency and mechanism of mutations. <i>Mutat Res</i> 2002; 511(1):45-62.
Mossink MH, van Zon A, Scheper RJ, Sonneveld P, Wiemer EA. Vaults: a ribonucleoprotein particle involved in drug resistance? <i>Oncogene.</i> 2003;22(47):7458-7467.
Mossink MH, de Groot J, van Zon A, Fränzel-Luiten E, Schoester M, Scheffer GL, Sonneveld P, Scheper RJ, Wiemer EA. Unimpaired dendritic cell functions in MVP/LRP knockout mice. <i>Immunology.</i> 2003 Sep;110(1):58-65.
Motsch, N., Pfuhl, T., Mrazek, J., Barth, S., and Grasser, F. A. (2007) Epstein-Barr Virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1) induces the expression of the cellular microRNA miR-146a. <i>RNA Biol.</i> 4, 131–137.

Mrazek, J., Kreutmayer, S. B., Grasser, F.A., Polacek, N., and Huttenhofer, A. (2007) Subtractive hybridization identifies novel differentially expressed ncRNA species in EBV-infected human B cells. <i>Nucleic Acids Res.</i> 2007;35(10):e73.
Mueller TJ, Wu H, Greenberg RE, Hudes G, Topham N, Lessin SR, Uzzo RG. Cutaneous metastases from genitourinary malignancies. <i>Urology.</i> 2004;63(6):1021-6.
Muller C, Paupert J, Monferran S, Salles B The double life of the Ku protein: facing the DNA breaks and the extracellular environment. <i>Cell Cycle.</i> 2005; 4(3):438-441.
Myung K, Ghosh G, Fattah FJ, Li G, Kim H, Dutia A, Pak E, Smith S, Hendrickson EA. Regulation of telomere length and suppression of genomic instability in human somatic cells by Ku86. <i>Mol Cell Biol.</i> 2004; 24(11):5050-5059.
Nakahara T, Nishimura A, Tanaka M, ueno T, Ishimoto A, Sakai H. Modulation of the Cell Division Cycle by Human Papillomavirus Type 18 E4. <i>J Virol</i> 2002; 76(21): 10914-20.
Nakamura M, Miyamoto S, Maeda H, Zhang SC, Sangai T, Ishii G, Hasebe T, Endoh Y, Saito N, Asaka M, Ochiai A. Low levels of insulin-like growth factor type 1 receptor expression at cancer cell membrane predict liver metastasis in Dukes' C human colorectal cancers. <i>CI in Cancer Res</i> 2004;10(24):8434-41.
Nakano T, Oka K, Ishikawa A, Morita S. Immunohistochemical prediction of radiation response and local control in radiation therapy for cervical cancer. <i>Cancer Detect Prev</i> 1998;22(2):120-8.
Nakayama J., Saito M., Nakamura H., Matsuura A. and Ishikawa F. (1997) TLP1: a gene encoding a protein component of mammalian telomerase is a novel member of WD repeats family. <i>Cell</i> 88: 875-884.
Narayan K, Fisher R, Bernshaw D. Significance of tumor volume and corpus uteri invasion in cervical cancer patients treated by radiotherapy. <i>Int J Gynecol Cancer</i> 2006;16(2):623-30.
Narayan K, Fisher RJ, Bernshaw D, Shakher R, Hicks RJ. Patterns of failure and prognostic factor analyses in locally advanced cervical cancer patients staged by positron emission tomography and treated with curative intent. <i>Int J Gynecol Cancer.</i> 2009 Jul;19(5):912-8.
Narita M, Shimizu S, Ito T, Chittenden T, Lutz RJ, Matsuda H, Tsujimoto Y. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. <i>Proceedings of the National Academy of Sciences, USA</i> 1998; 95(25): 14681-6.
Navarro, Baserga. Limited redundancy of survival signals from the type 1 insulin-like growth factor receptor. <i>Endocrinology</i> 2001; 142(3):1073-81.
Nicolson GL, Dulski K, Basson C, Welch DR. Preferential organ attachment and invasion in vitro by B16 melanoma cells selected for differing metastatic colonization and invasive properties. <i>Invasion Metastasis.</i> 1985;5(3):144-58

Nordmark M, Loncaster J, Aquino-Parsons C, Chou SC, Gebiski V, West C, Lindegaard JC, Havsteen H, Davidson SE, Hunter R, Raleigh JA, Overgaard J. The prognostic value of pimonidazole and tumour pO ₂ in human cervix carcinomas after radiation therapy: a prospective international multi-center study. <i>Radiother Oncol.</i> 2006;80(2):123-31.
Obermair A, Cheuk R, Horwood K, Janda M, Bachtiry B, Schwanzelberger B, Stoiber A, Nicklin JL, Perrin LC, Crandon AJ. Impact of hemoglobin levels before and during concurrent chemoradiotherapy on the response of treatment in patients with cervical carcinoma: preliminary results. <i>Cancer.</i> 2001;92(4):903-8.
Obermair A, Wanner C, Bilgi S, Speiser P, Kaider A, Reinthaller A, Leodolter S, Gitsch G. Tumor angiogenesis in stage IB cervical cancer: correlation of microvessel density with survival. <i>Am J Obstet Gynecol.</i> 1998;178(2):314-319.
Oda Y, Kohashi K, Yamamoto H, Tamiya S, Kohno K, Kuwano M, Iwamoto Y, Tajiri T, Taguchi T, Tsuneyoshi M. <i>Cancer Sci.</i> 2008 Apr;99(4):726-32.
Odunski KO, Lele S, Ghamande S, Seago P, Driscoll DL. The impact of pre-therapy extraperitoneal surgical staging on the evaluation and treatment of patients with locally advanced cervical cancer. <i>Eur J Gynaecol Oncol</i> 2001;22(5):325-30.
Ogino I, Okamoto N, Andoh K, Kitamura T, Okajima H, Matsubara S. Analysis of prognostic factors in stage IIB. IVA cervical carcinoma treated with radiation therapy: value of computed tomography. <i>Int J Radiat Oncol Biol Phys</i> 1997; 37(5):1071-7.
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. <i>Cancer</i> 1996; 77(11):2280-85.
Oka K, Suzuki Y, Nakano T. High growth fraction at 9 grays of radiotherapy is associated with a good prognosis for patients with cervical squamous cell carcinoma. <i>Cancer (Phila.)</i> 2000; 89(7):1526-31.
Organización mundial de la salud. Control integral del cáncer cervicouterino: guía de prácticas esenciales. 2007; 1:p29.
Padovan P, Salmaso R, Marchetti M, Padovan R. Prognostic value of bcl-2, p53 and ki-67 in invasive squamous carcinoma of the uterine cervix. <i>Eur J Gynaecol Oncol</i> 2000;21(3):267-72.
Paley PJ, Staskus KA, Gebhard K, Mohanraj D, Twiggs LB, Carson LF, Ramakrishnan S. Vascular endothelial growth factor expression in early stage ovarian carcinoma. <i>Cancer.</i> 1997;80(1):98-106.
Pappot H, Pedersen AN, Brünner N, Christensen IJ. The complex between urokinase (uPA) and its type-1 inhibitor (PAI-1) in pulmonary adenocarcinoma: relation to prognosis. <i>Lung Cancer.</i> 2006;51(2):193-200.

<p>Park SY, Jeong KJ, Lee J, Yoon DS, Choi WS, Kim YK, Han JW, Kim YM, Kim BK, Lee HY. Hypoxia enhances LPA-induced HIF-1α and VEGF expression: their inhibition by resveratrol. <i>Cancer Lett.</i> 2007 Dec 8;258(1):63-9.</p>
<p>Pavón MA, Parreño M, León X, Sancho FJ, Céspedes MV, Casanova I, Lopez-Pousa A, Mangués MA, Quer M, Barnadas A, Mangués R. Ku70 predicts response and primary tumor recurrence after therapy in locally advanced head and neck cancer. <i>Int J Cancer.</i> 2008 Sep 1;123(5):1068-79.</p>
<p>Peng L, Bhatia N, Parker AC, Zhu Y, Fay WP. Endogenous vitronectin and plasminogen activator inhibitor-1 promote neointima formation in murine carotid arteries. <i>Arterioscler Thromb Vasc Biol.</i> 2002 Jun 1;22(6):934-9.</p>
<p>Penrose KJ and McBride AA. Proteasome-Mediated Degradation of the Papillomavirus E2-TA Protein Is Regulated Phosphorylation and Can Modulate Viral Genome Copy Number. <i>J Virol</i> 2000; 74(13):6031-8.</p>
<p>PEREYRA EAG; PARELLADA CI. Entendendo melhor a infecção pelo Papilomavírus Humano. Manual Schering 2003.</p>
<p>Perer ES, Madan AK, Shurin A, Zakris E, Romeguera K, Pang Y, Beech DJ. Insulin-like growth factor I receptor antagonism augments response to chemoradiation therapy in colon cancer cells. <i>Surg Res</i> 2000;94(1):1-5.</p>
<p>Peretz S, Jensen R, Baserga R, Glazer PM. ATM-dependent expression of the insulin-like growth factor-I receptor in a pathway regulating radiation response. <i>Proc Natl Acad.Sci USA</i> 2001; 98(4):1676-81.</p>
<p>Pérez CA, Camel HM, Askin F. Endometrial extension of carcinoma of the cervix: a prognostic factor that may modify staging. <i>Cancer</i> 1981;48(1):170-80.</p>
<p>Pérez CA, Grigsby PW, Chao KS, Mutch DG, Lockett MA. Tumor size, irradiation dose, and long-term outcome of carcinoma of the uterine cervix. <i>Int J Radiat Oncol Biol Phys</i> 1998; 41(2):307-17.</p>
<p>Peters G, Gongoll S, Langner C, Mengel M, Piso P, Klempnauer J, Ruschoff J, Kreipe H, von Wasielewski R. IGF-1R, IGF-1 and IGF-2 expression as potential prognostic and predictive markers in colorectal cancer. <i>Virchows Arch</i> 2003;443(2):139-45.</p>
<p>Petersen D, Sogaard H, Overgaard J, Bentzen SM. Prognostic value of pretreatment factors in patients with locally advanced carcinoma of the uterine cervix treated by radiotherapy alone. <i>Acta Oncol</i> 1995;34(6):787-95.</p>
<p>Petros AM, Gunasekera A, Xu N, Olejniczak ET, Fesik SW. Defining the p53 DNA-binding domain/Bcl-x (L)-binding interface using NMR. <i>FEBS Lett</i> 2004; 559(1-3): 171-4.</p>
<p>Pezzella F, Gatter K. What is the value of bcl-2 protein detection for histopathologist? <i>Histopathology</i> 1995; 26(1): 89-93.</p>

Pillai MR, Jayaprakash PG, Nair MK. 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):456-61.
Pitson G, Fyles A, Milosevic M, Wylie J, Pintilie M, Hill R. Tumor size and oxygenation are independent predictors of nodal diseases in patients with cervix cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys.2001;51(3):699-703.
Pohl G, Filipits M, Suchomel RW, Stranzl T, Depisch D, Pirker R.Expression of the lung resistance protein (LRP) in primary breast cancer.Anticancer Res. 1999; 19(6B):5051-5055.
Pohl G, Suchomel RW, Stranzl T, Depisch D, Stiglbauer W, Filipits M, Pirker R. Expression of the lung resistance protein in primary colorectal carcinomas. Anticancer Res. 2001; 21 (1A):201-204.
Prempre T, Patanaphan V, Sewchand W. The influence of patients`age and tumor grade on the prognosis of carcinoma of the cervix. Cancer 1983; 51:1764-71.
PROGRAM FOR APPROPRIATE TECHNOLOGY IN HEALTH. Planning appropriate cervical cancer prevention programs. 2nd Edition. Seattle:PATH, 2000. 89p.
Quintero M, Mackenzie N, Brennan PA. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) in cancer. Eur J Surg Oncol. 2004 Jun;30(5):465-8.
Raaijmakers HG, Izquierdo MA, Lokhorst HM, de Leeuw C, Belien JA, Bloem AC, Dekker AW, Scheper RJ, Sonneveld P. Lung-resistance-related protein expression is a negative predictive factor for response to conventional low but not to intensified dose alkylating chemotherapy in multiple myeloma. Blood. 1998 Feb 1;91(3):1029-36.
Raff MC. Social control on cell survival and cell death. Nature1992; 356(6368): 397-400.
Railo MJ, von Smitten K, Pekonen F.The prognostic value of insulin-like growth factor-I in breast cancer patients. Results of a follow-up study on 126 patients. Eur J Cancer 1994; 30A(3):307-11.
Raj K, Berguerand S, Southern S, Doorbar J, Beard P. E1-E4 Protein of Human Papillomavirus Type 16 Associates with Mitochondria. J Virol 2004; 78(13):7199-207.
Rakic JM, Maillard C, Jost M, Bajou K, Masson V,Devy L, Lambert V, Foidart JM, Noel A. Role of plasminogen activator-plasmin system in tumor angiogenesis. Cell Mol Life Sci. 2003;60(3):463-73.
Raleigh JA, Dewhirst MW, Thrall DE. Measuring tumor hypoxia. Sem Radiat Oncol. 1996; 6 (1):37-45.
Ramani P, Dewchand H. Expression of mdr1/P-glycoprotein and p110 in neuroblastoma. J Pathol. 1995 Jan;175 (1):13-22.

Ravi R, Mookerjee B, Bhujwala ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, Dillehay LE, Madan A, Semenza GL, Bedi A. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 α . <i>Genes Dev.</i> 2000;14(1):34-44.
Reinmuth N, Liu W, Fan F, Jung YD, Ahmad SA, Stoeltzing O, Bucana CD, Radinsky R, Ellis LM. Blockade of insulin-like growth factor I receptor function inhibits growth and angiogenesis of colon cancer. <i>Clin Cancer Res</i> 2002; 8(10):3259-69.
Riethdorf L, Riethdorf S, Petersen S, Bauer M, Herbst H, Jänicke F, Lönning T. Urokinase gene expression indicates early invasive growth in squamous cell lesions of the uterine cervix. <i>J Pathol.</i> 1999;189(2):245-50.
Rodemann HP, Dittmann K, Toulany M. Radiation-induced EGFR-signaling and control of DNA-damage repair. <i>Int J Radiat Biol.</i> 2007 Nov-Dec;83(11-12):781-91.
Rofstad EK, Sundfør K, Lyng H, Tropé CG. Hypoxia-induced treatment failure in advanced squamous cell carcinoma of the uterine cervix is primarily due to hypoxia-induced radiation resistance rather than hypoxia-induced metastasis. <i>Br J Cancer.</i> 2000;83(3):354-9.
Rømer MU, Kirkebjerg Due A, Knud Larsen J, Hofland KF, Christensen IJ, Buhl-Jensen P, Almholt K, Lerberg Nielsen O, Brünner N, Lademann U. <i>Thromb Haemost.</i> 2005 Oct;94(4):859-66.
Rømer MU, Larsen L, Offenberg H, Brünner N, Lademann UA. Plasminogen activator inhibitor 1 protects fibrosarcoma cells from etoposide-induced apoptosis through activation of the PI3K/Akt cell survival pathway. <i>Neoplasia.</i> 2008 Oct;10(10):1083-91.
Rotman M, John M, Boyce J. Prognostic factors in cervical carcinoma: implications in staging and management. <i>Cancer</i> 1981;48(2): 560-7.
Ruesch MN, Stubenrauch F, Laimins LA. Activation of Papillomavirus Late Gene Transcription and Genome Amplification upon Differentiation in Semisolid Medium Is Coincident with Expression of Involucrin and Transglutaminase but Not Keratin-10. <i>J Virol</i> 1998; 72(6): 5016-24.
Rusch V, Klimstra D, Venkatraman E, Oliver J, Martini N, Gralla R, Kris M, Dmitrovsky E. Aberrant p53 expression predicts clinical resistance to cisplatin-based chemotherapy in locally advanced non-small cell lung cancer. <i>Cancer Res.</i> 1995; 55(21):5038-5042.
Rutledge FN, Mitchell MF, Nunsell S. Youth as a prognostic factor in carcinoma of the cervix: a matched analysis. <i>Gynecol Oncol</i> 1992;44(2):123-30.
Ryu SY, Oka K, Tsujii H, Suzuki Y, Nakano T. Platelet-derived endothelial cell growth factor as a prognostic factor for radiotherapy outcome in patients with adenocarcinoma of the uterine cervix. <i>Gynecol Oncol.</i> 2003;89(3):414-419.
Safran M, Kaelin WG Jr. HIF hydroxylation and the mammalian oxygen-sensing pathway. <i>J Clin Invest.</i> 2003;111(6):779-783.

Saito T., Matsuda Y., Suzuki T., Hayashi A. Yuan X., Saito M. et al. (1997) Comparative gene mapping of the human and mouse TEP1 genes, which encode one protein component of telomerases. <i>Genomics</i> 46: 46–50.
Sakata K, Matsumoto Y, Tauchi H, Satoh M, Oouchi A, Nagakura H, Koito K, Hosoi Y, Suzuki N, Komatsu K, Hareyama M. Expression of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in normal and tumor tissues. <i>Int J Radiat Oncol Biol Phys.</i> 2001; 49(1):161-167.
Samlal RA, van der Velden J, Ten Kate FJ, Schilthuis MS, Hart AA, Lammes FB. Surgical pathologic factors that predict recurrence in stage IB and IIA cervical carcinoma patients with negative pelvic lymph nodes. <i>Cancer</i> 1997;80(7):1234-40.
Samoylenko A, Roth U, Jungermann K, Kietzmann T. The upstream stimulatory factor-2a inhibits plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by binding to a promoter element adjacent to the hypoxia-inducible factor-1 binding site. <i>Blood.</i> 2001 May 1;97(9):2657-66.
Sawada M, Sun W, Hayes P, Leskov K, Boothman DA, Matsuyama S. Ku70 suppresses the apoptotic translocation of Bax to mitochondria. <i>Nat Cell Biol.</i> 2003; 5(4):320-329.
Saygili U, Gorkay IB, Koyuncuoglu M, Gol M, Uslu T, Erten O .The relationship between expression of Ku70 and survival in irradiated patients with endometrial carcinoma. <i>Gynecol Oncol.</i> 2004; 95(3):518-522.
Schadendorf D, Makki A, Stahr C, van Dyck A, Wanner R, Scheffer GL, Flens MJ, Scheper R, Henz BM. Membrane transport proteins associated with drug resistance expressed in human melanoma. <i>Am J Pathol.</i> 1995 Dec;147(6):1545-52.
Scheffer GL, Wijngaard PL, Flens MJ, Izquierdo MA, Slovak ML, Pinedo HM, Meijer CJ, Clevers HC, Scheper RJ. The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein <i>Nat Med.</i> 1995;1(6):578-582.
Schneider DJ, Hayes M, Wadsworth M, Taatjes H, Rincón M, Taatjes DJ, Sobel BE. Attenuation of neointimal vascular smooth muscle cellularity in atheroma by plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1). <i>J Histochem Cytochem.</i> 2004 Aug;52(8):1091-9.
Schneider J, Lucas R, Sánchez J, Ruibal A, Tejerina A, Martín M. Modulation of molecular marker expression by induction chemotherapy in locally advanced breast cancer: correlation with the response to therapy and the expression of MDR1 and LRP. <i>Anticancer Res.</i> 2000 Nov-Dec;20(6B):4373-7.
Schroeijers AB, Reurs AW, Scheffer GL, Stam AG, de Jong MC, Rustemeyer T, Wiemer EA, de Gruijl TD, Scheper RJ. Up-regulation of drug resistance-related vaults during dendritic cell development <i>J Immunol.</i> 2002; 168(4):1572-1578.

<p>Schroeijers AB, Siva AC, Scheffer GL, de Jong MC, Bolick SC, Dukers DF, Slootstra JW, Meloen RH, Wiemer E, Kickhoefer VA, Rome LH, Scheper RJ. The Mr 193,000 vault protein is up-regulated in multidrug-resistant cancer cell lines. <i>Cancer Res.</i> 2000; 60(4):1104-1110.</p>
<p>Shen MR, Hsu YM, Hsu KF, Chen YF, Tang MJ, Chou CY. Insulin-like growth factor 1 is a potent stimulator of cervical cancer cell invasiveness and proliferation that is modulated by alphavbeta3 integrin signaling. <i>Carcinogenesis</i> 2006; 27(5):962-71.</p>
<p>Sheridan MT, West CM, Cooper RA, Stratford IJ, Logue JP, Davidson SE, Hunter RD. Pretreatment apoptosis in carcinoma of the cervix correlates with changes in tumour oxygenation during radiotherapy. <i>Br J Cancer.</i> 2000;82(6):1177-82.</p>
<p>Sherif ZA, Nakai S, Pirolo KF, Rait A, Chang EH. Downmodulation of bFGF-binding protein expression following restoration of p53 function. <i>Cancer Gene Ther.</i> 2001;8(10):771-782.</p>
<p>Shimamoto Y, Sumizawa T, Haraguchi M, Gotanda T, Jueng HC, Furukawa T, Sakata R, Akiyama S. Direct activation of the human major vault protein gene by DNA-damaging agents. <i>Oncol Rep.</i> 2006;15(3):645-652.</p>
<p>Shimizu C, Hasegawa T, Tani Y, Takahashi F, Takeuchi M, Watanabe T, Ando M, Katsumata N, Fujiwara Y. Expression of insulin-like growth factor 1 receptor in primary breast cancer: immunohistochemical analysis. <i>Hum Pathol</i> 2004;35(12):1537-42.</p>
<p>Shingleton HM, Orr JW. <i>Cancer of the cervix: other treatments.</i> Philadelphia, PA, Lippincot 1995;201-23.</p>
<p>Shiohara S, Shiozawa T, Miyamoto T, Feng YZ, Kashima H, Kurai M, Suzuki A, Konishi I. Expression of cyclins, p53, and Ki-67 in cervical squamous cell carcinomas: overexpression of cyclin A is a poor prognostic factor in stage Ib and II disease. <i>Virchows Arch.</i> 2005 Jun;446(6):626-33.</p>
<p>Sigal A, Rotter V. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. <i>Cancer Res</i> 2000; 60(24): 6788-93.</p>
<p>Silva P, West CM, Slevin N, Valentine H, Ryder WD, Hampson L, Bibi R, Sloan P, Thakker N, Homer J, Hampson I. Tumor expression of major vault protein is an adverse prognostic factor for radiotherapy outcome in oropharyngeal carcinoma. <i>Int J Radiat Oncol Biol Phys.</i> 2007.</p>
<p>Silver DF, Piver MS. Gemcitabine salvage chemotherapy for patients with gynaecologic malignancies of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. <i>Am J Clin Oncol.</i> 1999;22:450-2.</p>
<p>Siva AC, Raval-Fernandes S, Stephen AG, LaFemina MJ, Scheper RJ, Kickhoefer VA, Rome LH. Up-regulation of vaults may be necessary but not sufficient for multidrug resistance. <i>Int J Cancer.</i> 2001; 92(2):195-202.</p>

Skomedal H, Forus A, Holm R. Deregulation of D-type cyclins in uterine cancers. Cyclin D1/D3 is differentially expressed in cervical cancer. <i>Anticancer Res</i> 2003; 23(5A):3929-35.
Skomedal H, Kristensen GB, Lie AK, Holm R. Aberrant Expression of the cell cycle associated proteins TP53, MDM2, p21, p27, cdk4, cyclin D1, Rb, and EGFR in cervical carcinomas. <i>Gynecol Oncol</i> ;1999;73(2):223-8.
Slesina M, Inman EM, Rome LH, Volkandt W. Nuclear localization of the major vault protein in U373 cells. <i>Cell Tissue Res</i> . 2005 Jul;321(1):97-104.
Slovak M. L., Ho J. P., Cole S. P., Deeley R. G., Greenberger L., de Vries E. G. et al. (1995) The LRP gene encoding a major vault protein associated with drug resistance maps proximal to MRP on chromosome 16: evidence that chromosome breakage plays a key role in MRP or LRP gene amplification. <i>Cancer Res</i> . 55: 4214–4219.
Smith S. (2001) The world according to PARP. <i>Trends Biochem. Sci.</i> 26: 174–179.
Soeda S, Oda M, Ochiai T, Shimeno H. Deficient release of plasminogen activator inhibitor-1 from astrocytes triggers apoptosis in neuronal cells. <i>Brain Res Mol Brain Res</i> . 2001 Jul 13;91(1-2):96-103.
Southern SA, Herrington CS. Differential cell cycle regulation by low-and high-risk human papillomaviruses in low-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. <i>Cancer Res</i> 1998; 58: 2941-45.
Speleman L, Kerrebijn JD, Look MP, Meeuwis CA, Foekens JA, Berns EM. Prognostic value of plasminogen activator inhibitor-1 in head and neck squamous cell carcinoma. <i>Head Neck</i> . 2007;29(4):341-50.
Sprong D, Janssen HL, Vens C, Begg AC. Resistance of hypoxic cells to ionizing radiation is influenced by homologous recombination status. <i>Int J Radiat Oncol Biol Phys</i> . 2006 Feb 1;64(2):562-72.
Stehman FB, Bundy BN, DiSaia PJ, Keys HM, Larson JE, Fowler WC. Carcinoma of the cervix treated with radiation therapy. I. A multi-variate analysis of prognostic variables in the Gynecologic Oncology Group. <i>Cancer</i> 1991;67(11):2776-85.
Steiner E, Holzmann K, Elbling L, Micksche M, Berger W. Cellular functions of vaults and their involvement in multidrug resistance. <i>Curr Drug Targets</i> . 2006; 7(8):923-934.
Steller MA, Delgado CH, Bartels CJ, Woodworth CD, Zou Z. Overexpression of the insulin-like growth factor-1 receptor and autocrine stimulation in Human cervical cancer cells. <i>Cancer Res</i> 1996; 56(8):1761-5.
Stephens RW, Brünner N, Jänicke F, Schmitt M. The urokinase plasminogen activator system as a target for prognostic studies in breast cancer <i>Breast Cancer Res Treat</i> . 1998;52(1-3):99-111.

Stewart PL, Makabi M, Lang J, Dickey-Sims C, Robertson AJ, Coffman JA, Suprenant KA. Sea urchin vault structure, composition, and differential localization during development. <i>BMC Dev Biol.</i> 2005 Feb 14;5:3.
Still I. H., Vince P. and Cowell J. K. (1999) Identification of a novel gene (ADPRTL1) encoding a potential Poly(ADP-ribosyl) transferase protein. <i>Genomics</i> 62: 533–536.
Stoeltzing O, Liu W, Reinmuth N, Fan F, Parikh AA, Bucana CD, Evans DB, Semenza GL, Ellis LM. Regulation of hypoxia inducible factor-1 alpha, vascular endothelial growth factor, and angiogenesis by an insulin-like growth factor-I receptor autocrine loop in human pancreatic cancer. <i>Am.J Pathol</i> 2003; 163(3):1001-11.
Stull MA, Richert MM, Loladze AV, Wood TL. Requirement for IGF-I in epidermal growth factor-mediated cell cycle progression of mammary epithelial cells. <i>Endocrinology</i> 2002; 143:1872-9.
Sun W, Yang J. Functional mechanisms for human tumor suppressors. <i>J Cancer.</i> 2010 Sep 15;1:136-40.
Sundfør K, Lyng H, Rofstad EK. Tumour hypoxia and vascular density as predictors of metastasis in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. <i>Br J Cancer.</i> 1998;78(6): 822-827.
Sundfør K, Lyng H, Tropé CG, Rofstad EK. Treatment outcome in advanced squamous cell carcinoma of the uterine cervix: relationships to pretreatment tumor oxygenation and vascularization. <i>Radiother Oncol.</i> 2000;54(2):101-7.
Sunnaram, B. L., Gandemer, V., Sebillot, M., Grandgirard, N., Amiot, L., Leray, E., and Goasguen, J. E. (2003) LRP overexpression in monocytic lineage. <i>Leuk. Res.</i> 27, 755–759.
Suprenant KA. Vault ribonucleoprotein particles: sarcophagi, gondolas, or safety deposit boxes? <i>Biochemistry.</i> 2002 Dec 10;41(49):14447-54.
Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Constantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular Characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. <i>Nature</i> 1999; 397(6718): 441-6.
Suzuki M, Tsukagoshi S, Saga Y, Ohwada M, Sato I. Assessment of proliferation index with MIB-1 as a prognostic factor in radiation therapy for cervical cancer. <i>Gynecologic oncology</i> 2000; 79(2):300-4. 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. <i>Prog Obst Bin</i> 1997; 40:204-412.
Suzuki Y, Nakano T, Kato S, Ohno T, Tsujii H, Oka K. Immunohistochemical study of cell cycle-associated proteins in adenocarcinoma of the uterine cervix treated with radiotherapy alone: P53 status has a strong impact on prognosis. <i>Int J Radiat Oncol Biol Phys</i> 2004; 60(1):231-6.

<p>Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K. J., and Baltimore, D. (2006) NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U S A</i> 103, 12481–12486.</p>
<p>Tanaka H, Kato K, Yamashita E, Sumizawa T, Zhou Y, Yao M, Iwasaki K, Yoshimura M, Tsukihara T. The structure of rat liver vault at 3.5 angstrom resolution. <i>Science</i>. 2009 Jan 16;323(5912):384-8.</p>
<p>Thews O, Kelleher DK, Vaupel P. Erythropoietin restores the anemia-induced reduction in cyclophosphamide cytotoxicity in rat tumors. <i>Cancer Res</i>. 2001;61:1358-61.</p>
<p>Tjalma W, Van Marck E, Weyler J, Dirix L, Van Daele A, Goovaerts G, Albertyn G, van Dam P. Quantification and prognostic relevance of angiogenic parameters in invasive cervical cancer. <i>Br J Cancer</i>. 1998;78(2):170-174.</p>
<p>Tjalma W, Weyler J, Weyn B, Van Marck E, Van Daele A, Van Dam P, Goovaerts G, Buytaert P. The association between vascular endothelial growth factor, microvessel density and clinicopathological features in invasive cervical cancer. <i>Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol</i>. 2000;92(2):251-257.</p>
<p>Todd RW, Shafi M. Invasive cervical cancer. <i>Current Obstet Gynaecol</i> 2004; 14:200-6.</p>
<p>Tokumo K, Kodama J, Seki N, Nakanishi Y, Miyagi Y, Kamimura S, Yoshinouchi M, Okuda H, Kudo T. Different angiogenic pathways in human cervical cancers <i>Gynecol Oncol</i>. 1998;68(1):38-44.</p>
<p>Tora L, Mullick A, Metzger D, Ponglikitmongkol M, Park I, Chambon P. The cloned human oestrogen receptor contains a mutation which alters its hormone binding properties. <i>EMBO J</i>. 1989 Jul;8(7):1981-6.</p>
<p>Torbé B. [Estimation of treatment results and side-effects in patients with invasive uterine cervix cancer stage IIB-IVA treated with concurrent radiochemotherapy]. <i>Ann Acad Med Stetin</i>. 2008;54(1):28-40.</p>
<p>Tort F, Hernández S, Beà S, Martínez A, Esteller M, Herman JG, Puig X, Camacho E, Sánchez M, Nayach I, Lopez-Guillermo A, Fernández PL, Colomer D, Hernández L, Campo E. CHK2-decreased protein expression and infrequent genetic alterations mainly occur in aggressive types of non-Hodgkin lymphomas. <i>Blood</i>. 2002 Dec 15;100(13):4602-8.</p>
<p>Tsang RW, Fyles AW, Kirkbride P, Levin W, Manchul LA, Rawlings GA., Banerjee, D., Pintilie, M., Wilson, G.D. Proliferation measurements with flow cytometry Tpot in cancer of the uterine cervix: correlation between two laboratories and preliminary clinical results. <i>Int J. Radiat. Oncol. Biol. Phys</i> 1995; 32(5):1319-29.</p>

Tsang RW, Fyles AW, Li Y, Rajaraman MM, Chapman W, Pintilie M, Wong CS. Tumor proliferation and apoptosis in human uterine cervix carcinoma I: correlations between variables. <i>Radiother Oncol</i> 1999;50(1):85-92.
Tsang RW, Fyles AW, Milosevic M, Syed A, Pintilie M, Levin W, Manchul LA. Interrelationship of proliferation and hypoxia in carcinoma of the cervix. <i>Int J Radiat Oncol Biol Phys.</i> 2000;46(1):95-9.
Tsang RW, Juvet S, Pintilie M, Hill RP, Wong CS, Milosevic M, Chapman W, Levin W, Manchul LA, Fyles AW. Pretreatment proliferation parameters do not add predictive power to clinical factors in cervical cancer treated with definitive radiation therapy. <i>Clin Cancer Res</i> 2003; 9(12):4387-95.
Tsang RW, 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. <i>Radiother Oncol</i> 1999; 50(1):93-101.
Tucker SL, Chan KS. The selection of patients for accelerated radiotherapy on the basis of tumor growth kinetics and radiosensitivity. <i>Radiother. Oncol</i> 1990; 18(3):197-211.
Uno T, Ito H, Isobe K, Kaneyasu Y, Tanaka N, Mitsuhashi A, Suzuka K, Yamazawa K, Shigematsu N, Itami J. Postoperative pelvic radiotherapy for cervical cancer patients with positive parametrial invasion. <i>Gynecol Oncol</i> 2005;96(2):335-40.
Uozaki H, Horiuchi H, Ishida T, Iijima T, Imamura T, Machinami R. Overexpression of resistance-related proteins (metallothioneins, glutathione-S-transferase pi, heat shock protein 27, and lung resistance-related protein) in osteosarcoma. Relationship with poor prognosis. <i>Cancer</i> 1997; 79 (12):2336-2344.
Ustav M, Ustav E, Szymanski P, et al: Identificaton of the origin of replication of bovine papillomavirus and characterization of the viral origin recognition factor E1. <i>EMBO J</i> 10:4321-4329, 1991.
van der Pol JP, Blom DJ, Flens MJ, Luyten GP, de Waard-Siebinga I, Koornneef L, Scheper RJ, Jager MJ. Multidrug resistance-related proteins in primary choroidal melanomas and in vitro cell lines. <i>Invest Ophthalmol Vis Sci.</i> 1997 Nov;38(12):2523-30.
van de putte G, Kristensen GB, Lie AK, Baekelandt M, Holm R. Cyclins and proliferation markers in early squamous cervical carcinoma. <i>Gynecol Oncol</i> 2004;92(1):40-6.
van Zon A, Mossink M. H., Schoester M., Scheffer G. L., Scheper R. J., Sonneveld P. et al. Multiple human vault RNAs. Expression and association with the vault complex. <i>J. Biol. Chem.</i> 2001; 276: 37715–37721.
van Zon A, Mossink MH, Scheper RJ, Sonneveld P, Wiemer EA. The vault complex. <i>Cell Mol Life Sci.</i> 2003 Sep;60(9):1828-37.

Van Zon A, Mossink MH, Schoester M, Houtsmuller AB, Scheffer GL, Scheper RJ, Sonneveld P, Wiemer EA. The formation of vault-tubes: a dynamic interaction between vaults and vault PARP. <i>J Cell Sci.</i> 2003 Nov 1;116(Pt 21):4391-400.
Varia MA, Calkins-Adams DP, Rinker LH, Kennedy AS, Novotny DB, Fowler WC Jr, Raleigh JA. Pimonidazole: a novel hypoxia marker for complementary study of tumor hypoxia and cell proliferation in cervical carcinoma. <i>Gynecol Oncol.</i> 1998;71(2):270-7.
Varlotta J, Stevenson MA. Anemia, tumor hypoxemia, and the cancer patient. <i>Int J Radiat Oncol Biol Phys.</i> 2005;63(1):25-36.
Vaupel P, Briest S, Höckel M. Hypoxia in breast cancer: pathogenesis, characterization and biological/therapeutic implications. <i>Wien Med Wochenschr.</i> 2002;152(13-14):334-42.
Vaupel P, Kelleher DK, Höckel M. Oxygen status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. <i>Semin Oncol.</i> 2001;28(2 Suppl 8):29-35.
Vaupel P, Thews O, Hoeckel M. Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. <i>Med Oncol.</i> 2001;18(4):243-59.
Vaupel P, Mayer A. Hypoxia and anemia: effects on tumor biology and treatment resistance. <i>Transfus Clin Biol.</i> 2005 Feb;12(1):5-10.
Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. <i>Nature</i> 1988; 335:440-2.
Vendrik CP, Bergers JJ, De Jong WH, Steerenberg PA. Resistance to cytostatic drugs at the cellular level. <i>Cancer Chemother Pharmacol.</i> 1992;29(6):413-29.
Vieira SC, Zeferino LC, Silva BB, Santana JO, Santos LG, Carvalho TC, Rocha MC[Sentinel node study with patent blue in cervical cancer] <i>Rev Assoc Med Bras.</i> 2004;50(3):302-4.
Villa LL. Aspectos moleculares da oncogênese por papilomavirus. In: Bibbo M, Silva Filho AM. Lesões relacionadas à infecção por HPV no trato anogenital. Rio de Janeiro: Revinter; 1998. p. 51-8.
Volinia, S., Calin, G. A., Liu, C. G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., Prueitt, R. L., Yanaihara, N., Lanza, G., Scarpa, A., Vecchione, A., Negrini, M., Harris, C. C., and Croce, C. M. (2006) A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. <i>Proc. Natl. Acad. Sci U S A.</i> 103, 2257–2261.
Volm M, Mattern J, Koomägi R. Expression of lung resistance-related protein (LRP) in non-small cell lung carcinomas of smokers and non-smokers and its predictive value for doxorubicin resistance. <i>Anticancer Drugs.</i> 1997 Nov;8(10):931-6.
Volm M, Rittgen W. Cellular predictive factors for the drug response of lung cancer. <i>Anticancer Res.</i> 2000; 20 (5B):3449-3458.

Walker JR, Corpina RA, Goldberg J. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. <i>Nature</i> 2001; 412(6847):607-164.
Wang M, Windgassen D, Papoutsakis ET. A global transcriptional view of apoptosis in human T-cell activation. <i>BMC Med Genomics</i> . 2008 Oct 23;1:53.
Wang Q, Griffin H, Southern S, Jackson D, Martin A, McIntosh P, et al. Functional Analysis of the Human Papillomavirus Type 16 E1-E4 Protein Provides a Mechanism for In Vivo and In Vitro Keratin Filament Reorganization. <i>J Virol</i> 2004; 78(2): 821-33.
Wang Q, Gao F, May WS, Zhang Y, Flagg T, Deng X. Bcl2 negatively regulates DNA double-strand-break repair through a nonhomologous end-joining pathway. <i>Mol Cell</i> . 2008 Feb 29;29(4):488-98.
Webster K, Parish J, Pandya M, Stern PL, Clarke AR, Gaston K. The Human Papillomavirus (HPV) 16 E2 Protein Induces Apoptosis in the Absence of Other HPV Proteins and via a p53- dependent Pathway. <i>J Biol Chem</i> 2000; 275(1): 87-94.
Wen B, Deutsch E, Marangoni E, Frasca V, Maggiora L, Abdulkarim. Tyrphostin AG 1024 modulates radiosensitivity in human breast cancer cells. <i>Br J cancer</i> 2001; 85(12):2017-21.
Werner H, Shalita-Chesner M, Abramovitch S, Idelman G, Shaharabani L, Glaser T. Regulation of the insulin-like growth factor-I receptor gene by oncogenes and antioncogenes: implications in human cancer. <i>Mol Genet Metab</i> 2000; 71(1-2):315-20.
West CM, Cooper RA, Lancaster JA, Wilks DP, Bromley M. Tumor vascularity: a histological measure of angiogenesis and hypoxia. <i>Cancer Res</i> .2001;61(7):2907-2910.
Wilson CR, Davidson SE, Margison GP, Jackson SP, Hendry JH, West CM Expression of Ku70 correlates with survival in carcinoma of the cervix <i>Br J Cancer</i> . 2000;83(12):1702-1706.
Wilson GD, Dische S, Saunders MI. Studies with bromodeoxyuridine in head and neck cancer and accelerated radiotherapy. <i>Radiother. Oncol</i> 1995; 36(3):189-97.
Winter WE , Maxwell GL, Tian C, Sobel E, Rose GS, Thomas G, Carlson JW. Association of hemoglobin level with survival in cervical carcinoma patients treated with concurrent cisplatin and radiotherapy: a Gynecologic Oncology Group Study. <i>Gynecol Oncol</i> . 2004;94(2):495-501.
Withers HR, Taylor JMG, Maciejewski, B. The hazard of accelerated tumour clonogen repopulation during radiotherapy. <i>Acta Oncologica</i> 1988; 27(2):131-46.
Wolff, M. E.; <i>Burger's Medicinal Chemistry</i> , John Wiley & Sons: New York. 1981,11-45.
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. <i>Int J Radiat Oncol Biol Phys</i> . 1997; 39(2): 405-412.

Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH, Turner KJ, Pastorek J, Sibtain A, Wilson GD, Turley H, Talks KL, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. <i>Cancer Res.</i> 2000;60(24):7075-83.
Yamada KM. Adhesive recognition sequences. <i>J Biol Chem.</i> 1991 Jul 15;266(20):12809-12.
Yamamoto S, Konishi I, Mandai M, Kuroda H, Komatsu T, Nanbu K, Sakahara H, Mori T. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in epithelial ovarian neoplasms: correlation with clinicopathology and patient survival, and analysis of serum VEGF levels. <i>Br J Cancer.</i> 1997;76(9):1221-1227.
Yeh SA, Wan Leung S, Wang CJ, Chen HC. Postoperative radiotherapy in early stage carcinoma of the uterine cervix: treatment results and prognostic factors. <i>Gynecol Oncol</i> 1999 ;72(1):10-5.
Yu Z, Fotouhi-Ardakani N, Wu L, Maoui M, Wang S, Banville D, Shen SH. PTEN associates with the vault particles in HeLa cells. <i>J Biol Chem.</i> 2002 Oct 25;277(43):40247-52.
Zaghloul MS, El Naggat M, El Deeb A, Khaled H, Mokhtar N Prognostic implication of apoptosis and angiogenesis in cervical uteri cancer. <i>Int J Radiat Oncol Biol Phys.</i> 2000;48(5):1409-1415.
Zhang HL, Zhang ZX, Xu YJ. Hypoxia-inducible factor-1 alpha increased the expression of peroxisome proliferator activated receptor alpha in lung cancer cell A549. <i>Chin Med J (Engl).</i> 2004 Jan;117(1):145-7.
Zhang L, Yu D, Hu M, Xiong S, Lang A, Ellis LM, Pollock RE Wild-type p53 suppresses angiogenesis in human leiomyosarcoma and synovial sarcoma by transcriptional suppression of vascular endothelial growth factor expression. <i>Cancer Res.</i> 2000;60(13):3655-3661.
Zhang X, Lin M, van Golen KL, Yoshioka K, Itoh K, Yee D. Multiple signaling pathways are activated during insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulated breast cancer cell migration. <i>Breast Cancer Res Treat</i> 2005; 93(2):159-68.
Zhao H, Dupont J, Yakar S, Karas M, LeRoith D. PTEN inhibits cell proliferation and induces apoptosis by downregulating cell surface IGF-IR expression in prostate cancer cells. <i>Oncogene</i> 2004;23(3):786-94.
Zhao HJ, Hosoi Y, Miyachi H, Ishii K, Yoshida M, Nemoto K, Takai Y, Yamada S, Suzuki N, Ono T DNA-dependent protein kinase activity correlates with Ku70 expression and radiation sensitivity in esophageal cancer cell lines. <i>Clin Cancer Res.</i> 2000; 6(3):1073-1078.
Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. <i>Nature.</i> 2000 Nov 23;408(6811):433-9.
Zoellner H, Höfler M, Beckmann R, Bielek E, Vanyek E, Kumabashiri I, Binder B. Fibrinolytic proteins in apoptotic human umbilical vein endothelial cells. <i>Thromb Res.</i> 1998 Sep 1;91(5):209-19.

Zölzer F, Streffer C. Increased radiosensitivity with chronic hypoxia in four human tumor cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2002 Nov 1;54(3):910-20.

Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002 May;2(5):342-50.

Zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(9):690-8.