

# PAPEL DEL INHIBIDOR DEL ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO TIPO 1 (PAI-1) EN EL CÁNCER

---

**Julio C. Velásquez<sup>1</sup>, Luis Alberto Henríquez-Hernández<sup>2,3</sup>, Almudena Valenciano<sup>3</sup>,  
Aura Lucy Caicero<sup>4</sup> y Pedro C. Lara<sup>2,3</sup>**

<sup>1</sup>Servicio de Oncología Radioterápica, Hospital Clínico universitario de Salamanca

<sup>2</sup>Servicio de Oncología Radioterápica, Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín

<sup>3</sup>Instituto Canario de Investigación del Cáncer (ICIC)

<sup>4</sup>Servicio de Medicina Nuclear, Centro de Investigación Biomédica de La Rioja Hospital San Pedro

---

## ÍNDICE:

1. INTRODUCCIÓN
  2. SISTEMA DE ACTIVACIÓN PLASMINÓGENO/PLASMINA
  3. ACTIVACIÓN DE LA PLASMINA A PARTIR DEL PLASMINÓGENO PARA LA DEGRADACIÓN DE LA MEC EN TEJIDO NO SANGUÍNEO
  4. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN MEDIADAS POR LA INTERACCIÓN uPA-uPAR EN TEJIDOS NO SANGUÍNEOS
  5. INHIBICIÓN DE UPA POR PAI-1
    - 5.1 Características de PAI-1
    - 5.2 Regulación de PAI-1
    - 5.3 Medición del PAI-1
  6. LA PROTEÍNA PAI-1 EN EL CÁNCER
  7. PAI-1 EN LA ANGIOGÉNESIS Y CÁNCER
  8. PAI-1 Y SU RELACIÓN CON P53
  9. PAI-1 Y SU RELACIÓN CON KU80
  10. PAI-1 Y SU RELACIÓN CON LA HIPOXIA CELULAR
  11. PAI-1 Y LOS CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS
  12. PAI-1 Y LOS ADENOCARCINOMAS
  13. COMPORTAMIENTO DEL PAI-1 EN PACIENTES CON CARCINOMA DE CUELLO UTERINO
  14. PAI-1 Y RADIOTERAPIA
  15. CONCLUSIONES
  16. BIBLIOGRAFÍA
-

## **1. INTRODUCCIÓN**

La relación de las células con su entorno es esencial para el adecuado funcionamiento e integridad de los tejidos (1). Estos últimos, como se sabe, están conformados por células y por una red de proteínas denominada matriz extracelular (2), que sirve de soporte para las células y le da la conformación al tejido (1).

La MEC es una estructura insoluble de proteínas y carbohidratos producidos por todas las células de los organismos complejos, en la cual, las células se encuentran embebidas sirviéndoles de sostén y dándole conformación al tejido (1). La MEC está en constante cambio por la síntesis y degradación de sus componentes (3). Las células contienen receptores de membrana para los componentes extracelulares de la MEC, de tal forma que, dependiendo del tipo de tejido, la MEC variará en la proporción y tipo de sus componentes (3). La remodelación de la MEC depende de varios sistemas y procesos, entre ellos, del sistema de activación del plasminógeno/plasmina, que participa en la degradación de algunos componentes de la MEC, como la fibrina y algunas proteínas del colágeno (4-5).

Un componente de este sistema es el PAI-1, que regula dicho sistema al inhibir la uPA y por consiguiente, evita la degradación de la MEC. Algunas alteraciones en la regulación de este sistema se asocian a procesos patológicos como la fibrosis epitelial, la trombosis, la arterioesclerosis, la diabetes tipo 2, la hiperinsulinemia, la hipertensión, la hipertriglicerinemias y la obesidad (6-11). Igualmente, se ha encontrado que en ciertos tipos de cáncer el PAI-1 y el uPA participan en la invasión y en la metástasis (12-14). La PAI-1 además de inhibir la degradación de la MEC, interviene en la angiogénesis y la migración celular (15).

En el presente artículo se revisarán las implicaciones de la PAI-1 en el cáncer y su interacción con varias vías de señalización y posibles repercusiones clínicas (15).

## **2. SISTEMA DE ACTIVACIÓN PLASMINÓGENO/PLASMINA**

Antes de describir brevemente el sistema de activación plasminógeno/plasmina, se harán algunas anotaciones sobre la MEC para contextualizar dicho sistema.

Para la remodelación de la MEC, existen varios tipos de enzimas: el conjunto metaloproteasas de la matriz (MMP) y las proteasas tisulares de serina (16).

Una serina proteasa que forma parte del sistema de activación plasminógeno/plasmina es la plasmina. Esta es una enzima proteolítica que actúa sobre varios componentes de la matriz extracelular tales como: la fibrina, la colágena tipo IV y V, fibronectina, laminina y proteoglicanos (17-20). Además, también actúa indirectamente en la degradación de la MEC



baja, scuPA forma el complejo scuPA-uPAR, con el receptor del activador del plasminógeno tipo uroquinasa uPAR que es transmembranal (27).

El complejo scuPA-uPAR, es digerido por algunas proteínas como plasmina, tripsina, calicreina, factor de coagulación XIIa y catepsina, convirtiendo a scuPA en una proteína de dos cadenas polipeptídicas, lo cual, incrementa la actividad enzimática del complejo. A esta nueva conformación se le denomina complejo uPA-uPAR (27) (Figura 1). El complejo uPA-uPAR permite que el plasminógeno sea convertido a plasmina por uPA y que la plasmina a su vez degrade componentes de la MEC como las fibras de colágeno y algunos inhibidores de las metaloproteasas (28).

Los dos tipos de activadores del plasminógeno uPA y tPA (activador del plasminógeno tipo tisular) realizan una función muy similar en diferentes tipos de tejido; sin embargo, estructuralmente presentan algunos dominios diferentes que les confieren una funcionalidad distinta (29). Así, por ejemplo, la degradación de fibrina durante los procesos de remoción de coágulos sanguíneos está a cargo principalmente de tPA, mientras que uPA degrada la MEC en tejidos sólidos (29).

Siguiendo el proceso de activación del plasminógeno en los tejidos "sólidos", la proteína uPA tiene tres dominios: a) el dominio N-terminal que se denomina dominio de factor de crecimiento (GFD) y que además es el que interactúa con uPAR, b) el dominio proteolítico (C-terminal) y c) el dominio Kringle, del cual aún no hay claridad de su función. Por otro parte, tPA cuenta con dominios similares y algunos adicionales, uno de los cuales le permite interactuar con fibrina (30-31).

La degradación de la MEC mediada por plasmina tiene dos puntos de control. Uno es la inactivación de la plasmina mediante la unión de las proteínas  $\alpha$ -2-AP ( $\alpha$ -2-antiplasmina) o TAFI (inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina) que bloquean su actividad proteolítica. El otro punto de control son los inhibidores: PAI-1, PAI-2 y PAI-3 (Inhibidores del activador del plasminógeno 1, 2 y 3, respectivamente) y la proteasa nexina (32). Específicamente, se ha descrito que PAI-1 mantiene la homeostasis, regula la fibrinólisis, angiogénesis e interviene en los procesos de invasión y metástasis en el cáncer (33-34).

#### **4. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN MEDIADAS POR LA INTERACCIÓN uPA-uPAR EN TEJIDOS NO SANGUÍNEOS**

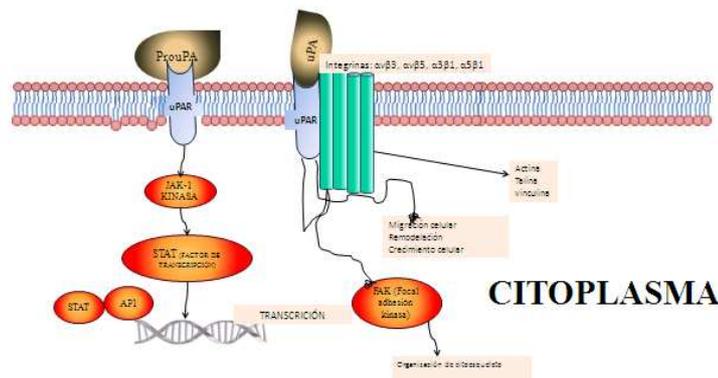
La formación del complejo uPA-uPAR activa algunas vías de señalización intracelulares que intervienen en la regulación de la migración y proliferación celular, tales como: JAK-STAT y MAPK (35-37). Estas señales contribuyen de manera natural a la regulación de varias funciones

fisiológicas como: angiogénesis, implantación embrionaria, reacción inflamatoria y cicatrización cutánea (35).

La vía de señalización JAK-STAT se activa por la unión del receptor a scuPA o pro-uPA independientemente de la activación del complejo uPA-uPAR (35-37) (Figura 2). JAK1 quinasa se asocia con uPAR, lo que lleva a la fosforilación y dimerización del factor de transcripción STAT, con lo cual, se activan diferentes rutas de señalización (35-37). Otra forma en que las vías de señalización son activadas, es por la interacción de uPAR con algunas integrinas tales como:  $\alpha V\beta 3$ ,  $\alpha V\beta 5$ ,  $\alpha 3\beta 1$  y  $\alpha 5\beta 1$ , que son receptores de vitronectina y fibronectina respectivamente y que están involucrados en migración celular, remodelación tisular, crecimiento celular y tumorigénesis (38).

El complejo uPA-uPAR también interacciona con la vía de señalización de FAK (focal adhesion kinase) que participa en la organización del citoesqueleto, esta interacción es mediada por integrinas (39-41). Además, la interacción de uPAR con integrinas permite que se produzcan cambios en la organización del citoesqueleto, ya que las integrinas interactúan con componentes del mismo (actina, talina, vinculina, entre otras) y con componentes de su MEC (39-41)

## VIAS DE SEÑALIZACIÓN MEDIADAS POR LA INTERACCIÓN uPA-uPAR EN TEJIDOS SOLIDOS

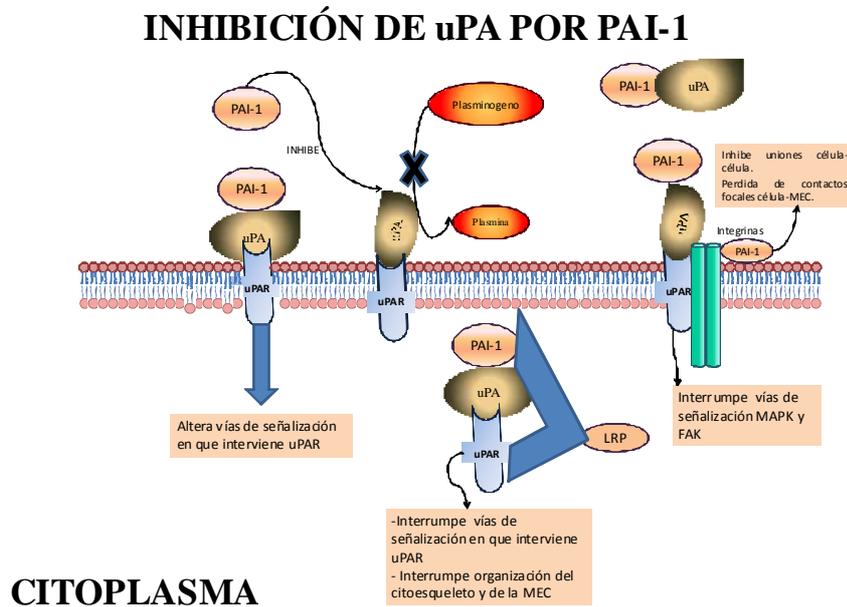


**Figura 2.** Vías de señalización mediadas por la interacción uPA-uPAR en tejidos sólidos.

### 5. INHIBICIÓN DE uPA POR PAI-1

El PAI-1 es el principal inhibidor de uPA y tPA e interviene de manera central en varias funciones celulares como angiogénesis, homeostasis, invasión y metástasis de células tumorales (41-43). La interacción PAI-1-uPA provoca la inhibición de la actividad de proteasa de uPA, por

lo que no transforma el plasminógeno en plasmina y se inhibe la fibrinólisis o la degradación de MEC (Figura 3) (41-43).



**Figura 3.** Inhibición de uPA por PAI-1

Por otra parte, al unirse PAI-1 con uPA para formar un complejo uPAR-uPA-PAI-1 (aunque también se une a uPA en estado libre), influye en la alteración de las vías de señalización en las cuales está implicado uPAR (41-43).

El complejo uPAR-uPA-PAI-1, se internaliza en la célula por la proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad LRP, con lo cual, PAI-1 induce la disminución en la superficie celular de uPAR e interrumpe de esta forma las vías de señalización, así como la organización del citoesqueleto y de la MEC que son medidas por uPAR (41-43).

Igualmente, PAI-1 puede inhibir las uniones célula-célula mediada por uPAR y vitronectina, mediante la unión de vitronectina-PAI-1 evitando la unión de vitronectina-integrina (44-47). La vitronectina también interactúa con el complejo uPA-uPAR para formar un nuevo complejo denominado uPA-uPAR-vitronectina de tal manera que PAI-1 puede evitar la formación de este complejo uniéndose tanto a vitronectina (vitronectina-PAI-1) como a uPA (uPAR-uPA-PAI-1), con lo cual se interrumpe la activación de las vías de señalización MAPK y FAK que están mediadas por uPAR-vitronectina e integrinas (44-47).

Por otra parte, se pueden perder contactos focales entre la célula y la MEC mediadas por las integrinas y donde también interviene tanto la vitronectina como la fibronectina, lo cual,

permite deducir la importancia de la PAI-1, las vías de señalización y las interacciones de la célula con la MEC (44-47).

Anteriormente, se anotó que el complejo uPA-uPAR interactúa con varias integrinas entre las cuales están  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$  que son receptores de fibronectina (48). Czekay y colaboradores mencionaron que PAI-1 disocia a las células de la MEC mediante la inactivación de integrinas y la unión de PAI-1 con uPA y no con la interacción PAI-1-vitronectina (49). Estos investigadores también observaron que la presencia de uPA y PAI-1 induce la disociación entre las células y los componentes de la MEC (49).

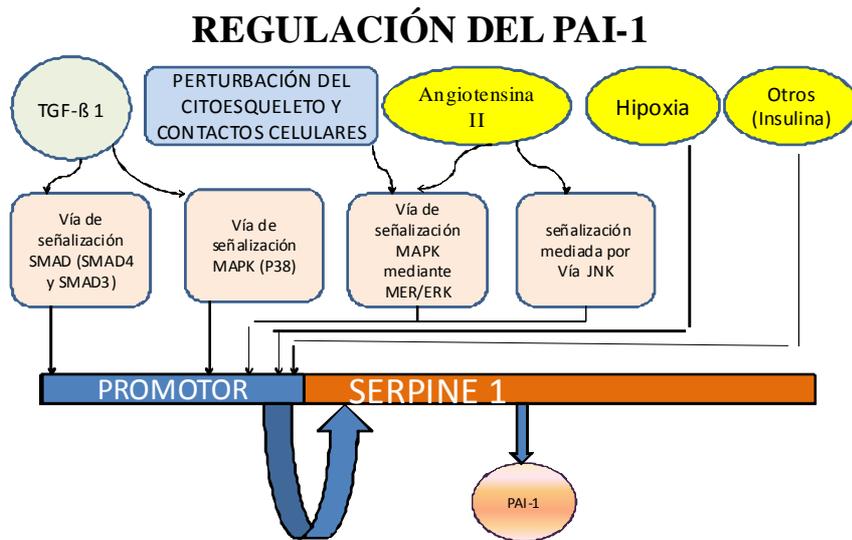
### **5.1 Características de PAI-1**

El PAI-1 es una glicoproteína de 50 kDa que está conformada por 359 aminoácidos, pertenece a la superfamilia de las serpinas (inhibidoras de serina proteasas) que la conforman aproximadamente 40 miembros y cuyas funciones principales son de inhibición (50-52). El gen que codifica a esta proteína se denomina SERPINE1 (53) y se localiza en el brazo largo del cromosoma 7 (7q21.3-q22)(54) ([www.genecards.org](http://www.genecards.org)). Este gen está constituido por 15 exones y puede presentar cinco isoformas (54).

El PAI-1 presenta tres conformaciones diferentes, las cuales además son interconvertibles entre sí: a) una conformación activa con propiedad inhibitoria (forma un complejo covalente estable con la proteína uPA), b) una conformación de sustrato, y c) una conformación latente no reactiva. Inicialmente PAI-1 es sintetizada en su conformación activa pero cambia espontáneamente a su conformación latente con una vida media de 1 a 2 h. (50-52).

### **5.2 Regulación de PAI-1**

El PAI-1 está regulado directamente por las proteínas involucradas en la remodelación de la MEC. En la figura 4 se muestra de forma resumida las vías de señalización que están implicadas en la regulación de la expresión del gen SERPINE1 y por consiguiente de la proteína PAI-1 (55-56).



**Figura 4.** Vías de señalización que están implicadas en la regulación de la expresión del gen SERPINE1 y por consiguiente de la proteína PAI-1.

En enfermedades como el cáncer, las células cambian su morfología modificando las interacciones con su entorno, tanto en los contactos célula-célula como en las interacciones célula-MEC (57). En el cáncer de mama se ha visto que los cambios en la estructura del citoesqueleto se dan por la interrupción de los contactos célula-célula dependientes de E-caderina y esta pérdida de contacto estimula la expresión de uPA y PAI-1 (57).

La expresión de PAI-1 también es regulada por la ruptura de microfilamentos y microtúbulos del citoesqueleto (58), por lo cual, la variación morfológica de la célula permite cambios en su expresión (58). Otros factores que regulan la expresión de PAI-1 son: TGF-β1, (factor de crecimiento transformante β1), TNF (factor de necrosis tumoral), insulina/proinsulina, y la angiotensina II; así como ácidos grasos libres y triglicéridos (59-64).

### 5.3 Medición del PAI-1

Se sabe que las técnicas de inmunoensayo enzimático (ELISA) y los métodos de inmunohistoquímica (IHC) proporcionan información sobre la expresión de proteínas en muestras de tejido y por consiguiente sobre la activación del plasminógeno (PA) (65).

En un estudio de Ferrier y colaboradores (1999), se compararon dos técnicas, una cuantitativa de ELISA y otra semicuantitativa de IHC para investigar el impacto de la activación del plasminógeno (PA) en el cáncer. En primer lugar, se estudiaron los niveles de expresión de uPA, tPA, PAI-1 y uPAR en un grupo compuesto de 33 lesiones de cáncer de origen diferente (mama, pulmón, colon, cuello del útero y melanoma). En segundo lugar, el mismo tipo de

comparación se realizó sobre un grupo de 23 lesiones de melanoma y un grupo de 28 lesiones de carcinoma de mama. Las dos técnicas fueron aplicadas a la parte adyacente de la muestra de tejido congelado, lo que permitió la comparación de los resultados obtenidos en un material de composición casi idéntica. Los coeficientes de correlación de Spearman entre los resultados de IHC y los de ELISA para uPA, tPA, PAI-1 y uPAR variaron entre 0,41 y 0,78, y fueron mayores para el grupo de muestras compuesto (de varios tipos de tumor) y para el grupo de cáncer de mama que para el grupo de melanoma. A pesar de que el más alto puntaje de la técnica de IHC estuvo siempre asociado con un aumento del valor medio de ELISA, se produjo un solapamiento de los valores de las dos técnicas. Por lo cual, para casos individuales, la relación entre el inmunoensayo enzimático (ELISA) y la inmunohistoquímica (IHC) es ambigua. Por esto los autores dicen que dos técnicas no son directamente intercambiables y que su valor en la clínica puede ser diferente (65).

## **6. LA PROTEÍNA PAI-1 EN EL CÁNCER**

La activación del sistema de plasminógeno (PA) juega un papel clave en la cascada asociada con la proteólisis del tumor que conduce a la degradación de la matriz extracelular y a la invasión del estroma. Cambios en la expresión de los componentes de este sistema, incluyendo el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), se han asociado con mal pronóstico en una variedad de tumores sólidos (66).

A continuación se describirá la relación del PAI-1 con algunas otras proteínas importantes en la biología del cáncer y su comportamiento en algunos tumores sólidos.

## **7. PAI-1 EN LA ANGIOGÉNESIS Y CÁNCER**

En la angiogénesis de procesos tanto normales como patológicos (tumores), se requiere que las células endoteliales de los vasos y capilares migren a formar nuevos vasos y para hacerlo, se requiere de la activación del sistema plasminógeno/plasmina que degradaría la MEC para permitir la migración de las células endoteliales, mediante PAI-1, para que se puedan formar nuevos vasos (67). La hipoxia es uno de los factores que inducen la angiogénesis y bajo estas condiciones, las células endoteliales presentan un aumento en la expresión de uPA y PAI, además de otros factores angiogénicos como VEGF (vascular endotelial growth factor) y bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos) que promueven la expresión de uPA, tPA, UPAR y PAI-1 (67-70).

El rol del PAI-1 dentro de la angiogénesis se basa en su capacidad para inhibir la fibrinólisis de la MEC y en el rompimiento de los contactos célula-célula y célula MEC, permitiendo la migración celular (71). En varios estudios *in vitro* e *in vivo*, se ha visto que la

sobre-expresión de PAI-1 reduce las metástasis y el crecimiento del tumor (71). Sin embargo, existen datos contradictorios en los que se observa que la presencia de PAI-1 es necesaria para que se pueda dar la angiogénesis (72-73). En un modelo knock-out murino para PAI-1 se mostró una reducción significativa del volumen tumoral, así como en la vascularización (72-73). Así mismo, se ha observado que en líneas celulares derivadas de cáncer de pulmón el proceso metastático se incrementa al administrar PAI-1 endógeno (74).

Para resumir, existen estudios contradictorios sobre la inhibición o activación de PAI-1 sobre procesos de angiogénesis y metástasis (13, 75-78). Con respecto a estos resultados, McMahon y colaboradores utilizaron diferentes concentraciones de PAI-1 en un modelo *in vivo* y observaron que a bajas concentraciones de la proteína se promueve la angiogénesis, mientras que a concentraciones altas ésta se inhibe (34). Es decir, PAI-1 tiene un efecto pro o antiangiogénico dosis-dependiente, siendo proangiogénico a concentraciones fisiológicas y antiangiogénico a niveles altos de expresión, de ahí los resultados contradictorios (79-80). El efecto proangiogénico o promigratorio de PAI-1 concuerda con los datos clínicos que indican que una alta expresión tumoral de PAI-1 se correlaciona con un peor pronóstico en una variedad de tumores (73, 81-82).

## **8. PAI-1 Y SU RELACIÓN CON P53**

La proteína supresora de tumores p53 es una molécula esencial en el control del ciclo celular y de la muerte celular programada (apoptosis). Tiene una vida media corta y se localiza en el núcleo (83).

Las mutaciones de p53 representan la lesión molecular más común en neoplasias humanas (84). Además, su presencia es indicativa de escasa respuesta terapéutica y mala evolución (85-86). La proteína p53 está formada por 393 aminoácidos que se pueden agrupar en dominios: un dominio amino terminal; dominio de unión al ADN y un dominio carboxiterminal (87-88). La proteína p53 se encuentra conservada en diferentes especies, de modo que las secuencias de p53 humana y de ratón presentan una identidad del 80% (84). En *Drosophila* se ha identificado un gen homólogo a p53 conocido como Dmp53 que se une a secuencias específicas de ADN reconocidas también por p53 humano (84). Cuando se expresa esta proteína se induce apoptosis y su inhibición conduce a la resistencia a la apoptosis post-radiación (89).

El estímulo fisiológico para la activación de p53 sería el daño del ADN causado por la radiación ionizante, agentes genotóxicos y oncogenes, como por ejemplo, la forma oncogénica de ras (90-91). Esta activación del p53 se produce por fosforilaciones, desfosforilaciones y

acetilaciones (92-94) mediadas por la proteína codificada por el gen de la ataxia-telangiectasia, ATM (95), por la ADN protein quinasa (96) y por quinasas inducidas por el estrés (97).

La activación química de p53 produce un incremento de las formas activas de la proteína con capacidad de unión al ADN y con capacidad de funcionar como factor de transcripción. Gran parte de los efectos observados se deben a la liberación del inhibidor fisiológico de p53, la proteína MDM2 que en condiciones normales, desplaza rápidamente el p53 del núcleo celular hacia el citoplasma y la introduce en las vías de degradación proteica dependiente de ubiquitina (98). La proteína responsable de la liberación del efecto inhibitorio de MDM2 es p14ARF, que se origina por un *splicing* alternativo del locus de p16 (99).

El gen que codifica la proteína p53 se localiza en el cromosoma 17p13.1, se extiende a lo largo de 20kb de ADN genómico y contiene 11 exones (100).

En cuanto a la relación entre p53 y PAI-1, en un estudio de Lalou y colaboradores (2010), en el que se utilizaron células M10 de melanoma primario humano con p53, y genes CDKN2A y N-Ras alterados, se encontró que la inhibición de las convertasas de proproteínas (PCs), que son enzimas involucradas en la activación proteolítica de diferentes precursores de proteínas relacionadas con el cáncer, produjo una considerable reducción de la invasión. En ensayos de digestión *in vitro* y experimentos con células de transfección, se ha revelado que las células M10/PDX reducen la actividad de las PCs y son incapaces de procesar los sustratos de PCs: proIGF-1R y proPDGF A (101). Estas células han mostrado una reducción de la migración y la invasión que paralelamente disminuye la actividad de la gelatinasa MMP-2 e incrementa la expresión y secreción del inhibidor tisular de la metaloproteinasa-1 y 2 (TIMP-1 y TIMP-2) (101).

Además, estas células han mostrado disminución de los niveles del receptor del plasminógeno tipo uroquinasa (uPAR) y mayores niveles del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) (101). Los autores concluyen que en conjunto, estos datos sugieren que la inhibición de la actividad de PCs resulta en la disminución de la capacidad de invasión primaria de células de melanoma humano a pesar de tener su p53, los genes CDKN2A y N-Ras alterados, lo que sugiere que los PCs pueden servir como nuevas dianas terapéuticas en el melanoma (101).

En un estudio de Offersen y colaboradores (2008) en el que se evaluó el pronóstico potencial de Her2, de las mutaciones de TP53, de los niveles de PAI-1, la angiogénesis y la proliferación en 408 pacientes con cáncer de mama con seguimiento de más de 10 años, se encontró que 91 pacientes (22%) fueron positivas para HER2. El TP53 se encontró mutado en 101 casos (25%) (102). La mediana de los valores de PAI-1, del puntaje del método Chalkley

(con el que se valoró la angiogénesis) y de MIB-1 fueron de 0,72 ng/mg de proteína (rango, 0-90 ng/mg de proteína); 5,00 (rango: 2,67-12,00) y el 15% (rango: 1-83%), respectivamente. MIB-1 se correlacionó con HER2 +, con el valor de Chalkley, con mutaciones de TP53 (todos  $p < 0,0001$ ) y con el nivel de PAI-1 ( $p = 0,002$ ) (102).

En el análisis univariado con la supervivencia específica como punto final, los marcadores pronósticos fueron el HER2+ ( $p < 0,0001$ ), el TP53 mutado ( $p < 0,0001$ ), los valores altos de Chalkley ( $p = 0,008$ ), el valor de MIB-1 ( $p = 0,002$ ), el tamaño del tumor ( $p = 0,008$ ), el grado histológico ( $p < 0,0001$ ), receptores de estrógeno negativos ( $p = 0,0001$ ) y el estado de los ganglios linfáticos ( $p < 0,0001$ ). Entre los pacientes con ganglios negativos, HER2 + ( $p = 0,0002$ ), mutación TP53 ( $p = 0,001$ ), altos niveles de PAI-1 ( $p = 0,02$ ) y el grado histológico ( $p = 0,03$ ) indican una pobre supervivencia específica. En pacientes con ganglios positivos, HER2+ ( $p = 0,0002$ ), mutación de TP53 ( $p < 0,0001$ ), MIB-1 ( $p = 0,01$ ), puntuaciones altas de Chalkley ( $p = 0,007$ ), receptores de estrógeno negativos ( $p < 0,0001$ ) y grado histológico ( $p = 0,001$ ) indican mal pronóstico (102).

En el análisis multivariado, los ganglios metastásicos (1-3 positivos: RR 1,56 IC 95% 1,02-2,38; > 3 positivos: RR 3,70 IC 95%: 2,54 a 5,38), HER2+ (RR 1,91, IC 95% 1,35-2,70), mutación TP53 (RR 1,70, IC 95% 1,21-2,38), PAI-1 (RR 1,04, IC 95%: 1,01 a 1,07) y grado tres histológico (RR 1,96, IC 95% 1,83-3,22) fueron marcadores independientes de mal pronóstico (102). Los autores concluyeron que HER2+ y las mutaciones de TP53 fueron los principales marcadores de mal pronóstico, independientemente del estado ganglionar, al comparar con los niveles de PAI-1, el puntaje de Chalkley y MIB-1 (102).

Por otra parte, Kortlever y Bernards (2006), en una revisión sobre "*senescencia, cicatrización de heridas y cáncer: la conexión de PAI-1*", mencionan que en la propagación prolongada de fibroblastos diploides primarios en cultivos en proceso de envejecimiento, conocida como senescencia replicativa, que se considera ofrece una barrera contra la transformación oncogénica, cabe destacar que tanto para las células autónomas supresoras de tumor, como para las células no autónomas promotoras de tumor, se han reportado efectos sobre las células senescentes. Recientemente, estos autores describieron que la diana del gen p53, el activador del plasminógeno-1 (PAI-1) es un mediador esencial de la senescencia replicativa. El PAI-1 es un antagonista de la proteasa uPA. Ambos son factores secretados e involucrados en procesos de señalización heterotípica, como la curación de heridas, la angiogénesis y la metástasis. Tanto uPA como PAI-1 se expresan en las células senescentes y sus controles en relativa abundancia, posterior a la proliferación de p53. Los autores concluyen que los efectos de PAI-1 y uPA en respuesta a la senectud no son estrictamente exclusivos de células autónomas.

En un estudio de Schneider y colaboradores (2003), en el cual se evaluó la acumulación de complejos uPA-PAI-1 dentro de células tumorales de mama y su relación con invasión de ganglios axilares en pacientes con cáncer de mama temprano con receptores de progesterona positivos, usaron la técnica de inmunohistoquímica para identificar dentro de células tumorales mamarias complejos uPA-PAI-1 en una serie de 212 pacientes con cáncer de mama unifocal estadio pT1 y lo correlacionaron con otras características clínicas y biológicas de las pacientes (variedad histológica, grado nuclear e histológico, receptores hormonales, índice de marcaje de ki67, c-erb-B2, p53 y expresión de CD44std) con o sin la presencia de la invasión de los ganglios axilares.

Aplicando un modelo de regresión logística, en busca de asociaciones con metástasis axilares, se encontró una interacción estadísticamente significativa entre la presencia de complejos uPA-PAI-1 y la positividad del receptor de progesterona ( $p=0,04$ ). Un modelo final mostró que la presencia de complejos uPA-PAI-1 fue un factor determinante para las metástasis axilares entre las mujeres con tumores que expresan receptores de progesterona. En estos casos, la presencia de complejos uPA-PAI-1 llevaba consigo un riesgo casi 14 veces mayor de la invasión de los ganglios axilares ( $p=0,009$ ). Estos resultados podrían indicar que pequeños tumores de mama, con receptores hormonales positivos (con un buen pronóstico teórico) puede llevar a un elevado riesgo de afectación ganglionar, si la acumulación de complejos uPA-PAI-1 se demuestra dentro de las células del tumor por medio de inmunohistoquímica.

Según Parra y colaboradores (2001), el agente alquilante N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) es un carcinógeno muy extendido en el medio ambiente que causa lesiones en el ADN que conducen a la muerte celular. El MNNG también puede inducir una respuesta de protección celular por la inducción de la expresión de genes relacionados con la reparación del ADN/transcripción (103). Ellos demostraron que el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA), una proteasa extracelular, a la que no se han asignado funciones de reparación del ADN, fue inducido por el MNNG. En este sentido, los investigadores demuestran que el inhibidor fisiológico del uPA, PAI-1, también es inducido por MNNG de una manera dependiente de p53, debido a la inducción de PAI-1 por MNNG en células que expresan p53, pero no en células p53-/- (103).

La fosforilación de p53 inducida por MNNG en la serina 15, que resulta en la estabilización de la proteína p53, es central para la transcripción de PAI-1 dependiente de p53. Por último, estos investigadores han demostrado que la inducción de PAI-1 transcripcional por MNNG requiere un elemento de respuesta p53 situado en la base de pares 136 del promotor de PAI-1, debido a una mutación específica de este sitio que deroga la inducción (103). Debido a que el PAI-1 es un factor pronóstico de muchos cánceres metastásicos y está involucrado en el

control de la agresividad del tumor, el hallazgo de que un agente genotóxico induce el gen PAI-1 a través de p53, añade una nueva función al rol de la proteína p53 supresora de tumores (103). Estos hallazgos también sugieren la posibilidad de que los agentes genotóxicos contribuyan a la metástasis del tumor mediante la inducción de PAI-1 sin la participación de ninguna modificación genética (103).

En un estudio de Hoffmann y colaboradores (1999), en el cual se midieron factores pronósticos como el uPA, PAI-1, p53 y Ki-67, como marcadores de proliferación y pronóstico en pacientes con carcinoma de vulva, comparándolos con factores clásicos histopatológicos, evaluaron 45 pacientes con tumores primarios y recurrencias de este tipo de tumor. Se encontró que hubo correlaciones fuertemente significativas con el diámetro y el grosor del tumor (104). De acuerdo con estimaciones de Kaplan-Meier, la influencia del espesor sobre el pronóstico tenía un valor de p de 0,048, mientras que la influencia de diámetro tenía un valor de p de 0,029 (104). La variable grado, también se asoció significativamente con la probabilidad de supervivencia ( $p=0,01$ ) (104). No hubo correlación estadísticamente significativa entre la p53 y las variables grado de diferenciación, grado de queratinización y el índice de color Ki-67. La correlación entre p53 y PAI-1, así como entre uPA y PAI-1 fue altamente significativa (104). De acuerdo con las estimaciones de Kaplan-Meier, Ki-67, uPA y PAI-1 no tuvieron influencia sobre la supervivencia en este grupo de pacientes (104). Los autores concluyen que para p53, el valor medio puede ser utilizado como un divisor de la mediana de supervivencia de los pacientes, de tal forma que aquellos con p53 por debajo de 122 pg/mg de proteína tienen una mediana de supervivencia de 151 meses y aquellos con una p53 por encima de 122 pg/mg sólo tienen 61 meses de mediana de supervivencia (104). El correspondiente valor de p fue significativo a 0,0201.

Resumiendo la relación entre PAI-1 y P53, tenemos que por lo general, los niveles de PAI-1 están correlacionados con los niveles de p53 y esta correlación es positiva; en algunos tipos histológicos de tumor, cuando se ha estudiado la relación entre ambos, los niveles elevados de PAI-1 se han asociado con disminución de la supervivencia o con metástasis ganglionar, pero en otros, a pesar de la correlación positiva con p53 y otros marcadores (uPA), su nivel elevado no incide en la supervivencia; se ha encontrado también en estudios celulares de senescencia replicativa una relación entre PAI-1 y p53, de tal manera, que PAI-1 se expresa en células senescentes luego de la proliferación de p53 tanto en células autónomas como en los controles; y finalmente, en un estudio con un genotóxico ambiental (MNNG), se indujo la producción de PAI-1 dependiente de p53, con lo cual, además de la relación entre ambos, se llegó a la sugerencia de que algunos agentes genotóxicos ambientales podrían contribuir a la metástasis de los tumores mediante la inducción de PAI-1 sin la participación de ninguna modificación genética.

## 9. PAI-1 Y SU RELACIÓN CON KU80

Ku80 es una proteína codificada en humanos por el gen *XRCC5* (105). Ku80 y Ku70, conforman un heterodímero denominado proteína Ku, que se une a los extremos de la doble cadena de ADN que ha sufrido una ruptura y se requiere para el proceso de recombinación no homóloga durante la reparación del ADN (105).

Ku80 también es necesaria en el proceso de recombinación V(D)J, que es un mecanismo de recombinación genética que se da en los vertebrados y en el cual, se seleccionan y ensamblan al azar segmentos de genes que codifican proteínas específicas con roles importantes en el sistema inmunitario (106-107). Esta combinación específica de localización genera un repertorio diverso de receptores en los linfocitos T y moléculas de inmunoglobulina (Ig) que son necesarios para el reconocimiento de diversos antígenos bacterianos, víricos y de parásitos, así como de células disfuncionales como las tumorales (108-109). Es decir, con esta función de Ku80 se logra incrementar la diversidad del reconocimiento antigénico del sistema inmune (106-107).

Además de su papel en el proceso de recombinación no homóloga, Ku también se requiere para el mantenimiento del tamaño del telómero y el silenciamiento de genes subteloméricos (110).

En un estudio de Bednarek y colaboradores (2008), se demostró que el aumento de la expresión intracelular de la timosina beta (Tbeta4) era un factor necesario y suficiente para inducir la expresión del gen del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) en células endoteliales. Para describir el mecanismo de este efecto, los investigadores produjeron células mutantes Tbeta4 con discapacidad funcional probada y evaluaron su localización intracelular y su actividad. La distribución citoplasmática de Tbeta4 ((AcSDKPT/4A)), Tbeta4 ((KLKKTET/7A)), y Tbeta4 ((K16A)) mutantes fusionada con una proteína fluorescente verde no se diferenció significativamente de los Tbeta4 de tipo natural o salvaje (111). La sobreexpresión de Tbeta4, Tbeta4 ((AcSDKPT/4A)) y Tbeta4 ((K16A)) afectó a la formación intracelular de los filamentos de actina (111). Como era de esperar, la absorción por el núcleo de Tbeta4 ((K16A)) se vio afectada (111). Por otra parte, la sobreexpresión de Tbeta4 ((KLKKTET/7A)) resultó en el desarrollo de una red de filamentos de actina típica de células adheridas, indicando que el mutante carecía de sitio de unión de la actina (111). El mecanismo por el cual el Tbeta4 intracelular induce el gen PAI-1 no depende del tetrapéptido N-terminal AcSDKP y depende sólo en parte de su capacidad para unirse a G-actina o de entrar en el núcleo (111). Ambos Tbeta4 y Tbeta4 ((AcSDKPT/4A)) inducen el gen PAI-1 en la misma medida, mientras que los mutantes Tbeta4 ((KLKKTET/7A)) y Tbeta4 ((K16A)) mantienen alrededor del 60% de la actividad original

(111). Por análisis proteómicos, la subunidad Ku80 de la helicasa II de ADN dependiente de ATP fue encontrada asociada con Tbeta4. Ku80 y Tbeta4 constantemente co-immunoprecipitan en un complejo de células endoteliales (111). La co-transfección de células endoteliales con la delección de mutantes Ku80 y Tbeta4 demostró que el dominio C-terminal del brazo de Ku80 está directamente involucrado en esta interacción (111). Por otra parte, la regulación a la baja de Ku80 por la interferencia específica de ARN corto, resultó en una reducción dramática en la expresión de PAI-1 tanto en el nivel de ARNm como de síntesis de proteínas (111). Estos datos sugieren que Ku80 funciona como un nuevo receptor para Tbeta4 y media su actividad intracelular (111).

Para resumir, la relación entre PAI-1 y Ku80 en células endoteliales, ha demostrado que la expresión intracelular de timosina beta 4 induce el gen PAI-1 y esta expresión depende solo en parte de la capacidad de Tbeta4 para unirse a G-actina o de entrar en el núcleo. La subunidad Ku80 de la helicasa II de ADN dependiente de ATP en su dominio C terminal está directamente involucrada con la asociación con Tbeta4, de tal forma que la regulación a la baja de Ku80 produce una reducción dramática en la expresión de PAI-1 tanto a nivel de ARNm como de síntesis de proteínas. Esto sugiere que Ku80 funciona como receptor para Tbeta4 y media su actividad intracelular, entre ella, la regulación de PAI-1.

Las timosinas son pequeños péptidos, originalmente identificadas en el timo, pero ahora se sabe que están ampliamente distribuidas en muchos tejidos y células (112). Las timosinas se dividen en tres grupos principales, alfa, beta y gamma-timosinas, basado en sus puntos isoeléctricos (112). Las alfa-timosinas (ProTalpha, Talphal) tiene localización nuclear y están implicados en la transcripción y/o repeticiones de ADN, mientras que las beta-timosinas (Tbeta4, Tbeta10, Tbeta15) tienen localización citoplasmática y muestran gran afinidad por G-actina para la movilidad celular (112). Por otra parte, es bien sabido que tanto alfa y beta-timosinas juegan un papel importante en la respuesta de modulación inmune, en la biología vascular y en la patogénesis del cáncer (por ejemplo, en el adenocarcinoma de próstata la timosina  $\beta$ 15, favorece la diseminación del cáncer fuera de la glándula prostática) (112). Más importante aún, las timosinas pueden tener importantes aplicaciones clínicas. Pueden servir como marcadores moleculares para el diagnóstico y pronóstico de ciertas enfermedades. Además, podrían ser dianas moleculares de ciertas enfermedades o ser utilizadas como agentes terapéuticos para el tratamiento de algunas enfermedades (112). Sin embargo, los mecanismos moleculares de acción de las timosinas son en gran parte desconocidos (112).

De todas las timosinas, la timosina  $\beta$ <sub>4</sub> es considerada el péptido principal, debido a que representa aproximadamente entre el 70% y 80% del contenido total de beta timosinas (112).

La Tbeta4 regula la producción de actina (un componente del citoesqueleto) y la producción de laminina (112).

## **10. PAI-1 Y SU RELACIÓN CON LA HIPOXIA CELULAR**

En general la hipoxia tumoral se ha relacionado consistentemente con resultados no satisfactorios del tratamiento. A continuación se revisarán algunos estudios que relacionan el PAI-1 con la hipoxia celular.

En un estudio de Li y colaboradores (2011), en el que se investigó un factor alfa-1 mutante inducible por hipoxia (HIF-1) para mejorar la angiogénesis y la perfusión tisular en el musculo esquelético isquémico de conejo, mencionan que el factor alfa 1 (HIF-1 alfa) es uno de los factores de crecimiento angiogénico más potentes, que regula genes implicados en la angiogénesis, pero se inactiva rápidamente por la normoxia.

Estos investigadores construyeron el Ad-HIF-1alpha-Trip por la transformación de Pro402, Pro564 y Asn803 de HIF-1 alfa a alanina con el fin de retrasar la degradación y crear un activador transcripcional sustitutivo (69). Con este factor alfa-1 evaluaron si se podría inducir una angiogénesis funcional madura y los posibles mecanismos implicados (69). Se encontró que el Ad-HIF-1alpha-Trip aumentó la expresión de múltiples genes angiogénicos en los cultivos celulares HMVEC-Ls, incluyendo VEGF, PlGF, PAI-1 y PDGF. En un modelo de conejo de isquemia aguda de extremidades posteriores, el Ad-HIF-1alpha-Trip mejoró la perfusión de los tejidos y los vasos colaterales, según los resultados de mediciones hechas por ultrasonido, angio-TAC, entre otros. El Ad-HIF-1alpha-Trip también produjo más capilares identificables histológicamente que fueron verificados por inmunotinción, en comparación con los controles (69). Curiosamente, la inhibición de CBP/p300 por la curcumina previno la inducción de la expresión por HIF-1 alfa de varios genes angiogénicos (69). El presente estudio sugiere que Ad-HIF-1alpha-Trip puede inducir la angiogénesis madura y mejorar la perfusión tisular en el músculo esquelético de conejo isquémico (69). El CBP/p300, que interactúa con los dominios de transactivación de HIF-1 alfa, es importante para la transcripción de genes angiogénicos inducida por HIF-1 alfa (69).

Según mencionan Ahn y colaboradores (2010), en un estudio sobre la respuesta a la hipoxia tras el aumento de la expresión de PAI-1 a través de los factores HIF-1 o HIF-2 en células de hepatoma de ratón, el PAI-1 es un importante regulador de numerosos procesos fisiopatológicos como la inflamación, la trombosis, la angiogénesis y las metástasis tumorales. Su expresión es inducida por la hipoxia en el nivel transcripcional, a través de los factores inducibles por hipoxia HIF-1 o HIF-2. Los autores, dilucidaron el mecanismo de regulación transcripcional del gen PAI-1 del ratón por hipoxia de células de hepatoma (113). Los

investigadores buscaron los elementos de respuesta a la hipoxia (HREs) del promotor PAI-1 murino utilizando varios ensayos de biología molecular (113). El primer ensayo de hipersensibilidad de la ADNsa I, sugirió que la expresión génica del PAI-1 está regulada por las interacciones proteína-ADN en el 3,6 y 3-kb en regiones superiores del sitio de inicio de la transcripción de genes de la PAI-1 (113). Una región aproximada de 6,4 kb del ADN que contiene la región promotora 5'-flanking del gen PAI-1 fue aislada, mapeada, clonada y secuenciada dentro de un gen vector. El ensayo del gen chivato luciferasa posteriormente identificó dos HREs funcionales, situados en torno a 3,6 kb de la región promotora 5'-flanking del gen PAI-1, que fueron responsables del aumento de la actividad del gen de la luciferasa. La mutación de HREs en este fragmento suprimió la actividad del gen luciferasa. Finalmente, *in vitro* e *in vivo*, los ensayos de interacción proteína-ADN confirmaron la unión de los dos HREs a las proteínas HIF-1 o HIF-2. Estos resultados muestran que los dos HREs situados alrededor de 3,6 kb de la región promotora 5'-flanking del gen PAI-1 del ratón, funcionan como potenciadores de la hipoxia, lo cual, junto a otras regiones reguladoras, controlan la transcripción del gen PAI-1 por HIF-1 o HIF -2 bajo ambientes de hipoxia en las células de hepatoma del ratón (113).

En un estudio de Sprague y colaboradores (2007), sobre efectos de la hipoxia y reoxigenación en la expresión de los niveles del activador de uPA, su inhibidor PAI-1 y el receptor del activador de uPA en células de cáncer de cabeza y cuello humanas, se menciona que uno de los objetivos durante el tratamiento radioterápico es inducir a la reoxigenación de tumores hipóxicos con el fin de mejorar la radiosensibilidad y en definitiva, incrementar la muerte celular.

Según estos autores, en los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (CECC), la hipoxia es considerada un modulador fisiológico clave para la progresión maligna (114). El sistema de activación del plasminógeno está involucrado en funciones generales como la conformación de la matriz extracelular, la proliferación celular y la transducción de señales (114). Puesto que se sabe poco sobre la reoxigenación y el sistema de activación del plasminógeno en CECC, tres líneas celulares humanas (BHY, FADU y CAL27) y una línea de células de control no transformadas (VH7) fueron expuestas a condiciones de hipoxia (<0,5% de O<sub>2</sub>) hasta 72 horas y posteriormente, reoxigenadas durante 24 h en condiciones normoxicas (114).

La expresión de ARNm del activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA), del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) y del receptor del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPAR) se evaluó en tiempo real por medios semi-cuantitativos de RT-PCR y la expresión proteica se determinó mediante cuantificación inmunoenzimométrica

(ELISA) (114). Tanto la hipoxia como la reoxigenación indujeron cambios estadísticamente significativos en la uPA, el ARNm de PAI-1 y uPAR, y los niveles de proteína en las diferentes líneas celulares analizadas, que muestra que la tensión de oxígeno es un modulador importante del sistema de activación del plasminógeno *in vitro*. Sin embargo, no se encontraron patrones uniformes de correlación entre los niveles de ARNm y de proteínas analizados en tres puntos (24,48 y 72 horas), ni con las variantes de tratamiento de oxígeno (N, H, I) de acuerdo con las condiciones de tratamiento de oxígeno en los tres cortes de tiempo (114). Estos resultados sugieren que los cambios en la tensión de oxígeno pueden modular un frágil equilibrio entre los diversos componentes del sistema de activación del plasminógeno en el CECC que pueden conducir en última instancia a un incremento en la ruptura de la matriz del tumor, a alteraciones que posibiliten en la invasión de las células tumorales y la difusión de dichas células hacia órganos distantes (114).

Por otra parte, Schilling y colaboradores (2007) estudiaron la inducción del activador del inhibidor del plasminógeno (PAI-1) por hipoxia y por radiación en líneas celulares humanas de carcinoma de cabeza y cuello. Mencionan estos autores que el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (CECC) con frecuencia contiene regiones hipóxicas muy radiorresistentes, sin embargo, la radioterapia es un tratamiento común para estos tumores. La reoxigenación durante la radioterapia fraccionada es deseable en estas regiones tumorales hipóxicas para hacerlas más sensibles a la radiación. La hipoxia, además, conduce a la sobrerregulación de la proteína PAI-1, que está implicada en la progresión tumoral y es un marcador de pronóstico desfavorable. Sin embargo, el impacto de la reoxigenación y la radiación en los niveles de PAI-1 no está todavía muy claro (115). Por lo tanto, los investigadores, determinaron la cinética de la expresión de PAI-1 en cultivos celulares y en la secreción de estos cultivos después de la hipoxia y la reoxigenación (115). Además, se determinó la influencia de las radiaciones ionizantes sobre los niveles de PAI-1 en las dos líneas celulares humanas de CECC, BHY y FADU (115).

Para visualizar los niveles de hipoxia en las dos líneas celulares, se utilizó el HIF-1 alfa inmunoblot (115). La expresión de PAI-1 se investigó por microscopía de inmunofluorescencia (115). La prueba de ELISA se utilizó para cuantificar los cambios relativos en la expresión de PAI-1 en lisados de células y en la secreción de los cultivos (sobrenadantes de cultivo celular) en respuesta a diferentes periodos de tiempo (2-4 horas) de exposición a la hipoxia (<0,66% de O<sub>2</sub>), la expresión celular de PAI-1 luego de la reoxigenación (24 h, 20% de O<sub>2</sub>) y la radiación (0,2,5,10 Gy) se estudio por microscopia (115). Se encontró que la expresión del HIF-1 alfa fue inducida entre 2 y 24 h de exposición a la hipoxia (115). La expresión del PAI-1 intracelular fue significativamente mayor en las células BHY y la FADU a las 4 h después de la exposición hipóxica (115). Una importante inducción de PAI-1 secretada fue observada después de 12 a 24

h en las células BHY y de 8 a 24 h de hipoxia en las células FADU, en comparación con el control normóxico (115). A 24 h del periodo de reoxigenación, se observó mucho menos secreción de PAI-1 que a 24 h del periodo de hipoxia en las células FaDu (115). La irradiación condujo a una regulación de la expresión y secreción de PAI-1 en ambas líneas celulares, FADU y BHY (115). Estos datos sugieren que, ambas, la exposición a la hipoxia de duración corta (aproximadamente 4-8 horas) y larga (aproximadamente 20 a 24 h) puede aumentar los niveles de PAI-1 en células de carcinoma escamocelular in vivo (115). Es importante destacar que la propia radiación podría llevar a una sobrerregulación de PAI-1 en tumores de cabeza y cuello, mientras que la reoxigenación de las células tumorales hipóxicas durante la radioterapia fraccionada podría contrarrestar el aumento de los niveles de PAI-1 (115).

Sprague y colaboradores (2006), estudiaron el efecto de la reoxigenación sobre la sobre-regulación inducida por hipoxia del inhibidor de la proteasa de serina, el PAI-1, en células de carcinoma de cabeza y cuello. Estos autores mencionan que, en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (CECC), la hipoxia es considerada como un modulador de importancia fisiológica para la progresión maligna, el sistema de activación del plasminógeno está involucrado en la superposición de funciones tales como el modelamiento de la matriz extracelular y la transducción de señales (116). Poco se sabe sobre los efectos de la reoxigenación en el sistema de activación del plasminógeno de las células de CECC (116). Los investigadores expusieron a hipoxia (<0,5% de O<sub>2</sub>) tres líneas celulares humanas de CECC (BHY, CAL27, FADU) y una línea de células humanas no transformadas de fibroblastos (VH7), por un máximo de 72 horas y posteriormente, las reoxigenaron en condiciones de normoxia por 24 horas (116). Se midió la concentración de uPA y de PAI-1 y su actividad por ELISA y ELISA compleja, respectivamente (116). La reoxigenación indujo cambios significativos en la secreción de PAI-1 en las células de CECC en comparación con el control normóxico (116). También se observó un aumento significativo de uPA después de la reoxigenación solo en algunas de las líneas celulares de CECC (116). La determinación de la formación de complejos uPA-PAI-1 reveló la liberación de la proteína activa en el sobrenadante celular (116). El papel benéfico de la reoxigenación durante la radioterapia es ampliamente aceptado (116). Sin embargo, la reoxigenación no parece contrarrestar los efectos inducidos por la hipoxia en el sistema de activación del plasminógeno (116). Igualmente, la irradiación de células tumorales reoxigenadas puede producir suficientes cantidades de proteínas nocivas e iniciar un camino para la supervivencia de las células tumorales a través de la invasión y las metástasis (116).

En un estudio de Liu, Moller, Flugel y Kietzmann (2004), en el cual se evaluó la inducción de la expresión génica del PAI-1 por el calcio intracelular a través del factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1), se menciona que la expresión del PAI-1 puede ser aumentada por la hipoxia y por otros estímulos que conduzcan a la movilización del calcio intracelular. Por esto, el

objetivo de los investigadores fue evaluar el papel del calcio en la expresión de PAI-1 dependiente de la hipoxia.

Se ha demostrado que el *Ca (2+)-ionophore A23187* y el *Ca (2+)-chelator BAPTA-am (1,2-bis (2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid-acetoxymethyl ester)*, permean las células e inducen la expresión de ARNm PAI-1 y la proteína PAI-1 en normoxia e hipoxia en las células HepG2 (117). Experimentos de transfección con el elemento de respuesta a la hipoxia (HRE) de tipo natural y mutado, promotores del PAI-1, han revelado que el HRE se une al factor inducido por hipoxia-1 (HIF-1) mediado por la respuesta a A23187 y BAPTA am. El A23187 induce una notable y estable inducción de HIF-1 alfa, mientras que BAPTA-am, únicamente produce un aumento rápido y transitorio (117).

Mediante el uso de actinomicina D y cicloheximida los investigadores demostraron que A23187 indujo la expresión de ARNm HIF-1, mientras que BAPTA-am actúa después de la transcripción (117). Aunque A23187 activa una señal extracelular regulada por quinasa (ERK) y otras reguladas por la Jun N-terminal quinasa (118), la p38 protein quinasa mitógena activada (MAPK) y la protein quinasa B; parece que el aumento de la HIF-1 alfa por A23187 fue mediado únicamente por la vía ERK (117). Por otra parte, BAPTA-am extiende sus efectos vía inhibición de la actividad de HIF-prolil hidroxilasa y la interacción con la proteína supresora del tumor von Hippel-Lindau (VHL) (117). Por estos hallazgos, los autores consideran que el calcio parece tener un papel fundamental en la regulación del sistema HIF y la posterior activación de la expresión del gen PAI-1 (117).

Finalmente, en un estudio de Kimura y colaboradores (2002), en el que se evaluó la influencia de hipoxia sobre la expresión de PAI-1 en una línea de cáncer de pulmón de células EBC-1, se menciona que el gen PAI-1 es uno de los genes diana del factor inducible por hipoxia alfa 1 (HIF-1 alfa), además de ser un importante regulador fisiológico del sistema fibrinolítico y de participar en la invasión del cáncer.

El HIF-1 alfa se expresa en varios tipos de células pulmonares, pero la relación de PAI-1 a HIF-1 alfa en condiciones de hipoxia en esas células no está completamente dilucidada. La expresión de la proteína HIF-1 alfa en las células EBC-1 se incrementó por la hipoxia y esto se asoció con un aumento de la secreción de PAI-1 (119). La hipoxia no afectó los niveles de ARNm HIF-1 alfa, pero aumentó los niveles de ARNm PAI-1 (119). Al hacer el pre tratamiento de las células con MG132, se inhibió la degradación proteasomal de HIF-1 alfa y se incrementó la producción de PAI-1 bajo ambas condiciones de normoxia e hipoxia (119). Por estos hallazgos, los autores concluyeron que la hipoxia induce la expresión de PAI-1, en células EBC-

1, a través de la estabilización del complejo HIF-1 y esto puede estar relacionado con las metástasis del cáncer (119).

En resumen, en estudios en cultivos celulares, se ha observado que la expresión de PAI-1 aumenta con la hipoxia. Este aumento es mediado por los factores inducidos por la hipoxia (HIF1 o HIF2), que inducen a su vez el PAI-1, actuando sobre el gen que lo codifica. Pero los HIF no actúan solos sobre este gen, se unen con los *elementos de respuesta a la hipoxia* (HREs), que actúan como potenciadores de la misma, antes de inducirlo.

Por otra parte, también en líneas de cultivos celulares de células tumorales de carcinoma de cabeza y cuello, se ha establecido que la hipoxia y la reoxigenación inducen cambios estadísticamente significativos en el ARNm de uPA, de PAI-1 y uPAR y de sus proteínas. Lo cual muestra que la tensión de oxígeno es un modulador importante del sistema de activación del plasminógeno *in vitro*. Sin embargo, los cambios generados por la tensión de oxígeno pueden modular un frágil equilibrio entre diversos componentes del sistema del plasminógeno, que pueden favorecer o no la rotura de la matriz del tumor, o, alteraciones que posibiliten la invasión de las células tumorales y su difusión hacia órganos distantes.

Por esto, algunos investigadores opinan que la reoxigenación no parece contrarrestar los efectos inducidos por la hipoxia en el sistema de activación del plasminógeno y cuando se irradian las células tumorales reoxigenadas, pueden producirse suficientes cantidades de proteínas nocivas e iniciarse el camino para la supervivencia de las células tumorales a través de la invasión y las metástasis.

Tal vez la inclinación de la balanza dependa de la tensión de oxígeno alcanzada en el tumor, del tiempo durante el cual el ambiente al que se someten las células tumorales sea hipóxicos, de otros factores que intervengan en la relación HIF-1 alfa y PAI-1 (como el calcio intracelular), de factores que estabilicen el HIF-1 alfa en el medio intracelular y que hagan que este induzca por un tiempo más prolongado la producción de PAI-1, y de si hay o no mutaciones en los HIF-1 alfa que induzcan factores angiogénicos que produzcan una angiogénesis madura y mejoren la perfusión tisular.

## **11. PAI-1 Y LOS CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS**

La invasión extravascular e intravascular de tumores sólidos malignos depende de la unión de las células tumorales a los componentes de la membrana basal y de la matriz extracelular, de la proteólisis local y de la capacidad de migración de las células tumorales (120). Se ha acumulado una fuerte evidencia clínica y experimental de la asociación de la proteasa sérica plasmina, el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA), el receptor de

uPAR (CD87) y los inhibidores de PAI-1 y PAI-2 con la invasión del cáncer y las metástasis (120). El aumento de uPA, uPA-R y/o PAI-1, en los pacientes afectados con tumores sólidos malignos, se ha asociado con la progresión del tumor y con la disminución de la supervivencia libre de enfermedad (120).

La unión a los receptores del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) parece desempeñar un papel clave en estos eventos. El uPA convierte el plasminógeno en plasmina y, por tanto media la proteólisis peri-celular durante la migración celular y la remodelación de los tejidos en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas (121). El uPA se secreta como una proenzima enzimáticamente inactiva (pro-uPA) por las células tumorales y las células del estroma (121). El uPA ejerce su función proteolítica en las células normales y en las células tumorales como coenzima después de haberse unido a un receptor de la superficie celular de alta afinidad (121). Después de la unión, pro-uPA es activada por proteasas de serina (por ejemplo, la plasmina, tripsina o calicreina plasmática) y por las proteasas de cisteína catepsina B o L. El uPA unido a los receptores enzimáticamente activos convierte el plasminógeno en plasmina, que se une a otros receptores de baja afinidad en las células tumorales (121). La plasmina degrada componentes del estroma tumoral (por ejemplo, la fibrina, fibronectina, proteoglicanos, laminina) y puede activar la procolagenasa tipo IV que degrada el colágeno tipo IV, una parte importante de la membrana basal (121). Por esto, el uPA unido al receptor promoverá la activación del plasminógeno y por tanto la disolución de la matriz del tumor y la membrana basal, que es un requisito previo para la invasión y la metástasis (121).

El aumento del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) y/o de su inhibidor PAI-1, parecen ser uno de los principales marcadores pronósticos descritos hasta ahora en este tipo de tumores (120). Un fuerte valor pronóstico de estas dos proteínas para predecir la recurrencia de la enfermedad y la supervivencia global se ha documentado en pacientes con cáncer de mama, ovario, cuello uterino, endometrio, estómago, colon, pulmón, vejiga, riñón, cerebro y tejidos blandos (120). Debido a la fuerte correlación entre valores elevados de uPA y/o PAI-1 en tejidos de cáncer primario y la capacidad de invasión/metástasis de las células cancerosas, se ha planteado en diferentes estudios que los factores proteolíticos de uPA y PAI-1 pueden ser dianas para el tratamiento de estos pacientes. Se han presentado diversos enfoques para interferir con la expresión o la reactividad de uPA o CD87 a nivel del gen o de la proteína que se han probado con éxito, como es el caso de los oligonucleótidos antisentido (antisense), los anticuerpos, los inhibidores enzimáticos y los análogos sintéticos o recombinantes de uPA y uPAR (120).

A continuación se revisarán algunos trabajos en los cuales se evalúa el PAI-1 en tumores malignos de células escamosas.

En un estudio de Gao y colaboradores (2010), sobre alteraciones epigenéticas del gen SERPINE 1 en carcinomas orales de células escamosas y en mucosa oral normal, se menciona que los mecanismos responsables de la sobrerregulación del PAI-1 en el cáncer siguen siendo poco claros. Por esto, investigaron la expresión específica de PAI-1 en células de los carcinomas orales mediante técnicas de inmunohistoquímica (122). Encontraron que el PAI-1 se expresó en 18 de 20 pacientes, principalmente por las células cancerosas. Dos pacientes mostraron PAI-1 positivo en las células del estroma que rodeaba las zonas tumorales y cinco mostraron células PAI-1 positivas en tumores adyacentes al epitelio normal. Utilizando la técnica de tiempo real de análisis, RT-PCR, 17 de 20 pacientes con carcinoma oral tenían entre 2,5 y 50 veces aumento del nivel de ARNm PAI-1 en el tumor, en comparación con los tejidos normales adyacentes pareados (122). El nivel de ARNm PAI-1 en el tejido conectivo de 15 voluntarios sanos fue similar al nivel encontrado en los tejidos normales adyacentes al tumor, pero el nivel en el epitelio fue de 5 a 10 veces menor (122). El análisis de la metilación del ADN de 25 sitios CpG dentro de 960 pb alrededor del sitio de iniciación de la transcripción del gen SERPINE1 (o PAI-1) por secuenciación de bisulfito, encontró que tanto los tumores como el tejido normal adyacente al tumor tenían un importante nivel de metilación, mientras que hubo muy poca metilación en el tejido de voluntarios sanos, lo que sugiere que el tejido normal adyacente al tumoral ya contiene la transformación asociada a los cambios epigenéticos (122).

A pesar de los anteriores hallazgos, no hubo una correlación inversa entre los niveles de ARNm PAI-1 y la metilación de genes SERPINE1 en todos los tejidos, lo que muestra que la metilación CpG no es el principal determinante del nivel de expresión de PAI-1 en el tejido oral (122).

Como se ha descrito anteriormente, el sistema activador del plasminógeno se compone de dos activadores del plasminógeno, el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) y el activador del plasminógeno tipo tejido, los inhibidores de la activación del plasminógeno (PAI-1 y 2), y un receptor de superficie celular de uPA (uPAR). El sistema activador del plasminógeno está involucrado en muchas etapas de la cascada metastásica, incluyendo la remodelación de la matriz, la proliferación celular y la migración. Baker y colaboradores realizaron un estudio en el que compararon las concentraciones tisulares de los componentes del sistema activador del plasminógeno en tejido tumoral y en tejido normal emparejados, de pacientes con carcinoma oral de células escamosas y su correlación con la clasificación histopatológica del tumor. Treinta y ocho pares de muestras de tejido fueron analizadas por el método de ELISA (ng/mg de proteína) para uPA, tPA, uPAR, PAI-1 y PAI-2 (123). Se encontró que las concentraciones de uPA, uPAR, PAI-1 y PAI-2 fueron significativamente mayores en el tumor que en el tejido oral normal (media de uPAR en el tumor de 1,6 ((rango, 0,1-7,5) ng/mg de proteína; normal=0,2 (0-2,3),  $p < 0,05$ ) (123). También se observó una fuerte correlación entre las concentraciones de

ciertos componentes del sistema activador del plasminógeno, en particular entre uPA, uPAR y PAI-1 ( $p < 0,05$ ). Además, las concentraciones tisulares de algunos componentes del sistema activador del plasminógeno correlacionaron con los índices clínicos y patológicos de agresividad de los tumores, incluyendo el grado de diferenciación y el estadio T (123).

Por otra parte, Hundsdorfer y colaboradores (2004), examinaron la distribución y la importancia pronóstica del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) y del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) en los casos de carcinoma primario de células escamosas de mucosa oral. El tejido del tumor primario fue tomado de 79 pacientes. Con el fin de hacer una comparación intra-individual, el tejido de la mucosa sana de la boca fue tomado en 50 pacientes y el tejido metastásico de los ganglios linfáticos del cuello en 16 pacientes. El contenido de uPA y PAI-1 se determinó por ELISA. Después del seguimiento, 58 pacientes con tratamiento quirúrgico primario se incluyeron en el estudio.

Se encontró que la mediana del valor de uPA fue de 3,43 ng/mg en el tumor primario y la de PAI-1 47,1 ng/mg ( $n=79$ ). Se observó una correlación significativa entre la uPA y PAI-1 tanto en el tejido canceroso, como en los tejidos sanos ( $p < 0,01$ ) (124). Las comparaciones intra-individuales mostraron que uPA y PAI-1 difirieron significativamente entre los tejidos cancerosos y sanos ( $p < 0,0001$ ) con la media de los valores de uPA y PAI-1 nueve veces mayor en el tejido canceroso ( $n=58$ ). La correlación entre uPA y PAI-1 en los tumores, el tejido sano y el tejido ganglionar metastásico ( $n=16$ ) mostró valores muy significativos en los tumores ( $p < 0,001$ ). La comparación entre el tejido canceroso del tumor primario y de los ganglios linfáticos no fue significativa para el PAI-1. Para uPA, los valores en los ganglios linfáticos fueron significativamente menores ( $p < 0,049$ ). Hubo también niveles significativamente más altos en el tejido ganglionar metastásico en comparación con las membranas mucosas sanas ( $p=0,005$  para la uPA y  $p=0,003$  para PAI-1). No se encontró correlación significativa de PAI-1 y uPA ( $n=79$ ) con el sexo del paciente, el tamaño del tumor (estadio T), el estado ganglionar (estadio N), el grado de diferenciación del tumor, o el estatus de tumor residual. Al dividir los pacientes en dos grupos etarios ( $\leq 58$  años y  $> 58$  años), los pacientes de mayor edad tuvieron mayores niveles de uPA ( $p < 0,017$ ) y PAI-1 ( $p < 0,02$ ). No se encontró asociación significativa entre la localización del tumor y el contenido de uPA en el tumor; para el PAI-1 la asociación fue significativa ( $P < 0,02$ ) en las distintas zonas de la boca. Hubo un total de 23 pacientes (40%) con recidiva (local  $n=13$ , a ganglios linfáticos  $n=3$ , local y de los ganglios linfáticos  $n=1$ , a ganglios linfáticos y piel  $n=1$ , en otros lugares  $n=5$ ). Estos pacientes tuvieron aumentados los niveles de uPA ( $p=0,012$ ) y PAI-1 ( $p=0,014$ ) en el tumor primario. Los autores concluyeron que la determinación del nivel de PAI-1 inmediatamente después de la cirugía podría ser una indicación de la probabilidad de recaída y por tanto de ayuda en la determinación de la terapia adyuvante (124). Estos hallazgos confirman también la tendencia de los resultados de

diferentes estudios sobre que las proteasas asociadas a tumores también pueden desempeñar un papel clave en el carcinoma oral de células escamosas como nuevo e independiente factor pronóstico.

En un estudio de Zhao y colaboradores (125), para detectar la expresión del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) y sus inhibidores (inhibidores del activador del plasminógeno, PAI, tipo 1 y 2) en el carcinoma de células escamosas de laringe en humanos y revelar su correlación con los principales parámetros clínico-patológicos y el pronóstico, se detectó uPA, PAI-1 y PAI-2 a partir de 104 casos de carcinoma de células escamosas de laringe sometidos a resección primaria. La detección se hizo mediante técnicas de inmunohistoquímica (con la marca comercial de etiqueta-streptoavidin-biotina-peroxidasa, SAB). Los resultados fueron clasificados como positivos y negativos. Los pacientes fueron seguidos de forma prospectiva durante una mediana de 41 meses (rango de 24 a 84 meses). Se encontró que la positividad para uPA, PAI-1 y PAI-2 se presentó tanto en las células neoplásicas como en fibroblastos y macrófagos. Sin embargo, dependiendo de la clasificación histológica y la capacidad invasiva del tumor, se observó una acentuada heterogeneidad intra e intertumoral en la tinción de uPA. La tasa total de positividad para uPA, PAI-1 y PAI-2 fue de 66,3%, 70,2% y 50,0%, respectivamente. No existió relación entre la expresión de estas proteínas y los parámetros clínico patológicos a excepción de las metástasis ganglionares y la recurrencia, el valor de p fue de 0,010, 0,027 y 0,038, respectivamente. El análisis univariante de la supervivencia reveló una alta correlación inversa significativa de la expresión de uPA positiva con el tiempo de supervivencia. Los pacientes con expresión de PAI-2 positiva tenían una supervivencia significativamente más larga que aquellos con expresión PAI-2 negativa. En los diferentes subgrupos de los parámetros clínicos patológicos, uPA, PAI-1 y PAI-2 añaden información significativa a la supervivencia. El análisis multivariado reveló cuatro factores pronósticos independientes para el tiempo de supervivencia global: uPA, PAI-2, metástasis ganglionares y recurrencias y *estadaje* clínico,  $p=0,001$ , 0,002, 0,035 y 0,005, respectivamente. Los autores concluyeron que estos hallazgos sugieren que el papel de uPA es importante en las metástasis del carcinoma de laringe y PAI-2 parece ser un inhibidor contrario a PAI-1. PAI-1 puede actuar como un modulador esencial del sistema de activación del plasminógeno o un protector del tejido de carcinoma contra la auto degradación, más que como un inhibidor simple del sistema. Igualmente, uPA y PAI-2 podrían ser nuevos factores pronósticos, independientes y fuertes para el carcinoma de células escamosas de laringe (125).

Se puede resumir la relación de PAI-1 y los carcinomas de células escamosas en que los estudios de los tejidos tumorales evaluados (de boca y laringe), han encontrado que el nivel de PAI-1 esta aumentado en el tejido tumoral (de la localización primaria del tumor y de las metástasis ganglionares) comparado con tejido sano adyacente al tumor y con tejido de

voluntarios sanos. Los cambios epigenéticos (análisis de metilación) están presentes en el tejido normal adyacente al tumor. En el carcinoma de laringe, los pacientes con expresión de PAI-2 positiva tuvieron una supervivencia significativamente más larga que aquellos con PAI-2 negativa. PAI-2 parece ser un inhibidor opuesto a PAI-1 (este puede actuar como protector del tejido canceroso contra la auto degradación, más que como inhibidor simple del sistema). En pacientes con carcinoma oral de células escamosas, la determinación del nivel de PAI-1 inmediatamente después de la cirugía podría ser una indicación de la probabilidad de recaída y por tanto de ayuda en la determinación de la terapia adyuvante.

## **12. PAI-1 Y LOS ADENOCARCINOMAS**

Con respecto al comportamiento del PAI-1 en los adenocarcinomas, se han desarrollado varios estudios principalmente en tumores de mama, páncreas, pulmón y esófago.

Descotes y colaboradores (2008), evaluaron la importancia pronóstica del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) y el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) en tejidos con adenocarcinoma de mama primario. Incluyeron pacientes de tres centros médicos entre 1994 y 2001. Los factores biológicos en los extractos tumorales se analizaron todos en el mismo laboratorio. PAI-1 y uPA fueron tratados como variables continuas o dicotómicas. El análisis de supervivencia libre de metástasis se realizó mediante el modelo de Cox, el algoritmo de clasificación y el árbol de regresión (CART) en toda la población y en el subgrupo de casos de ganglios negativos (pN0) o positivos (pN+). Las curvas de Kaplan de supervivencia libre de metástasis fueron diseñadas para los distintos grupos en relación con combinaciones de uPA/PAI-1. Encontraron que el nivel del activador del plasminógeno tipo uroquinasa pareció estar relacionado con el grado de extensión anatómica del tumor, por el contrario, el contenido de PAI-1 fue independiente del tamaño del tumor y la extensión ganglionar (126). En el análisis univariado, ajustado por los factores pronósticos habituales, el riesgo de metástasis aumentó con el nivel de PAI-1 en todos los pacientes (HR [hazard ratio], 3,1,  $p < 0,001$ ), en pN0 (HR, 4,3,  $p < 0,001$ ) y los pacientes pN+ (HR: 2,3;  $p = 0,019$ ) (126). Se incrementó también con el nivel de uPA en todos los pacientes (HR, 2,6,  $p = 0,006$ ) (126). En el análisis multivariado, cuando ambas variables fueron incluidas, el PAI-1 se mantuvo significativo en todos los pacientes (HR: 2,4;  $p = 0,002$ ) y en los pacientes pN0 (HR, 3,2,  $p = 0,003$ ), pero no uPA. El análisis CART confirmó que el mejor factor de división fue PAI-1 (126). Los autores concluyeron que no hubo pruebas de un impacto adicional de uPA sobre el pronóstico (126). PAI-1 se mantuvo como un factor pronóstico independiente en pacientes con carcinoma ductal de mama pN0 (126).

En un estudio de Schneider y colaboradores (2000), en el cual, se investigó el papel de uPA en el cáncer de mama precoz (pT1), se utilizaron técnicas de inmunohistoquímica (sistema

estreptavidina-biotina-peroxidasa), usando el anticuerpo policlonal Chemicon AB776, que reaccionaba con los complejos uPA-PA-1 y uPA-PAI-2. Además se estudió la expresión de CD44std, Ki67, c-erb-B2, p53, ER (receptores estrogénicos) y PR (receptores de progesterona) en las mismas muestras de tejido usando el mismo método (127).

Los resultados obtenidos se correlacionaron con invasión ganglionar y con cada una de las características patológicas clásicas tales como el grado histológico y nuclear. Se encontró que la reacción inmunohistoquímica para los complejos uPA-PAI-1 y uPA-PAI-2 fue citoplasmática y localizada en el interior de las células tumorales, sin, o sólo una reacción mínima en las células del estroma. La uPA-positiva detectada por este método se correlacionó significativamente con la expresión de ER ( $p=0,031$ ), de PR ( $p=0,030$ ), con el grado nuclear favorable ( $p=0,0087$ ) y, marginalmente, con una tasa de proliferación baja ( $p=0,088$ ), lo cual, fue contrario a los resultados reportados por la mayoría de grupos que han estudiado el uPA libre y el uPA unido a su receptor de membrana (uPAR) en tumores similares. Los autores concluyeron que los complejos uPA-PAI-1 y uPA-PAI-2 se forman dentro de las células tumorales con el fin de inactivar el uPA libre o unido a uPAR, lo cual, explica porque los hallazgos de este estudio fueron contrarios a lo observado cuando se estudian estas últimas formas (127).

Por otra parte, Smith y colaboradores (2007), realizaron un estudio para valorar la expresión del PAI-2 como predictor de mejora de la supervivencia en pacientes con adenocarcinoma de páncreas (128).

El activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA), su receptor (uPAR) y los inhibidores del activador del plasminógeno tipos 1 y 2 (PAI-1 y PAI-2) juegan un papel clave en la invasión del cáncer. El valor pronóstico de los componentes de este sistema se ha consolidado en el cáncer de mama (128). Sin embargo, según estos autores, poco se sabe de su implicación en el cáncer de páncreas.

En su estudio, utilizaron métodos cuantitativos en tiempo real de reacción en cadena de la polimerasa (Q-RT-PCR) en muestras de tejido no banquetado y técnicas de inmunohistoquímica (IHC) en muestras incluidas en parafina, para medir la expresión de las proteínas uPA, uPAR, PAI-1 y PAI-2 en 46 muestras de cáncer de páncreas y 12 muestras de cistoadenoma (128). Los resultados fueron relacionados con la supervivencia mediante pruebas de riesgo proporcional de Cox. Encontraron que el aumento de la expresión de uPA, uPAR y PAI-1 en el tejido de cáncer de páncreas se asoció independientemente con un mayor *estadiaje* del tumor según la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC)] ( $p<0,001$ ) y estuvieron intercorrelacionadas ( $P<0,001$ ) (128). La sobreexpresión de uPAR indicó disminución de la

supervivencia ( $p=0,03$ ). Por el contrario, la sobre expresión del mensajero del ácido ribonucleico PAI-2 (ARNm PAI-2), que se produjo en 21 de 46 tumores, tuvo una correlación negativa con el tamaño del tumor ( $p=0,008$ ) y con la supervivencia ( $p<0,007$ ) pero no con uPA, uPAR, o el estadio. Hubo una buena concordancia entre el valor de ARNm PAI-2 y el puntaje de IHC. Utilizando el análisis paso a paso de Cox, el valor de ARNm PAI-2 ( $HR=0,24$ ,  $p=0,001$ ) y el estadio del tumor según la UICC ( $HR= 2,014$ ,  $p=0,001$ ) predijeron de forma independiente la supervivencia. Una puntuación de IHC para el PAI-2 de 3+, o, 4+, también de forma independiente predijo una mejor supervivencia ( $HR=2,72$ ,  $p=0,025$ ) (128). Los autores concluyeron que el sistema uPA/uPAR/PAI-1 se activa en el cáncer de páncreas avanzado y puede explicar el comportamiento agresivo del tumor, mientras que la expresión del PAI-2 parece ser independiente de uPA/uPAR/PAI-1 y se asocia con un mejor pronóstico. Debido a su intercorrelación con el ARNm, la IHC de PAI-2 puede ser utilizada como un indicador de la supervivencia (128).

En un estudio de Pappot, Pedersen, Brunner y Christensen (2006), se evaluó la supervivencia de una población con adenocarcinoma de pulmón de 99 pacientes con muestras de tejido tumoral y su relación con el complejo formado por uPA y PAI-1 en dicho tejido (129). El estudio incluyó materiales de pacientes previamente incluidos en otro estudio sobre el impacto pronóstico de PAI-1 en la supervivencia, por lo cual, la información sobre los parámetros clínicos estaba disponible. Los pacientes tuvieron una mediana de supervivencia de 25 meses. Se utilizó la prueba de ELISA en extractos de tumor para medir complejos preformados de uPA-PAI-1 y previamente se tenían datos disponibles de los niveles de uPA y PAI-1. Las cantidades del complejo uPA-PAI-1 en el tejido de adenocarcinoma pulmonar estuvieron en el mismo rango que para el tejido de cáncer de mama (0,11-5,74 ng/mg de proteína), como se informó en un estudio previo de los mismos autores (129).

Los niveles de uPA y PAI-1 se correlacionaron débilmente con los niveles del complejo uPA-PAI-1,  $r=0,52$  y  $r=0,47$ , respectivamente y no se encontró relación entre el complejo uPA-PAI-1 y cualquiera de los parámetros clínicos investigados. Sin embargo, se demostró un impacto pronóstico significativo del PAI-1 en estos pacientes ( $HR=1,62$ ,  $p= 0,04$ ). En los pacientes con nivel alto de PAI-1 y bajo del complejo uPA-PAI-1, se encontró una supervivencia significativamente peor que los pacientes con bajo PAI-1 y altos niveles del complejo uPA-PAI-1 ( $HR=3,06$ ,  $p=0,01$ ). Según los autores, esta es la primera investigación sobre el impacto pronóstico del complejo uPA-PAI-1 en un tipo de tumor que no sea cáncer de mama. Los bajos niveles del complejo uPA-PAI-1 en combinación con altos niveles de PAI-1 se asociaron con mal pronóstico. Finalmente, mencionan que para comprender estas interacciones y la importancia clínica de los niveles tisulares de uPA, PAI-1 y de los complejos uPA-PAI-1, deben hacer nuevos

estudios exploratorios de estos componentes en adenocarcinomas pulmonares y otros tipos de cáncer (129).

Por otra parte, Hourihan, O'Sullivan y Morgan (2003), estudiaron la expresión de genes asociados al adenocarcinoma esofágico usando una serie de microchips de ADNc que contiene 1,176 genes asociados al cáncer humano (130). Aproximadamente el 59% de los genes se expresó en niveles detectables. Quince genes (1,3%) exhibieron expresión diferencial (>2,5 veces), entre el tejido de adenocarcinoma de esófago y el tejido normal de esófago. Nueve genes estuvieron sobrerregulados en el tejido de adenocarcinoma de esófago (metaloproteinasas de la matriz 11 (MMP11), la ornitina decarboxilasa (ODC), citoqueratinas 8 y 18, la integrina alfa 3 (ITGA3), la integrina alfa 6 (ITGA6), BIGH3 (factor de crecimiento transformante beta-inducida), beta-catenina y CDC25B (fosfata 2 inductora de la fase M). Seis genes estuvieron subregulados en el tejido de adenocarcinoma (citoqueratina 4, el PAI-2, el antagonista del receptor de la interleukina 1 (IRAP), la citoqueratina 13/15/17, el MAD y el receptor gamma 1 del ácido retinoico (RARG)). Los autores concluyeron que la expresión diferencial de estos genes influye en la adhesión celular, la composición de la matriz extracelular, la activación de la transcripción y la progresión del ciclo celular y pueden contribuir al desarrollo del adenocarcinoma de esófago.

Por otra parte, debido a que el activador de la plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) y el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) han sido sugeridos como marcadores pronóstico en los carcinomas de pulmón de células no pequeñas. Offersen, Pfeiffer, Andreasen y vergaard (2007) investigaron si el uPA y el PAI-1 podrían ser considerados marcadores pronóstico en pacientes con carcinomas de pulmón de células no pequeñas (en inglés, NSCLC) y si estaban relacionados con la angiogénesis (131). Para ello, utilizaron tejido tumoral congelado de piezas quirúrgicas de 118 pacientes no tratados previamente, diagnosticados con NSCLC durante el período 1984-1991. Todos los pacientes fueron tratados con cirugía, y no recibieron ni quimioterapia ni radioterapia.

Los niveles de uPA y de PAI-1 se evaluaron utilizando un método de ELISA tipo sándwich. Encontraron que tanto la uPA como el PAI-1 fueron independientes de los clásicos parámetros histopatológicos, así como de la densidad de los microvasos y del patrón vascular. Utilizando la supervivencia global en los primeros cinco años como objetivo final de evaluación, ninguno de los factores fue un marcador pronóstico en el análisis univariado; sin embargo, niveles significativamente más elevados de uPA y PAI-1 se observaron en los tumores con un patrón vascular angiogénico. En el análisis multivariado, el estadio avanzado de la enfermedad ( $p < 0,0001$ ), el adenocarcinoma ( $p = 0,007$ ), la mayor edad ( $p = 0,02$ ) y la presencia de un patrón de angiogénico ( $p = 0,05$ ), fueron identificados como marcadores independientes de la muerte

dentro de los cinco años evaluados. Los autores concluyeron que ninguno de los factores estudiados fue identificado como pronóstico cuando se evalúa la supervivencia global a cinco años como punto final. Sin embargo, en tumores previamente identificados como no-angiogénicos fue encontrado significativamente menor el contenido de ambos el uPA y el PAI-1 en comparación con los tumores angiogénicos, por lo cual, generaron la hipótesis de que el uPA y la PAI-1 estimulan la angiogénesis en pacientes con NSCLC (131).

Para resumir, la relación entre PAI-1 y adenocarcinomas, muestra que en el cáncer de mama (pT1, N0, M0), el aumento de los niveles de PAI-1 y uPA-PAI-1 se asoció a un mayor riesgo de metástasis ganglionares. En el adenocarcinoma de páncreas, el aumento de la expresión de uPA, uPAR y PAI-1 se asoció independientemente con un mayor estadiaje del tumor, mientras que la expresión de PAI-2 parece ser independiente de uPA/uPAR/PAI-1 y se asoció con un mejor pronóstico. En carcinomas de pulmón de células no pequeñas, el nivel elevado de PAI-1 y bajo del complejo uPA-PAI-1, se asoció con peor supervivencia. Igualmente, valores más elevados de uPA y PAI-1 se observaron en los tumores con un patrón vascular angiogénico

### **13. COMPORTAMIENTO DEL PAI-1 EN PACIENTES CON CARCINOMA DE CUELLO UTERINO**

En diferentes estudios se ha correlacionado directamente el grado de actividad proteolítica total y la historia natural del cáncer de cuello uterino (132).

El sistema de activación del plasminógeno desempeña un papel clave en la cascada de proteólisis asociada al tumor que conduce a la degradación de la matriz extracelular y a la invasión del estroma (133). Cambios en la expresión de este sistema, que consta de los activadores de plasminógeno tipo uroquinasa y tisular (uPA y tPA, respectivamente), los activadores del inhibidor del plasminógeno (PAI-1 y PAI-2) y el receptor de uPA, se han asociado con la agresividad del tumor en un variedad de tumores sólidos malignos, entre ellos, el de cuello uterino.

En un estudio de Horn y colaboradores (2002), en el cual se evaluó la relevancia clínica (predicción de metástasis en los ganglios linfáticos pélvicos, tasa de recurrencia tumoral y supervivencia libre de recurrencia-SLR-) de la expresión de uPA y de PAI-1 sobre el carcinoma de cuello uterino, se usó la técnica de ELISA para medir los niveles de uPA y de PAI-1 en pacientes tratadas y clasificadas quirúrgicamente de cáncer de células escamosas de cuello uterino (n=114 y n=103 respectivamente). Se encontró que la mediana de los niveles de ambos parámetros fue significativamente mayor en el tejido tumoral que en el tejido cervical normal ( $p < 0,001$ ) (77). La detección de uPA no dio información de utilidad para el pronóstico.

La concentración de PAI-1 mostró una correlación positiva con el *estadio* tumoral avanzado ( $p=0,008$ ), pero no hubo una correlación significativa con el *estadio* ganglionar ( $pN0: 2,6$  frente a  $pN1: 4,0$  ng / mg de proteína,  $p=0,092$ ). Al establecer un nivel de corte de  $2,4$  ng/mg de proteína, los pacientes con niveles elevados de PAI-1 demostraron reducción de supervivencia libre de recurrencia ( $45,9$  frente a  $52,9$  meses,  $p=0,1$ ) que no fue estadísticamente significativa. El análisis multivariado, incluyendo el *estadio* ganglionar, el *estadio* tumoral, la invasión del espacio linfovascular y el grado histológico fallaron en demostrar algún impacto pronóstico de uPA y PAI-1. Los autores concluyeron que la expresión de PAI-1 es de algún impacto pronóstico en el cáncer de cuello uterino, indicando una asociación de la elevación de los niveles de PAI-1 con la progresión local del tumor y la reducción de la supervivencia libre de recurrencia (77).

En un estudio de Daneri-Navarro y colaboradores (1998), en el cual, se examinó si un aumento en el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) y del PAI-1 se relacionaba con la historia natural del cáncer de cuello uterino, se midió la actividad del uPA y el PAI-1 y las concentraciones de antígenos de uPA, PAI-1 y PAI-2 en extractos de tejido de cuello uterino normal, de lesiones intraepiteliales escamosas (SIL) y de pacientes con carcinoma invasivo.

La actividad de uPA en los extractos de carcinoma invasivo fue  $8,46$  veces mayor que en los extractos de tejido normal y  $4,9$  veces mayor que en los extractos de SIL (132). La actividad de PAI-1 en extractos de carcinoma invasor fue  $1,3$  veces mayor que en los extractos de tejido normal y  $1,24$  veces que en los extractos de SIL (132). Las cantidades de uPA, PAI-1 y PAI-2 fueron  $25,7$ ,  $12,1$  y  $7,9$  veces mayor, respectivamente, en el carcinoma invasivo que en el SIL y  $39,1$ ,  $21,38$  y  $27,3$  veces mayores, respectivamente, que en extractos de tejido normal (132). Las actividades de uPA y PAI-1 fueron  $2,02$  y  $1,42$  veces mayores en los extractos de los pacientes con *estadios* II-IV que en aquellos con *estadio* I, respectivamente (132). Las cantidades de uPA, PAI-1 y PAI-2 fueron  $3,06$ ,  $4,2$  y  $1,4$  veces mayores en los extractos de pacientes con *estadios* II-IV que en los extractos de pacientes con *estadio* I, respectivamente. Los autores concluyeron que el aumento de la actividad de la uPA y los niveles de antígeno de uPA y PAI (PAI-1 y PAI-2) en los *estadios* II-IV de carcinoma invasor del cuello uterino sugiere que estos componentes juegan un papel importante en la invasión y la metástasis en los *estadios* avanzados de este tumor (132).

Por otra parte, Riethdorf y colaboradores (1999), en un estudio sobre la expresión del gen uroquinasa como indicador precoz de lesiones invasivas de células escamosas del cuello uterino, en el que se analizaron lesiones intraepiteliales escamosas (SIL,  $n=36$ ), lesiones de carcinoma de células escamosas (SCC,  $n=42$ ) y mucosa normal ( $n=5$ ) del cuello uterino mediante hibridación in situ con (35) S-marcado con sondas de ARN (133).

Se encontró que las transcripciones de uPA estuvieron ausentes en la mucosa normal y en lesiones no invasivas, pero presentes en las células epiteliales atípicas de todos los carcinomas microinvasores (n=19) y en algunos de los carcinomas invasores más avanzados (n=11). Las transcripciones de PAI-1 se encontraron en las células del estroma de la mayoría de las muestras de tejido, sin embargo, los niveles fueron significativamente mayores en los SCC invasores comparados con SIL, SCC microinvasores y mucosa normal. El uPA-positivo en carcinomas invasivos con frecuencia mostró una expresión adicional de PAI-1 por las células tumorales. Una variación de las transcripciones de uPA, tPA fue encontrada en las células epiteliales atípicas de bajo y alto grado de SIL (133). En la mayoría de los SCCs estudiados (27/29 casos), los oncogenes E6/E7 del HPV 16 y la transcripción de uPA estuvieron correlacionados. La expresión de uPA y PAI-1 indicó un crecimiento invasivo cuando se expresó en las células epiteliales atípicas de lesiones escamosas del cuello uterino. Además, la presencia de las transcripciones de uPA fue indicativa de un crecimiento invasivo temprano. Según estos datos, uPA y tPA parecen tener diferentes funciones en el desarrollo de las propiedades invasivas en el epitelio escamoso cervical uterino (133).

En un estudio de Hazelbag, Kenter, Gorter y Fleuren (2004), en el que se evaluó la importancia pronóstica de TGF-beta1 y PAI-1 en el cáncer de cuello de útero, específicamente, en la recaída, la supervivencia y otros parámetros clínico patológicos, se analizó la expresión de ARNm de TGF-beta 1 en 108 muestras de carcinoma de cuello uterino incluidas en parafina por hibridación in situ de ARNm (66). Se usaron pruebas inmunohistoquímicas para investigar la expresión de la proteína PAI-1. Se encontró que la presencia de ARNm TGF-beta 1 citoplasmático de las células tumorales no se correlacionó significativamente con el resto de parámetros clínico patológicos estudiados o con una peor supervivencia (libre de enfermedad). La expresión de la proteína PAI-1 en las células tumorales se correlacionó fuertemente con peor supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad, además de los conocidos parámetros pronósticos tales como metástasis en ganglios linfáticos, profundidad de la infiltración del tumor, tamaño del tumor y vaso invasión. En el análisis multivariado, el PAI-1 resultó ser un fuerte factor pronóstico independiente.

En un subgrupo de pacientes sin metástasis en los ganglios linfáticos, el PAI-1 fue predictivo de peor supervivencia y también de recidiva de la enfermedad (66). Los autores concluyeron que la expresión (elevada) de PAI-1 por las células de carcinoma se correlaciona con una peor supervivencia (total y libre de enfermedad) de los pacientes con cáncer de cuello uterino. La expresión de TGF-beta 1 en sí misma no se asoció con una peor supervivencia en estos pacientes. Por otra parte, a pesar de la presencia simultánea de los dos factores que se observó en todos los tumores, la inducción de PAI-1 por TGF-beta 1 no se pudo demostrar en este estudio.

En un estudio de Kobayashi, Fujishiro y Terao (1994), que evaluó el impacto del activador del plasminógeno tipo uroquinasa y el PAI-1 sobre el pronóstico (recidiva precoz) en el cáncer de cuello uterino de pacientes con *estadio* II, se determinó la localización de uPA y PAI-1 mediante inmunohistoquímica en cortes de tejido incluidos en parafina y fijados en formol. Ambas enzimas, uPA y PAI-1 se analizaron antigénicamente, enzimológicamente y enzimográficamente en 28 pacientes con afectación de ganglios linfáticos pélvicos, en 34 casos, sin diseminación ganglionar y en 10 casos con cuello uterino normal (134).

En los tejidos con células tumorales, una fuerte tinción de uPA se encontró en áreas con crecimiento invasivo y degradación de los tejidos normales circundantes, mientras que la mayoría de los nidos tumorales mostraron una leve o moderada tinción de PAI-1. Una tasa mayor y significativa de ganglios linfáticos positivos se observó en los pacientes que tenían tumores con fuertes coloraciones de uPA y /o PAI-1 en comparación con aquellos tumores con tinciones débiles. A pesar de niveles de PAI-1 significativamente más altos en los tejidos neoplásicos primarios, el uPA también se encontró aumentado, tanto en los niveles de antígeno como de actividad. La forma de la mayor parte del PAI-1 obtenido a partir de extractos de cáncer es latente. Según los autores, estos resultados sugieren que el cáncer asociado al aumento de uPA, no parece ser afectado (o inhibido) por PAI-1 en las áreas donde las células tumorales invaden los tejidos normales. La supervivencia global y libre de progresión fue peor en los pacientes con la tinción de uPA fuerte limitada a los estromas del tumor y también con la tinción de PAI-1 fuerte en los nidos de tumor, lo que indica que la localización más de uPA en las células del estroma que en las células malignas es un predictor de recidiva precoz y mal pronóstico en pacientes con cáncer de cuello uterino. Por lo tanto, la intensidad de la tinción y la localización de uPA y de PAI-1 en muestras de tejido parece ser predictora del incremento del riesgo de metástasis en ganglios linfáticos, lo que hace pensar que algunas células tumorales reclutan células estromales para producir uPA y que PAI-1 no puede actuar como mecanismo de defensa para la invasión celular y las metástasis del tumor en los límites del crecimiento tumoral (134).

Para resumir, el comportamiento de PAI-1 en los carcinomas de cuello uterino, su aumento se relaciona con el estadio tumoral avanzado, peor supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad, metástasis en ganglios linfáticos, profundidad de la infiltración del tumor, tamaño del tumor y vaso invasión.

En un subgrupo de pacientes sin metástasis en los ganglios linfáticos, el PAI-1 fue predictivo de peor supervivencia global y también de recidiva de la enfermedad

Al establecer un nivel de corte de 2,4 ng/mg de proteína de PAI-1, los pacientes con niveles elevados, demostraron reducción de la supervivencia libre de recurrencia.

#### **14. PAI-1 Y RADIOTERAPIA**

El sistema de activación del plasminógeno (que consta principalmente de los activadores de activación del plasminógeno, uPA y tPA; de los inhibidores del activador del plasminógeno, PAI-1, PAI-2 y PAI-3 y del receptor de uPA) es de suma importancia en la inflamación, en la cicatrización de las heridas y en el desarrollo de la fibrosis (75). Sin embargo, también es importante en el proceso de invasión tumoral y de las metástasis (75).

La invasión extravascular e intravascular de tumores sólidos es controlada por la unión de las células tumorales a los componentes de la membrana basal y a la matriz extracelular, por proteólisis local y por migración de células tumorales (120).

Por otra parte, la radiación tiene un efecto de selección de las proteasas de remodelación de la matriz extracelular (MEC) y esta reacción puede ser responsable de la morbilidad temprana y tardía pos radiación (135).

En este contexto, se revisarán algunos estudios en los cuales se asocia el PAI-1 con la radioterapia.

Angenete y colaboradores (2009), realizaron un estudio sobre la relación del uPA y PAI-1 en cáncer rectal con la radioterapia. Para lo cual, investigaron los niveles de uPA y de PAI-1 en el cáncer de recto y los efectos de la radioterapia en dichos niveles y como se relacionaban con el resultado clínico y su potencial pronóstico. Se estudiaron 91 pacientes con cáncer rectal. Se tomaron muestras de sangre y biopsias durante la cirugía y se analizaron uPA y PAI-1 con una técnica de inmunoensayo. Los pacientes fueron seguidos prospectivamente (0-96 meses) (75).

Se encontró que los niveles más altos de uPA ( $p < 0,0001$ ) y PAI-1 ( $p < 0,0001$ ) fueron encontrados en el tejido tumoral en comparación con la mucosa. La mucosa expuesta a radioterapia tuvo más altos niveles de uPA ( $p < 0,0001$ ) y de PAI-1 ( $p < 0,0001$ ). El tejido tumoral irradiado tenía mayores niveles de PAI-1 ( $p < 0,001$ ). El PAI-1 en el tumor se correlacionó con el estadio T ( $p < 0,001$ ) y el estadio N ( $p < 0,01$ ). El PAI-1 en plasma fue mayor en los pacientes con metástasis a distancia sincrónicas ( $p < 0,001$ ). Los altos niveles de PAI-1 en el tumor se identificaron como un factor independiente relacionado con la disminución de la supervivencia libre de enfermedad ( $p < 0,01$ ) y la proporción de uPA/PAI-1 se relacionó con el desarrollo de metástasis ( $p < 0,01$ ). Los autores concluyeron que existe una relación entre el PAI-1 en plasma y las metástasis en el cáncer rectal. Igualmente, el PAI-1 en el tejido tumoral se correlaciona

con los datos histopatológicos del tumor (*estadía*je T y N) y con su evolución. Por esto, el PAI-1 tiene la posibilidad de utilizarse como un factor pronóstico en este tipo de tumores (75).

En un estudio de Angenete y colaboradores (2009), cuyo objetivo fue explorar el efecto de la radioterapia en la matriz extracelular de la mucosa rectal y del tumor rectal mediante el estudio de las enzimas y factores de crecimiento implicados en la remodelación de la MEC, se estudiaron 20 pacientes sometidos a radioterapia preoperatoria a corto plazo y 12 pacientes control sin radioterapia. Se recogieron biopsias de la mucosa rectal y del tumor antes de la radioterapia y la cirugía. Se determinó por ELISA en los tejidos: MMP-1, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, uPA, PAI-1, TGF-beta1 y calprotectina (135). También se analizaron biopsias de las zonas peritoneales irradiadas y no irradiadas. Se encontró que la radioterapia aumentó los niveles tisulares de MMP-2 y PAI-1, tanto en la mucosa rectal, como en los tejidos tumorales; mientras que la calprotectina y la uPA mostraron un aumento sólo en la mucosa rectal después de la radioterapia. El aumento de la calprotectina se debió a la influencia de células inflamatorias como se reveló mediante técnicas de inmunohistoquímica. Antes de la irradiación, los tejidos tumorales tenían aumentados los niveles de MMP-1, MMP-2, MMP-9, TGF-beta1 total, uPA, PAI-1 y calprotectina en comparación con la mucosa rectal normal, mientras que el TIMP-1 y la fracción activa del TGF-beta 1 no mostró diferencias estadísticas entre ambos tipos de muestra. Los autores concluyeron que estos resultados indican que la radiación tiene un efecto de selección de proteasas de remodelación de la MEC. Igualmente, mencionan que esta selección puede ser responsable de la morbilidad temprana y tardía pos radiación y que la interferencia de esta respuesta podría reducir dicha morbilidad (135).

En un estudio de Landmark-Hoyvik y colaboradores (2011), en el que se determinaron los perfiles de expresión genética en sangre periférica de supervivientes de cáncer de mama que presentaron fibrosis inducida por radiación, con el fin de ampliar el conocimiento sobre los mecanismos y vías que participan en su mantenimiento, se realizaron perfiles de expresión genética en sangre de pacientes supervivientes con cáncer de mama, con y sin fibrosis, de 3 a 7 años después de finalizar el tratamiento radioterápico. Se obtuvo muestras de 254 personas de una cohorte de supervivientes tratados con radioterapia adyuvante, 3 a 7 años antes (136).

Los análisis de las diferencias en la expresión transcripcional de genes en sangre entre los supervivientes con fibrosis (n=31) y sin fibrosis (n=223), se realizó con la *R versión 2.8.0.*, y las herramientas del *proyecto Bioconductor*. El conjunto de genes extraídos después de una búsqueda bibliográfica sobre cáncer de mama y fibrosis fueron posteriormente utilizados en el análisis, enriqueciendo el conjunto total de genes del proyecto (136). Se encontró que hubo diferencias sustanciales en la expresión de genes entre los supervivientes con y sin fibrosis. Se identificaron 87 genes expresados diferencialmente mediante análisis lineal. La señalización del

*TGF-beta 1* (*Transforming growth factor-beta1*) fue identificada como el conjunto de genes más importante, mostrando una baja regulación (down-regulation) de la mayoría de los genes principales, junto con una sobre regulación (up-regulation) transcripcional del inhibidor del activador de la fibrinólisis, el (PAI-1), en los supervivientes con fibrosis. El TGF-beta 1 de señalización, se encontró subregulado en la fase de mantenimiento de la fibrosis en comparación con la sobre regulación durante la fase temprana. Entonces, una vez que el tejido fibrótico se ha desarrollado, la fase de mantenimiento puede involucrar una desregulación de la degradación de la fibrinólisis y degradación alterada de los componentes de la matriz extracelular (136).

En un estudio de Milliat y colaboradores (2006), se menciona que el daño de los vasos es uno de los efectos más comunes de la irradiación terapéutica en los tejidos normales. Por esto, los autores realizaron un estudio en pacientes tratados con radioterapia preoperatoria y demostraron en vivo la importancia de la proliferación, la migración y el fenotipo fibrogénico de las células del musculo liso vascular (CMLV) en el daño vascular inducido por radiación (137). Estas lesiones pueden resultar de un desequilibrio en el intercambio entre las células endoteliales (EC) y las CMLV. Utilizando modelos de co-cultivo, se examinó si las ECs influyen en la proliferación, la migración y en el fenotipo fibrogénico de las células del musculo liso vascular (CMLV). En presencia de ECs irradiadas, la proliferación y la migración de CMLV se incrementó. Por otra parte, las expresiones de la actina alfa del músculo liso, el factor de crecimiento del tejido conectivo, el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1), la proteína 27 del shock térmico y el colágeno tipo III alfa-1, estaban sobre-reguladas en presencia de CMLV expuestas a células endoteliales irradiadas. La secreción del factor de crecimiento tumoral transformante beta 1 (TGF-beta1) se incrementó después de la irradiación de células endoteliales. La irradiación de células endoteliales también activó la vía Smad en CMLV por inducción de la translocación nuclear de Smad3/4 y por activación del promotor dependiente de Smad. Utilizando una pequeña interferencia para el ARN *target* del Smad3 y un anticuerpo neutralizante del TGFbeta-RII, los autores demostraron que una vía TGF-beta1/TGF-beta-RII/Smad3 está involucrada en el fenotipo fibrogénico de CMLV inducida por la irradiación de ECs. Los autores también mostraron la importancia de la proliferación, la migración, y el fenotipo fibrogénico de CMLVs en los pacientes. Por otra parte, demostraron in vitro que la influencia de los ECs es fundamental en los mecanismos involucrados en el daño vascular inducido por la radiación (137).

Por otra parte, von Eyben, Jacobsen y Skotheim (2005), determinaron los niveles de ARNm de genes relacionados con la invasión, evaluados con base a un conjunto de datos de microarrays de ADN, en muestras de pacientes que fueron sometidos a tratamiento radioterápico para una neoplasia intratubular de células germinales no clasificada (IGCN) o, a

orquiectomía para tumores microinvasores de células germinales (MGCT) y tumores de células germinales in situ, ya sea seminoma intratubular o carcinoma embrionario intratubular. Estos pacientes siguieron un programa de vigilancia después del tratamiento local. Los autores encontraron que las anomalías genéticas más relevantes para la invasión de células germinales malignas fueron: metaloproteinasa-9 de la matriz (MMP9) y genes sobre regulados del activador del plasminógeno y de la uroquinasa (PLAu), para ello compararon las muestras de tejido de los pacientes mencionados, con muestras de tejido de tumor de células testiculares y tumor intratubular de células germinales no clasificado (IGCN) (138).

Los autores además hacen una revisión en la que mencionan que en los tumores microinvasores de células germinales (MGCT) de testículo, hay un número limitado de células germinales malignas en el tejido intertubular y que estas células tienen núcleos grandes, nucléolos prominentes, citoplasma abundante y claro, y distintos límites celulares con la coloración de hematoxilina-eosina. El MGCT puede ser la primera etapa de malignidad en el desarrollo de tumor testicular de células germinales (TTCG). Las biopsias de hombres con testículos mal descendidos han reportado que contienen neoplasia de células germinales intratubular no clasificada (IGCN) y MGCT en el 1,8% de los casos analizados (95% CI 0.5-4.6%). El MGCT también se ha encontrado en los testículos de los hombres con subfertilidad y en el testículo contralateral de pacientes con TTCG. El MGCT es un hallazgo frecuente (19%) en el tejido testicular adyacente a un TTCG abierto. Los hombres con un alto riesgo de TTCG pueden obtener a partir de la detección de lesiones precursoras de TTCG con ecografía de los testículos seguido por biopsia testicular, si se encuentra una anomalía sospechosa, un tratamiento precoz y un seguimiento estrecho en un programa de vigilancia (138).

En un estudio de Hageman y colaboradores (2005), se realizó un análisis detallado de la activación transcripcional de los genes profibróticos inducida por la radiación y el TGF-beta1. Los autores mencionan que la fibrosis inducida por la radiación es un efecto secundario importante en el tratamiento del cáncer. Se cree que las proteínas profibróticas, tales como el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), el factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta1) y el inhibidor tisular de la metaloproteinasa tipo 1 (TIMP-1), juegan un papel importante en el desarrollo de la fibrosis a través de la modulación de la integridad de la matriz extracelular. Se encontró que la irradiación de las células HepG2 llevó a un fuerte aumento de los niveles de ARNm PAI-1 y un leve aumento de los niveles de ARNm de TIMP-1. En contraste, el TGF-beta1 y Smad7 no aumentaron. La radiación y la TGF-beta mostraron fuertes efectos de cooperación en la transcripción del gen PAI-1. El gen TGF-beta1 mostró una leve activación cooperativa, mientras que el TIMP-1 y Smad7 no mostraron actividad cooperativa por radiación y TGF-beta. El análisis utilizando el promotor proximal 800 pb del PAI-1 humano reveló un aumento dosis dependiente de los niveles de PAI-1 entre 2 y 32 Gy de rayos gamma, que fue

independiente de la activación del TGF-beta latente. Posteriormente, la mutagénesis dirigida por el promotor del PAI-1 reveló que la mutación de un elemento de unión a p53 abolió la transcripción inducida por la radiación del PAI-1. En línea con esto, PAI-1 no se activó en las células Hep3B con p53 (-), lo que indica que es la p53 la base de la activación inducida por la radiación de PAI-1 y de la cooperación para la activación de la vía TGF-beta/Smad. Todos estos datos muestran que la radiación y el TGF-beta activan el PAI-1 y no superponen cascadas de señalización, más bien participan sinérgicamente en la transcripción del PAI-1. Estos hallazgos pueden jugar un papel importante en las variaciones paciente a paciente de la susceptibilidad a la fibrosis después de la radioterapia (139).

En un estudio de Hundsdorfer y colaboradores (2004), en el que se examinó la importancia pronóstica de los activadores del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) y los inhibidores del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) en los casos de carcinoma primario oral de células escamosas, se tomaron muestras de tejido del centro del tumor en 58 pacientes con este diagnóstico y con cirugía primaria (140). Los niveles de uPA y PAI-1 se determinaron mediante la prueba de ELISA. La significación estadística se calculó utilizando el chi<sup>2</sup> y test de log-rank. La media de seguimiento (n=58) fue de 23 meses. Con el fin de determinar el valor pronóstico, se utilizó como objetivo final el tiempo transcurrido antes de la recaída. El tiempo medio antes de la recaída fue de 19 meses. Se encontró que hubo un total de 28 (40%) pacientes con recidiva (local n=13, de los ganglios linfáticos n=3, local y de los ganglios linfáticos n=1, de los ganglios linfáticos y la piel n=1 y en otros lugares n=5). Estos pacientes tuvieron un aumento significativo de los niveles de uPA (p<0,012) y de PAI-1 (p<0,014) en el tumor primario. Un valor de corte óptimo para uPA (4,58 ng/mg) y para PAI-1 (106,3 ng/mg) se determinó usando test múltiples de log-rank. No se encontró correlación significativa para los pacientes con niveles altos o bajos (es decir, menor o mayor que el valor de corte, respectivamente) con los parámetros clínicos habituales como la localización, el *estadio* de N, el *estadio* T y el grado de diferenciación y el *estadio* del tumor residual. Los pacientes mayores (>58 años) tuvieron niveles significativamente más altos de uPA y PAI-1 (p<0,017 y p<0,02, respectivamente). La probabilidad de recaída fue significativamente mayor en pacientes con niveles altos (uPA p<0,009, PAI-1 p<0,008). Al dividir los pacientes en tres grupos en función de los niveles de uPA y PAI-1 (grupo 1: uPA y PAI-1 bajo, n=35; grupo 2: uPA o PAI-1 altos, n=12; grupo 3: uPA y PAI-1 altos, n=11), las recaídas fueron más frecuentes en el grupo 3 que en los grupos 1 y 2 (p<0,023). Los pacientes con sólo tratamiento quirúrgico (n =29) y aquellos con radioterapia postoperatoria (n=29) fueron seguidos en el postoperatorio. Se calcularon los niveles de corte de uPA y PAI-1 para ambos grupos. En el grupo de tratamiento quirúrgico, los niveles fueron en uPA=5,63 ng/mg y en PAI-1=106,3 ng/ml y en el grupo de tratamiento quirúrgico más radioterapia fueron de uPA=4,13 ng/mg y de PAI-1=97,02 ng/mg. Las curvas

de Kaplan-Meier mostraron una marcada tendencia de los pacientes con niveles más altos a recaer. Esto fue significativo para los pacientes quirúrgicos con el nivel de PAI-1 ( $p < 0,01$ ) y para los pacientes con radioterapia post-quirúrgica con el nivel de uPA ( $p < 0,04$ ) (140).

Para resumir, los estudios en los cuales se ha investigado o evaluado el PAI-1 y la radioterapia, muestran que el tejido tumoral irradiado tiene mayores niveles de PAI-1 que el tejido normal y que el tejido tumoral. La radioterapia también aumenta los niveles tisulares de MMP-2 y PAI-1, tanto en tejidos sanos, como en los tejidos tumorales (75). Mientras que la calprotectina y la uPA mostraron un aumento solo en el tejido sano después de la radioterapia, lo cual se debe a la influencia de células inflamatorias como se observa mediante técnicas de inmunohistoquímica (135). Es decir, la radioterapia tiene un efecto de selección de proteasas de remodelación de la MEC. Esta selección puede ser la responsable de la morbilidad temprana y tardía por radiación (135).

También se ha encontrado una sobre regulación (up-regulation) transcripcional del inhibidor del activador de la fibrinólisis (el PAI-1) en estudios sobre perfiles de expresión genética en sangre periférica de supervivientes de cáncer de mama que presentaron fibrosis inducida por radiación. El TGF-beta 1 de señalización se encontró subregulado en la fase de mantenimiento de la fibrosis en comparación con la sobre regulación durante la fase temprana. Por esto, una vez que el tejido fibrótico se ha desarrollado, la fase de mantenimiento puede involucrar una desregulación de la degradación de la fibrinólisis y degradación alterada de los componentes de la matriz extracelular (136).

La irradiación sobre células del endotelio vascular activa, en células del musculo liso vascular, la sobre expresión de PAI-1, de actina alfa, del factor de crecimiento del tejido conectivo, de la proteína 27 del shock térmico y del colágeno tipo III alfa-1 (137). También la activación de la vía de señalización Smad (137). Estos hallazgos sugieren que las lesiones vasculares inducidas por radiación se deben a un desequilibrio en el intercambio entre las células endoteliales y las células del musculo liso vascular y que es fundamental la influencia de las células endoteliales en los mecanismos involucrados en el daño vascular inducido por radiación (137).

Por otra parte, la radiación y el TGF-beta 1 muestran fuertes efectos de cooperación en la transcripción del gen PAI-1 en células HepG2. Hay además, un aumento dosis dependiente de los niveles de PAI-1 entre 2 y 32 Gy de rayos gamma, que es independiente de la activación del TGF-beta latente. PAI-1 además, no se activó en células HepG2 p53 (-), lo que indica que p53 es la base de la activación inducida por radiación de PAI-1 y de la cooperación para la activación de la vía TGF-beta/Smad (139). Todos estos datos sugieren que la radiación y TGF-

beta activan el PAI-1 y no superponen cascadas de señalización, más bien, participan sinérgicamente en la transcripción del PAI-1, lo cual también explica las variaciones paciente a paciente de la susceptibilidad a la fibrosis después de la radioterapia (139).

Finalmente, con respecto a la importancia pronóstica del PAI-1 y de uPA en los carcinomas primarios orales de células escamosas irradiados post-cirugía, se ha encontrado que hay una tendencia a recaer por parte de los pacientes con niveles altos después de terminado el tratamiento, siendo significativo para los pacientes post-cirugía el nivel de PAI-1 y para los pacientes post-cirugía y radioterapia, el nivel de uPA (140).

## **15. CONCLUSIONES**

Existen informes contradictorios sobre la inhibición o activación de PAI-1 sobre procesos de angiogénesis y metástasis. El PAI-1 tiene un efecto pro o antiangiogénico dosis dependiente. El efecto proangiogénico o promigratorio de PAI-1 concuerda con los datos clínicos que indican que una alta expresión tumoral de PAI-1 se correlaciona con un peor pronóstico en una variedad de tumores.

Los niveles de PAI-1 están correlacionados con los niveles de p53 y esta correlación es positiva; en algunos tipos histológicos de tumor, cuando se ha estudiado la relación entre ambos, los niveles elevados de PAI-1 se han asociado con disminución de la supervivencia o con metástasis ganglionar, pero en otros, a pesar de la correlación positiva con p53 y otros marcadores (uPA), su nivel elevado no incide en la supervivencia.

En cuanto a la relación entre PAI-1 y Ku80, en células endoteliales, se ha demostrado que la expresión intracelular de timosina beta 4 induce el gen PAI-1 y esta expresión depende solo en parte de la capacidad de Tbeta4 para unirse a G-actina o de entrar en el núcleo. La subunidad Ku80 de la helicasa II de ADN dependiente de ATP en su dominio c terminal esta directamente involucrada con la asociación con Tbeta4, de tal forma que la regulación a la baja de Ku80 produce una reducción dramática en la expresión de PAI-1 tanto a nivel de ARNm como de síntesis de proteínas.

De todas las timosinas, la timosina  $\beta_4$  es considerada el péptido principal, debido a que representa aproximadamente entre el 70% y 80% del contenido total de beta timosinas (112). La Tbeta4 regula la producción de actina (un componente del citoesqueleto) y la producción de laminina (112).

En estudios en cultivos celulares, se ha observado que la expresión de PAI-1 aumenta con la hipoxia. Este aumento es mediado por los factores inducidos por la hipoxia (HIF1 o HIF2), que inducen a su vez el PAI-1 actuando sobre el gen que lo codifica. Pero los HIF no

actúan solos sobre este gen, se unen con los *elementos de respuesta a la hipoxia* (HREs), que actúan como potenciadores de la misma, antes de inducirlo.

La inclinación de la balanza de los resultados de la hipoxia-reoxigenación sobre los resultados del control tumoral depende de: la tensión de oxígeno alcanzada en el tumor, del tiempo durante el cual el ambiente al que se someten las células tumorales sea hipóxico, de otros factores que intervengan en la relación HIF-1 alfa y PAI-1 (como el calcio intracelular), de factores que estabilicen el HIF-1 alfa en el medio intracelular y que hagan que este induzca por un tiempo más prolongado la producción de PAI-1, y de si hay o no mutaciones en los HIF-1 alfa que induzcan factores angiogénicos que produzcan una angiogénesis madura y mejoren la perfusión tisular.

Los estudios en los cuales se ha investigado o evaluado el PAI-1 y la radioterapia, muestran que el tejido tumoral irradiado tiene mayores niveles de PAI-1 que el tejido normal y que el tejido tumoral (75). La radioterapia también aumenta los niveles tisulares de MMP-2 y PAI-1, tanto en tejidos sanos, como en los tejidos tumorales (75). Mientras que la calprotectina y la uPA mostraron un aumento solo en el tejido sano después de la radioterapia, lo cual se debe a la influencia de células inflamatorias como se observa mediante técnicas de inmunohistoquímica (135). Es decir, la radioterapia tiene un efecto de selección de proteasas de remodelación de la MEC. Esta selección puede ser la responsable de la morbilidad temprana y tardía por radiación (135).

También se ha encontrado en estudios sobre perfiles de expresión genética en sangre periférica de supervivientes de cáncer de mama que presentaron fibrosis inducida por radiación, una sobre regulación (up-regulation) transcripcional del inhibidor del activador de la fibrinólisis (el PAI-1) (136).

La irradiación sobre células del endotelio vascular, activa en células del musculo liso vascular la sobre expresión de PAI-1, de actina alfa, del factor de crecimiento del tejido conectivo, de la proteína 27 del shock térmico, del colágeno tipo III alfa-1 y la vía de señalización Smad (137). Estos hallazgos sugieren que las lesiones vasculares inducidas por radiación se deben a un desequilibrio en el intercambio entre las células endoteliales y las células del musculo liso vascular y que es fundamental la influencia de las células endoteliales en los mecanismos involucrados en el daño vascular inducido por radiación (137).

Por otra parte, la radiación y el TGF-beta 1 muestran fuertes efectos de cooperación en la transcripción del gen PAI-1 en células HepG2. Hay además, un aumento dosis dependiente de los niveles de PAI-1 entre 2 y 32 Gy de rayos gamma, que es independiente de la activación del TGF-beta latente. PAI-1 además, no se activó en células HepG2 p53 (-), lo que indica que

p53 es la base de la activación inducida por radiación de PAI-1 y de la cooperación para la activación de la vía TGF-beta/Smad. Todos estos datos sugieren que la radiación y TGF-beta activan el PAI-1 y no superponen cascadas de señalización, más bien, participan sinérgicamente en la transcripción del PAI-1, lo cual también explica las variaciones paciente a paciente de la susceptibilidad a la fibrosis después de la radioterapia (139).

En cuanto a la relación de PAI-1 y los carcinomas de células escamosas, en estudios con tumores orales y de laringe, se ha encontrado que el nivel de PAI-1 está elevado en el tejido tumoral (de la localización primaria del tumor y de las metástasis ganglionares) comparado con tejido sano adyacente al tumor y con tejido de voluntarios sanos. Sin embargo, los cambios epigenéticos (análisis de metilación) están presentes en el tejido normal adyacente al tumor.

En el carcinoma de laringe, los pacientes con expresión de PAI-2 positiva tuvieron una supervivencia significativamente más larga que aquellos con PAI-2 negativa. Por lo tanto, el PAI-2 parece ser un inhibidor opuesto al PAI-1 (este puede actuar contra la autodegradación de la MEC en el tejido canceroso, más que como inhibidor simple del sistema plasminógeno/plasmina).

Finalmente, con respecto a la importancia pronóstica del PAI-1 y de uPA en los carcinomas primarios orales de células escamosas irradiados post-cirugía, se ha encontrado que hay una tendencia a recaer por parte de los pacientes con niveles altos después de terminado el tratamiento, siendo significativo para los pacientes post-cirugía el nivel de PAI-1 y para los pacientes post-cirugía y radioterapia, el nivel de uPA (124).

En pacientes con carcinoma oral de células escamosas, la determinación del nivel de PAI-1 inmediatamente después de la cirugía podría ser una indicación de la probabilidad de recaída.

En cuanto a la relación de PAI-1 con los adenocarcinomas, en el cáncer de mama (pT1, N0, M0), el aumento de los niveles de PAI-1 y uPA-PAI-1 se asoció a un mayor riesgo de metástasis ganglionares. En el adenocarcinoma de páncreas, el aumento de la expresión de uPA, uPAR y PAI-1 se asoció independientemente con un mayor estadiaje del tumor. Mientras que la expresión de PAI-2 parece ser independiente de uPA/uPAR/PAI-1 y se asoció con un mejor pronóstico. En carcinomas de pulmón no microcíticos, el nivel elevado de PAI-1 y bajo del complejo uPA-PAI-1, se asoció con peor supervivencia. Igualmente, valores más elevados de uPA y PAI-1 se observaron en los tumores con un patrón vascular angiogénico.

En carcinomas de cuello uterino, el aumento del PAI-1 se ha relacionado con el estadio tumoral avanzado; peor supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad; metástasis

en ganglios linfáticos; profundidad de la infiltración del tumor; tamaño del tumor e invasión vascular.

En un subgrupo de pacientes con carcinoma de cuello uterino, sin metástasis en los ganglios linfáticos, el PAI-1 fue predictivo de peor supervivencia global y también de recidiva de la enfermedad

Al establecer un nivel de corte de 2,4 ng/mg de proteína de PAI-1, los pacientes con carcinoma de cuello uterino con niveles elevados, demostraron reducción de la supervivencia libre de recurrencia.

## **16. BIBLIOGRAFÍA**

1. Carnegie JA, Cabaca O. Extracellular matrix composition and resilience: two parameters that influence the in vitro migration and morphology of rat inner cell mass-derived cells. *Biol Reprod.* 1993 Feb;48(2):287-99.
2. Riedel CG, Katis VL, Katou Y, Mori S, Itoh T, Helmhart W, et al. Protein phosphatase 2A protects centromeric sister chromatid cohesion during meiosis I. *Nature.* 2006 May 4;441(7089):53-61.
3. Kadler K. Matrix loading: assembly of extracellular matrix collagen fibrils during embryogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2004 Mar;72(1):1-11.
4. Davidson LA, Keller R, DeSimone DW. Assembly and remodeling of the fibrillar fibronectin extracellular matrix during gastrulation and neurulation in *Xenopus laevis*. *Dev Dyn.* 2004 Dec;231(4):888-95.
5. Mwale F, Tchetina E, Wu CW, Poole AR. The assembly and remodeling of the extracellular matrix in the growth plate in relationship to mineral deposition and cellular hypertrophy: an in situ study of collagens II and IX and proteoglycan. *J Bone Miner Res.* 2002 Feb;17(2):275-83.
6. Wiman B. Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) in plasma: its role in thrombotic disease. *Thromb Haemost.* 1995 Jul;74(1):71-6.
7. Paramo JA, Alfaro MJ, Rocha E. Postoperative changes in the plasmatic levels of tissue-type plasminogen activator and its fast-acting inhibitor--relationship to deep vein thrombosis and influence of prophylaxis. *Thromb Haemost.* 1985 Oct 30;54(3):713-6.
8. Goto D, Fujii S, Kaneko T, Furumoto T, Sugawara T, Tarikuz Zaman AK, et al. Intracellular signal transduction modulating expression of plasminogen activator inhibitor-1 in adipocytes. *Biochem Pharmacol.* 2003 Jun 1;65(11):1907-14.
9. Sakkinen PA, Wahl P, Cushman M, Lewis MR, Tracy RP. Clustering of procoagulation, inflammation, and fibrinolysis variables with metabolic factors in insulin resistance syndrome. *Am J Epidemiol.* 2000 Nov 15;152(10):897-907.
10. Bodary PF, Wickenheiser KJ, Eitzman DT. Recent advances in understanding endogenous fibrinolysis: implications for molecular-based treatment of vascular disorders. *Expert Rev Mol Med.* 2002 Mar;4(7):1-10.
11. Sternlicht MD, Dunning AM, Moore DH, Pharoah PD, Ginzinger DG, Chin K, et al. Prognostic value of PAI1 in invasive breast cancer: evidence that tumor-specific factors are more important than genetic variation in regulating PAI1 expression. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006 Nov;15(11):2107-14.
12. Jankun J, Yang J, Zheng H, Han FQ, Al-Senaigy A, Skrzypczak-Jankun E. Remarkable extension of PAI-1 half-life surprisingly brings no changes to its structure. *Int J Mol Med.* 2011 Sep 22.
13. Markl B, Renk I, Oruzio DV, Jahnig H, Schenkirsch G, Scholer C, et al. Tumour budding, uPA and PAI-1 are associated with aggressive behaviour in colon cancer. *J Surg Oncol.* 2010 Sep 1;102(3):235-41.
14. Malinowsky K, Bollner C, Hipp S, Berg D, Schmitt M, Becker KF. UPA and PAI-1 analysis from fixed tissues - new perspectives for a known set of predictive markers. *Curr Med Chem.* 2010;17(35):4370-7.
15. Bajou K, Masson V, Gerard RD, Schmitt PM, Albert V, Praus M, et al. The plasminogen activator inhibitor PAI-1 controls in vivo tumor vascularization by interaction with proteases, not vitronectin. Implications for antiangiogenic strategies. *J Cell Biol.* 2001 Feb 19;152(4):777-84.

16. Streuli C. Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr Opin Cell Biol.* 1999 Oct;11(5):634-40.
17. Knudsen BS, Silverstein RL, Leung LL, Harpel PC, Nachman RL. Binding of plasminogen to extracellular matrix. *J Biol Chem.* 1986 Aug 15;261(23):10765-71.
18. Andrade-Gordon P, Strickland S. Interaction of heparin with plasminogen activators and plasminogen: effects on the activation of plasminogen. *Biochemistry.* 1986 Jul 15;25(14):4033-40.
19. Roldan AL, Cubellis MV, Masucci MT, Behrendt N, Lund LR, Dano K, et al. Cloning and expression of the receptor for human urokinase plasminogen activator, a central molecule in cell surface, plasmin dependent proteolysis. *EMBO J.* 1990 Feb;9(2):467-74.
20. Ichinose A, Fujikawa K, Suyama T. The activation of pro-urokinase by plasma kallikrein and its inactivation by thrombin. *J Biol Chem.* 1986 Mar 15;261(8):3486-9.
21. Carmeliet P, Moons L, Lijnen R, Baes M, Lemaitre V, Tipping P, et al. Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation. *Nat Genet.* 1997 Dec;17(4):439-44.
22. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001;17:463-516.
23. Derosa G, D'Angelo A, Ciccarelli L, Piccinni MN, Pricolo F, Salvadeo S, et al. Matrix metalloproteinase-2, -9, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in patients with hypertension. *Endothelium.* 2006 May-Jun;13(3):227-31.
24. Nadler EP, Patterson D, Violette S, Weinreb P, Lewis M, Magid MS, et al. Integrin alphavbeta6 and mediators of extracellular matrix deposition are up-regulated in experimental biliary atresia. *J Surg Res.* 2009 Jun 1;154(1):21-9.
25. Murillo CA, Woodside KJ, Guo Q, Zhang S, O'Connor KL, Hunter GC. Integrin and matrix metalloproteinase expression in human carotid plaque. *J Surg Res.* 2009 Jul;155(1):157-64.
26. Castellino FJ, Ploplis VA. Structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Thromb Haemost.* 2005 Apr;93(4):647-54.
27. Lijnen HR, Van Hoef B, Nelles L, Collen D. Plasminogen activation with single-chain urokinase-type plasminogen activator (scu-PA). Studies with active site mutagenized plasminogen (Ser740----Ala) and plasmin-resistant scu-PA (Lys158----Glu). *J Biol Chem.* 1990 Mar 25;265(9):5232-6.
28. Vassalli JD, Sappino AP, Belin D. The plasminogen activator/plasmin system. *J Clin Invest.* 1991 Oct;88(4):1067-72.
29. Appella E, Robinson EA, Ullrich SJ, Stoppelli MP, Corti A, Cassani G, et al. The receptor-binding sequence of urokinase. A biological function for the growth-factor module of proteases. *J Biol Chem.* 1987 Apr 5;262(10):4437-40.
30. Carriero MV, Franco P, Votta G, Longanesi-Cattani I, Vento MT, Masucci MT, et al. Regulation of Cell Migration and Invasion by Specific Modules of uPA: Mechanistic Insights and Specific Inhibitors. *Curr Drug Targets.* 2011 Jun 27.
31. Tarui T, Andronicos N, Czekay RP, Mazar AP, Bdeir K, Parry GC, et al. Critical role of integrin alpha 5 beta 1 in urokinase (uPA)/urokinase receptor (uPAR, CD87) signaling. *J Biol Chem.* 2003 Aug 8;278(32):29863-72.
32. Potempa J, Korzus E, Travis J. The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *J Biol Chem.* 1994 Jun 10;269(23):15957-60.
33. Zhou A, Huntington JA, Pannu NS, Carrell RW, Read RJ. How vitronectin binds PAI-1 to modulate fibrinolysis and cell migration. *Nat Struct Biol.* 2003 Jul;10(7):541-4.

34. McMahon GA, Petitclerc E, Stefansson S, Smith E, Wong MK, Westrick RJ, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 regulates tumor growth and angiogenesis. *J Biol Chem.* 2001 Sep 7;276(36):33964-8.
35. Catalano RD, Johnson MH, Campbell EA, Charnock-Jones DS, Smith SK, Sharkey AM. Inhibition of Stat3 activation in the endometrium prevents implantation: a nonsteroidal approach to contraception. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jun 14;102(24):8585-90.
36. Burysek L, Syrovets T, Simmet T. The serine protease plasmin triggers expression of MCP-1 and CD40 in human primary monocytes via activation of p38 MAPK and janus kinase (JAK)/STAT signaling pathways. *J Biol Chem.* 2002 Sep 6;277(36):33509-17.
37. Koshelnick Y, Ehart M, Hufnagl P, Heinrich PC, Binder BR. Urokinase receptor is associated with the components of the JAK1/STAT1 signaling pathway and leads to activation of this pathway upon receptor clustering in the human kidney epithelial tumor cell line TCL-598. *J Biol Chem.* 1997 Nov 7;272(45):28563-7.
38. Blasi F, Carmeliet P. uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 Dec;3(12):932-43.
39. Tang H, Kerins DM, Hao Q, Inagami T, Vaughan DE. The urokinase-type plasminogen activator receptor mediates tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and activation of mitogen-activated protein kinase in cultured endothelial cells. *J Biol Chem.* 1998 Jul 17;273(29):18268-72.
40. Nguyen DH, Webb DJ, Catling AD, Song Q, Dhakephalkar A, Weber MJ, et al. Urokinase-type plasminogen activator stimulates the Ras/Extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway and MCF-7 cell migration by a mechanism that requires focal adhesion kinase, Src, and Shc. Rapid dissociation of GRB2/Sps-Shc complex is associated with the transient phosphorylation of ERK in urokinase-treated cells. *J Biol Chem.* 2000 Jun 23;275(25):19382-8.
41. Webb DJ, Thomas KS, Gonias SL. Plasminogen activator inhibitor 1 functions as a urokinase response modifier at the level of cell signaling and thereby promotes MCF-7 cell growth. *J Cell Biol.* 2001 Feb 19;152(4):741-52.
42. Nykjaer A, Conese M, Christensen EI, Olson D, Cremona O, Gliemann J, et al. Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA:serpin complexes. *EMBO J.* 1997 May 15;16(10):2610-20.
43. Czekay RP, Kuemmel TA, Orlando RA, Farquhar MG. Direct binding of occupied urokinase receptor (uPAR) to LDL receptor-related protein is required for endocytosis of uPAR and regulation of cell surface urokinase activity. *Mol Biol Cell.* 2001 May;12(5):1467-79.
44. Deng G, Curriden SA, Wang S, Rosenberg S, Loskutoff DJ. Is plasminogen activator inhibitor-1 the molecular switch that governs urokinase receptor-mediated cell adhesion and release? *J Cell Biol.* 1996 Sep;134(6):1563-71.
45. Waltz DA, Natkin LR, Fujita RM, Wei Y, Chapman HA. Plasmin and plasminogen activator inhibitor type 1 promote cellular motility by regulating the interaction between the urokinase receptor and vitronectin. *J Clin Invest.* 1997 Jul 1;100(1):58-67.
46. Deng G, Curriden SA, Hu G, Czekay RP, Loskutoff DJ. Plasminogen activator inhibitor-1 regulates cell adhesion by binding to the somatomedin B domain of vitronectin. *J Cell Physiol.* 2001 Oct;189(1):23-33.
47. Bale MD, Wohlfahrt LA, Mosher DF, Tomasini B, Sutton RC. Identification of vitronectin as a major plasma protein adsorbed on polymer surfaces of different copolymer composition. *Blood.* 1989 Dec;74(8):2698-706.

48. Wei Y, Czekay RP, Robillard L, Kugler MC, Zhang F, Kim KK, et al. Regulation of alpha5beta1 integrin conformation and function by urokinase receptor binding. *J Cell Biol.* 2005 Jan 31;168(3):501-11.
49. Czekay RP, Loskutoff DJ. Plasminogen activator inhibitors regulate cell adhesion through a uPAR-dependent mechanism. *J Cell Physiol.* 2009 Sep;220(3):655-63.
50. Declerck PJ, De Mol M, Vaughan DE, Collen D. Identification of a conformationally distinct form of plasminogen activator inhibitor-1, acting as a noninhibitory substrate for tissue-type plasminogen activator. *J Biol Chem.* 1992 Jun 15;267(17):11693-6.
51. Mottonen J, Strand A, Symersky J, Sweet RM, Danley DE, Geoghegan KF, et al. Structural basis of latency in plasminogen activator inhibitor-1. *Nature.* 1992 Jan 16;355(6357):270-3.
52. Rezaie AR. Elucidation of the structural basis for the slow reactivity of thrombin with plasminogen activator inhibitor-1. *Biochemistry.* 1998 Sep 22;37(38):13138-42.
53. Lanktree MB, Johansen CT, Anand SS, Davis AD, Miller R, Yusuf S, et al. Genetic variation in hyaluronan metabolism loci is associated with plasma plasminogen activator inhibitor-1 concentration. *Blood.* 2010 Sep 23;116(12):2160-3.
54. Persico AM, Militerni R, Bravaccio C, Schneider C, Melmed R, Trillo S, et al. No association between the 4g/5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor-1 gene promoter and autistic disorder. *Psychiatr Genet.* 2001 Jun;11(2):99-103.
55. Freytag J, Wilkins-Port CE, Higgins CE, Higgins SP, Samarakoon R, Higgins PJ. PAI-1 mediates the TGF-beta1+EGF-induced "scatter" response in transformed human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2010 Sep;130(9):2179-90.
56. Muth M, Theophile K, Hussein K, Jacobi C, Kreipe H, Bock O. "Hypoxia-induced down-regulation of microRNA-449a/b impairs control over targeted SERPINE1 (PAI-1) RNAm - a mechanism involved in SERPINE1 (PAI-1) overexpression". *J Transl Med.* 2010;8:33.
57. Frixen UH, Nagamine Y. Stimulation of urokinase-type plasminogen activator expression by blockage of E-cadherin-dependent cell-cell adhesion. *Cancer Res.* 1993 Aug 1;53(15):3618-23.
58. Samarakoon R, Higgins PJ. MEK/ERK pathway mediates cell-shape-dependent plasminogen activator inhibitor type 1 gene expression upon drug-induced disruption of the microfilament and microtubule networks. *J Cell Sci.* 2002 Aug 1;115(Pt 15):3093-103.
59. Samarakoon R, Overstreet JM, Higgins SP, Higgins PJ. TGF-beta1 --> SMAD/p53/USF2 -> PAI-1 transcriptional axis in ureteral obstruction-induced renal fibrosis. *Cell Tissue Res.* 2011 Jun 4.
60. Higgins SP, Samarakoon R, Higgins CE, Freytag J, Wilkins-Port CE, Higgins PJ. TGF-beta1-Induced Expression of the Anti-Apoptotic PAI-1 Protein Requires EGFR Signaling. *Cell Commun Insights.* 2009;2:1-11.
61. Kimura H, Li X, Torii K, Okada T, Kamiyama K, Mikami D, et al. Dexamethasone enhances basal and TNF-alpha-stimulated production of PAI-1 via the glucocorticoid receptor regardless of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 status in human proximal renal tubular cells. *Nephrol Dial Transplant.* 2009 Jun;24(6):1759-65.
62. Miyagawa R, Asakura T, Nakamura T, Okada H, Iwaki S, Sobel BE, et al. Increased expression of plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) in HEPG2 cells induced by insulin mediated by the 3'-untranslated region of the PAI-1 gene and its pharmacologic implications. *Coron Artery Dis.* 2010 May;21(3):144-50.

63. Fogari R, Zoppi A, Mugellini A, Maffioli P, Lazzari P, Derosa G. Role of angiotensin II in plasma PAI-1 changes induced by imidapril or candesartan in hypertensive patients with metabolic syndrome. *Hypertens Res.* 2011 Aug 4.
64. McCarty MF. De novo synthesis of diacylglycerol in endothelium may mediate the association between PAI-1 and the insulin resistance syndrome. *Med Hypotheses.* 2005;64(2):388-93.
65. Ferrier CM, de Witte HH, Straatman H, van Tienoven DH, van Geloof WL, Rietveld FJ, et al. Comparison of immunohistochemistry with immunoassay (ELISA) for the detection of components of the plasminogen activation system in human tumour tissue. *Br J Cancer.* 1999 Mar;79(9-10):1534-41.
66. Hazelbag S, Kenter GG, Gorter A, Fleuren GJ. Prognostic relevance of TGF-beta1 and PAI-1 in cervical cancer. *Int J Cancer.* 2004 Dec 20;112(6):1020-8.
67. Pepper MS, Sappino AP, Stocklin R, Montesano R, Orci L, Vassalli JD. Upregulation of urokinase receptor expression on migrating endothelial cells. *J Cell Biol.* 1993 Aug;122(3):673-84.
68. Seferovic MD, Chen S, Pinto DM, Gupta MB. Altered liver secretion of vascular regulatory proteins in hypoxic pregnancies stimulate angiogenesis in vitro. *J Proteome Res.* 2011 Apr 1;10(4):1495-504.
69. Li M, Liu C, Bin J, Wang Y, Chen J, Xiu J, et al. Mutant hypoxia inducible factor-1alpha improves angiogenesis and tissue perfusion in ischemic rabbit skeletal muscle. *Microvasc Res.* 2011 Jan;81(1):26-33.
70. Rohrberg KS, Skov BG, Lassen U, Christensen IJ, Hoyer-Hansen G, Buyschaert I, et al. Markers of angiogenesis and epidermal growth factor receptor signalling in patients with pancreatic and gastroesophageal junction cancer. *Cancer Biomark.* 2010;7(3):141-51.
71. Soff GA, Sanderowitz J, Gately S, Verrusio E, Weiss I, Brem S, et al. Expression of plasminogen activator inhibitor type 1 by human prostate carcinoma cells inhibits primary tumor growth, tumor-associated angiogenesis, and metastasis to lung and liver in an athymic mouse model. *J Clin Invest.* 1995 Dec;96(6):2593-600.
72. Bajou K, Noel A, Gerard RD, Masson V, Brunner N, Holst-Hansen C, et al. Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat Med.* 1998 Aug;4(8):923-8.
73. Rakic JM, Maillard C, Jost M, Bajou K, Masson V, Devy L, et al. Role of plasminogen activator-plasmin system in tumor angiogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 2003 Mar;60(3):463-73.
74. Tsuchiya H, Katsuo S, Matsuda E, Sunayama C, Tomita K, Ueda Y, et al. The antibody to plasminogen activator inhibitor-1 suppresses pulmonary metastases of human fibrosarcoma in athymic mice. *Gen Diagn Pathol.* 1995 May;141(1):41-8.
75. Angenete E, Langenskiold M, Palmgren I, Falk P, Oresland T, Ivarsson ML. uPA and PAI-1 in rectal cancer--relationship to radiotherapy and clinical outcome. *J Surg Res.* 2009 May 1;153(1):46-53.
76. Werle B, Kotsch M, Lah TT, Kos J, Gabrijelcic-Geiger D, Spiess E, et al. Cathepsin B, plasminogenactivator-inhibitor (PAI-1) and plasminogenactivator-receptor (uPAR) are prognostic factors for patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 2004 Nov-Dec;24(6):4147-61.
77. Horn LC, Pippig S, Raptis G, Fischer U, Kohler U, Hentschel B, et al. Clinical relevance of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type 1 (PAI-1) in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2002 Oct;42(4):383-6.

78. Maillard CM, Bouquet C, Petitjean MM, Mestdagt M, Frau E, Jost M, et al. Reduction of brain metastases in plasminogen activator inhibitor-1-deficient mice with transgenic ocular tumors. *Carcinogenesis*. 2008 Nov;29(11):2236-42.
79. Devy L, Blacher S, Grignet-Debrus C, Bajou K, Masson V, Gerard RD, et al. The pro- or antiangiogenic effect of plasminogen activator inhibitor 1 is dose dependent. *FASEB J*. 2002 Feb;16(2):147-54.
80. Bajou K, Maillard C, Jost M, Lijnen RH, Gils A, Declerck P, et al. Host-derived plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) concentration is critical for in vivo tumoral angiogenesis and growth. *Oncogene*. 2004 Sep 9;23(41):6986-90.
81. Andreasen PA, Egelund R, Petersen HH. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell Mol Life Sci*. 2000 Jan 20;57(1):25-40.
82. Foekens JA, Peters HA, Look MP, Portengen H, Schmitt M, Kramer MD, et al. The urokinase system of plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients. *Cancer Res*. 2000 Feb 1;60(3):636-43.
83. Hanel W, Moll UM. Links between mutant p53 and genomic instability. *J Cell Biochem*. 2011 Oct 17.
84. Marcel V, Dichtel-Danjoy ML, Sagne C, Hafsi H, Ma D, Ortiz-Cuaran S, et al. Biological functions of p53 isoforms through evolution: lessons from animal and cellular models. *Cell Death Differ*. 2011 Sep 23.
85. Stoenescu TM, Ivan LD, Stoenescu N, Azoicai D. [Assessment tumor markers by immunohistochemistry (Ki67, p53 and Bcl-2) on a cohort of patients with cervical cancer in various stages of evolution]. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 2011 Apr-Jun;115(2):485-92.
86. Sezgin C, Gokmen E, Kapkac M, Zekioglu O, Esassolak M, Karabulut B, et al. p53 protein accumulation and presence of visceral metastasis are independent prognostic factors for survival in patients with metastatic inflammatory breast carcinoma. *Med Princ Pract*. 2011;20(2):159-64.
87. Walker KK, Levine AJ. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Dec 24;93(26):15335-40.
88. May P, May E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene*. 1999 Dec 13;18(53):7621-36.
89. Okaichi K, Nose K, Kotake T, Izumi N, Kudo T. Phosphorylation of p53 modifies sensitivity to ionizing radiation. *Anticancer Res*. 2011 Jun;31(6):2255-8.
90. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*. 1997 Mar 7;88(5):593-602.
91. Palmero I, Pantoja C, Serrano M. p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras. *Nature*. 1998 Sep 10;395(6698):125-6.
92. Lakin ND, Jackson SP. Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene*. 1999 Dec 13;18(53):7644-55.
93. Lakin ND, Hann BC, Jackson SP. The ataxia-telangiectasia related protein ATR mediates DNA-dependent phosphorylation of p53. *Oncogene*. 1999 Jul 8;18(27):3989-95.
94. Brooks CL, Gu W. The impact of acetylation and deacetylation on the p53 pathway. *Protein Cell*. 2011 Jun;2(6):456-62.
95. Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, et al. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*. 1998 Sep 11;281(5383):1674-7.

96. Woo RA, McLure KG, Lees-Miller SP, Rancourt DE, Lee PW. DNA-dependent protein kinase acts upstream of p53 in response to DNA damage. *Nature*. 1998 Aug 13;394(6694):700-4.
97. Fuchs SY, Fried VA, Ronai Z. Stress-activated kinases regulate protein stability. *Oncogene*. 1998 Sep 17;17(11 Reviews):1483-90.
98. Tao W, Levine AJ. P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jun 8;96(12):6937-41.
99. Sherr CJ, Weber JD. The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev*. 2000 Feb;10(1):94-9.
100. Philipova T, Baryawno N, Hartmann W, Pietsch T, Druid H, Johnsen JI, et al. Differential forms of p53 in medulloblastoma primary tumors, cell lines and xenografts. *Int J Oncol*. 2011 Mar;38(3):843-9.
101. Lalou C, Scamuffa N, Mourah S, Plassa F, Podgorniak MP, Soufir N, et al. Inhibition of the proprotein convertases represses the invasiveness of human primary melanoma cells with altered p53, CDKN2A and N-Ras genes. *PLoS One*. 2010;5(4):e9992.
102. Offersen BV, Alsner J, Ege Olsen K, Riisbro R, Brunner N, Sorensen FB, et al. A comparison among HER2, TP53, PAI-1, angiogenesis, and proliferation activity as prognostic variables in tumours from 408 patients diagnosed with early breast cancer. *Acta Oncol*. 2008;47(4):618-32.
103. Parra M, Jardi M, Koziczak M, Nagamine Y, Munoz-Canoves P. p53 Phosphorylation at serine 15 is required for transcriptional induction of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene by the alkylating agent N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *J Biol Chem*. 2001 Sep 28;276(39):36303-10.
104. Hoffmann G, Casper F, Weikel W, Kummerle T, Pollow B, Schaffrath M, et al. [Value of p53, urokinase plasminogen activator, PAI-1 and Ki-67 in vulvar carcinoma]. *Zentralbl Gynakol*. 1999;121(10):473-8.
105. Bau DT, Tsai CW, Wu CN. Role of the XRCC5/XRCC6 dimer in carcinogenesis and pharmacogenomics. *Pharmacogenomics*. 2011 Apr;12(4):515-34.
106. Koike M, Matsuda Y, Mimori T, Harada YN, Shiomi N, Shiomi T. Chromosomal localization of the mouse and rat DNA double-strand break repair genes Ku p70 and Ku p80/XRCC5 and their RNAm expression in various mouse tissues. *Genomics*. 1996 Nov 15;38(1):38-44.
107. Taccioli GE, Gottlieb TM, Blunt T, Priestley A, Demengeot J, Mizuta R, et al. Ku80: product of the XRCC5 gene and its role in DNA repair and V(D)J recombination. *Science*. 1994 Sep 2;265(5177):1442-5.
108. Shi L, Qiu D, Zhao G, Corthesy B, Lees-Miller S, Reeves WH, et al. Dynamic binding of Ku80, Ku70 and NF90 to the IL-2 promoter in vivo in activated T-cells. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(7):2302-10.
109. Casellas R, Nussenzweig A, Wuerffel R, Pelanda R, Reichlin A, Suh H, et al. Ku80 is required for immunoglobulin isotype switching. *EMBO J*. 1998 Apr 15;17(8):2404-11.
110. Janzen CJ, Lander F, Dreesen O, Cross GA. Telomere length regulation and transcriptional silencing in KU80-deficient *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(22):6575-84.
111. Bednarek R, Boncela J, Smolarczyk K, Cierniewska-Cieslak A, Wyroba E, Cierniewski CS. Ku80 as a novel receptor for thymosin beta4 that mediates its intracellular activity different from G-actin sequestering. *J Biol Chem*. 2008 Jan 18;283(3):1534-44.
112. Chen C, Li M, Yang H, Chai H, Fisher W, Yao Q. Roles of thymosins in cancers and other organ systems. *World J Surg*. 2005 Mar;29(3):264-70.

113. Ahn YT, Chua MS, Whitlock JP, Jr., Shin YC, Song WH, Kim Y, et al. Rodent-specific hypoxia response elements enhance PAI-1 expression through HIF-1 or HIF-2 in mouse hepatoma cells. *Int J Oncol.* 2010 Dec;37(6):1627-38.
114. Sprague LD, Tomaso H, Mengers K, Schilling D, Bayer C, Stadler P, et al. Effects of hypoxia and reoxygenation on the expression levels of the urokinase-type plasminogen activator, its inhibitor plasminogen activator inhibitor type-1 and the urokinase-type plasminogen activator receptor in human head and neck tumour cells. *Oncol Rep.* 2007 May;17(5):1259-68.
115. Schilling D, Bayer C, Geurts-Moespot A, Sweep FC, Pruschy M, Mengers K, et al. Induction of plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) by hypoxia and irradiation in human head and neck carcinoma cell lines. *BMC Cancer.* 2007;7:143.
116. Sprague LD, Mengers K, Schilling D, Geurts-Moespot A, Sweep FC, Stadler P, et al. Effect of reoxygenation on the hypoxia-induced up-regulation of serine protease inhibitor PAI-1 in head and neck cancer cells. *Oncology.* 2006;71(3-4):282-91.
117. Liu Q, Moller U, Flugel D, Kietzmann T. Induction of plasminogen activator inhibitor I gene expression by intracellular calcium via hypoxia-inducible factor-1. *Blood.* 2004 Dec 15;104(13):3993-4001.
118. Charvat J, Kestlerova M, Jarosova H, Mlejnkova M. [Relation between the blood coagulation status in hemodialyzed patients and arteriovenous fistula thrombosis--prospective study]. *Cas Lek Cesk.* 1994 Apr 18;133(8):242-4.
119. Kimura D, Imaizumi T, Tamo W, Sakai T, Ito K, Hatanaka R, et al. Hypoxia enhances the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in human lung cancer cells, EBC-1. *Tohoku J Exp Med.* 2002 Apr;196(4):259-67.
120. Schmitt M, Harbeck N, Thomssen C, Wilhelm O, Magdolen V, Reuning U, et al. Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy. *Thromb Haemost.* 1997 Jul;78(1):285-96.
121. Schmitt M, Janicke F, Moniwa N, Chucholowski N, Pache L, Graeff H. Tumor-associated urokinase-type plasminogen activator: biological and clinical significance. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 1992 Jul;373(7):611-22.
122. Gao S, Nielsen BS, Krogdahl A, Sorensen JA, Tagesen J, Dabelsteen S, et al. Epigenetic alterations of the SERPINE1 gene in oral squamous cell carcinomas and normal oral mucosa. *Genes Chromosomes Cancer.* 2010 Jun;49(6):526-38.
123. Baker EA, Leaper DJ, Hayter JP, Dickenson AJ. Plasminogen activator system in oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2007 Dec;45(8):623-7.
124. Hundsdorfer B, Zeilhofer HF, Bock KP, Dettmar P, Schmitt M, Horch HH. [Comparison of urokinase type plasminogen activators (uPA) and plasminogen activator inhibitors (PAI-1) in primary resection of oral squamous cell carcinoma]. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 2004 May;8(3):180-90.
125. Zhao EM, Han DM, Yu ZK, Fan EZ, Li Y. [Expression and significance of the urokinase-type plasminogen activator and its inhibitors in squamous cell carcinoma of human larynx]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi.* 2003 Feb;38(1):39-42.
126. Descotes F, Riche B, Saez S, De Laroche G, Datchary J, Roy P, et al. Plasminogen activator inhibitor type 1 is the most significant of the usual tissue prognostic factors in node-negative breast ductal adenocarcinoma independent of urokinase-type plasminogen activator. *Clin Breast Cancer.* 2008 Apr;8(2):168-77.
127. Schneider J, Lucas R, Sanchez J, Tejerina A, Ruibal A. Cellular accumulation of uPA-PAI-1 [correction of UPA-PAI-1] and uPA-PAI-2 [correction of UPA-PAI-2] complexes in early (pT1) breast cancer: a new link in the uPA-UPAr-PAI chain. *In Vivo.* 2000 Jul-Aug;14(4):507-11.

128. Smith R, Xue A, Gill A, Scarlett C, Saxby A, Clarkson A, et al. High expression of plasminogen activator inhibitor-2 (PAI-2) is a predictor of improved survival in patients with pancreatic adenocarcinoma. *World J Surg.* 2007 Mar;31(3):493-502; discussion 3.
129. Pappot H, Pedersen AN, Brunner N, Christensen IJ. The complex between urokinase (uPA) and its type-1 inhibitor (PAI-1) in pulmonary adenocarcinoma: relation to prognosis. *Lung Cancer.* 2006 Feb;51(2):193-200.
130. Hourihan RN, O'Sullivan GC, Morgan JG. Transcriptional gene expression profiles of oesophageal adenocarcinoma and normal oesophageal tissues. *Anticancer Res.* 2003 Jan-Feb;23(1A):161-5.
131. Offersen BV, Pfeiffer P, Andreasen P, Overgaard J. Urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type-1 in nonsmall-cell lung cancer: relation to prognosis and angiogenesis. *Lung Cancer.* 2007 Apr;56(1):43-50.
132. Daneri-Navarro A, Macias-Lopez G, Ocegüera-Villanueva A, Del Toro-Arreola S, Bravo-Cuellar A, Perez-Montfort R, et al. Urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitors (PAI-1 and PAI-2) in extracts of invasive cervical carcinoma and precursor lesions. *Eur J Cancer.* 1998 Mar;34(4):566-9.
133. Riethdorf L, Riethdorf S, Petersen S, Bauer M, Herbst H, Janicke F, et al. Urokinase gene expression indicates early invasive growth in squamous cell lesions of the uterine cervix. *J Pathol.* 1999 Oct;189(2):245-50.
134. Kobayashi H, Fujishiro S, Terao T. Impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type 1 on prognosis in cervical cancer of the uterus. *Cancer Res.* 1994 Dec 15;54(24):6539-48.
135. Angenete E, Oresland T, Falk P, Breimer M, Hultborn R, Ivarsson ML. Preoperative radiotherapy and extracellular matrix remodeling in rectal mucosa and tumour matrix metalloproteinases and plasminogen components. *Acta Oncol.* 2009;48(8):1144-51.
136. Landmark-Hoyvik H, Dumeaux V, Reinertsen KV, Edvardsen H, Fossa SD, Borresen-Dale AL. Blood gene expression profiling of breast cancer survivors experiencing fibrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2011 Mar 1;79(3):875-83.
137. Milliat F, Francois A, Isoir M, Deutsch E, Tamarat R, Tarlet G, et al. Influence of endothelial cells on vascular smooth muscle cells phenotype after irradiation: implication in radiation-induced vascular damages. *Am J Pathol.* 2006 Oct;169(4):1484-95.
138. von Eyben FE, Jacobsen GK, Skotheim RI. Microinvasive germ cell tumor of the testis. *Virchows Arch.* 2005 Sep;447(3):610-25.
139. Hageman J, Eggen BJ, Rozema T, Damman K, Kampinga HH, Coppes RP. Radiation and transforming growth factor-beta cooperate in transcriptional activation of the profibrotic plasminogen activator inhibitor-1 gene. *Clin Cancer Res.* 2005 Aug 15;11(16):5956-64.
140. Hundsdorfer B, Zeilhofer HF, Bock KP, Dettmar P, Schmitt M, Horch HH. [The prognostic importance of urokinase type plasminogen activators (uPA) and plasminogen activator inhibitors (PAI-1) in the primary resection of oral squamous cell carcinoma]. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 2004 May;8(3):173-9.