

**Regulación de la proliferación tumoral  
y la apoptosis en tumores  
epidermoides de cavidad oral: papel  
del receptor para el factor de  
crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1R)  
y major vault proteína (MVP)**

**Mercedes Moreno González**

**Tesis Doctoral**

**Universidad de Las Palmas de Gran Canaria  
Enero 2012**





PROGRAMA DE DOCTORADO  
**CÁNCER: BIOLOGÍA Y CLÍNICA**

**Título**

**Regulación de la proliferación tumoral y la apoptosis en tumores epidermoides de cavidad oral: papel del receptor para el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1R) y major vault proteína (MVP)**

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

**Mercedes Moreno González**

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

LAS PALMAS DE GRAN CANARIA – ENERO DE 2012

*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 **“REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN TUMORAL Y LA APOPTOSIS EN TUMORES EPIDERMOIDES DE CAVIDAD ORAL: PAPEL DEL RECEPTOR PARA EL FACTOR DE CRECIMIENTO INSULÍNICO TIPO 1 (IGF-1R) Y MAJOR VOLT PROTEÍNA (MVP)”**, ha sido realizado por **Dña MERCEDES MORENO GONZÁLEZ**, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Fisiología, Genética e Inmunología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, 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 veintiocho de octubre de dos mil once.

**Fdo: Pedro Carlos Lara Jiménez**





UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA  
Departamento de Ciencias Clínicas

**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 **“REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN TUMORAL Y LA APOPTOSIS EN TUMORES EPIDERMÓIDES DE CAVIDAD ORAL: PAPEL DEL RECEPTOR PARA EL FACTOR DE CRECIMIENTO INSULÍNICO TIPO 1 (IGF-1R) Y MAJOR VOLT PROTEÍNA (MVP)”**, ha sido realizado por **Dña MERCEDES MORENO GONZÁLEZ**, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Fisiología, Genética e Inmunología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, 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 veintiocho de octubre de dos mil once.

**Fdo: Marta Lloret Sáez-Bravo**





UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA  
Departamento de Ciencias Clínicas

**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 **“REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN TUMORAL Y LA APOPTOSIS EN TUMORES EPIDERMÓIDES DE CAVIDAD ORAL: PAPEL DEL RECEPTOR PARA EL FACTOR DE CRECIMIENTO INSULÍNICO TIPO 1 (IGF-1R) Y MAJOR VAVL PROTEÍNA (MVP)”**, ha sido realizado por **Dña MERCEDES MORENO GONZÁLEZ**, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Fisiología, Genética e Inmunología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, 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 veintiocho de octubre de dos mil once.

**Fdo: Luis Alberto Henríquez Hernández**



*A Antonio, mi padre, ejemplo de superación constante; esperando que este trabajo sea para él un motivo de satisfacción en este momento tan difícil.*

*A Matilde, la madre tan añorada que me dió la vida.*

*A Fränzi, la madre tan querida que me ha criado.*

*A mis abuelos Santiago y Mercedes, que hicieron de mi primera infancia un tiempo tan feliz.*

*A mi hermano Santiago, deseándole que pronto encuentre su camino para ser feliz en la vida.*

*A Ángel, Elena e Isabel, porque gracias a ellos he descubierto la magia tras una simple caricia.*

*A los pequeñitos que no hemos conocido pero que vivirán para siempre en nuestro corazón.*



# ***Agradecimientos***



# ***Agradecimientos***

Al profesor Dr. Pedro Carlos Lara Jiménez, principal director de esta Tesis Doctoral, con toda mi admiración tanto profesional como personal, por su confianza, estímulo constante y comprensión, además de su competencia para coordinar el desarrollo de este trabajo.

A los co-directores de esta Tesis Doctoral, la Dra. Marta Lloret Saéz-Bravo por al apoyo profesional y personal, y en especial al Dr. Luis Alberto Henríquez Hernández, por su trabajo infatigable y comprensión y cuyo esfuerzo ha sido indispensable para el desarrollo de este estudio.

A mis compañeros del Servicio de Cirugía Máxilofacial:

Al Dr. Santiago Quintero Pérez, ejemplo de profesionalidad y serenidad, por el apoyo prestado tanto para la realización de este estudio como para el trabajo diario.

Al Dr. Victor Hugo Izaguirre Espinosa, por alentarme a realizar este trabajo.

A la Dra. Marta Vidales Lombó, porque con su mirada inteligente y su alegre sonrisa ha cambiado por completo nuestro día a día.

A Cristina Caballero Ruano, nuestra enfermera, y a Ángeles López Gandiaga, que con tanto cariño me han guiado desde que comenzó mi andadura canaria.

A nuestras secretarias, Inmaculada Rivero Araña, que me ayudó en los comienzos de este trabajo, y M<sup>a</sup> Pilar Gutiérrez Reyes, experta en descifrar mis jeroglíficos lo cual ha sido fundamental para concluirlo.

Al personal de quirófano, en especial a nuestras enfermeras, Ana Garcia, Cira y Carmen Diaz, con quienes compartimos mucho más que el trabajo diario.

A los compañeros del Servicio de Oncología Radioterápica, en especial los doctores Bernardino Clavo Varas, Ana Ruíz Alonso, Beatriz Pinar Sedeño y Maria Auxiliadora Cabezón Pons, con quienes me ha sido muy grato compartir tantas experiencias, a veces muy delicadas, durante estos años; y a Almudena Valenciano, por contribuir en la realización de este trabajo.

A los compañeros del Servicio de Otorrinolaringología, en especial a los doctores José María Cuyás De Torres, Florencio Castañeda Fuentes y Juan Rivero Suárez, miembros del Comité de Tumores de Cabeza y Cuello, que viernes tras viernes nos permiten compartir tanto su amplia experiencia y buen hacer como sus interesantes vivencias personales.

A los compañeros del Servicio de Anatomía Patológica, sin cuya ayuda no podríamos realizar los diagnósticos, y en especial al Dr. Agustín Rey López por todas las horas que ha dedicado a la realización de este estudio; y a Estíbaliz Valdés, que ha realizado todo el trabajo de laboratorio.

A los compañeros del Servicio de Radiología, en especial a los doctores Tatiana Marrero Pulido, Olga Suárez Cabrera, Pilar López Facal y Fernando Rezola Sáez, que tan amablemente ponen a nuestra disposición su conocimiento para comprender mejor los estudios radiológicos.

A los compañeros del Servicio de Anestesiología, todos en general, sin los que no podríamos desarrollar nuestra actividad quirúrgica.

A los compañeros del Servicio de Inmunología, especialmente al Dr. Florentino Sánchez García, por poner a mi disposición sus medios e instalaciones para realizar este trabajo.

A la Dra. Sofía Pérez, que amablemente me inició en el estudio de la apoptosis.

A la Dra. Rosa Apolinario, que dentro de sus obligaciones profesionales y personales, encontró tiempo para ayudarme en la lectura de los marcadores tumorales.

A la Dra. Elisa Bordón Rodríguez, por tantas tardes de trabajo compartidas.

A los pacientes, que se ponen en nuestras manos con la confianza de que podamos ayudarles en un momento tan importante de su vida, y con la esperanza de que así sea.

# ***Índice***



## ÍNDICE

### CAPITULO I

<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>1. GENERALIDADES</b>	3
1.1. Epidemiología y factores de riesgo	3
1.2. Histología	11
1.3. Patogénesis	12
1.4. Presentación clínica y diagnóstico	12
1.5. Estadíaje	15
1.6. Tratamiento	18
<b>2. FACTORES PRONÓSTICOS CLÁSICOS</b>	25
2.1. Factores relacionados con el paciente	25
2.2. Factores relacionados con el tumor	27
2.3. Factores relacionados con el tratamiento	30
<b>3. FACTORES PRONÓSTICOS BIOLÓGICOS</b>	31
3.1. Angiogénesis	31
3.2. Expresión tumoral de ciclooxigenasa-2 (COX-2)	31
3.3. Marcadores moleculares	32
<b>4. NUEVOS FACTORES PRONÓSTICOS MOLECULARES</b>	35
4.1. Receptor para el factor de crecimiento dependiente de insulina 1 (IGF-1R)	35
4.2. Proteínas reguladoras de la resistencia a drogas. Papel de <i>major vault proteína</i> (MVP)	47
4.3. Proteínas reguladoras de la apoptosis. Papel de BCL-2	61
4.4. Proliferación celular (Ki67)	69

### CAPITULO II

<b>OBJETIVOS</b>	75
------------------	----

### CAPITULO III

<b>REVISIÓN DE LA SITUACIÓN DEL CÁNCER DE CAVIDAD ORAL EN LOS SERVICIOS DE CIRUGÍA MAXILOFACIAL Y ONCOLOGÍA RADIOTERÁPICA DEL HOSPITAL DR. NEGRÍN (1989-2005)</b>	79
Análisis descriptivo de la serie de pacientes	81

### CAPITULO IV

<b>LA EXPRESIÓN DE IGF-1R PREDICE EL RESULTADO CLÍNICO EN PACIENTES CON CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CAVIDAD ORAL LOCALMENTE AVANZADO</b>	95
<b>RESUMEN/ABSTRACT</b>	97
<b>INTRODUCCIÓN</b>	101
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	102
<b>RESULTADOS</b>	104
<b>DISCUSIÓN</b>	106

## **CAPITULO V**

<b>LA EXPRESIÓN DE IGF-1R Y MVP SE ENCUENTRAN RELACIONADAS EN LA PREDICCIÓN DEL PRONÓSTICO CLÍNICO DE LOS PACIENTES CON CARCINOMA ESCAMOSO DE CAVIDAD ORAL</b> _____	111
<b>RESUMEN/ABSTRACT</b>	113
<b>INTRODUCCIÓN</b>	117
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	119
<b>RESULTADOS</b>	121
<b>DISCUSIÓN</b>	123

## **CAPITULO VI**

<b>PAPEL DE LA APOPTOSIS Y LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN RELACIÓN A LA EXPRESIÓN DE IGF-1R Y MVP</b> _____	127
<b>RESUMEN/ABSTRACT</b>	129
<b>INTRODUCCIÓN</b>	133
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	135
<b>RESULTADOS</b>	138
<b>DISCUSIÓN</b>	144

## **CAPITULO VII**

<b>CONCLUSIONES</b> _____	149
---------------------------	-----

## **CAPITULO VIII**

<b>BIBLIOGRAFÍA</b> _____	153
---------------------------	-----

## **CAPÍTULO I**

# **INTRODUCCIÓN**



## 1. GENERALIDADES

El cáncer de cabeza y cuello (CCC) se sitúa entre el 5º y el 6º lugar en incidencia de todos los tipos de tumores, con más de 500.000 nuevos casos diagnosticados en todo el mundo cada año. La edad media de aparición es la 6ª década de la vida, siendo más frecuente en varones, sobre todo el cáncer de laringe. La supervivencia a 5 años de todos los estadios del CCC es del 60%, pero es significativamente inferior en localizaciones específicas como la hipofaringe.

El cáncer de cabeza y cuello comprende múltiples localizaciones (cavidad oral, orofaringe, hipofaringe, laringe y senos paranasales) cada una con diferentes características (histología, epidemiología, diseminación loco-regional, diseminación a distancia y tratamiento).

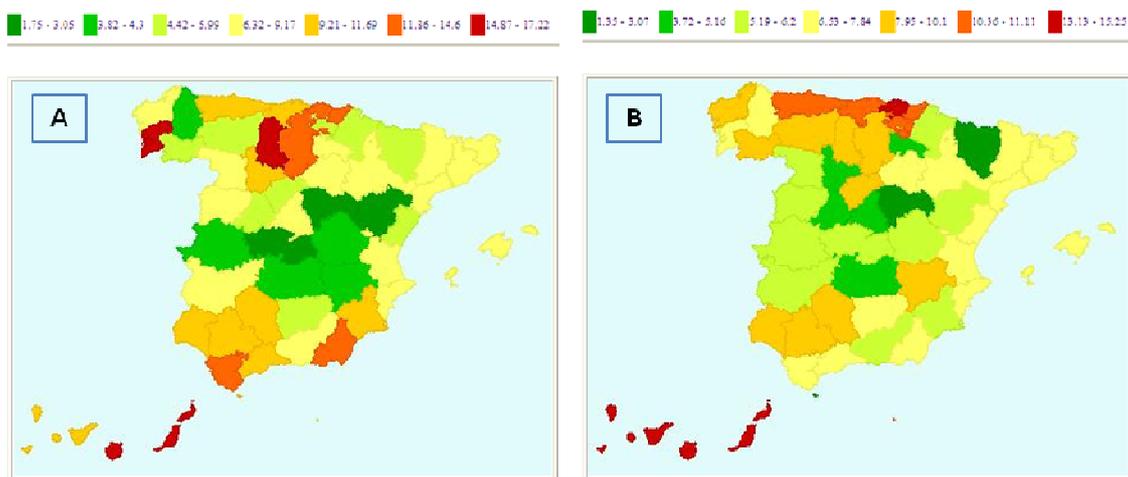
### 1.1. Epidemiología y factores de riesgo

#### 1.1.1. Epidemiología

El carcinoma de células escamosas de la cavidad oral (OCSCC) supone el 5% de los tumores diagnosticados en el hombre, y el 2.5% de los de la mujer. La mortalidad por OCSCC es alta, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, con aproximadamente 127.000 muertes registradas en el año 2008 (Ferlay et al. 2010). Su incidencia varía según la región del mundo estudiada. Así, en la India y el sureste asiático, el cáncer de cavidad oral es el mayoritario entre los hombres, y países como Hungría o Francia tienen unas incidencias de 52 por cada 100.000 habitantes al año. Este tipo tumoral es raro en individuos menores de 35 años, con independencia del sexo. A partir de ese segmento de edad, y tal y como ocurre para otros tumores de origen epitelial, el riesgo de desarrollo tumoral aumenta con la edad. En general, la incidencia de OCSCC es menor entre las mujeres que entre los hombres, debido fundamentalmente a los factores de riesgo asociados a este tipo de tumores. En España, las estimaciones realizadas para el año 2010 indicaban el registro de 5.600 nuevos casos y 1.780 muertes debidas al cáncer de cavidad oral y faringe (clásicamente agrupados en estudios epidemiológicos) entre los hombres, y de 1.600 nuevos casos con 430 muertes relacionadas entre las mujeres (de Souza et al. 2011). Los ratios de incidencia ajustados para el 2008 colocan a España entre los países europeos con mayor incidencia (16/100.000 habitantes por año), a pesar de que entre las mujeres este ratio es especialmente bajo (3.3/100.000 habitantes por año) (Ferlay

et al. 2010). No obstante, según los datos de los que se dispone en los registros de cáncer de las diferentes Comunidades Autónomas de nuestro país, se detecta una disminución significativa de la incidencia del cáncer de cavidad oral entre los hombres, sin que se modifique entre las mujeres (de Souza et al. 2011).

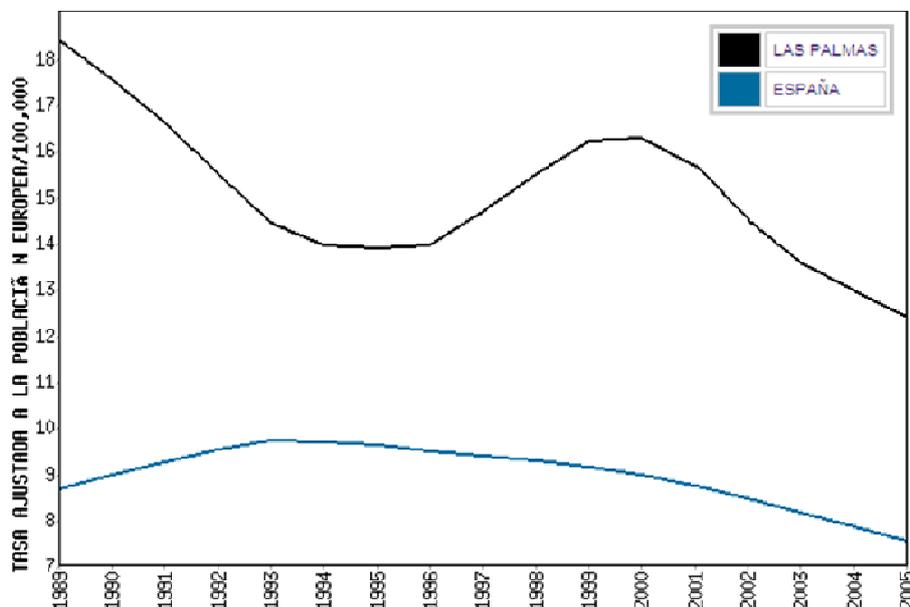
El universo de pacientes de esta Tesis Doctoral fue reclutado entre los años 1989 y 2005. Según datos del Centro Nacional de Epidemiología (acceso: [http://www.isciii.es/htdocs/centros/epidemiologia/epi\\_cancer.jsp](http://www.isciii.es/htdocs/centros/epidemiologia/epi_cancer.jsp)), la incidencia de este tipo de tumores entre la población masculina de nuestra Comunidad Autónoma, registrada entre los años 1997 y 2002 (según últimos datos actualizados a junio de 2009), era de 34.95 casos por cada 100.00 habitantes, siendo esta tasa la más alta de todo el territorio nacional. La supervivencia media a 5 años para este tipo de pacientes en nuestro país está en torno al 50%. La Comunidad Autónoma de Canarias, coloca a sus dos provincias entre las tres con mayores índices de mortalidad por esta causa. Así, la provincia de Tenerife registró una tasa de mortalidad por cáncer de cavidad oral y faringe (típicamente agrupadas) de 15.25/100.000 habitantes para el año 2005, ocupando el primer puesto. La provincia de Las Palmas ocupa el tercer lugar, con una tasa de 13.13 defunciones por esta causa por cada 100.000 habitantes para el mismo año (Figura 1). La tasa de mortalidad media nacional para ese mismo año era de 7.55/100.000 habitantes.



**Figura 1.** Mapas de mortalidad por provincias del cáncer de cavidad oral y faringe entre los hombres para los años 1989 (A) y 2005 (B). Tasa ajustada a la población europea por cada 100.000 habitantes. Fuente: Centro Nacional de Epidemiología (programa Ariadna).

La tendencia temporal en cuanto a mortalidad por este tipo de tumores entre los hombres de la provincia de Las Palmas, parece haber sufrido un ligero descenso

durante el periodo de tiempo señalado (Figura 2). La misma tendencia se observa para el global del país. Según los últimos datos disponibles en el Centro Nacional de Epidemiología, el índice de mortalidad para el año 2008 era de unos 13.09 y 6.56 por cada 100.000 habitantes para Las Palmas y España, respectivamente.



**Figura 2.** Tendencia temporal de la mortalidad por cáncer de cavidad oral y faringe en la provincia de Las Palmas (línea negra) y de España (línea azul) entre los años 1989-2005, para los hombres. Tasa ajustada a la población europea por cada 100.000 habitantes. Fuente: Centro Nacional de Epidemiología (programa Ariadna).

La proximidad anatómica entre la cavidad oral y la orofaringe, sumado a la similitud en los factores de riesgo, a menudo resulta en un erróneo análisis agrupado de los dos tipos de cáncer. Algunos estudios han incluido el cáncer nasofaríngeo y de hipofaringe, que tienen factores de riesgo claramente diferentes a los de la cavidad oral. Este tipo de agrupamientos son erróneos y hay que tomar sus resultados con precaución y en el contexto del tipo tumoral analizado (Moore et al. 2000). La epidemiología del cáncer de cavidad oral se ve seriamente obstaculizada por su clásico agrupamiento con el cáncer de orofaringe. Los factores de riesgo entre ambos tipos tumorales son diferentes, así la infección por el virus del papiloma humano (HPV) parece estar relacionado con la orofaringe, mientras que el alcohol o el tabaco lo están con la cavidad oral (Curado et al. 2009). Por tanto, es recomendable tratar al cáncer de cavidad oral independientemente, aunque para muchas clasificaciones se agrupe con orofaringe o más aún, dentro de los cánceres de cabeza y cuello.

### 1.1.2. Factores de riesgo

Los principales factores de riesgo, y factores protectores para el cáncer de cavidad oral quedan resumidos en la Tabla 1.

#### **Tabaco**

El tabaco es el factor de riesgo más importante para el cáncer de cavidad oral, no solo por su fuerte asociación con la enfermedad sino por su alta prevalencia en determinadas poblaciones. Aproximadamente el 80% de los OCSCC son atribuibles al tabaco (Rothman 1978). Fumar tabaco expone a la mucosa oral a sustancias cancerígenas como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), aldehídos y nitrosaminas. El riesgo de desarrollar cáncer de cavidad oral aumenta con la duración del hábito tabáquico y el número de cigarrillos consumidos. Se han reportado riesgos incrementados en más de 11 veces de desarrollar OCSCC en poblaciones fumadoras de cigarrillos (Franceschi et al. 1990), aunque este riesgo varía según la población en estudio y variables como la duración y la intensidad del hábito (Blot et al. 1988). Es más, el abandono del hábito tabáquico reduce de manera rápida el riesgo de desarrollo de este tipo de patologías (Blot et al. 1988; Franco et al. 1989; Merletti et al. 1989; Franceschi et al. 1990). Así, el riesgo entre aquellos fumadores que hayan abandonado el hábito durante al menos 10 años se iguala al que tienen los no fumadores, lo que tiene importantes repercusiones a nivel de Salud Pública.

Existen importantes diferencias según el tipo de tabaco y la forma en que este es consumido. Así, se han reportado importantes diferencias entre el tabaco rubio y el llamado tabaco negro. Éste último posee niveles mayores de N-nitrosaminas y aminas aromáticas, con lo que es posible que el riesgo sobre el OCSCC varíe en comparación con el tabaco rubio (Boffetta et al. 1993; De Stefani et al. 1993; Sancho-Garnier et al. 1993). Un estudio de casos y controles con base hospitalaria en Uruguay reportó un riesgo incrementado tres veces superior entre los fumadores de tabaco negro para el cáncer de cavidad oral y faringe (De Stefani et al. 1998). Resultados similares se obtuvieron en un estudio realizado en población española hace algunos años (Castellsague et al. 2004). Algo parecido se observó en otro estudio de casos y controles pero únicamente para el cáncer de faringe (Schlecht et al. 1999).

<b>Tabla 1.</b> Relación de factores de riesgo y factores protectores para el cáncer de cavidad oral	
<b>Factor de riesgo</b>	<b>Factor protector</b>
<i>Establecidos</i>	<i>Establecidos</i>
Tabaco	
Alcohol	
Infección por HPV	
<i>Posibles</i>	<i>Posibles</i>
Enjuague bucal	Ingesta de fruta y vegetales
Mate	Vit C, vit E y beta-carotenos
<i>Insuficientes</i>	<i>Insuficientes</i>
Infección por HSV	Ingesta de fibra
Ingesta de grasa	
<i>Abreviaturas:</i> HPV, virus del papiloma humano; HSV, herpes virus simples.	

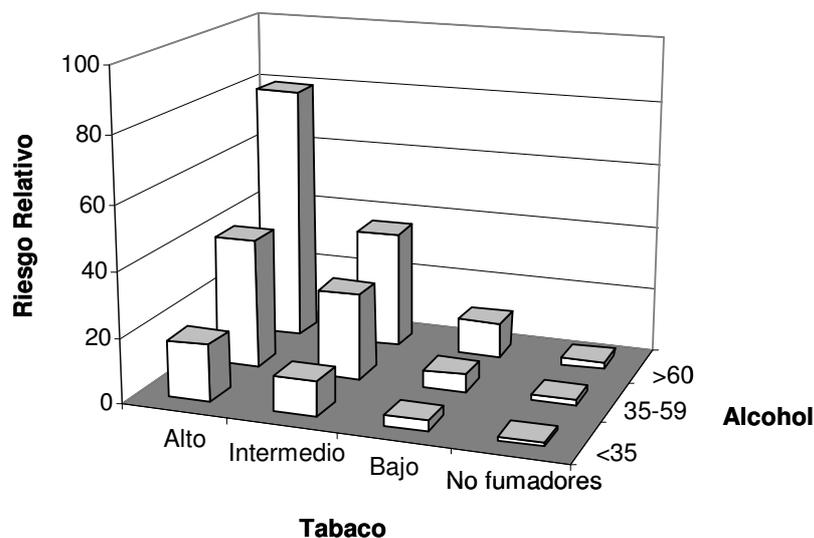
El tabaco mascado posee N-nitrosaminas, un compuesto químico con capacidad demostrada para producir cáncer de cavidad oral en modelos animales (Hecht et al. 1986; Hecht et al. 1988). El tabaco mascado aumenta el riesgo de desarrollo de tumores en la mejilla y en la encía, especialmente (Winn et al. 1981; Blot et al. 1988); aunque estos resultados no han sido reproducidos en cohortes posteriores (Boffetta et al. 2005), posiblemente debido a la heterogeneidad en la composición del tabaco en polvo según la región del mundo estudiada.

## **Alcohol**

Datos epidemiológicos recogidos durante más de 30 años parecen aportar suficiente evidencia acerca del papel de la ingesta de alcohol como factor de riesgo para el cáncer de cavidad oral, siendo la cantidad y la frecuencia las variables más importantes para condicionar ese riesgo (Blot et al. 1988; Kabat et al. 1989; Merletti et al. 1989; Franceschi et al. 1990; Choi et al. 1991). Se ha estimado que el consumo de 100 kg de alcohol a lo largo de la vida incrementa el riesgo de desarrollo de OCSCC en 3 veces, mientras que el consumo de 400 kg de alcohol aumenta este riesgo hasta en 7 veces (Franco et al. 1989). Aunque existe una importante asociación entre el hábito alcohólico y el tabáquico, se ha observado en bebedores exclusivos un incremento del riesgo de padecer OCSCC (Talamini et al. 1998; Hashibe et al. 2007).

No obstante, existe un claro sinergismo dosis dependiente entre los dos hábitos nocivos (Figura 1).

El mecanismo de acción por el cual el alcohol es un factor de riesgo para el OCSCC no está claro, máxime cuando el alcohol en su forma pura no es un cancerígeno en modelos experimentales. El acetaldehído, principal metabolito del etanol, se ha propuesto como candidato para explicar el riesgo que el alcohol tiene sobre el OCSCC, aunque no se ha establecido aún asociación directa. Además, algunas de las enzimas metabolizadoras del etanol como la alcohol deshidrogenanasa (ADH) y el CYP2E1, aparecen expresadas en la mucosa oral, lo que hace pensar que pueda existir alguna conexión con los metabolitos generados a nivel local. El efecto irritante que el alcohol tiene sobre la mucosa oral también puede ser relevante para explicar su asociación carcinogénica. Determinadas impurezas y contaminantes en las bebidas alcohólicas sí parecen ser cancerígenas. Así por ejemplo, se han detectado PAHs en licores como el whiskey, y N-nitrosodietilamina en algunos tipos de cerveza. Según esto, el tipo de alcohol ingerido puede ser determinante como factor de riesgo.



**Figura 3.** Efecto sinérgico del tabaco y el alcohol en el riesgo de desarrollo de tumores de cavidad oral. Riesgo relativo estimado por categorías de exposición. Alto: consumo de 25 o más cigarrillos al día durante 40 años o más; Intermedio: consumo de 14 cigarrillos o más al día durante menos de 30 años, o consumo de 15-24 cigarrillos al día sin influencia del tiempo, o fumar durante 30-39 años sin importar el número, o consumir 1-24 cigarrillos al día durante 40 años o más; Bajo: exfumadores durante 10 años o más, o fumadores que consumen 1-14 cigarrillos al día durante menos de 30 años. El alcohol está codificado según el número de tragos a la semana (Franceschi et al. 1990).

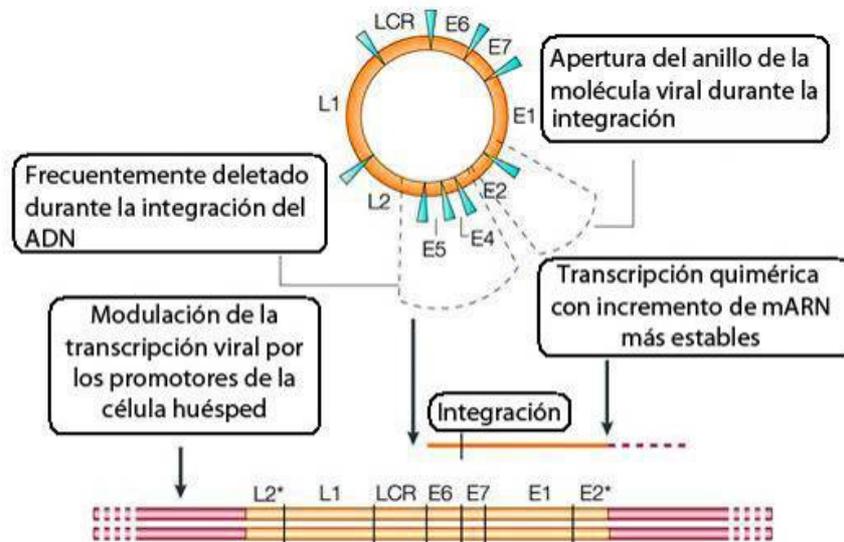
## Infecciones

El papilomavirus humano (HPV), así como otras infecciones como la producida por el herpes virus simple (HSV), en combinación con otros factores de riesgo, tienen un papel relevante en la etiología del cáncer de cavidad oral.

### *Virus del papiloma humano (HPV)*

El subtipo 16 del HPV está reconocido como agente causal del cáncer de cavidad oral. Las primeras evidencias surgieron de amplios estudios epidemiológicos donde se observaba la presencia continua de ADN del virus en tejido tumoral. Este ADN es transcripcionalmente activo con un número de copias para determinados genes aumentado. Un amplio estudio, que incluía a 1.670 casos y 1.732 controles reportó la prevalencia de ADN vírico en el 3,9% de los tumores de cavidad oral y en el 18,3% de los tumores de la orofaringe (Herrero et al. 2003). Es más, cuando los casos se comparan con los controles, se observó un incremento del riesgo de los anticuerpos frente a las proteínas contra HPV16 E6 y E7, tanto para el cáncer de cavidad oral (RR = 2.9, IC95% 1.7-4.8) como para el cáncer de orofaringe (RR = 9.2, IC95% 4.8-17.7).

La principal función de la proteína E7 del HPV 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 (Kissel'ov 2000). Se sabe que existe una interacción entre la proteína E7 del virus 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 Hausen 2000). Por lo tanto, la unión de E7 con pRb permite la expresión de genes como c-myc,  $\alpha$ -DNA-polimerasa, PCNA, Ki-67, proteína de manutención de minicromosomas (MCM), p16, ciclina A y E, incluso la inactivación de p21 y p27 (zur Hausen 2000; Middleton et al. 2003).



**Figura 4.** Mecanismo de acción del virus del papiloma humano (zur Hausen 2002).

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 endoplásmico (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).

La presencia del virus altera la biología del tumor e influye en el pronóstico de la enfermedad. Se ha reportado un aumento de la prevalencia de mutaciones en el gen p53 en los tumores HPV negativo, lo que se explica por la desintegración de la proteína debido a la acción de la oncoproteína E6 (Dai et al. 2004). Los enfermos HPV positivo tienen mayores ratios de supervivencia, posiblemente debido al incremento en la sensibilidad a la radiación que estos pacientes tienen (Hong et al. 2010).

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.

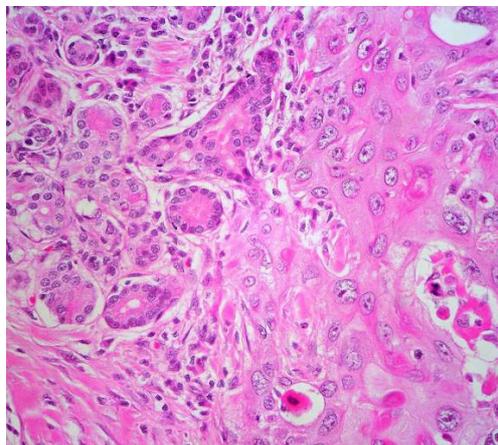
### *Otras infecciones*

El incremento en la incidencia del cáncer de cavidad oral en general, y de lengua en particular, sobre todo en cohortes de pacientes con enfermedades asociadas como la sífilis (Michalek et al. 1994), sugieren la participación de otras infecciones (HSV) en la etiología de este tipo de tumores (Binnie et al. 1983). Otras infecciones crónicas como la candidiasis han sido propuestas también como factores de riesgo para el cáncer de cavidad oral (Binnie et al. 1983; Harwood et al. 2000).

## **1.2. Histología**

El carcinoma de células escamosas es el tipo histológico predominante (más del 90%) en todas las localizaciones de cáncer de cabeza y cuello (*Figura 1*), excepto para la nasofaringe. En general, en los tumores de nasofaringe predomina el carcinoma indiferenciado (linfoepitelioma), y se utiliza la clasificación de la World Health Organization (WHO) en los siguientes tipos: tipo I (carcinoma epidermoide - queratinizante); tipo II (carcinoma de células transicionales - no queratinizante diferenciado); tipo III (carcinoma linfoepitelial - no queratinizante indiferenciado).

La clasificación para la determinación del grado de diferenciación se debe realizar a través de una escala numérica y descriptiva como la siguiente: GI bien diferenciado, GII moderadamente diferenciado, GIII pobremente diferenciado, GIV indiferenciado, GX no especificado. Asimismo, se recomienda la descripción de la profundidad de la invasión tumoral, y la invasión vascular o perineural. Otras variedades histológicas poco frecuentes son los linfomas, los sarcomas y los adenocarcinomas.



**Figura 5.** Imagen histológica de un carcinoma epidermoide de cabeza y cuello.

### 1.3. Patogénesis

En la patogenia del cáncer de cabeza y cuello tienen lugar numerosos acontecimientos genéticos que conducen a la inactivación de genes supresores de tumores, a la activación de proto-oncogenes que conllevan al desarrollo posterior del carcinoma o a ambos. Actualmente, las técnicas moleculares nos ayudan a conocer todas las alteraciones que se producen en las lesiones premalignas y malignas invasivas siendo posible realizar un modelo hipotético de la carcinogénesis. A través de estas técnicas se sabe que algunas mutaciones de determinados genes (pérdida de heterocigocidad, inactivación, hipermetilación, etc.) están asociadas con el desarrollo de tumores de peor pronóstico. Por ejemplo, la amplificación de 11q13, la mutación de TP53 y la sobreexpresión de la ciclina D1 podrían correlacionarse con un comportamiento más agresivo en este tipo de tumores, tal y como se describirá más en profundidad en capítulos posteriores.

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es necesario para la proliferación, supervivencia y diferenciación de las células normales, habiéndose observado que su desregulación puede producir oncogénesis (ver capítulo 3.3.1. de esta Tesis Doctoral para más detalles). EGFR se sobreexpresa en más del 95% de los CCC a través de distintos mecanismos de desregulación que llevan a la hiperactivación de la vía de transmisión de señales dependientes de EGFR y sus efectores.

Algunas lesiones premalignas en el tracto aerodigestivo superior pueden degenerar en una neoplasia. Se trata de la leucoplasia, la eritroplasia, la hiperplasia y la displasia. Esta última progresa a carcinoma entre el 15% y el 30% de los casos y su tratamiento varía desde la observación clínica hasta la cirugía parcial (láser) o radical.

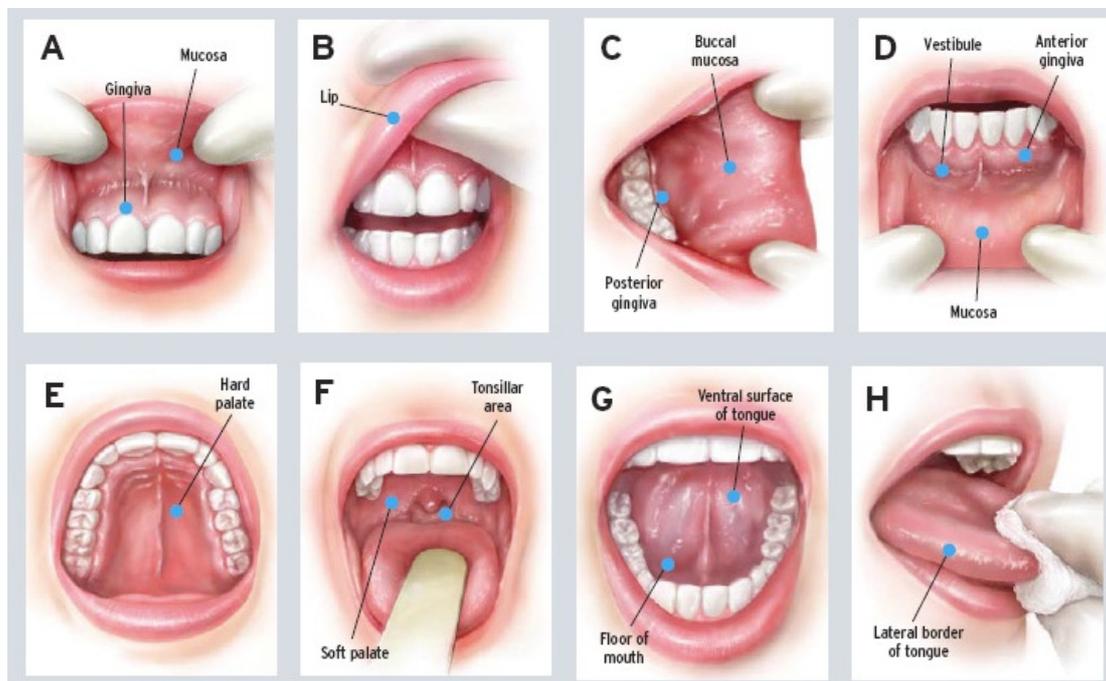
### 1.4. Presentación clínica y diagnóstico

Los signos y síntomas más frecuentes de los tumores de cabeza y cuello en general son: disfonía, odinofagia, disfagia, hemoptisis, disnea, dolor lingual, masa o úlcera en cavidad oral o en orofaringe, masa cervical, dificultad para la deglución, sinusitis y epistaxis. Para el caso particular de la cavidad oral, los síntomas más típicos son: manchas de color blanco y/o rojo en el interior de la boca o en los labios, llagas en las mismas localizaciones que sanan con dificultad o que no sanan, sangrado oral, caída de dientes, dificultad y/o dolor al deglutir, dificultad/dolor para llevar dentadura postiza,

bultos en el cuello o dolor de oídos. Cualquier paciente con este tipo de sintomatología debería ser revisado por un médico o un dentista a la mayor brevedad posible, para diagnosticar el problema en el menor tiempo posible.

El diagnóstico se basa en la observación clínica (inspección, palpación, endoscopia directa o indirecta con toma de biopsia) (Figura 4), así como las pruebas de imagen, tanto para definir la extensión loco-regional como a distancia.

La prueba más utilizada para definir la diseminación local y la afectación ganglionar en el momento del diagnóstico es la Tomografía Axial Computerizada (TAC), debido a su accesibilidad. Con esta técnica, se definen mejor la afectación ósea y los órganos móviles como la laringe; al tiempo que presenta menos artefactos con la deglución. La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) permite obtener una mejor definición de la extensión a tejidos blandos, de la diseminación perineural y vascular, así como de la afectación intracraneal, por lo que debe realizarse en determinadas localizaciones como la nasofaringe.



**Figura 6.** La exploración física de la cavidad oral debería comprender las ocho localizaciones especificadas en la figura (A-H), en busca de masas, llagas, manchas y cualquier otro signo relevante.

En los últimos años, se ha desarrollado una nueva prueba diagnóstica: la Tomografía por Emisión de Positrones (PET), que se utiliza habitualmente con 18-F-fluoro-deoxy-D-glucosa, aunque se están investigando otros trazadores. La PET y la TAC combinadas constituyen una herramienta de gran utilidad en la planificación del tratamiento con radioterapia, el estadiaje tumoral, la detección de los tumores ocultos, la valoración de la respuesta a los tratamientos y el seguimiento.

La característica principal de los tumores de cabeza y cuello es su rápida diseminación a los ganglios linfáticos regionales, que varía para cada localización y está relacionada con la extensión tumoral y con el grado de infiltración en profundidad. Por ello, es preciso definir de forma clara y precisa las regiones ganglionares. La clasificación más utilizada es la creada por la *American Head and Neck Society*, y la *American Academy of Otolaryngology-Head Neck Surgery*, en la que se definen los siguientes niveles ganglionares: IA submentonianos, IB submandibulares, II yugulares superiores (IIA anteriores, IIB posteriores), III yugulares medios, IV yugulares inferiores, V cervicales posteriores (VA superiores, VB inferiores), VI paratraqueales, VII mediastínicos superiores. También se deben destacar otras áreas ganglionares de riesgo como: retrofaríngea, parafaríngea, suboccipital, preauricular, periparotídea o intraparotídea y facial (músculo buccinador).

El riesgo de metástasis a distancia está más relacionado con la afectación ganglionar que con la extensión del tumor primario. La localización más frecuente de diseminación a distancia es la pulmonar, seguido de la ósea y la hepática. La afectación de los ganglios linfáticos mediastínicos también se considera metástasis a distancia, excepto los situados en el nivel VII (adenopatías mediastínicas superiores anteriores, situadas por encima de la arteria innominada). La supervivencia de este tipo de tumores empeora drásticamente cuando se detectan metástasis ganglionares por debajo del primer escalón ganglionar, sobre todo en las regiones ganglionares inferiores (niveles IV-VB, región supraclavicular).

En el 5% de los pacientes no se puede determinar el origen del tumor, debutando la enfermedad como una adenopatía o un conglomerado cervical. En estos casos, se debe realizar una inspección cuidadosa mediante endoscopia de toda la mucosa del área ORL, realizando biopsias de amígdala, base de lengua y nasofaringe, ya que son las localizaciones de origen más frecuente. También se realiza habitualmente una amigdalectomía y un PET/CT.

La realización de una analítica general y una radiografía de tórax es imprescindible para descartar tanto la diseminación a distancia como la existencia de otros tumores en el tracto aerodigestivo (los tumores sincrónicos son frecuentes, sobre todo en pulmón y esófago).

### 1.5. Estadiaje

El estadiaje tumoral se determina a través de la clasificación Tumor-Nódulos o ganglios linfáticos-Metástasis (TNM) del *American Joint Committee on Cancer (AJCC) Cancer Staging Handbook*, que es revisada periódicamente (Tabla 2a y 2b).

La clasificación por estadios es útil en la práctica clínica a la hora de confeccionar la pauta del tratamiento. El estadio clínico se determina mediante pruebas diagnósticas (observación y pruebas de imagen: TAC, RMN, PET y ecografía), mientras que el estadio patológico se basa en el estudio histológico de la pieza quirúrgica. El estadio patológico no reemplaza al clínico, sino que deben señalarse los dos a la vez, como recomienda la AJCC. Para definir el estadio patológico es muy importante que el anatomopatólogo especifique el tamaño del tumor, el estado de los bordes quirúrgicos, el grado de diferenciación y la afectación ganglionar, así como el estado de la cápsula ganglionar.

El examen de los ganglios linfáticos aislados tras la cirugía debe incluir el tamaño y número de los ganglios afectados, su localización y el nivel en el que se sitúan y la extensión extracapsular (ECS). Cuando la afectación ganglionar clínicamente mide más de 3 cm, se considera como conglomerado adenopático, siendo muy probable la afectación de los tejidos blandos adyacentes. En lo que se refiere a la cápsula ganglionar, es imprescindible determinar si existe ECS, lo que puede ser detectado mediante pruebas de imagen o examen histológico de la pieza quirúrgica. Los signos radiológicos de la ECS son: alteración de la morfología ganglionar, márgenes espiculados y afectación de tejidos blandos periganglionares.

**Tabla 2a.** Clasificación TNM clásica del carcinoma de cabeza y cuello

TUMOR PRIMARIO				
Labio, cavidad oral, faringe	Laringe	Nasofaringe	Cavidad nasal y Senos paranasales	Glándulas salivales
<b>T1</b> Hasta 2 cm	Supraglotis: una localización Glottis: limitado a cuerda vocal a: una cuerda b: ambas cuerdas Subglottis: limitado subglottis	Confinado a nasofaringe	Seno maxilar: limitado al seno sin erosión ósea CN y seno etmoidal: una localización.	Hasta 2 cm
<b>T2</b> Diámetro mayor entre 2 y 4 cm	Supraglotis: más de una localización, movilidad de cuerda normal Glottis: extensión a supra o subglottis, movilidad de la cuerda disminuida Subglottis: extensión acuerda, movilidad cuerda normal o disminuida	Afecta a orofaringe o fosa nasal a: sin extensión parafaríngea b: con extensión parafaríngea	CN y seno etmoidal: dos sublocalizaciones o localizaciones nasoetmoidales adyacentes Seno maxilar: erosión ósea, paladar duro, meato nasal medio. Seno maxilar: invade pared posterior de seno maxilar, tejido subcutáneo, pared medial/suelo de órbita, fosa pterigoidea, seno etmoidal CN y seno etmoidal: pared medial/suelo de la órbita, seno maxilar, paladar, lámina cribiforme	Diámetro mayor entre 2 y 4 cm
<b>T3</b> Mayor de 4 cm	Supraglotis: cuerda vocal fija, invasión área postcricóidea, espacio paraglótico o preepiglótico, erosión cartílago tiroideo Glottis: cuerda vocal fija, pero limitado a la laringe, erosión cartílago tiroideo Subglottis: fijación de la cuerda vocal	Invade huesos o senos paranasales		Extensión extraparenquimatosa, sin afectación del nervio facial o bien tamaño de 4-6 cm
<b>T4</b> Invade estructuras adyacentes	Invasión cartílago tiroideo o estructuras adyacentes	Extensión intracraneal o infiltra pares craneales, fosa infratemporal, hipofaríngea u órbita	Extensión al resto de los tejidos adyacentes.	Invade base cráneo, paladar, pterigoidea, arteria carótida, nervio facial o bien mayor de 6 cm.

<b>Tabla 2b.</b> Clasificación TNM clásica del carcinoma de cabeza y cuello			
<b>Afectación ganglionar</b>		<b>Metástasis a distancia</b>	
<b>N0</b>	No hay metástasis en los ganglios regionales	<b>M0</b>	No
<b>N1</b>	Metástasis en un ganglio homolateral de hasta 3 cm	<b>M1</b>	Sí
<b>N2</b>	A: Metástasis en ganglio homolateral entre 3 y 6 cm B: Metástasis en múltiples ganglios homolaterales, ninguno > 6 cm C: Ganglios bilaterales o contralaterales, ninguno > 6 cm		
<b>N3</b>	Metástasis en uno o más ganglios > 6 cm		

<b>Tabla 3.</b> Clasificación por estadios	
Estadio I	T1 N0M0
Estadio II	T2 N0M0
Estadio III	T3 N0M0 o T1-2-3 N1M0
Estadio IV	IVa: T4 N0-1 M0, cualquier N2M0 IVb: cualquier N3M0 IVc: cualquier M1

En la última revisión (séptima edición) del *AJCC Cancer Staging Handbook* se modifican algunos conceptos en el cáncer de cabeza y cuello estadio IV:

- En todas las localizaciones excepto la nasofaringe, los términos resecable e irresecable han sido reemplazados por moderadamente avanzado y muy avanzado. Es decir, los tumores T4 están subdivididos en T4a moderadamente avanzado y T4b muy avanzado.
- El estadio IV se reagrupa en IVa: enfermedad local/regional moderadamente avanzada, IVb: enfermedad local/regional muy avanzada y IVc: enfermedad metastásica.

No se han realizado cambios en el estadiaje ganglionar, pero sí se han añadido algunos conceptos complementarios: definir la extensión extracapsular (ECS+ o ECS-), que tras la cirugía se debe señalar como *En* (no determinada), *Eg* (macroscópica), *Em* (microscópica) y especificar si las adenopatías patológicas están situadas por

encima o por debajo del borde inferior del cartílago cricoides (región superior U o inferior L).

## 1.6. Tratamiento

La estrategia de diseño de tratamiento en el cáncer de cabeza y cuello tiene en cuenta la comorbilidad del paciente así como su estado general. Para ello, se recomienda utilizar las escalas *ECOG* o Karnofsky que puntúan estos factores del 0 al 5 y del 0% al 100%, respectivamente, en función de la capacidad del paciente para llevar a cabo su vida normal hasta su fallecimiento. Algunos factores externos al tumor, tales como el modo de vida (consumición habitual de tabaco y alcohol), el estado nutricional (que es determinante si la pérdida de peso es mayor 10% de la masa corporal) y el estado psicológico (el estado depresivo) van a afectar negativamente la supervivencia.

El tratamiento del cáncer de cabeza y cuello es multidisciplinar, por lo que la decisión terapéutica se debe tomar en un Comité de Tumores formado por especialistas en cirugía, oncología radioterápica y oncología médica. En general, los tumores precoces (T1-T2) sin afectación ganglionar, se tratan con cirugía o radioterapia (RT) según la localización y la experiencia de cada centro. El tratamiento combinado puede ser útil en los tumores intermedios (infiltrantes, T2 extensos, T3 exofíticos, No-N1). Por último, los tumores avanzados (T3-T4, N2, N3) pueden ser resecables, por lo que precisan adyuvancia con RT con/sin quimioterapia (QT); o irresecables, siendo su tratamiento la combinación de RT y QT, valorando tratamiento quirúrgico del cuello (en caso de residuo tumoral ganglionar). A continuación se describe brevemente cada técnica.

### 1.6.1. Cirugía

El tratamiento quirúrgico del cáncer de cabeza y cuello está limitado frecuentemente por la extensión tumoral y la necesidad de conservar el órgano para mejorar la calidad de vida. Los tumores de pequeño tamaño en localizaciones accesibles de la cavidad oral, faringe y laringe se pueden reseca al tiempo que se preserva la función del órgano y se obtienen los resultados deseados en cuanto a control local y supervivencia. Las nuevas técnicas quirúrgicas, que utilizan resección con láser por endoscopia así como los avances en reconstrucción de defectos con colgajos vascularizados, permiten realizar extensas cirugías reconstructivas tanto inicialmente como en las recidivas tumorales.

El análisis de la pieza quirúrgica ofrece información relevante sobre la extensión del tumor primario y los ganglios linfáticos regionales (habitualmente se realiza vaciamiento cervical). La biopsia del ganglio centinela es una técnica ya utilizada en otros tumores con excelentes resultados que actualmente se está estudiando en tumores de cavidad oral y orofaringe.

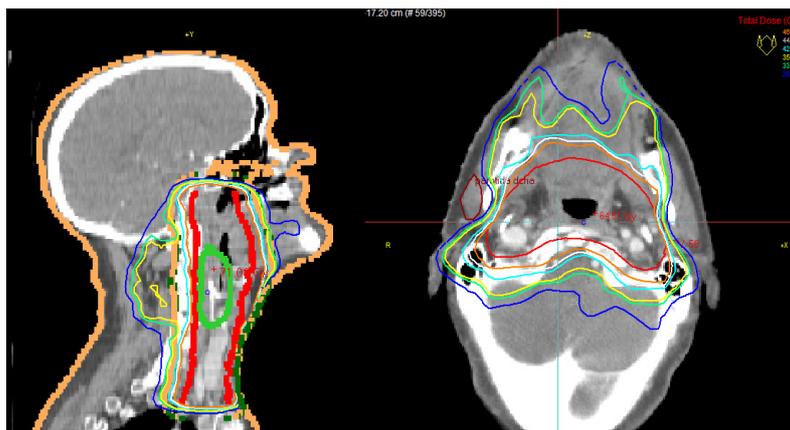
Habitualmente se realiza una disección cervical tras los tratamientos con radioquimioterapia (RT/QT) en enfermedad avanzada con afectación ganglionar extensa. Este tipo de cirugía puede ser obviada para reducir la toxicidad final si existe una remisión tumoral completa determinada por exploración clínica y por imagen radiológica (TAC o PET/TAC).

### *1.6.2. Radioterapia*

La RT constituye un arma esencial en el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello. Su uso exclusivo es beneficioso sobre todo en tumores precoces de laringe, orofaringe y nasofaringe. En los últimos años, ha experimentado un gran desarrollo debido a los avances en ingeniería, informática e imagen diagnóstica.

La radiación externa se administra con un Acelerador Lineal. La planificación de los tratamientos ha avanzado de forma continua y en la última década se ha pasado de realizar tratamientos sencillos basados en una simulación radiográfica en dos dimensiones a realizar una RT tridimensional mediante planificación con TAC o PET/TAC con la que se pueden delimitar de forma más adecuada los volúmenes de interés y los órganos de riesgo.

Los planificadores de última generación permiten visualizar de manera más exacta la dosis administrada e implementar nuevas técnicas como la intensidad modulada de dosis (IMRT) (Figura 5). Esta nueva modalidad de radiación permite aumentar la dosis en el tumor primario, manteniendo la dosis administrada en órganos de riesgo en niveles adecuados que permitan su función (como es el caso de las glándulas salivares) y que no produzcan toxicidad tardía. En la actualidad, se están realizando numerosos estudios con IMRT, tanto en tumores precoces extensos como en reirradiación, y es la técnica indicada como tratamiento estándar en los tumores nasofaríngeos.



**Figura 7.** Tratamiento con IMRT en un cáncer de pared faríngea posterior.

El fraccionamiento convencional se basa en la administración de una dosis diaria de radiación hasta conseguir la dosis prescrita. A partir de 1980, se comenzaron a estudiar las alteraciones del fraccionamiento convencional para intentar mejorar los resultados obtenidos en los tumores avanzados de cabeza y cuello. Los dos fraccionamientos alterados más utilizados son el hiperfraccionamiento y el fraccionamiento acelerado. Con el primero, se puede aumentar la dosis total fraccionando la radiación dos veces al día, con dosis por fracción menor que la convencional. En el fraccionamiento acelerado, se administran dosis por fracción similares a las del fraccionamiento convencional varias veces al día, lo que obliga a disminuir la dosis total. Con estas variaciones del fraccionamiento se han conseguido aumentar los resultados de control loco-regional y la supervivencia de los tumores avanzados (Bourhis et al. 2006; Budach et al. 2006; Michiels et al. 2009), aunque aumentan la toxicidad del tratamiento. Los resultados y la toxicidad también son superiores a los obtenidos con el fraccionamiento convencional. Los numerosos estudios que se han realizado valorando la asociación de QT y nuevos agentes biológicos a los fraccionamientos alterados muestran una importante toxicidad aguda, por lo que en la actualidad se recomienda utilizar el fraccionamiento estándar cuando se asocia a QT.

La braquiterapia es una técnica de radiación que consiste en introducir vectores plásticos o agujas vectoras en el seno del tumor para administrar una dosis mayor de radiación en menos tiempo al volumen estricto donde se localiza la enfermedad tumoral, lo que trae consigo una menor irradiación de los tejidos sanos circundantes (menor toxicidad). Comenzó a utilizarse a principios del siglo XX, y está indicada especialmente en los tumores localizados en cavidad nasal, piel facial, labios,

párpados, cavidad oral, lengua y orofaringe. Las tasas de curación en dichas localizaciones son comparables a las conseguidas con cirugía, siendo cercanas al 90% para tumores mayores de 2 cm y entre el 60% y el 80% para tumores entre 2 y 4 cm, al tiempo que se consigue preservar la función del órgano y la estética del paciente.

Otro avance en RT es la utilización de la Imagen Guiada (IGRT). Se utilizan diferentes técnicas con la finalidad de disminuir los movimientos que se producen durante la administración de la radiación.

En algunos centros de referencia, se puede utilizar la radioterapia con protones. Esta modalidad permite disminuir la dosis administrada en los tejidos que rodean al tumor, siendo de gran utilidad en las neoplasias próximas a estructuras como médula espinal o base de cráneo. Los estudios actuales van dirigidos a realizar tratamientos de Intensidad modulada con protones.

### *1.6.3. Quimioterapia y nuevos agentes biológicos*

La QT puede tener un papel paliativo en el cáncer de cabeza y cuello o formar parte de un tratamiento multidisciplinario en el cáncer localmente avanzado. Se denomina de inducción, concomitante o adyuvante según sea administrada antes, durante o después del tratamiento loco-regional. Los agentes quimioterápicos que han mostrado actividad en este tipo tumoral son los derivados del platino, los antimetabolitos y los taxanos. El cisplatino administrado de forma concomitante a la radiación se considera el tratamiento estándar en los tumores localmente avanzados. El carboplatino no ha demostrado aumentar la eficacia del cisplatino. Los taxanos forman parte del tratamiento estándar de la QT de inducción, junto con el cisplatino y el 5-fluorouracilo.

Los agentes moleculares han surgido como una nueva estrategia en el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello, tanto en monoterapia como en asociación con RT, QT o ambas. El cetuximab, inhibidor del EGFR, se ha integrado en la práctica habitual de tratamiento de los tumores localmente avanzados, administrándose en los pacientes que no toleran el esquema de QT tradicional. Otros inhibidores de EGFR son Panitumumab, Bevacizumab, Erlotinib, Gefitinib y Lapatinib. Los efectos secundarios más frecuentes relacionados con estos agentes son erupciones, diarrea, fatiga y anorexia.

#### 1.6.4. Nuevos tratamientos

De 1960 a 1980, la cirugía y la RT se consideraban las únicas armas terapéuticas contra el cáncer de cabeza y cuello. Posteriormente, se comenzaron a diseñar protocolos combinando QT, con la intención de preservar órganos y por tanto mejorar la calidad de vida de los pacientes. Los primeros resultados realizados con QT de inducción (QTI) mostraron similares resultados en cuanto a supervivencia respecto al tratamiento quirúrgico habitual, pudiendo preservar la voz hasta dos tercios de los pacientes. En 2003, el estudio de Forastière en cáncer de laringe, demostró mejores resultados de control loco-regional y preservación de laringe en el brazo de RT y QT concomitantes, por lo que se considera desde entonces el tratamiento estándar (Forastiere et al. 2003).

Se han realizado varios meta-análisis en cáncer avanzado de cabeza y cuello que demuestran que el tratamiento combinado de QT con cirugía o RT aumenta la supervivencia, siendo el cisplatino el agente quimioterápico más eficaz. El meta-análisis de Pignon, recientemente actualizado en 2009 con 17.346 pacientes, revela un beneficio absoluto de supervivencia de un 4% cuando se añade cualquier tipo de QT al tratamiento loco-regional (Pignon et al. 2009). El mayor beneficio (8%) se ha observado cuando se utiliza la QT de forma concomitante y cuando se utiliza cisplatino como único agente. El beneficio en la utilización de la QT de forma concomitante es similar en cuanto al tipo de fraccionamiento utilizado (convencional o alterado), siendo inferior en los pacientes con edad avanzada.

Cuando aparecieron nuevos agentes quimioterápicos como los taxanos, se renovó el interés por la QTI, pero utilizándola junto al tratamiento combinado para intentar disminuir la incidencia de metástasis a distancia. El esquema estándar en la QTI es la asociación de cisplatino, 5-fluorouracilo y taxano. En la actualidad, es un tratamiento muy utilizado, aunque las recomendaciones de las grandes instituciones no aconsejan hacerlo de forma indiscriminada ya que prolonga el tiempo de tratamiento y aumenta la toxicidad. Se están realizando estudios randomizados que comparan la asociación de QTI + RT/QT frente a RT/QT exclusiva, aunque no hay resultados definitivos. A la espera de estos, este esquema de tratamiento debe ser utilizado dentro de protocolos de investigación y puede ser tenido en cuenta en determinadas ocasiones: tumores muy avanzados, retraso en el comienzo de la RT, preservación de órgano, etc.

Desde el año 2006 se comenzó a utilizar el cetuximab para el tratamiento de este tipo de tumores. El estudio de Bonner, que comparaba la RT exclusiva frente a la RT asociada a cetuximab, mostró un aumento significativo de supervivencia cuando se asociaba este nuevo agente biológico (Bonner et al. 2006). Desde entonces, se ha incluido en numerosos protocolos de investigación tanto en monoterapia o asociado a nuevos agentes quimioterápicos (taxanos) o biológicos (bevacizumab). Recientemente, se ha publicado un estudio comparando la efectividad del cisplatino frente al cetuximab, asociados a la radiación, demostrando mejores resultados el cisplatino, por lo que se sigue considerando la QT estándar asociada de forma concomitante a la radiación. En la práctica clínica, la asociación de RT más cetuximab es una alternativa al esquema tradicional en pacientes que no toleran la QT (no aumenta la mielosupresión ni la mucositis), manteniendo su calidad de vida. Otros agentes moleculares en estudio actualmente son otros inhibidores del EGFR (Panituzumab o inhibidores de la tirosin quinasa) y los inhibidores de la angiogénesis. El bevacizumab es un anticuerpo monoclonal inhibidor del *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), por lo que podría influir en la aparición de metástasis a distancia. Se están realizando numerosos estudios en tumores localmente avanzados para valorar su eficacia, tanto en asociación de forma concomitante al tratamiento combinado (para potenciar la acción del cisplatino) como de forma adyuvante.

La RT adyuvante tiene un papel fundamental en los pacientes localmente avanzados resecables en cuanto a la disminución en la incidencia de recidiva loco-regional. Dos estudios randomizados publicados en el año 2004, en pacientes resecados con factores de mal pronóstico (afectación de márgenes quirúrgicos, extensión extracapsular o ambas), demostraron la ventaja de asociar QT a RT adyuvante en cuanto a mejora del control loco-regional y disminución de la incidencia de metástasis a distancia. Este esquema es considerado como estándar en estos pacientes (Bernier et al. 2004).

La dosis de radiación que se puede administrar está limitada debido a la proximidad de órganos de riesgo tan importantes como el tronco cerebral o las vías ópticas. Este hecho se ha podido obviar administrando dosis altas de radiación mediante la IMRT. Con esta técnica se consigue administrar una dosis adecuada de radiación al tumor primario y adenopatías afectas, al tiempo que se mantiene la dosis administrada a los órganos de riesgo dentro de unos límites aceptables de toxicidad (por ejemplo comparada con la RT tridimensional, la IMRT consigue una disminución importante de la xerostomía producida por la irradiación de las glándulas salivares).



## 2. FACTORES PRONÓSTICOS CLÁSICOS

El cáncer de cavidad oral (OCSCC) presenta significativos ratios de mortalidad y morbilidad según la Organización Mundial de la Salud en su informe sobre la situación mundial de esta patología (The World Oral Health Report, 2003). A pesar de los importantes avances realizados en el tratamiento de esta patología, y de los recursos en investigación dedicados a este tipo tumoral, los ratios de mortalidad no han variado significativamente. Esto ha motivado la búsqueda de marcadores pronósticos individuales que contribuyan al mejor manejo individualizado de los pacientes con OCSCC. En este capítulo se estudiarán los factores clásicos usados para el pronóstico de la enfermedad.

### 2.1. Factores relacionados con el paciente

#### 2.1.1. Sexo y Edad

Aparentemente, no parece que el sexo sea un factor relevante para el pronóstico del OCSCC, tal y como han reportado diversos autores (Nguyen et al. 2002; Lo et al. 2003; P et al. 2003), aunque algunos trabajos han reportado menor supervivencia entre las mujeres, posiblemente debido a que acuden a consulta médica especializada más tarde y a que aceptan peor los tratamientos (Leite et al. 1998).

El papel de la edad es igualmente controvertido a este respecto. Mientras que algunos autores no muestran relación alguna con esta variable (Al-Rajhi et al. 2000; Nguyen et al. 2002; Lo et al. 2003; P et al. 2003), otros han observado un peor pronóstico entre los pacientes de mayor edad (Leite et al. 1998; de Cassia Braga Ribeiro et al. 2003).

#### 2.1.2. Tabaco y Alcohol

Mientras que algunos trabajos no observan asociación significativa alguna entre la supervivencia en este tipo tumoral y los hábitos tabáquico y alcohólico (Lo et al. 2003), otros sí reportan una clara asociación entre estas variables, siendo peor el pronóstico y la mortalidad mayor entre los fumadores y bebedores (Leite et al. 1998; Ribeiro et al. 2000; de Cassia Braga Ribeiro et al. 2003).

Además, los fumadores y bebedores parecen tener un mayor riesgo de desarrollar tumores secundarios diferentes al oral, lo que complica el pronóstico de la enfermedad

y las expectativas de supervivencia (Silverman et al. 1983; Day et al. 1994; Carvalho et al. 2004). Este es el caso de aquellos pacientes que mantienen el hábito tabáquico y/o alcohólico tras el diagnóstico de su enfermedad; tienen un alto riesgo de desarrollar tumores secundarios (Silverman et al. 1983; Day et al. 1994; Deleyiannis et al. 1996).

#### *2.1.3. Condiciones socioeconómicas*

Aparentemente, el pronóstico es peor en aquellos pacientes diagnosticados de OCSCC que pertenecen a clases sociales inferiores o con menores niveles de educación. Esta asociación se explica, al menos parcialmente, por los deficientes hábitos de higiene oral en este segmento de población así como por un menor acceso a los cuidados médicos, sobre todo en países con asistencia sanitaria “no gratuita” (Leite et al. 1998).

#### *2.1.4. Retraso en el diagnóstico*

El retraso en el diagnóstico de la enfermedad lleva a que los tumores tengan más tiempo para crecer y diseminarse, lo que conlleva un irremediable empeoramiento del pronóstico. Aunque esta hipótesis parece establecida, los datos que se tienen hasta el momento para este tipo tumoral parecen desmentir el hecho (Allison et al. 1998). Una posible explicación para esta discrepancia es que aquellos pacientes con tumores más agresivos tienden a acudir a consulta médica antes; aunque esto no evita el hecho de que estos pacientes tengan que afrontar tratamientos más agresivos y un pronóstico peor debido a la alta malignidad de sus tumores.

#### *2.1.5. Miscelánea*

Otras condiciones comórbidas pueden empeorar el pronóstico de la enfermedad como consecuencia de un aumento del estrés sobre los pacientes (Piccirillo et al. 2002). Los ratios de supervivencia son menores entre aquellos pacientes que además sufren insuficiencia cardíaca congestiva, arritmias, enfermedad vascular periférica, enfermedad renal o pulmonar, así como otros tumores ya sean o no tratados (Piccirillo et al. 2002).

La depresión del sistema inmune parece ser relevante en el pronóstico del OCSCC, empeorando significativamente el mismo. Así, aquellos pacientes bajo tratamiento inmunosupresor secundario a un trasplante y que han desarrollado OCSCC tienen un

pronóstico peor que aquellos con un sistema inmune menos deprimido (Preciado et al. 2002). La supervivencia a 5 años es menor, de manera generalizada, entre aquellos pacientes inmunodeprimidos, independientemente de la causa (Whiteside 2001), lo que pone de manifiesto la importancia que el sistema inmune tiene sobre el control tumoral, así como el potencial valor terapéutico de la inmunoterapia en cáncer (Whiteside 2001; Rosenberg et al. 2004).

Algunos síntomas específicos como la odinodisfagia, la hemorragia oral o la pérdida de peso, se han visto asociadas a un peor pronóstico de la enfermedad y menor supervivencia (de Cassia Braga Ribeiro et al. 2003). Más concretamente, la pérdida de peso parece aumentar los ratios de mortalidad en pacientes con OCSCC con recurrencia o persistencia de la enfermedad, o con tumores secundarios (Nguyen et al. 2002).

## **2.2. Factores relacionados con el tumor**

### *2.2.1. Localización anatómica*

Las redes vascular y linfática, que varían según la localización anatómica, influyen sobre la evolución tumoral y el pronóstico. A este respecto, se ha observado que los ratios de metástasis son mayores entre los tumores de tipo escamoso localizados en la base de la lengua (Genden et al. 2003). También se ha publicado que los tumores localizados en la lengua tienen un peor pronóstico que los localizados en el labio (Leite et al. 1998). En este sentido, algunos lugares anatómicos se relacionan con peor pronóstico fundamentalmente debido a la cantidad de vasos linfáticos que favorece una mayor extensión de la enfermedad, una mayor dificultad para evaluar su gravedad, y un peor manejo de la misma (Tiwari 2000).

### *2.2.2. Estadio de la enfermedad*

El estadiaje de los tumores está basado en el sistema TNM. Este sistema, aunque está absolutamente implantado, no es útil para valorar el pronóstico de la enfermedad (Ribeiro et al. 2000; Nguyen et al. 2002; de Cassia Braga Ribeiro et al. 2003; P et al. 2003; Bettendorf et al. 2004; Takes 2004). A pesar de estos datos, la amplia mayoría de autores aceptan que el estadio de la enfermedad tiene una influencia crucial en el pronóstico. Así, Muñoz Guerra y col. han reportado una supervivencia a 5 años del 82% para pacientes en estadios iniciales de la enfermedad, y del 49% para los

pacientes en estados avanzados (Munoz Guerra et al. 2003); Lo y col. publicaron supervivencias a 5 años del 75, 65.6, 49 y 30% para los estadios I, II, III y IV respectivamente (Lo et al. 2003); Nguyen y col. encontraron ratios de supervivencia a 1 año del 60% para pacientes en estadio I y del 32% para pacientes en estadio IV (Nguyen et al. 2002).

La afectación ganglionar tiene una incidencia variable, pero se acepta que éste es uno de los principales factores pronóstico para los pacientes con OCSCC (Shingaki et al. 2003; Woolgar et al. 2003). La presencia de ganglios linfáticos afectados se asocia a un decrecimiento significativo de la supervivencia y a una mayor posibilidad de recurrencia (Genden et al. 2003; Greenberg et al. 2003b; Shingaki et al. 2003; Woolgar et al. 2003). La afectación ganglionar debe ser clasificada en dos grandes grupos: abierta o clínica y no-abierta u oculta. Esta última a su vez debe ser categorizada como i) afectación detectable por métodos tradicionales (por ejemplo, tinción microscópica con hematoxilina/eosina) o ii) afectación submicroscópica (solo detectables por técnicas inmunohistoquímicas o por análisis moleculares). Este tipo de técnicas son muy relevantes en la actualidad, ya que se detecta un 20-40% de afectación ganglionar oculta en pacientes que clínica e incluso radiológicamente habían sido catalogados como N0 (Greenberg et al. 2003b). En un análisis retrospectivo con 266 pacientes diagnosticados con OCSCC y sometidos a cirugía y disección cervical, se observó que el 34% de los pacientes inicialmente clasificados como cN0, tenían afectación oculta (pN+) (Greenberg et al. 2003a). Dado que los pacientes con afectación ganglionar presentan unos ratios de supervivencia menores (Greenberg et al. 2003a; Shingaki et al. 2003), el estadiaje anatomopatológico tras disección cervical debe realizarse para identificar aquellos pacientes de mayor riesgo que además deban ser tratados de manera adyuvante tras la cirugía.

### *2.2.3. Grosor del tumor*

El grosor del tumor primario condiciona el riesgo de afectación ganglionar y el ratio de supervivencia (Al-Rajhi et al. 2000; Gonzalez-Moles et al. 2002; P et al. 2003). Se ha reportado que un grosor superior a los 5 mm es un factor predictivo de afectación ganglionar oculta, recomendándose la disección cervical selectiva para aquellos pacientes con este tipo de tumores (P et al. 2003). Algunos autores sugieren incluso que esta variable tiene más influencia en la supervivencia que otras como estadio (Gonzalez-Moles et al. 2002).

#### *2.2.4. Invasión extracapsular*

La invasión extracapsular (ECS por sus siglas en inglés, *extracapsular spread*) se define como la extensión tumoral más allá de la cápsula del nódulo linfático. La presencia de ECS es un relevante factor pronóstico asociado a mayor probabilidad de recaída locorregional, metástasis a distancia y menor ratio de supervivencia (Greenberg et al. 2003a; Greenberg et al. 2003b; Woolgar et al. 2003). Se han publicado datos de supervivencia a 5 años del 21% para pacientes con ECS y del 64% para pacientes sin invasión extracapsular (Woolgar et al. 2003).

La ECS puede ser dividida en dos tipos: i) macroscópica, evidente a simple vista o ii) microscópica, solo observable tras estudios histológicos. No obstante, los estudios llevados a cabo para ver si el subtipo de ECS es relevante en la supervivencia parecen concluir que el pronóstico es el mismo con independencia de que la ECS sea micro o macroscópica, aunque siempre peor en comparación con pacientes que no sufren invasión extracapsular (Woolgar et al. 2003). Más aún, se ha reportado que aquellos pacientes N+ que además son ECS+ tienen mayor riesgo de recidiva y mayor mortalidad (Greenberg et al. 2003b). Este tipo de pacientes tienen una alta posibilidad de fracaso en el tratamiento, y deben ser considerados como serios candidatos a tratamientos adyuvantes. Con todo, parece ser importante incorporar la ECS a los sistemas de estadiaje patológicos (Woolgar et al. 2003).

#### *2.2.5. Diferenciación histológica*

El papel que el grado tumoral tiene en el pronóstico del OCSCC es controvertido. Hay autores que han establecido una asociación entre ambas variables, siendo peor el pronóstico cuanto mayor sea el grado de diferenciación (Nguyen et al. 2002; Piccirillo et al. 2002; Lo et al. 2003; Kosunen et al. 2004; Takes 2004); mientras que otros autores no han visto esta asociación (Leite et al. 1998; Al-Rajhi et al. 2000; P et al. 2003).

#### *2.2.6. Invasión perineural*

La invasión perineural se asocia aparentemente a una mayor probabilidad de recaída locorregional y metástasis a distancia, mayor profundidad de invasión tumoral, menor grado de diferenciación y menor supervivencia (Rahima et al. 2004). Así mismo, se ha

observado que la presencia de invasión perineural aumenta el riesgo de afectación nodal (Rodolico et al. 2004).

### **2.3. Factores relacionados con el tratamiento**

#### *2.3.1. Disección cervical*

La disección radical del cuello es el procedimiento quirúrgico clásico empleado para el tratamiento de tumores con afectación ganglionar. Este procedimiento, no obstante, aumenta la morbilidad de complicaciones secundarias a la cirugía, sobre todo en términos de disfunción en el hombro. La disección cervical selectiva, que depende de la localización tumoral, parece reportar similares ratios de control regional y supervivencia a los ofrecidos por la disección cervical radical (Ferlito et al. 2003). Para valorar la extensión de la disección cervical, se ha propuesto la determinación del ganglio centinela mediante la inyección de colorante o la linfocintografía, que ayudaría a decidir la agresividad de la intervención quirúrgica. La implantación de la determinación del ganglio centinela en este tipo tumoral no debe ser de difícil implantación, habiéndose reportado beneficios para los pacientes a este respecto (Taylor et al. 2001; Ross et al. 2002).

#### *2.3.2. Resección de márgenes*

Se ha demostrado una fuerte correlación entre la resección de márgenes quirúrgicos libres de enfermedad y mayores ratios de supervivencia, registrándose tiempos más largos en cuanto a recurrencia de la enfermedad (Al-Rajhi et al. 2000; Munoz Guerra et al. 2003; Woolgar et al. 2003).

### 3. FACTORES PRONÓSTICOS BIOLÓGICOS

#### 3.1. Angiogénesis

Los tumores malignos tienen la habilidad de inducir el crecimiento de nuevos vasos, fenómeno importante para la progresión tumoral, la agresividad y la capacidad de metastatizar. Este fenómeno tiene una regulación intrincada y compleja, siendo denominado angiogénesis (Carmeliet 2003). La angiogénesis tumoral se ha determinado clásicamente contando el número de nuevos vasos generados (densidad de microvasos, MVD) en secciones de tejido y usando técnicas inmunohistoquímicas (Hannen et al. 2004). La angiogénesis parece ser un importante factor relacionado con la hostilidad de tumores de cavidad oral (Shpitzer et al. 1996). Además, mayor angiogénesis incrementa el riesgo de afectación ganglionar y aparece como un factor pronóstico independiente de recurrencia, condicionando tratamientos adyuvantes más agresivos para los pacientes con mayores niveles de MVD (Bettendorf et al. 2004).

El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) tiene un papel fundamental en el desarrollo de nuevos vasos (Uehara et al. 2004). Se han observado correlaciones entre la expresión de VEGF y el pronóstico, de tal manera que cuanto mayor es la expresión de este marcador, peor es el pronóstico de los pacientes con OCSCC (Uehara et al. 2004).

#### 3.2. Expresión tumoral de ciclooxygenasa-2 (COX-2)

Se ha observado una fuerte correlación entre la sobreexpresión de COX-2 y el riesgo de afectación ganglionar, el mayor grado de recurrencia y el menor grado de supervivencia en pacientes con carcinoma de cavidad oral (Itoh et al. 2003). COX-2 parece expresarse no solo en las células tumorales, sino también en células del estroma tumoral y en los vasos sanguíneos circundantes, lo que sugiere una participación de esta molécula en otros procesos tumorales como invasión y metástasis (Day et al. 1994; Thomas et al. 1999).

Terakado y col. reportaron una relación de la expresión de COX-2 con la radioterapia. Así, aquellos tumores de cavidad oral con sobreexpresión de COX-2 eran más radorresistentes (Terakado et al. 2004). Más aún, la inhibición de COX-2 *in vitro* mostró mayor sensibilidad de las células tumorales a la radioterapia (Terakado et al. 2004).

### 3.3. Marcadores moleculares

Se han identificado numerosas aberraciones genéticas en tumores de cavidad oral, frecuentemente ligadas a los cromosomas 3, 9, 11, 13 y 17. Entre otras alteraciones relacionadas con la carcinogénesis del OCSCC se han descrito i) la inactivación de genes supresores como p16 y p53, ii) la sobreexpresión de oncogenes como PRAD-1, iii) o la alteración de genes relacionados con la metabolización de carcinógenos o iv) involucrados en la reparación del ADN (Scully et al. 2000c). Además, gran parte de los tumores de cavidad oral tienen actividad telomerasa (Bettendorf et al. 2004). El estudio de estos marcadores es importante para caracterizar las células tumorales, teniendo implicaciones relativas al riesgo (familiar), el diagnóstico, el estadiaje, el pronóstico o el tratamiento (Scully et al. 2000b).

### Oncogenes

#### 3.3.1. Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

El receptor para el factor de crecimiento epidérmico es un receptor de membrana activado por ligando, que una vez activo promueve una serie de cascadas de señalización complejas que llegan hasta el núcleo celular promoviendo la transcripción de una serie de genes. EGFR está relacionado con fenómenos de proliferación celular, diferenciación, migración, y antiapoptosis. Su sobreexpresión es común en tumores de mama, próstata, pulmón o vejiga, implicando un peor pronóstico (Scully et al. 2000c; Bettendorf et al. 2004). En relación al cáncer de cavidad oral, EGFR se ha asociado a mayor tamaño tumoral (T), invasión y afectación ganglionar (Bettendorf et al. 2004), así como a menor grado de diferenciación tumoral (Ulanovski et al. 2004). El OCSCC no está al margen de los ensayos realizados con inhibidores de EGFR (Myers et al. 2002; Shintani et al. 2004).

#### 3.3.2. Otros oncogenes

Se ha estudiado el papel de otros oncogenes en el contexto del cáncer de cavidad oral, destacando ciclina D1 y ciclina A. La ciclina D1 regula el ciclo celular, fosforilando a la proteína retinoblastoma promoviendo la transición de la fase G1 a la S del ciclo celular. La sobreexpresión de ciclina D1 es un factor pronóstico independiente en diversos tumores incluyendo cabeza y cuello, y se asocia a estadios más avanzados y mayor riesgo de afectación ganglionar (Schneeberger et al. 1998; Miyamoto et al.

2003), aunque hay resultados contradictorios al respecto (Scully et al. 2000b; Bettendorf et al. 2004).

La ciclina A juega un papel fundamental en la síntesis de ADN en fase S y la progresión de la fase G2 a la fase M. La sobreexpresión de ciclina A se asocia a estadios más avanzados de la enfermedad, mayor volumen tumoral, más afectación ganglionar y recurrencia (Chen et al. 2003).

### **Genes supresores**

#### *3.3.3. p53*

La proteína p53 es considerada una de las más influyentes en la carcinogénesis humana. Está involucrada en el control del ciclo celular, apoptosis y preservación de la estabilidad genética. Su sobreexpresión se asocia a mayor grado de indiferenciación tumoral y peor pronóstico. Las mutaciones en el gen p53 han sido motivo de extensos estudios, y son consideradas mejores factores predictivos de recurrencia y supervivencia que la simple expresión (Scully et al. 2000b). El impacto de p53 en respuesta a la radioterapia es confuso, reportándose resultados contradictorios en la bibliografía (Dijkema et al. 2000; Scully et al. 2000a; Bettendorf et al. 2004).

#### *3.3.4. Otros genes supresores*

Se ha estudiado el papel de otros genes supresores en el contexto del carcinoma de cavidad oral, destacando la proteína retinoblastoma (Rb), p16, p21 y otros. En algunos casos, se ha observado relación entre Rb (Takes et al. 2002), p16 (Scully et al. 2000b; Bettendorf et al. 2004) o p21 (Xie et al. 2002) y el pronóstico de los pacientes con OCSCC, aunque también se han reportado resultados contradictorios.

### **Ploidía**

Un contenido anormal de ADN se ha asociado a estadios más avanzados de OCSCC así como a otros marcadores de peor pronóstico como un menor grado de diferenciación o mayor afectación ganglionar. La ploidía parece ser un factor pronóstico independiente de recaída y muerte causa específica en este tipo tumoral (Byers et al. 1998; Rubio Bueno et al. 1998). Se considera que el estudio del contenido de ADN de las células presentes en el tumor invasivo, da una idea de la agresividad

tumoral y sugiere una influencia sobre la supervivencia causa-específica, sobre todo en combinación con otros hallazgos clínicos (Noguchi et al. 2002).

## 4. NUEVOS FACTORES PRONÓSTICOS MOLECULARES

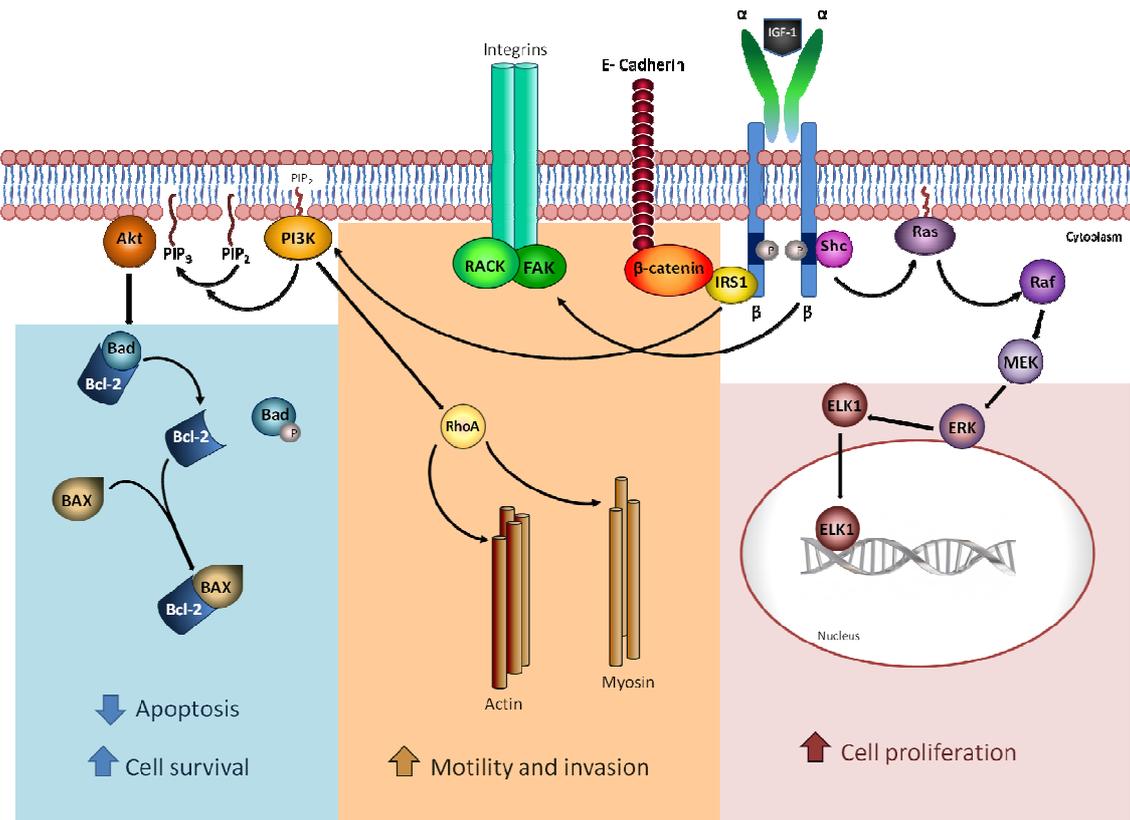
### 4.1. Receptor para el factor de crecimiento dependiente de insulina 1 (IGF-1R)

El receptor del factor de crecimiento dependiente de insulina 1 (IGF-1R) es un receptor de membrana de tipo tirosin-kinasa involucrado en el desarrollo y la progresión del cáncer, cuya activación promueve el crecimiento y la supervivencia celular. IGF-1R ejerce su acción principal a través de la activación de las rutas de *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) y de *phosphoinositol-3 kinase* (PI3K). Además de los roles asignados tradicionalmente a IGF-1R, su activación también se ha asociado con un incremento de la radioresistencia tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*, aunque los mecanismos moleculares que están detrás de este procesos son todavía inciertos. Recientemente, IGF-1R se ha relacionado con otros marcadores como *B-cell Leukemia Protein* (Bcl-2), *Bcl-2-associated X Protein* (Bax) o Ku70/80, los cuales están implicados en la resistencia a radioterapia, regulación de la apoptosis y mecanismos de reparación de ADN mediante unión de extremos no homólogos (*non homologous end joining* (NHEJ) DNA repair).

#### 4.1.1. Receptor del factor de crecimiento dependiente de insulina 1: una breve introducción sobre su estructura y función

El factor de crecimiento dependiente de insulina 1 (IGF-1R) es un receptor de membrana celular extensamente distribuido en los tejidos humanos. Su estructura y funciones han sido profundamente exploradas durante los últimos veinte años. La estructura final de IGF-1R es un homodímero con dos subunidades extracelulares  $\alpha$  y dos subunidades transmembrana  $\beta$ , unidas mediante puentes disulfuro (Adams et al. 2000). La subunidad  $\alpha$  contiene el dominio de unión al ligando, mientras que la subunidad  $\beta$  está formada por un dominio yuxtamembranal, un dominio intracelular con actividad tirosin-kinasa y un dominio C-terminal con función de interacción con otras proteínas (Ullrich et al. 1986). IGF-1 se une con alta afinidad a IGF-1R. Pero existen otros ligandos capaces de unirse a IGF-1R, como IGF-2 o la insulina. La concentración de IGF-1 circulante depende principalmente de su producción en el hígado, la cual está estrechamente controlada por la hormona de crecimiento (GH). La biodisponibilidad de los ligandos está controlada por una familia de proteínas de unión denominadas *IGF-binding proteins* (IGFBP 1-6). La proporción entre IGF libre y unido a IGFBPs es importante en la determinación de la potencia de este factor de crecimiento. Una vez que el receptor es activado por la unión de una molécula de IGF-

1, se desencadenan una serie de cascadas de transducción de la señal hacia el núcleo celular, modulando así algunas de las funciones celulares mediante la regulación de factores de transcripción. La variedad de respuestas celulares mediadas por IGF-1R es el resultado de la combinación de varias de estas rutas de señalización, entre las que encontramos la ruta de *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) y la ruta de *phosphoinositol 3-kinase* (PI3K), que median la proliferación y supervivencia celular (Figura 8).



**Figura 8.** Principales vías de señalización mediadas por la activación de IGF-1R, así como las principales moléculas efectoras.

La ruta de MAPK es una gran cascada de señalización que engloba un gran número de proteínas kinasa y que promueve principalmente el incremento de la proliferación y diferenciación celulares. IGF-1R enlaza con la ruta MAPK a través de la activación, mediante fosforilación, de la proteína *Src homology and collagen* (Shc). Esta activación es seguida por una secuencia de fosforilaciones de proteínas kinasa a través del citoplasma (Ras –*human homologue of rat sarcoma*-, Raf –*protein serine/threonine kinase encoded by the raf oncogen*- y MEK –*MAPK kinase kinase*-) las cuales llegan hasta la proteína *extracellular-signal regulated kinase 1 y 2* (ERK1 y

ERK2) (Robbins et al. 1992). No obstante, esta ruta parece controlar también los procesos de apoptosis a través del protooncogén Crk-II mediante una ruta dependiente de Ras, pero independiente de Raf-1/MAPK (Parrizas et al. 1997).

La proteína *insulin receptor substrate 1* (IRS-1) también se activa cuando IGF-1R es fosforilada. Esta proteína interactúa con p85 (que es la subunidad reguladora del PI3K), activando a la subunidad catalítica (p110) de PI3K, la cual induce a la producción de fosfolípidos activados (Oskouian et al. 2010). La proteína kinasa B (Akt) se activa gracias a estos fosfolípidos con la mediación de las proteínas *3-phosphoinositide-dependent protein-kinase* (PDKs). Una vez esto ocurre, Akt es capaz de inactivar a la proteína *Bcl associated death promoter* (BAD), que forma parte del complejo BCL-2/BAD (*B-cell leukemia protein/Bcl associated death promoter*), y así liberar a la proteína antiapoptótica BCL-2, todo ello regulado principalmente a través de las caspasas (del Peso et al. 1997). La fosforilación de BAD es uno de los mecanismos más importantes por los que IGF-1R induce antiapoptosis y supervivencia celular (Sell et al. 1995).

La activación de IGF-1R se ha relacionado también con la adhesión celular, motilidad celular y la metástasis tumoral (Tai et al. 2003). La activación de IGF-1R desorganiza los complejos  $\beta$ -catenina/E-cadherina, favoreciendo la separación celular. La motilidad y migración celulares están incrementadas por la interacción entre IGF-1R, las integrinas, la proteína *focal adhesion kinase* (FAK) y las proteínas RACK1, y por la activación de Rho-A, todo lo cual conduce a una reorganización del citoesqueleto de actina y mayor contractilidad de actina/miosina (Chitnis et al. 2008). IGF-1R estimula la secreción de anexina II a la matriz extracelular promoviendo la activación del plasminógeno, la adhesión celular y la metástasis e invasión tumorales (Tressler et al. 1993; Hajjar et al. 1999). Se ha sugerido que el mecanismo por el cual IGF-1R interacciona con anexina II es independiente de las principales rutas de señalización conocidas para IGF-1R (Zhao et al. 2003). Las proteínas IGF además inducen la expresión de metaloproteínas, necesarias para la invasión y estimula la angiogénesis mediante la activación de *endothelial nitric oxide synthase* y la expresión de las proteínas *hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$*  (HIF-1 $\alpha$ ) y *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (Chitnis et al. 2008).

Las funciones celulares están controladas no sólo por IGF-1R, sino también por otros receptores tirosin-kinasa que comparten las mismas rutas de señalización. Este es el caso del receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR), extensamente

relacionado con la transformación celular (Velu et al. 1987; Miyaki et al. 2000; Greulich et al. 2005). Debido a sus mecanismos de acción similares, varias publicaciones han estudiado la interacción entre los receptores para IGF-1 y EGF. El efecto combinado de IGF-1R y EGFR fue estudiado primeramente por Coppola y cols., en 1994. En su estudio, se mostró que, al menos en fibroblastos de embriones de ratón, la presencia de IGF-1R era necesaria para promover el efecto mitógeno y transformante de EGFR (Coppola et al. 1994). En 2000, Roudabush y cols., definieron un entrecruzamiento entre IGF-1R y EGFR (Roudabush et al. 2000). La presencia de IGF-1R parece tener un papel relevante como mecanismo de resistencia a las terapias anti-EGFR (Chakravarti et al. 2002). Esta interacción entre moléculas debe tenerse en cuenta a la hora de planear el tratamiento más apropiado.

#### *4.1.2. IGF-1R en radioterapia*

El papel que juega la expresión de IGF-1R en el cáncer ha sido extensamente estudiada (Bonnetterre et al. 1990; Papa et al. 1993; Railo et al. 1994). Sin embargo, la implicación de esta proteína en la respuesta a la radiación no está clara. La radiación causa la pérdida de estructura y función de la mayoría de las moléculas biológicas, incluido el ADN. Esta pérdida de estructura de la molécula de ADN incluye: la excisión de nucleótidos, roturas simples de cadena (SSBs) y roturas dobles de cadena (DSBs) entre otros. Las células han desarrollado a lo largo de la evolución algunos mecanismos para reparar las lesiones de ADN y así incrementar sus posibilidades de supervivencia. Sin embargo, si las células no son capaces de reparar el daño, se inicia el proceso de apoptosis. La radiación promueve un estado celular en el que se producen múltiples daños en el ADN. La lesión celular más importante inducida por la radiación es la DSB (Teoh et al. 2008). Si estas lesiones no se reparan, la célula se muere. Pero las células pueden invertir este daño, y lo hacen mediante dos mecanismos: recombinación homóloga (HR) y la unión de extremos no homólogos o reparación no homóloga (NHEJ) (Barker et al.). La NHEJ opera durante todo el ciclo celular, y por ello se cree que es la ruta de reparación de DSBs más importante en las células de mamíferos (Mladenov et al. 2011). Ambos tipos de reparación, NH y NHEJ, llevan a la célula a incrementar su supervivencia, pero en el segundo caso, la recombinación no específica que se produce resulta en una pérdida de información de las células dañadas, favoreciendo la supervivencia de fenotipos alterados los cuales presentan inestabilidad genética. Bajo estas condiciones, las células podrían evitar la apoptosis (por ejemplo mediante la sobreexpresión de IGF-1R o p53 alterada) lo cual

favorecería la malignización del tumor y la reducción de su respuesta al tratamiento (Teoh et al. 2008).

**Tabla 4.** Relación de estudios que relacionan la expresión de IGF-1R con el pronóstico clínico

Referencia	N° de pacientes	Tipo de tumor	Tratamiento	Expresión (%)	Expresión relativa	LRDFS	DMFS	DFS	OS
Turner, 1997	47	CM	L y RT	43.0	Sobreexpresión	Peor	-	-	-
Lloret, 2007	60	CC	RT, BT y ChT	80.0	Sobreexpresión	Peor	ns	Peor	Peor
Lloret, 2008	60	CC	RT, BT y ChT	80.0	Sobreexpresión *	Peor	Peor	Peor	Peor
Yuan, 2008	75	NPC	NR	56.0	Sobreexpresión	Peor	-	-	Peor
Peiró, 2009	197	CM	CX y RT	51.5	Sobreexpresión	Mejor	-	-	-
Taunk, 2010	345	CN	CX y RT	57.0	Sobreexpresión	ns	ns	-	Peor #
Henríquez-Hernández, 2011	60	CC	RT, BT y ChT	80.0	Sobreexpresión	Peor	Peor	Peor	Peor
					**				

*Abreviaturas:* CM, cancer de mama; CC, carcinoma cervical; L, lumpectomía RT, Radioterapia; BT, braquiterapia; ChT, quimioterapia; CX, cirugía; NR, no reportado; LRDFS, supervivencia libre de recaída loco-regional; DMFS, supervivencia libre de metástasis; DFS, supervivencia libre de enfermedad; OS, supervivencia absoluta; ns, no-significativo; NPC, carcinoma nasofaríngeo

\*Expresión combinada con MVP.

\*\*Expresión combinada con MVP/BCL-2.

# Solo en pacientes sin afectación nodular (N0)

El valor pronóstico de IGF-1R en la respuesta de las células cancerígenas a la radiación se ha analizado en múltiples estudios. En fibroblastos de embriones de ratón, aquellas células sin expresión de IGF-1R tuvieron valores altos de apoptosis inducida por radiación, mientras que las células que sobreexpresaban IGF-1R tenían este proceso inhibido (Tezuka et al. 2001). Resultados similares se han publicado en otras líneas celulares en las que la sobreexpresión de IGF-1R induce radioresistencia (Turner et al. 1997). Curiosamente, niveles fisiológicos de IGF-1R son un requisito imprescindible para el establecimiento y mantenimiento del fenotipo transformado (Baserga 1995). En líneas celulares de cáncer de mama positivas para el receptor de estrógeno (ER), los niveles de IGF-1R e IRS-1 están a menudo elevados, y estas características se han relacionado con un incremento de la radio-resistencia y de la reparación del tumor (Bartucci et al. 2001). En células de melanoma de ratón, aquellas en las que la expresión de IGF-1R se inhibió artificialmente, presentaron mayor radiosensibilidad comparado con las células control (Macaulay et al. 2001). Estos resultados *in vitro* subrayan la utilidad de IGF-1R en el pronóstico clínico de los pacientes con cáncer tratados con RT (Tabla 4). El primer estudio *in vivo* en este campo fue publicado en 1997 por Turner y cols. Ellos sugirieron que aquellos tumores

que habían sufrido una recidiva en las mamas irradiadas tras lumpectomía, representarían a un subgrupo especialmente radioresistente (Turner et al. 1997). La expresión proteica de IGF-1R fue examinada mediante técnicas inmunohistoquímicas en especímenes de pacientes con recaída local tras el tratamiento con radiación y comparada con casos control en los que no hubo recaída. La tinción de IGF-1R se clasificó así: 0, sin expresión; 1+, expresión ligera; 2+ moderada; 3+ fuerte, y 4+ intensa. Los valores por encima de 2+ (inclusive) se consideraron como positivos. IGF-1R estaba sobreexpresado en aquellos casos con recidiva tras el tratamiento con radioterapia (Turner et al. 1997). Este primer hallazgo clínico estaba en concordancia con los trabajos previos que demostraban la acción antiapoptótica de esta oncoproteína (Pietrkowski et al. 1992; Resnicoff et al. 1995). Sin embargo, no está claro si el efecto sobre la respuesta a radioterapia mediado por IGF-1R implica alguno de los reguladores apoptóticos conocidos, como las proteínas de la familia de BCL-2 o las proteínas CPP32 serin-cistein proteasas, o si está mediado por la interacción con otras moléculas. En 2007, Lloret y cols., estudiaron la expresión proteica de IGF-1R en pacientes con cáncer de cérvix tratadas con quimio-radioterapia (Lloret et al. 2007). Las muestras de tejido fueron tomadas al diagnóstico. La tinción de IGF-1R, observada en la membrana celular, fue clasificada semicuantitativamente según fuera negativa (-), ligeramente positiva (+), moderadamente positiva (++) o fuertemente positiva (+++), considerando sobreexpresión de IGF-1R aquellas muestras tumorales que presentaban tinciones moderada/fuertemente positivas. IGF-1R se expresó en 56 de 60 pacientes (93,7%) y no se encontró relación con otras variables clínico-patológicas. La respuesta completa al tratamiento (el factor pronóstico de supervivencia más importante) se observó en 50 pacientes. De este modo, analizaron el papel de IGF-1R en el control local y la supervivencia a largo plazo de los pacientes que presentaron respuesta completa al tratamiento. Las 19 pacientes con baja expresión de IGF-1R tumoral estuvieron libres de muerte relacionada con la enfermedad (tanto local como a distancia) en comparación con las 6 pacientes de 31 que presentaban niveles altos de IGF-1R tumoral, concluyendo que la sobreexpresión de IGF-1R se correlacionó con un peor control a largo plazo de la enfermedad en pacientes que inicialmente respondieron al tratamiento (Lloret et al. 2007). Yuan y cols., publicaron que la expresión de IGF-1R puede ser importante en la invasión, metástasis y recidiva en pacientes con carcinoma nasofaríngeo (Yuan et al. 2008). Los especímenes fueron recolectados durante la biopsia previa al tratamiento. Se aplicó un esquema de clasificación semicuantitativo, considerando tanto la extensión como la intensidad de la tinción: 0, completamente negativo; 1+, menos del 25% de células tumorales positivas; 2+, del 25% al 50% de células positivas, y 3+, más del 50% de

células positivas. La intensidad de la tinción se expresó de 0 a 3, expresando ausencia, débil, moderada o fuerte reactividad. La clasificación final de inmunoreactividad fue el resultado de multiplicar estos dos parámetros. Una puntuación de inmunoreactividad de 4 o superior se consideró sobreexpresión. IGF-1R estaba sobreexpresado en 42 de los 75 (56%) tejidos. Junto con EGFR, IGF-1R tuvo mayor expresión en tumores con metástasis en los ganglios linfáticos y existió una correlación positiva entre la expresión positiva de EGFR/IGF-1R y la recidiva. También hubo una supervivencia a 5 años significativamente mayor en los grupos negativos para EGFR/IGF-1R comparado con los grupos positivos para EGFR/IGF-1R (Yuan et al. 2008). Recientemente, Taunk y cols., analizaron el valor pronóstico de IGF-1R en una cohorte de pacientes con cáncer de mama en estadios tempranos tratadas con cirugía conservadora y radioterapia, con el fin de evaluar si la sobreexpresión de IGF-1R se correlacionaba con los resultados a largo plazo, particularmente con el control local. Las muestras fueron recolectadas durante la cirugía, previo al tratamiento con quimioterapia. La intensidad de la tinción de IGF-1R se clasificó así: 0 (0% de células inmunoreactivas), 1+ (1-9% de células inmunoreactivas), 2+ (10-40% de células inmunoreactivas), o 3+ (>50% de células inmunoreactivas). Los casos clasificados como 0 o 1 fueron considerados como el grupo de expresión negativa, mientras que los casos clasificados como 2 y 3 se consideraron como positivos. De los 345 pacientes evaluados, se detectó sobreexpresión de IGF-1R en 197 casos (57%). La expresión de IGF-1R no fue predictiva para supervivencia considerando la serie completa. Sin embargo, en los análisis del subconjunto de pacientes con nódulo negativo (factor clínico de buen pronóstico), la sobreexpresión tumoral de IGF-1R supuso una reducción significativa de la supervivencia de dichos pacientes, aunque aparentemente no tuvo efecto sobre el control local (Taunk et al. 2010). Solo un trabajo detectado en la bibliografía ha reportado resultados inversos, donde la sobreexpresión de IGF-1R sea un factor de buen pronóstico (Peiro et al. 2009). En este caso, las muestras se tomaron durante la cirugía, antes de los tratamientos con quimioterapia. La tinción de IGF-1R se clasificó de forma semicuantitativa de acuerdo con el porcentaje de células positivas y la intensidad de la tinción (puntuación de 0-300). Así, se observó que niveles altos de IGF-1R se relacionaron con una mejor respuesta al tratamiento (lumpectomía y posterior radioterapia) en aquellas pacientes con cáncer de mama en estadios tempranos y nódulos negativos, considerando por tanto los niveles bajos de IGF-1R como un factor de mal pronóstico para recidiva local (Peiro et al. 2009). Estas discrepancias pueden estar generadas por la selección de pacientes (series descritas de forma incompleta, diferencias en los protocolos de tratamiento o en la estrategia de análisis), y por otro lado, los resultados de las

determinaciones inmunohistoquímicas pueden no ser comparables ya que se aplican diferentes sistemas de clasificación, así como diferentes tipos de anticuerpos. Finalmente, a nivel de expresión génica, IGF-1R ha sido estudiada por Hirano y cols., en 46 muestras de cáncer de endometrio, 32 de cáncer de cérvix, 20 de cáncer de ovario y 28 en tejido normal de endometrio (Hirano et al. 2004), con la intención de tratar de revelar los mecanismos moleculares detrás de la aparente asociación clínica observada entre la sobreexpresión de IGF-1R y la respuesta a la radioterapia. En su estudio, los autores encontraron sobreexpresión de IGF-1R en los tumores de cérvix, comparado con el tejido normal (Hirano et al. 2004).

#### *4.1.3. Rutas moleculares relacionadas con la resistencia a radiación mediada por IGF-1R*

Aunque la asociación entre la expresión de IGF-1R y la respuesta a la radiación parece existir, se conoce muy poco sobre los mecanismos que están detrás de esta asociación. Esta relación puede ser explicada de un modo clásico, a través de la implicación de IGF-1R en la modulación de la proliferación celular, o mediante un modo alternativo que relacionaría a IGF-1R con la regulación de los mecanismos de reparación del ADN conjuntamente con otras moléculas como ataxia telangiectasia mutada (ATM) o en asociación con nuevas moléculas, como *major vault protein* (MVP). No obstante, probablemente ambos mecanismos participen en la regulación de la respuesta a la radiación mediada por IGF-1R.

##### 4.1.2.1. IGF-1R y proliferación celular

IGF-1R controla la proliferación celular a través de la clásica y bien descrita interacción con la ruta de señalización de las MAPK (Robbins et al. 1992). La proliferación celular puede determinarse mediante la tinción inmunológica de la proteína Ki67, tal y como se describirá más adelante. Esta es una proteína nuclear que se expresa en las células que están en ciclo celular; así, su determinación puede representar una medición de la fracción tumoral que está creciendo (Gerdes et al. 1983) y consecuentemente estimar la repoblación tumoral. El índice de Ki67 se ha evaluado en pacientes con cáncer tratados con radioterapia, buscando un mecanismo para predecir el pronóstico y la respuesta a la radiación de estos pacientes. La respuesta a la radioterapia se determina principalmente mediante la proliferación tumoral, radiosensibilidad e hipoxia. Durante los programas de radioterapia convencionales (unas 5

semanas), una parte significativa de la dosis diaria de radiación se utiliza para controlar la repoblación celular que se ha producido desde el día anterior (Bentzen et al. 1991; Raybaud-Diogene et al. 1997), disminuyendo así las probabilidades de control tumoral. Si los tumores se repueblan rápidamente, esta fracción será mayor, reduciendo la posibilidad de un control local duradero, y por lo tanto de curación. De este modo, los tumores altamente proliferativos tienen peor pronóstico como ya se ha demostrado previamente en pacientes con cáncer de cabeza y cuello (Valente et al. 1994; Raybaud-Diogene et al. 1997; Lera et al. 1998) o vejiga (Lara et al. 1998). En los tumores de proliferación lenta, la repoblación no es una cuestión de la que preocuparse, y pueden utilizarse dosis mayores de radiación durante períodos más largos, utilizando varias fracciones de radiación más pequeñas al día (Sarkaria et al. 1995). La relación directa establecida entre IGF-1R y la proliferación celular apunta a esta proteína como relevante en la modulación de la resistencia a la radioterapia.

#### 4.1.3.2. IGF-1R y reparación de DNA y apoptosis

Los rayos X interaccionan con las moléculas de los tejidos del cuerpo causando ionización y liberando radicales libres, los cuales causan daños secundarios en los tejidos adyacentes, incluyendo el ADN, mediante mecanismos dependientes de oxígeno. Los daños resultantes pueden ser tanto rotura simple como rotura doble de la cadena de ADN. Estas lesiones son reconocidas durante la evolución del ciclo celular en los puntos de control o *checkpoints* que promueven las rutas de reparación al ADN. El gen ATM, codifica para una proteína denominada ATM kinasa que pertenece a la ruta del PI3K, ruta de importancia en la progresión celular ya que promueve la proliferación celular e inhibe la apoptosis (Shtivelman 2003). Se ha identificado a ATM kinasa como un componente central para la ruta de control del daño al ADN (Savitsky et al. 1995). Cuando hay exposición a radiación ionizante, ATM kinasa es inmediatamente activada, resultando en la fosforilación de un número crítico de agentes involucrados en la reparación del ADN, apoptosis y arresto del ciclo celular. Peretz y cols., publicaron un enlace fundamental entre la función de ATM y la expresión de IGF-1R y sugirieron que la reducción de la expresión de IGF-1R contribuye a la radiosensibilidad de las células con ataxia telangiectasia (AT) (Peretz et al. 2001). Las células AT expresaron niveles bajos de IGF-1R y fueron más radiosensibles que las células de individuos

aparentemente sanos. La complementación de las células AT con moléculas de cDNA de ATM resultó en un incremento de la actividad promotora de IGF-1R y en los niveles de IGF-1R, lo que a su vez supuso un incremento de la radioresistencia. Los estudios moleculares sugieren que la señalización desencadenada por IGF-1R puede controlar la función de ATM, y apoya el concepto de la inhibición de IGF-1R como tratamiento potencial para los tumores radio-resistentes (Macaulay et al. 2001).

Las *Vaults* son partículas ribonucleoproteicas compuestas por tres proteínas: MVP (104 kD), el *vault poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase* también denominado VPARP (193 kD) y la proteína *telomerase-associated protein-1* o TEP-1 (240 kD), junto con pequeñas moléculas de ARN no traducido (vRNA) de 141 bases. Las proteínas VPARP pertenecen a la misma familia que la proteína *poly(ADP-ribose) polymerase 1* (PARP-1), la cual posee un papel importante en el control de la reparación del daño al ADN y el mantenimiento de su integridad (Bouchard et al. 2003). Se ha publicado una asociación entre IGF-1R y MVP (Lloret et al. 2008). Los tumores que presentan alta expresión de MVP también tienen elevada la expresión de IGF-1R. Las expresiones de MVP e IGF-1R se relacionaron entre sí en pacientes con cáncer de cérvix y confieren peor control local a largo plazo de estas pacientes tratadas con quimio-radioterapia, sugiriendo por primera vez una fuerte correlación entre estas dos proteínas (Lloret et al. 2008). La interacción entre IGF-1R y MVP es de gran interés, y puede ayudarnos a explicar el papel predictivo de estas oncoproteínas en la respuesta a radioterapia. En un estudio llevado a cabo en 116 mujeres con cáncer de cérvix localizado, Lloret y cols. mostraron una asociación inversa entre MVP y BAX, IGF-1R y BAX, así como una asociación directa entre IGF-1R y BCL-2, sugiriendo que IGF-1R podría colaborar con MVP en la prevención de la apoptosis mediante la estimulación de BCL-2 y la inhibición de BAX (Lloret et al. 2009). El rol de BCL-2 en este escenario parece ser complejo y estar estrechamente relacionado con IGF-1R. Esta asociación ha sido recientemente estudiada por Henríquez-Hernández y cols. también en pacientes con cáncer de cérvix (Henríquez-Hernandez et al. 2011). Los tumores que sobreexpresaron IGF-1R mostraron un incremento en los niveles de expresión de BCL-2 y MVP. BCL-2 apareció como un factor importante en el pronóstico de los pacientes, permitiendo seleccionar a un grupo de pacientes con excelentes tasas de supervivencia. De este modo, todos los pacientes con cáncer de cérvix tratados con quimio-radioterapia que

presentaban niveles de expresión bajos para MVP y/o IGF-1R y/o BCL-2 sobrevivieron durante los 10 años que duró el seguimiento. Parece que es necesaria la sobreexpresión de las tres oncoproteínas para desarrollar un fenotipo de mal pronóstico. Se han observado resultados similares para la supervivencia libre de recidiva local, supervivencia libre de metástasis a distancia y supervivencia libre de enfermedad (Henríquez-Hernández et al. 2011).

MVP se ha asociado con mecanismos de reparación no homólogos al DNA (NHEJ) a través de su interacción con la proteína Ku70/80 (Lloret et al. 2009). El dímero Ku70/80 se une a los extremos rotos de las cadenas de ADN al mismo tiempo que atrae a otras proteínas para constituir el complejo de reparación. Por otro lado, Ku70/80 tiene un efecto regulador muy potente sobre la interacción entre BCL-2 y BAX. Esta proteína ha sido propuesta como un modulador clave en la función de apoptosis (Amsel et al. 2008; Wang et al. 2008). Lloret y cols. publicaron que niveles bajos de expresión de Ku70/80 se relacionaron de forma inversa con la expresión de BCL-2 y la proliferación tumoral, mientras que estaban directamente relacionados con la expresión de BAX y p53 alterada (Lloret et al. 2009). La actividad de Ku70/80 está suprimida por PARP-1 (que forma parte de los complejos *vaults*), promoviendo la recombinación homóloga frente a NHEJ (Hochegger et al. 2006). La relación entre Ku70/80 y los complejos *vaults* se ha corroborado recientemente a nivel clínico (Lloret et al. 2009). La expresión de MVP y Ku70/80 estaba inversamente relacionada, sugiriendo que MVP podría favorecer el aumento de la inestabilidad genética reduciendo la reparación del ADN dañado en términos de NHEJ, e inhibición de la expresión de Ku70/80. La progresión tumoral y la resistencia a quimioterapia y radioterapia también parecen estar mediadas por la supresión de BAX y la sobreexpresión de IGF-1R, resultando en un aumento de la proliferación y una inhibición de la apoptosis, causado todo ello por el incremento de BCL-2 y la sobreexpresión de p53 alterada (Lloret et al. 2009). La inhibición de la señal inducida por IGF-1R produce radiosensibilidad a través de varios mecanismos. Cuando la función de IGF-1R está dañada, se aumenta la radiosensibilidad mediante un mecanismo que implica el descenso en la actividad de unión de Ku al ADN y la inhibición de Ku86 nuclear. Este mecanismo parece ser dependiente de la proteína p38 kinasa (Cosaceanu et al. 2007). A nivel clínico, Henríquez-Hernández y cols. han demostrado recientemente, en 50 pacientes con cáncer de cérvix que presentaron

respuesta completa a la quimio-radioterapia, que la expresión de Ku70/80 estaba significativamente inhibida en tumores que sobreexpresaban IGF-1R/MVP/BCL-2 (Henriquez-Hernandez et al. 2011). Ku parece ser un regulador central de la apoptosis por su interacción con BAX (Amsel et al. 2008) y BCL-2. Se ha demostrado, además, que este último suprime a Ku70/80 y así inhibe la reparación NHEJ (Wang et al. 2008). IGF-1R podría estar implicado en este proceso a través de la fosforilación de BAD, que posteriormente promueve la liberación de BCL-2, o mediante su asociación con MVP y la subsecuente modulación de Ku. Aunque el valor pronóstico de IGF-1R no está del todo claro, parece ser que esta oncoproteína podría ser un buen factor pronóstico en pacientes tratados con radioterapia, y actuar como una diana directa para mejorar la respuesta a la radiación de los pacientes con cáncer. IGF-1R podría afectar a la reparación del ADN mediante la regulación de Ku70/80 a través de su interacción con MVP y la ulterior modulación de NHEJ. Los mecanismos celulares por los que IGF-1R podría afectar a la actividad de Ku70/80 mediante MVP son desconocidos, y esta asociación teórica podría considerarse como una nueva hipótesis a estudiar para mejorar el conocimiento sobre el papel de IGF-1R en la resistencia a radioterapia.

## 4.2. Proteínas reguladoras de la resistencia a drogas. Papel de *Major vault protein* (MVP)

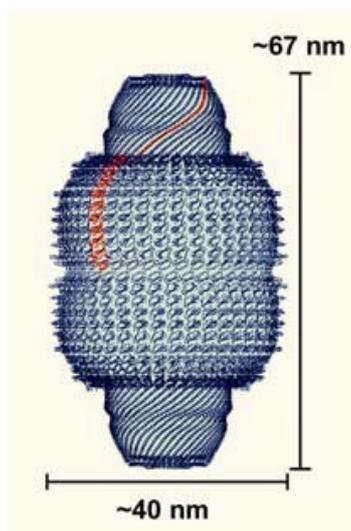
Las células tumorales insensibles a las drogas antineoplásicas poseen un fenotipo de resistencia a drogas. Las proteínas que pueden estar envueltas en esta resistencia están asociadas al transporte de xenobióticos: P-glicoproteína, la proteína 1 de resistencia a multidroga (MDR1), la proteína de resistencia en cáncer de mama (BRP) y la proteína relacionada con la resistencia en pulmón (LRP).

### 4.2.1. Estructura y composición

A la proteína LRP se la llamó posteriormente proteína *vault* mayor (MVP). 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 (VPARP y TEP1), además de moléculas de ARN sin traducir. MVP supone más del 70% de la masa total del complejo (Steiner et al. 2006a). Los estudios de vaults en mamíferos han 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 (VPARP o p193) (Kickhoefer et al. 1999a). La subunidad Mr240.000 presenta cierta similitud con la proteína asociada a la telomerasa 1 (TEP1) (Kickhoefer et al. 1999b). 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 VPARP, 2 moléculas de TEP1 y al menos seis moléculas de vARN (Kong et al. 2000).

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.



**Figura 9.** Estructura de Vault presente en hígado de rata (resolución, 3.5 Å) (Tanaka et al. 2009).

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. Se ha demostrado que VPARP cataliza la ribosilación ADP de sí mismo y, en menor medida de MVP (Kickhoefer et al. 1999a). 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. Los seres humanos presentan tres tipos de vRNAs (hvg1, hvg2 y hvg3) de 98, 88 y 88 bases, respectivamente. . 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 Zon et al. 2001). Esto sugiere que la proporción en que los tipos de vARN aparecen asociados a vaults puede ser de importancia funcional.

#### 4.2.2. Funciones putativas de Vaults

El detallado conocimiento estructural que se tiene de este complejo proteico contrasta con el escaso conocimiento que se tiene acerca de sus funciones y de las proteínas con las que interacciona.

MVP posee un papel fundamental y esencial como proteína de resistencia a drogas, tal y como se desarrollará en el siguiente apartado. No obstante, algunos autores sugieren que MVP puede estar relacionada con las mayores cascadas de señalización citoplasmáticas. 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. 2006a). MVP inhibe a fosfatasa homóloga de tensina (PTEN), que a su vez están relacionadas con el aumento de PI3K/Akt (Yu et al. 2002). Este dímero inhibe la apoptosis, inhibiendo a su vez a la proteína pro-apoptótica Bad (Rodemann et al. 2007).

En células estimuladas mediante la adición de factor de crecimiento epidérmico (EGF), se ha visto que MVP interacciona con los dominios SH2 de algunas tirosina fosfatasas, interaccionando a su vez con ras e interviniendo en la modulación de la actividad de la vía de Erk (Kolli et al. 2004). MVP también se une a los dominios SH2 de Src-quinasa, disminuyendo la activación de Erk dependiente de EGF en células que sobreexpresan Src (Kim et al. 2006). Esta proteína aumenta la proliferación celular a

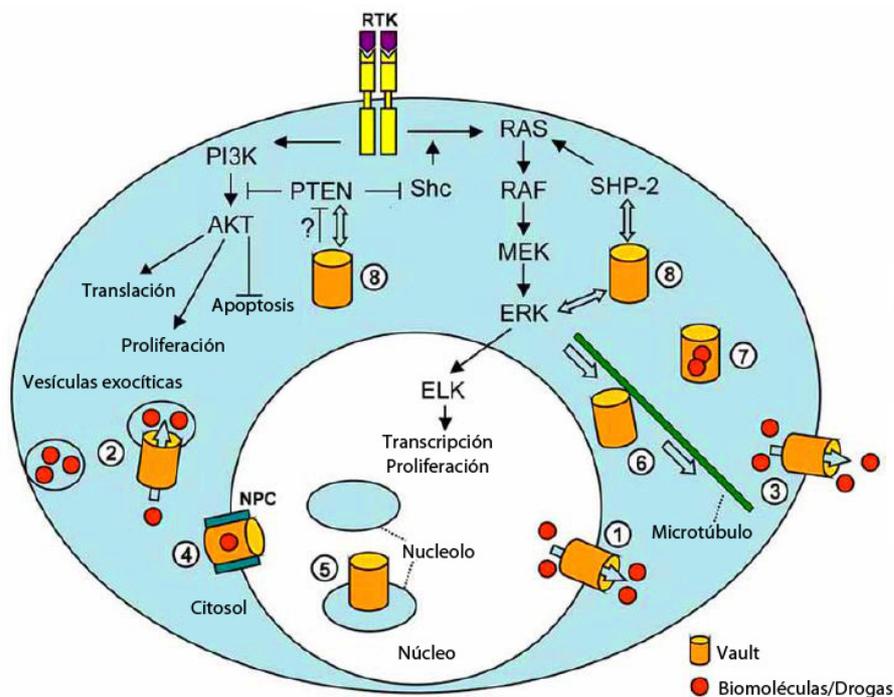
través de la vía de señalización dependiente de Erk/MAPK (Rodemann et al. 2007), y previene la apoptosis mediando la inhibición del eje COP-1/p53 (Lloret et al. 2008). Se ha observado además que los niveles de expresión de MVP están relacionados con los de IGF-1R en pacientes con cáncer cervical (Lloret 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 et al. 2007), así como con la relación existente con los procesos de remodelación de la cromatina (Emre et al. 2004).

El receptor de estrógeno es la proteína responsable 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 de acción hormonal (Beato et al. 1989). Abbondanza y col., han reportado 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).

Diferentes trabajos 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 et al. 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 y col, donde se buscaba establecer una función más clara para las partículas vaults y otras partículas de tipo 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. Vaults 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). Estos resultados sugieren que vaults estarían involucradas en el montaje y/o transporte de las subunidades ribosomales nucleocitoplásmicas (Hamill et al. 1997).

La capacidad de interacción de la proteína *constitutive photomorphogenic 1 ubiquitin ligase* (COP1) con el factor de transcripción c-jun parece estar condicionada por el estado de fosforilación de MVP. En modelos celulares, la fosforilación de MVP inducida por radiación UV impide una interacción con COP1, lo que conduce a un aumento del complejo COP1-c-jun, lo que al final modifica la expresión de AP-1 (Yi et al. 2005).

También se ha observado una asociación positiva entre los niveles del factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1) y MVP. Así, en células sometidas a privación de oxígeno, los niveles de ambas proteínas se ven aumentados. Parece que MVP media la ubiquitinación y posterior degradación de HIF-1 (Iwashita et al. 2010).



**Figura 10.** 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. 2006a).

Recientemente, se ha visto que MVP puede tener un papel relevante en la modulación del sistema inmune. El interferón g activa MVP a través de la vía JAK/STAT, mediando el aumento de expresión de MVP en macrófagos y células dendríticas (Mossink et al. 2003; Steiner et al. 2006b). No obstante, el papel de MVP en el sistema inmune está aún por dilucidar.

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.

#### *4.2.3. Resistencia a drogas: el papel más conocido de 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. Las proteínas de resistencia a multidroga (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 las 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).

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 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 crioinmunoeléctrica 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).

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 multidrogas (MDR). Tanto las células de carcinoma de faringe sensibles como las resistentes fueron sometidas a diferentes concentraciones de benzopireno y de doxirubicina. 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. 2000). Por su parte, Silva y cols. 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. 2000b). 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; Filipits et al. 2000b; Mossink et al. 2003). También participa en la resistencia a la adriamicina, y se cree que pueda estar asociado con los fenómenos de resistencia en algunos casos de neoplasias mamarias; aunque los mecanismos de acción subyacentes no han sido claramente dilucidados (Schneider et al. 2000).

Estudios en mielomas han visto relación entre la expresión de MVP y la resistencia a agentes alquilantes como el melfalano (Raaijmakers et al. 1998; Mossink et al. 2003). Además, la expresión de MVP en células tumorales está asociada a la resistencia a

doxorubicina, vincristina, carboplatino, etoposido, paclitaxel y gramicidina D (Filipits et al. 2000a). 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. 2000b). En el caso de la leucemia mieloide aguda, se ha observado que existe una co-expresión de Pgp, MRP1 y MVP. Generalmente, las peores respuestas al tratamiento y las 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). No obstante, son pocos los estudios que han evaluado el papel de MVP en los 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; Arts et al. 1999).

En el caso del cáncer de mama, en dos estudios en los 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. 1995; 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 et al. 1995). En el melanoma, se ha observado una alta expresión de MVP que parece correlacionarse con el comportamiento agresivo del tumor, como es el caso del 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 así como con una baja supervivencia (Uozaki et al. 1997).

En el estudio de Izquierdo y col., en donde se midió la expresión por 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. 1995):

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

Un estudio posterior realizado en pacientes con cáncer de mama, evidenció altos niveles de expresión de LRP/MVP en tumores primarios operables, tumores localmente avanzados, tumores localmente avanzados tras ser tratados con quimioterapia, y en tumores metastásicos 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 del 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), donde se observaron niveles elevados de MVP en células resistentes a varias clases de agentes citotóxicos. En cáncer de pulmón no microcítico, los niveles de expresión de MVP, determinados a nivel de proteína y de ARN mensajero (expresión), 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 realizaron transfecciones estables de MVP en líneas celulares de carcinoma ovárico A2780. 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 (Siva et al. 2001). Estos autores concluyeron que vaults podía ser necesaria pero no suficiente para conferir una resistencia a droga (Siva et al. 2001).

La hipótesis de que la expresión de MVP refleja una ruta de resistencia a multidroga ha promovido el 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 a la quimioterapia. En cáncer de ovario avanzado, los pacientes con tumores LRP positivos tuvieron una peor respuesta a la quimioterapia ( $p = 0.004$ ), así como una menor supervivencia libre de enfermedad ( $p = 0.003$ ) y supervivencia global,

en comparación con los pacientes LRP negativos (Izquierdo et al. 1995). Dos estudios en cáncer de mama encontraron una alta expresión de la proteína 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 sugiere 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 resistencia a la quimioterapia así como con una peor tasa de supervivencia (Uozaki et al. 1997). Se ha encontrado una relación entre LRP y ciertos factores pronósticos en carcinoma ovárico. En el estudio de Arts y col, realizado en 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 y col. analizaron la expresión de LRP en 68 pacientes con carcinoma colorrectal, observando que era un factor pronóstico independiente del grado histológico, el tamaño tumoral, el desarrollo de nodo linfático y de la 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 carcinoma de orofaringe, una alta expresión de MVP se relacionaba con una peor supervivencia y menor respuesta a la radioterapia (Silva et al. 2007). Harada y col. 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).

#### 4.2.4. 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 y col. realizado en líneas de cáncer colorrectal humano, se observó que 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). El primer estudio publicado que analizaba el papel clínico de MVP en pacientes tratados con radioterapia fue realizado por Silva y col (Silva et al. 2007). Analizaron la expresión de MVP en 78 biopsias de pacientes con carcinoma epidermoide de cabeza y cuello que recibieron radioterapia radical. Observaron que únicamente en pacientes con cáncer de lengua, la sobreexpresión de MVP se asociaba con un peor pronóstico de la enfermedad ( $p < 0.0001$ ), demostrando por primera vez a nivel clínico que LRP/MVP no sólo juega un papel importante en la resistencia a drogas sino también en la resistencia a la radioterapia (Silva et al. 2007).

Posteriormente, Lloret y col. analizaron el papel de MVP en 60 pacientes con carcinoma de cérvix (Lloret et al. 2008). Observaron una asociación directa entre la expresión de MVP e IGF-1R, y concluyeron que la sobreexpresión de cualquiera de las dos oncoproteínas disminuía significativamente los ratios de supervivencia. Más aún, aquellos pacientes que tuvieron respuesta clínica completa al tratamiento ( $n = 50$ ), y que además presentaban niveles bajos de expresión de IGF-1R y MVP, tenían unas tasas de supervivencia a 10 años del 100%. Constituyendo la sobreexpresión de cualquiera de las dos proteínas un factor de peor pronóstico (Lloret et al. 2008).

**Tabla 5.** Relación entre LRP/MVP respuesta y supervivencia en distintos tipos tumorales

	<b>Nº de pacientes</b>	<b>Tipo de tumor</b>	<b>Respuesta a quimioterapia</b>	<b>DFS</b>	<b>OS</b>
(Izquierdo et al. 1995)	57	Ovario	Si	Si	Si
(Schadendorf et al. 1995)	71	Melanoma	Si		
(Ramani et al. 1995)	21	Neuroblastoma			No
(Dingemans et al. 1996)	36	NSCLC	No		No
(Linn et al. 1997)	70	Mama	No		
(Uozaki et al. 1997)	60	Osteosarcoma	Si		Si
(Arts et al. 1999)	115	Ovario	No	No	No
(Pohl et al. 1999)	99	Mama	No	No	No
(Volm et al. 2000)	87	NSCLC	Si		No
(Goff et al. 2001)	29	Ovario	No		
(Pohl et al. 2001)	68	Colorrecto	No		
(Diestra et al. 2003)	83	Vejiga	Si		
(Harada et al. 2003)	57	NSCLC	Si		
(Silva et al. 2007)	78	HNSCC	Si		Si
(Lloret et al. 2008)	60	Cérvix	Si	Si	Si

*Abreviaturas:* NSCLC, non-small cell lung cáncer; HNSCC, head & neck squamous cell carcinoma; DFS, supervivencia libre de enfermedad; OS, supervivencia global.



### 4.3. Proteínas reguladoras de la apoptosis. Papel de BCL-2

#### 4.3.1. Generalidades

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 et al. 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 (“tal y como caen las hojas de los árboles”). Se postuló que el inicio inadecuado, o la inhibición de la apoptosis, podrían influir en la génesis de enfermedades como el cáncer.

Durante la apoptosis se produce i) la condensación de la cromatina con rotura del ADN (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 celular, 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 súper-producción 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 a todos los casos (Lockshin et al. 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 et al. 2005).

#### *4.3.2. Apoptosis: regulación, moléculas involucradas y fases*

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 promueve la supervivencia celular, disminuyendo la susceptibilidad a la apoptosis, pertenecen al grupo de los llamados oncogenes, destacando entre ellos el gen *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2). Aquellos genes que promueven la apoptosis se engloban dentro de los llamados genes supresores, entre los que destaca p53 y el gen del retinoblastoma (pRb). La mutación y/o el cambio en la expresión de estos genes, puede provocar un desequilibrio del 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. La anomalía o la 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, mutaciones o ausencia de p53 producirían una ausencia de muerte celular por apoptosis. De manera didáctica, el daño nuclear aumentaría la expresión de p53. Su mensaje apoptótico será

alentado por *Bcl-2 associated X proteína* (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 (por ejemplo, HPV-E6) (Morris 2002).

**P53** es una proteína de 393 aminoácidos cuyo gen codificador se encuentra en el cromosoma 17 y que posee varios dominios (May et al. 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 inhibitoras de p53 (SV40 Large T antigen protein),

favorecedoras de la misma (P53BP1/2) o 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.

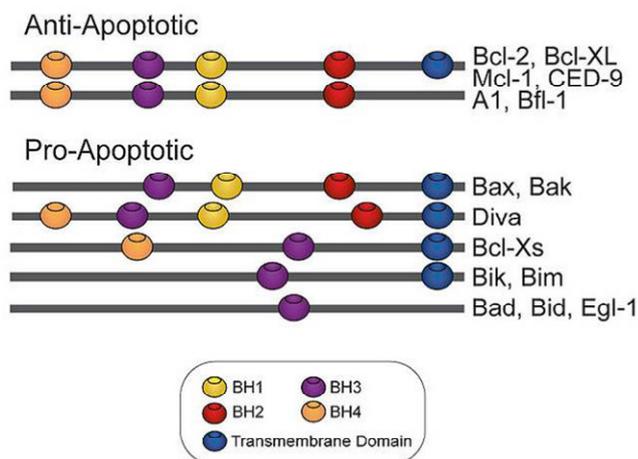
- El dominio C-terminal incluye:
  - Un dominio de oligomerización que permite la óptima configuración de p53 en forma de tetrámeros.
  - Una región de señalización de localización nuclear (NLS) relacionada con la translocación de p53 desde el citoplasma al núcleo.
  - Una región de unión con secuencias 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 et al. 2004).

En condiciones fisiológicas, p53 muestra niveles bajos 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 et al. 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 et al. 2002).

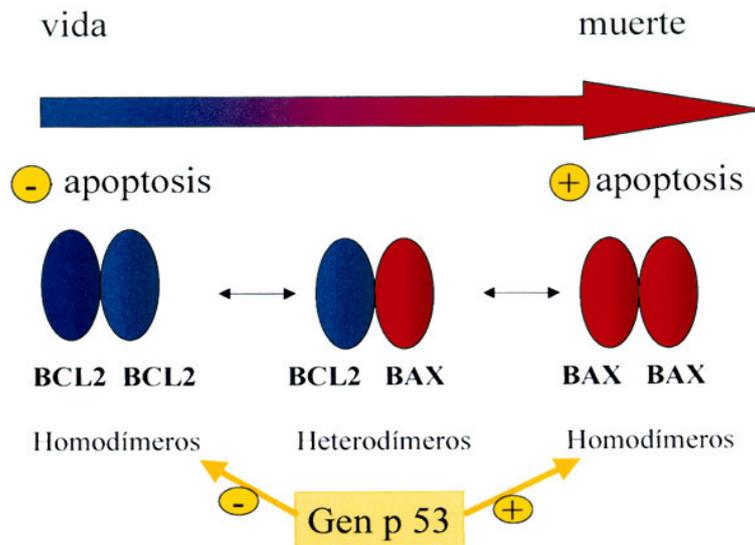
En condiciones normales, la expresión de Bcl-2 disminuye cuando las células están maduras o cuando tienen que ser eliminadas, mientras que se expresa en células que deben sobrevivir (células hematopoyéticas precursoras y células del sistema nervioso). Bcl-2 tiene un importante papel en la embriogénesis, 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 et al. 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).

### Familia de proteínas BCL-2

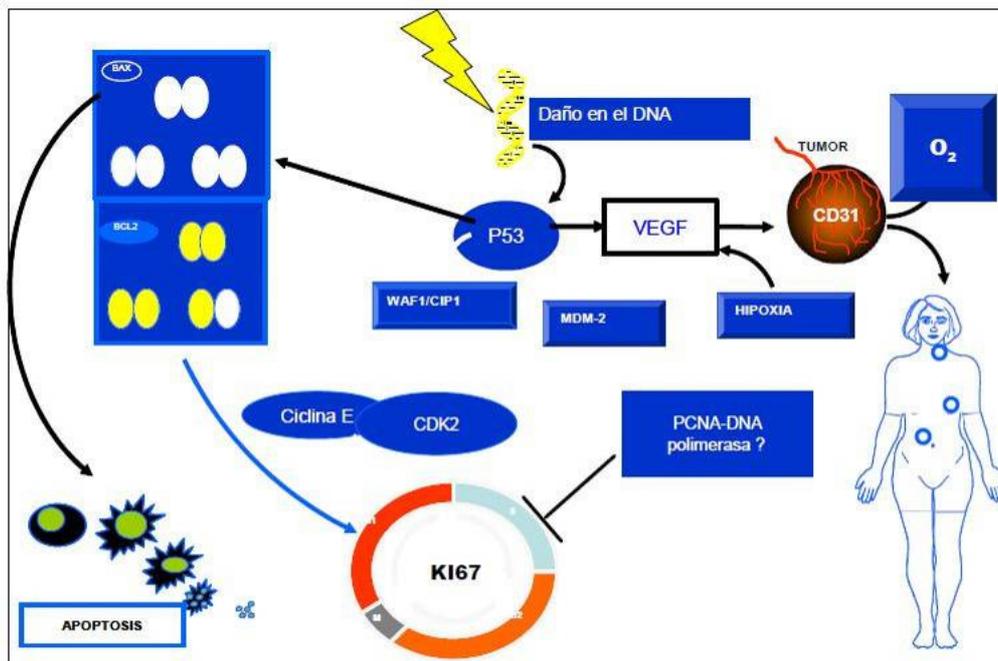


**Figura 11.** La familia de proteínas BCL-2 contiene muchas otras moléculas, divididas en dos grupos, anti-apoptóticas y proapoptóticas. La figura representa los dominios que presenta cada uno de sus miembros.

**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 (Figura 11). 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 Ca<sup>2+</sup> 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 12.** Bcl-2 y Bax, regulados por p53, controlan el destino final de la célula. La formación de homodímeros de Bcl-2 inhibe la apoptosis, mientras que la formación de homodímeros de Bax, propiciado por p53, induce la apoptosis celular. El equilibrio entre estas tres proteínas regula si la célula vive o muere.



**Figura 13.** Principales factores que influyen el ciclo celular y la apoptosis. (Disponible en: [www.biocancer.com](http://www.biocancer.com))

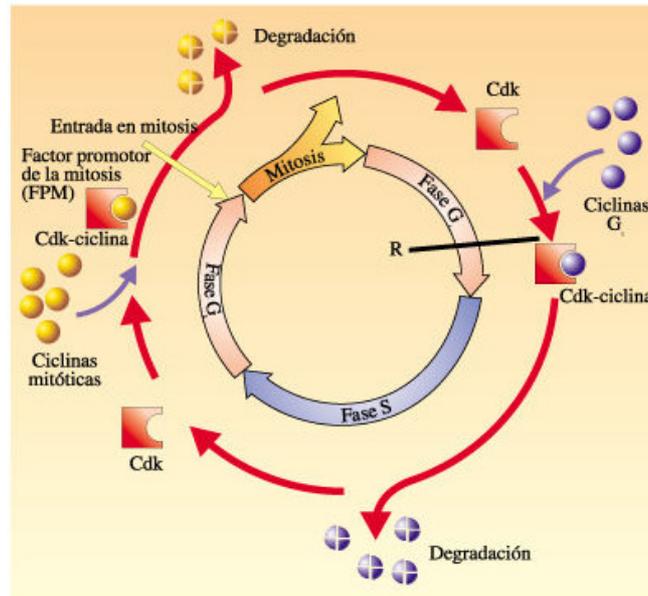
Bax, Bcl-2 y p53 son las principales proteínas involucradas en la apoptosis. No obstante, recientemente se ha descrito el papel que estas moléculas pueden tener en los procesos de reparación del ADN. Aparte de Bcl-2, Ku70 es capaz de secuestrar a Bax desde la mitocondria, provocando una regulación negativa 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). Bcl-2 por su parte es capaz de inhibir los procesos de reparación homóloga reduciendo la actividad de la proteína Ku (Ku70/80). Bcl-2 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 Bcl-2 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). El papel de Ku70/80 en la regulación de la reparación del ADN tiene una trascendencia terapéutica, ya que se ha observado que su inhibición condiciona una peor respuesta a la radioterapia, existiendo además una íntima relación con otras proteínas desarrolladas en esta Tesis Doctoral como IGF-1R y MVP (Lloret et al. 2009; Henriquez-Hernandez et al. 2011).



#### 4.4. Proliferación celular (Ki67)

El cáncer es una proliferación descontrolada de células con anomalías en su material genético. La proliferación celular está sometida, en primer término, a la presencia de factores externos 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 $\beta$ ) 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).



**Figura 14.** Ciclo celular y principales proteínas involucradas en el mismo. (Disponible en: [http://www.fisicanet.com.ar/biologia/informacion\\_genetica/ap1/ciclo\\_celular03.jpg](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 (DeWolf et al. 2004; Ivanchuk et al. 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 inhibitor 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 et al. 2009).

#### 4.4.1. Marcadores tumorales de proliferación celular

Los marcadores de proliferación celular pueden ser agrupados en tres categorías mayoritarias: (i) marcadores de la fracción de crecimiento; (ii) marcadores específicos de determinadas fases del ciclo celular; y (iii) marcadores de evolución (tiempo) del ciclo celular. La fracción de crecimiento (por ejemplo, la fracción de células en ciclo) puede ser fácilmente determinada mediante tinción con los anticuerpos Ki67 o MIB-1, que identifican antígenos expresados en las fases G1, S y G2 del ciclo celular (Gerdes et al. 1983; Cattoretti et al. 1992). La fase M puede ser evaluada mediante el conteo de las figuras mitóticas. Esta técnica es probablemente la más antigua metodología empleada para valorar la proliferación celular (Baak 1990). La fracción de células en fase S (SPF) puede ser determinada *in vivo* o *in vitro* mediante técnicas de incorporación de timidina tritiada (TH3) o de bromodeoxiuridina (BrdU), que es considerado el marcador estándar de células en fase S (van Diest et al. 1998). La SPF puede ser detectada por otros métodos, como la citometría de flujo o la detección por inmunohistoquímica del antígeno nuclear de proliferación PCNA/Ciclina, una proteína nuclear relacionada con los procesos de síntesis del ADN (Mathews et al. 1984). La determinación de PCNA y la tinción con BrdU son dos métodos muy robustos considerados de elección para la determinación del SPF en los servicios de anatomía patológica (Galand et al. 1989; Humbert et al. 1992). El tiempo de ciclo celular puede ser conocido mediante la determinación del tiempo potencial de duplicación (Tpot), una metodología que implica la inyección *in vivo* intravenosa de BrdU y posterior análisis por citometría de flujo (Riccardi et al. 1988). Otra manera de conocer el tiempo de ciclo celular es la cuantificación de la *proteína asociada con las regiones organizadoras nucleares* (AgNORs), que son bucles en el ADN que se transcriben a ARN ribosomal (Gall et al. 1969). La detección de AgNORs es sencilla, y puede ser realizada de manera rutinaria tanto en tejidos fijados como embebidos en parafina (Ploton et al. 1986). La cuantificación de esta proteína se relaciona directamente con los niveles de proliferación celular; así, a mayores niveles de AgNORs menor tiempo de duplicación y por tanto mayor proliferación celular (Derenzini et al. 1995; Dong et al. 1997).

#### *4.4.2. Papel pronóstico de la proliferación celular en tumores de cavidad oral*

La proliferación celular es un importante mecanismo para la oncogénesis (van Diest et al. 1998). Es más, la actividad proliferativa tumoral está considerada como un relevante factor pronóstico para diferentes tipos tumorales (Tubiana et al. 1989). El papel de la proliferación tumoral ha sido extensamente explorado, también en relación a los tumores de cabeza y cuello en general y de cavidad oral en particular.

De manera general, y para el caso particular de los tumores de cavidad oral, se asume que la alta proliferación celular se asocia a un peor pronóstico. No obstante, existen algunos trabajos que reportan resultados contrarios, siendo la proliferación un factor de buen pronóstico (Veneroni et al. 1997). Piffko y col. observaron en 80 pacientes con OCSCC que los niveles de AgNORs cuantificados en el frente invasivo del tumor eran el factor pronóstico más importante para la supervivencia (Piffko et al. 1997b), lo que implicaba la necesidad de aproximaciones quirúrgicas más agresivas para aquellos pacientes con mayores niveles de AgNORs (Piffko et al. 1997b). La mayor parte de los estudios realizados al respecto no reportan ningún tipo de asociación entre la proliferación celular y el pronóstico de la enfermedad. No obstante, es importante resaltar que los trabajos que determinan la proliferación celular mediante la cuantificación de AgNORs poseen los resultados más significativos y el mayor número de asociaciones significativas con el pronóstico (Teixeira et al. 1996; Piffko et al. 1997a; Xie et al. 1997; Xie et al. 1999).

#### *4.4.3. 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). 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).

En los estudios de Tsang y Bolger se demostró que había una supervivencia y mayor recidiva local en aquellos pacientes con un Tpot corto (Tsang et al. 1995; Bolger et al. 1996). Sin embargo, en un estudio posterior en donde se midió la proliferación celular mediante la incorporación de BrdU y Tpot por citometría de flujo, se observó que ninguno de los parámetros de proliferación pretratamiento tenían 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 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). 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.

Aunque la mayor parte de los artículos publicados a este respecto reportan una correlación positiva entre la alta proliferación celular y el peor pronóstico, existen otros muchos trabajos que no reportan asociación alguna. Existen una serie de razones que podrían explicar estas discrepancias:

- Lugar anatómico: el cáncer de cabeza y cuello es muy heterogéneo, aglutinando a tumores de diferentes tipos histológicos, con diversas actividades biológicas y, pos consiguiente, con distintos comportamientos clínicos.
- Tipo de terapia: Algunas series publicadas han sido hechas con pacientes tratados exclusivamente con cirugía, o con RT, o combinaciones de ambas incluyendo o no los tratamientos con quimioterapia. Las diferentes terapias,

sobretudo quimio y radioterapia, modifican la actividad biológica del tumor, por lo que es importante valorar los factores predictivos en relación a grupos homogéneos de pacientes.

- Estandarización de las técnicas: Existe una falta de estandarización de los protocolos que determinan la proliferación celular. Así por ejemplo, el número de figuras mitóticas puede ser evaluado de diferentes maneras, y cada procedimiento lleva a una cuantificación diferente del parámetro en cuestión. El uso de anticuerpos diluidos a diferentes concentraciones o el método de recuperación de antígenos empleado, lleva a resultados diferentes de las técnicas inmunohistoquímicas. Estas diferencias metodológicas explican en gran parte las diferencias observadas en los estudios.
- Lugar de la determinación: La determinación de la proliferación se puede realizar en los lugares más activos (por ejemplo, en el frente invasivo del tumor) (Piffko et al. 1997b), en áreas seleccionadas al azar (Pich et al. 1991; Pich et al. 1992), o en áreas de máxima tinción (Kropveld et al. 1998). Algunos autores eligen unas zonas y otros, otras; lo que condiciona los resultados reportados.
- Identificación de las células neoplásicas: Determinar el grado de proliferación tumoral implica que ese parámetro solo puede ser evaluado en células tumorales. Esto no siempre es sencillo y depende de la técnica utilizada. En este sentido, la cuantificación de AgNORs distingue de manera muy eficiente las células tumorales de las sanas.
- Actividad proliferativa: la relación matemática que existe entre la actividad proliferativa (PA), la fracción de crecimiento (G) y el tiempo de generación (T) de clones es  $PA = G/T$ . La tinción con Ki67 determina de manera sencilla y eficiente la fracción de crecimiento tumoral. Sin embargo, la determinación de la velocidad de duplicación mediante  $T_{pot}$  no parece ser un buen método según algunos autores. Por otro lado, la cuantificación de los niveles de AgNORs es un buen reflejo de la proliferación celular (Derenzini et al. 1995; Dong et al. 1997), y puede ser usado de rutina para tejidos fijados y embebidos en parafina (Ploton et al. 1986). Con todo, algunos autores han propuesto lo siguiente para determinar la actividad proliferativa de los tumores:  $PA = Ki67 \text{ o } MIB-1 \times AgNOR$ . La metodología empleada para la determinación de la actividad proliferativa condicionará, por tanto, los resultados obtenidos (Pich et al. 2004).

## **CAPÍTULO II**

# **OBJETIVOS**



## OBJETIVOS

1. Evaluar la prevalencia del carcinoma escamoso de cavidad oral en los Servicios de Cirugía Maxilofacial y Oncología Radioterápica del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín.
2. Evaluar los principales factores de riesgo y factores pronósticos clínicos en los pacientes con carcinoma epidermoide de la cavidad oral.
3. Determinar la expresión de IGF-1R en este tipo de tumores, explorar su relación con factores pronósticos clínicos y patológicos y su papel en la predicción del resultado clínico.
4. Estudiar la expresión proteica de MVP en estos tumores, la relación de esta proteína con otros factores pronósticos clínicos y moleculares, y su papel como factor predictivo de supervivencia en estos pacientes, y explorar la relación con IGF-1R y su papel combinado en la predicción de la respuesta y la supervivencia.
5. Investigar el papel de BCL-2 y la proliferación celular en el pronóstico clínico de estos pacientes, la asociación entre todos los marcadores biológicos, su relación con factores clínicos y patológicos y su papel predictivo en este tipo de pacientes.



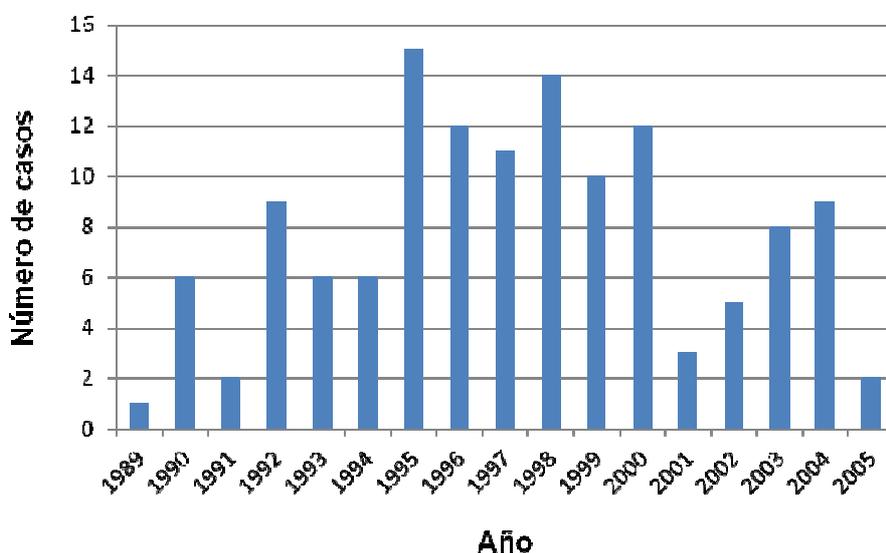
## **CAPÍTULO III**

**REVISIÓN DE LA SITUACIÓN DEL CÁNCER  
DE CAVIDAD ORAL EN LOS SERVICIOS DE  
CIRUGÍA MAXILOFACIAL Y ONCOLOGÍA  
RADIOTERÁPICA DEL HOSPITAL DR.  
NEGRÍN (1989-2005)**



## ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA SERIE DE PACIENTES

Durante el periodo comprendido entre julio de 1989 y abril de 2005, se recogieron todos los casos de cáncer de cavidad oral en el Servicio de Cirugía Maxilofacial del Hospital Universitario de Gran Canaria, Dr. Negrín. Del estudio, se excluyeron aquellos casos diagnosticados en otra Institución o de los que no se dispusiera de tejido en el Servicio de Anatomía Patológica de nuestro Hospital. El mayor número de casos se registró en los años 1995, 1998 y 2000; con 15, 14 y 12 pacientes reclutados, respectivamente (Figura 1). Los años 1989, 1991 y 2005 fueron los que menos casos registraron, aunque los años 1989 y 2005 no se computaron al completo (de julio a diciembre en 1989, y de enero a abril en 2005).



**Figura 1.** Número de pacientes reclutados en el estudio, por años.

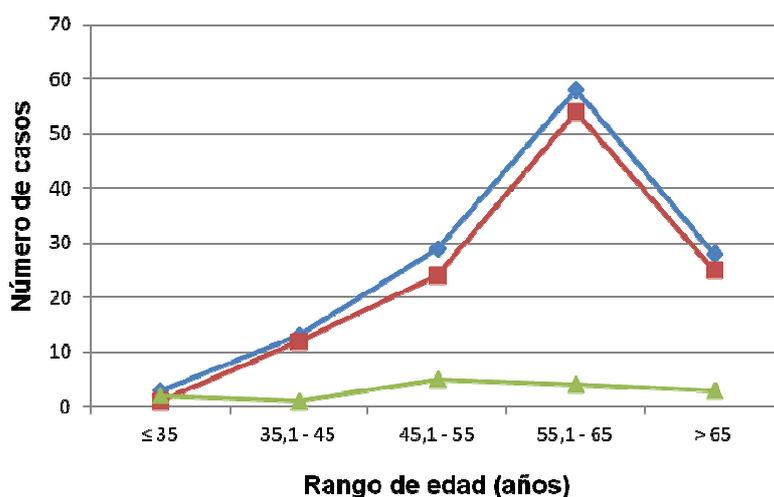
Un total de **131 casos** fueron incluidos en el estudio durante 17 años. Es difícil comparar la incidencia registrada en nuestro Hospital con la reportada a otros niveles, ya que los registros estadísticos agrupan al carcinoma de cavidad oral y de faringe.

Del total de casos, 116 eran hombres (88.5%) y 15 eran mujeres (Tabla 1), estableciéndose una **razón de sexo** de **7.73** veces más frecuente entre los hombres. Este dato está de acuerdo con lo reportado en líneas generales en nuestro país (Adami et al. 2008). De hecho, España es uno de los países con mayores diferencias entre sexo para este tipo de tumores, siendo 7 veces más frecuente entre los hombres que entre las mujeres. En el resto de países, esa diferencia está en torno a 2; y

aquellos países como EEUU, que reportaban amplias diferencias, han visto recortadas las mismas en los últimos 20 años (Adami et al. 2008).

La edad media de presentación de la enfermedad fue de 58.1 años (mediana, 59). Es bastante raro observar casos en pacientes menores de 35 años. En nuestra serie de pacientes, 3 tenían una edad menor o igual a esa. De ellos, dos eran mujeres (edad, 23 y 31 años) y uno solo era hombre (edad, 35 años). Este número es ligeramente superior a lo reportado por otros autores para nuestro país, donde las mujeres jóvenes presentaban mayores incidencias que los hombres en el mismo rango de edad (Adami et al. 2008). Entre los hombres, la edad media de presentación de la enfermedad fue de 58.3 años; entre las mujeres, esa edad media fue de 56.7 años, no siendo esa diferencia de edad estadísticamente significativa.

Los tumores de tipo epitelial son dependientes de la edad, esto es, a mayor edad, mayor incidencia. La distribución por edad en nuestra serie no cumple estrictamente con lo reportado por otros autores (Figura 2), que observan un aumento de la incidencia exponencial conforme aumenta la edad de los pacientes (Adami et al. 2008). No obstante, este perfil de distribución, con un aumento hasta los 60 años seguido de un decrecimiento de la incidencia a partir de los 65, ha sido observado en algunas poblaciones tales como Bas-Rhin (Francia). En general, existen importantes diferencias de distribución por edad según la población en estudio (Adami et al. 2008).

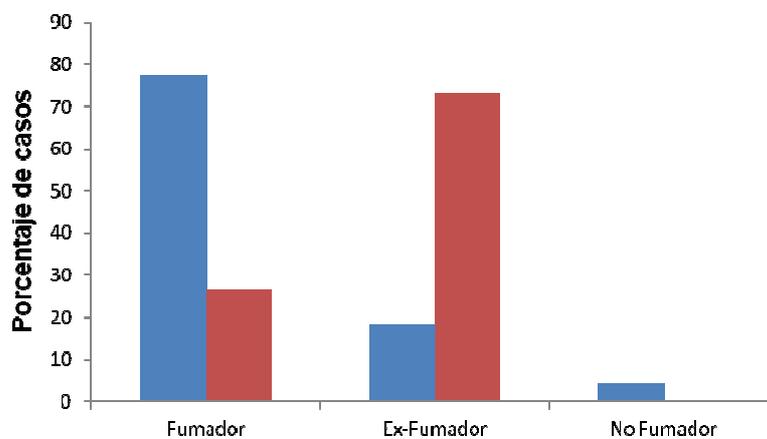


**Figura 2.** Número de pacientes reclutados en el estudio según grupo de edad en la serie global (♦), entre los hombres (■) y entre las mujeres (▲).

**Tabla 1.** Análisis descriptivo de las variables demográficas de la serie de pacientes incluidos en esta Tesis Doctoral

Variable	N	(%)	Media $\pm$ SD	Mediana (Rango)
<b>Edad</b>	131	100	58.1 $\pm$ 10.41	59 (23-97)
<b>Sexo</b>				
Hombre	116	88.5		
Mujer	15	11.5		
<b>Hábito tabáquico</b>				
Fumador	94	71.8		
No fumador	16	12.2		
Ex-fumador	21	16.0		
<b>Hábito tabáquico absoluto</b>				
Fumador	115	87.8		
No fumador	16	12.2		
<b>Hábito alcohólico</b>				
Bebedor	74	56.5		
No bebedor	35	26.7		
Ex-bebedor	21	16.0		
<b>Hábito alcohólico absoluto</b>				
Bebedor	95	72.5		
No bebedor	35	26.7		

Únicamente el 12.2% de la serie (n = 16) declaró no haber fumado a lo largo de su vida. En el momento del diagnóstico, el 71.8% de los pacientes (n = 94) fumaba. El hábito tabáquico se mostró significativamente diferente en función del sexo (Figura 3).

**Figura 3.** Distribución del hábito tabáquico entre hombres (■) y mujeres (■).

Así, el 26.7 de las mujeres eran fumadores en el momento del diagnóstico ( $n = 4$ ), frente al 77.6 % de hombres fumadores al diagnóstico ( $n = 90$ ) ( $P < 0.001$ ). El tabaco es el principal factor de riesgo para el cáncer de cavidad oral. Observamos que la edad media al diagnóstico entre los fumadores era de 56.74 años, mientras que entre los no fumadores, la edad media fue de 59.69, siendo esta diferencia significativa ( $P = 0.020$ ).

Respecto al consumo de alcohol, el 72.5% ( $n = 95$ ) de los pacientes declararon hábito alcohólico a lo largo de su vida, siendo activos al momento del diagnóstico el 56.5% de los individuos ( $n = 74$ ) (Tabla 1). También observamos diferencias significativas respecto al sexo ( $P < 0.001$ ), destacando el hecho de que ninguna mujer reportó hábito alcohólico alguno. Esto es, todas las mujeres de la serie son no bebedoras.

Es de destacar el hecho de que 66 pacientes (todos hombres), lo que supone el 50.4% de la serie global y el 57.4% de los pacientes hombre, eran fumadores y bebedores activos al momento del diagnóstico. Estos datos están de acuerdo con otros previamente publicados que insisten en el efecto adverso combinado de los hábitos alcohólico y tabáquico sobre los tumores de cavidad oral (Franceschi et al. 1990).

La localización tumoral más frecuente fue el borde lingual (63.6%), seguido del suelo de la boca (30.5%) y base lingual (6.15). La mayor parte de los pacientes fueron diagnosticados con lesiones de tipo ulcerada (56.5%,  $n = 74$ ) (Tabla 2). Este tipo de lesiones, generalmente persistentes y resistentes a la curación, son el principal motivo de consulta de los pacientes, hecho que justifica la alta proporción de este tipo de lesiones en nuestra cohorte de enfermos (Rogers et al. 2011). Solo el 10.7% de los pacientes presentaban lesiones de tipo bilateral, dato que coincide con lo reportado por otros autores (Kolomvos et al. 2010). El 71.7% de los pacientes ( $n = 94$ ) era T1-T2 clínico, N0 (71%,  $n = 93$ ). Ningún paciente de la serie presentaba metástasis al diagnóstico. El estadio clínico mayoritario fue el II (Tabla 2).

**Tabla 2.** Análisis descriptivo de las variables clínicas

<b>Variable</b>	<b>N</b>	<b>(%)</b>	<b>Media ± SD</b>	<b>Mediana (Rango)</b>
<b>Tipo de lesión</b>				
Vegetante	18	13.7		
Ulcerada	74	56.5		
Ulcerovegetante	30	22.9		
Otros (eritematosa, indurada...)	9	6.9		
<b>Lado</b>				
Bilateral	14	10.7		
Derecho	55	42.0		
Izquierdo	62	47.3		
<b>cT</b>				
T1	24	18.3		
T2	70	53.4		
T3	20	15.3		
T4	17	13.0		
<b>cN</b>				
N0	93	71.0		
N1	21	16.0		
N2	16	12.2		
N3	1	0.8		
<b>cM</b>				
M0	131	100		
<b>Estadio clínico</b>				
I	17	13.0		
II	56	42.7		
III	32	24.4		
IV	26	19.8		
<b>Segundo tumor</b>				
Si	32	24.4		
No	99	75.6		
<b>Hemoglobina</b>	124	94.6	17.4 ± 16.2	14.9 (10.3-153.0)
<b>Hematocrito</b>	124	94.6	46.1 ± 34.6	43.7 (13.3-422.0)
<b>Plaquetas</b>	123	93.9	244715 ± 82247	233000 (68000-580000)

**Tabla 3.** Análisis descriptivo de las variables patológicas

<b>Variable</b>	<b>N</b>	<b>(%)</b>
<b>Grado</b>		
I	39	29.8
II	74	56.5
III	18	13.7
<b>pT</b>		
T1	22	17.6
T2	66	50.4
T3	19	14.5
T4	23	17.6
<b>pN</b>		
N0	75	57.3
N1	21	16.0
N2	23	17.6
N3	2	1.5
ND	10	7.6
<b>pM</b>		
M0	131	100
<b>Estadio patológico</b>		
I	19	14.5
II	46	35.1
III	25	19.1
IV	41	31.3
<b>Infiltrado inflamatorio</b>		
Sí	9	6.9
No	77	58.8
ND	45	34.4
<b>Invasión vascular</b>		
Sí	10	7.6
No	78	59.5
ND	43	32.8
<b>Invasión perivascular</b>		
Sí	8	6.1
No	79	60.3
ND	44	33.6
<b>Invasión ganglionar extracapsular</b>		
Sí	6	4.6
No	81	61.8
ND	44	33.6
<b>Afectación de márgenes quirúrgicos</b>		
Sí	44	33.6
No	87	66.4

Setenta y cuatro pacientes (58.5%) presentaban tumores moderadamente diferenciados (Grado II). Los estadios patológicos mayoritarios fueron los II y IV, afectando al 35.1 y 31.3% de los pacientes, respectivamente (Tabla 3). La mayor parte de los pacientes no mostraban presencia de infiltrado inflamatorio (58.8%), invasión vascular (59.5%) o perivascular (60.3%), invasión ganglionar extracapsular (61.8%) o afectación de márgenes quirúrgicos (66.4%).

Observamos diferencias estadísticamente significativas entre el estadiaje clínico y anatomopatológico. La distribución de frecuencias es diferente entre el tamaño tumoral, afectación de ganglios y estadio clínico comparado con el patológico. Mientras que 17 pacientes fueron catalogados clínicamente como T4, tras el examen anatomopatológico ese número crecía a 23 ( $P < 0.001$ ). De la misma manera, 17 pacientes fueron catalogados clínicamente como N2-N3, ascendiendo ese número a 25 tras los estudios microscópicos ( $P < 0.001$ ). Al *estadificar* a los pacientes, 26 de ellos tenían estadio clínico IV mientras que ese número ascendía a 41 en el mismo estadio patológico ( $P < 0.001$ ).

Todos los pacientes fueron sometidos a cirugía como tratamiento primario. El 54.2% de los pacientes fueron tratados únicamente con resección, mientras que al resto se les realizó otro tipo de maniobras quirúrgicas (mandibulectomía, traqueostomía, colgajos). El 77.9% de los pacientes ( $n = 102$ ) sufrió un vaciado cervical radical (Tabla 4).

<b>Tabla 4. Análisis descriptivo del tratamiento</b>				
<b>Variable</b>	<b>N</b>	<b>(%)</b>	<b>Media <math>\pm</math> SD</b>	<b>Mediana (Rango)</b>
<b>Cirugía</b>				
Resección solo	71	54.2		
Resección + otra maniobra	60	45.8		
<b>Tipo de vaciamiento cervical</b>				
Funcional	14	10.7		
Radical	102	77.9		
Bilateral	1	0.8		
No vaciamiento	14	10.7		
<b>Radioterapia</b>				
Si	84	64.1		
No	47	35.9		
<b>Dosis tumor primario (Gy)</b>			62.1 $\pm$ 7.7	65.0 (30.0-70.2)
<b>Dosis primer escalón (Gy)</b>			52.8 $\pm$ 6.2	50.0 (30.0-70.0)
<b>Dosis supraclavicular (Gy)</b>			50.7 $\pm$ 4.7	50.0 (30.0-70.0)
<b>Tiempo de tratamiento RT</b>			49.1 $\pm$ 9.0	50.0 (2.0-70.0)

Los pacientes en estadio I-II eran sometidos a tratamiento con cirugía, mientras que aquellos en estadio III-IV fueron sometidos a radioterapia adyuvante tras la cirugía. Además, aquellos pacientes en estadios I-II con afectación de márgenes quirúrgicos tras los análisis anatomopatológicos, fueron referidos a tratamiento adyuvante con radioterapia. Así, 84 pacientes (64.1%) fueron tratados con radioterapia radical convencional con intención curativa (Tabla 4). La radioterapia fue administrada con una unidad de cobalto o acelerador lineal a una dosis de 1.8-2 Gy día, hasta alcanzar una dosis media en el tumor primario de 62.1 Gy. La duración media del tratamiento fue de 49.1 días (mediana, 50 días). Del total de pacientes tratados con radioterapia, 53 (65.4%) recibieron tratamiento a nivel supraclavicular, a una dosis media de 50.7 Gy. Ningún paciente fue tratado con quimioterapia adyuvante o radioterapia neoadyuvante.

El seguimiento de los pacientes se cerró en julio de 2011. De los 131 pacientes, 18 (15 hombres (12.9%) y 3 mujeres (20.0%)) estaban vivos en esa ficha. Para ellos, el seguimiento medio fue de  $123.11 \pm 40.36$  meses (más de 10 años). La supervivencia actuarial causa específica a los 5, 10 y 15 años fue del 62.7, 60.6 y 57.1% (Tabla 5). Por su parte, la supervivencia absoluta para el mismo periodo de tiempo fue del 47.6, 38.7 y 19.2%.

**Tabla 5.** Datos de supervivencia en la serie global (n = 131)

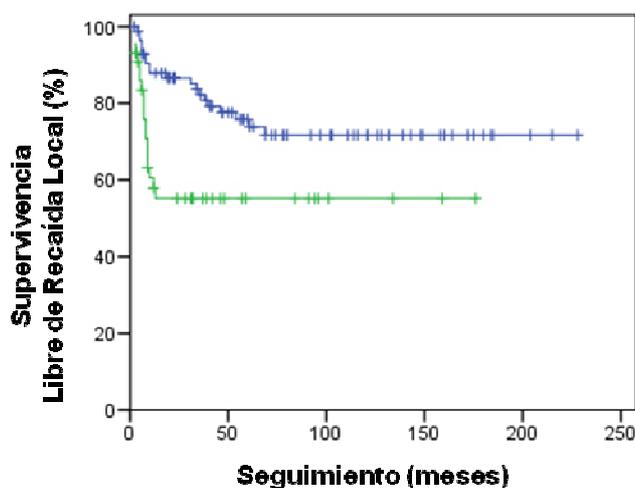
	SLRL	SLRG	SLM	SLE	SCE	SA
<b>Supervivencia a los 5 años (% <math>\pm</math> TE)</b>	68.7 $\pm$ 4.4	72.4 $\pm$ 4.2	92.4 $\pm$ 2.6	54.3 $\pm$ 4.6	62.7 $\pm$ 4.5	47.6 $\pm$ 4.5
<b>Supervivencia a los 10 años (% <math>\pm</math> TE)</b>	65.6 $\pm$ 4.7	70.2 $\pm$ 4.7	90.6 $\pm$ 3.2	49.6 $\pm$ 4.9	60.6 $\pm$ 4.8	38.7 $\pm$ 4.7
<b>Supervivencia a los 15 años (% <math>\pm</math> TE)</b>	65.6 $\pm$ 4.7	70.2 $\pm$ 4.7	90.6 $\pm$ 3.2	49.6 $\pm$ 4.9	57.1 $\pm$ 5.7	19.2 $\pm$ 5.9

SLRL: supervivencia libre de recidiva local, SLRG: supervivencia libre de recidiva ganglionar, SLM: supervivencia libre de metástasis, SLE: supervivencia libre de enfermedad, SCE: supervivencia causa específica, SA: supervivencia absoluta.

Estos datos de supervivencia se compararon con los reportados por el proyecto EURO CARE, la única fuente homogénea y sistematizada de información existente en Europa, que aglutina a 2.718.346 pacientes adultos con cáncer (con 15 años de edad o más) (Berrino 2003). No obstante, ante la dificultad en muchos casos de determinar si la muerte de un paciente de cáncer está directa o indirectamente relacionada con el proceso tumoral subyacente, EURO CARE ha optado por establecer las

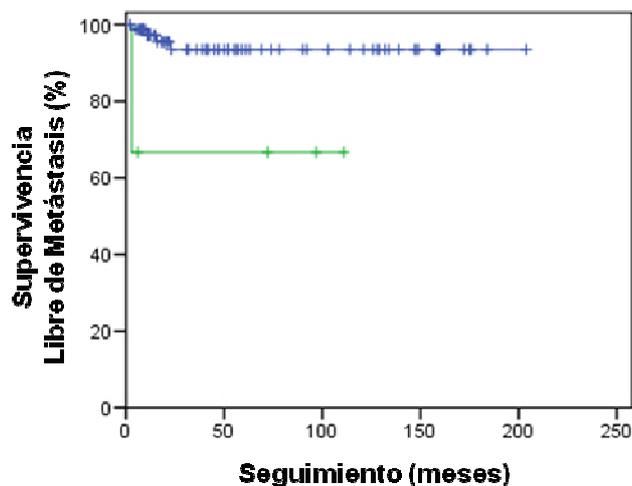
comparaciones en términos de supervivencia relativa. Ésta consiste en dividir la supervivencia observada entre la supervivencia esperada, teniendo en cuenta la mortalidad general de la población. Se trata, por tanto, de un estimador ajustado por otras posibles causas de muerte, por lo que permite establecer comparaciones entre regiones o entre periodos de tiempo (Esteve et al. 1994). Así, la supervivencia relativa a los 5 años para el cáncer de boca y lengua en adultos europeos diagnosticados entre 1995 y 1999 (hombres y mujeres) fue del 48.5 y 45.4% (Berrino et al. 2007). Para los adultos españoles, la supervivencia relativa a los 5 años para ambos tipos de tumores durante el mismo periodo de tiempo fue del 50.6 y 43.7% (Sant et al. 2009). Los valores, como se puede observar, se aproximan a la supervivencia absoluta reportada en nuestra serie de pacientes.

La afectación de los márgenes quirúrgicos, fue el único factor predictivo para la supervivencia libre de recidiva local. Esto es, aquellos pacientes con márgenes positivos tras la cirugía tenía una menor supervivencia libre de recaída local, en comparación con aquellos pacientes sin afectación de márgenes ( $P = 0.004$ ) (Figura 4).



**Figura 4.** Curva de Kaplan-Meier para la supervivencia libre de recidiva local entre los pacientes con márgenes quirúrgicos afectados (—) y no afectados (—). La comparación entre grupos se ha realizado mediante el test de Log-Rank ( $P = 0.004$ ).

La afectación de ganglionar extracapsular fue factor predictivo para la supervivencia libre de metástasis. De esta manera, aquellos pacientes con afectación extracapsular ganglionar tienen mayor probabilidad de sufrir recaídas a distancia en comparación con aquellos sin afectación de este tipo ( $P = 0.005$ ) (Figura 5).



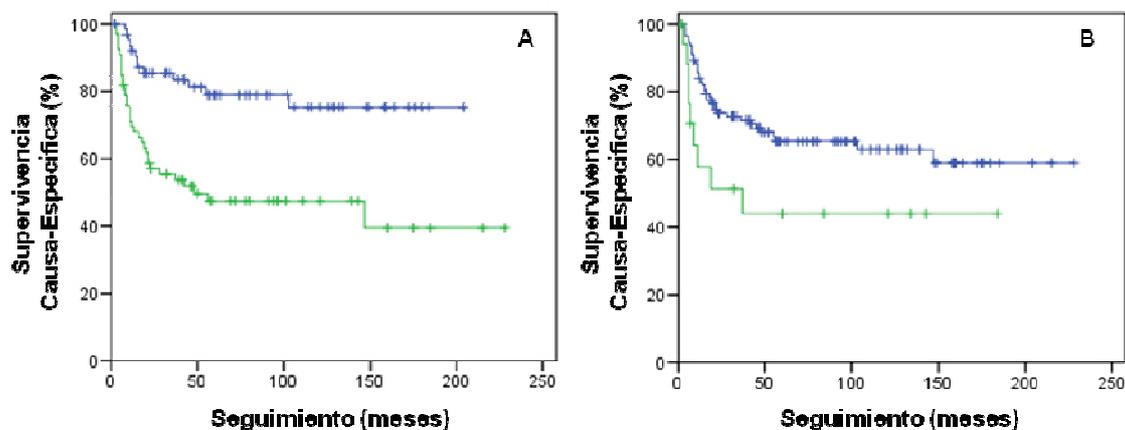
**Figura 5.** Curva de Kaplan-Meier para la supervivencia libre de metástasis entre los pacientes con afectación ganglionar extracapsular (—) y sin afectación (—). La comparación entre grupos se ha realizado mediante el test de Log-Rank ( $P = 0.005$ ).

El estadio tumoral fue el factor predictivo más importante para la supervivencia causa-específica (SCE). Los pacientes que presentaron estadios I-II tuvieron supervivencias causa-específicas mayores que aquellos en estadios III-IV ( $P < 0.0001$ ) (Figura 6A). Algo parecido se observó para el grado de diferenciación tumoral. Los pacientes con tumores bien o moderadamente diferenciados (grados I y II) tuvieron una mayor supervivencia causa específica en comparación con aquellos que tenían tumores pobremente diferenciados (grado III) ( $P = 0.039$ ) (Figura 6B).

Respecto a la supervivencia absoluta, el estadio tumoral apareció como un factor predictivo para esta variable. Los pacientes con estadios tumorales I y II tenían mayores tasas de supervivencia absoluta comparados con aquellos en estadios más avanzados de la enfermedad (III-IV) ( $P = 0.002$ ) (Dato no mostrado).

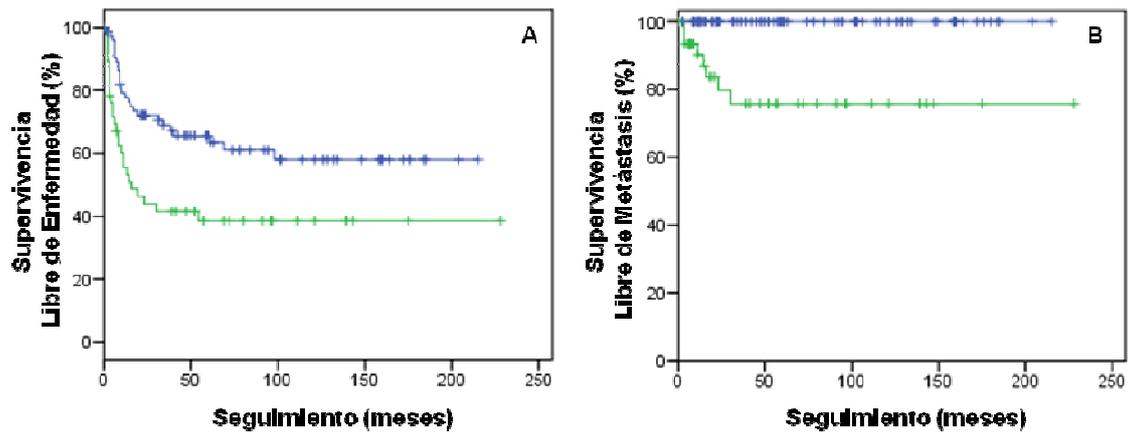
La extensión de la neoplasia es uno de los factores más importantes para determinar el tratamiento y predecir la evolución de los enfermos (González Barón 1997). A pesar de los inconvenientes derivados de la estadificación, y de los progresos que se han realizado en el campo de la biología molecular, el estadio del tumor sigue constituyendo uno de los principales factores pronóstico. Así, y de manera general, los enfermos en estadio IV tienen pocas probabilidades de permanecer vivos tras 5 años, mientras que una importante proporción de los estadios I lo conseguirían. No obstante, la extensión de la neoplasia no debe utilizarse de forma aislada para definir el

pronóstico, sino que es aconsejable, además, tener en cuenta otros aspectos que nos informen sobre la agresividad biológica del tumor.

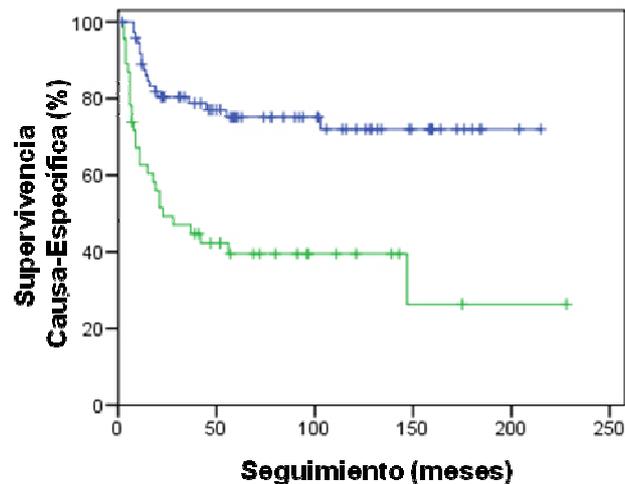


**Figura 6.** Curva de Kaplan-Meier para la supervivencia causa-específica entre los pacientes con (A) estadio tumoral I-II (—) frente a III-IV (—) ( $P < 0.0001$ ); y con (B) grado de diferenciación tumoral I-II (—) frente a III (—) ( $P = 0.039$ ). La comparación entre grupos se ha realizado mediante el test de Log-Rank.

La histología suele ser el factor más decisivo para determinar el tratamiento de un enfermo con cáncer. Dentro de la histología existen diversos aspectos que nos van a orientar sobre la agresividad biológica del tumor. Una de estas características es el grado de diferenciación. Los tumores muy diferenciados se comportan de una forma indolente, mientras que los poco diferenciados son más agresivos. Todos estos parámetros biológicos se inter-relacionan entre sí. Así, se ha observado que la afectación nodular, que constituye un factor de mal pronóstico bien conocido (Larsen et al. 2009), es más frecuente entre aquellos tumores más indiferenciados (Larsen et al. 2009). En nuestra serie, la afectación nodular fue un importante factor pronóstico para la supervivencia libre de metástasis, la supervivencia libre de enfermedad, la supervivencia causa-específica y la supervivencia absoluta. Aquellos pacientes sin afectación ganglionar (N0) tenían un mejor pronóstico en comparación con aquellos que presentaban ganglios positivos (N+) (Figuras 7 y 8). Se observó, por ejemplo, que ningún paciente N0 sufrió metástasis a distancia, con un seguimiento superior a los 200 meses (Figura 7B). El papel de los anatompatólogos es crucial para el tratamiento, ya que este tipo de hallazgos condicionan notablemente la agresividad del tratamiento, no solo a nivel quirúrgico sino también adyuvante.



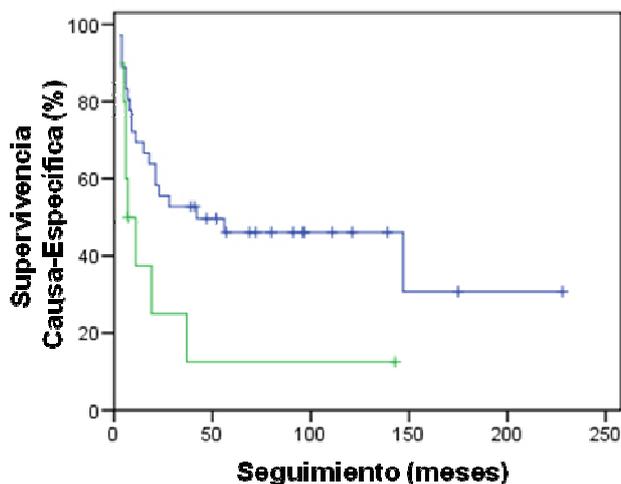
**Figura 7.** Curva de Kaplan-Meier para la supervivencia libre de enfermedad (A) y libre de metástasis (B) entre los pacientes sin afectación nodular (N0) (—) y con afectación nodular (—).  $P = 0.004$  y  $P < 0.0001$  para A y B respectivamente. La comparación entre grupos se ha realizado mediante el test de Log-Rank.



**Figura 8.** Curva de Kaplan-Meier para la supervivencia causa-específica entre los pacientes sin afectación nodular (N0) (—) y con afectación nodular (—),  $P < 0.0001$ . La comparación entre grupos se ha realizado mediante el test de Log-Rank.

Se exploró la relación entre la afectación nodular y el grado tumoral, hecho reportado recientemente en pacientes con tumor de cavidad oral (Larsen et al. 2009). Se observó que si se segmentaba a la población en función de la afectación ganglionar, esto es N0 vs. N+, el grado histológico era un factor predictivo de supervivencia únicamente entre los pacientes N+ (Figura 9). La significación estadística se perdía entre los pacientes N0. Este hallazgo se muestra de acuerdo con lo reportado recientemente

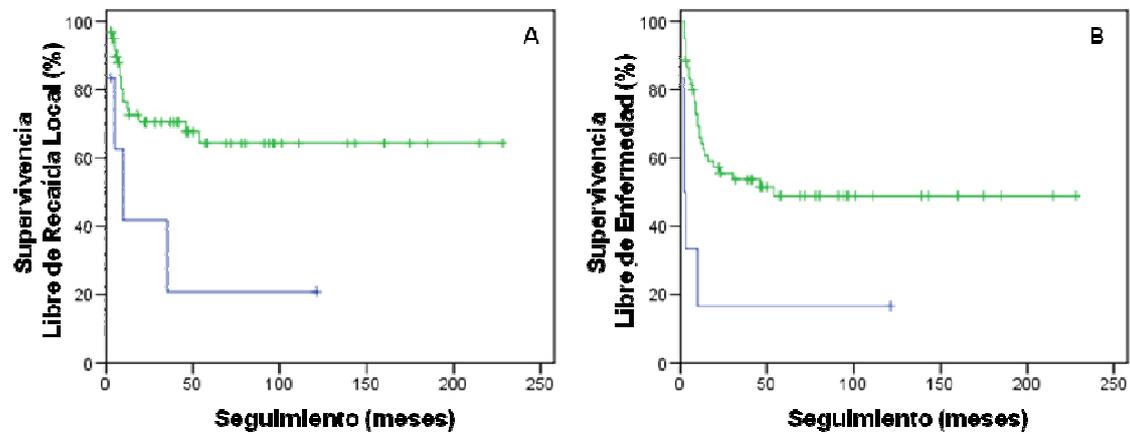
por otros autores (Larsen et al. 2009), e incide en la importancia del correcto estudio anatomopatológico a la hora de establecer los tratamientos y aventurar un pronóstico. El estadio tumoral no se mostró como un factor pronóstico en relación a la afectación ganglionar ( $P > 0,05$  en cualquier caso).



**Figura 9.** Curva de Kaplan-Meier para la supervivencia causa-específica entre los pacientes con afectación nodular (N+). (—), grados I-II; (—), grado III.  $P = 0.022$ . La comparación entre grupos se ha realizado mediante el test de Log-Rank.

La radioterapia adyuvante o complementaria es el tratamiento aplicado tras la cirugía cuya finalidad fundamental es mejorar el control local de la enfermedad y disminuir el riesgo de recidiva local. Su utilidad se basa en la erradicación de restos tumorales subclínicos en la zona inicial tras el tratamiento previo con cirugía. En la serie estudiada, este tratamiento se administró a todos aquellos pacientes en estadio III-IV, así como a aquellos en estadio I-II con afectación de márgenes quirúrgicos tras la cirugía. La radioterapia no fue un factor pronóstico de supervivencia en ningún caso en la serie completa. Cuando se segmentó a la población en función del estadio, se observó que el tratamiento radioterápico era un factor de buen pronóstico relacionado con la supervivencia libre de recidiva local y la supervivencia libre de enfermedad, únicamente entre los pacientes con estadios III-IV, que son aquellos que mayoritariamente recibieron radioterapia (Figura 10). Esto es, en ese subgrupo de pacientes con estadios avanzados de la enfermedad, la administración de radioterapia aumentaba la supervivencia. Solo seis pacientes con estadios avanzados de la enfermedad dejaron de recibir tratamiento radioterápico. A pesar del escaso tamaño muestral, este resultado pone de manifiesto la necesidad de la radioterapia en aquellos pacientes con estadios tumorales avanzados. Cuando se segmentó a la

población en función de la afectación de los márgenes quirúrgicos, se perdió toda significación estadística (dato no mostrado).



**Figura 7.** Curva de Kaplan-Meier para la supervivencia libre de enfermedad (A) y libre de enfermedad (B) entre los pacientes en estadios III-IV. (—), no administración de radioterapia y con afectación nodular (—).  $P = 0.004$  y  $P < 0.0001$  para A y B respectivamente. La comparación entre grupos se ha realizado mediante el test de Log-Rank.

## **CAPÍTULO IV**

**La expresión de IGF-1R predice el resultado clínico en pacientes con carcinoma de células escamosas de cavidad oral localmente avanzado**



**RESUMEN**

Los objetivos de este estudio fueron, determinar la expresión de IGF-1R en pacientes con carcinoma de células escamosas de cavidad oral, explorar su relación con factores pronósticos clínicos y patológicos, así como su papel en la predicción del resultado clínico.

Se incluyeron en este estudio ciento treinta y un pacientes con carcinoma de células escamosas de cavidad oral, durante el periodo comprendido entre julio de 1989 y abril de 2005, cerrándose el seguimiento de los mismos en mayo de 2010. La media de seguimiento para los supervivientes fue de  $110.26 \pm 47.42$  meses. Los pacientes se *estadiaron* siguiendo la clasificación TNM. Los pacientes en estadios I y II fueron tratados con cirugía. Los pacientes en estadios III y IV además recibieron radioterapia postoperatoria (dosis media  $62.13 \pm 7.74$  Gy en fracciones de 1.8 – 2 Gy cada día). La expresión de IGF-1R fue estudiada mediante inmunohistoquímica de tejidos tumorales embebidos en parafina.

IGF-1R estaba expresado en 101 pacientes (77.1%). La expresión de IGF-1R se relacionó con el grado tumoral ( $P = 0,012$ ). El estadio tumoral fue el factor pronóstico de supervivencia más importante. La expresión tumoral baja (negativa o ligeramente positiva) de IGF-1R se correlacionó con mejor supervivencia libre de enfermedad local ( $P = 0.016$ ), supervivencia libre de enfermedad ( $P = 0.029$ ) y supervivencia causa-específica ( $P = 0.009$ ) en pacientes con estadios III-IV de la enfermedad.

La baja expresión de IGF-1R se relacionó con un mejor control a largo plazo en pacientes con carcinoma oral localmente avanzado.



**SUMMARY**

To assess the expression of IGF-1R in oral cavity squamous cell carcinoma patients, to explore its relation with clinical and pathologic prognostic factors and its role in predicting clinical outcome. One hundred and thirty-one consecutive patients suffering from oral cavity squamous cell carcinoma were included in this study from July 1989 to April 2005. Follow-up was closed in May 2010. The mean follow-up for survivors was  $110.26 \pm 47.42$  months. Patients were staged following the TNM classification. Patients in tumour stages I and II were referred to surgery. Patients in stages III–IV were referred to postoperative radiotherapy. Radiation therapy was administered up to a mean dose of  $62.13 \pm 7.74$  Gy in 1.8–2 Gy fractions. IGF-1R expression was studied by immunohistochemistry in paraffin-embedded tumour tissue. IGF-1R was expressed in 101 patients (77.1%). IGF-1R expression was related to tumour grade ( $P = 0.012$ ). Tumour stage was the most important prognostic factor for survival. Low (negative and fairly) IGF-1R tumour expression was correlated to better long-term Local Disease Free Survival ( $P = 0.016$ ), Disease-Free Survival ( $P = 0.029$ ), and Survival ( $P = 0.009$ ) in patients achieving tumour stages III–IV. Low IGF-1R expression was related to better long-term control in patients suffering locally advanced oral carcinoma.



## INTRODUCCIÓN

En 2008 se registraron 913.000 nuevos casos de carcinoma de células escamosas de cavidad oral (OCSCC) en todo el mundo, y 261.000 muertes relacionadas con esta enfermedad (Ferlay et al. 2010). El carcinoma oral se trata comúnmente con cirugía o radioterapia como tratamientos locales. Aunque la supervivencia a largo plazo ha mejorado con los avances en las terapias, los resultados en los casos localmente avanzados siguen siendo insuficientemente (Harrison et al. 1994). La determinación del papel que determinados factores biológicos tengan en la respuesta al tratamiento deben ser estudiados, con el fin de identificar nuevos factores pronósticos que contribuyan a elegir el mejor tratamiento para cada paciente individualmente.

El receptor del factor de crecimiento dependiente de insulina (IGF-1R) es un receptor transmembrana de tipo tirosin-kinasa, estructural y funcionalmente relacionado con el receptor de insulina, y activado por los ligandos IGF-1 e IGF-2 (Ullrich et al. 1986). El IGF-1R está comúnmente sobreexpresado en bastantes tipos de tumores (Larsson et al. 2005). Se han reportado nuevas rutas de señalización desencadenadas por la activación de IGF-1R que afectan a la proliferación, adhesión, migración y muerte de células cancerígenas, funciones críticas para la supervivencia celular y la metástasis (LeRoith et al. 2003). La activación de IGF-1R lleva a la activación de las rutas de señalización ras, raf y MAPK, dando como resultado un incremento de la proliferación celular, así como de la ruta PI3K que, en definitiva, supone la prevención de la apoptosis (Baserga et al. 2003). Se ha demostrado que la expresión de IGF-1R juega un papel importante en varios tipos tumorales, pero el papel de la expresión de IGF-1R con respecto al control tumoral, la supervivencia y la respuesta a las terapias no está claro.

La activación de IGF-1R se ha asociado con mayor radioresistencia mediada por el incremento de la proliferación celular y la prevención de la apoptosis (Turner et al. 1997; Yu et al. 2003). Por otro lado, su inhibición por el gen Ataxia-Telangiectasia Mutado (ATM), relacionado con la ruta de PI3K, se ha asociado a una mayor radiosensibilidad (Peretz et al. 2001). IGF-1R puede resultar inhibido a través de la señalización de la kinasa p38, induciendo así radiosensibilidad a través de ku86 nuclear, siendo este proceso independiente de la ruta PI3K (Cosaceanu et al. 2007).

A nivel clínico, hay varios estudios que han reportado una asociación entre la expresión proteica de IGF-1R y la respuesta clínica y el pronóstico (Dziadziuszko et al.

2010; Girard et al. 2010). Así, parece que, según lo publicado, la expresión de IGF-1R directamente induce radio-resistencia (Chinnaiyan et al. 2006). De esta manera, niveles altos de expresión de IGF-1R se correlacionan con un aumento de recidiva tumoral tras haber realizado lumpectomía y radioterapia en pacientes con cáncer de mama (Turner et al. 1997; Taunk et al. 2010). Además, en pacientes con cáncer de cérvix, una elevada expresión de IGF-1R está asociada a una reducción en el control local a largo plazo en pacientes que inicialmente respondieron a radioterapia radical y quimioterapia concomitante (Lloret et al. 2007). Sin embargo, en la actualidad no hay datos ni de la expresión de IGF-1R en pacientes de cáncer oral ni de su papel en la predicción del control a largo plazo.

El objetivo del presente estudio fue determinar la expresión de IGF-1R en pacientes con OCSCC, su relación con factores pronósticos clínicos y patológicos y su papel en la predicción de los resultados clínicos.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### *Pacientes*

Tal y como se ha descrito, la muestra estaba compuesta por 131 pacientes con OCSCC diagnosticados en nuestro hospital. Los pacientes fueron tratados con cirugía y radioterapia adyuvante con intención curativa. Todos los pacientes recibieron un consentimiento informado que debía ser firmado. El estudio fue aprobado por el Comité Científico de la Institución. El seguimiento se cerró en mayo de 2010, registrándose una media de seguimiento de los pacientes vivos,  $n = 34$ , de  $110.26 \pm 47.42$  meses (mediana 102.50; rango 19-211 meses). Sólo 16 (12,2%) y 35 (26,7%) de los pacientes fueron no fumadores y no bebedores, respectivamente. Los pacientes fueron *estadiados* siguiendo el sistema de clasificación TNM (American Cancer et al.). El grado de diferenciación tumoral se realizó de acuerdo al sistema de Broders.

### *Pacientes*

Los detalles del tratamiento han sido ampliamente expuestos en el capítulo anterior. Brevemente, todos los pacientes fueron sometidos a cirugía. Todos los pacientes en estadios III-IV recibieron radioterapia adyuvante con intención curativa. Además, aquellos pacientes con estadio I-II que tras la cirugía presentaban márgenes

quirúrgicos afectos, también fueron sometidos a este tipo de radioterapia. Ningún paciente fue tratado con quimioterapia en ninguna modalidad, ni con radioterapia neoadyuvante.

#### *Inmunohistoquímica*

La expresión de IGF-1R se estudió por inmunohistoquímica (IHC) en las 131 muestras de tejido embebido en parafina de los pacientes, tal y como se había descrito previamente (Lloret et al. 2009; Henriquez-Hernandez et al. 2011; Lara et al. 2011). El bloque tumoral más representativo fue aquel usado para el análisis. Se usaron cortes de tejido de 4 mm, que fueron incubados durante una hora en una cámara húmeda con el anticuerpo primario. A continuación, se realizó una incubación durante 30 minutos con un anticuerpo secundario biotinado (Dako Detection kit, LSBA). El revelado se realizó con sustrato de tetrahidroclorohidro-diaminobencidina (DAB Chromogen, Dako) y rápido contraste con hematoxilina de Harris. La marcación se realizó por peroxidada-estreptavidina-biotina (Dako). En cada sección de cortes se omitió el anticuerpo primario, para usar dicha sección como control negativo. Como control positivo, se utilizó una sección fuertemente positiva para la oncoproteína.



### *Análisis estadístico*

La correlación entre las variables clínicas e histopatológicas, incluido IGF-1R, se analizó a través de las medias del test de Chi cuadrado para las variables categorizadas y el test t de student. Se usó el ANOVA para las variables continuas. Las correlaciones entre estas variables y los resultados durante el seguimiento fueron analizados por el test de supervivencia Kaplan-Meier y las diferencias se calcularon mediante el test de *log-rank*. El test de regresión de Cox se utilizó para el análisis multivariante. Los resultados del tratamiento se calcularon para la Supervivencia Libre de Enfermedad Local (LDFS), Supervivencia Libre de Enfermedad Regional (RDFS), Supervivencia Libre de Metástasis a Distancia (DMFS), Supervivencia Libre de Enfermedad (DFS), Supervivencia Causa-Específica (CSS) y Supervivencia Absoluta (OS). Los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico SPSS 15.0 (SPSS Inc. Chicago, IL.).

## **RESULTADOS**

La expresión de IGF-1R se determinó para los 131 casos. Esta expresión fue negativa en 30 casos (22.9%) ligeramente positiva en 41 casos (31.1%), moderadamente positiva en 39 casos (29.8%) y fuertemente positiva en 21 casos (16.0%).

La expresión de IGF-1R se relacionó con el grado tumoral. Así, el 28.8% de los pacientes con grado I presentó una alta expresión de IGF-1R, mientras que en los pacientes con grados II-III el porcentaje de sobreexpresión de IGF-1R alcanzó el 53.3% ( $P = 0.012$ ). La expresión de IGF-1R no se relacionó con ninguna otra de las variables clínicas y/o patológicas que se estudiaron.

Los porcentajes de LDFS, RDFS, DMFS, DFS y CSS a 15 años (180 meses) fueron de 65.5%, 69.9%, 90.6%, 46.1% y 56.2%, respectivamente. El grado tumoral (I vs. II-III) y el estadio (I-II vs. III-IV) fueron los factores predictivos más importantes para la supervivencia en los análisis multivariantes ( $\text{Exp(B)} = 3.009$ , intervalo de confianza [CI] 95% (1.255-7.214),  $P = 0.014$ ;  $\text{Exp(B)} = 3.085$ , CI 95% (1.565-6.083),  $P = 0.001$ , respectivamente) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Relación de factores pronósticos y supervivencia en la serie completa de pacientes

	<b>LDFS</b>	<b>RDFS</b>	<b>DMFS</b>	<b>DFS</b>	<b>CSS</b>
<b>Sexo</b>	P = 0.487	P = 0.866	P = 0.364	P = 0.885	P = 0.501
<b>Edad</b>	P = 0.371	P = 0.981	P = 0.720	P = 0.414	P = 0.868
<b>Estadio</b>	P = 0.136	P = 0.193	P = 0.008 <sup>b</sup>	P = 0.080	P < 0.001 <sup>c</sup>
<b>Grado</b>	P = 0.182	P = 0.066	P = 0.146	P = 0.024	P = 0.002 <sup>d</sup>
<b>Márgenes afectos</b>	P = 0.004 <sup>a</sup>	P = 0.633	P = 0.063	P = 0.041	P = 0.002
<b>IGF-1R</b>	P = 0.240	P = 0.557	P = 0.536	P = 0.376	P = 0.272

P valor en análisis univariante obtenidos por el test de log rank.

Los superíndices hacen referencia a análisis multivariante (regresión de Cox):

<sup>a</sup>P = 0.014, Exp(B) = 2.284, CI 95% (1.183-4.410)

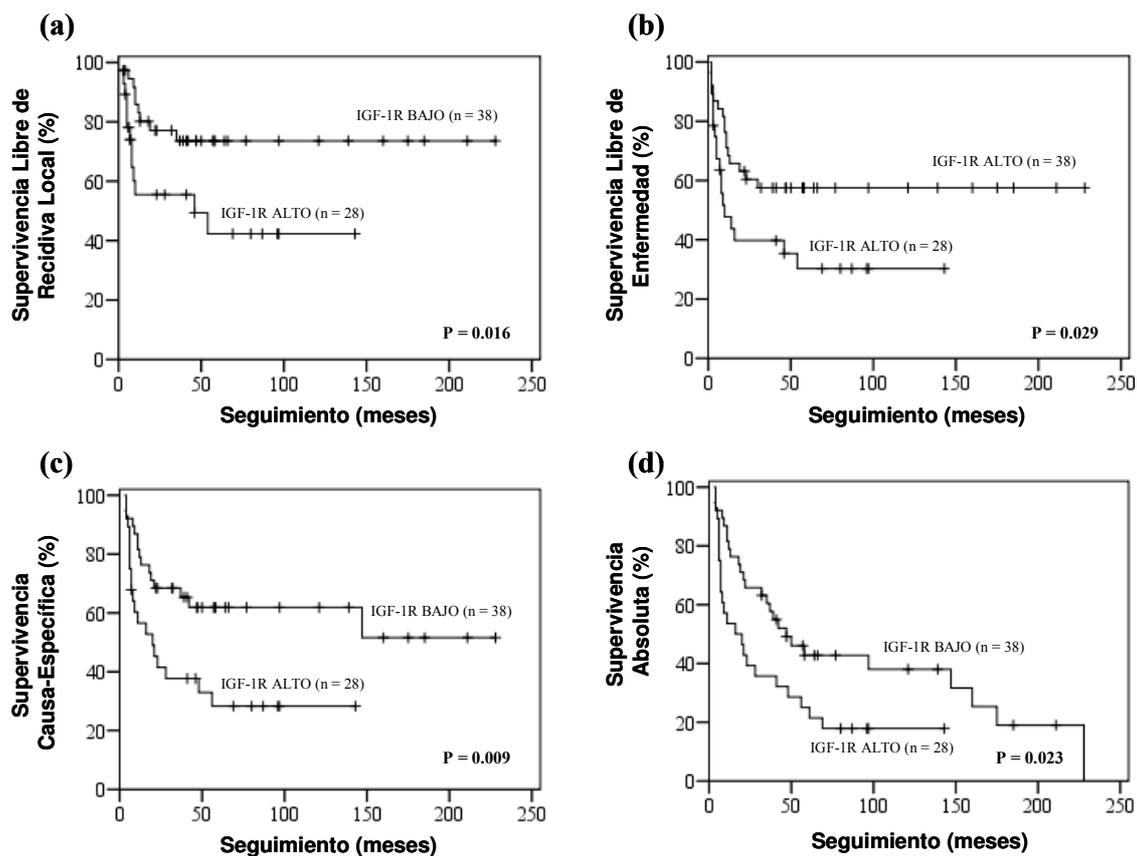
<sup>b</sup>P = 0.028, Exp(B) = 13.491, CI95% (1.324-137.461)

<sup>c</sup>P = 0.001, Exp(B) = 3.085, CI95% (1.565-6.083)

<sup>d</sup>P = 0.014, Exp(B) = 3.009, CI95% (1.255-7.214)

La expresión de IGF-1R no fue un factor predictivo para el pronóstico en la serie completa (Tabla 1). El estadio tumoral fue el factor pronóstico más importante para la supervivencia en el análisis univariante (Tabla 1). Debido a ello, la población se segmentó en función del estadio tumoral, quedando de un lado los pacientes con estadios I-II, y de otro los pacientes en estadios avanzados III-IV. Se analizó el papel de IGF-1R en el control y la supervivencia a largo plazo en ambos grupos de pacientes de acuerdo al estadio tumoral patológico.

Aquellos pacientes que presentaban estadios tumorales avanzados (III-IV) y alta expresión de IGF-1R, mostraron peor supervivencia que los pacientes con estadios tumorales altos y baja expresión de IGF-1R. Así, 23 de los 38 pacientes (60.5%) con estadios tumorales altos y expresión de IGF-1R negativa o ligeramente positiva estuvieron libres de muerte relacionada con la enfermedad (CSS), mientras que sólo 9 de los 28 pacientes (32.1%) con estadios tumorales altos y expresión de IGF-1R positiva o fuertemente positiva presentaron ausencia de muerte relacionada con la enfermedad ( $P = 0.009$ ). El resultado del test log-rank fue estadísticamente significativo también para LDFS ( $P = 0.016$ ), DFS ( $P = 0.029$ ) y OS ( $P = 0.023$ ) (Fig. 2a-d). Los análisis estratificados por el grado tumoral y los márgenes quirúrgicos no mostraron ninguna asociación con la expresión de IGF-1R ( $P > 0.05$  en todos los casos).



**Figura 2.** Asociación entre la expresión de IGF-1R y supervivencia, expuesta mediante curvas de Kaplan-Meier, en pacientes con carcinoma de cavidad oral en estadios III-IV. Los valores de P se obtuvieron mediante el test de log-rank.

## DISCUSIÓN

Esta parte del trabajo se llevó a cabo con el fin de explorar la relación entre la expresión de la proteína IGF-1R, determinada mediante inmunohistoquímica, y su asociación con el pronóstico clínico en una serie de pacientes con carcinoma escamoso de la cavidad oral (OCSCC), tratados con cirugía y radioterapia. IGF-1R se expresó en el 77.1% de nuestros pacientes. La expresión de IGF-1R en OCSCC no ha sido muy estudiada hasta el momento. Aunque se ha publicado un estudio que informa de que el 56.1% de los pacientes con tumores orales presentan tinción inmunológica positiva para IGF-1R (Reszec et al. 2004). Se han estimado tasas de expresión de IGF-1R del 98% en cáncer colorrectal (Peters et al. 2003; Nakamura et al. 2004), endometrial (87.5%) (Hirano et al. 2004), de cérvix (sobre el 87%) (Hirano et al. 2004; Lloret et al. 2007), de nasofaringe/orofaringe (sobre el 56%) (Friedrich et al. ; Yuan et

al. 2008) y en cáncer de mama (88.6%) (Shimizu et al. 2004), disminuyendo hasta el 48% en sarcomas de tejido blando (Ahlen et al. 2005) .

En este estudio, se observa una asociación estadística entre el grado tumoral y la expresión de IGF-1R. Estos resultados concuerdan con los de otros autores a este respecto. En otros tipos tumorales, los niveles más altos de expresión de IGF-1R se observaron en los tumores de mayor grado (Cappuzzo et al. 2010).

La expresión tumoral de IGF-1R se ha asociado de forma relevante con el pronóstico clínico de pacientes con distintos tipos de cáncer (Turner et al. 1997; Hirano et al. 2004; Lloret et al. 2007; Kalinina et al. 2010; Taunk et al. 2010). Aunque existen algunos datos publicados en pacientes con OCSCC, hasta el momento no se había explorado la asociación de la expresión de IGF-1R con la supervivencia en este tipo de pacientes (Reszec et al. 2004). El estadio tumoral fue el factor predictivo más importante para la supervivencia en nuestra serie. Los pacientes con carcinoma de cavidad oral y orofaringe presentan un alto riesgo de recaída local tras el tratamiento inicial con cirugía, radioterapia, cirugía con radioterapia adyuvante o radioquimioterapia (Agra et al. 2008). Para los tumores en estadios clínicos III y IV, las tasas de recaída local pueden llegar a alcanzar valores del 40% (Carvalho et al. 2003; Carvalho et al. 2004). En la serie global, la expresión de IGF-1R no fue un factor predictivo de supervivencia. Sin embargo, cuando los pacientes se agruparon en función de su estadio tumoral, bajo (I-II) vs. alto (III-IV), la expresión de IGF-1R fue predictiva para la LDFS, DFS, CSS y OS entre aquellos pacientes con estadios más avanzados de la enfermedad. Previamente se había publicado que IGF-1R parece jugar un papel relevante en la respuesta de los tumores a la radioterapia, tanto en relación con el incremento de la proliferación celular y la inhibición de apoptosis, como con la regulación de los mecanismos de reparación de roturas dobles de la cadena de ADN a través de la unión de extremos no homólogos (Ku70/80) y la proteína principal de *vault* (MVP) (Lloret et al. 2008; Lloret et al. 2009). No obstante, el papel de IGF-1R solo se observó en este subgrupo de pacientes con estadios avanzados de la enfermedad. Este hallazgo puede ser parcialmente explicado debido al hecho de que todos los pacientes con COSCC en estadios III-IV recibieron radioterapia. La expresión de IGF-1R y el estadio tumoral se han relacionado en pacientes con cáncer de pulmón, aunque no se ha descrito la influencia de esta oncoproteína sobre las tasas de supervivencia (Dziadziuszko et al. 2010). En nuestra opinión, la expresión de IGF-1R puede tener relevancia en la predicción del resultado clínico en pacientes con OCSCC.

La activación de IGF-1R desencadena una cascada de reacciones que envuelve diferentes rutas de transducción: Ras, Raf, proteína kinasa activada por mitógenos (MAPK) y la fosfoinositol-3-kinasa (PI3K)/AKT/BAD (Bcl-xL/BCL-2) (LeRoith et al. 2003). La expresión de IGF-1R y su activación se han vinculado a la progresión de la enfermedad, al incremento de la resistencia a radioterapia y a un peor pronóstico (Rocha et al. 1997; Turner et al. 1997). Por otra parte, la adición de oligómeros antisentido para mRNA de IGF-1R, invierte el fenotipo radioresistente en los fibroblastos (Turner et al. 1997). Recientemente, se ha especulado acerca de la relación del gen IGF-1R como diana de la ruta dependiente de Ataxia Telangiectasia Mutada (ATM), la cual está involucrada en la respuesta a la radioterapia (Peretz et al. 2001). El gen IGF-1R parece ser una de las últimas dianas de la ruta de respuesta a daños en el ADN, mediada por ATM. Así, la desregulación de la expresión del gen IGF-1R, tras un evento de radiación ionizante, puede estar relacionada con mayor inestabilidad genómica y una mayor capacidad transformante de las células tumorales (Shahrabani-Gargir et al. 2004).

IGF-1R y el receptor para el factor de crecimiento epidermal (EGFR) se asocian comúnmente con carcinogénesis, progresión y pronóstico tumorales (Ludovini et al. 2009). Se ha demostrado que los entrecruzamientos entre estos receptores y sus rutas de señalización más comunes juegan un papel fundamental en algunas de las respuestas celulares a los diferentes ligandos (Gilmore et al. 2002). Dichos entrecruzamientos pueden ocurrir entre los receptores para EGF e IGF-1, los cuales son en ambos casos receptores tirosin-kinasa, y producirse así una resistencia a terapias basadas en inhibidores de tirosin-kinasa, ya que las células podrían encontrar rutas alternativas para la estimulación de proteínas antiapoptóticas, como la proteína AKT.

Nuestra serie estaba compuesta por pacientes con OCSCC tratados con cirugía y radioterapia. No se emplearon ni quimioterapia ni otras terapias neoadyuvantes en ningún caso. La combinación de radioterapia e inhibición de EGFR ha demostrado recientemente un beneficio importante para la supervivencia durante la fase III del ensayo clínico en pacientes con cáncer de cabeza y cuello (Bonner et al. 2006). Por otro lado, la interrupción de la señal de IGF-1R parece ser terapéuticamente útil en combinación con la radioterapia en experimentos *in vitro* (Allen et al. 2007). Además, los fragmentos de siRNA específicos para mRNA de IGF-1R humano son capaces de aumentar la radiosensibilidad en cáncer de colon (Yavari et al. 2010). De este modo,

aquellos fármacos que potencialmente bloqueen a IGF-1R podrían inhibir las rutas anti-apoptóticas y proliferativas desencadenadas por su activación, conduciendo al aumento de la muerte celular por radiación (Chinnaiyan et al. 2006). La sobreexpresión tumoral de IGF-1R no sólo puede utilizarse como indicador de peor resultado clínico, sino que además, los pacientes con tumores que sobreexpresen IGF-1R pueden ser seleccionados para tratamientos futuros que mejoren el potencial clínico de dicha terapia (Tanno et al. 2006).

En resumen, los resultados presentes permiten definir un subgrupo de pacientes con niveles bajos de IGF-1R los cuales, incluso presentando un estadio avanzado de la enfermedad, muestran buenas figuras de supervivencia. Estos resultados preliminares necesitan ser confirmados mediante ensayos clínicos más grandes.



## **CAPÍTULO V**

**La expresión de IGF-1R y MVP se encuentran relacionadas en la predicción del pronóstico clínico de los pacientes con carcinoma escamoso de cavidad oral**



**RESUMEN**

**Objetivos.** Evaluar la expresión de MVP en pacientes con carcinoma de células escamosas en la cavidad oral, su relación con otros factores pronósticos clínicos y patológicos y su papel como factor predictivo clínico. Además, se estudió su relación con la expresión de IGF-1R en esta cohorte de pacientes.

**Pacientes y Métodos.** Se incluyó en la presente fase del trabajo a 131 pacientes afectados de carcinoma de células escamosas de la cavidad oral, incluidos en este estudio desde julio de 1989 a abril de 2005. El seguimiento de los pacientes fue cerrado en julio de 2011. La media del seguimiento para los supervivientes fue de  $123 \pm 40.36$  meses. Los pacientes fueron *estadiados* siguiendo la clasificación TNM. Aquellos pacientes con estadio de tumor I y II fueron remitidos a cirugía. Los pacientes con estadio III- IV fueron tratados con radioterapia postoperatoria. La radioterapia fue administrada a una dosis de  $62.13 \pm 7.74$  Gy en fracciones de 1.8-2 Gy/día. La expresión de MVP fue estudiada mediante inmunohistoquímica en tejidos tumorales embebidos en parafina.

**Resultados.** MVP fue expresada en 112 pacientes (85.5%) y no se encontró relación significativa alguna con las variables clínico-patológicas. La sobreexpresión de MVP apareció asociada a la sobreexpresión de IGF-1R ( $P = 0.014$ ). Como se ha expuesto previamente, el estadio tumoral de la enfermedad fue el factor pronóstico más importante relacionado con la supervivencia. Los tumores en estadios avanzados de la enfermedad (III-IV) que además presentaban sobreexpresión de MVP e IGF-1R, tenían una menor supervivencia libre de enfermedad ( $P = 0.008$ , Exp (B) = 2.730, CI 95% (1.302-5.724)) y supervivencia causa-específica ( $P = 0.014$ , Exp (B) = 2.570, CI 95% (1.215-5.437)), en análisis multivariante.

**Conclusión.** La expresión de MVP e IGF-1R parece estar relacionada en este tipo de tumores confiriendo una menor supervivencia a largo plazo en pacientes que sufren estadios avanzados de la enfermedad.



**SUMMARY**

Oral carcinoma is commonly treated by surgery or radiotherapy. However, outcomes in locally advanced cases remain suboptimal and there is a clear need for new prognostic indicators. Major vault protein (MVP) has been classically associated to multidrug resistance, although its overexpression has been associated to resistance to radiotherapy. At the clinical level, the role of MVP in predicting response to radiotherapy was recently addressed. The aim of this study was to assess the expression of MVP in oral cavity squamous cell carcinoma patients, its relation with clinical and pathologic prognostic factors and its role in predicting clinical outcome. One hundred and thirty one consecutive were included in this study, and followed during more than 20 years. MVP overexpression conferred reduced long-term survival in patients suffering from advanced stages of the disease, highlighting this protein as a predictive factor for survival in this tumour type.



## INTRODUCCIÓN

El cáncer de cavidad oral se trata principalmente mediante cirugía y radioterapia. En las últimas décadas se ha conseguido mejorar la supervivencia en este tipo de pacientes. No obstante, el control local sigue siendo, en ocasiones difícil. Por ello, se buscan factores pronósticos y marcadores tumorales que ayuden a prever las recaídas, con la intención de mejorar los tratamientos y prestar más atención asistencial a aquellos pacientes de mayor riesgo.

Las partículas vaults son ribonucleoproteínas en forma de barril, compuestas principalmente por tres proteínas diferentes, tal y como se ha detallado previamente en esta Tesis Doctoral: la proteína vault mayor o *major vault proteína* (MVP), la *vault poly(ADP-ribose)* polimerasa (VPARP) y la proteína-1 asociada a telomerasa o *telomerase-associated proteína-1* (TEP1). Además, el complejo se completa con la presencia de pequeñas partículas de ARN no traducible (vRNA) (Kickhoefer et al. 1999a). Clásicamente, la función de vaults ha sido asociada a los fenómenos de resistencia a drogas (Mossink et al. 2003). No obstante, debido a las complejas interacciones que vaults tiene con otras importantes moléculas efectoras (PTEN, Erk o EGF), se le han atribuido numerosas funciones más, algunas de ellas determinantes en la fisiología celular. La sobreexpresión de MVP parece asociarse a algunos fenotipos malignos de algunos tipos tumorales, lo que sugiere que esta proteína podría ejercer alguna función en el desarrollo y la progresión de los tumores (Steiner et al. 2006a). La expresión de MVP se ha visto también asociada a fenómenos de resistencia a la radioterapia (Fichtner et al. 2003), probablemente debido a su papel como inhibidor de la apoptosis a través de la inhibición del eje COP-1/p53 (Yi et al. 2005). Diferentes agentes dañinos para el ADN, entre ellos la luz ultravioleta, induce la transcripción de MVP y la sobreexpresión de esta proteína (Shimamoto et al. 2006). Estos hallazgos indican que vaults podría ejercer algún tipo de función en relación a los fenómenos de reparación del daño al ADN, lo que coincidiría con otras publicaciones que reportan que aquellos ratones deficientes en VPARP y TEP-1 presentan un mayor riesgo de cáncer de colon carcinógeno-inducido (Raval-Fernandes et al. 2005). A nivel clínico, el papel de MVP en la predicción de la respuesta a la radioterapia ha sido recientemente reportado (Silva et al. 2007). En el estudio de Silva y col., la sobreexpresión de MVP se asociaba a un peor pronóstico en 78 pacientes con cáncer de orofaringe tratados con radioterapia (Silva et al. 2007). El efecto de la sobreexpresión de MVP era todavía superior en el subgrupo de pacientes con carcinoma de lengua, donde MVP era un importante factor pronóstico de

supervivencia local y supervivencia causa-específica (Silva et al. 2007). No obstante, los mecanismos moleculares detrás de esa asociación siguen siendo desconocidos, y el papel que esta proteína tenga en los tumores de cavidad oral no ha sido estudiado, máxime en combinación con otro tipo de marcadores biológicos.

El receptor para el factor de crecimiento dependiente de insulina-1 (IGF-1R), es un receptor transmembranal de tipo tirosina-quinasa, comúnmente sobreexpresado en diferentes tipos tumorales. La activación de este receptor conduce a una ulterior activación de ras, raf y la vía de las MAPK, lo que resulta en un incremento de la proliferación celular. Igualmente, la activación de IGF-1R produce una activación de la vía PI3K, que provoca una inhibición de la apoptosis. Como se ha comentado previamente, la activación de IGF-1R se ha asociado a un incremento de la radioresistencia, fundamentalmente debida a ese incremento de la proliferación celular e inhibición de la apoptosis (Turner et al. 1997; Yu et al. 2003). Esa asociación ha sido observada en pacientes con cáncer de cérvix (Lloret et al. 2007), y como se expuso en el capítulo anterior de esta Tesis Doctoral, también en nuestra serie de pacientes con cáncer de cavidad oral.

Previamente, se ha publicado una asociación a nivel clínico de la expresión combinada de IGF-1R y MVP en el pronóstico clínico de pacientes con cáncer de cérvix (Lloret et al. 2008). Así, la sobreexpresión combinada de ambas proteínas condiciona el pronóstico clínico de las pacientes, aún cuando hayan presentado respuesta completa a los tratamientos (Lloret et al. 2008).

Los objetivos de esta parte del trabajo fueron, estudiar la expresión proteica de MVP en tumores clínicos de cavidad oral, la relación de la proteína con otros factores pronósticos clínicos y moleculares, y su papel como factor predictivo de supervivencia en estos pacientes. Además, explorar la relación con IGF-1R y su papel combinado en la predicción de la respuesta y la supervivencia.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Pacientes*

La serie de pacientes ha quedado descrita suficientemente en capítulos anteriores. Para esta parte del trabajo, realizamos una actualización del seguimiento, cerrando el mismo en julio de 2011. La media de seguimiento para los supervivientes (n = 18, 15 hombres y 3 mujeres) fue de  $123.11 \pm 40.36$  meses (mediana 113.50, rango 72-204 meses).

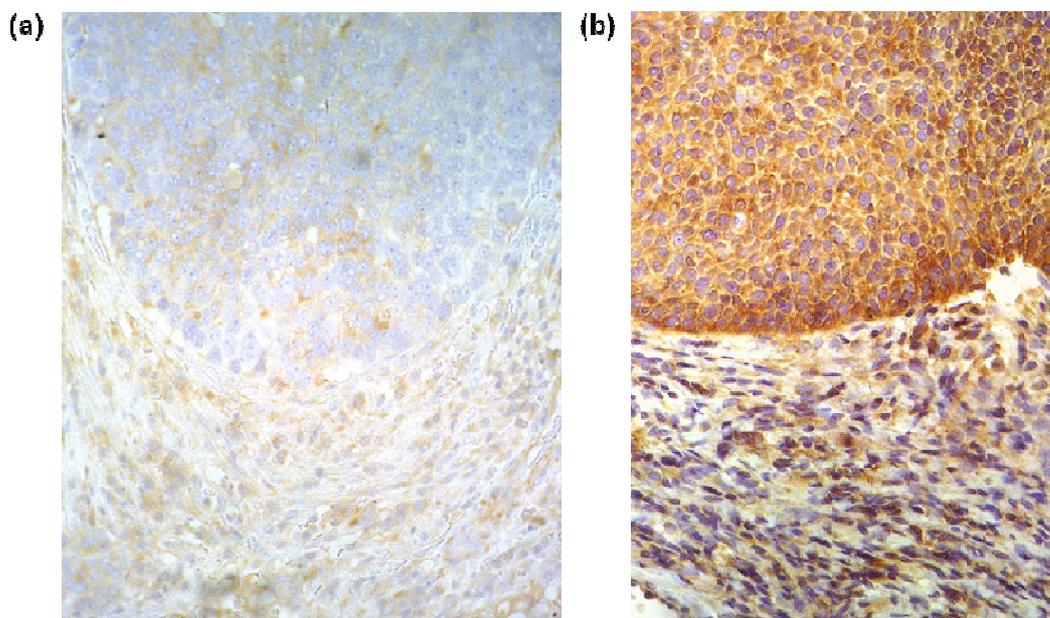
### *Tratamiento*

El tratamiento de estos pacientes ha sido extensamente descrito en capítulos anteriores. Resaltar el hecho de que aquellos pacientes con estadios I-II fueron sometidos a cirugía; aquellos pacientes con estadio III-IV recibieron, además, tratamiento con radioterapia postoperatoria; aquellos pacientes en estadios iniciales que tuvieran márgenes afectos tras la cirugía recibieron igualmente radioterapia adyuvante. Ningún paciente de esta serie recibió readioterapia neoadyuvante ni quimioterapia de ningún tipo.

### *Inmunohistoquímica*

La expresión de MVP se estudió por inmunohistoquímica (IHC) en las 131 muestras de tejido embebido en parafina de los pacientes, tal y como se había descrito previamente. El bloque tumoral más representativo fue aquel usado para el análisis. Se usaron cortes de tejido de 4 mm, que fueron incubados durante una hora en una cámara húmeda con el anticuerpo primario (LRP/MVP Ab-2, Clon 1032, Neomarkers, CA) a una dilución 1:100. A continuación, se realizó una incubación durante 30 minutos con un anticuerpo secundario biotinado (Dako Detection kit, LSBA). El revelado se realizó con sustrato de tetrahidroclorohidro-diaminobencidina (DAB Chromogen, Dako) y rápido contraste con hematoxilina de Harris. La marcación se realizó por peroxidada-estreptavidina-biotina (Dako). En cada sección de cortes se omitió el anticuerpo primario, para usar dicha sección como control negativo. Como control positivo, se utilizó una sección fuertemente positiva para la oncoproteína. La valoración de la IHC fue realizada de manera ciega, sin conocimiento de las características clínicas del paciente por parte del patólogo, en aquellas zonas de máxima expresión (Figura 1).

La tinción de MVP, observada en el citoplasma de las células, se valoró de manera semicuantitativa de la siguiente forma: tinción negativa (-), débilmente positiva (+), moderadamente positiva (++) y fuertemente positiva (+++). Aquellos tumores clasificados como moderados/fuertemente positivos se consideraron con sobreexpresión de MVP. Los datos referidos a IGF-1R fueron rescatados del trabajo previo, siguiendo el mismo protocolo de tinción y cuantificación especificado.



**Figura 1.** Tinción inmunohistoquímica representativa de MVP valorada semicuantitativamente (400X), mostrándose baja (a) y alta (b) expresión de la oncoproteína.

#### *Análisis estadístico*

La correlación entre variables categóricas clínicas y patológicas se realizó mediante test de Chi cuadrado. Para la comparación entre variables continuas de distribución normal se usaron los test de t-student y análisis de la varianza. Las asociaciones entre las variables estudiadas y el pronóstico de la enfermedad se realizaron mediante curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, y las diferencias entre grupos se analizaron mediante test de log-rango. La regresión de Cox se usó para los análisis multivariantes. El pronóstico de la enfermedad tras el tratamiento se realizó en

términos de supervivencia libre de recidiva local (LDFS), supervivencia libre de recidiva regional (RDFS), supervivencia libre de metástasis a distancia (DMFS), supervivencia libre de enfermedad (DFS), supervivencia causa-específica (CSS) y supervivencia absoluta (OS). El análisis estadístico se realizó mediante el paquete informático SPSS 15.0 (SPSS Inc. Chicago, IL).

## RESULTADOS

La expresión de MVP se determinó para los 131 pacientes de la serie. MVP aparecía sobreexpresado en 67 pacientes (51.1%). Como se ha expuesto previamente, IGF-1R aparecía sobreexpresado en 60 pacientes (45.8%). Observamos una asociación positiva entre la expresión de ambas proteínas, de tal manera que aquellos tumores que sobreexpresaban MVP sobreexpresaban también IGF-1R ( $P = 0.014$ ) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Asociación de la expresión de MVP e IGF-1R

	MVP		Total
	Bajo	Alto	
IGF-1R Bajo	42	29	71
Alto	22	38	60
Total	64	67	131

La expresión de las oncoproteínas se evaluó de manera semicuantitativa. Bajo, tinción negativa/débilmente positiva; Alto, tinción moderada/fuertemente positiva. Test de Chi cuadrado,  $P = 0.014$ .

No se observaron otras asociaciones estadísticas con otras variables. La supervivencia actuarial tras 15 años de seguimiento fue la siguiente: 65.6, 70.2, 90.6, 49.6 y 57.1% para LDFS, RDFS, DMFS, DFS y CSS, respectivamente. Como se ha descrito previamente, el grado histológico (I vs. II-III) y el estadio tumoral (I-I vs. III-IV) fueron los factores pronósticos más importantes en la serie completa, en análisis multivariante ( $\text{Exp}(B) = 3.009$ , CI 95% (1.255-7.214),  $P = 0.014$ ;  $\text{Exp}(B) = 3.085$ , CI95% (1.565-6.083),  $P = 0.001$ , respectivamente). La expresión de MVP, ni tampoco la de IGF-I, fue un factor pronóstico de supervivencia en la serie completa.

Dada la importancia del grado y el estadio, se exploró el papel de las oncoproteínas segmentando a los pacientes según estas variables. Así, se observó que MVP era un factor pronóstico de supervivencia en pacientes con estadios avanzados de la enfermedad (estadios III-IV). Veinte de los 30 pacientes (66.7%) con estadio III-IV y baja expresión de MVP (tinción negativa o débilmente positiva) estaban libres de muerte causa-específica; mientras que 12 de los 36 pacientes (33.3%) con tumores en estadio III-IV y sobreexpresión de MVP estaban libres de muerte causa-específica ( $P = 0.010$ ). Los resultados del test de log-rank fueron significativos también para DMFS ( $P = 0.030$ ) y DFS ( $P = 0.020$ ) (Tabla 2). En análisis multivariante (regresión de Cox), la sobreexpresión de MVP fue un importante factor pronóstico de DFS ( $P = 0.016$ ,  $\text{Exp}(B) = 2.584$ ,  $\text{CI}_{95\%} (1.191-5.604)$ ) y CSS ( $P = 0.011$ ,  $\text{Exp}(B) = 2.916$ ,  $\text{CI}_{95\%} (1.286-6.629)$ ) (Tabla 2). Los análisis realizados, segmentando a la población según el grado histológico o la afectación de los márgenes quirúrgicos, no reportó resultados significativos en ningún caso.

**Tabla 2.** Relación de factores pronósticos y variables clínicas en el subgrupo de pacientes con carcinoma de cavidad oral en estadios avanzados de la enfermedad (III-IV),  $n = 66$

	<b>LDFS</b>	<b>RDFS</b>	<b>DMFS</b>	<b>DFS</b>	<b>CSS</b>
<b>Sexo</b>	$P = 0.683$	$P = 0.744$	$P = 0.524$	$P = 0.707$	$P = 0.485$
<b>Edad</b>	$P = 0.882$	$P = 0.537$	$P = 0.387$	$P = 0.574$	$P = 0.866$
<b>Grado</b>	$P = 0.330$	$P = 0.053$	$P = 0.047$	$P = 0.024^b$	$P = 0.008^d$
<b>Márgenes quirúrgicos</b>	$P = 0.001^a$	$P = 0.077$	$P = 0.388$	$P = 0.003$	$P = 0.001$
<b>MVP</b>	$P = 0.214$	$P = 0.362$	$P = 0.030$	$P = 0.020^c$	$P = 0.010^e$
<b>IGF-1R</b>	$P = 0.016$	$P = 0.153$	$P = 0.898$	$P = 0.029$	$P = 0.009$

Los valores  $P$  en análisis univariante fueron obtenidos mediante el test log rank.

Los superíndices hacen referencia a los análisis multivariantes (regresión de Cox):

<sup>a</sup> $P = 0.006$ ,  $\text{Exp}(B) = 3.882$ ,  $\text{CI}_{95\%} (1.474-10.226)$

<sup>b</sup> $P = 0.044$ ,  $\text{Exp}(B) = 2.876$ ,  $\text{CI}_{95\%} (1.030-8.035)$

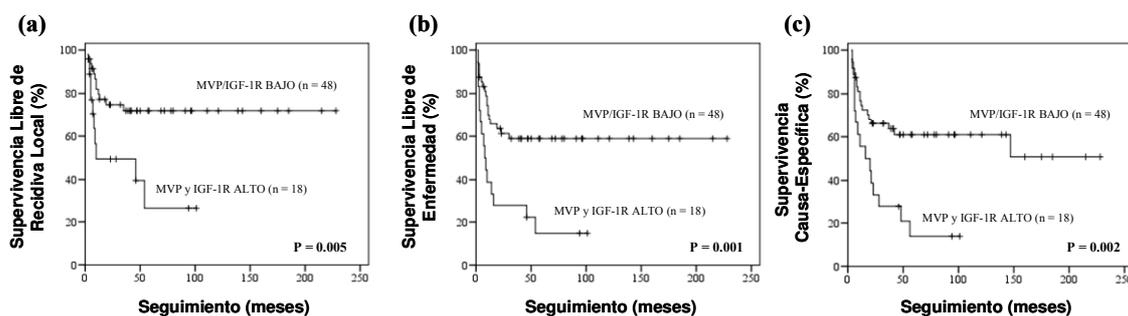
<sup>c</sup> $P = 0.016$ ,  $\text{Exp}(B) = 2.584$ ,  $\text{CI}_{95\%} (1.191-5.604)$

<sup>d</sup> $P = 0.017$ ,  $\text{Exp}(B) = 3.952$ ,  $\text{CI}_{95\%} (1.281-12.193)$

<sup>e</sup> $P = 0.011$ ,  $\text{Exp}(B) = 2.916$ ,  $\text{CI}_{95\%} (1.283-6.629)$

Con la intención de conocer el papel conjunto de IGF-1R y MVP en este contexto, se procedió a realizar una serie de análisis combinados con ambas proteínas. Estos

análisis mostraron que 29 de los 48 pacientes (60.4%) con los tumores en estadio III-IV que además presentaban una baja expresión de IGF-1R y/o MVP estaban libres de muerte relacionada con la enfermedad; mientras que únicamente 3 de los 18 pacientes con tumores en estadio III-IV y sobreexpresión de ambas proteínas estaba libre de muerte causa-específica ( $P = 0.002$ ). Estos resultados fueron también significativos para LDFS ( $P = 0.005$ ) y DFS ( $P = 0.001$ ) (Figuras 1a-c). En análisis multivariante, la sobreexpresión de IGF-1R y MVP (conjuntamente) fue un importante factor predictivo para DFS ( $P = 0.008$ ,  $\text{Exp}(B) = 2.730$ ,  $\text{CI95\%} (1.302-5.724)$ ) y CSS ( $P = 0.014$ ,  $\text{Exp}(B) = 2.570$ ,  $\text{CI95\%} (1.215-5.437)$ ).



**Figura 2.** Asociación entre la expresión de IGF-1R y MVP con la supervivencia, expuesta mediante curvas de Kaplan-Meier, en pacientes con carcinoma de cavidad oral en estadios III-IV. Los valores de P se obtuvieron mediante el test de log-rank.

## DISCUSIÓN

La presente parte del estudio se llevó a cabo con la intención de explorar el papel de la expresión de MVP como factor pronóstico en tumores de cavidad oral tratados con cirugía y radioterapia.

MVP apareció sobreexpresado en 67 pacientes (51.1%). Solo un estudio ha reportado niveles de expresión de esta oncoproteína en tumores de cabeza y cuello (Silva et al. 2007). Silva y col. reportaron una tinción positiva de MVP en 49 de los 78 pacientes con carcinoma del tercio posterior de la lengua y las tonsilas que habían estudiado (62.8%). No existen datos en la bibliografía referidos a la expresión de esta oncoproteína exclusivamente en tumores de cavidad oral.

El estadio tumoral, tal y como se ha comentado previamente, se mostró como el factor pronóstico más importante en nuestra serie de pacientes. Los ratios de recaídas

locales reportados en la bibliografía para aquellos pacientes en estadios avanzados de la enfermedad (III-IV) está en torno al 40%, dato similar al mostrado en nuestra serie.

La expresión de MVP no fue un factor pronóstico de supervivencia en la serie completa. No obstante, cuando los pacientes fueron segregados según su estadio tumoral (I-II vs. III-IV), la expresión de MVP fue un factor predictivo de LDFS, DFS y CSS. MVP podría tener algún tipo de papel favoreciendo la inestabilidad genética mediante la reducción de los mecanismos de reparación del daño al ADN, a través de la inhibición de la expresión de Ku70/80 y por tanto de los mecanismos de reparación no homóloga al ADN (Lloret et al. 2009). El principal daño producido por la radiación ionizante al ADN es la rotura doble de cadena, que es reparada esencialmente por mecanismos de reparación no homóloga (NHEJ). Ku70/80 son genes clave en la reparación NHEJ de las roturas doble de cadena de ADN radio-inducidas. Si vaults se sobreexpresa, los mecanismos de NHEJ podrían ser inhibidos mediante diferentes formas, lo cual produciría un aumento de la inestabilidad genética ya sea por la ineficacia de NHEJ o por la participación de mecanismos de reparación homóloga, inadecuados para reparar daños de este tipo. PARP-1, parte del complejo vault, promueve la reparación homóloga sobre la NHEJ, mediante la inhibición de la expresión de Ku70/80. Estos eventos se asociarían con la decisión de las células dañadas de sobrevivir y proliferar, favoreciendo así la progresión tumoral y reduciendo la respuesta del tumor a los tratamientos oncológicos mediante la aparición de células con fenotipos resistentes. Los resultados presentados aquí están de acuerdo con los reportados previamente por Silva y cols., donde la sobreexpresión de MVP aparecía como un importante factor predictivo de supervivencia en 78 pacientes con carcinoma de orofaringe tratados con radioterapia primaria e intención curativa (Silva et al. 2007).

Los presentes resultados son los primeros que evidencian una relación directa entre la expresión de IGF-1R y MVP a nivel clínico en este tipo de tumores. No obstante, esta asociación había sido observada en pacientes con cáncer de cérvix (Lloret et al. 2008), lo que parece indicar que ambas oncoproteínas necesitan estar sobreexpresadas para conferir radio-resistencia y condicionar el pronóstico y la supervivencia. Se ha sugerido que tanto IGF-1R como MVP incrementan la proliferación celular mediante la activación de Src, PTEN y ERK; e inhiben la apoptosis mediante la modulación del eje COP-1/p53, lo que resulta en un incremento de la resistencia tumoral a los tratamientos oncológicos. Por su parte, la expresión de MVP se ha visto asociada con otras moléculas también relacionadas con la proliferación y la apoptosis (Lloret et al. 2009). Así, la resistencia a la radioterapia derivada de la sobreexpresión de MVP a

nivel clínico podría ser debida a ese aumento de la proliferación e inhibición de la apoptosis, así como por la regulación de los procesos de reparación del daño al ADN, fundamentalmente a través de la inhibición de Ku70/80 (Lloret et al. 2009). IGF-1R colaboraría con MVP en la prevención de la apoptosis a través de la inducción de BCL-2, así como, en menor medida, la inhibición de BAX (Lloret et al. 2009). Esto afectaría a los mecanismos de reparación no homóloga mediante la regulación de la vía AKT/p38MAPK, principalmente a través de la modificación de la expresión de Ku (Cosaceanu et al. 2007).

La activación de IGF-1R promueve la puesta en marcha de una serie de vías de señalización tales como ras, raf, MAPK o PI3K/AKT/BAD. La sobreexpresión de IGF-1R se ha asociado a fenómenos de progresión de la enfermedad, incremento de la resistencia a la radioterapia y peor pronóstico (Rocha et al. 1997; Turner et al. 1997; Lloret et al. 2007). Además, IGF-1R parece ser importante en relación a los fenómenos de reparación del daño al ADN mediados por ATM (Peretz et al. 2001). Así, la desregulación de la expresión de IGF-1R tras la radioterapia podría estar asociada con el incremento de la inestabilidad genética y el aumento de la capacidad transformadora de las células tumorales (Shahrabani-Gargir et al. 2004).

En conclusión, la expresión de MVP e IGF-1R está relacionada en tumores de células escamosas de cavidad oral, y ambas proteínas parecen conferir menor supervivencia y peor pronóstico entre aquellos pacientes con estadios más avanzados de la enfermedad. Según esto, la expresión combinada de ambas oncoproteínas podría ser relevante como factor predictivo en este tipo de pacientes. No obstante, se deben diseñar nuevos estudios que incluyan a PTEN, p53, BCL-2 marcadores de proliferación (como Ki67) o PI3K, con el objeto de definir más concretamente el papel de estas oncoproteínas y entender los mecanismos moleculares que llevan a estos pacientes a tener un peor pronóstico. Además, estos resultados deben ser confirmados en series de pacientes más grandes.



## **CAPÍTULO VI**

**Papel de la apoptosis y la proliferación celular en  
relación a la expresión de IGF-1R y MVP**



**RESUMEN**

Una vez establecido el papel predictivo de la expresión de las oncoproteínas IGF-1R y MVP, se investigó la influencia de la apoptosis y la proliferación celular en el pronóstico clínico de pacientes con carcinoma de cavidad oral tratados con radioterapia post-operatoria. Se investigó la asociación entre todos los marcadores biológicos, su relación con factores clínicos y patológicos y su papel predictivo en este tipo de pacientes.

Ciento treinta y un pacientes con carcinoma epidermoide de la cavidad oral fueron incluidos en el estudio tal y como se ha descrito previamente. Los pacientes en estadios I y II de la enfermedad fueron tratados mediante cirugía. Aquellos pacientes en estadio III-IV se trataron con cirugía y radioterapia postoperatoria tal y como se ha descrito en capítulos anteriores. La dosis de radioterapia administrada fue de  $62.13 \pm 7.74$  Gy en fracciones de 1.8-2 Gy al día. La expresión de las oncoproteínas se estudió mediante inmunohistoquímica en tejidos embebidos en parafina.

El estadio tumoral fue el factor pronóstico más importante para la supervivencia. Aquellos tumores con sobreexpresión de IGF-1R y MVP tenían una menor tasa de supervivencia causa-específica en aquellos pacientes con estadios avanzados de la enfermedad (III-IV), tanto en análisis univariante como multivariante. Entre aquellos pacientes en estadio III-IV que además mostraron expresión negativa de BCL-2, todos aquellos que además sobreexpresaban IGF-1R/MVP murieron por la enfermedad durante los primeros 5 años de seguimiento.

Estos resultados muestran un papel relevante de la apoptosis y la proliferación celular en relación a la expresión de IGF-1R y MVP en tumores de cavidad oral, lo que hace pensar que estas oncoproteínas están íntimamente relacionadas y condicionan el pronóstico de la enfermedad.



**SUMMARY**

**Objectives.** To assess the expression of MVP, IGF-1R, BCL-2 and Ki67 in oral carcinoma patients treated with postoperative radiotherapy, the association established among the biological markers, the relation with clinical and pathological prognostic factors, and its role in predicting clinical outcome.

**Patients and Methods.** One hundred and thirty one consecutive patients suffering from oral cavity squamous cell carcinoma were included in this study from July 1989 to April 2005. Follow-up was closed in July 2011. The mean follow-up for survivors was  $123.11 \pm 40.36$  months. Patients in tumour stages I and II were referred to surgery. Patients in stage III-IV were referred to surgery and postoperative radiotherapy. Radiation therapy was administered up to a mean dose of  $62.13 \pm 7.74$  Gy in 1.8–2 Gy fractions. Oncoproteins expression was studied by immunohistochemistry in paraffin-embedded tumour tissue.

**Results.** Tumour stage was the most important prognostic factor for survival. Tumours showing high IGF-1R and MVP expression were related to poor cause-specific survival in those patients suffering advanced stages of the disease (III-IV), in univariate and multivariate analysis. Among those patients suffering from stages III-IV who showed negative staining of BCL-2, patients overexpressing IGF-1R/MVP tumours died of the disease within the first five years of follow-up (hazard ratio 4.738, 95% CI 1.967-21.414,  $P = 0.001$ ).

**Conclusion.** These results show a role of apoptosis and cell proliferation in relation to the expression of IGF-1R and MVP in oral cavity tumors, suggesting that these oncoproteins are closely related and determine the prognosis.



## INTRODUCCIÓN

El tumor primario de cavidad oral de tipo epidermoide (OCSCC) es tratado fundamentalmente mediante cirugía, con o sin disección cervical, o por terapia combinada de cirugía y radioterapia (RT). No obstante, a pesar de esto, es común observar entre los pacientes, resistencias a los tratamientos y altos ratios de recaídas locales. Aunque existen algunos factores pronósticos de supervivencia, se necesitan nuevos factores pronósticos que puedan ser usados en el momento del diagnóstico y que, consecuentemente, contribuya a seleccionar a los pacientes para recibir un tipo de tratamiento u otro, en función del riesgo derivado de la presencia o no de esos nuevos factores de riesgo.

Las partículas vaults son ribonucleoproteínas con una estructura en forma de barril y compuestas por tres tipos de proteínas, tal y como se ha descrito anteriormente: la proteína vault mayor (MVP), dos vault menores con actividad poly(ADP-ribosa) polimerasa (VPARP) y una proteína asociada a telomerasa-1 (TEP-1). El complejo se completa con la presencia de pequeñas partículas de ARN no traducible (vRNA) de funcionalidad no del todo conocida (Kickhoefer et al. 1999a). Clásicamente, las partículas vaults se han asociado a fenómenos de resistencia a drogas, relacionadas con otras proteínas como la proteína de resistencia pulmonar (LRP) (Mossink et al. 2003). No obstante, los estudios realizados sobre vaults han demostrado una interacción de esta proteína con otras relevantes para diferentes mecanismos celulares: PTEN (Minaguchi et al. 2006), Erk (Xiang et al. 2006), o EGF (Kim et al. 2006). Además, la expresión de MVP, la proteína de mayor tamaño del complejo vault, se ha asociado a fenotipos de malignidad en algunos tumores, lo que sugiere que estas proteínas podrían ejercer algún tipo de papel en el desarrollo y la progresión tumoral (Steiner et al. 2006a). Se ha observado una participación de MVP en la resistencia a la radioterapia, probablemente debida a la inhibición de la apoptosis a través de la inhibición del eje COP-1/p53 (Yi et al. 2005; Dornan et al. 2006). Es más, algunos agentes responsables de producir daño al ADN, tales como la luz ultravioleta, inducen los niveles de expresión de MVP (Shimamoto et al. 2006). A nivel clínico, el papel de MVP en relación a la radioterapia ha sido poco estudiado. La primera evidencia se reportó en el año 2007 por el grupo de Silva y col. En ese estudio, la sobreexpresión de MVP se relacionaba con un peor pronóstico en 78 pacientes con carcinoma de orofaringe tratados con radioterapia. La mayor significación clínica se observaba entre los pacientes con tumores de lengua, que presentaban mayores niveles de recaída local y muerte causa-específica (Silva et al. 2007). No obstante, los

mecanismos moleculares subyacentes a esta asociación no son del todo conocidos, y el papel de MVP en pacientes con OCSCC no es del todo conocido, ni sus asociaciones con otras variables clínicas o moleculares.

La expresión del receptor para el factor de crecimiento insulínico de tipo 1 (IGF-1R) parece ser importante para la biología de diferentes tumores. Su activación parece estar asociada a modificaciones de los mecanismos de respuesta a la RT (Turner et al. 1997; Peretz et al. 2001; Yu et al. 2003). En capítulos anteriores hemos reportado la acción de IGF-1R en pacientes con OCSCC. Así, aquellos pacientes en estadios avanzados de la enfermedad que además presentaban sobreexpresión de esta oncoproteína, presentaban menores supervivencias. Debido al papel central que IGF-1R tiene en relación a la modulación de la apoptosis y la proliferación, y a otras asociaciones con otras proteínas, es probable que exista algún tipo de interacción de IGF-1R no solo con MVP sino también con BCL-2, Ki-67 o Ku70/80 (proteína clave en la regulación de los mecanismos de reparación no homóloga de daño al ADN). La asociación entre IGF-1R fue reportada por vez primera por Lloret y col. en pacientes con cáncer de cervix (Lloret et al. 2008), y ha sido observada igualmente en nuestra serie de pacientes (ver capítulo V de esta Tesis Doctoral). Ambas proteínas aparecen co-expresadas en el mismo tipo tumoral, y ambas tienen que estar sobreexpresadas para mediar quimio-radio-resistencia. Más aún, MVP, IGF-1R y BCL-2 parecen estar relacionadas en tumores de cervix, y asociadas a una peor supervivencia, tal y como se ha reportado recientemente (Henriquez-Hernandez et al. 2011).

La familia de proteínas BCL-2 se encuentra relacionada con procesos carcinogénicos del OCSCC. Se ha sugerido que la expresión de moléculas apoptóticas podría ser un factor pronóstico útil en este tipo de tumores (Coutinho-Camillo et al. 2010). La sobreexpresión de BCL-2 no solo es relevante en la carcinogénesis oral (Kannan et al. 1998; Sulkowska et al. 2001; Loro et al. 2002), sino que también es esencial en la progresión de la enfermedad, ya que incrementa los ratios de supervivencia de las células neoplásicas, permitiendo la aparición de nuevas mutaciones y el origen de nuevos fenotipos resistentes a la quimioterapia y/o a la radioterapia (Saikrishana et al. 2002). La expresión de BCL-2 es un factor predictivo de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia absoluta en tumores de tipo epidermoide de la orofaringe (Nichols et al. 2010) y la nasofaringe (Chen et al. 2010). Es más, se ha observado una relación entre BCL-2 y Ki67; la sobreexpresión de BCL-2 se ha asociado a un aumento de la proliferación celular a través de la sobreexpresión de Ki67 (Lloret et al. 2009).

Tal y como se ha descrito previamente, la expresión de la proteína Ki67 es un marcador de proliferación celular (Scholzen et al. 2000) asociado a peor pronóstico en diferentes tipos de tumores, entre los que está el OCSCC (Montebugnoli et al. 2009; Motta Rda et al. 2009).

El objetivo de esta parte del trabajo fue estudiar la expresión de MVP, en combinación con IGF-1R, y en asociación a BCL-2 y Ki67, en pacientes con carcinoma primario de cavidad oral de tipo epidermoide tratados con cirugía y radioterapia adyuvante; establecer posibles asociaciones entre las distintas oncoproteínas, así como entre ellas y otras variables clínico-patológicas; y su papel como factores predictivos de supervivencia.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### *Pacientes*

La muestra estaba compuesta por 131 pacientes con OCSCC diagnosticados en el Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín. Los pacientes fueron tratados con cirugía y radioterapia adyuvante con intención curativa. Tal y como se ha descrito previamente, los pacientes fueron reclutados entre los años 1989 y 2005. Todos los pacientes recibieron un consentimiento informado que debía ser firmado. Así mismo, el estudio fue aprobado por el Comité Científico de la Institución. El seguimiento se cerró en julio de 2011, registrándose una media de seguimiento de los pacientes vivos,  $n = 18$ , de  $123.11 \pm 40.36$  meses (mediana 113.50; rango 72-204 meses). Tal y como se ha descrito, la mayoría de los pacientes era de sexo masculino ( $n = 116$ , 88.5%) con una mediana de edad de 59 años.

El *estadiaje* de los pacientes se realizó según la clasificación TNM de la Unión Internacional Contra el Cáncer (IUAC). El grado de diferenciación tumoral se realizó de acuerdo a los criterios establecidos por el sistema Broder. Diecinueve pacientes presentaban estadio I, 46 estadio II, 25 estadio III y 41 estadio IV. El tumor de lengua fue la localización más frecuentemente observada ( $n = 64$ , 48.8%), y la mayoría tenían tumores bien o moderadamente diferenciados (grados I-II,  $n = 113$ , 86.2%).

### *Tratamiento*

Todos los pacientes fueron sometidos a cirugía: 71 pacientes sufrieron resección simple del tumor (14 pacientes fueron sometidos a disección cervical funcional, 102 pacientes sufrieron disección cervical radical y un paciente fue sometido a resección cervical bilateral). Catorce pacientes no sufrieron ningún tipo de resección cervical.

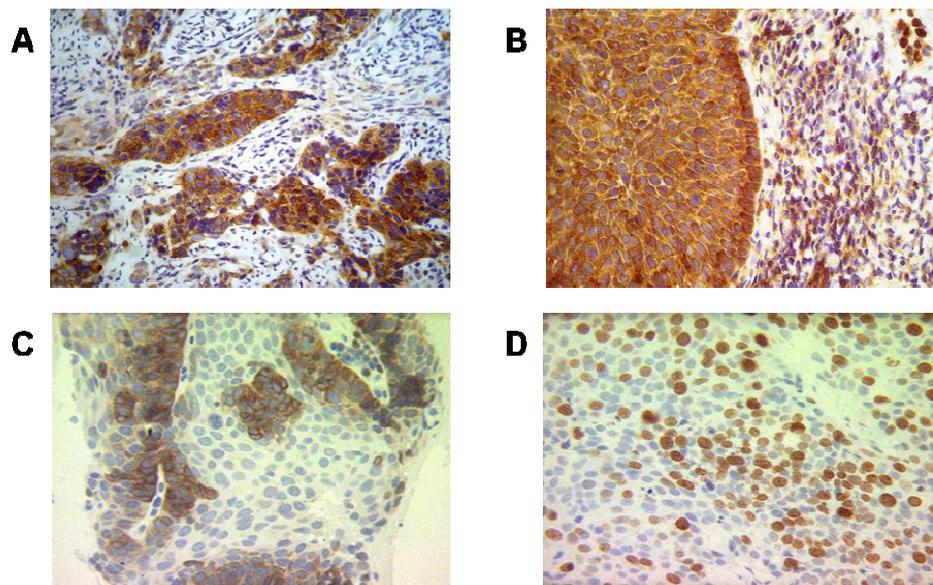
Todos los pacientes en estadios III-IV recibieron radioterapia adyuvante con intención curativa. Además, aquellos pacientes con estadio I-II que tras la cirugía presentaban márgenes quirúrgicos afectos, también fueron sometidos a este tipo de radioterapia. Así, se trataron con RT 84 pacientes, con una unidad de cobalto o con un acelerador lineal según la fecha del tratamiento. La dosis media de radiación fue de  $62.13 \pm 7.74$  Gy en fracciones diarias de 1.8 a 2 Gy tal y como se ha explicado anteriormente (ver capítulo III de esta Tesis Doctoral). Ningún paciente fue tratado con quimioterapia en ninguna modalidad, ni con radioterapia neoadyuvante.

### *Inmunohistoquímica*

La expresión de MVP, IGF-1R, BCL-2 y Ki67 se estudió por inmunohistoquímica (IHC) en las 131 muestras de tejido embebido en parafina de los pacientes, tal y como se había descrito previamente (Lloret et al. 2009; Henriquez-Hernandez et al. 2011; Lara et al. 2011). El bloque tumoral más representativo fue aquel usado para el análisis. Se usaron cortes de tejido de 4 mm, que fueron incubados durante una hora en una cámara húmeda con el anticuerpo primario (Tabla 1). A continuación, se realizó una incubación durante 30 minutos con un anticuerpo secundario biotinado (Dako Detection kit, LSBA). El revelado se realizó con sustrato de tetrahidroclorohidrodiaminobencidina (DAB Chromogen, Dako) y rápido contraste con hematoxilina de Harris. La marcación se realizó por peroxidada-estreptavidina-biotina (Dako). En cada sección de cortes se omitió el anticuerpo primario, para usar dicha sección como control negativo. Como control positivo, se utilizó una sección fuertemente positiva para la oncoproteína. La valoración de la IHC fue realizada de manera ciega, sin conocimiento de las características clínicas del paciente por parte del patólogo, en aquellas zonas de máxima expresión (Figura 1). La expresión de MVP, IGF-1R y BCL-2 se realizó de manera semicuantitativa y se clasificó de la siguiente manera: negativo vs. positivo para BCL-2; y baja (negativa o débilmente positiva expresión) o alta (moderada o fuertemente positiva expresión) para MVP e IGF-1R. La tinción de Ki67 observada en el núcleo de las células se evaluó de manera continua como el

porcentaje de células teñidas. Al menos 1.000 células por paciente fueron estudiadas para la determinación de Ki67 (Lloret et al. 2007; Lloret et al. 2008; Lloret et al. 2009; Henriquez-Hernandez et al. 2011; Lara et al. 2011).

<b>Tabla 1.</b> Descripción de los anticuerpos utilizados		
<b>Proteína</b>	<b>Clon</b>	<b>Casa comercial</b>
<b>MVP</b>	Ab-2 Clone 1032	Neomarkers, Fremont, CA
<b>IGF-1R</b>	Ab1 Clone 24-31	Neomarkers, Fremont, CA
<b>BCL-2</b>	Clone 124	Dako, Carpintería, CA
<b>Ki67</b>	Clon Mib-1	Master Diagnóstica, Granada, España



**Figura 1.** Inmunotinciones representativas de (A) IGF-1R, (B) MVP, (C) BCL-2 y (D) Ki67 (400X)

#### *Análisis estadístico*

La correlación entre variables categóricas clínicas y patológicas se realizó mediante test de Chi cuadrado. Para la comparación entre variables continuas de distribución normal se usaron los test de t-student y análisis de la varianza. Las asociaciones entre las variables estudiadas y el pronóstico de la enfermedad se realizaron mediante curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, y las diferencias entre grupos se analizaron

mediante test de log-rango. La regresión de Cox se usó para los análisis multivariantes. El pronóstico de la enfermedad tras el tratamiento se realizó en términos de supervivencia libre de recidiva local (LDFS), supervivencia libre de recidiva regional (RDFS), supervivencia libre de metástasis a distancia (DMFS), supervivencia libre de enfermedad (DFS), supervivencia causa-específica (CSS) y supervivencia absoluta (OS). El análisis estadístico se realizó mediante el paquete informático SPSS 15.0 (SPSS Inc. Chicago, IL).

## RESULTADOS

La expresión de todas las oncoproteínas se detectó mediante inmunohistoquímica en todas las muestras. MVP aparecía sobreexpresada en 67 pacientes (51.1%), IGF-1R estaba sobreexpresada en 60 pacientes (45.8%), y BCL-2 fue detectado en 20 pacientes (15.3%) (Tabla 2). La expresión de Ki67 siguió una distribución normal (test de Kolmogorov-Smirnov,  $P > 0.05$ ), mostrando una media de expresión de  $52.94\% \pm 21.68\%$  (mediana 50%, rango 0-95%).

**Tabla 2.** Características patológicas de los pacientes en estudio

Característica	N	(%)
<b>MVP</b>		
Bajo*	64	(48.9)
Alto**	67	(51.1)
<b>IGF-1R</b>		
Bajo	71	(54.2)
Alto	60	(45.8)
<b>BCL-2</b>		
Negativo	111	(84.7)
Positivo	20	(15.3)
<b>Ki67</b>		
$\leq 50\%$	66	(50.4)
$> 50\%$	65	(49.6)
* Bajo: expresión negativa o débilmente positiva		
** Alto: expresión moderada-fuertemente positiva		
La expresión de Ki67 se segmentó por la mediana		

Se observó una correlación positiva entre la expresión de BCL-2 y Ki67. Así, aquellos tumores con expresión positiva de BCL-2 mostraban altos niveles de expresión de Ki67 (63.3 vs. 51.1%,  $P = 0.020$ ). Como ya se ha comentado, se observó una asociación positiva entre la expresión de MVP e IGF-1R ( $P = 0.014$ ). Así, 42 de los 71 tumores (59.1%) que mostraban bajos niveles de IGF-1R mostraban también bajos niveles de MVP; y 38 de los 60 tumores (63.3%) con sobreexpresión de IGF-1R sobreexpresaban igualmente MVP. No observamos ninguna otra asociación estadística significativa con el resto de variables estudiadas.

La supervivencia actuarial tras 15 años de seguimiento fue del 65.6, 70.2, 90.6, 49.6, 57.1 y 19.2% para la supervivencia libre de recidiva local (LDFS), supervivencia libre de recidiva regional (RDFS), supervivencia libre de metástasis a distancia (DMFS), supervivencia libre de enfermedad (DFS), supervivencia causa-específica (CSS) y supervivencia absoluta (OS), respectivamente. El estadio tumoral, el grado de diferenciación y la afectación de márgenes quirúrgicos fueron los únicos factores predictivos de supervivencia en análisis univariante en la serie global (Tabla 3). En el subgrupo de pacientes en estadios avanzados de la enfermedad (III-IV), la sobreexpresión de MVP, IGF-1R y la combinación de ambas oncoproteínas fue un factor predictivo para CSS ( $P = 0.010$ ,  $P = 0.009$  y  $P = 0.011$ , respectivamente) (Tabla 3). En análisis multivariante, el estadio tumoral y el grado histológico fueron los únicos factores pronóstico de supervivencia en la serie global. En el subgrupo de pacientes con estadios avanzados de la enfermedad, la sobreexpresión de MVP y de MVP/IGF-1R fue un factor predictivo para la supervivencia causa-específica ( $P = 0.017$ ,  $\text{Exp}(B) = 3.014$ ,  $\text{IC}_{95\%} (1.221-7.441)$ ;  $P = 0.024$ ,  $\text{Exp}(B) = 2.641$ ,  $\text{IC}_{95\%} (1.135-6.144)$ , respectivamente) (Tabla 3). No se observó asociación estadística significativa cuando los pacientes fueron segregados según el grado de diferenciación tumoral o la afectación de los márgenes quirúrgicos.

Los análisis de Kaplan-Meier en el subgrupo de pacientes en estadios avanzados de la enfermedad, mostraron una supervivencia causa-específica del 61.9% tras 10 años de seguimiento en aquellos pacientes con expresión negativa o débilmente positiva de IGF-1R, en comparación con el 28.3% de CSS observada en aquellos pacientes con expresión moderada-fuerte de IGF-1R ( $P = 0.009$ ). La CSS tras 10 años de seguimiento en el mismo grupo de pacientes con estadios III-IV fue del 68.8 y del 30.5% para aquellos con expresión negativa-débilmente positiva de MVP y moderada-fuertemente positiva ( $P = 0.010$ ). No observamos ninguna influencia estadísticamente significativa de BCL-2 o Ki67 ( $P = 0.503$  y  $P = 0.320$ ). Como ya se ha comentado en

capítulo anterior, la combinación de IGF-1R y MVP en este subgrupo de pacientes, fue un factor predictivo para la supervivencia causa-específica ( $P = 0.002$ ) (Figura 2A).

**Tabla 3.** Factores pronósticos de supervivencia causa-específica en la serie completa, en el subgrupo de pacientes con estadios avanzados de la enfermedad (III-IV), con expresión de Ki67 baja (segmentado por la mediana) o con expresión negativa de BCL-2

	<b>Serie completa</b>	<b>Estadios III-IV</b>	<b>Bajo Ki67</b>	<b>BCL-2 Negativo</b>
<b>Edad</b>	$P = 0.885$	$P = 0.866$	$P = 0.671$	$P = 0.927$
<b>Sexo</b>	$P = 0.505$	$P = 0.485$	$P = 0.507$	$P = 0.476$
<b>Estadio (I-II vs. III-IV)</b>	$P < 0.0001^a$	–	$P < 0.0001^f$	$P < 0.0001^g$
<b>Grado</b>	$P = 0.039^b$	$P = 0.011^c$	$P = 0.008$	$P = 0.148$
<b>Márgenes quirúrgicos</b>	$P = 0.002$	$P = 0.001$	$P = 0.004$	$P = 0.003$
<b>Ki67</b>	$P = 0.385$	$P = 0.320$	–	$P = 0.999$
<b>MVP</b>	$P = 0.075$	$P = 0.010^d$	$P = 0.265$	$P = 0.053$
<b>IGF-1R</b>	$P = 0.290$	$P = 0.009$	$P = 0.303$	$P = 0.092$
<b>BCL-2</b>	$P = 0.888$	$P = 0.503$	$P = 0.134$	–
<b>MVP/IGF-1R</b>	$P = 0.112$	$P = 0.011^e$	$P = 0.081$	$P = 0.014^h$

La comparación entre grupos en análisis univariante se realizó por el test de log-rango. Los superíndices hacen referencias a análisis multivariantes mediante regresión de Cox: <sup>a</sup> $P = 0.001$ ,  $\text{Exp}(B) = 3.101$ , intervalo de confianza [IC] 95% (1.566-6.142); <sup>b</sup> $P = 0.039$ ,  $\text{Exp}(B) = 1.973$ , IC 95% (1.058-3.679); <sup>c</sup> $P = 0.005$ ,  $\text{Exp}(B) = 3.899$ , IC 95% (1.523-9.982); <sup>d</sup> $P = 0.017$ ,  $\text{Exp}(B) = 3.014$ , IC 95% (1.221-7.441); <sup>e</sup> $P = 0.024$ ,  $\text{Exp}(B) = 2.641$ , IC 95% (1.135-6.144); <sup>f</sup> $P = 0.001$ ,  $\text{Exp}(B) = 8.977$ , IC 95% (2.554-31.557); <sup>g</sup> $P = 0.001$ ,  $\text{Exp}(B) = 3.554$ , IC 95% (1.679-7.526); <sup>h</sup> $P = 0.032$ ,  $\text{Exp}(B) = 2.158$ , IC 95% (1.067-4.362).

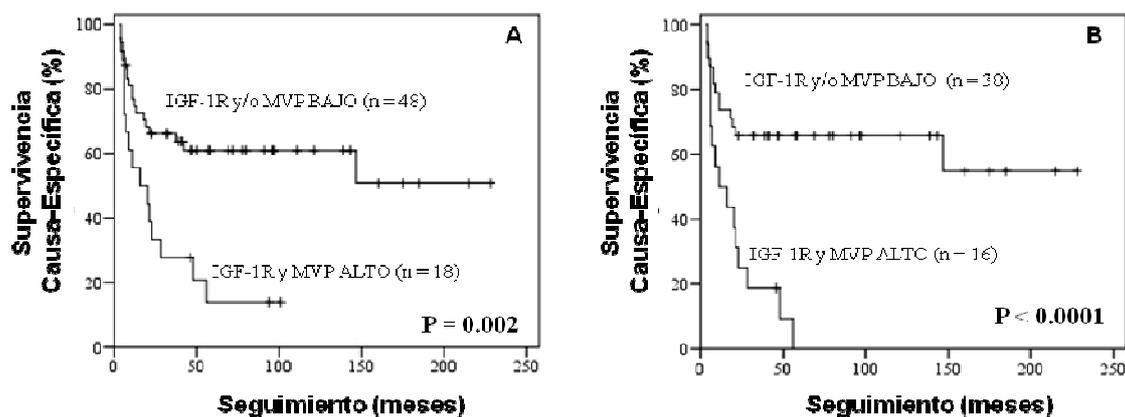
El principal objetivo de esta parte del trabajo era estudiar el papel de BCL-2 y de Ki67 en este contexto. Como se ha dicho, ninguna de estas dos oncoproteínas fue un factor predictivo de supervivencia. En el subgrupo de pacientes con expresión negativa de BCL-2, la sobreexpresión de IGF-1R/MVP fue un factor predictivo para CSS en análisis multivariante ( $P = 0.032$ ,  $\text{Exp}(B) = 2.158$ , IC95% (1.067-4.362)) (Tabla 3). Cuando el grupo de pacientes fue segregado según la mediana de expresión de Ki67, IGF-1R/MVP perdió la significación estadística.

**Tabla 4.** Análisis multivariante de la supervivencia causa-específica (regresión de Cox) en el subgrupo de pacientes que presentaban estadios tumorales avanzados (III-IV) y expresión negativa de BCL-2 (n = 54)

Variable	Riesgo Relativo	IC95%	P
<b>Edad*</b>	0.967	0.930–1.004	0.079
<b>Sexo</b>			
Hombre	1	–	
Mujer	0.342	0.085–1.376	0.131
<b>Grado</b>			
I-II	1	–	
III	2.620	0.946–7.254	0.064
<b>Márgenes quirúrgicos</b>			
Afectados	1	–	
No afectados	0.476	0.209–1.085	0.077
<b>IGF-1R/MVP</b>			
Otras combinaciones	1	–	
Ambas sobreexpresadas	4.738	1.967–21.414	0.001

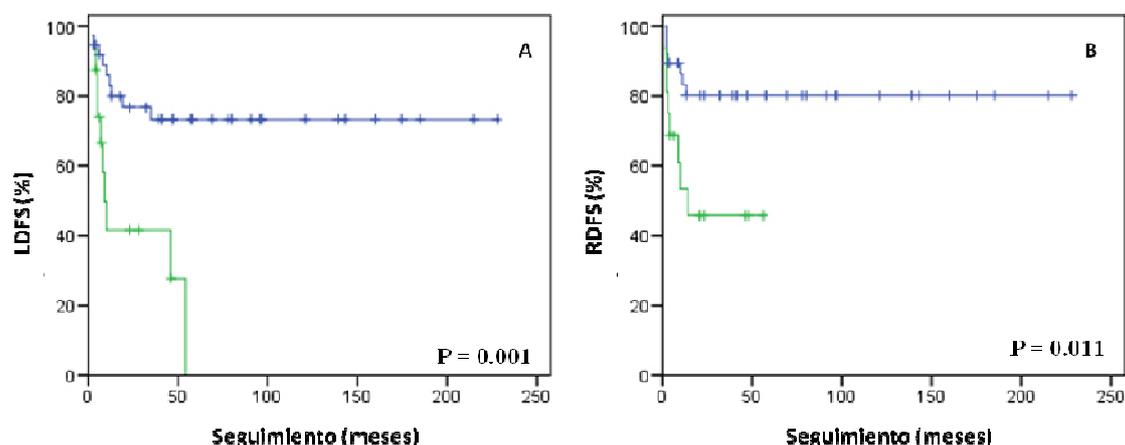
\* La edad se incluyó en el análisis como una variable continua

Por último, y dado el papel que BCL-2 parece tener en relación a MVP e IGF-1R, se evaluó el papel de estas dos oncoproteínas en el subgrupo de 54 pacientes con estadios avanzados de la enfermedad que además presentaban tinción negativa de BCL-2. Así, tras 10 años de seguimiento, la CSS para aquellos pacientes con tinción negativa-débilmente positiva de IGF1R y/o MVP fue del 65.8%, comparado con el 0% de supervivencia observado en el grupo de pacientes con expresión moderada-fuertemente positiva de ambas oncoproteínas (Figura 2B). Así, todos aquellos pacientes con estadios avanzados de la enfermedad, expresión negativa de BCL-2 y sobreexpresión conjunta de IGF-1R/MVP morían en menos de 5 años ( $P < 0.0001$ ). En análisis multivariante en este interesante grupo de 54 pacientes, la combinación de IGF-1R/MVP fue el único factor predictivo de CSS ( $P = 0.001$ ,  $\text{Exp}(B) = 4.738$ ,  $\text{IC95\%}$  (1.967-21.414)) (Tabla 4).



**Figura 2.** Análisis de Kaplan-Meier de la supervivencia causa-específica, estratificada según la expresión de IGF-1R/MVP en el subgrupo de pacientes con estadios avanzados de la enfermedad (III-IV) (A), y en el subgrupo de pacientes en estadios III-IV y expresión negativa de BCL-2 (B). Se incluyó el número de pacientes de cada subgrupo. Se utilizó el test de log-rank para determinar diferencias estadísticamente significativas.

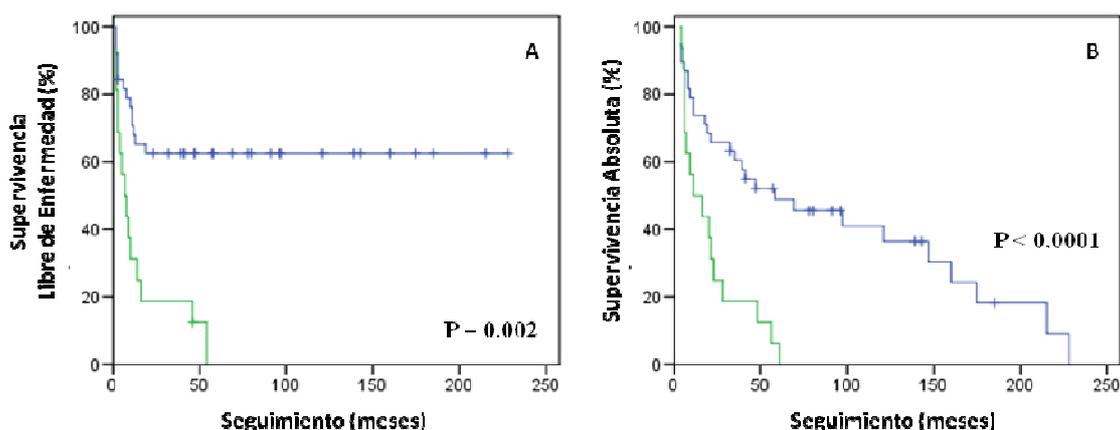
De la misma manera, todos aquellos pacientes con estadios avanzados de la enfermedad, expresión negativa de BCL-2 y sobreexpresión conjunta de IGF-1R/MVP sufrían recidiva local (LDFS) en menos de 5 años (Figura 3A) ( $P = 0.001$ ).



**Figura 3.** Análisis de Kaplan-Meier de la supervivencia libre de recaída local (LDFS) (A) y supervivencia libre de recaída regional (RDFS) (B) estratificada según la expresión de IGF-1R/MVP (-, IGF-1R y/o MVP con baja expresión; +, IGF-1R y MVP sobreexpresadas) en el subgrupo de pacientes en estadios III-IV y expresión negativa de BCL-2. Se utilizó el test de log-rank para determinar diferencias estadísticamente significativas.

Respecto a la supervivencia libre de recaída regional (RDFS), aquellos pacientes con estadios avanzados de la enfermedad, expresión negativa de BCL-2 y sobreexpresión conjunta de IGF-1R/MVP presentaron una menor supervivencia libre de recidiva regional (Figura 3B) ( $P = 0.011$ ).

Se observó que todos aquellos pacientes con estadios avanzados de la enfermedad, expresión negativa de BCL-2 y sobreexpresión conjunta de IGF-1R/MVP recaían de la enfermedad (DFS) en menos de 5 años (Figura 4A) ( $P = 0.002$ ).



**Figura 4.** Análisis de Kaplan-Meier de la supervivencia libre de enfermedad (A) y supervivencia absoluta (B) estratificada según la expresión de IGF-1R/MVP (—, IGF-1R y/o MVP con baja expresión; —, IGF-1R y MVP sobreexpresadas) en el subgrupo de pacientes en estadios III-IV y expresión negativa de BCL-2. Se utilizó el test de log-rank para determinar diferencias estadísticamente significativas.

Tras 10 años de seguimiento, la OS para aquellos pacientes con tinción negativa-débilmente positiva de IGF1R y/o MVP fue del 41.0%, comparado con el 0% de supervivencia observado en el grupo de pacientes con expresión moderada-fuertemente positiva de ambas oncoproteínas (Figura 4B). Así, todos aquellos pacientes con estadios avanzados de la enfermedad, expresión negativa de BCL-2 y sobreexpresión conjunta de IGF-1R/MVP morían en menos de 5 años ( $P < 0.0001$ ).

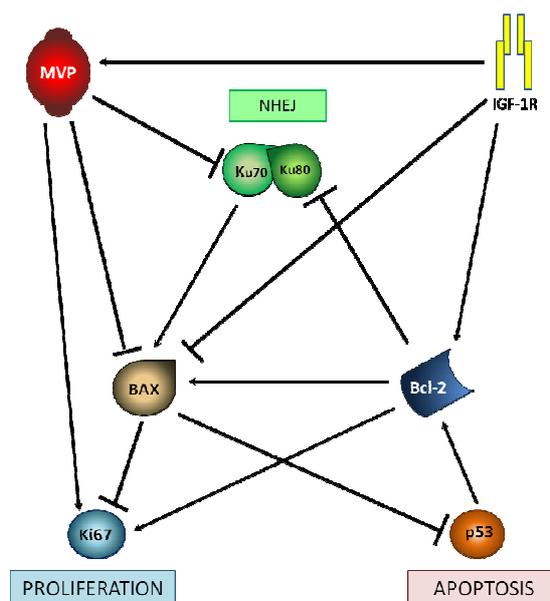
La expresión de Ki67 no mejoraba el poder predictivo de MVP e IGF-1R, posiblemente debido al limitado número de pacientes con expresión combinada de todas las variables.

## DISCUSIÓN

Los avances realizados en la comprensión de los mecanismos moleculares tras el carcinoma epidermoide de cavidad oral, han llevado a un aumento en el número de biomarcadores que podrían ser usados para predecir el comportamiento de la enfermedad. El valor predictivo de IGF-1R en este tipo de tumores ha sido descrito recientemente (ver Capítulo IV de esta Tesis Doctoral). Así mismo, la relación de IGF-1R y MVP ha sido también descrita en cáncer de cavidad oral (ver Capítulo V de esta Tesis Doctoral). La relación entre ambas oncoproteínas se había observado previamente en pacientes con cáncer de cérvix (Lloret et al. 2008), lo que sugiere la necesidad de la expresión de ambas moléculas para conferir quimio-radio resistencia.

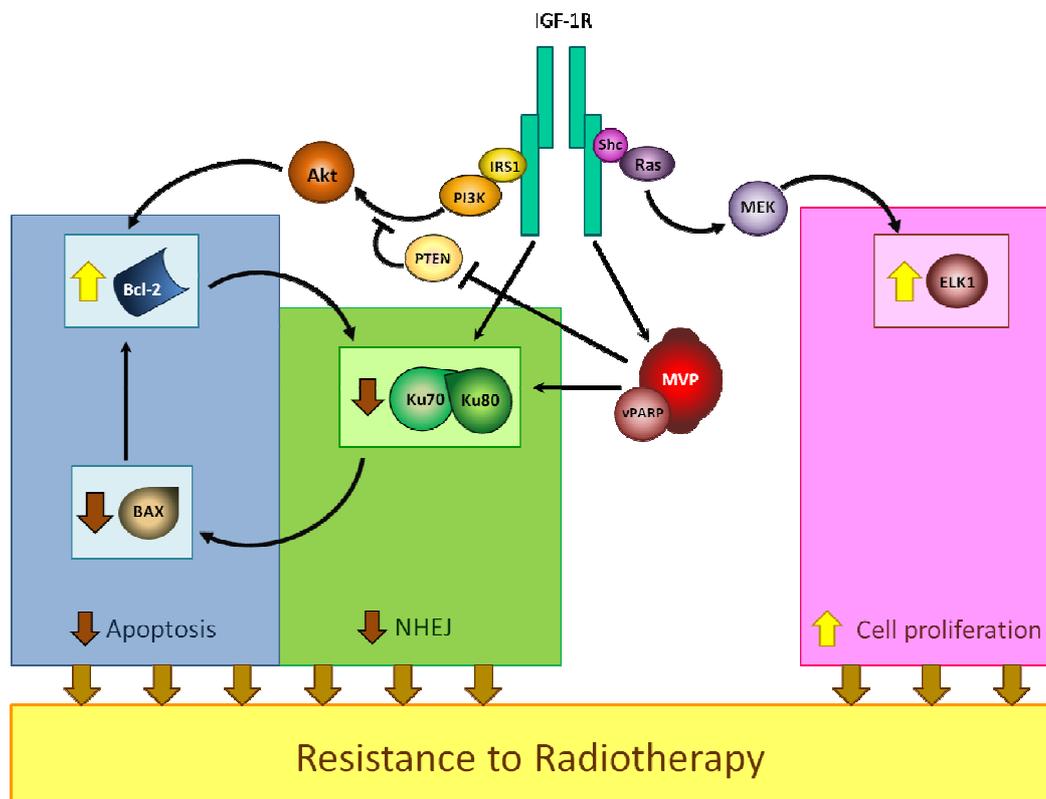
Tal y como se ha descrito en capítulos anteriores, el estadio tumoral y el grado histológico fueron los principales factores predictivos de supervivencia causa-específica. La sobreexpresión de IGF-1R y MVP fue un factor predictivo de CSS entre aquellos pacientes con estadios avanzados de la enfermedad (III-IV), tal y como se ha descrito previamente, tanto en análisis univariante como multivariante. Es de resaltar el hecho de que los peores ratios de supervivencia se observaron en un subgrupo de pacientes que además de sufrir estadios avanzados de la enfermedad y sobreexpresión de IGF-1R/MVP, presentaban tinción negativa de BCL-2, tanto en análisis univariante como multivariante. Así, todos aquellos pacientes con esta combinación de variables clínicas y moleculares morían antes de los 5 años. Estos resultados sugieren una compleja interacción entre las tres oncoproteínas, interrelacionadas de alguna manera en la regulación de la apoptosis, la supervivencia celular y la resistencia a drogas. Este análisis combinado ha permitido identificar un subgrupo de pacientes que morían debido a la enfermedad, con independencia de otros factores pronósticos clásicos. La expresión negativa de BCL-2 es considerada un factor de buen pronóstico en el carcinoma de cabeza y cuello (Lo Muzio et al. 2005; Michaud et al. 2009; Ritta et al. 2009). Aunque hay estudios que han reportado resultados contradictorios (Homma et al. 1999; Wilson et al. 2001; Buffa et al. 2004). Los mecanismos moleculares detrás de la asociación observada entre IGF-1R, MVP y BCL-2 deben ser complicados y no están completamente dilucidados. Tanto MVP como IGF-1R incrementan la proliferación celular a través de la activación de Src (Kim et al. 2006), PTEN (Minaguchi et al. 2006) y ERK (Xiang et al. 2006), y la inhibición de la apoptosis a través del eje ATM COP1/p53 (Dornan et al. 2006), lo que resulta en un incremento de la resistencia celular a agentes dañinos para el ADN.

Se ha reportado previamente una asociación directa entre la expresión de IGF-1R y BAX, así como una asociación inversa entre IGF-1R y BCL-2, lo que convierte a IGF-1R en un importante modulador de la apoptosis (Lloret et al. 2009). De la misma forma, se ha observado una asociación directa entre MVP y BAX, y entre MVP y Ki67 (Lloret et al. 2009). Por el contrario, MVP y Ku70/80 (una proteína clave en la regulación de la reparación no homóloga al ADN) aparecen inversamente relacionados, lo que convierte a MVP en un importante modulador de la apoptosis y la proliferación celular. Aún así, se debe dilucidar si los mecanismos detrás de estas observaciones están relacionados con el incremento de la proliferación y la inhibición de la apoptosis mediada por las vías PI3K/Akt o Erk/MAPK; o por la reparación de los mecanismos de reparación no homóloga a través de la inhibición de Ku70/80. Esta última suposición se torna relevante desde el momento en que se observa que Ku70/80 es un potente regulador de la apoptosis a través de su interacción con BAX y BCL-2 (Amsel et al. 2008; Wang et al. 2008; Lloret et al. 2009) (Figura 5). Con todo, la inestabilidad genética debida a unos mecanismos de reparación de roturas dobles de cadena de ADN defectuosos causado por una represión de Ku70/80, se continúa con un aumento de la progresión tumoral debida a una inhibición de la apoptosis y a un incremento de la proliferación. Los resultados presentados a lo largo de esta Tesis Doctoral sugieren que IGF-1R y MVP podrían tener un importante papel en este complejo escenario tumoral, condicionando la respuesta a la radioterapia y en última instancia la supervivencia de los pacientes (Figura 6).



**Figura 5.** Esquema que representa la inter-relación de las principales oncoproteínas estudiadas.

No obstante, puede haber otros factores involucrados. La hipoxia tumoral es una situación frecuente en muchos tipos de cánceres que contribuye a la progresión local y sistémica de los tumores, comprometiendo en ocasiones la eficacia de la quimioterapia y de la radioterapia (Moulder et al. 1987; Huang et al. 2007). La hipoxia lleva a condiciones que causan un mayor nivel de daño espontáneo al ADN y a una inhibición de los procesos de reparación de esta molécula. Favorece el incremento de la angiogénesis y aumenta la expresión de p53 alterada, lo que promueve la progresión tumoral (Wood 1996; Lara et al. 2008). De forma interesante, se ha reportado una asociación entre la expresión de MVP y la hipoxia (Lara et al. 2009). Así, aquellos tumores con hipoxia severa (<2.5 mmHg) presentaban sobreexpresión de MVP. Esta observación fue realizada en 43 pacientes con cáncer de cérvix recientemente. Este hallazgo sugiere que la hipoxia no solo provoca un incremento de la inestabilidad genómica y un favorecimiento de las propiedades oncogénicas y de metastatización de los tumores, sino que a través de su asociación con MVP podría mediar los fenómenos de resistencia a radioterapia y peor pronóstico clínico observado en este tipo de pacientes.



**Figura 6.** Esquema que representa las nuevas vías moleculares, mediadas por IGF-1R y MVP, que llevan a la aparición de fenómenos de resistencia a radioterapia y, en última instancia, menor supervivencia de los pacientes.

En resumen, se reporta el valor predictivo de la expresión de IGF-1R y de MVP en un escenario celular muy complejo influenciado por diferentes parámetros clínicos (principalmente el estadio tumoral) y moleculares (fundamentalmente la expresión de BCL-2). Aunque la asociación de estas moléculas con Ku70/80, ATM o la vía MAPK surge como una posible explicación a los resultados observados, otros factores como la hipoxia deberían ser tenidos en cuenta. Con todo, los análisis combinados de la expresión de estas oncoproteínas podrían ser relevantes en la predicción de la supervivencia de los pacientes con carcinoma epidermoide de cavidad oral, siendo capaces de detectar un grupo de pacientes que fallecen en menos de 5 años con independencia de otros factores predictivos clásicos (como el grado histológico). No obstante, estos hallazgos deben ser confirmados en series más grandes de pacientes.



## **CAPÍTULO VII**

## **CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

1. El estadio tumoral, el grado de diferenciación y la presencia de márgenes afectos son los principales factores pronóstico clínicos en nuestra serie de pacientes.
2. La expresión de IGF-1R es un factor pronóstico de supervivencia en pacientes con carcinoma epidermoide de cavidad oral. Así, aquellos pacientes con baja expresión de la oncoproteína presentan supervivencias mayores, aún en estadios avanzados de la enfermedad.
3. La expresión de MVP es un factor pronóstico de supervivencia en estos pacientes. La expresión de MVP e IGF-1R aparece positivamente correlacionada, y determinan igualmente el pronóstico de la enfermedad, especialmente en pacientes con estadios avanzados.
4. La expresión de BCL-2 y la proliferación celular influyen en el pronóstico de los pacientes con carcinoma epidermoide de cavidad oral. La sobreexpresión de IGF-1R y MVP, en pacientes con estadios avanzados de la enfermedad y tinción negativa de BCL-2, condiciona la supervivencia de este tipo de pacientes.



## **CAPÍTULO VIII**

## **BIBLIOGRAFÍA**



## BIBLIOGRAFÍA

- Abbondanza C, Rossi V, Roscigno A, Gallo L, Belsito A, Piluso G, Medici N, Nigro V, Molinari AM, Moncharmont B and Puca GA (1998). "Interaction of vault particles with estrogen receptor in the MCF-7 breast cancer cell." J Cell Biol **141**(6): 1301-10.
- Adami H-O, Hunter DJ and Trichopoulos D (2008). Textbook of cancer epidemiology. New York [etc.], Oxford University Press.
- Adams TE, Epa VC, Garrett TP and Ward CW (2000). "Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor." Cell Mol Life Sci **57**(7): 1050-93.
- Agra IM, Carvalho AL, Pinto CA, Martins EP, Filho JG, Soares FA and Kowalski LP (2008). "Biological markers and prognosis in recurrent oral cancer after salvage surgery." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **134**(7): 743-9.
- Ahlen J, Wejde J, Brosjo O, von Rosen A, Weng WH, Girnita L, Larsson O and Larsson C (2005). "Insulin-like growth factor type 1 receptor expression correlates to good prognosis in highly malignant soft tissue sarcoma." Clin Cancer Res **11**(1): 206-16.
- Al-Rajhi N, Khafaga Y, El-Husseiny J, Saleem M, Mourad W, Al-Otieschan A and Al-Amro A (2000). "Early stage carcinoma of oral tongue: prognostic factors for local control and survival." Oral Oncol **36**(6): 508-14.
- Allen GW, Saba C, Armstrong EA, Huang SM, Benavente S, Ludwig DL, Hicklin DJ and Harari PM (2007). "Insulin-like growth factor-I receptor signaling blockade combined with radiation." Cancer Res **67**(3): 1155-62.
- Allison P, Locker D and Feine JS (1998). "The role of diagnostic delays in the prognosis of oral cancer: a review of the literature." Oral Oncol **34**(3): 161-70.
- American Cancer S, American College of S, American Society of Clinical O, Centers for Disease C, Prevention, International Union Against C and American Joint Committee on Cancer AJCC cancer staging manual. New York [etc.], Springer.
- Amsel AD, Rathaus M, Kronman N and Cohen HY (2008). "Regulation of the proapoptotic factor Bax by Ku70-dependent deubiquitylation." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(13): 5117-22.
- 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 and Suurmeijer AJ (1999). "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." Clin Cancer Res **5**(10): 2798-805.
- Ashcroft M and Vousden KH (1999). "Regulation of p53 stability." Oncogene **18**(53): 7637-43.
- Baak JP (1990). "Mitosis counting in tumors." Hum Pathol **21**(7): 683-5.
- Barker CA and Powell SN "Enhancing radiotherapy through a greater understanding of homologous recombination." Semin Radiat Oncol **20**(4): 267-273 e3.
- Bartucci M, Morelli C, Mauro L, Ando S and Surmacz E (2001). "Differential insulin-like growth factor I receptor signaling and function in estrogen receptor (ER)-positive MCF-7 and ER-negative MDA-MB-231 breast cancer cells." Cancer Res **61**(18): 6747-54.
- Baserga R (1995). "The insulin-like growth factor I receptor: a key to tumor growth?" Cancer Res **55**(2): 249-52.
- Baserga R, Peruzzi F and Reiss K (2003). "The IGF-1 receptor in cancer biology." Int J Cancer **107**(6): 873-7.
- Beato M, Chalepakis G, Schauer M and Slater EP (1989). "DNA regulatory elements for steroid hormones." J Steroid Biochem **32**(5): 737-47.

- Begg AC, McNally NJ, Shrieve DC and Karcher H (1985). "A method to measure the duration of DNA synthesis and the potential doubling time from a single sample." *Cytometry* **6**(6): 620-6.
- Belka C and Budach W (2002). "Anti-apoptotic Bcl-2 proteins: structure, function and relevance for radiation biology." *Int J Radiat Biol* **78**(8): 643-58.
- Bentzen SM and Thames HD (1991). "Clinical evidence for tumor clonogen regeneration: interpretations of the data." *Radiother Oncol* **22**(3): 161-6.
- Berger W, Elbling L and Micksche M (2000). "Expression of the major vault protein LRP in human non-small-cell lung cancer cells: activation by short-term exposure to antineoplastic drugs." *Int J Cancer* **88**(2): 293-300.
- Bernier J, Domenge C, Ozsahin M, Matuszewska K, Lefebvre JL, Greiner RH, Giralt J, Maingon P, Rolland F, Bolla M, Cognetti F, Bourhis J, Kirkpatrick A and van Glabbeke M (2004). "Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer." *N Engl J Med* **350**(19): 1945-52.
- Berrino F (2003). "The EURO CARE Study: strengths, limitations and perspectives of population-based, comparative survival studies." *Ann Oncol* **14** Suppl 5: v9-13.
- Berrino F, De Angelis R, Sant M, Rosso S, Bielska-Lasota M, Coebergh JW and Santaquilani M (2007). "Survival for eight major cancers and all cancers combined for European adults diagnosed in 1995-99: results of the EURO CARE-4 study." *Lancet Oncol* **8**(9): 773-83.
- Bettendorf O, Piffko J and Bankfalvi A (2004). "Prognostic and predictive factors in oral squamous cell cancer: important tools for planning individual therapy?" *Oral Oncol* **40**(2): 110-9.
- Binnie WH, Rankin KV and Mackenzie IC (1983). "Etiology of oral squamous cell carcinoma." *J Oral Pathol* **12**(1): 11-29.
- Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A and Fraumeni JF, Jr. (1988). "Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer." *Cancer Res* **48**(11): 3282-7.
- Boffetta P, Aagnes B, Weiderpass E and Andersen A (2005). "Smokeless tobacco use and risk of cancer of the pancreas and other organs." *Int J Cancer* **114**(6): 992-5.
- Boffetta P, La Vecchia C, Levi F and Lucchini F (1993). "Mortality patterns and trends for lung cancer and other tobacco-related cancers in the Americas, 1955-1989." *Int J Epidemiol* **22**(3): 377-84.
- Bolger BS, Symonds RP, Stanton PD, MacLean AB, Burnett R, Kelly P and Cooke TG (1996). "Prediction of radiotherapy response of cervical carcinoma through measurement of proliferation rate." *Br J Cancer* **74**(8): 1223-6.
- Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, Jones CU, Sur R, Raben D, Jassem J, Ove R, Kies MS, Baselga J, Youssoufian H, Amellal N, Rowinsky EK and Ang KK (2006). "Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck." *N Engl J Med* **354**(6): 567-78.
- Bonneterre J, Peyrat JP, Beuscart R and Demaille A (1990). "Prognostic significance of insulin-like growth factor 1 receptors in human breast cancer." *Cancer Res* **50**(21): 6931-5.
- Bouchard VJ, Rouleau M and Poirier GG (2003). "PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage." *Exp Hematol* **31**(6): 446-54.
- Bourhis J, Overgaard J, Audry H, Ang KK, Saunders M, Bernier J, Horiot JC, Le Maitre A, Pajak TF, Poulsen MG, O'Sullivan B, Dobrowsky W, Hliniak A, Skladowski K, Hay JH, Pinto LH, Fallai C, Fu KK, Sylvester R and Pignon JP (2006). "Hyperfractionated or accelerated radiotherapy in head and neck cancer: a meta-analysis." *Lancet* **368**(9538): 843-54.

- Brustugun OT, Fladmark KE, Doskeland SO, Orrenius S and Zhivotovsky B (1998). "Apoptosis induced by microinjection of cytochrome c is caspase-dependent and is inhibited by Bcl-2." Cell Death Differ **5**(8): 660-8.
- Budach W, Hehr T, Budach V, Belka C and Dietz K (2006). "A meta-analysis of hyperfractionated and accelerated radiotherapy and combined chemotherapy and radiotherapy regimens in unresected locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck." BMC Cancer **6**: 28.
- Buffa FM, Bentzen SM, Daley FM, Dische S, Saunders MI, Richman PI and Wilson GD (2004). "Molecular marker profiles predict locoregional control of head and neck squamous cell carcinoma in a randomized trial of continuous hyperfractionated accelerated radiotherapy." Clin Cancer Res **10**(11): 3745-54.
- Byers RM, El-Naggar AK, Lee YY, Rao B, Fornage B, Terry NH, Sample D, Hankins P, Smith TL and Wolf PJ (1998). "Can we detect or predict the presence of occult nodal metastases in patients with squamous carcinoma of the oral tongue?" Head Neck **20**(2): 138-44.
- Cappuzzo F, Tallini G, Finocchiaro G, Wilson RS, Ligorio C, Giordano L, Toschi L, Incarbone M, Cavina R, Terracciano L, Roncalli M, Alloisio M, Varella-Garcia M, Franklin WA and Santoro A (2010). "Insulin-like growth factor receptor 1 (IGF1R) expression and survival in surgically resected non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients." Ann Oncol **21**(3): 562-7.
- Carmeliet P (2003). "Angiogenesis in health and disease." Nat Med **9**(6): 653-60.
- Carvalho AL, Magrin J and Kowalski LP (2003). "Sites of recurrence in oral and oropharyngeal cancers according to the treatment approach." Oral Dis **9**(3): 112-8.
- Carvalho AL, Singh B, Spiro RH, Kowalski LP and Shah JP (2004). "Cancer of the oral cavity: a comparison between institutions in a developing and a developed nation." Head Neck **26**(1): 31-8.
- Castellsague X, Quintana MJ, Martinez MC, Nieto A, Sanchez MJ, Juan A, Monner A, Carrera M, Agudo A, Quer M, Munoz N, Herrero R, Franceschi S and Bosch FX (2004). "The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis." Int J Cancer **108**(5): 741-9.
- Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J and Gerdes J (1992). "Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections." J Pathol **168**(4): 357-63.
- Conrad M, Bubb VJ and Schlegel R (1993). "The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein." J Virol **67**(10): 6170-8.
- Coppola D, Ferber A, Miura M, Sell C, D'Ambrosio C, Rubin R and Baserga R (1994). "A functional insulin-like growth factor I receptor is required for the mitogenic and transforming activities of the epidermal growth factor receptor." Mol Cell Biol **14**(7): 4588-95.
- Corvo R, Sanguineti G, Scala M, Garaventa G, Santelli A, Barbieri M and Vitale V (1994). "Primary site as predictive factor of local control in advanced head and neck tumors treated by concomitant boost accelerated radiotherapy." Tumori **80**(2): 135-8.
- Cosaceanu D, Budiu RA, Carapancea M, Castro J, Lewensohn R and Dricu A (2007). "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." Oncogene **26**(17): 2423-34.
- Coutinho-Camillo CM, Lourenco SV, Nishimoto IN, Kowalski LP and Soares FA (2010). "Expression of Bcl-2 family proteins and association with clinicopathological characteristics of oral squamous cell carcinoma." Histopathology **57**(2): 304-16.

- Couture C, Raybaud-Diogene H, Tetu B, Bairati I, Murry D, Allard J and Fortin A (2002). "p53 and Ki-67 as markers of radioresistance in head and neck carcinoma." Cancer **94**(3): 713-22.
- Cuddihy AR and Bristow RG (2004). "The p53 protein family and radiation sensitivity: Yes or no?" Cancer Metastasis Rev **23**(3-4): 237-57.
- Curado MP and Hashibe M (2009). "Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer." Curr Opin Oncol **21**(3): 194-200.
- Chakravarti A, Loeffler JS and Dyson NJ (2002). "Insulin-like growth factor receptor I mediates resistance to anti-epidermal growth factor receptor therapy in primary human glioblastoma cells through continued activation of phosphoinositide 3-kinase signaling." Cancer Res **62**(1): 200-7.
- Chang HW, Roh JL, Jeong EJ, Lee SW, Kim SW, Choi SH, Park SK and Kim SY (2008). "Wnt signaling controls radiosensitivity via cyclooxygenase-2-mediated Ku expression in head and neck cancer." Int J Cancer **122**(1): 100-7.
- Chen HM, Yen-Ping Kuo M, Lin KH, Lin CY and Chiang CP (2003). "Expression of cyclin A is related to progression of oral squamous cell carcinoma in Taiwan." Oral Oncol **39**(5): 476-82.
- Chen MK, Yang SF, Lai JC, Yeh KT, Yang JS, Chen LS and Chen HC (2010). "Expression of bcl-2 correlates with poor prognosis and modulates migration of nasopharyngeal carcinoma cells." Clin Chim Acta **411**(5-6): 400-5.
- Cheng SH, Lam W, Lee AS, Fung KP, Wu RS and Fong WF (2000). "Low-level doxorubicin resistance in benzo[a]pyrene-treated KB-3-1 cells is associated with increased LRP expression and altered subcellular drug distribution." Toxicol Appl Pharmacol **164**(2): 134-42.
- Chinnaiyan P, Allen GW and Harari PM (2006). "Radiation and new molecular agents, part II: targeting HDAC, HSP90, IGF-1R, PI3K, and Ras." Semin Radiat Oncol **16**(1): 59-64.
- Chitnis MM, Yuen JS, Protheroe AS, Pollak M and Macaulay VM (2008). "The type 1 insulin-like growth factor receptor pathway." Clin Cancer Res **14**(20): 6364-70.
- Choi SY and Kahyo H (1991). "Effect of cigarette smoking and alcohol consumption in the aetiology of cancer of the oral cavity, pharynx and larynx." Int J Epidemiol **20**(4): 878-85.
- Chugani DC, Rome LH and Kedersha NL (1993). "Evidence that vault ribonucleoprotein particles localize to the nuclear pore complex." J Cell Sci **106** ( Pt 1): 23-9.
- Dai M, Clifford GM, le Calvez F, Castellsague X, Snijders PJ, Pawlita M, Herrero R, Hainaut P and Franceschi S (2004). "Human papillomavirus type 16 and TP53 mutation in oral cancer: matched analysis of the IARC multicenter study." Cancer Res **64**(2): 468-71.
- Day GL, Blot WJ, Shore RE, McLaughlin JK, Austin DF, Greenberg RS, Liff JM, Preston-Martin S, Sarkar S, Schoenberg JB and et al. (1994). "Second cancers following oral and pharyngeal cancers: role of tobacco and alcohol." J Natl Cancer Inst **86**(2): 131-7.
- de Cassia Braga Ribeiro K, Kowalski LP and Latorre Mdo R (2003). "Perioperative complications, comorbidities, and survival in oral or oropharyngeal cancer." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **129**(2): 219-28.
- de Souza DL, de Camargo Cancela M, Perez MM and Curado MP (2011). "Trends in the incidence of oral cavity and oropharyngeal cancers in Spain." Head Neck.
- De Stefani E, Barrios E and Fierro L (1993). "Black (air-cured) and blond (flue-cured) tobacco and cancer risk. III: Oesophageal cancer." Eur J Cancer **29A**(5): 763-6.
- De Stefani E, Boffetta P, Oreggia F, Mendilaharsu M and Deneo-Pellegrini H (1998). "Smoking patterns and cancer of the oral cavity and pharynx: a case-control study in Uruguay." Oral Oncol **34**(5): 340-6.

- del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R and Nunez G (1997). "Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt." Science **278**(5338): 687-9.
- Deleyiannis FW, Thomas DB, Vaughan TL and Davis S (1996). "Alcoholism: independent predictor of survival in patients with head and neck cancer." J Natl Cancer Inst **88**(8): 542-9.
- Derenzini M, Sirri V, Trere D and Ochs RL (1995). "The quantity of nucleolar proteins nucleolin and protein B23 is related to cell doubling time in human cancer cells." Lab Invest **73**(4): 497-502.
- DeWolf WC and Gaston SM (2004). "The cell cycle and its relevance to the urologist." J Urol **171**(4): 1674-81.
- 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 and Izquierdo MA (2003). "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." J Urol **170**(4 Pt 1): 1383-7.
- Dijkema IM, Struikmans H, Dullens HF, Kal HB, van der Tweel I and Battermann JJ (2000). "Influence of p53 and bcl-2 on proliferative activity and treatment outcome in head and neck cancer patients." Oral Oncol **36**(1): 54-60.
- Dingemans AM, van Ark-Otte J, van der Valk P, Apolinario RM, Scheper RJ, Postmus PE and Giaccone G (1996). "Expression of the human major vault protein LRP in human lung cancer samples and normal lung tissues." Ann Oncol **7**(6): 625-30.
- Dong H, Bertler C, Schneider E and Ritter MA (1997). "Assessment of cell proliferation by AgNOR scores and Ki-67 labeling indices and a comparison with potential doubling times." Cytometry **28**(4): 280-8.
- Dornan D, Shimizu H, Mah A, Dudhela T, Eby M, O'Rourke K, Seshagiri S and Dixit VM (2006). "ATM engages autodegradation of the E3 ubiquitin ligase COP1 after DNA damage." Science **313**(5790): 1122-6.
- Durand RE (1997). "Tumor repopulation during radiotherapy: quantitation in two xenografted human tumors." Int J Radiat Oncol Biol Phys **39**(4): 803-8.
- Durand RE and Aquino-Parsons C (2004). "Predicting response to treatment in human cancers of the uterine cervix: sequential biopsies during external beam radiotherapy." Int J Radiat Oncol Biol Phys **58**(2): 555-60.
- Dziadziuszko R, Merrick DT, Witta SE, Mendoza AD, Szostakiewicz B, Szymanowska A, Rzyman W, Dziadziuszko K, Jassem J, Bunn PA, Jr., Varella-Garcia M and Hirsch FR (2010). "Insulin-like growth factor receptor 1 (IGF1R) gene copy number is associated with survival in operable non-small-cell lung cancer: a comparison between IGF1R fluorescent in situ hybridization, protein expression, and mRNA expression." J Clin Oncol **28**(13): 2174-80.
- Emre N, Raval-Fernandes S, Kickhoefer VA and Rome LH (2004). "Analysis of MVP and VPARP promoters indicates a role for chromatin remodeling in the regulation of MVP." Biochim Biophys Acta **1678**(1): 33-46.
- Esteve J, Benhamou E and Raymond L (1994). "Statistical methods in cancer research. Volume IV. Descriptive epidemiology." IARC Sci Publ(128): 1-302.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM (2010). "Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008." Int J Cancer **127**(12): 2893-917.
- Ferlito A, Rinaldo A, Robbins KT, Leemans CR, Shah JP, Shaha AR, Andersen PE, Kowalski LP, Pellitteri PK, Clayman GL, Rogers SN, Medina JE and Byers RM (2003). "Changing concepts in the surgical management of the cervical node metastasis." Oral Oncol **39**(5): 429-35.
- Fichtner I, Paal K, Borgmann A, Badiali L, Wurm R and Henze G (2003). "Chemo- and radiation sensitivity of xenografted acute lymphoblastic leukemias--correlation

- to the expression of multidrug resistance proteins." Anticancer Res **23**(3B): 2657-64.
- Filipits M, Jaeger U, Simonitsch I, Chizzali-Bonfadin C, Heinzl H and Pirker R (2000a). "Clinical relevance of the lung resistance protein in diffuse large B-cell lymphomas." Clin Cancer Res **6**(9): 3417-23.
- Filipits M, Stranzl T, Pohl G, Heinzl H, Jager U, Geissler K, Fonatsch C, Haas OA, Lechner K and Pirker R (2000b). "Drug resistance factors in acute myeloid leukemia: a comparative analysis." Leukemia **14**(1): 68-76.
- Fink SL and Cookson BT (2005). "Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells." Infect Immun **73**(4): 1907-16.
- Forastiere AA, Goepfert H, Maor M, Pajak TF, Weber R, Morrison W, Glisson B, Trotti A, Ridge JA, Chao C, Peters G, Lee DJ, Leaf A, Ensley J and Cooper J (2003). "Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer." N Engl J Med **349**(22): 2091-8.
- Fowler JF and Lindstrom MJ (1992). "Loss of local control with prolongation in radiotherapy." Int J Radiat Oncol Biol Phys **23**(2): 457-67.
- Franceschi S, Talamini R, Barra S, Baron AE, Negri E, Bidoli E, Serraino D and La Vecchia C (1990). "Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx, and esophagus in northern Italy." Cancer Res **50**(20): 6502-7.
- Franco EL, Kowalski LP, Oliveira BV, Curado MP, Pereira RN, Silva ME, Fava AS and Torloni H (1989). "Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study." Int J Cancer **43**(6): 992-1000.
- Friedrich RE, Hagel C and Bartel-Friedrich S "Insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) in primary and metastatic undifferentiated carcinoma of the head and neck: a possible target of immunotherapy." Anticancer Res **30**(5): 1641-3.
- Galand P and Degraef C (1989). "Cyclin/PCNA immunostaining as an alternative to tritiated thymidine pulse labelling for marking S phase cells in paraffin sections from animal and human tissues." Cell Tissue Kinet **22**(5): 383-92.
- Gall JG and Pardue ML (1969). "Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations." Proc Natl Acad Sci U S A **63**(2): 378-83.
- Gasparini G, Bevilacqua P, Bonoldi E, Testolin A, Galassi A, Verderio P, Boracchi P, Guglielmi RB and Pezzella F (1995). "Predictive and prognostic markers in a series of patients with head and neck squamous cell invasive carcinoma treated with concurrent chemoradiation therapy." Clin Cancer Res **1**(11): 1375-83.
- Genden EM, Ferlito A, Bradley PJ, Rinaldo A and Scully C (2003). "Neck disease and distant metastases." Oral Oncol **39**(3): 207-12.
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H and Stein H (1983). "Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation." Int J Cancer **31**(1): 13-20.
- Gilmore AP, Valentijn AJ, Wang P, Ranger AM, Bundred N, O'Hare MJ, Wakeling A, Korsmeyer SJ and Streuli CH (2002). "Activation of BAD by therapeutic inhibition of epidermal growth factor receptor and transactivation by insulin-like growth factor receptor." J Biol Chem **277**(31): 27643-50.
- Girard N, Teruya-Feldstein J, Payabyab EC, Riely GJ, Rusch VW, Kris MG and Zakowski MF (2010). "Insulin-like growth factor-1 receptor expression in thymic malignancies." J Thorac Oncol **5**(9): 1439-46.
- Goff BA, Paley PJ, Greer BE and Gown AM (2001). "Evaluation of chemoresistance markers in women with epithelial ovarian carcinoma." Gynecol Oncol **81**(1): 18-24.
- Gonzalez-Moles MA, Esteban F, Rodriguez-Archilla A, Ruiz-Avila I and Gonzalez-Moles S (2002). "Importance of tumour thickness measurement in prognosis of tongue cancer." Oral Oncol **38**(4): 394-7.
- González Barón M (1997). Oncología clínica : fundamentos y patología general. Madrid [etc.], McGraw-Hill Interamericana.

- Greenberg JS, El Naggar AK, Mo V, Roberts D and Myers JN (2003a). "Disparity in pathologic and clinical lymph node staging in oral tongue carcinoma. Implication for therapeutic decision making." *Cancer* **98**(3): 508-15.
- Greenberg JS, Fowler R, Gomez J, Mo V, Roberts D, El Naggar AK and Myers JN (2003b). "Extent of extracapsular spread: a critical prognosticator in oral tongue cancer." *Cancer* **97**(6): 1464-70.
- Greulich H, Chen TH, Feng W, Janne PA, Alvarez JV, Zappaterra M, Bulmer SE, Frank DA, Hahn WC, Sellers WR and Meyerson M (2005). "Oncogenic transformation by inhibitor-sensitive and -resistant EGFR mutants." *PLoS Med* **2**(11): e313.
- Gu Z and Matlashewski G (1995). "Effect of human papillomavirus type 16 oncogenes on MAP kinase activity." *J Virol* **69**(12): 8051-6.
- Hajjar KA and Krishnan S (1999). "Annexin II: a mediator of the plasmin/plasminogen activator system." *Trends Cardiovasc Med* **9**(5): 128-38.
- Hamill DR and Suprenant KA (1997). "Characterization of the sea urchin major vault protein: a possible role for vault ribonucleoprotein particles in nucleocytoplasmic transport." *Dev Biol* **190**(1): 117-28.
- Hannen EJ and Riediger D (2004). "The quantification of angiogenesis in relation to metastasis in oral cancer: a review." *Int J Oral Maxillofac Surg* **33**(1): 2-7.
- Harada T, Ogura S, Yamazaki K, Kinoshita I, Itoh T, Isobe H, Yamashiro K, Dosaka-Akita H and Nishimura M (2003). "Predictive value of expression of P53, Bcl-2 and lung resistance-related protein for response to chemotherapy in non-small cell lung cancers." *Cancer Sci* **94**(4): 394-9.
- Harrington L, McPhail T, Mar V, Zhou W, Oulton R, Bass MB, Arruda I and Robinson MO (1997). "A mammalian telomerase-associated protein." *Science* **275**(5302): 973-7.
- Harrison LB, Zelefsky MJ, Armstrong JG, Carper E, Gaynor JJ and Sessions RB (1994). "Performance status after treatment for squamous cell cancer of the base of tongue--a comparison of primary radiation therapy versus primary surgery." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **30**(4): 953-7.
- Harwood CA, Suretheran T, McGregor JM, Spink PJ, Leigh IM, Breuer J and Proby CM (2000). "Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in immunosuppressed and immunocompetent individuals." *J Med Virol* **61**(3): 289-97.
- Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianova E, Fernandez L, Wunsch-Filho V, Franceschi S, Hayes RB, Herrero R, Koifman S, La Vecchia C, Lazarus P, Levi F, Mates D, Matos E, Menezes A, Muscat J, Eluf-Neto J, Olshan AF, Rudnai P, Schwartz SM, Smith E, Sturgis EM, Szeszenia-Dabrowska N, Talamini R, Wei Q, Winn DM, Zaridze D, Zatonski W, Zhang ZF, Berthiller J and Boffetta P (2007). "Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium." *J Natl Cancer Inst* **99**(10): 777-89.
- Hecht SS and Hoffmann D (1988). "Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke." *Carcinogenesis* **9**(6): 875-84.
- Hecht SS, Rivenson A, Braley J, DiBello J, Adams JD and Hoffmann D (1986). "Induction of oral cavity tumors in F344 rats by tobacco-specific nitrosamines and snuff." *Cancer Res* **46**(8): 4162-6.
- Henriquez-Hernandez LA, Lloret M, Pinar B, Bordon E, Rey A, Lubrano A and Lara PC (2011). "BCL-2, in combination with MVP and IGF-1R expression, improves prediction of clinical outcome in complete response cervical carcinoma patients treated by radiochemotherapy." *Gynecol Oncol* **122**(3): 585-9.
- Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, Rajkumar T, Sridhar H, Rose B, Pintos J, Fernandez L, Idris A, Sanchez MJ, Nieto A, Talamini R, Tavani A, Bosch FX, Reidel U, Snijders PJ, Meijer CJ, Viscidi R, Munoz N and Franceschi S (2003). "Human papillomavirus and oral cancer: the

- International Agency for Research on Cancer multicenter study." J Natl Cancer Inst **95**(23): 1772-83.
- Herrmann C, Golkaramnay E, Inman E, Rome L and Volkandt W (1999). "Recombinant major vault protein is targeted to neuritic tips of PC12 cells." J Cell Biol **144**(6): 1163-72.
- Hirano S, Ito N, Takahashi S and Tamaya T (2004). "Clinical implications of insulin-like growth factors through the presence of their binding proteins and receptors expressed in gynecological cancers." Eur J Gynaecol Oncol **25**(2): 187-91.
- Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M and Korsmeyer SJ (1991). "BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(16): 6961-5.
- Hoehgegger H, Dejsuphong D, Fukushima T, Morrison C, Sonoda E, Schreiber V, Zhao GY, Saberi A, Masutani M, Adachi N, Koyama H, de Murcia G and Takeda S (2006). "Parp-1 protects homologous recombination from interference by Ku and Ligase IV in vertebrate cells." EMBO J **25**(6): 1305-14.
- Homma A, Furuta Y, Oridate N, Nakano Y, Kohashi G, Yagi K, Nagahashi T, Fukuda S, Inoue K and Inuyama Y (1999). "Prognostic significance of clinical parameters and biological markers in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck treated with concurrent chemoradiotherapy." Clin Cancer Res **5**(4): 801-6.
- Hong AM, Dobbins TA, Lee CS, Jones D, Harnett GB, Armstrong BK, Clark JR, Milross CG, Kim J, O'Brien CJ and Rose BR (2010). "Human papillomavirus predicts outcome in oropharyngeal cancer in patients treated primarily with surgery or radiation therapy." Br J Cancer **103**(10): 1510-7.
- Huang LE, Bindra RS, Glazer PM and Harris AL (2007). "Hypoxia-induced genetic instability--a calculated mechanism underlying tumor progression." J Mol Med **85**(2): 139-48.
- Humbert C, Santisteban MS, Usson Y and Robert-Nicoud M (1992). "Intranuclear collocation of newly replicated DNA and PCNA by simultaneous immunofluorescent labelling and confocal microscopy in MCF-7 cells." J Cell Sci **103** ( Pt 1): 97-103.
- Itoh S, Matsui K, Furuta I and Takano Y (2003). "Immunohistochemical study on overexpression of cyclooxygenase-2 in squamous cell carcinoma of the oral cavity: its importance as a prognostic predictor." Oral Oncol **39**(8): 829-35.
- Ivanchuk SM and Rutka JT (2004). "The cell cycle: accelerators, brakes, and checkpoints." Neurosurgery **54**(3): 692-9; discussion 699-700.
- Iwashita K, Ikeda R, Takeda Y, Sumizawa T, Furukawa T, Yamaguchi T, Akiyama S and Yamada K (2010). "Major vault protein forms complexes with hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and reduces HIF-1alpha level in ACHN human renal adenocarcinoma cells." Cancer Sci **101**(4): 920-6.
- Izquierdo MA, Scheffer GL, Flens MJ, Giaccone G, Broxterman HJ, Meijer CJ, van der Valk P and Scheper RJ (1996). "Broad distribution of the multidrug resistance-related vault lung resistance protein in normal human tissues and tumors." Am J Pathol **148**(3): 877-87.
- Izquierdo MA, van der Zee AG, Vermorken JB, van der Valk P, Belien JA, Giaccone G, Scheffer GL, Flens MJ, Pinedo HM, Kenemans P and et al. (1995). "Drug resistance-associated marker Lrp for prediction of response to chemotherapy and prognoses in advanced ovarian carcinoma." J Natl Cancer Inst **87**(16): 1230-7.
- Jacobson MD, Weil M and Raff MC (1997). "Programmed cell death in animal development." Cell **88**(3): 347-54.
- Kabat GC and Wynder EL (1989). "Type of alcoholic beverage and oral cancer." Int J Cancer **43**(2): 190-4.
- Kalinina T, Bockhorn M, Kaifi JT, Thielges S, Gungor C, Effenberger KE, Strelow A, Reichelt U, Sauter G, Pantel K, Izbicki JR and Yekebas EF (2010). "Insulin-like

- growth factor-1 receptor as a novel prognostic marker and its implication as a cotarget in the treatment of human adenocarcinoma of the esophagus." Int J Cancer **127**(8): 1931-40.
- Kannan K, Latha PN and Shanmugam G (1998). "Expression of bcl-2 oncoprotein in Indian oral squamous cell carcinomas." Oral Oncol **34**(5): 373-6.
- Kedersha NL, Heuser JE, Chugani DC and Rome LH (1991). "Vaults. III. Vault ribonucleoprotein particles open into flower-like structures with octagonal symmetry." J Cell Biol **112**(2): 225-35.
- Kedersha NL, Miquel MC, Bittner D and Rome LH (1990). "Vaults. II. Ribonucleoprotein structures are highly conserved among higher and lower eukaryotes." J Cell Biol **110**(4): 895-901.
- Kedersha NL and Rome LH (1986). "Isolation and characterization of a novel ribonucleoprotein particle: large structures contain a single species of small RNA." J Cell Biol **103**(3): 699-709.
- Kerr JF and Searle J (1972). "A suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal-cell carcinomas that contain numerous mitotic figures." J Pathol **107**(1): 41-4.
- Kickhoefer VA, Rajavel KS, Scheffer GL, Dalton WS, Scheper RJ and Rome LH (1998). "Vaults are up-regulated in multidrug-resistant cancer cell lines." J Biol Chem **273**(15): 8971-4.
- Kickhoefer VA, Searles RP, Kedersha NL, Garber ME, Johnson DL and Rome LH (1993). "Vault ribonucleoprotein particles from rat and bullfrog contain a related small RNA that is transcribed by RNA polymerase III." J Biol Chem **268**(11): 7868-73.
- Kickhoefer VA, Siva AC, Kedersha NL, Inman EM, Ruland C, Streuli M and Rome LH (1999a). "The 193-kD vault protein, VPARP, is a novel poly(ADP-ribose) polymerase." J Cell Biol **146**(5): 917-28.
- Kickhoefer VA, Stephen AG, Harrington L, Robinson MO and Rome LH (1999b). "Vaults and telomerase share a common subunit, TEP1." J Biol Chem **274**(46): 32712-7.
- Kim E, Lee S, Mian MF, Yun SU, Song M, Yi KS, Ryu SH and Suh PG (2006). "Crosstalk between Src and major vault protein in epidermal growth factor-dependent cell signalling." FEBS J **273**(4): 793-804.
- Kisseljov FL (2000). "Virus-associated human tumors: cervical carcinomas and papilloma viruses." Biochemistry (Mosc) **65**(1): 68-77.
- Kolomvos N, Skouteris CA, Papadogeorgakis N, Sklavounou A, Alexandridis C and Angelopoulos AP (2010). "Histopathologic study of the carotid sheath in patients with oral squamous cell carcinoma." J Oral Maxillofac Surg **68**(10): 2452-8.
- Kolli S, Zito CI, Mossink MH, Wiemer EA and Bennett AM (2004). "The major vault protein is a novel substrate for the tyrosine phosphatase SHP-2 and scaffold protein in epidermal growth factor signaling." J Biol Chem **279**(28): 29374-85.
- Kong LB, Siva AC, Kickhoefer VA, Rome LH and Stewart PL (2000). "RNA location and modeling of a WD40 repeat domain within the vault." RNA **6**(6): 890-900.
- Kong LB, Siva AC, Rome LH and Stewart PL (1999). "Structure of the vault, a ubiquitous cellular component." Structure **7**(4): 371-9.
- Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, Merry DE and Oltvai ZN (1993). "Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death." Semin Cancer Biol **4**(6): 327-32.
- Kosunen A, Ropponen K, Kellokoski J, Pukkila M, Virtaniemi J, Valtonen H, Kumpulainen E, Johansson R, Tammi R, Tammi M, Nuutinen J and Kosma VM (2004). "Reduced expression of hyaluronan is a strong indicator of poor survival in oral squamous cell carcinoma." Oral Oncol **40**(3): 257-63.
- Kropveld A, Slootweg PJ, Blankenstein MA, Terhaard CH and Hordijk GJ (1998). "Ki-67 and p53 in T2 laryngeal cancer." Laryngoscope **108**(10): 1548-52.

- Lara PC, Bordon E, Rey A, Moreno M, Lloret M and Henriquez-Hernandez LA (2011). "IGF-1R expression predicts clinical outcome in patients with locally advanced oral squamous cell carcinoma." Oral Oncol **47**(7): 615-9.
- Lara PC, Lloret M, Clavo B, Apolinario RM, Bordon E, Rey A, Falcon O, Alonso AR and Belka C (2008). "Hypoxia downregulates Ku70/80 expression in cervical carcinoma tumors." Radiother Oncol **89**(2): 222-6.
- Lara PC, Lloret M, Clavo B, Apolinario RM, Henriquez-Hernandez LA, Bordon E, Fontes F and Rey A (2009). "Severe hypoxia induces chemo-resistance in clinical cervical tumors through MVP over-expression." Radiat Oncol **4**: 29.
- Lara PC, Rey A, Santana C, Afonso JL, Diaz JM, Gonzalez GJ and Apolinario R (1998). "The role of Ki67 proliferation assessment in predicting local control in bladder cancer patients treated by radical radiation therapy." Radiother Oncol **49**(2): 163-7.
- Larsen SR, Johansen J, Sorensen JA and Krogdahl A (2009). "The prognostic significance of histological features in oral squamous cell carcinoma." J Oral Pathol Med **38**(8): 657-62.
- Larsson O, Girnita A and Girnita L (2005). "Role of insulin-like growth factor 1 receptor signalling in cancer." Br J Cancer **92**(12): 2097-101.
- Leite IC and Koifman S (1998). "Survival analysis in a sample of oral cancer patients at a reference hospital in Rio de Janeiro, Brazil." Oral Oncol **34**(5): 347-52.
- Lera J, Lara PC, Perez S, Cabrera JL and Santana C (1998). "Tumor proliferation, p53 expression, and apoptosis in laryngeal carcinoma: relation to the results of radiotherapy." Cancer **83**(12): 2493-501.
- LeRoith D and Roberts CT, Jr. (2003). "The insulin-like growth factor system and cancer." Cancer Lett **195**(2): 127-37.
- Levine AJ, Momand J and Finlay CA (1991). "The p53 tumour suppressor gene." Nature **351**(6326): 453-6.
- Li JY, Volkhardt W, Dahlstrom A, Herrmann C, Blasi J, Das B and Zimmermann H (1999). "Axonal transport of ribonucleoprotein particles (vaults)." Neuroscience **91**(3): 1055-65.
- Linn SC, Pinedo HM, van Ark-Otte J, van der Valk P, Hoekman K, Honkoop AH, Vermorken JB and Giaccone G (1997). "Expression of drug resistance proteins in breast cancer, in relation to chemotherapy." Int J Cancer **71**(5): 787-95.
- Lo Muzio L, Falaschini S, Farina A, Rubini C, Pezzetti F, Campisi G, De Rosa G, Capogreco M and Carinci F (2005). "Bcl-2 as prognostic factor in head and neck squamous cell carcinoma." Oncol Res **15**(5): 249-55.
- Lo WL, Kao SY, Chi LY, Wong YK and Chang RC (2003). "Outcomes of oral squamous cell carcinoma in Taiwan after surgical therapy: factors affecting survival." J Oral Maxillofac Surg **61**(7): 751-8.
- Lockshin RA and Zakeri Z (2001). "Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(7): 545-50.
- Loro LL, Johannessen AC and Vintermyr OK (2002). "Decreased expression of bcl-2 in moderate and severe oral epithelia dysplasias." Oral Oncol **38**(7): 691-8.
- Ludovini V, Bellezza G, Pistola L, Bianconi F, Di Carlo L, Sidoni A, Semeraro A, Del Sordo R, Tofanetti FR, Mameli MG, Daddi G, Cavaliere A, Tonato M and Crino L (2009). "High coexpression of both insulin-like growth factor receptor-1 (IGFR-1) and epidermal growth factor receptor (EGFR) is associated with shorter disease-free survival in resected non-small-cell lung cancer patients." Ann Oncol **20**(5): 842-9.
- Lloret M, Lara PC, Bordon E, Fontes F, Rey A, Pinar B and Falcon O (2009). "Major vault protein may affect nonhomologous end-joining repair and apoptosis through Ku70/80 and bax downregulation in cervical carcinoma tumors." Int J Radiat Oncol Biol Phys **73**(4): 976-9.

- Lloret M, Lara PC, Bordon E, Pinar B, Rey A, Falcon O, Molano F and Hernandez MA (2007). "IGF-1R expression in localized cervical carcinoma patients treated by radiochemotherapy." *Gynecol Oncol* **106**(1): 8-11.
- Lloret M, Lara PC, Bordon E, Rey A, Falcon O, Apolinario RM, Clavo B and Ruiz A (2008). "MVP expression is related to IGF1-R in cervical carcinoma patients treated by radiochemotherapy." *Gynecol Oncol* **110**(3): 304-7.
- Macaulay VM, Salisbury AJ, Bohula EA, Playford MP, Smorodinsky NI and Shiloh Y (2001). "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." *Oncogene* **20**(30): 4029-40.
- Majno G and Joris I (1995). "Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death." *Am J Pathol* **146**(1): 3-15.
- Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jurgensmeier JM, Susin SA, Vieira HL, Prevost MC, Xie Z, Matsuyama S, Reed JC and Kroemer G (1998). "Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis." *Science* **281**(5385): 2027-31.
- Masamha CP and Benbrook DM (2009). "Cyclin D1 degradation is sufficient to induce G1 cell cycle arrest despite constitutive expression of cyclin E2 in ovarian cancer cells." *Cancer Res* **69**(16): 6565-72.
- Mathews MB, Bernstein RM, Franza BR, Jr. and Garrels JI (1984). "Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin." *Nature* **309**(5966): 374-6.
- Mattern J and Volm M (1993). "Multiple pathway drug-resistance (review)." *Int J Oncol* **2**(4): 557-61.
- May P and May E (1999). "Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein." *Oncogene* **18**(53): 7621-36.
- Meijer GA, Schroeijers AB, Flens MJ, Meuwissen SG, van der Valk P, Baak JP and Scheper RJ (1999). "Increased expression of multidrug resistance related proteins Pgp, MRP1, and LRP/MVP occurs early in colorectal carcinogenesis." *J Clin Pathol* **52**(6): 450-4.
- Merletti F, Boffetta P, Ciccone G, Mashberg A and Terracini B (1989). "Role of tobacco and alcoholic beverages in the etiology of cancer of the oral cavity/oropharynx in Torino, Italy." *Cancer Res* **49**(17): 4919-24.
- Michalek AM, Mahoney MC, McLaughlin CC, Murphy D and Metzger BB (1994). "Historical and contemporary correlates of syphilis and cancer." *Int J Epidemiol* **23**(2): 381-5.
- Michaud WA, Nichols AC, Mroz EA, Faquin WC, Clark JR, Begum S, Westra WH, Wada H, Busse PM, Ellisen LW and Rocco JW (2009). "Bcl-2 blocks cisplatin-induced apoptosis and predicts poor outcome following chemoradiation treatment in advanced oropharyngeal squamous cell carcinoma." *Clin Cancer Res* **15**(5): 1645-54.
- Michiels S, Le Maitre A, Buyse M, Burzykowski T, Maillard E, Bogaerts J, Vermorken JB, Budach W, Pajak TF, Ang KK, Bourhis J and Pignon JP (2009). "Surrogate endpoints for overall survival in locally advanced head and neck cancer: meta-analyses of individual patient data." *Lancet Oncol* **10**(4): 341-50.
- Middleton K, Peh W, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Nakahara T, El-Sherif A, Morris L, Seth R, Hibma M, Jenkins D, Lambert P, Coleman N and Doorbar J (2003). "Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers." *J Virol* **77**(19): 10186-201.
- Mikulski S (1994). "Pathogenesis of cancer in view of mutually opposing apoptotic and anti-apoptotic growth signals." *Int J Oncol* **4**(6): 1257-63.
- Minaguchi T, Waite KA and Eng C (2006). "Nuclear localization of PTEN is regulated by Ca(2+) through a tyrosil phosphorylation-independent conformational modification in major vault protein." *Cancer Res* **66**(24): 11677-82.

- Miwa M and Masutani M (2007). "PolyADP-ribosylation and cancer." Cancer Sci **98**(10): 1528-35.
- Miyaki M, Sato C, Sakai K, Konishi M, Tanaka K, Muraoka M, Kikuchi-Yanoshita R, Nadaoka Y, Kanda H and Kitagawa T (2000). "Malignant transformation and EGFR activation of immortalized mouse liver epithelial cells caused by HBV enhancer-X from a human hepatocellular carcinoma." Int J Cancer **85**(4): 518-22.
- Miyamoto R, Uzawa N, Nagaoka S, Hirata Y and Amagasa T (2003). "Prognostic significance of cyclin D1 amplification and overexpression in oral squamous cell carcinomas." Oral Oncol **39**(6): 610-8.
- Mladenov E and Iliakis G (2011). "Induction and repair of DNA double strand breaks: The increasing spectrum of non-homologous end joining pathways." Mutat Res **711**(1-2): 61-72.
- Montebugnoli L, Badiali G, Marchetti C, Cervellati F, Farnedi A and Foschini MP (2009). "Prognostic value of Ki67 from clinically and histologically 'normal' distant mucosa in patients surgically treated for oral squamous cell carcinoma: a prospective study." Int J Oral Maxillofac Surg **38**(11): 1165-72.
- Moore SR, Pierce AM and Wilson DF (2000). "'Oral cancer'--the terminology dilemma." Oral Dis **6**(3): 191-3.
- Moran E, Cleary I, Larkin AM, Amhlaioibh RN, Masterson A, Scheper RJ, Izquierdo MA, Center M, O'Sullivan F and Clynes M (1997). "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." Eur J Cancer **33**(4): 652-60.
- Morris SM (2002). "A role for p53 in the frequency and mechanism of mutation." Mutat Res **511**(1): 45-62.
- Mossink MH, van Zon A, Scheper RJ, Sonneveld P and Wiemer EA (2003). "Vaults: a ribonucleoprotein particle involved in drug resistance?" Oncogene **22**(47): 7458-67.
- Motta Rda R, Zettler CG, Cambruzzi E, Jotz GP and Berni RB (2009). "Ki-67 and p53 correlation prognostic value in squamous cell carcinomas of the oral cavity and tongue." Braz J Otorhinolaryngol **75**(4): 544-9.
- Moulder JE and Rockwell S (1987). "Tumor hypoxia: its impact on cancer therapy." Cancer Metastasis Rev **5**(4): 313-41.
- Munoz Guerra MF, Naval Gias L, Campo FR and Perez JS (2003). "Marginal and segmental mandibulectomy in patients with oral cancer: a statistical analysis of 106 cases." J Oral Maxillofac Surg **61**(11): 1289-96.
- Myers JN, Holsinger FC, Bekele BN, Li E, Jasser SA, Killion JJ and Fidler IJ (2002). "Targeted molecular therapy for oral cancer with epidermal growth factor receptor blockade: a preliminary report." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **128**(8): 875-9.
- Nakamura M, Miyamoto S, Maeda H, Zhang SC, Sangai T, Ishii G, Hasebe T, Endoh Y, Saito N, Asaka M and Ochiai A (2004). "Low levels of insulin-like growth factor type 1 receptor expression at cancer cell membrane predict liver metastasis in Dukes' C human colorectal cancers." Clin Cancer Res **10**(24): 8434-41.
- 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." Cell **88**(6): 875-84.
- Narita M, Shimizu S, Ito T, Chittenden T, Lutz RJ, Matsuda H and Tsujimoto Y (1998). "Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(25): 14681-6.
- Nguyen TV and Yueh B (2002). "Weight loss predicts mortality after recurrent oral cavity and oropharyngeal carcinomas." Cancer **95**(3): 553-62.

- Nichols AC, Finkelstein DM, Faquin WC, Westra WH, Mroz EA, Kneuertz P, Begum S, Michaud WA, Busse PM, Clark JR and Rocco JW (2010). "Bcl2 and human papilloma virus 16 as predictors of outcome following concurrent chemoradiation for advanced oropharyngeal cancer." Clin Cancer Res **16**(7): 2138-46.
- Noguchi M, Kinjyo H, Kohama GI and Nakamori K (2002). "Invasive front in oral squamous cell carcinoma: image and flow cytometric analysis with clinicopathologic correlation." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **93**(6): 682-7.
- Oda Y, Kohashi K, Yamamoto H, Tamiya S, Kohno K, Kuwano M, Iwamoto Y, Tajiri T, Taguchi T and Tsuneyoshi M (2008). "Different expression profiles of Y-box-binding protein-1 and multidrug resistance-associated proteins between alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma." Cancer Sci **99**(4): 726-32.
- Oskouiian B and Saba JD (2010). "Cancer treatment strategies targeting sphingolipid metabolism." Adv Exp Med Biol **688**: 185-205.
- P Oc, Pillai G, Patel S, Fisher C, Archer D, Eccles S and Rhys-Evans P (2003). "Tumour thickness predicts cervical nodal metastases and survival in early oral tongue cancer." Oral Oncol **39**(4): 386-90.
- Papa V, Gliozzo B, Clark GM, McGuire WL, Moore D, Fujita-Yamaguchi Y, Vigneri R, Goldfine ID and Pezzino V (1993). "Insulin-like growth factor-I receptors are overexpressed and predict a low risk in human breast cancer." Cancer Res **53**(16): 3736-40.
- Parrizas M, Blakesley VA, Beitner-Johnson D and Le Roith D (1997). "The proto-oncogene Crk-II enhances apoptosis by a Ras-dependent, Raf-1/MAP kinase-independent pathway." Biochem Biophys Res Commun **234**(3): 616-20.
- Peiro G, Benlloch S, Sanchez-Tejada L, Adrover E, Lerma E, Peiro FM, Sanchez-Paya J and Aranda FI (2009). "Low activation of Insulin-like Growth Factor 1- Receptor (IGF1R) is associated with local recurrence in early breast carcinoma." Breast Cancer Res Treat **117**(2): 433-41.
- Peretz S, Jensen R, Baserga R and Glazer PM (2001). "ATM-dependent expression of the insulin-like growth factor-I receptor in a pathway regulating radiation response." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(4): 1676-81.
- Peters G, Gongoll S, Langner C, Mengel M, Piso P, Klempnauer J, Ruschoff J, Kreipe H and von Wasielewski R (2003). "IGF-1R, IGF-1 and IGF-2 expression as potential prognostic and predictive markers in colorectal-cancer." Virchows Arch **443**(2): 139-45.
- Petros AM, Gunasekera A, Xu N, Olejniczak ET and Fesik SW (2004). "Defining the p53 DNA-binding domain/Bcl-x(L)-binding interface using NMR." FEBS Lett **559**(1-3): 171-4.
- Pezzella F and Gatter K (1995). "What is the value of bcl-2 protein detection for histopathologists?" Histopathology **26**(1): 89-93.
- Piccirillo JF, Lacy PD, Basu A and Spitznagel EL (2002). "Development of a new head and neck cancer-specific comorbidity index." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **128**(10): 1172-9.
- Pich A, Chiusa L and Navone R (2004). "Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumors." Ann Oncol **15**(9): 1319-29.
- Pich A, Chiusa L, Pisani P, Krenegli M, Pia F and Navone R (1992). "Argyrophilic nucleolar organizer region counts and proliferating cell nuclear antigen scores are two reliable indicators of survival in pharyngeal carcinoma." J Cancer Res Clin Oncol **119**(2): 106-10.
- Pich A, Pisani P, Kzenegli M, Cappello N and Navone R (1991). "Argyrophilic nucleolar organiser region counts and prognosis in pharyngeal carcinoma." Br J Cancer **64**(2): 327-32.
- Pietrzkowski Z, Lammers R, Carpenter G, Soderquist AM, Limardo M, Phillips PD, Ullrich A and Baserga R (1992). "Constitutive expression of insulin-like growth

- factor 1 and insulin-like growth factor 1 receptor abrogates all requirements for exogenous growth factors." Cell Growth Differ **3**(4): 199-205.
- Piffko J, Bankfalvi A, Ofner D, Bryne M, Rasch D, Joos U, Bocker W and Schmid KW (1997a). "Prognostic value of histobiological factors (malignancy grading and AgNOR content) assessed at the invasive tumour front of oral squamous cell carcinomas." Br J Cancer **75**(10): 1543-6.
- Piffko J, Bankfalvi A, Ofner D, Rasch D, Joos U and Schmid KW (1997b). "Standardized AgNOR analysis of the invasive tumour front in oral squamous cell carcinomas." J Pathol **182**(4): 450-6.
- Pignon JP, le Maitre A, Maillard E and Bourhis J (2009). "Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients." Radiother Oncol **92**(1): 4-14.
- Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himber G, Pigeon F and Adnet JJ (1986). "Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level." Histochem J **18**(1): 5-14.
- Pohl G, Filipits M, Suchomel RW, Stranzl T, Depisch D and Pirker R (1999). "Expression of the lung resistance protein (LRP) in primary breast cancer." Anticancer Res **19**(6B): 5051-5.
- Pohl G, Suchomel RW, Stranzl T, Depisch D, Stiglbauer W, Filipits M and Pirker R (2001). "Expression of the lung resistance protein in primary colorectal carcinomas." Anticancer Res **21**(1A): 201-4.
- Preciado DA, Matas A and Adams GL (2002). "Squamous cell carcinoma of the head and neck in solid organ transplant recipients." Head Neck **24**(4): 319-25.
- Raaijmakers HG, Izquierdo MA, Lokhorst HM, de Leeuw C, Belien JA, Bloem AC, Dekker AW, Scheper RJ and Sonneveld P (1998). "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 **91**(3): 1029-36.
- Raff MC (1992). "Social controls on cell survival and cell death." Nature **356**(6368): 397-400.
- Rahima B, Shingaki S, Nagata M and Saito C (2004). "Prognostic significance of perineural invasion in oral and oropharyngeal carcinoma." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **97**(4): 423-31.
- Railo MJ, von Smitten K and Pekonen F (1994). "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 **30A**(3): 307-11.
- Ramani P and Dewchand H (1995). "Expression of mdr1/P-glycoprotein and p110 in neuroblastoma." J Pathol **175**(1): 13-22.
- Raval-Fernandes S, Kickhoefer VA, Kitchen C and Rome LH (2005). "Increased susceptibility of vault poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice to carcinogen-induced tumorigenesis." Cancer Res **65**(19): 8846-52.
- Raybaud-Diogene H, Fortin A, Morency R, Roy J, Monteil RA and Tetu B (1997). "Markers of radioresistance in squamous cell carcinomas of the head and neck: a clinicopathologic and immunohistochemical study." J Clin Oncol **15**(3): 1030-8.
- Resnicoff M, Abraham D, Yutanawiboonchai W, Rotman HL, Kajstura J, Rubin R, Zoltick P and Baserga R (1995). "The insulin-like growth factor I receptor protects tumor cells from apoptosis in vivo." Cancer Res **55**(11): 2463-9.
- Reszec J, Duraj E, Koda M, Musiatowicz B and Sulkowska M (2004). "Insulin-like growth factor-I receptor in human oral cancer." Rocz Akad Med Bialymst **49** **Suppl 1**: 58-60.
- Ribeiro KC, Kowalski LP and Latorre MR (2000). "Impact of comorbidity, symptoms, and patients' characteristics on the prognosis of oral carcinomas." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **126**(9): 1079-85.

- Riccardi A, Danova M, Wilson G, Ucci G, Dormer P, Mazzini G, Brugnatelli S, Girino M, McNally NJ and Ascari E (1988). "Cell kinetics in human malignancies studied with in vivo administration of bromodeoxyuridine and flow cytometry." Cancer Res **48**(21): 6238-45.
- Ritta M, De Andrea M, Mondini M, Mazibrada J, Giordano C, Pecorari G, Garzaro M, Landolfo V, Schena M, Chiusa L and Landolfo S (2009). "Cell cycle and viral and immunologic profiles of head and neck squamous cell carcinoma as predictable variables of tumor progression." Head Neck **31**(3): 318-27.
- Robbins DJ, Cheng M, Zhen E, Vanderbilt CA, Feig LA and Cobb MH (1992). "Evidence for a Ras-dependent extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(15): 6924-8.
- Rocha RL, Hilsenbeck SG, Jackson JG, VanDenBerg CL, Weng C, Lee AV and Yee D (1997). "Insulin-like growth factor binding protein-3 and insulin receptor substrate-1 in breast cancer: correlation with clinical parameters and disease-free survival." Clin Cancer Res **3**(1): 103-9.
- Rodemann HP, Dittmann K and Toulany M (2007). "Radiation-induced EGFR-signaling and control of DNA-damage repair." Int J Radiat Biol **83**(11-12): 781-91.
- Rodolico V, Barresi E, Di Lorenzo R, Leonardi V, Napoli P, Rappa F and Di Bernardo C (2004). "Lymph node metastasis in lower lip squamous cell carcinoma in relation to tumour size, histologic variables and p27Kip1 protein expression." Oral Oncol **40**(1): 92-8.
- Rogers SN, Vedpathak SV and Lowe D (2011). "Reasons for delayed presentation in oral and oropharyngeal cancer: the patients perspective." Br J Oral Maxillofac Surg **49**(5): 349-53.
- Rosenberg SA, Yang JC and Restifo NP (2004). "Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines." Nat Med **10**(9): 909-15.
- Ross G, Shoaib T, Soutar DS, Camilleri IG, Gray HW, Bessent RG, Robertson AG and MacDonald DG (2002). "The use of sentinel node biopsy to upstage the clinically N0 neck in head and neck cancer." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **128**(11): 1287-91.
- Rothman KJ (1978). "Epidemiology of head and neck cancer." Laryngoscope **88**(3): 435-8.
- Roudabush FL, Pierce KL, Maudsley S, Khan KD and Luttrell LM (2000). "Transactivation of the EGF receptor mediates IGF-1-stimulated shc phosphorylation and ERK1/2 activation in COS-7 cells." J Biol Chem **275**(29): 22583-9.
- Rubio Bueno P, Naval Gias L, Garcia Delgado R, Domingo Cebollada J and Diaz Gonzalez FJ (1998). "Tumor DNA content as a prognostic indicator in squamous cell carcinoma of the oral cavity and tongue base." Head Neck **20**(3): 232-9.
- Saikrishana P, Sivapathasundharam B, Rafiuddeen IS and Krishnan B (2002). "Expression of bcl-2 oncoprotein in oral squamous cell carcinoma--an immunohistochemical study." Indian J Pathol Microbiol **45**(3): 283-7.
- Saito T, Matsuda Y, Suzuki T, Hayashi A, Yuan X, Saito M, Nakayama J, Hori T and Ishikawa F (1997). "Comparative gene mapping of the human and mouse TEP1 genes, which encode one protein component of telomerases." Genomics **46**(1): 46-50.
- Sancho-Garnier H and Theobald S (1993). "Black (air-cured) and blond (flue-cured) tobacco and cancer risk II: Pharynx and larynx cancer." Eur J Cancer **29A**(2): 273-6.
- Sant M, Allemani C, Santaquilani M, Knijn A, Marchesi F and Capocaccia R (2009). "EUROCORE-4. Survival of cancer patients diagnosed in 1995-1999. Results and commentary." Eur J Cancer **45**(6): 931-91.
- Sarkaria JN, Fowler JF, Lindstrom MJ, Jordan VC and Mulcahy RT (1995). "The decreased influence of overall treatment time on the response of human breast

- tumor xenografts following prolongation of the potential doubling time (Tpot)." Int J Radiat Oncol Biol Phys **31**(4): 833-40.
- Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, Ashkenazi M, Pecker I, Frydman M, Harnik R, Patanjali SR, Simmons A, Clines GA, Sartiel A, Gatti RA, Chessa L, Sanal O, Lavin MF, Jaspers NG, Taylor AM, Arlett CF, Miki T, Weissman SM, Lovett M, Collins FS and Shiloh Y (1995). "A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase." Science **268**(5218): 1749-53.
- Sawada M, Sun W, Hayes P, Leskov K, Boothman DA and Matsuyama S (2003). "Ku70 suppresses the apoptotic translocation of Bax to mitochondria." Nat Cell Biol **5**(4): 320-9.
- Scully C, Field JK and Tanzawa H (2000a). "Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 2: chromosomal aberrations." Oral Oncol **36**(4): 311-27.
- Scully C, Field JK and Tanzawa H (2000b). "Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 3: clinico-pathological applications." Oral Oncol **36**(5): 404-13.
- Scully C, Field JK and Tanzawa H (2000c). "Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control." Oral Oncol **36**(3): 256-63.
- Schadendorf D, Makki A, Stahr C, van Dyck A, Wanner R, Scheffer GL, Flens MJ, Scheper R and Henz BM (1995). "Membrane transport proteins associated with drug resistance expressed in human melanoma." Am J Pathol **147**(6): 1545-52.
- Scheffer GL, Wijngaard PL, Flens MJ, Izquierdo MA, Slovak ML, Pinedo HM, Meijer CJ, Clevers HC and Scheper RJ (1995). "The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein." Nat Med **1**(6): 578-82.
- Schlecht NF, Franco EL, Pintos J and Kowalski LP (1999). "Effect of smoking cessation and tobacco type on the risk of cancers of the upper aero-digestive tract in Brazil." Epidemiology **10**(4): 412-8.
- Schneeberger C, Eder S, Swoboda H, Ullrich R and Zeillinger R (1998). "A differential PCR system for the determination of CCND1 (cyclin D1) gene amplification in head and neck squamous cell carcinomas." Oral Oncol **34**(4): 257-60.
- Schneider J, Lucas R, Sanchez J, Ruibal A, Tejerina A and Martin M (2000). "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." Anticancer Res **20**(6B): 4373-7.
- Scholzen T and Gerdes J (2000). "The Ki-67 protein: from the known and the unknown." J Cell Physiol **182**(3): 311-22.
- Schroeijers AB, Reurs AW, Scheffer GL, Stam AG, de Jong MC, Rustemeyer T, Wiemer EA, de Gruijl TD and Scheper RJ (2002). "Up-regulation of drug resistance-related vaults during dendritic cell development." J Immunol **168**(4): 1572-8.
- Schroeijers AB, Siva AC, Scheffer GL, de Jong MC, Bolick SC, Dukers DF, Slootstra JW, Meloen RH, Wiemer E, Kickhoefer VA, Rome LH and Scheper RJ (2000). "The Mr 193,000 vault protein is up-regulated in multidrug-resistant cancer cell lines." Cancer Res **60**(4): 1104-10.
- Sell C, Baserga R and Rubin R (1995). "Insulin-like growth factor I (IGF-I) and the IGF-I receptor prevent etoposide-induced apoptosis." Cancer Res **55**(2): 303-6.
- Shahrabani-Gargir L, Pandita TK and Werner H (2004). "Ataxia-telangiectasia mutated gene controls insulin-like growth factor I receptor gene expression in a deoxyribonucleic acid damage response pathway via mechanisms involving zinc-finger transcription factors Sp1 and WT1." Endocrinology **145**(12): 5679-87.

- Shimamoto Y, Sumizawa T, Haraguchi M, Gotanda T, Jueng HC, Furukawa T, Sakata R and Akiyama S (2006). "Direct activation of the human major vault protein gene by DNA-damaging agents." *Oncol Rep* **15**(3): 645-52.
- Shimizu C, Hasegawa T, Tani Y, Takahashi F, Takeuchi M, Watanabe T, Ando M, Katsumata N and Fujiwara Y (2004). "Expression of insulin-like growth factor 1 receptor in primary breast cancer: immunohistochemical analysis." *Hum Pathol* **35**(12): 1537-42.
- Shingaki S, Takada M, Sasai K, Bibi R, Kobayashi T, Nomura T and Saito C (2003). "Impact of lymph node metastasis on the pattern of failure and survival in oral carcinomas." *Am J Surg* **185**(3): 278-84.
- Shintani S, Li C, Mihara M, Yano J, Terakado N, Nakashiro K and Hamakawa H (2004). "Gefitinib ('Iressa', ZD1839), an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, up-regulates p27KIP1 and induces G1 arrest in oral squamous cell carcinoma cell lines." *Oral Oncol* **40**(1): 43-51.
- Shpitzer T, Chaimoff M, Gal R, Stern Y, Feinmesser R and Segal K (1996). "Tumor angiogenesis as a prognostic factor in early oral tongue cancer." *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **122**(8): 865-8.
- Shtivelman E (2003). "Promotion of mitosis by activated protein kinase B after DNA damage involves polo-like kinase 1 and checkpoint protein CHFR." *Mol Cancer Res* **1**(13): 959-69.
- Sigal A and Rotter V (2000). "Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome." *Cancer Res* **60**(24): 6788-93.
- Silva P, West CM, Slevin N, Valentine H, Ryder WD, Hampson L, Bibi R, Sloan P, Thakker N, Homer J and Hampson I (2007). "Tumor expression of major vault protein is an adverse prognostic factor for radiotherapy outcome in oropharyngeal carcinoma." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **69**(1): 133-40.
- Silverman S, Jr., Gorsky M and Greenspan D (1983). "Tobacco usage in patients with head and neck carcinomas: a follow-up study on habit changes and second primary oral/oropharyngeal cancers." *J Am Dent Assoc* **106**(1): 33-5.
- Siva AC, Raval-Fernandes S, Stephen AG, LaFemina MJ, Scheper RJ, Kickhoefer VA and Rome LH (2001). "Up-regulation of vaults may be necessary but not sufficient for multidrug resistance." *Int J Cancer* **92**(2): 195-202.
- Slesina M, Inman EM, Rome LH and Volkandt W (2005). "Nuclear localization of the major vault protein in U373 cells." *Cell Tissue Res* **321**(1): 97-104.
- Slovak ML, Ho JP, Cole SP, Deeley RG, Greenberger L, de Vries EG, Broxterman HJ, Scheffer GL and Scheper RJ (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." *Cancer Res* **55**(19): 4214-9.
- Smith S (2001). "The world according to PARP." *Trends Biochem Sci* **26**(3): 174-9.
- Steiner E, Holzmann K, Elbling L, Micksche M and Berger W (2006a). "Cellular functions of vaults and their involvement in multidrug resistance." *Curr Drug Targets* **7**(8): 923-34.
- Steiner E, Holzmann K, Pirker C, Elbling L, Micksche M, Sutterluty H and Berger W (2006b). "The major vault protein is responsive to and interferes with interferon-gamma-mediated STAT1 signals." *J Cell Sci* **119**(Pt 3): 459-69.
- Still IH, Vince P and Cowell JK (1999). "Identification of a novel gene (ADPRTL1) encoding a potential Poly(ADP-ribosyl)transferase protein." *Genomics* **62**(3): 533-6.
- Sulkowska M, Famulski W, Chyczewski L and Sulkowski S (2001). "Evaluation of p53 and bcl-2 oncoprotein expression in precancerous lesions of the oral cavity." *Neoplasma* **48**(2): 94-8.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM and Kroemer G (1999). "Molecular

- characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor." Nature **397**(6718): 441-6.
- Tai YT, Podar K, Catley L, Tseng YH, Akiyama M, Shringarpure R, Burger R, Hideshima T, Chauhan D, Mitsiades N, Richardson P, Munshi NC, Kahn CR, Mitsiades C and Anderson KC (2003). "Insulin-like growth factor-1 induces adhesion and migration in human multiple myeloma cells via activation of beta1-integrin and phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT signaling." Cancer Res **63**(18): 5850-8.
- Takes RP (2004). "Staging of the neck in patients with head and neck squamous cell cancer: imaging techniques and biomarkers." Oral Oncol **40**(7): 656-67.
- Takes RP, Baatenburg De Jong RJ, Alles MJ, Meeuwis CA, Marres HA, Knegt PP, De La Riviere GB, De Wilde PC, Mooi WJ, Hermans J and Van Krieken JH (2002). "Markers for nodal metastasis in head and neck squamous cell cancer." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **128**(5): 512-8.
- Talamini R, La Vecchia C, Levi F, Conti E, Favero A and Franceschi S (1998). "Cancer of the oral cavity and pharynx in nonsmokers who drink alcohol and in nondrinkers who smoke tobacco." J Natl Cancer Inst **90**(24): 1901-3.
- Tanaka H, Kato K, Yamashita E, Sumizawa T, Zhou Y, Yao M, Iwasaki K, Yoshimura M and Tsukihara T (2009). "The structure of rat liver vault at 3.5 angstrom resolution." Science **323**(5912): 384-8.
- Tanno B, Mancini C, Vitali R, Mancuso M, McDowell HP, Dominici C and Raschella G (2006). "Down-regulation of insulin-like growth factor I receptor activity by NVP-AEW541 has an antitumor effect on neuroblastoma cells in vitro and in vivo." Clin Cancer Res **12**(22): 6772-80.
- Taunk NK, Goyal S, Moran MS, Yang Q, Parikh R and Haffty BG (2010). "Prognostic significance of IGF-1R expression in patients treated with breast-conserving surgery and radiation therapy." Radiother Oncol **96**(2): 204-8.
- Taylor RJ, Wahl RL, Sharma PK, Bradford CR, Terrell JE, Teknos TN, Heard EM, Wolf GT and Chepeha DB (2001). "Sentinel node localization in oral cavity and oropharynx squamous cell cancer." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **127**(8): 970-4.
- Teixeira G, Antonangelo L, Kowalski L, Saldiva P, Ferraz A and Silva Filho G (1996). "Argyrophilic nucleolar organizer regions staining is useful in predicting recurrence-free interval in oral tongue and floor of mouth squamous cell carcinoma." Am J Surg **172**(6): 684-8.
- Teoh NC, Dan YY, Swisshelm K, Lehman S, Wright JH, Haque J, Gu Y and Fausto N (2008). "Defective DNA strand break repair causes chromosomal instability and accelerates liver carcinogenesis in mice." Hepatology **47**(6): 2078-88.
- Terakado N, Shintani S, Yano J, Chunnan L, Mihara M, Nakashiro K and Hamakawa H (2004). "Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with radioresistance in oral squamous cell carcinoma." Oral Oncol **40**(4): 383-9.
- Tezuka M, Watanabe H, Nakamura S, Yu D, Aung W, Sasaki T, Shibuya H and Miura M (2001). "Antiapoptotic activity is dispensable for insulin-like growth factor I receptor-mediated clonogenic radioresistance after gamma-irradiation." Clin Cancer Res **7**(10): 3206-14.
- Thomas GT, Lewis MP and Speight PM (1999). "Matrix metalloproteinases and oral cancer." Oral Oncol **35**(3): 227-33.
- Tiwari R (2000). "Squamous cell carcinoma of the superior gingivolabial sulcus." Oral Oncol **36**(5): 461-5.
- Tressler RJ, Updyke TV, Yeatman T and Nicolson GL (1993). "Extracellular annexin II is associated with divalent cation-dependent tumor cell-endothelial cell adhesion of metastatic RAW117 large-cell lymphoma cells." J Cell Biochem **53**(3): 265-76.
- Tsang RW, Fyles AW, Kirkbride P, Levin W, Manchul LA, Milosevic MF, Rawlings GA, Banerjee D, Pintilie M and Wilson GD (1995). "Proliferation measurements with

- flow cytometry Tpot in cancer of the uterine cervix: correlation between two laboratories and preliminary clinical results." Int J Radiat Oncol Biol Phys **32**(5): 1319-29.
- Tsang RW, Juvet S, Pintilie M, Hill RP, Wong CS, Milosevic M, Chapman W, Levin W, Manchul LA and Fykes AW (2003). "Pretreatment proliferation parameters do not add predictive power to clinical factors in cervical cancer treated with definitive radiation therapy." Clin Cancer Res **9**(12): 4387-95.
- Tsang RW, Wong CS, Fyles AW, Levin W, Manchul LA, Milosevic M, Chapman W, Li YQ and Pintilie M (1999). "Tumour proliferation and apoptosis in human uterine cervix carcinoma II: correlations with clinical outcome." Radiother Oncol **50**(1): 93-101.
- Tubiana M and Courdi A (1989). "Cell proliferation kinetics in human solid tumors: relation to probability of metastatic dissemination and long-term survival." Radiother Oncol **15**(1): 1-18.
- Tucker SL and Chan KS (1990). "The selection of patients for accelerated radiotherapy on the basis of tumor growth kinetics and intrinsic radiosensitivity." Radiother Oncol **18**(3): 197-211.
- Turner BC, Haffty BG, Narayanan L, Yuan J, Havre PA, Gumbs AA, Kaplan L, Burgaud JL, Carter D, Baserga R and Glazer PM (1997). "Insulin-like growth factor-I receptor overexpression mediates cellular radioresistance and local breast cancer recurrence after lumpectomy and radiation." Cancer Res **57**(15): 3079-83.
- Uehara M, Sano K, Ikeda H, Sekine J, Irie A, Yokota T, Tobita T, Ohba S and Inokuchi T (2004). "Expression of vascular endothelial growth factor and prognosis of oral squamous cell carcinoma." Oral Oncol **40**(3): 321-5.
- Ulanovski D, Stern Y, Roizman P, Shpitzer T, Popovtzer A and Feinmesser R (2004). "Expression of EGFR and Cerb-B2 as prognostic factors in cancer of the tongue." Oral Oncol **40**(5): 532-7.
- Ullrich A, Gray A, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C, Henzel W, Le Bon T, Kathuria S, Chen E and et al. (1986). "Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity." EMBO J **5**(10): 2503-12.
- Uozaki H, Horiuchi H, Ishida T, Iijima T, Imamura T and Machinami R (1997). "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." Cancer **79**(12): 2336-44.
- Valente G, Orecchia R, Gandolfo S, Arnaudo M, Ragona R, Kerim S and Palestro G (1994). "Can Ki67 immunostaining predict response to radiotherapy in oral squamous cell carcinoma?" J Clin Pathol **47**(2): 109-12.
- van der Pol JP, Blom DJ, Flens MJ, Luyten GP, de Waard-Siebinga I, Koornneef L, Scheper RJ and Jager MJ (1997). "Multidrug resistance-related proteins in primary choroidal melanomas and in vitro cell lines." Invest Ophthalmol Vis Sci **38**(12): 2523-30.
- van Diest PJ, Brugal G and Baak JP (1998). "Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value." J Clin Pathol **51**(10): 716-24.
- van Zon A, Mossink MH, Scheper RJ, Sonneveld P and Wiemer EA (2003). "The vault complex." Cell Mol Life Sci **60**(9): 1828-37.
- van Zon A, Mossink MH, Schoester M, Scheffer GL, Scheper RJ, Sonneveld P and Wiemer EA (2001). "Multiple human vault RNAs. Expression and association with the vault complex." J Biol Chem **276**(40): 37715-21.
- Vaux DL, Cory S and Adams JM (1988). "Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells." Nature **335**(6189): 440-2.

- Velu TJ, Beguinot L, Vass WC, Willingham MC, Merlino GT, Pastan I and Lowy DR (1987). "Epidermal-growth-factor-dependent transformation by a human EGF receptor proto-oncogene." Science **238**(4832): 1408-10.
- Vendrik CP, Bergers JJ, De Jong WH and Steerenberg PA (1992). "Resistance to cytostatic drugs at the cellular level." Cancer Chemother Pharmacol **29**(6): 413-29.
- Veneroni S, Silvestrini R, Costa A, Salvatori P, Faranda A and Molinari R (1997). "Biological indicators of survival in patients treated by surgery for squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx." Oral Oncol **33**(6): 408-13.
- Volm M, Mattern J and Koomagi R (1997). "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." Anticancer Drugs **8**(10): 931-6.
- Volm M and Rittgen W (2000). "Cellular predictive factors for the drug response of lung cancer." Anticancer Res **20**(5B): 3449-58.
- Wang Q, Gao F, May WS, Zhang Y, Flagg T and Deng X (2008). "Bcl2 negatively regulates DNA double-strand-break repair through a nonhomologous end-joining pathway." Mol Cell **29**(4): 488-98.
- Whiteside TL (2001). "Immunobiology and immunotherapy of head and neck cancer." Curr Oncol Rep **3**(1): 46-55.
- Wilson GD, Dische S and Saunders MI (1995). "Studies with bromodeoxyuridine in head and neck cancer and accelerated radiotherapy." Radiother Oncol **36**(3): 189-97.
- Wilson GD, Saunders MI, Dische S, Richman PI, Daley FM and Bentzen SM (2001). "bcl-2 expression in head and neck cancer: an enigmatic prognostic marker." Int J Radiat Oncol Biol Phys **49**(2): 435-41.
- Winn DM, Blot WJ, Shy CM, Pickle LW, Toledo A and Fraumeni JF, Jr. (1981). "Snuff dipping and oral cancer among women in the southern United States." N Engl J Med **304**(13): 745-9.
- Withers HR, Taylor JM and Maciejewski B (1988). "The hazard of accelerated tumor clonogen repopulation during radiotherapy." Acta Oncol **27**(2): 131-46.
- Wood RD (1996). "DNA repair in eukaryotes." Annu Rev Biochem **65**: 135-67.
- Woolgar JA, Rogers SN, Lowe D, Brown JS and Vaughan ED (2003). "Cervical lymph node metastasis in oral cancer: the importance of even microscopic extracapsular spread." Oral Oncol **39**(2): 130-7.
- Xiang Z, Yuan W, Luo N, Wang Y, Tan K, Deng Y, Zhou X, Zhu C, Li Y, Liu M and Wu X (2006). "A novel human zinc finger protein ZNF540 interacts with MVP and inhibits transcriptional activities of the ERK signal pathway." Biochem Biophys Res Commun **347**(1): 288-96.
- Xie X, Boysen M, Clausen OP and Bryne MA (1999). "Prognostic value of Le(y) and H antigens in oral tongue carcinomas." Laryngoscope **109**(9): 1474-80.
- Xie X, Clausen OP and Boysen M (2002). "Prognostic significance of p21WAF1/CIP1 expression in tongue squamous cell carcinomas." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **128**(8): 897-902.
- Xie X, Clausen OP, Sudbo J and Boysen M (1997). "Diagnostic and prognostic value of nucleolar organizer regions in normal epithelium, dysplasia, and squamous cell carcinoma of the oral cavity." Cancer **79**(11): 2200-8.
- Yavari K, Taghikhani M, Maragheh MG, Mesbah-Namin SA, Babaei MH, Arfaee AJ, Madani H and Mirzaei HR (2010). "siRNA-mediated IGF-1R inhibition sensitizes human colon cancer SW480 cells to radiation." Acta Oncol **49**(1): 70-5.
- Yi C, Li S, Chen X, Wiemer EA, Wang J, Wei N and Deng XW (2005). "Major vault protein, in concert with constitutively photomorphogenic 1, negatively regulates c-Jun-mediated activator protein 1 transcription in mammalian cells." Cancer Res **65**(13): 5835-40.

- Yu D, Watanabe H, Shibuya H and Miura M (2003). "Redundancy of radioresistant signaling pathways originating from insulin-like growth factor I receptor." J Biol Chem **278**(9): 6702-9.
- Yu Z, Fotouhi-Ardakani N, Wu L, Maoui M, Wang S, Banville D and Shen SH (2002). "PTEN associates with the vault particles in HeLa cells." J Biol Chem **277**(43): 40247-52.
- Yuan Y, Zhou X, Song J, Qiu X, Li J, Ye L, Meng X and Xia D (2008). "Expression and clinical significance of epidermal growth factor receptor and type 1 insulin-like growth factor receptor in nasopharyngeal carcinoma." Ann Otol Rhinol Laryngol **117**(3): 192-200.
- Zhao WQ, Chen GH, Chen H, Pascale A, Ravindranath L, Quon MJ and Alkon DL (2003). "Secretion of Annexin II via activation of insulin receptor and insulin-like growth factor receptor." J Biol Chem **278**(6): 4205-15.
- zur Hausen H (2000). "Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis." J Natl Cancer Inst **92**(9): 690-8.
- zur Hausen H (2002). "Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application." Nat Rev Cancer **2**(5): 342-50.