

# ONCOPROTEÍNAS E HIPOXIA EN LA PREDICCIÓN DE LA RESPUESTA TUMORAL A IRRADIACIÓN.

---

Almudena Valenciano<sup>1</sup>, Luis Alberto Henríquez-Hernández<sup>1,2</sup>, Elisa Bordón Rodríguez<sup>1,2</sup>, Beatriz Pinar Sedeño<sup>1,2</sup>, Marta Lloret Sáez-Bravo<sup>1,2</sup>, Bernardino Clavo<sup>1,2</sup>, Carlos Rodríguez Gallego<sup>1,3</sup> y Pedro C. Lara Jiménez<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Instituto Canario de Investigación del Cáncer (ICIC).

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

<sup>3</sup>Servicio de Inmunología. Hospital Universitario de Gran Canaria "Dr. Negrín".

---

## ÍNDICE:

- 1. ANTECEDENTES DE LOS MARCADORES PRONÓSTICOS Y LA RADIOTERAPIA**
    - 1.1 El daño celular radioinducido
    - 1.2 Efecto de la hipoxia tumoral en los tratamientos de irradiación
    - 1.3 Los marcadores pronósticos en el estudio del cáncer
      - 1.3.1. El origen de los marcadores pronósticos
      - 1.3.2. La proliferación celular y el receptor del factor de crecimiento dependiente de insulina (IGF-1R)
      - 1.3.3. La reparación del ADN y Ku70/Ku80
      - 1.3.4. Las proteínas de resistencia a drogas (MVP)
  - 2. IGF-1R, MVP, Ku70/80 E HIPOXIA EN PACIENTES TRATADOS CON RADIOTERAPIA**
    - 2.1 IGF-1R, el primer marcador estudiado
    - 2.2 MVP y su relación con otros factores pronósticos
    - 2.3 Influencia de la hipoxia en la regulación de la expresión de marcadores pronósticos
    - 2.4 Marcadores pronósticos en cáncer de cabeza y cuello
  - 3. CONCLUSIONES**
  - 4. REFERENCIAS**
-

## **1. ANTECEDENTES DE LOS MARCADORES PRONÓSTICOS Y LA RADIOTERAPIA**

Los resultados clínicos de la radioterapia en pacientes oncológicos y su relación con los marcadores pronósticos, son el hilo conductor de los proyectos de estudio tumoral que durante los últimos años se han llevado a cabo en el Servicio de Oncología Radioterápica del Hospital Universitario Dr. Negrín.

Los tratamientos con irradiación de tumores son complejos y no sólo afectan a la masa tumoral, también a los tejidos sanos circundantes. Por ello, los pacientes con cáncer que se presentan en la consulta de radioterapia deben enfrentarse a una gran incertidumbre en cuanto a los resultados que el tratamiento puede producirles. Uno de los objetivos que se persiguen es la individualización de las terapias, personalizando al máximo los tratamientos en función de las características específicas de la enfermedad de cada paciente. En este sentido, los marcadores pronósticos juegan un papel importante, ya que nos ayudan a conocer estas características particulares. Así, un paciente que presenta un tumor con alta proliferación celular, cuyos niveles de hipoxia son elevados, que a todas luces posee un tumor radioresistente, requiere de una dosis de radiación alta para controlar el tumor; mientras que en un paciente con un tumor menos activo, el empleo de una dosis más baja de radiación puede ser suficiente para eliminar el tumor y así evitar la toxicidad que la radiación provoca en los tejidos sanos. Si ambos pacientes presentan un tumor del mismo tipo y tamaño, y en el mismo estadio, determinar cuál de ellos responderá mejor a la radiación es importante para reducir en la medida de lo posible los efectos secundarios. Sin embargo, establecer una relación entre las propiedades biológicas de un tumor y los resultados que presenta el paciente tras la radioterapia no es sencillo, pues en general son muchos los factores que pueden intervenir.

Con la intención de profundizar en la relación entre los marcadores pronósticos y los efectos de la radiación en los pacientes con cáncer, en base a los conocimientos que sobre estos temas ya existían, el grupo de investigación del Servicio de Oncología Radioterápica del Hospital Universitario Dr. Negrín ha llevado a cabo una serie de estudios de los que han surgido varias publicaciones en revistas internacionales de prestigio y que comentaremos más detalladamente en esta revisión. Pero previamente expondremos una breve introducción de los aspectos más importantes que tienen relación con los artículos publicados.

### **1.1 El daño celular radioinducido**

El uso de la IR se ha implantando como una de las herramientas más útiles en el tratamiento de determinadas enfermedades en las que se quiere controlar o reducir la proliferación celular; una de ellas es el cáncer.

La radiobiología es la ciencia que estudia los efectos que la radiación ionizante (IR) produce en los organismos vivos. Para estudiar estos efectos se han empleado técnicas *in vitro*, como cultivos celulares o cultivo de tejidos; y experimentos *in vivo*, mediante el uso de trasplante de tumores en ratones. Aunque la radiobiología ha sido tradicionalmente una ciencia descriptiva, en los últimos años se han desarrollado en mayor medida los estudios sobre la acción de la IR a nivel molecular.

El efecto último de la IR en el material vivo es la pérdida de la estructura y función de algunas moléculas biológicas, entre ellas el ADN. La IR puede romper las moléculas de ADN por interacción directa; o bien, indirectamente, a través de la formación de radicales libres de O<sub>2</sub>, altamente reactivos e inestables, que surgen de la ionización de las moléculas celulares, y que al chocar con el ADN puede dañarlo, o incluso romperlo.

Se cree que el ADN es la diana crítica más importante para la producción de mutación y muerte celular inducida por radiación. Las lesiones que se producen en el ADN a través de la radiación son: la rotura doble de cadena, rotura simple de cadena, daños en las bases nitrogenadas, daños en los azúcares, entrecruzamientos de ADN y entrecruzamientos ADN-proteínas. Una de las características particulares del daño de ADN mediante IR es la aparición de lugares de daño múltiple (*locally multiply damaged sites*, LMDS), en los que multitud de lesiones del ADN aparecen próximas en el espacio. Por otro lado, las roturas dobles de cadena (DSB) se consideran las lesiones radioinducidas más importantes del ADN. Si estas lesiones no se reparan, son letales; pero si se reparan de forma incorrecta, pueden dar lugar a mutaciones y pérdida de material genético, que al acumularse en las células capaces de sobrevivir al daño, generan fenotipos celulares resistentes que pierden el control del ciclo celular.

Cuando se produce daño en el ADN debido a la irradiación, las células tratan de reparar estas lesiones para continuar con su ciclo celular. Este proceso se inicia con la localización del daño, para posteriormente proceder a su reparación y a la señalización de dicho daño a la maquinaria que regula el ciclo celular y la transcripción. Si las lesiones no se reparan correctamente, el proceso puede concluir con la muerte celular. Rouse y Jackson (2002) propusieron un modelo de detección, reparación y señalización de los daños de ADN. Según este modelo, existen moléculas, los factores de reparación específicos, que reconocen las lesiones de ADN. Si estas lesiones son sencillas de reparar, no se produce ningún tipo de señalización y el ciclo celular no se ve afectado. Si las lesiones son más complicadas (DSB) y su reparación se prolonga en el tiempo, una serie de factores se acumulan en las proximidades del daño para favorecer el reclutamiento de material de reparación. Si aún así el daño es persistente, se activa la respuesta global al daño de ADN, en la que se produce una cascada de señalización para promover la parada del ciclo celular y el incremento de la capacidad reparadora de la célula. Este modelo se ajusta bastante a las observaciones experimentales.

Determinar si una célula tumoral y, en extensión, si un tumor es más radiosensible que otro, es un mecanismo importante para establecer la terapia más adecuada para cada paciente. Hay que tener en cuenta que también los tejidos sanos sufren daños con la radiación, produciendo toxicidad y efectos no deseados. En este aspecto, el uso de marcadores pronósticos en la determinación de la radiosensibilidad de un tumor es muy útil para desarrollar tratamientos cada vez más individualizados (Kiltie, 2005). Por ello, los avances en estos campos son imprescindibles.

## **1.2 Efecto de la hipoxia tumoral en los tratamientos de irradiación**

Muchas de las características biológicas de los tumores están influidas por las condiciones microambientales que los rodean. El flujo sanguíneo, la microcirculación, el pH, el estado bioenergético y metabólico del tumor, así como el aporte de nutrientes y de oxígeno son condicionantes de: la tasa de proliferación celular, la capacidad de reparación de las lesiones, la inducción de apoptosis, el potencial de invasión metastático y angiogénesis tumoral o la capacidad de expresión de genes responsables de la resistencia a drogas.

Una característica del tejido tumoral es que, a medida que crece, se aleja de las fuentes de aporte de nutrientes y oxígeno. Aunque se producen nuevos vasos sanguíneos con el objetivo de nutrir estas zonas, encontramos regiones heterogéneamente distribuidas en la masa tumoral en las que se produce una depleción de la concentración de oxígeno (Vaupel et al., 2001). En el estudio de Lartigau (2007), aquellos pacientes con niveles de hipoxia intratumoral más elevados presentaron un peor control de la enfermedad y menor supervivencia que los que presentaban mejor oxigenación, en igualdad de estadio y tamaño tumoral.

Los niveles de hipoxia tumoral tienen relación con la resistencia a la radiación de los tumores sólidos. Esto se debe a los mecanismos indirectos a través de los cuales la radioterapia inflige el daño celular, y en los que la molécula de oxígeno juega un papel principal. Mediante la radiación se producen radicales libres que reaccionan con las moléculas celulares, las cuales al interactuar a su vez con otros elementos y moléculas dan como resultado especies reactivas de oxígeno, altamente inestables y oxidantes. Estas moléculas derivadas del oxígeno son las responsables de la destrucción de las biomoléculas y la consecuente muerte celular (Wolff, 1981; Hellman y Rosenberg, 1999). Por lo tanto, en presencia de O<sub>2</sub>, el daño de ADN radioinducido se mantiene, mientras que en condiciones de hipoxia el efecto de daño celular por irradiación disminuye.

La medida de la presión parcial de oxígeno (pO<sub>2</sub>) como factor predictivo a la respuesta clínica está validada en la actualidad. En el estudio de Brizel, de 1995, se midieron los valores de pO<sub>2</sub> en dos localizaciones intratumorales distintas, en tres tipos de tumores, y se observó que la variabilidad intrapaciente fue menor que la variabilidad interpaciente en todos los

parámetros medidos. Estos resultados se confirmaron en algunas publicaciones posteriores (Lyng et al., 1997; Wong et al., 1997).

En cuanto a la relación entre los niveles de hipoxia y otras funciones celulares, se han realizado varios estudios para determinar si existe tal relación y si puede ser predictiva de la respuesta clínica en pacientes con cáncer (Sheridan et al., 2000 y Haensgen et al., 2001, que estudiaron el índice apoptótico y p53 en relación a los niveles de oxigenación). Pero lo cierto es que las publicaciones en este tema son contradictorias.

### **1.3 Los marcadores pronósticos en el estudio del cáncer**

#### *1.3.1 El origen de los marcadores pronósticos*

En los años 50, se tenía la idea general de que no existían materiales específicos de los tumores en los tejidos cancerosos humanos. Sin embargo, en 1965, Gold y Freedman publican dos trabajos consecutivos en los que describen y demuestran la presencia de un antígeno tumoral específico del sistema digestivo humano, el antígeno carcinoembrionario (CEA). Este descubrimiento provocó toda una revolución y desde entonces han sido muchas las biomoléculas que se han estudiado en relación a los tejidos tumorales humanos.

#### *1.3.2 La proliferación celular y el receptor del factor de crecimiento dependiente de insulina (IGF-1R)*

La proliferación celular de cualquier tejido está sujeta a la acción de moléculas reguladoras, así como al suministro de nutrientes y a la comunicación con otras células. Estas moléculas reguladoras, entre las que se encuentran los factores de crecimiento, son generalmente proteínas que se unen específicamente, mediante enlaces de alta afinidad, a receptores celulares cuya función es controlar el ciclo celular. La unión de un factor de crecimiento con su receptor provoca una serie de reacciones bioquímicas en cascada que permiten enviar la información hasta el núcleo. Es lo que se conoce como transducción de la señal. Una vez en el núcleo, la decisión de la inducción proliferativa queda en manos de otros mediadores biológicos, que regulan lo que se denominan puntos de control del ciclo celular o *check-points* que se encargan de impedir la progresión de células dañadas y de mantener la homeostasis celular (Ivanchuk y Rutka, 2004).

Los factores de crecimiento pueden ser inductores o supresores de la proliferación celular. La activación y posterior señalización de unos u otros tienen como consecuencia un equilibrio en las funciones celulares básicas como la diferenciación celular, la movilidad, la adhesión o la muerte celular.

El receptor del factor de crecimiento dependiente de insulina (IGF-1R) modula el crecimiento celular y es un importante factor metastático, regulando la migración celular, la invasión y la angiogénesis. Es una proteína de la membrana celular con función tirosin-quinasa, que se expresa en muchos tipos celulares. Su estructura final consiste en un homodímero complejo, formado por dos subunidades extracelulares alfa, y dos subunidades transmembrana beta, unidas entre sí por puentes disulfuro. En las cadenas alfa encontramos el dominio de unión al ligando, mientras que las cadenas beta aparecen diferenciadas en una región yuxtamembranal, un dominio intracelular con función tirosin-quinasa y un dominio carboxilo terminal con funciones de interacción proteica (Ullrich et al., 1986).

La activación del receptor de IGF-1 conduce a una activación de las rutas ras, raf y MAPK, lo que se traduce en un incremento de la proliferación, y también activa la ruta PI3K, produciendo un efecto de prevención apoptótica (Navarro and Baserga, 2001; Baserga et al., 2003).

IGF-1R es especialmente importante por su efecto anti-apoptótico frente a la radiación (Kulik et al., 1997). En el estudio de Wen et al., en 2001, se evaluó el efecto de la inhibición de IGF-1R en pacientes con cáncer de mama y colon, observándose que la inhibición de la función de este receptor incrementaba la respuesta del tumor a la irradiación. Existen otros trabajos en los que se ha determinado el efecto que produce la inhibición de IGF-1R frente a la irradiación (Cosaceanu et al., 2005; Macaulay et al., 2001; Peretz et al., 2001), y en todos se relaciona esta inhibición, estrechamente ligada a la expresión y señalización ATM (*ataxia telangiectasia mutada*), con un incremento de la radiosensibilidad. Estos resultados han llevado a pensar que la activación de IGF-1R está asociada a un incremento de la radioresistencia.

El valor pronóstico de IGF-1R no está claro en la literatura. No son muchos los trabajos que se han dedicado al estudio de este factor en series amplias de pacientes y los que existen han obtenido resultados dispares. En el estudio de Railo et al. (1994), realizado sobre una serie de 126 pacientes con cáncer de mama, una expresión elevada del marcador se relacionaba significativamente con peor supervivencia. Por otro lado, en el estudio de Shimizu et al. (2004), también realizado sobre pacientes con cáncer de mama (210 pacientes), IGF-1R estaba sobreexpresado en el 43% de las pacientes, pero su expresión no se asoció de forma significativa a ningún parámetro clínico-patológico, ni tampoco a una disminución de la supervivencia libre de enfermedad. Existen otros artículos en los que se ha estudiado la expresión de IGF-1R en otro tipo de carcinomas, como en cáncer colorrectal (Peters et al., 2003; Nakamura et al., 2004), o en sarcomas de tejido blando (Ahlén et al., 2005), pero el resultado de todos ellos tampoco es concluyente.

En cuanto a los trabajos realizados sobre la significación pronóstica que IGF-1R pueda tener en relación a los pacientes tratados con terapias de irradiación, el número de artículos se reduce aún más (Turner et al., 1997; Lloret et al., 2007; Taunk et al., 2010).

### 1.3.3. La reparación del ADN y Ku70/Ku80

La alteración en la secuencia de ADN es un fenómeno que se produce de forma intrínseca a la célula debido a errores en el proceso de replicación. Estas alteraciones también pueden generarse mediante cambios químicos espontáneos de las bases nitrogenadas. Pero además existen multitud de agentes que pueden modificar la secuencia de ADN. Estos agentes pueden ser ambientales (sustancias químicas, radiación), biológicos (virus) o sustancias generadas durante el metabolismo de la célula (especies reactivas de oxígeno). Los defectos de la reparación del ADN pueden generar importantes alteraciones genéticas asociadas a múltiples enfermedades, entre ellas el cáncer.

Los daños en el ADN pueden afectar a un solo nucleótido (formación de dímeros, formación de aductos), a una región más amplia del ADN (entrecruzamientos intra e intercatenarios, entrecruzamientos ADN-proteína), incluso puede producirse una rotura simple o doble de la cadena de ADN. La reparación de cada uno de estos daños es llevada a cabo por mecanismos diferentes. Algunos de ellos son: la inversión directa, la reparación de nucleótidos por escisión (NER), la reparación de bases por escisión (BER) y la reparación mal emparejada (*mismatch repair*, MMR). Cuando el daño se produce por rotura doble de cadena (DSB), el mecanismo de reparación puede ser homólogo (si se produce una reparación del daño de manera precisa, utilizando como molde una cadena homóloga no dañada), en cuyo caso se denomina recombinación homóloga (HR); o puede ser una reparación no homóloga (cuando las enzimas unen extremos rotos sin ningún tipo de homología), produciéndose en este caso una recombinación de bordes no homólogos (NHEJ) (Köberle et al., 2005).

La recombinación no homóloga (NHEJ) necesita de proteínas de unión terminal que funcionan como factores de reparación. En este proceso participa la proteína Ku, formada por Ku70 y Ku80 (para algunos autores Ku86), que junto con la subunidad DNA-PKcs forma el complejo DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*). La proteína heterodimérica Ku se encarga de unirse a los cortes del ADN sin discriminar la naturaleza del corte y activa a DNA-PKcs para que realice la reparación (Walker et al., 2001). Ku está presente de forma abundante en el núcleo, además de estar implicada en la reparación del ADN, realiza funciones de mantenimiento de los telómeros.

La IR produce una multitud de daños en el ADN, de los cuales los más letales son las roturas dobles y simples de cadena (DSB y STB). Dentro de los mecanismos de reparación de rotura doble de cadena, la recombinación no homóloga es el mecanismo predominante en las

células somáticas. La proteína Ku, implicada en este sistema de reparación, es absolutamente esencial para el mantenimiento de la estabilidad genómica. La expresión de Ku está regulada de tal manera que su sobreexpresión promueve fenotipos oncogénicos (incluyendo hiperproliferación y resistencia a la apoptosis), pero al mismo tiempo, una expresión baja o nula de dicha proteína conduce a inestabilidad genómica y oncogénesis. Estas observaciones indican que Ku puede actuar tanto como oncoproteína como proteína supresora tumoral (Gullo et al., 2006).

La relación entre el heterodímero Ku y la respuesta a la radiación de distintos tipos de cáncer ha sido recogida en múltiples estudios con resultados controvertidos. En el estudio de Bjork-Ericsson et al. (1999), no se encontró relación entre la fracción de supervivencia tumoral y la expresión de DNA-PKcs o Ku70/80. En Sakata et al. (2001), se analizó la expresión de Ku70 y otros genes relacionados con reparación de ADN, en tejido normal y tumoral de 134 pacientes con distintos tipos tumorales y que desarrollaron radioresistencia, sin encontrar diferencias en su expresión entre tejido canceroso y su tejido sano correspondiente. Por otro lado, en otros artículos sí se estableció relación entre la expresión de Ku70 y la sensibilidad o resistencia a la radiación en pacientes con distintos tipos tumorales (Zhao et al., 2000; Komuro et al., 2002).

La relación entre la depleción de oxígeno y los niveles de Ku70/80 es controvertida. En la literatura encontramos artículos publicados en los que no se observa modulación de NHEJ por hipoxia (Bindra et al., 2004; Sprong et al., 2006), mientras que en otros aparece una relación entre los niveles de oxígeno y la expresión de algunos de los genes relacionados con NHEJ, entre ellos la proteína Ku (Meng et al., 2005).

El valor pronóstico de Ku70/80 tampoco está claro en la literatura. En algunos trabajos se establece que los niveles bajos de Ku70 o Ku80 se relacionan con una mayor radiosensibilidad, y por lo tanto mayor supervivencia libre de enfermedad y/o supervivencia global (Wilson et al., 2000; Komuro et al., 2002; Harima et al., 2003; Saygili et al., 2004). Por el contrario, en otros artículos, como en el de Grabsch et al. (2006) o el de Pavón et al. 2008, se observa mayor supervivencia global en aquellos pacientes con valores de expresión más altos para Ku70.

#### *1.3.4. Las proteínas de resistencia a drogas (MVP)*

MVP es el acrónimo de *major vault protein*. Hace referencia a la proteína mayoritaria de las partículas denominadas *Vaults*. Los complejos *Vaults* están constituidos, además de por MVP, por dos proteínas *vaults* de menor peso molecular (VPARP y TEP1) y por moléculas de ARN sin traducir (vARN). Estos complejos, en particular MVP, tienen un papel primordial en la resistencia celular a drogas. Por ello, en tejido sano, aparece principalmente en esos lugares en los que la exposición a xenobióticos es mayor, como en pulmón, hígado e intestino.



Debido a esta función de transporte de drogas, son muchos los estudios que se han llevado a cabo para determinar la relación de *Vaults*, y en concreto de MVP, con la quimioresistencia que presentan algunos tipos tumorales. Sin embargo, su posible relación con la resistencia a la radiación no ha sido casi estudiada. En el estudio de Shimamoto et al. (2006), en líneas celulares de cáncer colorectal humano, los niveles de MVP aumentaban tras el tratamiento con agentes que dañaban el ADN, entre ellos la radiación ultravioleta. En Silva et al. (2007), en un estudio en pacientes con cáncer de lengua, se analizó el papel de LRP (*Lung Resistance Protein*) en la resistencia a la radiación y se encontró que una alta expresión de LRP (que es equivalente a MVP) se relacionaba con peor pronóstico de la enfermedad, demostrando que LRP es importante en el pronóstico de la resistencia a la radiación.

Parece además que las proteínas *Vaults* pueden participar en otros procesos celulares, aunque las demostraciones no están claras. Los diferentes componentes de las partículas *vaults* se han asociado con funciones tales como la proliferación celular y la apoptosis (Steiner et al., 2006). En cuanto a la relación que MVP puede tener con los procesos de carcinogénesis, podría estar mediado por su relación con la proteína-asociada a telomerasa (TEP1) (Miwa y Masutani, 2007). Además, la proteína *vault* PARP-1, parece inhibir la acción de Ku70/80, favoreciendo los procesos de recombinación homóloga frente a los procesos no homólogos (NHEJ) (Hochegger et al., 2006). A pesar de que existen indicios que indican que MVP, y en extensión los componentes de *vaults*, intervienen en diversos procesos celulares claves en los fenómenos de carcinogénesis, las demostraciones no son concluyentes.

## **2. IGF-1R, MVP, Ku70/80 E HIPOXIA EN PACIENTES TRATADOS CON RADIOTERAPIA**

### **2.1 IGF-1R, el primer marcador estudiado**

En 2007, Lloret y colaboradores publican el artículo titulado "*IGF-1R expression in localized cervical carcinoma patients treated by radiochemotherapy*" (Lloret et al., 2007), iniciando así el estudio de los marcadores pronósticos en pacientes con cáncer tratados con radioterapia. En este caso, la molécula elegida fue IGF-1R por su implicación en procesos de proliferación celular, inhibición apoptótica y migración celular, fenómenos todos ellos relacionados con los procesos carcinogénicos; también por su implicación en la radioresistencia de células tumorales que sobreexpresan este receptor.

El estudio se realizó sobre 60 pacientes diagnosticadas de cáncer de cérvix, que recibieron radioterapia y quimioterapia concomitante, y sobre las que se realizó un seguimiento medio de 46 meses. La determinación de la expresión de IGF-1R de las células tumorales se realizó mediante técnicas inmunohistoquímicas.

De los análisis que se realizaron, los resultados más relevantes fueron que la expresión de IGF-1R estaba estrechamente relacionada con el control loco-regional de la enfermedad y la supervivencia. En los pacientes que obtuvieron respuesta completa al tratamiento (n=50), que además presentaban niveles bajos de expresión de IGF-1R, ningún paciente presentó recidiva durante el período de seguimiento, resultando así en un 100% de control loco-regional durante 5 años de seguimiento.

En el cáncer de cérvix, la supervivencia está fuertemente influenciada por el control loco-regional, ya que la metástasis es un fallo al tratamiento menos común. Por ello, la expresión de IGF-1R, como marcador relacionado con el control loco-regional, puede tener importancia en el pronóstico de los resultados de los tratamientos con radioterapia y quimioterapia concomitante en pacientes con cáncer de cérvix.

Aunque existían algunas publicaciones acerca de la relación de la expresión de IGF-1R y la respuesta a la radioterapia (Turner et al., 2005), esta publicación fue la primera en cáncer de cérvix.

## **2.2 MVP y su relación con otros factores pronósticos**

En 2008 se publicaron dos artículos dirigidos a explorar el papel de MVP en relación a los resultados clínicos de pacientes con cáncer de cérvix, y al mismo tiempo profundizar en los conocimientos sobre las funciones celulares en las que MVP participa, y que son importantes en la progresión y desarrollo de los tumores en dichas pacientes.

En Julio de 2008 se publica el artículo "*MVP expression is related to IGF-1R in cervical carcinoma patients treated by radiochemotherapy*" (Lloret et al., 2008), en el que se persigue evaluar el valor pronóstico de MVP en pacientes con cáncer de cérvix tratadas con radioquimioterapia y su relación con la expresión de IGF-1R. En el momento de la publicación, el papel de MVP en la respuesta a la radioterapia apenas comenzaba a estudiarse (Silva et al., 2007), aunque sí se había asociado su expresión con resistencia a radioterapia mediante su implicación en la prevención de la apoptosis (Yi et al., 2005). Tanto MVP como IGF-1R parecen estar relacionados con resistencia a tratamientos oncológicos, existiendo la posibilidad de que ambos estén relacionados entre sí. Se estudió una serie de 60 pacientes con cáncer de cérvix, tratadas con radioquimioterapia, con una media de seguimiento para las supervivientes de 67,69 meses. Tanto la determinación de MVP, como de IGF-1R se realizó mediante métodos inmunohistoquímicos.

De las pacientes que respondieron completamente al tratamiento de radioterapia (n=50), aquellas que presentaban expresión nula o muy baja de MVP estuvieron libres de enfermedad local, regional o muerte relacionada con la enfermedad. Sin embargo, los resultados no fueron

significativos, aunque sí se observaba una tendencia, para supervivencia libre de enfermedad loco-regional (LRDFS), supervivencia libre de enfermedad (DFS) y supervivencia global. Sin embargo, si se agrupaban las pacientes con expresión nula o baja de MVP ó IGF-1R (cualquiera de los dos marcadores), entonces los resultados eran muy significativos para LRDFS, DFS y supervivencia global. En este caso, las pacientes que tenían MVP bajo, pero alto IGF-1R o viceversa, estaban libres de enfermedad después de la respuesta completa al tratamiento.

Este artículo supone el primer estudio sobre el valor pronóstico de MVP en cáncer de cérvix y el primero en el que se evidencia la relación directa entre la expresión de MVP e IGF-1R y la necesidad de que ambos marcadores estén sobreexpresados para que se produzca quimioradioresistencia, y por tanto, peor pronóstico. Como consecuencia, la expresión conjunta de MVP e IGF-1R, puede ser un factor pronóstico importante en el tratamiento con quimioradioterapia de pacientes con cáncer de cérvix.

Con posterioridad, en noviembre de 2009, Lloret y colaboradores publican el artículo "*Major vault protein may affect nonhomologous end-joining repair and apoptosis through Ku70/80 and Bax downregulation in cervical carcinoma tumors*". En este artículo se estudia la relación de MVP con Ku70/80, factor importante en la reparación de ADN, y con otros marcadores involucrados en la apoptosis y proliferación celular: IGF-1R, BAX (*BCL2-associated X protein*), BCL-2 (*B-cell CLL/lymphoma 2*), p53 y Ki67 (marcador de proliferación celular), con la intención de profundizar en las posibles causas que producen inestabilidad genética, progresión tumoral y resistencia a tratamientos oncológicos de pacientes con cáncer de cérvix.

La expresión de estos marcadores se estudió en una serie de 116 pacientes con cáncer de cérvix. Las medidas de expresión de los marcadores se realizaron mediante técnicas inmunohistoquímicas.

Los tumores que sobreexpresaban MVP, mostraban niveles bajos de Ku70/80. De estos resultados, por primera vez se observó que la expresión de MVP podía tener relación con el incremento de la inestabilidad genética por reducción de la reparación de los daños de ADN mediante NHEJ y disminución de la expresión de Ku70/80.

También se asoció la expresión de MVP con la progresión tumoral y resistencia al tratamiento oncológico mediante la supresión de BAX y la sobreexpresión de IGF-1R, aumentando la proliferación y disminuyendo la apoptosis mediante incremento de BCL-2 y sobreexpresión de p53 alterado.

La decisión de una célula tumoral con daños en el ADN (producidos por la radiación) de proseguir con el ciclo celular o no, depende de los mecanismos de reparación de DSBs por recombinación homóloga o no homóloga e implica la progresión hacia el control tumoral o hacia su proliferación y resistencia. De ahí la importancia de los factores que intervienen en esta decisión. Por primera vez se asocia MVP con factores que favorecen la reparación no homóloga (NHEJ) y se evidencia su implicación en la reducción de la respuesta tumoral a tratamientos oncológicos mediante el desarrollo de fenotipos celulares resistentes.

### **2.3 Influencia de la hipoxia en la regulación de la expresión de marcadores pronósticos**

Teniendo en cuenta la importancia que los procesos de reparación no homólogos tienen en la progresión tumoral, y la relación tan estrecha entre los niveles de hipoxia tumorales y la radiosensibilidad, en 2008, Lara y colaboradores, publican el artículo "*Hypoxia downregulates Ku70/80 expression in cervical carcinoma tumors*". En este estudio se realiza una prospección de la relación entre la expresión de Ku70/80 y los niveles de hipoxia en tumores de cérvix.

Tanto la expresión de Ku70/80, como los niveles de hipoxia tumorales se midieron en un total de 43 pacientes. La expresión de Ku70/80 se estimó mediante tinciones inmunohistoquímicas. Los niveles de oxigenación tumoral se realizaron siguiendo el método descrito en el trabajo de Clavo et al. (2003).

De los resultados obtenidos, los más relevantes hacen referencia a la relación entre hipoxia y expresión de Ku70/80. Por primera vez se demuestra que la hipoxia inhibe la expresión de Ku70/80 en tumores clínicos de cérvix. De esta manera se confirman estudios preclínicos previos en los que los niveles de hipoxia originaban un aumento de la inestabilidad genética a través de una disminución de la reparación del daño celular.

Siguiendo la línea de estudio de los efectos de la hipoxia en la expresión de marcadores pronósticos, y teniendo en cuenta la relación previamente reportada entre expresión de MVP y Ku70/80, en 2009 se publica el trabajo "*Severe hypoxia induces chemo-resistance in clinical cervical tumors through MVP over-expression*", por Lara y colaboradores. La molécula de MVP es conocida principalmente por su función en la resistencia a drogas y por lo tanto a la quimioterapia, aunque también se ha documentado su participación en los mecanismos de

resistencia a radioterapia. Con este estudio se pretende determinar la relación entre MVP y los niveles de hipoxia en tumores clínicos de cérvix.

Los análisis se llevaron a cabo en una serie de 43 pacientes con cáncer de cérvix en las que se midió tanto la concentración de oxígeno tumoral, mediante la técnica nombrada anteriormente, como la expresión de MVP y otros marcadores tumorales (p53 y angiogénesis mediante CD 31), medidos mediante métodos inmunohistoquímicos.

La expresión alta de MVP se relacionó con hipoxia severa en comparación con los tumores que presentaban baja expresión de MVP. De este modo, y por primera vez, se relacionan niveles altos de hipoxia tumoral con una sobreexpresión de MVP en tumores de cérvix. La relevancia de este hallazgo radica en la importancia de los tratamientos quimioterápicos en los pacientes con cáncer de cérvix, en los que en muchos casos, se produce un aumento de los niveles de hipoxia, influyendo en la sobreexpresión de MVP y favoreciendo así la resistencia a estos fármacos. Estos resultados concuerdan con estudios previos en los que se relacionaba la disminución de pO<sub>2</sub> con un incremento de la quimioresistencia (Cosse y Michiels, 2008).

#### **2.4 Marcadores pronósticos en cáncer de cabeza y cuello**

En la actualidad, motivados por la evidencia del valor pronóstico de IGF-1R en cáncer de cérvix, está en proceso de publicación el artículo titulado "*IGF-1R expression predicts clinical outcome in patients with locally advanced oral squamous cell carcinoma*" (Lara et al., 2011). En este trabajo se estudia la expresión de IGF-1R en pacientes con cáncer de cavidad oral, su relación con factores clínico-patológicos y su papel en la predicción de los resultados clínicos.

El estudio se realizó sobre 131 pacientes con cáncer de cavidad oral tratados con cirugía y posteriormente con radioterapia. La media de seguimiento para los pacientes vivos fue de 110 meses. La expresión de IGF-1R se estimó mediante inmunohistoquímica.

En la serie completa, la expresión de IGF-1R estaba relacionada únicamente con el grado histológico del tumor y su expresión no se asoció con los resultados del tratamiento. Sin embargo, la relevancia de este trabajo es que, en aquellos pacientes diagnosticados de cáncer de cavidad oral con peor pronóstico (estadios III y IV), los que presentan valores de IGF-1R más bajos tienen una expectativa de supervivencia significativamente mejores que los que presenta valores elevados de expresión de IGF-1R.

### **3. CONCLUSIONES**

La sobreexpresión o inhibición de determinadas moléculas biológicas, implicadas en las funciones celulares, pueden conducir a una alteración de los patrones celulares normales, como el aumento de proliferación, la inhibición de la apoptosis, anomalías en la migración celular, inestabilidad genética... que en último término pueden traducirse en una progresión tumoral y resistencia a los tratamientos oncológicos. Se ha observado que algunas de estas moléculas pueden tener significación pronóstica para los resultados de un determinado tratamiento en un tipo concreto de cáncer.

La sobreexpresión de IGF-1R (*insulin-like growth factor 1 receptor*) implica un aumento de la radioresistencia en los tratamientos oncológicos. Se ha observado además, que la expresión de IGF-1R está estrechamente relacionada con el control loco-regional de pacientes con cáncer de cérvix, siendo esta la primera evidencia de su valor pronóstico en este tipo de cáncer (Lloret et al., 2007).

IGF-1R no sólo tiene valor pronóstico en pacientes con cáncer de cérvix. También en pacientes con cáncer de cavidad oral con estadios avanzados, en los que el pronóstico es peor, los niveles bajos de expresión de IGF-1R implican una mejora significativamente mayor en la supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global (Lara et al., 2011).

Por primera vez se ha relacionado la expresión de IGF-1R con la expresión de MVP. *Major vault protein* ya había sido asociada previamente con funciones de resistencia a drogas, pero con este estudio se han potenciado las evidencias de su relación con funciones de proliferación y apoptosis. Además, se ha incrementado el valor pronóstico de IGF-1R en pacientes con cáncer de cérvix, ya que sólo en aquellos casos en los que ambos factores (IGF-1R y MVP) están sobreexpresados, se producen recidivas loco-regionales de la enfermedad y resistencia al tratamiento (Lloret et al., 2008).

Siguiendo con la profundización en las causas por las que MVP tiene relación con la progresión tumoral y resistencia al tratamiento, por primera vez se ha evidenciado la participación de MVP en los procesos de inestabilidad genética, a través de su relación con la expresión de factores potenciadores de la reparación no homóloga de ADN (NHEJ) tales como Ku70/80 (Lloret et al., 2009).

Los niveles de hipoxia tumoral, otro factor que favorece la resistencia a los tratamientos oncológicos con radioterapia, también está relacionado con la capacidad reparadora de la célula, a través de la regulación de la expresión de Ku70/80 en tumores de cérvix (Lara et al., 2008). Pero además, los niveles de oxígeno tumorales no sólo se han relacionado con resistencia a la radioterapia, lo cual es lógico debido a su función primordial en este

tratamiento, sino que también se han vinculado con la quimioresistencia, ya que por primera vez se ha demostrado la regulación de los niveles de expresión de MVP mediante los niveles de hipoxia de tumores de cérvix (Lara et al., 2009).

#### **4. REFERENCIAS**

Ahlén J, Wejde J, Brosjö O, von Rosen A, Weng WH, Girnita L, Larsson O, Larsson C. Insulin-like growth factor type 1 receptor expression correlates to good prognosis in highly malignant soft tissue sarcoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11(1):206-16.

Baserga R, Peruzzi F, Reiss K. The IGF-1 receptor in cancer biology. *Int J Cancer* 2003 (Dec 20); 107(6):873-7.

Bindra RS, Schaffer PJ, Meng A, Woo J, Måseide K, Roth ME, Lizardi P, Hedley DW, Bristow RG, Glazer PM. Down-regulation of Rad51 and decreased homologous recombination in hypoxic cancer cells. *Mol Cell Biol*. 2004 Oct; 24(19):8504-18.

Bjork-Eriksson T, West C, Nilsson A, Magnusson B, Svensson M, Karlsson E, Slevin N, Lewensohn R, Mercke C. The immunohistochemical expression of DNA-PKCS and Ku (p70/p80) in head and neck cancers: relationships with radiosensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1999; 45(4):1005-1010.

Brizel DM, Rosner GL, Prosnitz LR. Patterns and variability of tumor oxygenation in human soft tissue sarcomas, cervical carcinomas, and lymph node metastases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1995; 32:1121-1125.

Clavo B, Perez JL, Lopez L, Suarez G, Lloret M, Morena J, Macias D, Martinez JC, Santana M, Hernandez MA, Robaina F, Günderoth M. Influence of hemoglobin concentration and peripheral muscle pO<sub>2</sub> on tumor oxygenation in advanced head and neck tumors. *Radiother Oncol* 2003; 66:71-4.

Cosaceanu D, Carapancea M, Castro J, Ekedahl J, Kanter L, Lewensohn R, Dricu A. Modulation of response to radiation of human lung cancer cells following insulin-like growth factor 1 receptor inactivation. *Cancer Letters* 2005; 222(2):173-81.

Cosse JP, Michiels C. Tumour hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression. *Anticancer Agents Med Chem* 2008; 8:790-797.

Gold P, Freedman SO. Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J Exp Med*. 1965; 121:439-62.

Gold P, Freedman SO. Specific carcinoembryonic antigen of the human digestive system. *J Exp Med*. 1965; 122(3):467-81.



Grabsch H, Dattani M, Barker L, Maughan N, Maude K, Hansen O, Gabbert HE, Quirke P, Mueller W. Expression of DNA double-strand break repair proteins ATM and BRCA1 predicts survival in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(5):1494-1500.

Gullo C, Au M, Feng G, Teoh G. The biology of Ku and its potential oncogenic role in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1765(2):223-234.

Haensgen G, Krause U, Becker A, Stadler P, Lautenschlaeger C, Wohlrab W, Rath FW, Molls M, Dunst J. Tumor hypoxia, p53, and prognosis in cervical cancers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001; 50(4):865-72.

Harima Y, Sawada S, Miyazaki Y, Kin K, Ishihara H, Imamura M, Sougawa M, Shikata N, Ohnishi T. Expression of Ku80 in cervical cancer correlates with response to radiotherapy and survival. *Am J Clin Oncol.* 2003; 26(4):80-5.

Hellman S, Rosenberg S. A. *Cancer: principles and practice of oncology.* J.B. Lippincott, Philadelphia, 1999.

Hochegger H, Dejsuphong D, Fukushima T, Morrison C, Sonoda E, Schreiber V, Zhao GY, Saberi A, Masutani M, Adachi N, Koyama H, de Murcia G, Takeda S. Parp-1 protects homologous recombination from interference by Ku and Ligase IV in vertebrate cells. *EMBO J.* 2006 Mar 22; 25(6):1305-14.

Ivanчук SM, Rutka JT. The cell cycle: accelerators, brakes, and checkpoints. *Neurosurgery* 2004; 54(3):692-699; discussion 699-700.

Kiltie A. Radiotherapy and molecular radiotherapy. In: Knowles M and Shelby P (eds.). *Introduction to the cellular and molecular biology of cancer.* Oxford University press, Oxford, 2005, pp 414-427.

Köberle B, Wittschieben JP, Wood RD. DNA repair and cancer. In: Knowles M and Shelby P (eds.). *Introduction to the cellular and molecular biology of cancer.* Oxford University press, Oxford, 2005, pp 61-77.

Komuro Y, Watanabe T, Hosoi Y, Matsumoto Y, Nakagawa K, Tsuno N, Kazama S, Kitayama J, Suzuki N, Nagawa H. The expression pattern of Ku correlates with tumor radiosensitivity and disease free survival in patients with rectal carcinoma. *Cancer.* 2002; 95(6):1199-1205.

Kulik G, Klippel A, Weber MJ. Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase and Akt. *Mol Cell Biol.* 1997; 17(3):1595-606.

Lara PC, Lloret M, Clavo B, Apolinario RM, Bordón E, Rey A, Falcón O, Alonso AR, Belka C. Hypoxia downregulates Ku70/80 expression in cervical carcinoma tumors. *Radiother Oncol.* 2008 Nov; 89(2):222-6.

Lara PC, Lloret M, Clavo B, Apolinario RM, Henríquez-Hernández LA, Bordón E, Fontes F, Rey A. Severe hypoxia induces chemo-resistance in clinical cervical tumors through MVP over-expression. *Radiat Oncol.* 2009; 4:29-33.

Lara PC, Bordón E, Rey A, Moreno M, Lloret M, Henríquez-Hernández LA. IGF-1R expression predicts clinical outcome in patients with locally advanced oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2011; *in press.*

Lartigau E. Angiogenesis and radiotherapy (vessels, anaemia, oxygen and radiosensitivity). *Bull Cancer.* 2007; 94 Spec No:S197-202.

Lloret M, Lara PC, Bordón E, Pinar B, Rey A, Falcón O, Molano F, Hernández MA. IGF-1R expression in localized cervical carcinoma patients treated by radiochemotherapy. *Gynecol Oncol.* 2007 Jul; 106(1):8-11.

Lloret M, Lara PC, Bordón E, Rey A, Falcón O, Apolinario RM, Clavo B, Ruiz A. MVP expression is related to IGF1-R in cervical carcinoma patients treated by radiochemotherapy. *Gynecol Oncol.* 2008 Sep; 110(3):304-7.

Lloret M, Lara PC, Bordón E, Fontes F, Rey A, Pinar B, Falcón O. Major vault protein may affect nonhomologous end joining repair and apoptosis through Ku70/80 and Bax downregulation in cervical carcinoma tumors. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 2009 Mar 15; 73(4):976-9.

Lyng H, Sundfør K, Rofstad EK. Oxygen tension in human tumours measured with polarographic needle electrodes and its relationship to vascular density, necrosis and hypoxia. *Radiother Oncol.* 1997; 44(2):163-169.

Macaulay VM, Salisbury AJ, Bohula EA, Playford MP, Smorodinsky NI, Shiloh Y. Downregulation of the type 1 insulin-like growth factor receptor in mouse melanoma cells is associated with enhanced radiosensitivity and impaired activation of Atm kinase. *Oncogene* 2001; 20(30):4029-40.

Meng AX, Jalali F, Cuddihy A, Chan N, Bindra RS, Glazer PM, Bristow RG. Hypoxia downregulates DNA double strand break repair gene expression in prostate cancer cells. *Radiother Oncol.* 2005 Aug; 76(2):168-76.

Miwa M, Masutani M. PolyADP-ribosylation and cancer. *Cancer Sci.* 2007 Oct; 98(10):1528-35.

Nakamura M, Miyamoto S, Maeda H, Zhang SC, Sangai T, Ishii G, Hasebe T, Endoh Y, Saito N, Asaka M, Ochiai A. Low levels of insulin-like growth factor type 1 receptor expression at cancer cell membrane predict liver metastasis in Dukes'C human colorectal cancers. *Clin Cancer Res* 2004; 10(24):8434-41.

Navarro M, Baserga R. Limited redundancy of survival signals from the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Endocrinology* 2001; 142(3):1073-81.

Pavón MA, Parreño M, León X, Sancho FJ, Céspedes MV, Casanova I, Lopez-Pousa A, Mangues MA, Quer M, Barnadas A, Mangues R. Ku70 predicts response and primary tumor recurrence after therapy in locally advanced head and neck cancer. *Int J Cancer*. 2008 Sep 1; 123(5):1068-79.

Peretz S, Jensen R, Baserga R, Glazer PM. ATM-dependent expression of the insulin-like growth factor-I receptor in a pathway regulating radiation response. *Proc Natl Acad. Sci USA* 2001; 98(4):1676-81.

Peters G, Gongoll S, Langner C, Mengel M, Piso P, Klemptner J, Ruschoff J, Kreipe H, von Wasielewski R. IGF-1R, IGF-1 and IGF-2 expression as potential prognostic and predictive markers in colorectal-cancer. *Virchows Arch* 2003; 443(2):139-45.

Railo MJ, von Smitten K, Pekonen F. The prognostic value of insulin-like growth factor-I in breast cancer patients. Results of a follow-up study on 126 patients. *Eur J Cancer* 1994; 30A(3):307-11.

Rouse J, Jackson SP. Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. *Science* 2002; 297:547-51.

Sakata K, Matsumoto Y, Tauchi H, Satoh M, Oouchi A, Nagakura H, Koito K, Hosoi Y, Suzuki N, Komatsu K, Hareyama M. Expression of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in normal and tumor tissues. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001; 49(1):161-167.

Saygili U, Gorkay IB, Koyuncuoglu M, Gol M, Uslu T, Erten O .The relationship between expression of Ku70 and survival in irradiated patients with endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2004; 95(3):518-522.

Sheridan MT, West CM, Cooper RA, Stratford IJ, Logue JP, Davidson SE, Hunter RD. Pretreatment apoptosis in carcinoma of the cervix correlates with changes in tumour oxygenation during radiotherapy. *Br J Cancer*. 2000; 82(6):1177-82.

Shimamoto Y, Sumizawa T, Haraguchi M, Gotanda T, Jueng HC, Furukawa T, Sakata R, Akiyama S. Direct activation of the human major vault protein gene by DNA-damaging agents. *Oncol Rep*. 2006; 15(3):645-652.

Shimizu C, Hasegawa T, Tani Y, Takahashi F, Takeuchi M, Watanabe T, Ando M, Katsumata N, Fujiwara Y. Expression of insulin-like growth factor 1 receptor in primary breast cancer: immunohistochemical analysis. *Hum Pathol* 2004; 35(12):1537-42.

Silva P, West CM, Slevin N, Valentine H, Ryder WD, Hampson L, Bibi R, Sloan P, Thakker N, Homer J, Hampson I. Tumor expression of major vault protein is an adverse prognostic

factor for radiotherapy outcome in oropharyngeal carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007; 69(1):133-40.

Sprong D, Janssen HL, Vens C, Begg AC. Resistance of hypoxic cells to ionizing radiation is influenced by homologous recombination status. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006 Feb 1; 64(2):562-72.

Steiner E, Holzmann K, Elbling L, Micksche M, Berger W. Cellular functions of vaults and their involvement in multidrug resistance. *Curr Drug Targets.* 2006; 7(8):923-934.

Taunk NK, Goyal S, Moran MS, Yang Q, Parikh R, Haffty BG. Prognostic significance of IGF-1R expression in patients treated with breast-conserving surgery and radiation therapy. *Radiother Oncol.* 2010; 96:204-208.

Turner BC, Haffty BG, Narayanan L, Yuan J, Havre PA, Gumbs AA, Kaplan L, Burgaud JL, Carter D, Baserga R, Glazer PM. Insulin-like growth factor-I receptor overexpression mediates cellular radioresistance and local breast cancer recurrence after lumpectomy and radiation. *Cancer Res* 1997 Aug 1; 57(15):3079–83.

Ullrich A, Gray A, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C, Henzel W, Le Bon T, Kathuria S, Chen E et al. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J* 1986 Oct; 5(10):2503–12.

Vaupel P, Kelleher DK, Höckel M. Oxygen status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. *Semin Oncol.* 2001; 28(2 Suppl 8):29-35.

Walker JR, Corpina RA, Goldberg J. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* 2001; 412(6847):607-164.

Wen B, Deutsch E, Marangoni E, Frasca V, Maggiorella L, Abdulkarim. Tyrphostin AG 1024 modulates radiosensitivity in human breast cancer cells. *Br J Cancer* 2001; 85(12):2017-21.

Wilson CR, Davidson SE, Margison GP, Jackson SP, Hendry JH, West CM. Expression of Ku70 correlates with survival in carcinoma of the cervix. *Br J Cancer.* 2000; 83(12):1702-1706.

Wolff ME. *Burger's Medicinal Chemistry.* John Wiley & Sons, New York, 1981, pp 11-45.

Wong RK, Fyles A, Milosevic M, Pintilie M, Hill RP. Heterogeneity of polarographic oxygen tension measurements in cervix cancer: an evaluation of within and between tumor variability, probe position, and track depth. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1997; 39(2):405-412.

Yi C, Li S, Chen X, Wiemer EA, Wang J, Wei N, Deng XW. Major vault protein, in concert with constitutively photomorphogenic 1, negatively regulates c-Jun-mediated activator protein 1 transcription in mammalian cells. *Cancer Res* 2005; 65(13):5835–40.

Zhao HJ, Hosoi Y, Miyachi H, Ishii K, Yoshida M, Nemoto K, Takai Y, Yamada S, Suzuki N, Ono T. DNA-dependent protein kinase activity correlates with Ku70 expression and radiation sensitivity in esophageal cancer cell lines. *Clin Cancer Res.* 2000; 6(3):1073-1078.