



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA**

**CURSO DE ESPECIALIDAD EN ONCOLOGÍA MÉDICA**

**TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMAL (EMT) EN  
PACIENTES CON CÁNCER DE CÉRVIX  
LOCALMENTE AVANZADO (ESTADIOS IB2- IVA)  
TRATADOS CON QUIMIORADIOTERAPIA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
ESPECIALISTA EN ONCOLOGÍA MÉDICA**

**PRESENTA:**

**DR. LUIS LEONARDO ROJAS PUENTES**

**DRA. LUCELY DEL CARMEN CETINA PÉREZ  
DIRECTOR DE TESIS  
MEDICO ADSCRITO ONCOLOGÍA MÉDICA  
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA**



**MÉXICO, D.F.**

**Julio, 2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## II DEDICATORIA

A mis padres por el tiempo que siendo suyo lo tomé para mí, por su empeño y dedicación que hacen posible ser lo que hoy soy y cumplir las metas que me he propuesto; por la paciencia infinita que a mamá le ha sobrado, gracias.

A mi hermano, ejemplo de amor y dedicación a sus pacientes, trabajador incansable y excelente faro guiador en esta difícil profesión.

A Carolina, fuente inagotable de amor y apoyo, motivo y razón de lo que hago y lo que sueño.

A mi maestro Andrés Cardona a quien debo la entrega y la pasión por la Oncología, muestra palpable que aún con las limitaciones que impone nuestro medio es posible diferenciarse de los demás, gracias infinitas por todo el apoyo y enseñanzas en estos años.

A mis profesores en México, en especial a la Doctora Cetina por su interés incansable por sus pacientes, en particular aquellas con cáncer cervicouterino de las que el mundo oncológico occidental se olvidó pero que ocupan los consultorios y hospitales en nuestros países.

Finalmente a mis amigos, compañeros y pacientes Mexicanos de quienes aprendí el difícil arte de ser oncólogo pero sobre todo la difícil responsabilidad de ser oncólogo del Instituto Nacional de Cancerología, insignia que se lleva tatuada a donde se vaya y que te hace único.

## INDÍCE

I.	PORTADA.....	1
II.	DEDICATORIA.....	2
III.	ÍNDICE.....	3
IV.	RESUMEN Y PALABRAS CLAVE.....	5
V.	INTRODUCCIÓN.....	7
VI.	MARCO TEÓRICO.....	8
VII.	JUSTIFICACIÓN.....	17
VIII.	HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	18
IX.	OBJETIVOS.....	18
	a) Generales.....	18
	b) Específicos.....	18
X.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
	a) Diseño del Estudio.....	19
	b) Muestreo y Cálculo del tamaño de muestra .....	19
	c) Criterios de selección.....	20
	d) Plan de análisis y Métodos para análisis estudios moleculares.....	20
	e) Análisis estadístico.....	23
XI.	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE LOS DATOS.....	24
	a) Características generales de la población.....	24
	b) Desenlaces clínicos interés globales y de acuerdo factores pronósticos clínicos.....	27

<b>c) Relación entre la expresión de genes de proliferación celular y marcadores de transición epitelio mesenquimal .....</b>	<b>29</b>
<b>e) Desenlaces clínicos de interés de acuerdo a marcadores de transición epitelio mesenquimal y expresión de genes de proliferación y angiogénesis .....</b>	<b>31</b>
<b>XII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>36</b>
<b>XIII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>39</b>
<b>XIV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>40</b>

## V RESUMEN

**Antecedentes:** En países en vías de desarrollo el cáncer de cérvix constituye la segunda causa de muerte por cáncer.

**Objetivos:** Evaluar la asociación de marcadores de transición epitelio mesenquimal (EMT) con la densidad microvascular (DMV) y la expresión proteica de genes relacionados con proliferación y crecimiento tumoral así como el papel pronóstico de ésta asociación en pacientes con cáncer de cérvix localmente avanzado tratadas con quimioradioterapia seguida de braquiterapia intracavitaria. Se estimaron la tasa de respuesta global (TRG), la supervivencia libre de progresión (SLP) y la supervivencia global (SG).

**Resultados:** Se incluyeron 61 mujeres con una edad media de  $52 \pm 10$  años; todas tenían diagnóstico de cáncer de cérvix localmente avanzado (IIA 2.3%/IIB 47.5%/IIIA 4.9%/IIIB 37.7%/IVA 3.3%/no definido 3.3%), con un volumen tumoral promedio de 6.4cm ( $DE \pm 1.8$ cm) e infección por VPH en 46% de los casos; 58 sujetos (95%) tenían un patrón escamoso, dos fueron adenocarcinomas y >50% presentaba neoplasias moderada o pobremente diferenciadas. Todas fueron tratadas con quimiorradiación (interrupción transitoria en teleterapia por toxicidad y otras causas en 19% y 21.4%, respectivamente/media de ciclos de platino concomitante 4.8 series  $\pm 1.0$ ) y braquiterapia (77% completaron el tratamiento intracavitario). La mediana para la SLP y global fue de 6.6 meses (4.0-9.1) y 30 meses (11-48), respectivamente. Ninguna de las variables tuvo efecto sobre la SLP, mientras el análisis multivariado demostró que los niveles de expresión del VEGF ( $p=0.026$ ), EGFR ( $p=0.030$ ), y el volumen tumoral  $<6$  cm ( $p=0.02$ ) influyeron sobre éste desenlace, La expresión de TWIST2 y la pérdida de E-caderina (marcadores de EMT) se relacionaron con la expresión de VEGF y EGFR y también influyeron en la SG. Los pacientes que tuvieron positividad fuerte para expresión de TWIST-2 mostraron SG menor (mediana 16 meses IC 95% 14-18 meses) comparados con aquellos TWIST-2 negativos (mediana 76 meses IC 58-95 meses)  $p=0.0001$ . De manera similar aquellos pacientes con pérdida de E-caderina mostraron una SG menor (mediana 17 meses IC 95% 13-21 meses) comparados con aquellos con E-Caderina positivos (87 meses IC 95% 71-102 meses)  $p=0.02$ . Cuando se asoció la positividad para expresión de EGFR o VEGF con la presencia de marcadores de EMT la SG fue aún menor. [EGFR positivo + E-Caderina negativo (mediana 14 meses IC 95% 3-24) vs EGFR negativo + E-Caderina positivo (mediana 31 meses IC 95% 14-NA)  $p=0.02$ ]

**Conclusión:** La presencia de marcadores de transición epitelio mesenquimal (EMT) se relaciona con la expresión de genes de proliferación y crecimiento tumoral y tiene influencia en el pronóstico de pacientes con cáncer cérvix localmente avanzado.

**PALABRAS CLAVE:** Cáncer Cervicouterino, expresión de genes, transición epitelio-mesenquimal, supervivencia,

## V ABSTRACT

**Background:** In low and middle income countries cervical carcinoma is the second leading cause of death among women.

**Objective:** To describe the prognostic value of microvascular density (MVD) and protein expression of several genes related to tumoral survival and proliferation and their relationship with Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) of locally advanced cervical cancer (LACC). Overall response rates (ORR), clinical benefit (CB), progression-free survival (PFS), and overall survival (OS) were estimated for women suffering from LACC treated with chemoradiotherapy followed by high dose rate brachytherapy (HDRB).

**Results:** Sixty-one patients were included (mean age  $52 \pm 10$ ); all of them had LACC (2.3% 2A/47.5% 2B/4.9% 3A/37.7% 3B/3.3% 4A/3.3% not defined), a tumour mean size of 6.4cm (SD $\pm$ 1.8cm) and HPV infection in 46% of the cases. Fifty-eight patients (95%) had a squamous pattern, two were adenocarcinomas and >50% presented moderated or poorly differentiated neoplasms. All of them were treated with chemotherapy (transitory interruption of external radiotherapy was documented in 19% due to toxicity and in 21.4% of cases by other causes/mean cycles of platinum administered during radiotherapy  $4.8 \pm 1.0$ ) and brachytherapy (77% completed all planned intracavitary treatment). The median PFS and OS was 6.6 months (4.0-9.1) and 30 months (11-48) respectively. None of the variables had effect on PFS, whilst multivariate analysis revealed that VEGF ( $p=0.026$ ) and EGFR expression levels ( $p=0.030$ ) and <6 cm tumor volume ( $p=0.02$ ) positively influenced the OS.

The TWIST2 expression and E-cadherine lost (EMT markers) are related with VEGF and EGFR expression and influence OS ( $p=0.001$ ) and ( $p=0.02$ ) respectively.

The patients with strong positivity for TWIST-2 expression showed worse OS (median 16 months CI 95% 14-18 m) compared with TWIST-2 negative (median 76 months CI 95% 58-95 m)  $p=0.0001$ . Similarly patients with E-Cadherine lost showed worst OS (median 17 months CI 95% 13-21 m) compared with E-Cadherine positive (median 87 months CI 95% 71-102 m)  $p=0.02$ . When we associate EGFR or VEGFR expression with EMT markers OS were even less [EGFR positive + E-Cadherine negative (median 14 months CI 95% 3-24) vs EGFR negative + E-Cadherine positive (median 31 months CI 95% 14-NA)  $p=0.02$ ].

**Conclusion:** Classifying LACC patients treated with cisplatin-based chemoradiotherapy by protein expression and EMT markers had a positive influence on prognosis

**KEYWORDS:** Cervical Cancer, gene expression, Epithelial mesenchymal transition, survival.

## VI INTRODUCCIÓN

El cáncer de cérvix constituye la segunda neoplasia más frecuente y la segunda causa de muerte por cáncer en países en vías de desarrollo como los nuestros. Los programas de tamizaje exitosos en países desarrollados que han impactado de manera relevante en la reducción de la morbimortalidad de esta neoplasia no han podido ser correctamente implementados en nuestro medio por diversas razones económicas, políticas y culturales. Lo anterior convierte a esta neoplasia en un constante reto de diagnóstico y tratamiento para aquellos que nos dedicamos al cuidado de los pacientes con cáncer.

Desde finales de los años 90, la quimioradioterapia se ha convertido en el manejo estándar de los pacientes con cáncer de cérvix localmente avanzado dado el impacto en mortalidad y recurrencia cuando se compara con la radioterapia sola. A pesar del éxito de este tratamiento un porcentaje no despreciable de estas pacientes tratadas van a recurrir, con opciones de tratamiento limitadas, pocas opciones de curación y alta mortalidad. Buscando alternativas se han probado otros medicamentos radiosensibilizadores como es el caso de Gemcitabine; así mismo se ha evaluado el papel de la terapia adyuvante con quimioterapia sin que existe hasta el momento una terapia que permita superar estas limitaciones.

Se han establecido factores pronósticos clínicos (tamaño tumoral, tipo histológico, compromiso ganglionar, invasión de estructuras anatómicas adyacentes, entre otros ) que ayudan al clínico a identificar que pacientes pudieran fallar al tratamiento inicial con quimioradioterapia; con el desarrollo de nuevas técnicas en biología molecular aplicada al cáncer y oncología traslacional surge la inquietud sobre la existencia de marcadores celulares o biológicos que sirvan como marcadores pronósticos. Existe información relevante sobre la sobreexpresión de proteínas relacionadas el crecimiento celular tumoral y la angiogénesis en el cáncer de cérvix (ej EGFR, VEGF, HIF-1) y su relación con un peor pronóstico; así mismo en diversas neoplasias como cáncer de mama y pulmón la identificación de proteínas que denotan la transición de epitelio propio del tejido de origen a otro con diferenciación mesenquimal (transición epitelio mesénquima) constituye un marcador de agresividad tumoral y mal pronóstico.

En este estudio se describe la correlación entre la expresión de genes asociados con la supervivencia y proliferación del carcinoma de cérvix localmente avanzado tratado con quimio-radioterapia seguida de braquiterapia endocavitaria, con marcadores celulares para transición epitelio mesénquima y a su vez establece el papel pronóstico de éstos marcadores.

## VII MARCO TEORICO

El cáncer de cérvix es la segunda neoplasia en incidencia y mortalidad a nivel global; anualmente, esta enfermedad causa cerca de 234.000 muertes, de las cuales, 40.000 se presentan en mujeres provenientes de los países en vía de desarrollo (1). La discrepancia en la relación incidencia/mortalidad para el cáncer de cérvix entre los países con mayores y menores recursos económicos, es el resultado directo de la inversión marginal en los programas de cribado. La vacunación masiva dirigida contra el virus de papiloma humano (VPH) que se asocia con el desarrollo del 99% de las neoplasias invasivas del cérvix, podría reducir dramáticamente la morbilidad y mortalidad de esta neoplasia (2). No obstante, el elevado costo de las vacunas y las barreras políticas y logísticas para su inclusión, retrasarán la implementación universal de la inmunización en los países en desarrollo (2). De igual forma, las vacunas dirigidas contra el VPH que se encuentran disponibles sólo son efectivas contra los serotipos que originan el 70% de los canceres (3).

En los Estados Unidos al igual que en otros países del primer mundo, la mayoría de los canceres de cérvix se diagnostican en estado temprano (4,5). De los 13.458 pacientes con cáncer de cérvix incluidos en el SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results) entre 1973 y 1987, el 71% tenía neoplasias estados I a IIA según la clasificación FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) (4)

Pese a las limitaciones de información respecto al comportamiento epidemiológico de las neoplasias más frecuentes, el Cáncer de Cérvix corresponde a la segunda causa de muerte por cáncer entre las mujeres en México con una tasa para el año 2006 de 9 muertes por cada 100.000 mujeres (6) y dentro del Instituto Nacional de Cancerología la neoplasia más frecuentemente diagnosticada en mujeres correspondiendo al 30.6 % de las 19.597 neoplasias diagnosticadas entre 1985 y 1994 en este Instituto (7). Para el caso de Colombia el Cáncer de Cérvix es igualmente la segunda causa de muerte por Cáncer (8) La distribución por estadios en éstos países es especialmente preocupante, en particular, por que el 60% de los casos incidentes corresponden con lesiones localmente avanzadas (5-7).

La gran mayoría de las mujeres con neoplasias tempranas se curan con cirugía radical con o sin la administración de radioterapia complementaria; sin embargo, las pacientes con tumores localmente avanzados (estados II a IIIB) presentan un riesgo mayor de progresión. En este subgrupo la radioterapia como intervención única permite controlar la enfermedad en el 35% a 65% de los casos (8). La administración concomitante de la teleterapia pélvica con la quimioterapia permite incrementar el control del crecimiento tumoral, induciendo un daño subletal sobre la célula, al afectar la capacidad para reparar el ADN, hecho que ocasiona profundos cambios en su metabolismo. De la misma manera, afecta el tamaño tumoral siguiendo una relación directa entre la dosis y la respuesta, que favorece la disminución en la oxigenación tisular, la inhibición de la angiogenesis y la promoción de la apoptosis al incrementar la radiosensibilidad (9,10).

En 1999, el National Cancer Institute (NCI, United States of America) recomendó el uso concurrente del cisplatino con la radioterapia como estándar para el tratamiento del cáncer de cérvix localmente avanzado basado en los resultados de la integración de cinco estudios clínicos fase III con asignación aleatoria (11); de estos, dos fueron realizados de forma exclusiva en mujeres con enfermedad temprana (estados IA, II, IB y IIA) e incluyeron el uso preoperatorio y postoperatorio de radioterapia como parte del control. En los tres estudios restantes publicados por el Gynecology Oncology Group (GOG) y por el Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) se incluyeron un gran número de pacientes con estados IIB, III y IVA. Estos experimentos encontraron un beneficio uniforme con el uso de la quimiorradiación que otorga un incremento absoluto en la supervivencia global a cinco años del 12%. La mayoría de estos estudios incluyeron como tratamiento de quimioterapia concomitante Cisplatino, convirtiéndose en el medicamento de elección en esta estrategia de tratamiento. (12).

A pesar del impacto positivo del tratamiento con quimio y radioterapia concomitante (utilizando cisplatino como radiosensibilizador), alrededor del 35% de éstas pacientes progresan. (13). Se han intentado alternativas de tratamiento que permitan mejorar estos desenlaces. Una de ellas es la modificación del tratamiento adicionando gemcitabine al tratamiento con cisplatino como medicamento radiosensibilizador. Un estudio fase II con población Mexicana mostró que la respuesta patológica completa fue mayor en el grupo en que se administró la combinación cisplatino-gemcitabine comparado con el grupo que solo recibió cisplatino, si bien estos resultados a consta de una mayor toxicidad gastrointestinal y genitourinaria (14).

### **Virus del papiloma humano (VPH) y carcinoma de cérvix**

El VPH es un virus ADN circular de 8-kb que tiene como blanco específico las células basales de los epitelios de las mucosas; su familia está constituida por más de 100 genotipos que se clasifican de acuerdo con las células que infectan, y su capacidad para generar modificaciones complejas en la información del hospedero. Algunos subtipos como el VPH1, infectan las células de los estratos córneos en la piel, mientras que los subtipos 6, 11, 16 y 18 comprometen la mucosa de la cavidad oral, la orofaringe, el tracto anogenital, y el cérvix. Los tipos de bajo riesgo generan lesiones benignas, en contraposición a sus homólogos de alto riesgo que ocasionan neoplasias.

El genoma del VPH está comprimido en genes tempranos y tardíos así como en regiones no codificantes, todos ellos, activos en los procesos de replicación, transcripción y carcinogénesis. Los marcos de lectura tardía codifican las proteínas de la cápside L1 y L2 que se transcriben solo en las células infectadas. Los primeros marcos de lectura (E) codifican de forma abierta las proteínas E1, 2, 5, 6 y 7, vinculados en la regulación de la replicación y en la expresión de otros genes. Al menos tres proteínas (E5, E6 y E7) codificadas por los virus de alto riesgo se consideran oncogénicas debido a su capacidad para inducir la transformación y el crecimiento de las células anormales. Estas moléculas

proteicas tienen la capacidad de regular la función de los genes supresores de tumor mediante la derogación de la actividad de las proteínas p21, p53 y pRb, eventos que resultan en la alteración de la apoptosis, en defectos relacionados con la reparación del ADN y del control del ciclo celular (15-17).

La región no codificante de control (LCR) contiene sitios de unión para las proteínas C2 y E1 localizadas cascada arriba en la secuencia del promotor p97 que controla la transcripción de las oncoproteínas E6 y E7. De igual forma, existe una regulación dependiente de la expresión de las proteínas E6 y E7 por la E2, capaz de reprimir el efecto de estas dos. Desde que se reconoció el efecto de la infección persistente de los genotipos de alto riesgo del VPH sobre la probabilidad de desarrollar cáncer de cérvix se descubrió la capacidad de adhesión lineal del genoma del virus en los cromosomas del huésped, evento que suele ocurrir de forma tardía. La integración del genoma viral es al azar y ocurre con mayor predilección en los sitios donde hay cierta fragilidad. Dicha unión, se produce gracias a la interrupción en la secuencia del gen E1/2 lo que produce sobreexpresión de E6 y E7 que conducen a la alteración de las principales vías supresoras de tumor (16,17).

El marco abierto de E5 se transcribe a partir de la fórmula episómica del ADN viral y ejerce efectos procancerígenos durante las primeras etapas de la infección sin que su presencia sea necesaria para mantener el fenotipo maligno. Sin embargo, se ha demostrado que la proteína E5 estimula el crecimiento celular a través de la activación y regulación del receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR), hecho que conduce hacia la señalización anormal generando la sobreexpresión de algunos protooncogenes y la represión de la quinasa dependiente de ciclinas 1A (CDKN1A/p21).

La proteína viral E6 tiene capacidad para estimular el crecimiento celular a través de varios mecanismos diferentes, entre ellos, la unión con la proteína asociada a E6 (E6-AP), el p53 y el complejo inhibitorio del proteosoma. Todos estos eventos ocasionan la inhibición de la apoptosis en un punto ineficiente de la fase G1/S, donde se realiza el control al daño del ADN que tras la infección por el VPH genera inestabilidad cromosómica en las células infectadas. El complejo E6/E6-AP también evita la degradación de la familia SRS y BLK, lo que resulta en la estabilización de las formas activas de estas quinasas estimulando así la mitosis. Las proteínas E6 del serotipo 16 activan o inhiben varios blancos celulares adicionales entre los que se incluyen la Paxilina, la transcriptasa inversa de la telomerasa (hTERT), la oncoproteína MYC y el regulador del factor 3 del interferón (IRF3), que actúa como transactivador de todos los interferones. De igual forma, se altera la capacidad de reparar el ADN de cadena sencilla a través del XRCC1 (16,17).

La proteína E7 del VPH es capaz de degradar el RB por la ubiquitinación y la inactivación funcional de la proteína, este hallazgo conduce a la sobreexpresión de la ciclina dependiente de quinasa p16 y NK4A; la detección de la sobreexpresión del p16 es considerada como un marcador indirecto de infección por VPH en el

que juega un importante papel la hiperproliferación celular. También está implicado en cambios documentados en las vías PLK1, con la aurora quinasa A, CDK1 y NEK2 (16-22)

VPH y cáncer de cérvix: relación con la expresión de genes relacionados con la angiogénesis y proliferación celular y con la transición epitelio-mesenquimal

La familia de proteínas relacionadas con el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor) representa un grupo heterogéneo de elementos relacionados con el estímulo y aumento de la permeabilidad vascular, el crecimiento de las células endoteliales, su migración y diferenciación (23). Otros miembros adicionales de esta superfamilia son el factor de crecimiento placentario (PlGF, Placental Growth Factor), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y VEGF-E. La sobreexpresión del VEGF se ha correlacionado con un peor pronóstico en los pacientes con carcinoma escamoso de cérvix y sus niveles en suero representan un marcador subrogado del crecimiento tumoral. Evaluaciones colposcópicas del cérvix han encontrado vasos sanguíneos atípicos con formas irregulares y aumento de la densidad microvascular (DMV cuantificando la expresión de CD31) que caracteriza un fenotipo más agresivo (24).

La oncoproteína E6 del VPH media la inactivación del p53 promoviendo la sobreexpresión de VEGF, modulando la angiogénesis y vasculogénesis a través de la inhibición de la expresión del TSP1 (Thrombospondina 1); esta última es una glicoproteína de adhesión que facilita la interacción entre las células y su matriz a nivel de estroma, permitiendo la unión de moléculas como el fibrinógeno, la fibronectina, la laminina, el colágeno tipo 5 y las integrinas  $\alpha 5$  y  $\beta 1$ , importantes en la génesis del carcinoma de cérvix. Recientemente, Randall y colaboradores describieron la relevancia pronóstica de la densidad microvascular detectada por inmunohistoquímica en una muestra de especímenes recolectados en un experimento clínico fase III que incluyó mujeres con cáncer de cérvix tratadas con quimiorradiación. Este estudio demostró que una alta expresión de CD31 representa un factor pronóstico independiente que se asocia con una mayor supervivencia libre de progresión (SLP) y global (SG), (24-25). En contraposición, Obermair reportó que el aumento en la DMV se asoció con un desenlace negativo al documentar una reducción en la tasa de supervivencia global a 5 años entre las mujeres que tuvieron un recuento mayor a 20 vasos por campo de gran aumento cercano al 35% (23). La inconsistencia de los resultados en estos y otros estudios puede ser explicada por la heterogeneidad de la población evaluada, por el método de detección utilizado, por la estrategia para cuantificar la DMV, y por las diversas intervenciones usadas. (26,27)

El aumento en la DMV se asocia con la alteración de otros marcadores derivados del endotelio vascular como el factor VIII, el CD34, la interleuquina 8 (IL8), el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) y el VEGF. Un estudio que valoró 117 mujeres con carcinoma de cérvix estado IB2, encontró una relación directa y proporcional entre la expresión de VEGF, la invasividad tumoral, el compromiso ganglionar y el volumen de la neoplasia. (28). La intensidad de la expresión del VEGF

cuantificada por inmunohistoquímica se correlacionó de forma negativa con la SG, hallazgo que confirmaron Gaffney y colaboradores al demostrar una asociación estadísticamente significativa entre este marcador y el compromiso de la SLP (29).

El gen VEGF-A (región cromosómica 6p21.3) da lugar, por “splicing” alternativo del ARNm, a cinco isoformas distintas que corresponden a las proteínas de 121, 145, 165, 189 y 206 aminoácidos. Se han identificado otras moléculas estructuralmente relacionadas con el VEGF que se unen a sus mismos receptores, como son PDGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, y el homólogo viral VEGF-E. El VEGF165, de solubilidad y afinidad por la matriz extracelular intermedias entre el VEGF121 y el VEGF189, es la isoforma más abundante, y es producido por una gran cantidad de tipos celulares. Estructuralmente, el VEGF165 es una glicoproteína homodímera de 45 KDa, básica y con dominios de unión a la heparina, siendo por lo tanto parcialmente soluble lo que facilita su retención en la superficie celular y en la matriz extracelular.

La tensión de oxígeno tiene un papel crítico en la regulación de la expresión génica del VEGF. El HIF-1 es el regulador principal de la respuesta transcripcional secundaria a la hipoxia, aunque otros factores de transcripción, como AP-1, SP-1 y NFκB, tienen sitios de unión en la región del promotor de VEGF. Además, otras citoquinas y alteraciones tumorales pueden activar la expresión de VEGF, como las mutaciones del gen Ras, la inactivación del gen von Hippel-Lindau, o las mutaciones en el p53. El VEGF se une, al menos, a tres receptores de tipo tirosinquinasa y a una proteína de membrana llamada neuropilina. Los tres receptores se denominan VEGFR1 (Flt-1), VEGFR2 (KDR/Flk-1) y VEGFR3 (Flt-4). Los dos primeros se encuentran en el endotelio vascular, y el último se expresa exclusivamente en los linfáticos. La señal del VEGF transmitida a través de estos receptores es capaz de fosforilar al menos 11 proteínas de las células endoteliales y tumorales. El VEGFR1 presenta una respuesta débil a la fosforilación y aparentemente media algunas señales que regulan la migración celular. La interacción del VEGF con el VEGFR2 activa la proliferación, migración, supervivencia y reorganización del citoesqueleto celular. Además, el VEGF no sólo activa un programa de proliferación en el endotelio, también pone en marcha propiedades citoprotectoras específicas, descritas hasta ahora en los capilares en desarrollo y en las neoplasias; estos cambios son promovidos por la vía PI3K/Akt. (30-33)

Varios estudios han relacionado la sobreexpresión del VEGF con el potencial de metástasis y con la posibilidad de respuesta a la quimiorradiación en diversas neoplasias ginecológicas. Bachtary informó una mayor probabilidad de falla local y a distancia en mujeres con cáncer de cérvix que tuvieron niveles elevados de VEGF en plasma (mayores de 244 pg/ml), evento que se relacionó con un aumento en la expresión proteica cuantificada antes de la administración de la radioterapia (34). De igual forma, Zusterzeel concluyó que la elevación en los niveles circulantes de VEGF se asoció con un mayor estado tumoral, con la posibilidad de documentar un tumor mayor de 2 cm y con una probabilidad superior de evidenciar la presencia de los subtipos más agresivos del VPH. (35)

La proliferación de las células en los tumores cervicales también depende de una interacción dinámica con su microambiente, en particular con las estructuras vasculares, este entorno mantiene un avance irregular entre las señales que favorecen a la proliferación y aquellas que la reprimen, evento que representa en parte una clave para controlar la angiogénesis y la homeostasis en dichas neoplasias. Varios estudios han demostrado que la hipoxia aumenta el flujo en las arterias uterinas beneficiando el consumo de glucosa y la alteración en la densidad capilar. La hipoxia también representa uno de los principales indicadores para el control de las células progenitoras normales y tumorales. En el cáncer de cérvix la hipoxia modifica el gradiente de oxígeno de múltiples sustancias quimiotácticas, y de otras proinflamatorias que favorecen la producción de HIF-1 $\alpha$ . (32,33)

Por otra parte, Liu y colaboradores encontraron que la sobreexpresión de HIF-1 $\alpha$  promueve la radioresistencia a través de la supresión de la expresión de Bax (36-37), efecto que es motivado por la producción de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH. (38). Dellas y colaboradores investigaron la relación entre la expresión de HIF-1 $\alpha$  cuantificada por inmunohistoquímica, la oxigenación tumoral y los niveles de hemoglobina en una cohorte de pacientes con carcinoma de cérvix localmente avanzado tratado con radioterapia; el estudio documentó que las pacientes con especímenes negativos para el HIF-1 $\alpha$  tuvieron una mejor SG a 5 años, hallazgo que se asoció con una menor fracción intratumoral de pO<sub>2</sub> (<5 mmHg) (39). Estos datos han sido corroborados por múltiples estudios que han evaluado la inmunoreactividad para el HIF-1 $\alpha$  en pacientes con cáncer de cérvix y su impacto sobre los desenlaces más relevantes (40-42)

Dado que la angiogénesis se encuentra claramente relacionada con el desarrollo y la progresión del cáncer de cérvix, varios estudios han evaluado la eficacia y seguridad de agentes como el bevacizumab en mujeres con enfermedad recurrente o metastásica. Este agente demostró una tasa de respuesta del 11% y una proporción baja de pacientes sin progresión de la enfermedad después de 6 meses de iniciada la intervención (43). Algunos reportes adicionales soportan el uso de este y otros antiangiogénicos en combinación con carboplatino y paclitaxel como parte del tratamiento sistémico del carcinoma de cérvix avanzado (44-46)

El receptor para factor de crecimiento epidérmico (EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor) pertenece a la familia de receptores localizados en la membrana plasmática que presentan actividad tirosin-quinasa intrínseca. En humanos, el gen que codifica el EGFR (c-erbB1) se encuentra en el brazo corto (región p13-p12) del cromosoma 7 y está compuesto por 28 exones que ocupan un segmento de 75 kb. Este gen codifica una proteína precursora de 1.210 aminoácidos que posee una corta secuencia líder hidrofóbica en su extremo N-terminal que usa para su inserción en la membrana, siendo posteriormente eliminada por procesamiento proteolítico. El receptor maduro es una glicoproteína integral de membrana de 170 kDa que está constituida por un dominio extracelular amino terminal, un único dominio transmembrana y un dominio citoplásmico carboxilo terminal en el que se localiza el sitio catalítico responsable de la actividad tirosin quinasa. Algo más de

la mitad de la cadena polipeptídica del EGFR forma su dominio extracelular. Este dominio, que contiene múltiples residuos N-glicosilados ricos en manosa, presenta dos zonas en las que existen un gran número de residuos de cisteína, entre las que se encuentra el sitio de unión del ligando. Este sitio es específicamente reconocido por una familia de factores de crecimiento que poseen módulos estructurales semejantes al del EGF (Epidermal Growth Factor), su ligando prototipo. Las cadenas glicosílicas del receptor parecen estar implicadas en el correcto plegamiento del mismo y en su transporte a la superficie celular. El dominio transmembrana, como otros segmentos proteicos helicoidales que atraviesan membranas biológicas, es rico en aminoácidos hidrofóbicos; este dominio juega un papel fundamental en la transmisión de información a través de la membrana plasmática, ya que comunica el sitio de unión del ligando extracelular con el sitio catalítico tirosin quinasa intracelular. En el dominio citoplásmico del EGFR se encuentra localizado el sitio catalítico responsable de su actividad tirosin quinasa. En este dominio se encuentra un residuo de lisina (Lys721), que está implicado en la unión del ATP al receptor, y cinco residuos de tirosina (Tyr992, Tyr1068, Tyr1086, Tyr1148 y Tyr1173) en su extremo más distal, que son susceptibles de ser transfosforilados después de producirse la dimerización del receptor. Los residuos de fosfotirosina así generados sirven como sitios de reclutamiento y anclaje de proteínas que contienen dominios SH2 (Src homology domain-2) o dominios PTB (phospho-tyrosine-binding domains) que inician múltiples vías de señalización intracelular. (47,48)

El EGFR se encuentra alterado en el 80% de los carcinomas escamosos de cérvix; Noordhuis y colaboradores demostraron recientemente que la sobreexpresión del EGFR en mujeres con cáncer de cérvix localmente avanzado tratadas con quimiorradiación se asoció de forma negativa con la SLP. Además, la inmunoreactividad del EGFR y de su fracción fosforilada fueron útiles para predecir la respuesta al tratamiento de forma independiente al estado tumoral y al patrón histológico dominante. Esta asociación puede explicarse, al menos en parte, por el papel que tiene el receptor en el proceso de reparación del daño ocasionado sobre el ADN vía activación de la cascada de señalización PI3K/Akt. (49)

### **Transición epitelio-mesenquimal**

Las células epiteliales juegan un rol estructural y funcional en los órganos y son mutuamente adherentes a través de interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular. Las moléculas de adhesión célula-célula incluyen las caderinas mientras que las de adhesión célula-matriz extracelular involucran a las integrinas. Las caderinas y las integrinas reposan en el citoesqueleto que es una estructura rígida formada por filamentos de actina y citoqueratina. En un epitelio intacto las células tienen una estructura rígida y son inmóviles. En contraste, las células mesenquimales, tienen una organización menos rígida con menor cantidad de uniones celulares y de moléculas de citoqueratina, mostrando propensión a la movilidad (50).

En una situación normal, las células epiteliales se encuentran en comunicación directa con el estroma por medio de una estructura organizada mayormente en hojas (a excepción de la piel), con células adyacentes unidas fuertemente por “tight junctions y gap junctions”. Estas conexiones sirven para funciones como: comunicación, restricción de la proliferación, migración celular y mantenimiento de la polaridad celular. En la superficie apical de gran parte de los tejidos, las células epiteliales están en contacto con fluidos corporales que contienen en su mayoría factores de crecimiento y sus receptores se encuentran secuestrados en las superficies baso-laterales. Las tight junctions que se componen por uniones epitelio-caderinas (E-caderina o CDH1), limitan el acceso de los fluidos apicales a los espacios basolaterales y compartimientos estromales (51,52).

Cuando ocurre un proceso neoplásico, todo este ordenamiento sufre alguna alteración. Cambios a nivel genético y/o epigenético generan una serie de eventos que resultan en la transición de una célula epitelial polarizada, no móvil (fenotipo cúbico) a una célula mesenquimal (fenotipo espiculado) no polarizada y móvil, con capacidad invasiva, proceso identificado y conocido como EMT (50).

La EMT no solo juega un papel primordial en las transformaciones neoplásicas, sino que también ha sido reconocido como un mecanismo importante en diversos procesos durante el desarrollo embrionológico (incluyendo gastrulación, en donde el epitelio da origen al mesodermo), procesos de cicatrización, fibrosis y transformación neoplásica. De esta forma, la EMT se divide en 3 tipos que conllevan a diferentes consecuencias funcionales (52).

#### Transición epitelio-mesenquimal en cáncer

El proceso de EMT que ocurre en cáncer es definido como la pérdida de la arquitectura epitelial normal generada por un deterioro de los contactos célula – célula. A nivel molecular se evidencia por pérdida de marcadores epiteliales como la E-caderina y la baja regulación citoqueratinas específicas y la aparición de marcadores mesenquimales que incluyen: fibronectina, N-caderina y vimentina más la adquisición de fenotipo fibroblastoide móvil e invasivo. (1,4) Una vez la célula mesenquimal alcanza su destino final sufre el proceso reverso conocido como transición mesenquimal-epitelial (EMT) (53).

#### **Inductores de la transición epitelio-mesenquimal**

El proceso conocido como EMT puede ser inducido tanto por señales intrínsecas, (por ejemplo mutaciones génicas) o por señales extrínsecas (como señalización a través de factores de crecimiento). Dentro de los factores de crecimiento conocidos que inducen EMT está el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), diversos miembros de la familia de los factores de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento derivado de los fibroblastos (FGF) (54-60). Recientemente, la señalización a través de Notch ha sido implicada en transición EMT mediante la activación del factor de transcripción Snail2 (Slug), un potente represor de la expresión de E-caderina (12). Cambios en la composición de la matriz extracelular (ECM) también son

capaces de inducir EMT, como se observa con el colágeno tipo I y con el ácido hialurónico (61,62).

Como se mencionó anteriormente, en el proceso de transición epitelio-mesenquimal (EMT), además de la pérdida de las capacidades de adhesión, las células tumorales desarrollan procesos para ganar propiedades de migración e invasión a través de la disrupción célula – célula que ha sido correlacionado con la pérdida de la E-caderina. Esta pérdida puede ser causada por mutaciones somáticas, hipermetilación del promotor o por la acción de represores transcripcionales como Slug, Snail, Twist1 y Zeb-1. La baja regulación de la E-caderina también se ha asociado con el desarrollo de carcinomas invasivos, diseminación metastásica y mal pronóstico (63), y su nivel de expresión es inversamente proporcional con el estado y grado tumoral. Todo esto en conjunto nos indica que la E-caderina puede ser considerada como un “gen supresor de invasión” (64)

## VIII JUSTIFICACION

El Cáncer de Cérvix es una de las neoplasias más frecuentes en países en vías de desarrollo como los nuestros, con un impacto relevante en términos de mortalidad y morbilidad. El tratamiento con quimioterapia y radioterapia se ha convertido en el estándar de manejo para pacientes con enfermedad localmente avanzada logrando beneficio en supervivencia global y libre de recurrencia, sin embargo por razones todavía no establecidas un porcentaje importante de éstas pacientes fallan a la terapia con opciones limitadas posteriores.

Se han intentado establecer características o factores que permitan predecir que pacientes fallarán a la terapia con quimio y radioterapia concomitante y establecer quizás un manejo más enérgico o prolongado en este subgrupo de mayor riesgo. Estas características o factores han sido tradicionalmente clínicos (Tamaño Tumoral, compromiso ganglionar linfático, profundidad de invasión, etc) y es en ellos en los cuales se basan la mayor parte de sistemas de estadificación, sin embargo la evaluación de éstos factores es un reto constante en la práctica clínica y ésta sujeta a errores frecuentes considerando las dificultades en su medición, la variabilidad entre observadores o la disponibilidad para ser utilizadas. De igual manera su utilidad como predictor de respuesta al tratamiento es limitada o nula.

Desde hace varias décadas la caracterización genética de pacientes con cáncer ha permitido el mejor conocimiento del comportamiento biológico de las neoplasias con implicaciones relevantes en identificación de factores pronósticos, predictores de respuesta a tratamiento y desarrollo de nuevas estrategias de manejo. Establecer y analizar marcadores de inducción de EMT, así como marcadores asociados con angiogénesis y proliferación celular puede contribuir a diferenciar grupos de pacientes con un mayor riesgo de recaída tumoral y crear modelos predictivos que integren éstos marcadores y las características clínicas (Tamaño tumoral, ganglios linfáticos, profundidad de invasión, etc.) y caracterizar de una mejor manera a las pacientes con Cáncer de Cérvix localmente avanzado.

## **IX HIPOTESIS**

Los marcadores de transición epitelio mesénquima estarán asociados con la expresión de genes relacionados con la angiogénesis y proliferación tumoral (EGFR, VEGF y HIF-1a) en el tejido tumoral y con la densidad microvascular en dicho tejido.

De igual manera los marcadores de transición epitelio mesénquima se asociaran con supervivencia global y libre de recurrencia en pacientes con Cáncer de Cérvix localmente avanzado (Ib2-IVa), tratados con quimio y radioterapia concomitante, seguido de braquiterapia endocavitaria. La adición de gemcitabine al tratamiento con cisplatino como radiosensibilizador podrá modificar estos desenlaces.

## **X OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

- Evaluar la asociación de los marcadores de EMT (E-caderina y Twist 2) con la densidad microvascular y la expresión proteica (cuantificada por inmunohistoquímica) de los genes VEGF, EGFR y HIF-1a asociados con la supervivencia y proliferación del carcinoma de cérvix localmente avanzado tratado con quimioradioterapia, seguida de braquiterapia endocavitaria en dos grupos de pacientes del Instituto Nacional de Cancerología de México y uno del Centro Oncológico de Colombia. (Fundación para la Investigación Clínica y Molecular en Cáncer).

### **Objetivos Específicos**

- Determinar las características clínicas y demográficas de una población de mujeres con cáncer de cérvix localmente avanzado tratadas con el esquema estándar de manejo en México y Colombia, el cual consiste en quimioradioterapia utilizando Cisplatino, seguido de braquiterapia endocavitaria, así como aquellas tratadas con quimioradioterapia con la combinación de Cisplatino y Gemcitabine, seguido de braquiterapia endocavitaria.
- Determinar el estado de la expresión proteica de los genes de E-caderina, twist 2, VEGF, EGFR y HIF-1a relevantes en el comportamiento del cáncer de cérvix localmente avanzado cuantificando su valor por inmunohistoquímica.
- Evaluar la asociación de la expresión de E-Caderina y Twist2 con los genes conductores de la angiogénesis y la proliferación.
- Evaluar la asociación de la expresión de E-caderina y twist 2 con la tasa de respuesta global (TRG), Supervivencia libre de progresión (SLP), Supervivencia Global (SG) y la mortalidad de acuerdo a los subgrupos de tratamiento analizados (quimioradioterapia con cisplatino y quimioradioterapia con cisplatino-gemcitabina).

## **XI MATERIAL Y METODOS**

### **a. Diseño del estudio**

Es un estudio longitudinal de tres grupos de pacientes con cáncer cervico-uterino en etapas localmente avanzadas en E.C.IB2 a IVA.

Dos grupos de cohortes llevados a cabo en México en el Instituto Nacional de Cancerología y un grupo de cohorte en la Fundación para la Investigación Clínica y Molecular en Cáncer en Colombia.

El primer grupo en base al protocolo número 004-009-OMI que se llevó a cabo desde el 2004 al 2009 actualmente en vías de publicación,

El segundo grupo llevado a cabo en el Instituto Nacional de Cancerología de pacientes tratadas con quimioradioterapia concomitante con el tratamiento convencional de 1999 a 2005, y publicado en BMC woman Health 2006. (65)

El tercer grupo de pacientes llevado a cabo en la Fundación para la Investigación Clínica y Molecular en Cáncer en Colombia, tratadas con quimioradioterapia concomitante con el tratamiento convencional publicado en abstracto en el Congreso Post ASCO-ASH 5.0 (2011) y presentado parcialmente en el Congreso de la European Society of Medical Oncology (ESMO 2011 - Poster N° 8044, publicado en Acta Médica Colombiana 2012 y fue llevado a cabo en el período comprendido de 1999-2008. (66)

Muestra de pacientes:

Grupo 1. 60 pacientes con cáncer de cérvix localmente avanzados (E.C. IB2 a IVA), tratados con QTRT con CDDP a 40 mgs /m<sup>2</sup>/S.C. y gemzar a 125 mgs/m<sup>2</sup>/S.C seguido de Braquiterapia convencional de baja tasa y seguimiento de por lo menos 5 años.

Grupo 2. 60 pacientes con las mismas características con el tratamiento convencional de QTRT con CDDP a 40 mgs /m<sup>2</sup>/S.C. seguido de Braquiterapia de baja tasa en México y con seguimiento de por lo menos 5 años.

Grupo 3. 61 pacientes con las mismas características, tratadas convencionalmente con QTRT con CDDP a 40 mgs /m<sup>2</sup>/S.C. seguido de Braquiterapia en Colombia y con seguimiento de por lo menos 5 años.

### **b. Muestreo y cálculo de la muestra.**

Debido a que este estudio es un análisis exploratorio y que se realizará un modelo proporcional de COX, se considera que por cada variable que se incluya en el modelo deben analizarse 10 pacientes, por tanto el tamaño de muestra por grupo es de al menos 60 pacientes.

### **c. Criterios de selección**

#### *Criterios de Inclusión:*

- Haber participado en alguna de las cohortes descritas.
- Tener un seguimiento en las cohortes de al menos 5 años.
- Confirmación histológica de cáncer cervicouterino estadificado en etapas clínicas localmente avanzadas (E.C. IB2- IVA), que hayan participado en las cohortes previamente mencionadas
- Histología epidermoide, adenoescamoso, adenocarcinoma y carcinoma de células vidriosas
- Sin tratamiento previo
- Enfermedad medible
- Edad entre 18 y 70 años.
- Estado funcional de 0-2 de acuerdo a los criterios de la OMS

#### *Criterios de exclusión:*

- Aquellas pacientes de los tres grupos que no tengan bloques confirmatorios de tejido para realizar las pruebas moleculares propuestas por este protocolo

#### *Pareo de los tres grupos propuestos para este estudio*

Se realizó un pareamiento de las cohortes para intentar homogeneizar al máximo posible la muestra, considerando que cada una de las cohortes tuvo criterios de inclusión, exclusión y eliminación propios lo cual crea poblaciones disímiles que pudiesen generar confusiones en los análisis posteriores de factores pronósticos

#### *Criterios de Pareo*

- Edad = < > 3
- Reporte histopatológico
- Estadio Clínico

### **d. Plan de análisis y Métodos para análisis estudios moleculares**

#### *Pacientes*

La información será extraída de los expedientes clínicos de 180 mujeres con cáncer de cérvix localmente avanzado (Etapas Clínicas FIGO IB2-IVA), tratadas con quimio-radioterapia y braquiterapia en México y Colombia.

Estas pacientes serán valorados de forma independiente por los investigadores que registraran los datos en un formato diseñado para el estudio; luego serán digitadas en una base de datos donde se examinarán usando el paquete

estadístico SPSS® 21.0 (IBM software, Chicago, IL, EE.UU). Se consideraran y analizaran diversas variables clínicas (edad, grado de escolaridad, historia de exposición al humo por combustión del tabaco, número de años de consumo de tabaco, historia de infección por VIH o de lesiones preneoplásicas previas, el estado funcional basal cuantificado por el índice de Karnofsky, la histología y graduación tumoral, el estado tumoral, las dimensiones del primario en centímetros, la presencia de ganglios pélvicos sugestivos de compromiso metastásico, el esquema y dosis de la radioterapia pélvica y de la braquiterapia intracavitaria, la dosis y el número de ciclos de quimioterapia). Se realizará un análisis por subgrupos de cada una de los grupos y el estado al final del seguimiento (viva o muerta, con o sin enfermedad) y diversos desenlaces como la tasa de respuesta global (TRG), SLP, SG y la mortalidad (utilizando los criterios RECIST 1.1) (67).

#### *Inmunohistoquímica*

Las siguientes pruebas se realizarán en el tejido tumoral obtenido al momento del diagnóstico del Cáncer Cervicouterino. Las diferentes pruebas serán realizadas en el Departamento de Patología y el Laboratorio de Oncología Traslacional del Instituto Nacional de Cancerología de México para los dos grupos de pacientes tratadas en México. Para el caso de las pacientes tratadas en Colombia las pruebas de realizarán en el laboratorio de Oncología Traslacional de la Fundación para Investigación Clínica y Molecular en Cáncer (FICMAC).

#### *Determinación de la expresión del VEGF*

Se cortaran secciones de parafina con un grosor de 5 mm, se montaran en portaobjetos de cristal recubiertos de APES (3-aminopropiltriethoxisilano) y desparafinizaran, luego serán tratadas con peróxido de hidrógeno al 0,3% en metanol para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena. Posteriormente, se recuperará el antígeno por inmersión de las preparaciones en un tampón citrato 0,01 (citrato monohidratado 10 mM en agua destilada, pH=6,0). Después, se enfriaran las preparaciones durante 15 minutos, se incubaran durante 30 minutos con suero normal de conejo (NRS, X-0902 DAKO, Carpinteria, CA, USA), se diluirán al 1,5 en solución salina tamponada con fosfato (PBS) para reducir la tinción inespecífica de las zonas vecinas y se incubarán durante 60 minutos con VEGF antihumano (anticuerpo policlonal, AB-293-NA, sistemas R&D, Oxford, Reino Unido) diluido al 1:100 en PBS. Después de tres lavados con PBS, las preparaciones se incubaran con anticuerpos biotinilados anticabra/conejo (RAG, E-0466 DAKO, Carpinteria, CA, USA) diluido en 1:350 durante 30 minutos. Ulteriormente, se expondrán al complejo peroxidasa biotina-estreptavidina (DAKO, Glostrup, Dinamarca) durante 30 minutos y se utilizará como cromógeno el tetracloruro de diaminobencidina (DAB) (SIGMA, Poole, Dorset, Reino Unido). Se realizará la contratinción con hematoxilina de Mayer. Una preparación positiva servirá como control significativo, y como control negativo se utilizará la omisión del anticuerpo primario. Para la evaluación de la expresión del VEGF se seguirán los métodos de puntuación general descritos previamente por Kimura y colaboradores (68). En resumen, usando un aumento de 200 (cámara de 0,12 mm<sup>2</sup>), la expresión de VEGF se graduará semicuantitativamente en dos grupos:

<10% y ≥10% de células tumorales teñidas como expresión negativa y positiva, respectivamente.

#### *Determinación de la expresión del EGFR*

Siguiendo el proceso descrito para el tratamiento del tejido tumoral embebido en parafina se realizará la tinción para el EGFR usando el anticuerpo policlonal (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) IgG de conejo dirigido contra el receptor. El anticuerpo se diluirá 1:100 en PBS. Como controles positivos se emplearan muestras de carcinomas de mama y los controles negativos se realizaran con el mismo tejido del cérvix sin exposición al anticuerpo. Los casos se consideraran como positivos si la tinción es al menos 2 veces superior (2+) en una escala de 1 a 4+, y si el 10% o más de las células tumorales estuvieran teñidas sobre el trasfondo sano o sobre el control negativo (69).

#### *Determinación de la expresión del HIF-1 $\alpha$*

El tejido embebido en parafina se expondrá al anticuerpo monoclonal anti-HIF1 $\alpha$  (H72320; BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ, USA) evaluando la expresión nuclear de forma semicuantitativa siguiendo el porcentaje de células afectadas y la intensidad de la tinción. Los casos con menos del 10% de células positivas se consideraran negativos, y el resto serán positivas, valorando la reactividad como débil (11%-50%), moderada (51%-80%) y fuertemente positiva (>80%). Se descartaran las áreas con necrosis, excepto si presentaban formaciones tumorales adyacentes

#### *Determinación de la densidad microvascular*

Las células endoteliales se teñiran con CD31 (anticuerpo monoclonal, clon JC/70A, isotipo IGG1, kappa, M-0823, DAKO, Carpinteria, CA, USA) en una dilución 1/40 (68). La densidad de los vasos sanguíneos se determinará en zonas con gran vascularización, en función de los criterios propuestos por Wedner y colaboradores (70). En estas áreas, la densidad de la microvasculatura se medirá por un analizador digital de imágenes (aumento de 200 y campo de 0,24 mm<sup>2</sup>), como fue descrito previamente por Tjalma y colaboradores (71)

#### *Determinación de TWIST2*

El tejido embebido en parafina se expondrá al anticuerpo monoclonal de ratón anti TWIST2 (3E10 de ABCAM, Reino Unido). Se analizará mediante inmunohistoquímica determinando inmunoreactividad citoplasmática y nuclear. La tinción citoplasmática será medida por extensión e intensidad la cual se graduará en una escala arbitraria de 0 a 3: 0 negativa; 1 débil; 2 moderada y 3 fuerte. La tinción nuclear será medida usando amplificación 400 x y 100 núcleos serán contados de acuerdo al porcentaje de núcleos que muestren inmunoreactividad en "hot spot". El porcentaje de inmunoreactividad será luego graduada de 1 a 3 de la siguiente manera: 0: menor a 5%, 1: 5-10%, 2: 20-50% y 3 mayor al 50%.Un

puntaje de 2 a 3 se considerará como alto nivel de expresión y un puntaje de 0 a 1 como bajo nivel de expresión.

#### *Determinación de E-Caderina*

El tejido embebido en parafina se expondrá al anticuerpo monoclonal de conejo anti E-caderina (EP700Y de ABCAM, Reino Unido). Se analizará mediante inmunohistoquímica reactividad a nivel de membrana celular y citoplasmática para E-Caderina. En membrana celular será medido de acuerdo a los niveles de inmunoreactividad de la siguiente manera: 0: negativo (menor a 10% de las células positivas), 1 reactivo débil (70% de las células positivas), 2 reactivo moderado (mayor a 70% de las células con nivel bajo o intermedio) y 3 reactivo fuerte (mayor a 70% de las células con nivel alto). La inmunoreactividad Citoplasmático para E-Caderina será graduada de manera similar a lo descrito previamente para TWIST2 y se interpretará como normal o aberrante.

#### **e. Análisis estadístico**

Los resultados se obtendrán y describirán por medio de la determinación de frecuencias absolutas, relativas, medidas de tendencia central y de dispersión. El análisis bivariado se realizará con tablas de contingencia sometidas a pruebas de dependencia y asociación utilizando la prueba de Q de Cochran para un análisis pareado de 3 grupos y 2 categorías. Para todos los casos, el nivel de significancia será de  $p < 0,05$ . Las estimaciones de supervivencia se realizaran utilizando el modelo no paramétrico del límite del producto (método de Kaplan-Meier), y sus funciones se compararan mediante la prueba Log-rank. Con el fin de valorar los factores que influyeron sobre la supervivencia se realizará un análisis multivariado utilizando el modelo proporcional de Cox ("stepwise model") ajustando por estadio clínico, histología, edad, tratamiento previo, país de origen y tamaño del tumor

El presente estudio fue aprobado por los comité de ética e investigación de los centros participantes en el estudio (013/013/ICI) (CEI/844).

## XII RESULTADOS

### a) Características Generales de la población

En este estudio se realizó un análisis preliminar con un grupo de 61 mujeres pertenecientes a la cohorte de Colombia. Las edades de éstas pacientes fueron entre los 29 y 75 años. El 92% de la población tenía menos de 65 años, la gran mayoría presentaba un estado funcional adecuado (índice de Karnofsky mayor al 70%). Cerca de la mitad de las pacientes en estudio no presentaban antecedentes de exposición al humo por combustión del tabaco, y en las 12 mujeres que reportaron ser fumadoras, la media de años de consumo fue de doce. Respecto a antecedente de lesiones preneoplásicas, en el 47% de los casos no fue posible obtener datos referentes a estudios de cribado previos, evidenciándose solo positividad para el VPH en una mínima cantidad de mujeres (n=7); ninguna tenía historia de infección por VIH.

El tipo histológico más frecuente fue el carcinoma escamoso (n=58), 47.5% y 6.6% fueron moderadamente y mal diferenciados respectivamente. En el 51% (n=31) presentaban un volumen tumoral superior a los 6 cm; de acuerdo a la clasificación FIGO al momento del diagnóstico el 2.3%, 47.5%, 4.9%, 37.7% y 3.3% tenían lesiones estados IIA, IIB, IIIA, IIIB y IVA, respectivamente. Sólo una minoría de los casos tuvo evaluación invasiva de los ganglios pélvicos que fueron positivos en 5 mujeres. La Tabla 1 resume las características principales de la cohorte mencionada.

**Tabla 1.** Características de la población en estudio.

Variable	N (%)
<b>Edad (media, DE)</b>	52 ( $\pm$ 10)
<b>Edad por estratos</b>	
<65 años	56 (91.8)
$\geq$ 65 años	5 (8.2)
<b>Estado funcional (IK)</b>	
<70	10 (16.4)
$\geq$ 70	37 (60.7)
ND	14 (23.0)
<b>Grado escolaridad</b>	
Primaria	14 (23.0)
Bachillerato	9 (14.8)
Vocacional/técnico	13 (21.3)
Posgrado	1 (1.6)
Ninguno	10 (16.4)

ND	14 (23.0)
<b>Antecedente tabaquismo</b>	
No fumador	29 (47.5)
Fumador	12 (19.7)
ND	10 (16.4)
<b>Número de años de exposición al tabaco (media, DE)</b>	12 ( $\pm$ 7)
<b>HIV (+)</b>	0
<b>Historia de lesión preneoplásica</b>	
Si	13 (21.3)
No	19 (31.1)
ND	29 (47.5)
<b>Historia de infección por virus del papiloma humano (VPH)</b>	
Si	7 (11.5)
No	26 (42.5)
ND	28 (45.9)
<b>Histología</b>	
Escamoso	58 (95.1)
Adenocarcinoma	2 (3.3)
Adenoescamoso	1 (1.6)
<b>Grado histológico</b>	
Gx	18 (29.5)
G1	10(16.4)
G2	29 (47.5)
G3	4 (6.6)
<b>Tamaño tumoral (media, DE)</b>	6.4 cm ( $\pm$ 1.8)
<b>Estado clínico (FIGO)</b>	
IIA	2 (2.3)
IIB	29 (47.5)
IIIA	3 (4.9)
IIIB	23 (37.7)
IVA	2 (3.3)
Desconocido	2 (3.3)
<b>Ganglios pélvicos positivos (biopsia escisional o BACAF)</b>	
Si	5 (8.2)
No evaluados	56 (91.8)

FIGO: Federation International Gynecology Oncology; BACAF: biopsia por aspiración con aguja fina.

En 25 pacientes se interrumpió la teleterapia de forma no programada debido a toxicidad (principalmente por diarrea [12 casos] y por cistitis actínica [4 casos]) y en 12 mujeres se detuvo el tratamiento por limitaciones asistenciales de orden administrativo. El 75% de las pacientes completó la braquiterapia de alta tasa y el número promedio de series de cisplatino administrados durante la concomitancia fue de 4 (DE±1). Después de finalizar el tratamiento oncológico, el 47% de las pacientes había logrado respuesta clínica y por imagen completa, y el 25% parcial. Sólo en 8 casos se documentó enfermedad estable o en progresión, y en 9 mujeres fue imposible obtener información referente al resultado final del tratamiento. La mediana de seguimiento fue de 13.2 meses, periodo en el cual se encontró progresión de la enfermedad en 31 casos. En la Tabla 2 se encuentran discriminados los desenlaces después de la administración de la quimiorradiación y de la braquiterapia endocavitaria.

**Tabla 2.** Desenlaces principales después de la administración de la quimiorradiación.

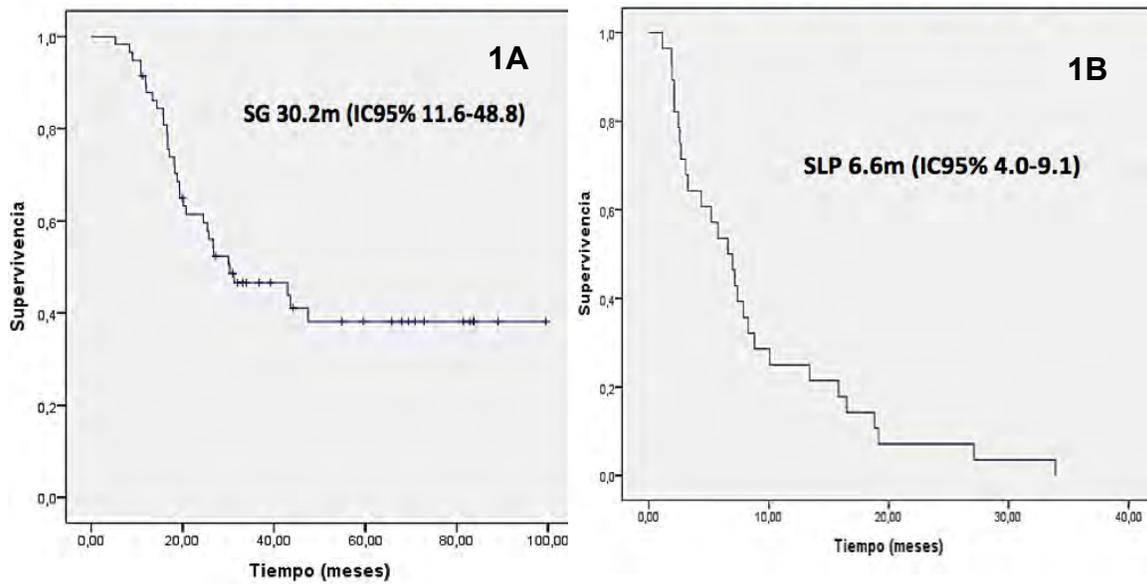
<b>Desenlaces</b>	<b>N (%)</b>
<b>Interrupciones no programadas en la teleterapia</b>	
No	33 (54.1)
Si, por toxicidad	13 (21.3)
Si, por otras razones	12 (19.7)
ND	3 (4.9)
<b>Tratamiento completo con braquiterapia de alta tasa</b>	
Si	46 (75.4)
No	11 (18.0)
ND	4 (6.6)
<b>Número de ciclos de carbo o cisplatino semanal</b>	
1	2 (3.3)
2	3 (4.9)
3	7 (11.5)
4	10 (16.4)
5	16 (26.2)
6	21 (34.4)
ND	2 (3.3)
<b>Estado clínico postratamiento</b>	
Ausencia de tumor	28 (45.9)
Tumor residual	19 (31.1)

Desconocido	14 (23.0)
<b>Estado tomográfico postratamiento</b>	
Respuesta completa	29 (47.5)
Respuesta parcial	15 (24.6)
Enfermedad estable	5 (8.2)
Enfermedad en progresión	3 (4.9)
Desconocido	9 (14.8)
<b>Progresión de la enfermedad</b>	
Si	31 (50.8)
No	23 (37.7)
Desconocido	7 (11.5)

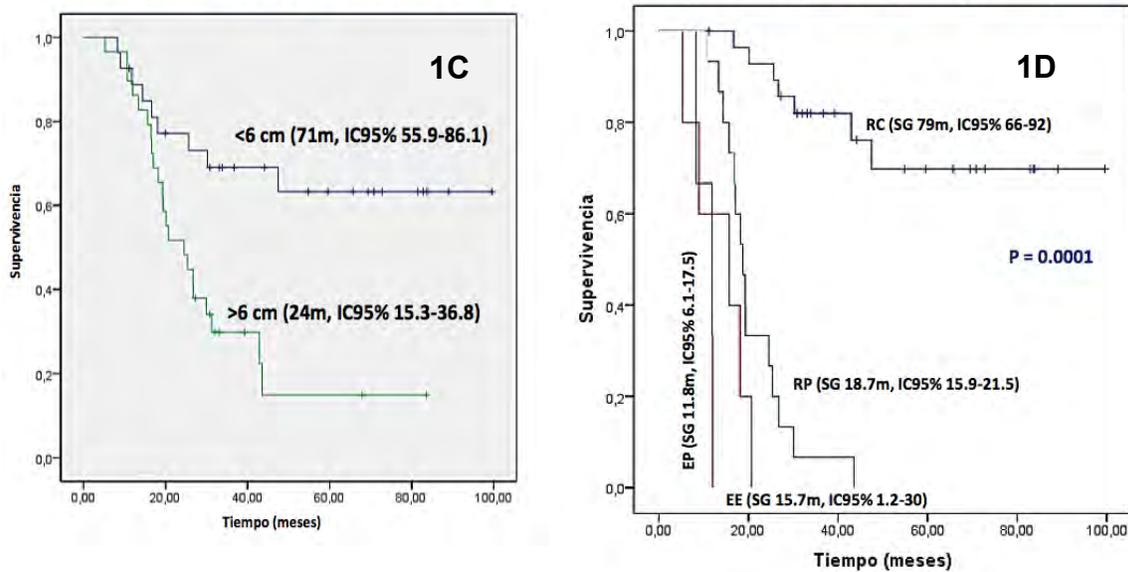
**b) Desenlaces clínicos interés globales y de acuerdo factores pronósticos clínicos**

Las medianas de SG y la SLP en la población general fueron 30.2 meses (IC95% 11.6-48.8) y 6.6 meses (IC95% 4.0-9.1), respectivamente (Figuras 1A y 1B). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al discriminar la SLP según el tamaño tumoral (8.7 meses para las lesiones menores de 6 centímetros y 9.1 meses para las mayores de 6 centímetros;  $p=0.85$ ), pero si al valorar la SG según esta variable (71 meses para las lesiones menores de 6 centímetros y 24 meses para las mayores de 6 centímetros;  $p=0.02$ ) (Figura 1C). La SLP ( $p=0.0001$ ) y la SG ( $p=0.0001$ ) fueron significativamente superiores entre las pacientes que lograron respuesta imaginológica completa; relación que no fue positiva para la SLP según el grado tumoral ( $p=0.23$ ), pero si para la estadificación siguiendo la clasificación FIGO (mayor tiempo sin evidencia de progresión entre los pacientes con lesiones estados IIA y B;  $p=0.004$ ). Los hallazgos fueron similares para la SG, que también fue influenciada por el estado tumoral ( $p=0.01$ ). (Figura 1D)

**Figura 1A y 1B:** Supervivencia Global y Supervivencia Libre Progresión



**Figura 1C y 1D:** Supervivencia Global según tamaño tumoral y tipo de respuesta



### c) Relación de la expresión de genes de EMT y genes de proliferación celular y angiogénesis

El 46% de las pacientes presentaron inmunoreactividad para EGFR sin que este hallazgo fuera modificado por el tamaño tumoral ( $p=0.49$ ), el estado ( $p=0.40$ ), o el grado histológico ( $p=0.12$ ). El 57% de las pacientes con expresión positiva del EGFR tuvieron una alta reactividad para el VEGF evento que se relacionó en esas 16 mujeres con un impacto negativo sobre la SG ( $p=0.0001$ ). El 50% de las pacientes tuvieron una expresión anormal del HIF-1 $\alpha$  siendo mayor entre quienes presentaban neoplasias moderadamente diferenciadas, tumores en estado IIIB, con elevación en el VEGF y la DMV; entre estos, hubo una correlación estadísticamente significativa para el ligando del VEGFR ( $p=0.04$ ), y para la expresión del CD31 ( $p=0.03$ ).

El 50.8% de las mujeres tuvo alteraciones en la DMV, evento que no fue dominante para las lesiones de mayor gradación ( $p=0.26$ ), en aquellas con un estado tumoral superior a II ( $p=0.35$ ) o en las que midieron más de 6 cm ( $p=0.13$ ). No hubo relación entre una DMV anormal y el tipo de respuesta ( $p=0.38$ ), pero si una tendencia positiva a que la infiltración vascular fuera dominante en el segmento de mujeres menores de 50 años ( $p=0.06$ ). El 88% y 62% de las mujeres con DMV alterada tuvieron una alta expresión de VEGF y HIF1- $\alpha$ , respectivamente; en las mujeres con mayor reactividad para las proteínas codificadas por los genes relacionados con angiogénesis se encontró una relación positiva para los cambios estructurales valorados por la DMV ( $p=0.027$ ).

El 42.6 % ( $n= 26$ ) de las pacientes tuvieron expresión alta de TWIST2 y esta se relacionó en el 34.4% con positividad para expresión de EGFR y en 31% con positividad para expresión de VEGF. El 11.5% de la población tuvo expresión de los tres genes TWIST2, EGFR y VEGF. El 18% ( $n=11$ ) fue negativo para expresión de E-caderina; en el 9.8% esta negatividad se relacionó con expresión de EGFR y en el 6.6% con expresión de VEGF. Solo el 4.9% de las pacientes presentaron las características E-Caderina negativa, EGFR positivo y VEGF positivo. La tabla 3 y 4 describe el estado de expresión marcadores de EMT y su relación con genes de proliferación celular y angiogénesis.

**Tabla 3.** Expresión proteica marcadores transición epitelio mesenquimal (EMT)

Expresión nuclear TWIST2		Expresión E-Caderina	
Valor	N (%)	Valor	N (%)
Baja expresión	29 (47.5)	Positiva	13 (21.3)
Alta expresión	26 (42.6)	Debil-Moderada	34 (55.7)

<b>No dato</b>	6 (9.8)	<b>Ausente</b>	11 (18.0)
-	-	<b>No dato</b>	3 (5.0)
Total	61 (100)		61 (100)

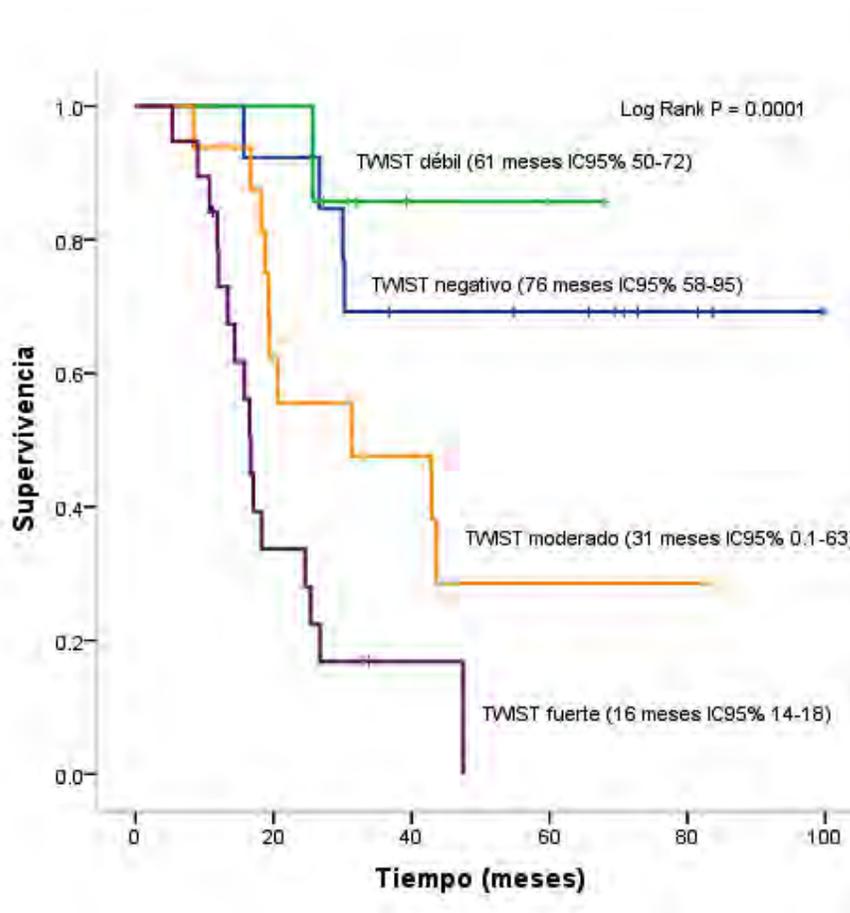
**Tabla 4.** Relación expresión de EMT y genes de proliferación celular y angiogénesis.

<b>EGFR (+)/TWIST2 (+)</b>		<b>VEGF (+)/TWIST2 (+)</b>
	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>
<b>Si</b>	21 (34.4)	19 (31.1)
<b>No</b>	34 (55.7)	40 (65.6)
<b>No dato</b>	6 (9.8)	2 (3.3)
<b>EGFR (+)/E-Caderina (-)</b>		<b>VEGF (+)/ E-Caderina (-)</b>
	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>
<b>Si</b>	6 (9.8)	4 (6.6%)
<b>No</b>	48 (78.7)	52 (85.2)
<b>No dato</b>	7 (11.5)	5 (8.2)
<b>EGFR (+)/VEGF (+)/TWIST2 (+)</b>		<b>EGFR (+)/VEGF (+)/E-Caderina (-)</b>
<b>Si</b>	7 (11.5)	3 (4.9)
<b>No</b>	53 (86.9)	57 (93.4)
<b>No dato</b>	1 (1.6)	1 (1.6)

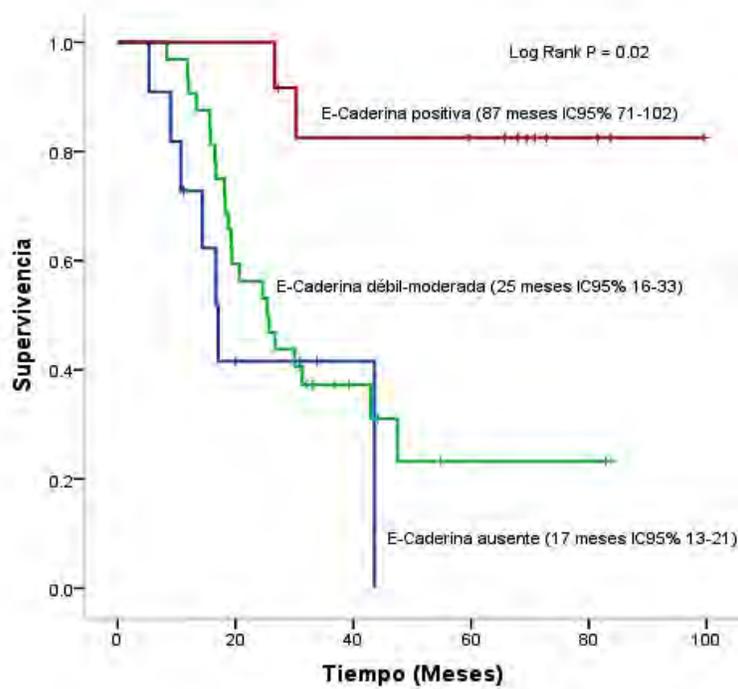
**d) Desenlaces clínicos de interés de acuerdo a marcadores de EMT y expresión de genes de proliferación y angiogénesis.**

Cuando se analizó al SG de acuerdo a la presencia de marcadores de EMT (Expresión de TWIST2 y/o no expresión de E-caderina), encontramos que la positividad para TWIST 2 tuvo un impacto negativo en la SG. Aquellas pacientes con positividad fuerte para TWIST 2 tuvieron una SG de 16 meses (IC 95% 14-18 meses) comparados con aquellas pacientes con TWIST negativo que mostraron una SG media de 76 meses (IC 95% 58-95 meses)  $p=0.0001$ . De igual forma cuando se analizó la SG de acuerdo a la no expresión de E-caderina la SG fue menor (mediana de SG 17 meses IC 95% 13-21 meses) comparados con aquellos con E-Caderina positivos (87 meses IC 95% 71-102 meses)  $p=0.02$ . Las figuras 2A y 2B muestran la relación entre los marcadores de EMT y la SG. La presencia de marcadores de EMT no afecto la SLP (Figura 2C y 2D)

**Figura 2A** Supervivencia Global según expresión de TWIST2

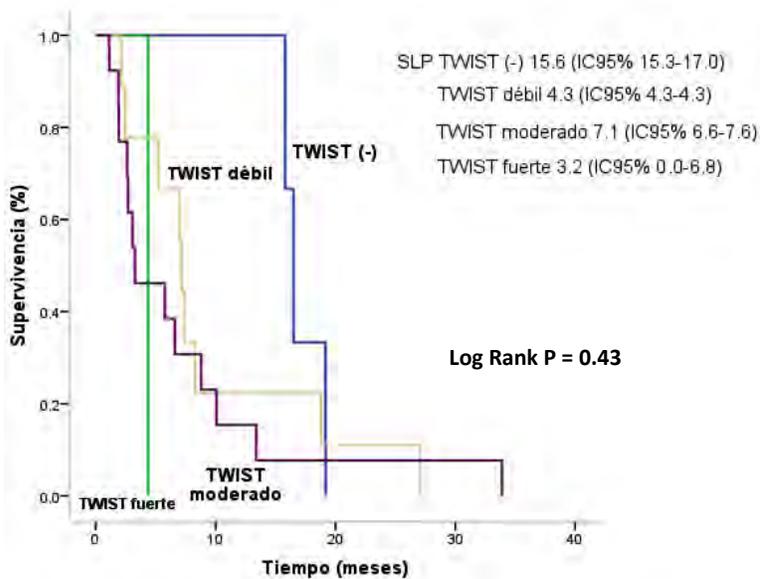


**Figura 2B** Supervivencia Global según expresión de E-caderina

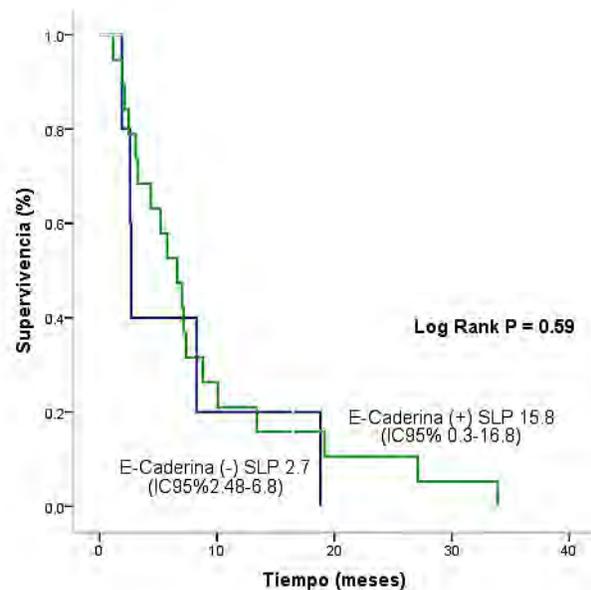


**Figura 2C y 2D** Supervivencia Libre de progresión según expresión de TWIST2/E-caderina respectivamente

**2C**

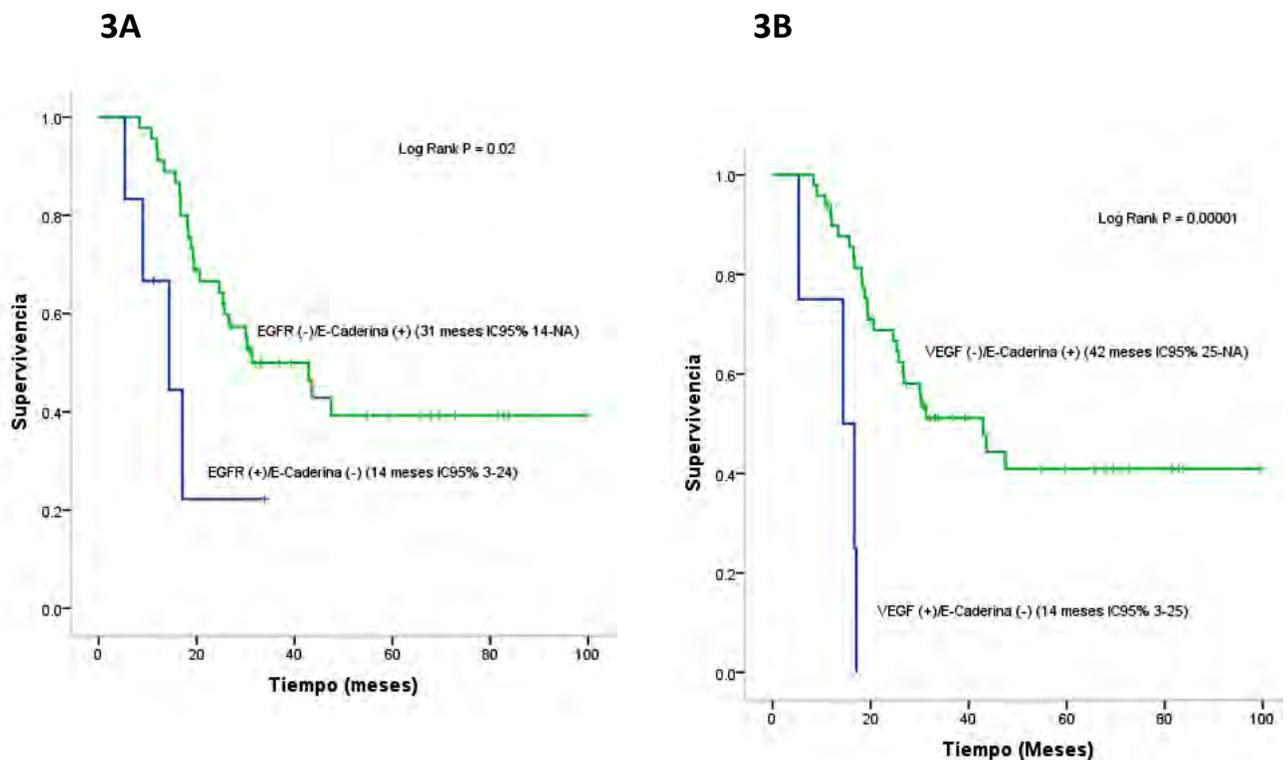


**2D**



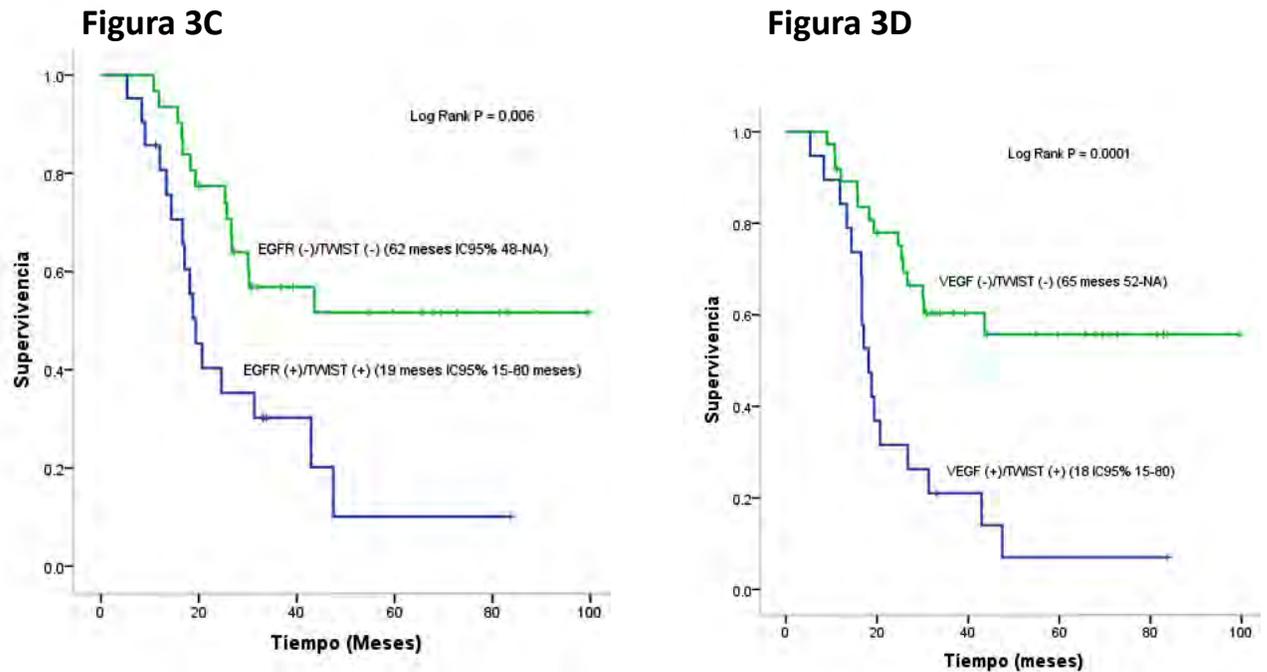
Cuando se asoció la positividad para expresión de genes relacionados con proliferación y angiogénesis (EGFR o VEGF) con la presencia de marcadores de EMT el impacto en la supervivencia global fue incluso mayor al observado para la sola positividad de marcadores de EMT. Cuando EGFR positivo se asoció a E-Caderina negativo la SG observada fue de 14 meses (IC 95% 3-24 meses) comparado con EGFR negativo asociado E-Caderina positivo (mediana 31 meses IC 95% 14-NA)  $p=0.02$ . De igual manera la expresión de VEGF asociado a E-caderina negativo tuvo un impacto negativo en SG [VEGF negativo + E caderina positivo mediana SG 42 meses (IC 95% 25-NA meses) comparado con VEGF positivo + E caderina negativo mediana SG 14 meses (IC 95% 3-25 meses);  $p=0.00001$ . Las figuras 3A y 3B muestran el comportamiento de SG de acuerdo a la expresión EGFR y E-caderina y de acuerdo a la expresión VEGF y E-caderina respectivamente.

**Figura 3A Y 3B** Supervivencia Global según la expresión de EGFR/E-caderina y VEGF/E-caderina



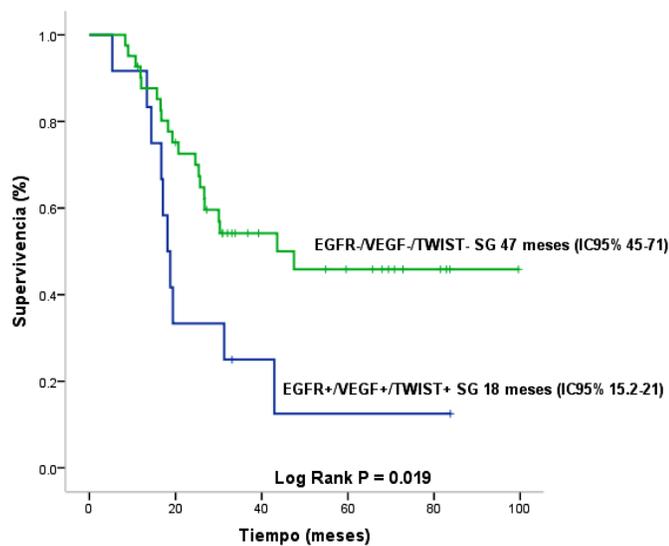
Al analizar el impacto en la SG de acuerdo a la coexpresión de TWIST2 y EGFR o VEGF se evidenció un efecto similar al descrito previamente para E-caderina. Las figuras 3C y 3D muestran esta relación.

**Figura 3C y 3D** Supervivencia Global según la expresión de EGFR/TWIST2 y VEGF/TWIST2



La expresión de tres marcadores en conjunto TWIST2, EGFR y VEGF también tuvo un impacto significativo en la SG. Figura 4

**Figura 4** Supervivencia Global según la expresión de TWIST2, EGFR y VEGF



XLa expresión anormal de genes asociados a proliferación celular y angiogénesis (EGFR, del VEGF y HIF-1 $\alpha$ ) impactaron en SG sin afectar la SLP (Tabla 5). Al término del seguimiento el 57% de las mujeres había muerto, evento influenciado en el análisis multivariado de riesgos proporcionales por la expresión del EGFR VEGF y TWIST2; para la pérdida de E-caderina el valor de p fue limítrofe. (Tabla 6). En 33 casos la causa de muerte estuvo relacionada con la progresión de la enfermedad especialmente a nivel locoregional, y en 2 mujeres fue imposible determinar la causa de muerte

**Tabla 5** Expresión proteica genes asociados a proliferación/angiogénesis y su relación con los principales desenlaces en estudio.

Variable	Resultado N (%)	SLP (meses, IC95%)	P	SG (meses, IC95%)	P
<b>EGFR</b>					
Alterada	28 (45.9)	3.0 (1.7-5.3)	0.69	20 (12.4-28.2)	0.030
Negativa	26 (42.6)	5.2 (0.3-11.7)		48.5 (36.4-60.7)	
ND	7 (11.5)	-			
<b>DMV</b>					
Normal	21 (34.4)	2.7 (1.8-3.5)	0.60	25.6 (0.8-58.3)	0.66
Alterada	31 (50.8)	6.7 (4.2-8.9)		26.7 (11.0-42.4)	
ND	9 (14.8)	-		-	
<b>VEGF</b>					
Baja	24 (39.3)	3.0 (0.7-5.3)	0.65	58 (44.5-71.5)	0.026
Moderada	10 (16.4)	-		-	
Alta	19 (31.1)	1.2 (0.6-1.8)		18.7 (15.1-22.4)	
Ausente	4 (6.6)	8.0 (4.6-11.4)		26.6 (9.0-44.2)	
ND	4(6.6)	-		-	
<b>HIF</b>					
Alterada	30 (49.2)	4.3 (1.0-7.7)	0.59	24.0 (7.1-42.0)	0.037
Negativa	23 (37.7)	7.0 (4.3-9-7)		52.0 (40.0-63.0)	
ND	8 (13.1)			-	

**Tabla 6** Análisis multivariado para la supervivencia global (Modelo de Cox).

Variable	P	IC95%	
		Inferior	Superior
TWIST2	0.001	1.621	6.747

<b>E-Caderina</b>	0.052	1.035	2.173
<b>EGFR+/VEGF+/TWIST+</b>	0.663	0.191	2.863
<b>EGFR</b>	0.015	1.661	12.660
<b>Densidad microvascular</b>	0.704	0.153	3.556
<b>HIF1<math>\alpha</math></b>	0.15	0.52	54.5
<b>VEFG</b>	0.002	1.419	4.684
<b>Tamaño tumoral</b>	0.073	0.928	5.245
<b>FIGO</b>	0.525	0.470	1.470
<b>Infección HPV</b>	0.244	0.350	1.306
<b>ECOG basal</b>	0.868	0.328	3.755
<b>Compromiso ganglionar</b>	0.126	0.198	1.221
<b>Exposición a tabaco</b>	0.873	0.416	2.809

### **XIII DISCUSION**

El cáncer de cérvix continúa ocupando los primeros lugares en prevalencia y letalidad por cáncer en nuestros países; tanto en México como en Colombia constituye la segunda neoplasia más común y la segunda causa de muerte por cáncer (5-8).

El tamizaje mediante la citología cervicovaginal ha permitido una disminución dramática en la frecuencia y mortalidad de esta neoplasia, sin embargo nuestros países continúan rezagados en la implementación y cobertura de ésta estrategia de tamizaje por diversas razones económicas y geopolíticas.

El papel de la infección por el virus del papiloma humano (VPH) en el desarrollo del cáncer de cérvix es bien conocido. La generación de varias oncoproteínas (E6 y E7 principalmente) por parte de éste virus interfiere en la capacidad de la célula del epitelio cervical para regular la proliferación y crecimiento celular al afectar genes primordiales (RB, P53) que intervienen en el control del ciclo celular y la muerte celular programada o apoptosis (15-17).

Así mismo el aumento de la expresión de genes relacionados con la proliferación celular y la angiogénesis parece estar ligado estrechamente a la infección por VPH. Diversos estudios han demostrado que las oncoproteínas de VPH (especialmente E6) promueven la expresión de VEGF a través de diversos mecanismos como inhibición de trombospondina 1, aumento de niveles de HIF1 $\alpha$ , entre otros, derivando en angiogénesis (24,25). Diversos marcadores de angiogénesis han sido evaluados en pacientes con cáncer cervicouterino relacionándose con desenlaces clínicos adversos. El aumento en la densidad

microvascular (DMV) medida por cuantificación de la expresión de CD31 se ha relacionado con un pronóstico adverso en pacientes con cáncer cervicouterino. Un estudio fase III en pacientes con cáncer de cérvix demostró que el aumento de DMV se relacionaba con peor SLP y SG (25); similares resultados arrojó un estudio realizado en población mexicana en donde 118 pacientes fueron evaluadas para DMV encontrando un pronóstico adverso para aquellas con DMV de 20 vasos/mm<sup>2</sup> (72); en contraposición un estudio en población colombiana no encontró que la DMV impacte negativamente en la SG ni en la SLP. (66). En nuestro estudio la DMV no influyó en los principales desenlaces clínicos evaluados.

La expresión HIF1 $\alpha$ , uno de los principales reguladores del proceso de angiogénesis, se ha relacionado con las oncoproteínas E6 y E7 del VPH (37). De igual manera en diversos estudios se ha demostrado que la expresión elevada de HIF1 $\alpha$  impacta negativamente en los desenlaces clínicos evaluados (39-41). En nuestro estudio la expresión de HIF1 $\alpha$  no impactó en SG ni en SLP.

VEGF al unirse a algunos de sus receptores en especial al receptor tipo 2 (VEGFR-2) activa diversas señales de proliferación, migración, supervivencia y reorganización del citoesqueleto; estas señales tienen como objetivo más destacado la proliferación endotelial y formación de la neovasculatura (30-32).

Gaffney y colaboradores demostraron que la expresión elevada de VEGF en el tejido tumoral medida por Inmunohistoquímica en pacientes con cáncer de cérvix EC IB2- IVA tratadas con Radioterapia influyó negativamente en la SG (30) Adicionalmente analizaron otros marcadores de angiogénesis como CD34, demostrando que la expresión elevada de éste marcador impacta también de manera negativa en la SG. En concordancia nuestro trabajo logra también demostrar que la sobreexpresión de VEGF influye negativamente en la SG de las pacientes con cáncer de cérvix; nuestro estudio tiene la ventaja de haber analizado un grupo mayor de pacientes, analizar los resultados con una estrategia de tratamiento estándar en la actualidad como es la quimio-radioterapia seguida de braquiterapia endocavitaria y haberse realizado un ajuste de los resultados teniendo en cuenta otros factores clínicos además del estadio clínico que hubiesen podido influenciar los desenlaces clínicos evaluados; de ésta manera es evidente que la expresión elevada de VEGF impacta de manera negativa en el pronóstico de éstas pacientes y es independiente de la presencia de factores clínicos presentes.

Se ha demostrado que la presencia de marcadores de transición epitelio-mesenquimal (EMT) se relaciona con invasión y progresión celular tumoral en tejidos analizados de pacientes con cáncer de cérvix (73,74). De manera particular la expresión de la oncoproteína E7 del VPH se ha relacionado con inducción de cambios característicos de EMT (75). Myong y colaboradores demostraron que la pérdida de E-caderina y la adquisición de vimentina (marcadores de EMT) estuvieron presentes en pacientes coreanas con carcinoma epidermoide de cérvix (invasor o microinvasor) pero no en aquellas pacientes con lesiones preinvasoras (76), definiendo así a EMT como un conjunto de características que denotan proliferación, crecimiento y capacidad invasora en pacientes con cáncer de cérvix. En concordancia con estos estudios nosotros logramos demostrar que la presencia de marcadores de EMT denota agresividad tumoral y esto impacta

negativamente en el pronóstico de pacientes con cáncer de cérvix. En nuestro estudio la presencia de TWIST 2 y pérdida de E-caderina se relacionó con una menor SG, traduciendo los diversos hallazgos en estudios preclínicos en probables aplicaciones clínicas al definir marcadores pronósticos en pacientes con cáncer de cérvix.

Diversos estudios en modelos de líneas celulares tumorales han logrado demostrar la relación existente entre la presencia de inductores de angiogénesis (ej anoxia/hipoxia, HIF-1 $\alpha$ ) con la presencia de marcadores de transición epitelio-mesénquimal (EMT). HIF-1 $\alpha$  induce transición epitelio-mesénquimal a través de reguladores de EMT incluyendo SNAI1; así mismo la expresión de factores relacionados con EMT ejercen una retroalimentación positiva sobre los niveles de SNAI1 a través de activación de receptores de crecimiento relacionados con las vías de señalización MAPK y PI3K generándose así un círculo continuo entre angiogénesis y EMT (77,78). Estudios realizados en líneas celulares tumorales o células preinvasoras han demostrado que al adicionar VEGF a los cultivos celulares se induce la aparición de marcadores de EMT generando crecimiento, proliferación y capacidad de invasión de éstas células (79, 80). Nuestro estudio logra demostrar *in vivo* que la expresión elevada de VEGF se relaciona con la presencia de marcadores de EMT y esta asociación se relaciona con una menor supervivencia global, siendo en nuestro conocimiento el primer estudio en demostrar el impacto de esta asociación en pacientes con cáncer de cérvix. La expresión de marcadores de EMT tiene relevancia primordial en pacientes con cáncer de cérvix que pudiesen ser candidatas a terapias anti-VEGF; un trabajo recientemente presentado por Tewari y colaboradores en la reunión anual de la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO 2013) demostró que la adición de bevacizumab, una terapia anti VEGF, a la quimioterapia en pacientes con cáncer de cérvix recurrente o metastásico reduce en 19% el riesgo de muerte aumentando la SG en comparación con aquellas pacientes que no recibieron esta terapia (81) Diversos estudio en modelos celulares y clínicos han demostrado que EMT es uno de los mecanismos de resistencia a las terapias anti-VEGF (82,83), podríamos por tanto postular a EMT como un conjunto de marcadores predictivos de respuesta a ésta terapia, es necesario por consiguiente realizar trabajos enfocados a evaluar EMT en éste contexto.

La sobreexpresión de EGFR se ha relacionado con un peor pronóstico en pacientes con cáncer de cérvix. Diversos estudios clínicos han demostrado que la expresión elevada de EGFR impacta negativamente en SLP y en SG (referencias); en concordancia con éstos estudios nuestra trabajo logra demostrar que la sobreexpresión de EGFR se asoció con una menor SG y fue un factor independiente para este desenlace.

Buscando relacionar estos complejos procesos celulares se ha logrado identificar que la presencia de hipoxia induce la sobreexpresión de EGFR y este fenómeno lleva a la aparición de fenotipos celulares con características de transición epitelio-mesénquimal (85). Nuestro estudio logra demostrar que la sobreexpresión de EGFR se relaciona con la presencia de marcadores de EMT y de manera relevante que ésta asociación tienen influencia en el pronóstico. La presencia de los tres fenómenos (angiogénesis medido por expresión de VEGF, sobreexpresión

de EGFR y presencia de EMT) tuvo un impacto negativo en términos de SG en nuestras pacientes evaluadas.

Modelos preclínicos y clínicos han demostrado que uno de los mecanismos resistencia a terapias anti EGFR es la presencia de transición epitelio-mesenquimal. Con los resultados de nuestro estudio podríamos demostramos que un porcentaje de las pacientes que sobreexpresan EGFR tienen marcadores de EMT y que tal vez esta asociación pudiese ser la explicación a la no respuesta a las terapias anti-EGFR que se han intentado utilizar en las pacientes con cáncer de cérvix (85-87), por supuesto son necesarios ensayos clínicos prospectivos que respondan a éste cuestionamiento.

Nuestro estudio tiene algunas limitaciones en especial las que tienen que ver con el número limitado de pacientes analizados, esto pudiese explicar en parte el no impacto que se observó con los resultados en la supervivencia libre de progresión; sin embargo es de resaltar que el presente reporte corresponde a un preliminar del inicialmente planteado, es posible que ésta limitación sea superada una vez completado el análisis en toda la muestra planeada.

No es posible plantear con estos resultados alguna influencia del tipo de tratamiento de quimioterapia dado como concomitancia, ya que toda la población analizada corresponde a pacientes tratados con cisplatino como quimioterapia concomitante a la radioterapia. Esperaremos los resultados del presente estudio en aquellas pacientes tratadas con cisplatino y gemcitabine.

Resulta relevante en el establecimiento del pronóstico de las pacientes con cáncer de cérvix contar con la genotipificación que incluya el patrón mesenquimal. Es posible que éstas características permitan definir una mejor terapia, incluida aquellas terapias blanco que ya han demostrado beneficio en éstas pacientes.

#### **XIV CONCLUSIONES**

Los desenlaces encontrados en la serie son equivalentes a estudios experimentales reportados previamente.

Cuatro condiciones influyeron negativamente sobre la supervivencia global sin modificar el curso de la supervivencia libre de progresión, la expresión de EGFR, VEGF, TWIST 2 y el volumen tumoral inicial.

Estos resultados tienen relación con el pronóstico del cáncer de cérvix localmente avanzado, y algunos de ellos, podrían ser controlados con la administración de terapias dirigidas contra la angiogénesis y la vía del factor de crecimiento epidermoide.

La expresión de VEGF/EGFR determina el pronóstico de la enfermedad, en especial cuando hay pérdida de la E-Caderina y aumento en la expresión de TWIST. Estas dos últimas variables modifican la SG cuando se evalúan de forma individual o en conjunto con el aumento en la expresión de VEGF/EGFR.

La infección por el VPH induce la transición epitelio mesenquimal, en particular al favorecer la proliferación vía EGFR y al facilitar la angiogénesis.

Existe una influencia positiva sobre el pronóstico, de la genotipificación que incluya el patrón mesenquimal en el cáncer de cérvix localmente avanzado tratado con quimiorradiación.

## XV REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pisani P, Parkin DM, Bray F, et al. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer*. 1999;83:18-29.
2. Frazer IH, Lowy DR, Schiller JT. Prevention of cancer through immunization: Prospects and challenges for the 21st century. *Eur J Immunol*. 2007;37 Suppl 1:S148-55.
3. Agosti JM, Goldie SJ. Introducing HPV vaccine in developing countries-key challenges and issues. *N Engl J Med*. 2007;356(19):1908-10.
4. Monk BJ, Tewari KS. Invasive cervical cancer, in DiSaia PJ, Creasman WT (eds): *Clinical Gynecologic Oncology* (ed 7). Philadelphia, PA, Mosby Publishers, 2007.
5. Robles SC, White F, Peruga A. Trends in cervical cancer mortality in the Americas. *Bull Pan Am Health Org*. 1996;30:290-301.
6. Palacio-Mejía S, Lazcano E, Allen-Leigh B, et al. Diferencias regionales en la mortalidad por cáncer de mama y cérvix en México entre 1979 y 2006. *Salud Pública Mex* 2009; 51 (supp 2): s208-s219.
7. Mohar A, Frias-Mendivil M, Suchill-Bernal M, et al. Epidemiología descriptiva de cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología de México. *Salud Publica Mex* 1997; 39: 253-258
8. Pabón A. La mortalidad en Colombia 1953-1991. [Mortality in Columbia 1953-1991]. Santafé de Bogotá: Instituto Nacional de Salud, 1993
9. Keys H, Gibbons SK. Optimal management of locally advanced cervical carcinoma. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 1996;21:89-92.
10. Morris M, Eifel PJ, Lu J, et al. Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer. *N Engl J Med* 1999;340:1137-1143.
11. Peters WA III, Liu PY, Barrett II RJ, et al. Concurrent chemotherapy and pelvic radiation therapy compared with radiotherapy alone as adjuvant therapy after radical surgery in high-risk early stage-cancer of the cervix. *J Clin Oncol*. 2000;18:1606-1613.
12. Cancer trials. NCI issues clinical announcement on cervical cancer chemotherapy plus radiation improves survival, <http://www.cancer.gov/newscenter/cervicalcancer.html>.
13. Chemoradiotherapy for Cervical Cancer Meta-Analysis Collaboration: Reducing uncertainties about the effects of chemoradiotherapy for cervical cancer: A systematic review and metaanalysis of individual patient data from 18 randomized trials. *J Clin Oncol* 2008; 26:5802-5812.
14. Duenas-Gonzalez A, Cetina-Perez L, Lopez-Graniel C, Gonzalez Enciso A, Gómez-González E, Rivera-Rubi L, et al: Pathologic response and toxicity assessment of chemoradiotherapy with cisplatin versus cisplatin plus gemcitabine in cervical cancer: a randomized phase II study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005, 61:817-823.
15. Datta NR, Agrawal S. Does the evidence support the use of concurrent chemoradiotherapy as a standard in the management of locally advanced

- cancer of the cervix, especially in developing countries? *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2006;18(4):306-12.
16. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Eng J Med*. 2003;348:518-527.
  17. Münger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res*. 2002;89:213-228.
  18. Mork J, Lie AK, Glattre E, Hallmans G, Jellum E, Koskela P, et al. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2001 Apr 12;344(15):1125-31.
  19. Kesis TD, Slebos RJ, Nelson WG, Kastan MB, Plunkett BS, Han SM, et al. Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *PNAS*. 1993;90:3988-3992.
  20. Giuntoli RL 2nd, Webb TJ, Zoso A, Rogers O, Diaz-Montes TP, Bristow RE, et al. Ovarian cancer-associated ascites demonstrates altered immune environment: implications for antitumor immunity. *Cancer*. 2001;92:2875-2884.
  21. Haraf DJ, Nodzenski E, Brachman D, Mick R, Montag A, Graves D. Human papilloma virus and p53 in head and neck cancer: clinical correlates and survival. *Clin Cancer Res*. 1996;2:755-762.
  22. Hudelist G, Manavi M, Pischinger KI, Watkins-Riedel T, Singer CF, Kubista E, et al. Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecol Oncol*. 2004;92:873-880.
  23. Ngan HY, Stanley M, Liu SS, Ma HK. HPV and p53 in cervical cancer. *J Virol*. 1992;66:6237-6245.
  24. Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res*. 2000;60:203-212.
  25. Randall LM, Monk BJ, Darcy KM, Tian C, Burger RA, Liao SY. Markers of angiogenesis in high-risk, early-stage cervical cancer: A Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol*. 2009;112(3):583-9.
  26. Obermair A, Wanner C, Bilgi S, Speiser P, Kaider A, Reinthaller A, et al. Tumor angiogenesis in stage IB cervical cancer: correlation of microvessel density with survival. *Am J Obstet Gynecol*. 1998;178(2):314-9.
  27. Rutgers JL, Mattox TF, Vargas MP. Angiogenesis in uterine cervical squamous cell carcinoma. *Int J Gynecol Pathol*. 1995;14(2):114-8.
  28. Kainz C, Speiser P, Wanner C, Obermair A, Tempfer C, Sliutz G, et al. Prognostic value of tumour microvessel density in cancer of the uterine cervix stage IB to IIB. *Anticancer Res*. 1995;15:1549-1551.
  29. Lee IJ, Park KR, Lee KK, Song JS, Lee KG, Lee JY, et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in Stage IB carcinoma of the uterine cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2002;54:768-79.
  30. Gaffney DK, Haslam D, Tsodikov A, Hammond E, Seaman J, Holden J. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and vascular endothelial growth factor (VEGF) negatively affect overall survival in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2003;56(4):922-8.

31. Brahim-Horn C, Pouysségur J. The role of the hypoxia-inducible factor in tumor metabolism growth and invasion. *Bull Cancer*. 2006;93(8):E73-80.
32. Auguste P, Lemiere S, Larrieu-Lahargue F, Bikfalvi A. Molecular mechanisms of tumor vascularization. *Crit Ref Oncol Hematol*. 2005;54(1):53-61.
33. Costa C, Soares R, Schmitt F. Angiogenesis: now and then. *APMIS*. 2004;112(7-8):402-12.
34. Bachtiry B, Selzer E, Knocke T-H, Potter R, Obermair A. Serum VEGF levels in patients undergoing primary radiotherapy for cervical cancer: impact on progression-free survival. *Cancer Letters* 2002; 179: 197–203
35. Zusterzeel PL, Span PN, Dijksterhuis MG, Thomas CM, Sweep FC, Massuger LF. Serum vascular endothelial growth factor: a prognostic factor in cervical cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2009;135:283-290.
36. Lu ZH, Wright JD, Belt B, Cardiff RD, Arbeit JM. Hypoxia-inducible factor-1 facilitates cervical cancer progression in human papillomavirus type 16 transgenic mice. *Am J Patol*. 2007;171(2):667-681.
37. Moeller BJ, Dreher MR, Rabbani ZN, Schroeder T, Cao Y, Li CY. Pleiotropic effects of HIF-1 blockade on tumor radiosensitivity. *Cancer Cell*. 2005;8:99-110.
38. Liu J, Zhang J, Wang X, Li Y, Chen Y, Li K, Zhang J, Yao L, Guo G. HIF-1 and NDRG2 contribute to hypoxia-induced radioresistance of cervical cancer Hela cells. *Exp Cell Res*. 2010;316(12):1985-93.
39. Nakamura M, Bodily JM, Beglin M, Kyo S, Inoue M, Laimins LA. Hypoxia-specific stabilization of HIF-1alpha by human papillomaviruses. *Virology*. 2009;387(2):442-8.
40. Dellas K, Bache M, Pigorsch SU, Taubert H, Kappler M, Holzapfel D, et al. Prognostic impact of HIF-1alpha expression in patients with definitive radiotherapy for cervical cancer. *Strahlenther Onkol*. 2008;184(3):169-74.
41. Burri P, Djonov V, Aebersold DM, Lindel K, Studer U, Altermatt HJ, et al. Significant correlation of hypoxia-inducible factor-1alpha with treatment outcome in cervical cancer treated with radical radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2003;56(2):494-501.
42. Ishikawa H, Sakurai H, Hasegawa M, Mitsuhashi N, Takahashi M, Masuda N, et al. Expression of hypoxic-inducible factor 1alpha predicts metastasis-free survival after radiation therapy alone in stage IIIB cervical squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004;60(2):513-21.
43. Hutchison GJ, Valentine HR, Loncaster JA, Davidson SE, Hunter RD, Roberts SA, et al. Hypoxia-inducible factor 1alpha expression as an intrinsic marker of hypoxia: correlation with tumor oxygen, pimonidazole measurements, and outcome in locally advanced carcinoma of the cervix. *Clin Cancer Res*. 2004;10(24):8405-12.
44. Monk BJ, Sill MW, Burger RA, Gray HJ, Buekers TE, Roman LD. Phase II trial of bevacizumab in the treatment of persistent or recurrent squamous cell carcinoma of the cervix: a gynecologic oncology group study. *J Clin Oncol*. 2009;27(7):1069-74.
45. Monk BJ, Willmott LJ, Sumner DA. Anti-angiogenesis agents in metastatic or recurrent cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2010;116(2):181-6.

46. Tan SJ, Juan YH, Fu PT, Yu MH, Lai HC. Chemotherapy with low-dose bevacizumab and carboplatin in the treatment of a patient with recurrent cervical cancer. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2010;31(3):350-3.
47. Takano M, Kikuchi Y, Kita T, Goto T, Yoshikawa T, Kato M, et al. Complete remission of metastatic and relapsed uterine cervical cancers using weekly administration of bevacizumab and paclitaxel/carboplatin. *Onkologie*. 2009;32(10):595-7.
48. Speake G, Holloway B, Costello G. Recent developments related to the EGFR as a target for cancer chemotherapy. *Curr Opin Pharmacol*. 2005;5(4):343-9.
49. Ghosh S, Liu XP, Zheng Y, Uckun FM. Rational design of potent and selective EGFR tyrosine kinase inhibitors as anticancer agents. *Curr Cancer Drug Targets*. 2001;1(2):129-40.
50. Noordhuis MG, Eijsink JJ, Ten Hoor KA, Roossink F, Hollema H, Arts HJ, et al. Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and activated EGFR predict poor response to (chemo)radiation and survival in cervical cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15(23):7389-97.
51. Wells A, Yates C, Shepard C. E-cadherin as an indicator of mesenchymal to epithelial reverting transitions during the metastatic seeding of disseminated carcinomas. *Clin Exp Metastasis*. 2008;25(6):621–628.
52. Micalizzi DS, Farabaugh Sm, Ford HL. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Parallels Between Normal Development and Tumor Progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2010;15:117–134.
53. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1420-8.
54. Berx G, Raspé E, Christofori G, Thiery JP, Sleeman JP. Pre-EMTing metastasis? Recapitulation of morphogenetic processes in cancer. *Clin Exp Metastasis*. 2007;24(8):587-97
55. Comoglio PM, Boccaccio C, Trusolino L. Interactions between growth factor receptors and adhesion molecules: breaking the rules. *Curr Opin Cell Biol*. 2003 Oct;15(5):565-71.
56. Grünert S, Jechlinger M, Beug H. Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(8):657-65.
57. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
58. Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)*. 1995;154(1):8-20.
59. Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol*. 2005;17(5):548-58.
60. Hult J, Suyama K, Chung S, Keren R, Agiostratidou G, Shan W, Dong X, Williams TM, Lisanti MP, Knudsen K, Hazan RB. N-cadherin signaling potentiates mammary tumor metastasis via enhanced extracellular signal-regulated kinase activation. *Cancer Res*. 2007;67(7):3106-16.
61. Kang Y, Massagué J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell*. 2004;118(3):277-9.

62. Niu RF, Zhang L, Xi GM, Wei XY, Yang Y, Shi YR, Hao XS. Up-regulation of Twist induces angiogenesis and correlates with metastasis in hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2007 Sep;26(3):385-94.
63. Peinado H, Portillo F, Cano A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol.* 2004;48(5-6):365-75.
64. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?. *Nat Rev Cancer.* 2007 Jun;7(6):415-28.
65. Cetina L, Rivera L, Hinojosa J, Poitevin A, Uribe J, et al. Routine management of locally advanced cervical cancer with concurrent radiation and cisplatin. Five-year results. *BMC Women's Health* 2006;6(3):1-20.
66. Cardona AF, Jaramillo LF, Archila P, Zea D, Reveiz L, Carranza H, et al. Prognostic role of microvascular density, VEGF, EGFR and HIF-1 $\alpha$  expression in patients with locally advanced cervical cancer treated with chemoradiotherapy (ONCOLGRoup). *Acta Med Colomb* 2012; 37: 106-117.
67. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer.* 2009;45(2):228-47.
68. Kimura S, Kitadai Y, Tanaka S, Kuwai T, Hihara J, Yoshida K, Toge T, Chayama K: Expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  is associated with vascular endothelial growth factor expression and tumour angiogenesis in human oesophageal squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer.* 2004;40(12):1904-1912.
69. Noordhuis MG, Eijsink JJ, Ten Hoor KA, Roossink F, Hollema H, Arts HJ, et al. Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and activated EGFR predict poor response to (chemo)radiation and survival in cervical cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15(23):7389-97.
70. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumour angiogenesis and metastasis-Correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 1991;324:1-8
71. Tjalma W, Van Marck E, Weyler J, Dirix L, Van Daele A, Goovaerts G, et al. Quantification and prognostic relevance of angiogenic parameters in invasive cervical cancer. *Br J Cancer.* 1998;78:170-4.
72. Cantu De León D, López-Graniel C, Frias Mendivil M, Chanona Vilchis G, Gómez C, De La Garza Salazar J. Significance of microvascular density (MVD) in cervical cancer recurrence. *Int J Gynecol Cancer.* 2003;13(6):856-62.
73. Lee MY, Chou CY, Tang MJ and Shen MR. Epithelial-mesenchymal transition in cervical cancer: correlation with tumor progression, epidermal growth factor receptor overexpression, and snail up-regulation. *Clin Cancer Res* 2008;14:4743-4750.
74. Hsu YM, Chen YF, Chou CY, Tang MJ, Chen JH, Wilkins RJ, Ellory JC and Shen MR. KCl cotransporter-3 down-regulates E-cadherin/  $\beta$ -catenin complex to promote epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* 2007; 67: 11064-11073.
75. Hellner K, Mar J, Fang F, Quackenbush J and Munger K. HPV16 E7 oncogene expression in normal human epithelial cells causes molecular

- changes indicative of an epithelial to mesenchymal transition. *Virology* 2009; 391: 57-63
76. Myong NH. Loss of E-cadherin and Acquisition of Vimentin in Epithelial-Mesenchymal Transition are Noble Indicators of Uterine Cervix Cancer Progression. *Korean J Pathol.* 2012 ;46(4):341-8
  77. Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res* 2006;66: 8319–8326.
  78. Moustakas A, Heldin CH. Signaling networks guiding epithelial–mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Sci* 2007;98:1512–1520.
  79. Desai S, Laskar S, Pandey BN. Autocrine IL-8 and VEGF mediate epithelial-mesenchymal transition and invasiveness via p38/JNK-ATF-2 signalling in A549 lung cancer cells. *Cell Signal.* 2013;25(9):1780-91.
  80. Gonzalez-Moreno O, Lecanda J, Green JE, Segura V, Catena R, Serrano D, Calvo A. VEGF elicits epithelial-mesenchymal transition (EMT) in prostate intraepithelial neoplasia (PIN)-like cells via an autocrine loop.
  81. Tewari K, Sill M, Long H, Ramondetta L, Landrum L, Oaknin A et al. Incorporation of bevacizumab in the treatment of recurrent and metastatic cervical cancer: A phase III randomized trial of the Gynecologic Oncology Group. *J Clin Oncol*, 2013 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition). Vol 31, No 15\_suppl (May 20 Supplement), 2013: 3-
  82. Marijon H, Dokmak S, Paradis V, Zappa M, Bieche I, Bouattour M, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition and acquired resistance to sunitinib in a patient with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2011;54(5):1073-8.
  83. Berkers J, Govaere O, Wolter P, Beuselinck B, Schöffski P, van Kempen LC, et al. A possible role for microRNA-141 down-regulation in sunitinib resistant metastatic clear cell renal cell carcinoma through induction of epithelial-to-mesenchymal transition and hypoxia resistance. *J Urol.* 2013 ;189(5):1930-8.
  84. Hypoxia activated EGFR signaling induces epithelial to mesenchymal transition (EMT). *PLoS One.* 2012; 7(11): e49766.
  85. Nogueira-Rodrigues A, do Carmo CC, Viegas C, Erlich F, Camisão C, Fontão K, et al. Phase I trial of erlotinib combined with cisplatin and radiotherapy for patients with locally advanced cervical squamous cell cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14(19):6324-9.
  86. Ferreira CG, Erlich F, Carmo CC, Viegas C, Cidade IJ, Camisao CC, et al. Erlotinib combined with cisplatin and radiotherapy for patients with locally advanced squamous cell cervical cancer: A phase II trial. *J Clin Oncol.* 2008;26:5511.
  87. Goncalves A, Fabbro M, Lhommé C, Gladiéff L, Extra JM, Floquet A, et al. A phase II trial to evaluate gefitinib as second- or third-line treatment in patients with recurring locoregionally advanced or metastatic cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2008;108(1):42-6