

PROGRESOS de OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA

www.elsevier.es/pog



ORIGINAL

Expresión de marcadores hipóxicos y glucolíticos CAIX, GLUT-1, HKII y su relación con la respuesta temprana al tratamiento en carcinoma escamocelular de cuello uterino

Pablo Moreno-Acosta^{a,*}, Schyrly Carrillo^a, Oscar Gamboa^b, Yineth Acosta^c,
Joseph Balart-Serra^d, Nicolas Magne^e, Mario Alexander Melo-Uribe^f
y Alfredo Ernesto Romero-Rojas^{g,*}

^aGrupo de Investigación en Biología del Cáncer, Subdirección de Investigaciones, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, Colombia

^bSubdirección de Investigaciones, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, Colombia

^cGrupo de Patología, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina, Bogotá, Colombia

^dRadiobiología Aplicada, Laboratorio de Investigación Translacional (IDIBELL), Instituto Catalán de Oncología, Barcelona, España

^eDepartment of Radiotherapy, Institut de Cancérologie de la Loire, Saint Priest en Jarez, Francia

^fGrupo de Patología Quirúrgica, Universidad de La Sabana, Bogotá, Colombia

^gGrupo de Patología Oncológica, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, Colombia

Recibido el 4 de mayo de 2012; aceptado el 18 de septiembre de 2012

Disponible en Internet el 9 de febrero de 2013

PALABRAS CLAVE

Neoplasias de cuello
uterino;
Inmunohistoquímica;
Anhidrasa carbónica IX;
Transportador de glucosa
tipo 1;
Hexocinasa;
Hipoxia;
Glucólisis;
Respuesta al tratamiento

Resumen

Objetivo: Determinar la expresión de CAIX, GLUT-1, HKII y establecer si existe asociación entre la expresión y la respuesta temprana al tratamiento en carcinomas escamocelulares de cuello uterino.

Sujetos y métodos: En este estudio de tipo cohorte retrospectiva se incluyó a 66 pacientes en estadios FIGO IIB y IIIB durante el periodo del 2001 al 2007, con una edad promedio de 47 años. De las 66 pacientes, 22 fueron tratadas con radioterapia exclusiva y 44 con quimioterapia concomitante a radioterapia. La expresión de las proteínas CAIX, GLUT-1 y HKII fue determinada mediante inmunohistoquímica en biopsias tomadas antes del tratamiento.

Resultados: Se encontró un mayor incremento en la expresión de GLUT-1 (74%), seguido de CAIX (41%) y HKII (18%). La coexpresión de GLUT-1 y CAIX resultó ser significativa ($p < 0,002$) en comparación con GLUT-1 y HKII. Además, se observó una tendencia de riesgo de no respuesta cuando se expresan simultáneamente las 3 proteínas.

Conclusiones: El incremento en la expresión de GLUT-1 respecto de CAIX y HKII reafirma el concepto de que los carcinomas tienen un alto consumo de glucosa y su coexpresión con CAIX y HKII como factores biológicos preexistentes puede contribuir a esclarecer los mecanismos de hipoxia en la invasión tumoral, así como su posible efecto frente a tratamientos como la

* Autores para correspondencia.

Correo electrónico: pmoreno@cancer.gov.co (P. Moreno-Acosta), aromero@cancer.gov.co (A.E. Romero-Rojas).

KEYWORDS

Uterine cervical neoplasms;
Immunohistochemistry;
Carbonic anhydrase IX;
Glucose transporter type 1;
Hexokinase;
Cell hypoxia;
Glycolysis;
Treatment response

radioterapia exclusiva y la radioquimioterapia concomitante para el manejo de cáncer de cuello uterino en estadios II B y III B.

© 2012 SEGO. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Expression of the hypoxic and glycolytic markers, CAIX, GLUT-1 and HKII and their association with early treatment response in squamous cell carcinomas of the uterine cervix

Abstract

Objective: To determine the expression of CAIX, GLUT-1 and HKII and whether there is an association between expression of these markers and early treatment response in squamous cell carcinomas of the uterine cervix.

Subjects and methods: This retrospective cohort study included 66 patients with squamous cell carcinomas of the uterine cervix in FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) stages IIB and IIIB between 2001 and 2007. The mean age was 47 years. Of the 66 patients, 22 were treated with radiotherapy and 44 with concurrent radiochemotherapy. Expression of the proteins CAIX, GLUT-1 and HKII was determined by immunohistochemistry in biopsies taken before treatment.

Results: The highest increase was found in expression of GLUT-1 (74%), followed by that of CAIX (41%) and HKII (18%). Coexpression of GLUT-1 and CAIX was significant ($p < 0.002$) compared with that of GLUT-1 and HKII. When all three proteins were expressed simultaneously, we observed a tendency toward lack of treatment response.

Conclusions: Increased expression of GLUT-1 compared with that of CAIX and HKII supports the notion that carcinomas have high glucose consumption. Coexpression of GLUT-1 with CAIX and HKII as preexisting biological factors could help to elucidate the mechanisms of hypoxia in tumoral invasion. Coexpression could also help to explain the possible effect of these markers on response to treatments such as exclusive radiotherapy and concurrent radiochemotherapy in the management of stage II B and IIIB cervical cancer.

© 2012 SEGO. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

En Colombia, el cáncer de cuello uterino constituye la segunda causa de cáncer, siendo la principal causa de muerte en mujeres. En 2002 la agencia internacional para investigación en cáncer reportó en GLOBOCAN una estimación de 21,8 casos nuevos por 100.000 mujeres al año con cáncer de cuello uterino¹. La mayoría de los casos son diagnosticados en estadios avanzados II B y III B, por lo que deben recibir tratamientos como radioterapia exclusiva o radioterapia concomitante a quimioterapia. El Instituto Nacional de Cancerología (INC) para el 2008 reportó 641 (11,8%) casos nuevos, de los cuales 92 (14,4%) casos correspondían a estadio II B y 133 (20,7%) casos a estadio III B^{2,3}. Algunos estudios realizados en pacientes con cáncer de cuello uterino, así como estudios biológicos dirigidos a evaluar el microambiente del tumor y los mecanismos moleculares que lo regulan, señalan que puede existir una asociación significativa entre la respuesta al tratamiento y el fenotipo tumoral, caracterizado este por cambios en la expresión génica, proteica y metabólica⁴⁻¹⁰. Los fenotipos que caracterizan el microambiente tumoral son la hipoxia (bajos niveles de oxígeno hasta el 1%), la glucólisis (incremento) y la acidosis (pH bajo)^{4,11,12}. En estas condiciones, las células malignas emplean vías metabólicas alternas a las que comúnmente utilizan las células normales para suplir sus necesidades, adaptarse y favorecer su proliferación y supervivencia.

Los fenotipos hipóxico, glucolítico y de acidosis son tomados en cuenta dentro del modelo hipotético propuesto para el

desarrollo tumoral del cáncer invasivo de cuello uterino^{13,14}. Este modelo se plantea desde la aparición de lesiones displásicas como consecuencia de la infección por virus del papiloma humano en la zona de transformación del tejido epitelial del cuello uterino^{15,16}, lesiones que mantenidas en el tiempo continúan hasta establecer el carcinoma in situ, caracterizado este por excesiva proliferación celular que da lugar a la condición de hipoxia^{1,15,17-21}. Esta se conserva durante la siguiente etapa de invasión celular (cáncer invasivo), en la que se hacen evidentes fenotipos como el glucolítico y de acidosis^{13,22,23}. Aquellas proteínas que se encuentran involucradas dentro de estos eventos y fenotipos mencionados experimentan modulación de su expresión. La expresión de algunas de ellas se ha considerado con posible valor pronóstico en el cáncer de cuello uterino, como las que se evaluaron en este estudio: anhidrasa carbónica (CAIX), transportador de glucosa tipo 1 (GLUT-1) y hexocinasa II (HKII)²⁴⁻²⁹. La CAIX es considerada un marcador endógeno de hipoxia, condición bajo la cual incrementa su expresión, regulada a través del factor inducible por hipoxia tipo 1 (HIF-1)^{29,30}; su expresión también puede depender de factores como bajos niveles de glucosa (que impiden su expresión)²⁹⁻³² y de bicarbonato^{30,33}, así como principalmente de la densidad celular^{31,34}. A nivel de fenotipo de acidosis, es importante por su participación en regulación del pH extracelular del tumor. El GLUT-1 es una proteína que se suma al desarrollo del cáncer; se ha demostrado que su sobreexpresión se asocia a un pronóstico adverso en varios tipos tumorales, incluyendo el cáncer de cuello uterino y, al igual que la CAIX,

participa en la progresión, la invasión y la metástasis³⁴⁻³⁷. Se ha reportado que su expresión se incrementa tanto en lesiones precursoras como en el cáncer invasivo de cuello uterino (estadios I-IV), y se relaciona con el grado de diferenciación del tumor a bajos niveles de oxígeno (considerado por ello otro marcador endógeno de hipoxia) y con el incremento de la captación de glucosa, evaluada esta en tumores de cáncer de cuello uterino in vivo mediante tomografía por emisión de positrones (PET)^{10,28,35-37}. Los estudios que han evaluado el consumo de glucosa por PET y su relación con la expresión de GLUT-1 en el cáncer de cuello uterino discuten la importancia que puede tener la enzima HKII, ya que esta participa en la conversión de glucosa a glucosa-6-fosfato durante la glucólisis³⁷⁻³⁹ y desempeña un papel en la inhibición de la apoptosis y muerte celular a través de su estabilización y la unión a la membrana mitocondrial. Por esto se cree que su actividad pueda estar incrementada, contribuyendo así a la proliferación, la supervivencia celular y el mantenimiento del fenotipo tumoral en el cáncer^{11,13,38,39}.

Tomando en cuenta los antecedentes anteriormente mencionados y considerando que la expresión de estas proteínas no ha sido descrita en pacientes con cáncer escamocelular invasivo de cuello uterino de nuestra población, el propósito del presente trabajo se centró en determinar dicha expresión mediante IHQ y establecer si existe asociación entre la expresión y la respuesta temprana al tratamiento.

Materiales y métodos

Un grupo de 66 pacientes diagnosticadas de cáncer escamocelular invasivo de cuello uterino fue seleccionado de 218 historias clínicas de pacientes que fueron remitidas a la consulta de Ginecología del INC durante los años 2001 al 2007. Las características clínico-patológicas de las pacientes incluidas en este estudio se describen en la [tabla 1](#). Una base de datos fue construida para registrar datos clínicos, histopatológicos y de tratamiento.

Con el fin de confirmar el diagnóstico de carcinoma escamocelular infiltrante de cuello uterino de cada una de las pacientes incluidas, las preparaciones histológicas, coloreadas con hematoxilina y eosina a partir de biopsias incluidas en parafina, fueron leídas por un patólogo oncólogo del INC.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), parámetros como el grado de diferenciación celular, la presencia o la ausencia de queratinización y el tamaño celular fueron tomados como criterios para realizar la respectiva clasificación histológica. Para la queratinización, la presencia de perlas de queratina indicaba queratinización y la ausencia de estas indicaba ausencia de queratinización. Para el tamaño celular, células grandes o células pequeñas representaban un criterio importante que se tuvo en cuenta con el fin de evitar confusión con los carcinomas de célula pequeña (tumores con diferenciación neuroendocrina no incluidos en este estudio).

De cada bloque de parafina correspondiente a cada uno de los casos que se debían estudiar, se hicieron 3 cortes de 3 µm de tejido, colocándolos en láminas cargadas con poli-L-lisina como adherente y secadas a temperatura ambiente durante 12 h para el análisis inmunohistoquímico (IHQ) de CAIX, GLUT-1 y HKII. Como controles positivos de expresión, para la CAIX se empleó tejido de carcinoma renal de célula clara^{40,41},

Tabla 1 Características clínico-patológicas de las pacientes

Características	N.º de pacientes
<i>Edad (promedio)</i>	47 años (26-72)
<i>Estadio FIGO</i>	
IIB	24 (36,4%)
IIIB	42 (63,6%)
<i>Localización del tumor</i>	
Exofítico	48 (72,7%)
Endofítico	8 (12,1%)
Exo/endofítico	10 (15,2%)
<i>Tamaño del tumor^a</i>	
> 4 cm	9 (13,6%)
< 4 cm	57 (86,4%)
<i>Compromiso parametrios</i>	
Unilateral	25 (37,9%)
Bilateral	41 (62,1%)
<i>IK</i>	
70	1 (1,5%)
80	4 (6,1%)
90	16 (24,2%)
100	45 (68,2%)

IK: índice Karnofsky.

^a Tamaño del tumor antes del tratamiento.

carcinoma canalicular infiltrante de seno para GLUT-1⁴² y para HKII un osteosarcoma de alto grado, tipo condroblástico y fibroblástico⁴³; cada control fue seleccionado según la recomendación del inserto para cada anticuerpo. Como controles negativos se emplearon los mismos tejidos de los controles positivos, sustituyendo la incubación del anticuerpo por PBS. Adicionalmente, se evaluó un grupo de 20 casos de tejido no tumoral de cuello uterino procedente de biopsias con diagnóstico histopatológico de cervicitis, sin evidencia de lesión escamosa intraepitelial ni malignidad.

El proceso de IHQ se realizó siguiendo la técnica estandarizada en el laboratorio de Patología del INC, utilizando el kit Dako En vision + Dual Link system-HRP. Los cortes de tejido de 3 µm fueron desparafinados, rehidratados y lavados. La recuperación antigénica se realizó utilizando antígeno retrieval a 10X y pH 9. Para el bloqueo de la peroxidada endógena se colocaron los tejidos en solución de H₂O₂ al 6% durante 7 min y seguidamente fueron lavados con PBS. Posteriormente, se llevó a cabo la incubación durante 45 min a temperatura ambiente con anticuerpos policlonales de conejo, CAIX (H-120: SC-25599, Santa Cruz) en dilución 1:50, que detecta los aminoácidos 41-160 de la proteína humana; GLUT-1 (RB-9052-P, Thermo Scientific), en dilución 1:100, que detecta el epítipo c-terminal de la proteína humana y HKII (ab37593, abcam) en dilución 1:50, que reconoce los aminoácidos 400-500 de la proteína humana.

La valoración de cada marcador o la expresión de cada proteína de estudio fueron realizadas por 2 patólogos oncólogos, para lo cual se tuvo en cuenta la localización de cada proteína a nivel del citoplasma, la membrana celular y/o la mitocondria y el porcentaje de células tumorales que expresaron cada proteína. De acuerdo con los reportes de la literatura, se consideraron las siguientes escalas: CAIX

(citoplasma-membrana), expresión negativa (0%) y expresión positiva: + (1-25%), ++ (26-50%) y +++ (> 50%)^{40,41}; GLUT-1 (citoplasma-membrana), expresión negativa (< 10%) y expresión positiva: + (10-24%), ++ (25-49%), +++ (> 50%)³⁵; HKII (citoplasma-mitocondria) expresión negativa: 0 (0%) y expresión positiva: 1 (1-20%), 2 (21-40%), 3 (41-60%), 4 (61-80%) y 5 (81-100%)^{26,36}.

Para el análisis estadístico descriptivo, las escalas se definieron en 4 categorías: negativa (escala 0% y escala < 10%), débil (escala + y escala 1), moderada (escala ++ y escala 2-3) y fuerte (escala +++ y escala 4-5). Además, se calcularon las medidas de tendencia central y dispersión para variables continuas, y proporciones para variables categóricas.

La respuesta temprana al tratamiento se definió como la respuesta evaluada 3 meses después de haber terminado el tratamiento y fue determinada de acuerdo con los criterios de la OMS así: respuesta completa (RC), cuando hubo una reducción del 100% del volumen tumoral inicial (VTI) y no evidencia clínica ni radiológica de la enfermedad; respuesta parcial (RP), cuando se presentó una reducción del VTI mayor al 50%, y no respuesta, cuando hubo menos del 25% de reducción del VTI o persiste el VTI o hay progresión por incremento en el tamaño del tumor inicial.

Para hacer el análisis estadístico se incluyeron 2 grupos de pacientes: el de pacientes con respuesta (incluyó RC) y el de no respuesta al tratamiento (incluyó la RP y no respuesta).

Para el análisis estadístico se realizó un análisis descriptivo mediante el cual se calcularon las medidas de tendencia central y dispersión para variables continuas y proporciones para variables categóricas. Para determinar qué variables estaban asociadas a la no respuesta al tratamiento, se realizaron análisis bivariados usando la prueba de Mann-Whitney para variables continuas y la prueba de la ji al cuadrado o el test exacto de Fisher si no se cumplía el supuesto de la ji al cuadrado para las variables categóricas. Se tuvieron en cuenta para el análisis las variables clínico-histopatológicas y la expresión de CAIX, GLUT-1 y HKII. Se calcularon OR crudas y ajustadas con sus intervalos de confianza, utilizando un modelo de regresión logística. El modelo fue ajustado usando las variables con resultados significativos en el análisis bivariado y aquellas con plausibilidad biológica (factores de riesgo para no respuesta descritos en la literatura).

Resultados

En la [figura 1](#) se muestran algunos casos representativos de la descripción histológica correspondiente a carcinoma escamocelular infiltrante que nos permiten observar las diferentes características estructurales y morfológicas. Con respecto a la clasificación de lesiones escamocelulares (OMS), se observó que el 87,9% correspondió a lesiones queratinizantes y el 12,1% a lesiones no queratinizantes.

En la [figura 2](#) se observa inmunorreactividad para CAIX, GLUT-1 y HKII de algunos casos representativos de cáncer escamocelular invasivo de cuello uterino en estadios clínicos FIGO IIB o IIIB. Se observó como característica particular de la tinción o expresión de GLUT-1, que regularmente se encuentra localizada junto a los vasos sanguíneos ([fig. 2E](#)).

En el análisis de la distribución de la expresión de las proteínas CAIX, GLUT-1 y HKII se observó una variación en los niveles de expresión; se encontró un incremento en la expresión de GLUT-1 (74%), seguido de CAIX (41%) y HKII (18%). Además, se observó que en el 43,8% de las muestras analizadas el patrón de expresión de GLUT-1 fue débil y negativo, mientras que en el 55,9% fue moderado y fuerte ([fig. 3](#)). La expresión individual o coexpresión de CAIX, GLUT-1 y HKII de los 66 casos analizados se muestra en la [tabla 2](#), donde se observa de manera particular que en ningún caso analizado se presenta inmunorreactividad individual para HKII.

Al estudiar la tendencia de las proteínas CAIX, GLUT-1 y HKII al expresarse individualmente o asociadas entre sí, encontramos que la tendencia de la coexpresión de GLUT-1 y CAIX resultó significativa ($p < 0,002$) en comparación cuando la expresión de GLUT-1 se asocia con HKII.

La mayor frecuencia de expresión con relación a estadios FIGO fue observada para la expresión individual de GLUT-1 (25,8%) en estadios IIB (7,5%) y IIIB (18,1%) en comparación con CAIX (3%), IIB (0%) y IIIB (3%), y HKII (0). También se observó que la coexpresión de GLUT-1 y CAIX fue mayor (28,7%) en estadios IIB (15,1%) y IIIB (13,5%) en comparación con la coexpresión de GLUT-1, CAIX y HKII (9,1%) y de GLUT-1 y HKII (9,1%).

Tomando la frecuencia total de expresión de GLUT-1 de los 66 casos analizados con relación al estadio clínico FIGO, observamos que la diferencia en frecuencia de expresión para IIB (83,3%) y IIIB (66,6%) no fue estadísticamente significativa; sin embargo, observamos que la expresión de GLUT-1 se mantiene del estadio IIB al IIIB.

Con respecto al esquema de tratamiento empleado, las pacientes presentaron un buen estado funcional antes de recibir el respectivo tratamiento, como lo indican los valores del índice Karnofsky ([tabla 1](#)), que oscilaron entre el 70 y el 100%. Todas recibieron el esquema completo de la terapia asignada, 22 (33,3%) de ellas fueron al protocolo de radioterapia exclusiva y 44 (66,7%) al protocolo de radioquimioterapia concomitante.

A todas las pacientes se les administró radioterapia externa (teleterapia) e intracavitaria (braquiterapia). Las dosis mínimas y máximas de teleterapia oscilaron entre 4.320-5.580 cGy y las de braquiterapia entre 2.500-5.040 cGy en puntos A y entre 660-3.500 cGy en puntos B; 55 (83,3%) pacientes recibieron braquiterapia de baja tasa y 11 (16,7%) de alta tasa.

Quienes recibieron quimioterapia fueron tratadas con 6 ciclos de cisplatino, una dosis semanal entre 44 a 70 mg.

En el análisis de la respuesta temprana al tratamiento y la expresión de las proteínas CAIX, GLUT1 y HKII, en general se observó que los niveles de expresión de las 3 proteínas fue mayor en el grupo de respuesta respecto al de no respuesta.

En el grupo de pacientes que respondieron ($n = 53$), se observó que la mayor expresión fue para GLUT-1 (73,6%), seguido de CAIX (43,4%) y HKII (17%).

En el grupo de no respuesta ($n = 13$) también se observó que GLUT-1 presentó mayor expresión (77%) con respecto a CAIX (30,8%) y HKII (23,1%). En este grupo, se hallaron 2 (15,4%) casos que coexpresaron las 3 proteínas, otros 2 (15,4%) que coexpresaron GLUT-1 y CAIX, uno (7,7%) que coexpresó GLUT-1 y HKII, y ninguno con coexpresión de GLUT-1 y HKII.

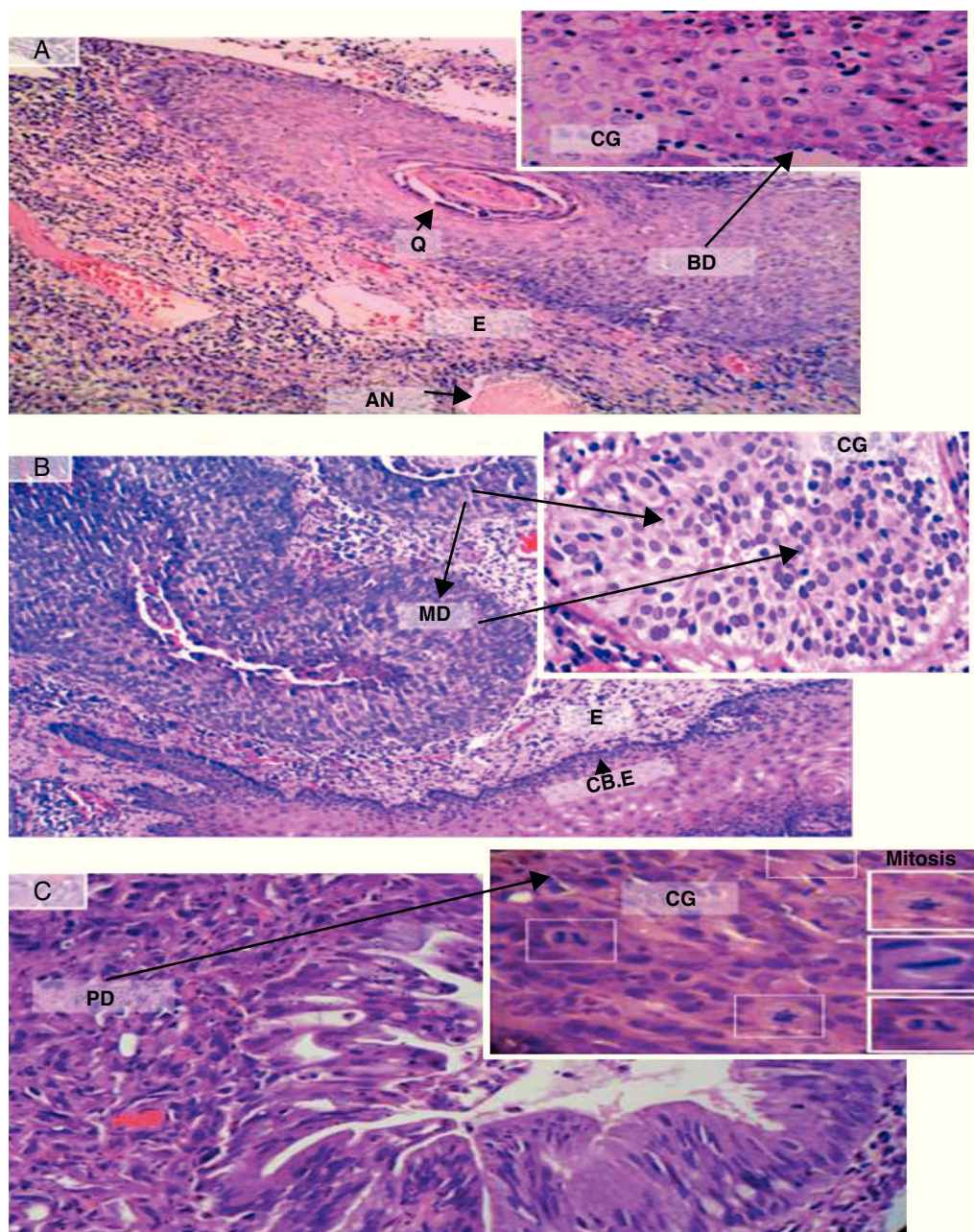


Figura 1 Descripción histológica de carcinoma escamocelular infiltrante.

Casos representativos de carcinoma escamocelular (CE), que muestran las diferentes características estructurales y morfológicas de cada tipo histológico. A) CE bien diferenciado (BD) queratinizante (Q) de célula grande (CG), con áreas necróticas (AN). B) CE moderadamente diferenciado (MD) no queratinizante de célula grande (CG). CBE: células basales del epitelio que limitan con el estroma. C) CE pobremente diferenciado (PD) no queratinizante de célula grande (CG).

E: infiltración epitelial al estroma.

En la [tabla 3](#) se muestran los resultados del análisis de asociación entre las variables clínico-patológicas y la expresión de las proteínas con la respuesta al tratamiento. Al comparar entre los 2 grupos de respuesta, teniendo en cuenta las variables clínico-patológicas y la expresión de CAIX, GLUT-1 y HKII, no se halló ninguna diferencia estadísticamente significativa.

En el análisis de regresión logística entre la expresión de CAIX, GLUT-1 y HKII y la no respuesta al tratamiento, no

se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa; sin embargo, se observó un posible riesgo ($OR = 1,70$) en las pacientes que expresaron GLUT-1. Sobre la base de este resultado, se consideró evaluar si la expresión conjunta de GLUT-1-CAIX, GLUT-1-HKII y GLUT-1-CAIX-HKII aumenta el riesgo de no responder al tratamiento; se observó una tendencia de riesgo de no respuesta cuando se expresan simultáneamente las 3 proteínas ($OR = 1,43$).

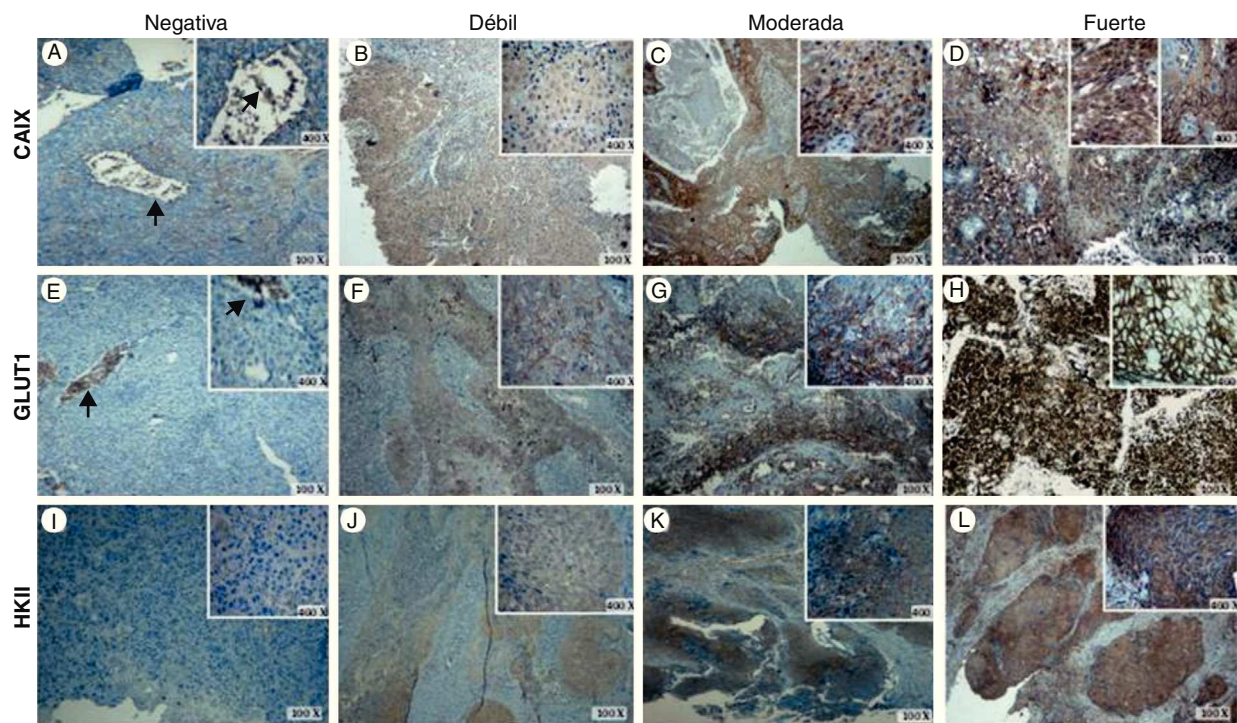
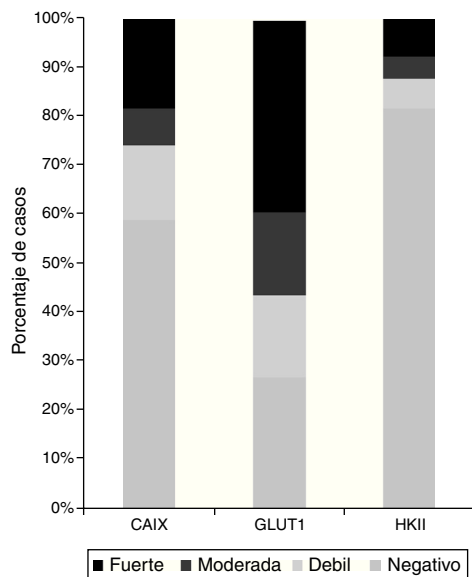


Figura 2 Casos representativos de la expresión de las proteínas CAIX, GLUT-1 y HKII por IHQ, en carcinoma escamocelular invasivo de cuello uterino. Para cada proteína se muestran los niveles de expresión negativa (–), débil (+), moderada (++) y fuerte (+++). Las fotografías A, B, C, E, F, G, I y J corresponden a casos en estadios FIGO IIIB y las fotografías D, H y L son casos en estadio IIB. Las flechas indican inmunorreactividad para CAIX (2A) y GLUT-1 (2E) en eritrocitos de casos negativos.



Marcador	CAIX	GLUT 1	HKII
Expresión	n (%)	n (%)	n (%)
Negativa	39 (59)	18 (27.2)	54 (81.8)
Positiva			
Débil	10 (15)	11 (16.7)	4 (6.1)
Moderada	5 (8)	11 (16.7)	3 (4.5)
Fuerte	12 (18)	26 (39.3)	5 (7.6)

Figura 3 Distribución de la expresión de las proteínas CAIX, GLUT-1 y HKII.

Discusión

La detección molecular de proteínas endógenas como CAIX, GLUT-1 y HKII fue posible a través del uso de una de las técnicas de fácil acceso y aplicabilidad como la IHQ, para la cual se estandarizaron condiciones específicas y se utilizaron muestras de rutina clínica como son los tejidos embebidos en parafina^{38,39}. En este trabajo se describen y cuantifican por primera vez los patrones de expresión de marcadores relacionados con la hipoxia y la glucólisis, como la CAIX, el GLUT-1 y la HKII, en carcinomas escamocelulares invasivos de cuello uterino de población colombiana.

El modelo propuesto para el desarrollo de cáncer de cuello uterino plantea la participación de fenotipos como el hipóxico, el glucolítico y de acidosis^{8,11,44-46}, los cuales están

Tabla 2 Expresión simultánea de GLUT-1, CAIX y HKII

Expresión	Proteína(s)	Total casos (%)
Positiva	GLUT-1, CAIX, HKII	5 (7,5)
	GLUT-1, CAIX	20 (30,3)
	GLUT-1, HKII	6 (9,1)
	CAIX, HKII	1 (1,5)
	GLUT-1	17 (25,8)
	CAIX	1 (1,5)
	HKII	0 (0,0)
Negativa		16 (24,2)
Total casos		66 (100)

Tabla 3 Asociación entre las variables clínico-patológicas y la expresión de las proteínas con la respuesta al tratamiento

Variables	Respuesta		
	Sí (n = 53)	No (n = 13)	Valor p
<i>Edad, media</i>	46	47	
DE	11 (26 ± 72)	13 (27 ± 65)	0,82 ^a
<i>Tamaño tumor, media</i>	6	7	
DE	2 (3 ± 10)	2 (3 ± 12)	0,1618 ^a
<i>Estadio FIGO (%)</i>			
IIB	21 (39,6)	3 (23,1)	0,345 ^b
IIIB	32 (60,4)	10 (76,9)	
<i>Tipo célula</i>			
Grande	53 (100,0)	13 (100,0)	—
Pequeña	0 (0,0)	0 (0,0)	
<i>Queratinización (%)</i>			
Presente	6 (11,3)	2 (15,4)	0,651 ^b
Ausente	47 (88,7)	11 (84,6)	
<i>Compromiso parametrios (%)</i>			
Unilateral	21 (39,6)	4 (30,8)	0,752 ^b
Bilateral	32 (60,4)	9 (69,2)	
<i>Índice de Karnosky</i>			
70%	1 (1,9)	0 (0,0)	0,17 ^c
80%	2 (3,8)	2 (15,4)	
90%	11 (20,8)	5 (38,5)	
100%	39 (73,6)	6 (46,2)	
<i>Tipo de tratamiento (%)</i>			
Radioterapia	16 (30,2)	6 (46,2)	0,331 ^b
Radioterapia + quimioterapia	37 (69,8)	7 (53,8)	
<i>Tipo tasa braquiterapia</i>			
Baja	45 (84,9)	10 (76,9)	0,79 ^b
Alta	8 (15,1)	3 (23,1)	
<i>Tipo expresión</i>			
Negativo	13 (24,52)	3 (23,07)	0,535 ^c
GLUT-1	12 (22,64)	5 (38,46)	
GLUT-1 y HKII	5 (9,43)	1 (7,7)	
GLUT1 y CAIX	19 (35,84)	2 (15,38)	
GLUT-1, HKII y CAIX	4 (7,54)	2 (15,38)	

p < 0,05 (significación).

^a Test Mann-Whitney.^b Test exacto Fisher.^c Test de Pearson de la chi al cuadrado.

implicados en resistencia al tratamiento, como la radioterapia, quimioterapia y/o radioquimioterapia concomitante, y se asocian con inestabilidad genética, que puede reflejarse en el incremento de la expresión de ciertas proteínas, entre las que están CAIX, GLUT-1 y HKII, consideradas como posibles marcadores pronósticos de progresión de la enfermedad, metástasis y supervivencia^{10,13,14,46}. Diferentes estudios han demostrado que la expresión de CAIX, GLUT-1 y HKII evaluada por IHQ se encuentra incrementada en tejidos tumorales de cáncer escamocelular invasivo de cuello uterino, señalando que el incremento en la expresión de CAIX puede oscilar entre el 21,1 y el 99% de los casos analizados^{30,31,38,47-49}. A su vez, el incremento en la expresión de GLUT-1 puede darse entre un 7 y un 94,1% de los casos^{27,37,44,50}. Los únicos reportes recientes sobre niveles

de expresión de HKII en cáncer escamocelular invasivo de cuello uterino, como el de Guo-Qing et al.⁵¹, en un estudio de casos y controles en pacientes con carcinoma cervical severo, encuentran un 69,2% de expresión. En otros tipos de cáncer, como el carcinoma de pulmón (98%), el carcinoma oral (58%), de tiroides (16%), el carcinoma de seno (76%) y el colangiocarcinoma (81%), se ha reportado que su expresión es variable^{26,39,42,52,53}. El incremento observado de la expresión de GLUT-1, CAIX y HKII en nuestro estudio, que se ubica dentro de los porcentajes de los estudios reportados, confirma el papel relevante de estas proteínas en el desarrollo y la invasión del cáncer escamocelular invasivo de cuello uterino.

Warburg⁵⁴, en 1931, demostró un incremento tanto de la tasa glucolítica como de la expresión de proteínas membranales transportadoras de glucosa (GLUT-1, GLUT-7) y su

asociación a un aumento del metabolismo en células neoplásicas. Además, el incremento en la expresión de GLUT-1 se ha visto correlacionado con el aumento de valores en fracciones hipóxicas, como lo han demostrado Airley et al.⁵, razón por la que se le considera esta proteína como un marcador endógeno de hipoxia. Sobre la base de los resultados reportados en la literatura, y comparándolos con las frecuencias de expresión halladas en el presente estudio para GLUT-1, podríamos pensar que aproximadamente el 44% de los casos analizados serían hipóxicos y el 56% de estos se encontrarían en un ambiente de normoxia.

Aunque el grado de expresión de estas moléculas en la totalidad de las secciones tumorales no se correlaciona cuantitativamente con el estado de oxigenación, como se muestra en número de publicaciones^{4-6,55}, su intensidad en expresión microrregional aumenta con la ampliación de distancia de los vasos sanguíneos. Sin embargo, la expresión de GLUT-1 también se encuentra regularmente adyacente a los vasos sanguíneos, siendo este fenómeno atribuido tanto a la actividad de HIF-1 independiente de oxígeno y a la hipoxia transitoria (aguda) debido a la oclusión transitoria de los vasos sanguíneos^{38,55}. Esta localización adyacente a los vasos sanguíneos de la expresión de GLUT-1 fue una característica particular en la mayoría de los casos analizados en el presente estudio. Recientemente, Mayer et al. han reportado que gracias a la valoración morfológica de la microarquitectura del cáncer de cuello uterino y a los resultados de la identificación mediante IHQ de áreas hipóxicas mediante el uso de anticuerpos contra GLUT-1 se puede llegar a tener claro cómo los mecanismos de hipoxia conducen a fenómenos invasivos⁵⁵. Mayer et al. han identificado un elemento novedoso de invasión en cáncer que consiste de un estroma rico en vasos sanguíneos, infiltrante y que migra activamente, el cual parece dar forma a las masas de células tumorales y, al hacerlo, influye decisivamente en la arquitectura histológica del tumor⁵⁵.

Además de la hipoxia, tal como sucede en otros tipos de cáncer, el incremento en la expresión de GLUT-1 también depende del aumento de la glucólisis^{29,34,38,56-58}, proceso que implica una alta tasa de captación de glucosa con un gasto energético elevado. En nuestro caso, observamos que solo en el 27,2% de los casos la expresión de GLUT-1 fue negativa y en el 72,7% fue positiva, lo que demostraría la necesidad del requerimiento energético en tumores de cáncer escamocelular invasivo de cuello uterino.

Estas diferencias en los niveles de expresión de GLUT-1 posiblemente se deban a: heterogeneidad intratumoral, evento que puede dificultar la evaluación de marcadores moleculares⁵⁷, y extensión e intensidad de coloración de marcadores endógenos, las cuales quizá dependan de la técnica utilizada⁴¹. Nosotros también hallamos que la expresión de GLUT-1 estuvo limitada a partes específicas del epitelio normal, de la zona de transformación y porciones del endocervix, patrón de tinción también observado con CAIX y HKII.

Con respecto a la distribución de la expresión de GLUT-1 y su relación con el estadio clínico FIGO IIB o IIIB, aunque no se halló una diferencia estadísticamente significativa, se observa que la expresión de GLUT-1 se mantiene del estadio IB al IIIB, condición que estaría favoreciendo el mantenimiento del fenotipo tumoral, la invasión y la metástasis.

Estudios clínicos han validado la expresión de CAIX al igual que GLUT-1 como marcadores endógenos de hipoxia en carcinoma avanzado de cuello uterino mediante IHQ^{38,49}, al encontrarse una expresión colocalizada con el marcador endógeno hipóxico pimonidazole⁵.

De los resultados hallados en este estudio para la expresión de CAIX y su relación con la hipoxia tumoral, y habiendo hallado que en el 59,1% de los casos la expresión fue negativa y en un 40,9% fue positiva, sin haber medido directamente hipoxia, podríamos mencionar que la ausencia de expresión estaría relacionada con la presencia de hipoxia aguda, condición no suficiente para inducir a CAIX. Respecto a esta relación entre la expresión de CAIX y la hipoxia, Mayer et al.⁵⁹ toman como referencia los estudios de Lancaster et al.³⁸ y Hedley et al.⁵⁷ para proponer 2 fundamentos: el primero hace referencia a que la ausencia de hipoxia no puede predecirse a partir de la carencia de la expresión de CAIX, mientras que el segundo considera que la expresión fuerte de CAIX se identifica en tumores que exhiben hipoxia comparada con tumores normóxicos, donde estos últimos carecen de la expresión de esta proteína. Adicionalmente, Lancaster et al. muestran otros hallazgos sobre la relación potencial entre hipoxia y el fenotipo de acidosis³⁸. En hipoxia el nivel de pH extracelular disminuye conllevando a acidosis, condición que se ha visto contrarrestada por la acción de CAIX. Otros reportes señalan que el proceso de acidosis extracelular también es inducido vía incremento de la glucólisis, condición dada en nuestro estudio por el incremento de expresión de GLUT-1 en el 74% de los casos analizados, lo que significa que en esta condición se eleva la expresión de CAIX. Tomando en cuenta los antecedentes mencionados y los resultados que hallamos para la expresión de CAIX, podríamos suponer que aproximadamente el 75% de los casos analizados en este estudio serían normóxicos y el 25%, hipóxicos.

Varios estudios muestran que los factores reguladores de GLUT-1 son los mismos que regulan la expresión de HKII; entre ellos están: el incremento de glucólisis, la hipoxia, el estrés, la transformación y la carcinogénesis³⁶. Por tal razón, se ha considerado que existe una relación entre el incremento de GLUT-1 y el aumento de HKII, donde esta enzima, a su vez, contribuye a la retención de glucosa, ayudando así a la obtención del requerimiento energético que favorece el rápido crecimiento de las células tumorales⁵³.

En nuestro estudio, en el 74% de los casos se encontró un incremento en la expresión de GLUT-1; sin embargo, no encontramos correspondencia con la expresión de HKII (18,1%). Estos datos discrepan de los hallazgos descritos en la literatura^{26,51,53}. Esta diferencia podría ser explicada si se tiene en cuenta que la expresión de HKII es específica del tejido tumoral, la presencia de heterogeneidad intratumoral, el tipo de anticuerpo, las condiciones de IHQ utilizadas y las técnicas de detección empleadas distintas de la IHQ⁶⁰.

Existen distintos reportes sobre la expresión de CAIX, GLUT-1 y HKII con relación a los resultados del tratamiento en el cáncer cervical localmente avanzado, en los que se relaciona la supervivencia; sin embargo, con respecto a la respuesta temprana, aún no se conocen reportes. En este estudio se observó una tendencia de riesgo de no respuesta cuando se expresan simultáneamente estas 3 proteínas, a pesar de que el patrón de expresión de estas proteínas fue variable. Estos resultados permiten confirmar que ocurren cambios en los niveles de expresión de estas proteínas a nivel

intratumoral previos al tratamiento, como lo representa GLUT-1, que pueden influir frente a una respuesta completa; sin embargo, se debe tener en cuenta que no es un requerimiento absoluto, sino que sucede como efecto aditivo de otros mecanismos biológicos, que desempeñan un papel importante frente al resultado del tratamiento.

En conclusión, el incremento en la expresión de GLUT-1 respecto a CAIX y HKII reafirma el concepto de que los carcinomas tienen un alto consumo de glucosa y su coexpresión con CAIX y HKII como factores biológicos preexistentes puede contribuir a esclarecer los mecanismos de hipoxia en la invasión tumoral, así como su posible efecto frente a tratamientos como la radioterapia exclusiva y la radioquimioterapia concomitante para el manejo de cáncer de cuello uterino en estadios II B y III B.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Financiación

Este trabajo recibió apoyo financiero del Instituto Nacional de Cancerología-Recursos Inversión Nación-, a través del proyecto «expresión de IGF-IR, GAPDH, HIF-1 α , Survivina, ERCC1, GLUT1 y polimorfismo ARG72PRO de P53 como biomarcadores de respuesta a tratamiento en pacientes con cáncer escamocelular invasivo de cuello uterino» (código C41030610026).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Betancourt D, Rada CV. El cáncer. Aspectos básicos sobre su biología, clínica, prevención, diagnóstico y tratamiento. Ministerio de la Protección Social. Instituto Nacional de Cancerología ESE. 2002.
- Betancourt DP, Rada CV. Anuario estadístico. «Por el control del cáncer». Ministerio de la Protección Social Instituto Nacional de Cancerología ESE. 2007.
- Cendales R. Radioterapia comparada con radioterapia más quimioterapia en el tratamiento del cáncer de cuello uterino en estadio III B. *Rev Colomb Cancerol*. 2006;10:109–16.
- Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature*. 2006;441:437–43.
- Airley RE, Lancaster J, Raleigh JA, Harris AL, Davidson SE, Hunter RD, et al. GLUT-1 and CAIX as intrinsic markers of hypoxia in carcinoma of the cervix: relationship to pimonidazole binding. *Int J Cancer*. 2003;104:85–91.
- Bachtiary B, Schindl M, Potter R, Dreier B, Knocke TH, Hainfellner JA, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α indicates diminished response to radiotherapy and unfavorable prognosis in patients receiving radical radiotherapy for cervical cancer. *Clin Cancer Res*. 2003;9:2234–40.
- Birner P, Schindl M, Obermair A, Plank C, Breitenacker G, Oberhuber G. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. *Cancer Res*. 2000;60:4693–6.
- Gatenby RA, Gillies RJ. Glycolysis in cancer: a potential target for therapy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39:1358–66.
- Moreno-Acosta P, Gamboa O, Sanchez de Gomez M, Cendales R, Diaz GD, Romero A, et al. IGF1R gene expression as a predictive marker of response to ionizing radiation for patients with locally advanced HPV16-positive cervical cancer. *Anticancer Res*. 2012;32:4319–25.
- Xue F, Lin LL, Dehdashti F, Miller TR, Siegel BA, Grigsby PW. F-18 fluorodeoxyglucose uptake in primary cervical cancer as an indicator of prognosis after radiation therapy. *Gynecol Oncol*. 2006;101:147–51.
- DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab*. 2008;7:11–20.
- Hatzivassiliou G, Andreadis C, Thompson CB. Akt-directed metabolic alterations in cancer. *Drug Discovery Today Disease Mechanisms*. 2005;2:255–62.
- Lee WY, Huang SC, Hsu KF, Tzeng CC, Shen WL. Roles for hypoxia-regulated genes during cervical carcinogenesis: somatic evolution during the hypoxia-glycolysis-acidosis sequence. *Gynecol Oncol*. 2008;108:377–84.
- Waggoner SE. Cervical cancer. *Lancet*. 2003;361:2217–25.
- IARC Working Group. Human papillomaviruses. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 64. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 1995.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999;189:12–9.
- Haugland HK, Vukovic V, Pintilie M, Fyles AW, Milosevic M, Hill RP, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α in cervical carcinomas: correlation with tumor oxygenation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2002;53:854–61.
- Hutchison GJ, Valentine HR, Lancaster JA, Davidson SE, Hunter RD, Roberts SA, et al. Hypoxia-inducible factor 1 α expression as an intrinsic marker of hypoxia: correlation with tumor oxygen, pimonidazole measurements, and outcome in locally advanced carcinoma of the cervix. *Clin Cancer Res*. 2004;10:8405–12.
- Mayer A, Wree A, Hockel M, Leo C, Pilch H, Vaupel P. Lack of correlation between expression of HIF-1 α protein and oxygenation status in identical tissue areas of squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Cancer Res*. 2004;64:5876–81.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005;55:74–108.
- Vaupel P, Harrison L. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *Oncologist*. 2004;9 Suppl 5:4–9.
- Dayan F, Roux D, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J, Mazure NM. The oxygen sensor factor-inhibiting hypoxia-inducible factor-1 controls expression of distinct genes through the bifunctional transcriptional character of hypoxia-inducible factor-1 α . *Cancer Res*. 2006;66:3688–98.
- Gatenby RA, Gillies RJ. A microenvironmental model of carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:56–61.
- Brahimi-Horn C, Pouyssegur J. The role of the hypoxia-inducible factor in tumor metabolism growth and invasion. *Bull Cancer*. 2006;93:E73–80.

25. Joost HG, Thorens B. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members [review]. *Mol Membr Biol.* 2001;18:247–56.
26. Mamede M, Higashi T, Kitaichi M, Ishizu K, Ishimori T, Nakamoto Y, et al. [18F]FDG uptake and PCNA, Glut-1, and hexokinase-II expressions in cancers and inflammatory lesions of the lung. *Neoplasia.* 2005;7:369–79.
27. Mendez LE, Mancini N, Cantuaria G, Gomez-Marin O, Penalver M, Braunschweiger P, et al. Expression of glucose transporter-1 in cervical cancer and its precursors. *Gynecol Oncol.* 2002;86:138–43.
28. Pessin JE, Bell GI. Mammalian facilitative glucose transporter family: structure and molecular regulation. *Annu Rev Physiol.* 1992;54:911–30.
29. Lal A, Peters H, St CB, Haroon ZA, Dewhirst MW, Strausberg RL, et al. Transcriptional response to hypoxia in human tumors. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93:1337–43.
30. Mayer A, Hockel M, Vaupel P. Endogenous hypoxia markers: case not proven! *Adv Exp Med Biol.* 2008;614:127–36.
31. Vordermark D, Kaffer A, Riedl S, Katzer A, Flentje M. Characterization of carbonic anhydrase IX (CA IX) as an endogenous marker of chronic hypoxia in live human tumor cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005;61:1197–207.
32. Rafajova M, Zatovicova M, Kettmann R, Pastorek J, Pastorekova S. Induction by hypoxia combined with low glucose or low bicarbonate and high posttranslational stability upon reoxygenation contribute to carbonic anhydrase IX expression in cancer cells. *Int J Oncol.* 2004;24:995–1004.
33. Pastorek J, Pastorekova S, Callebaut I, Mornon JP, Zelnik V, Opavsky R, et al. Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix-loop-helix DNA binding segment. *Oncogene.* 1994;9:2877–88.
34. Yen TC, See LC, Lai CH, Yah-Huei CW, Ng KK, Ma SY, et al. 18F-FDG uptake in squamous cell carcinoma of the cervix is correlated with glucose transporter 1 expression. *J Nucl Med.* 2004;45:22–9.
35. Mayer A, Hockel M, Wree A, Vaupel P. Microregional expression of glucose transporter-1 and oxygenation status: lack of correlation in locally advanced cervical cancers. *Clin Cancer Res.* 2005;11:2768–73.
36. Lyschik A, Higashi T, Hara T, Nakamoto Y, Fujimoto K, Doi R, et al. Expression of glucose transporter-1, hexokinase-II, proliferating cell nuclear antigen and survival of patients with pancreatic cancer. *Cancer Invest.* 2007;25:154–62.
37. Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL. Hexokinase II: cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene.* 2006;25:4777–86.
38. Lancaster JA, Harris AL, Davidson SE, Logue JP, Hunter RD, Wycoff CC, et al. Carbonic anhydrase (CA IX) expression, a potential new intrinsic marker of hypoxia: correlations with tumor oxygen measurements and prognosis in locally advanced carcinoma of the cervix. *Cancer Res.* 2001;61:6394–9.
39. Tian M, Zhang H, Higuchi T, Oriuchi N, Nakasone Y, Takata K, et al. Hexokinase-II expression in untreated oral squamous cell carcinoma: comparison with FDG PET imaging. *Ann Nucl Med.* 2005;19:335–8.
40. Al-Ahmadie HA, Alden D, Qin LX, Olgac S, Fine SW, Gopalan A, et al. Carbonic anhydrase IX expression in clear cell renal cell carcinoma: an immunohistochemical study comparing 2 antibodies. *Am J Surg Pathol.* 2008;32:377.
41. Kirkpatrick JP, Rabbani ZN, Bentley RC, Hardee ME, Karol S, Meyer J, et al. Elevated CAIX expression is associated with an increased risk of distant failure in early-stage cervical cancer. *Biomark Insights.* 2008;3:45–55.
42. Brown RS, Goodman TM, Zasadny KR, Greenson JK, Wahl RL. Expression of hexokinase II and Glut-1 in untreated human breast cancer. *Nucl Med Biol.* 2002;29:443–53.
43. Hamada K, Tomita Y, Qiu Y, Tomoeda M, Ueda T, Tamai N, et al. (18)F-FDG PET analysis of schwannoma: increase of SUVmax in the delayed scan is correlated with elevated VEGF/VPF expression in the tumors. *Skeletal Radiol.* 2009;38:261–6.
44. Lamkin DM, Spitz DR, Shahzad MM, Zimmerman B, Lenihan DJ, Degeest K, et al. Glucose as a prognostic factor in ovarian carcinoma. *Cancer.* 2009;115:1021–7.
45. Robert ME, Fu YS. Squamous cell carcinoma of the uterine cervix—a review with emphasis on prognostic factors and unusual variants. *Semin Diagn Pathol.* 1990;7:173–89.
46. Fan Y, Zong WX. Hacking hexokinase halts tumor growth. *Cancer Biol Ther.* 2008;7:1136–8.
47. Ivanov SV, Kuzmin I, Wei MH, Pack S, Geil L, Johnson BE, et al. Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von Hippel-Lindau transgenes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:12596–601.
48. Kaluz S, Kaluzova M, Chrastina A, Olive PL, Pastorekova S, Pastorek J, et al. Lowered oxygen tension induces expression of the hypoxia marker MN/carbonic anhydrase IX in the absence of hypoxia-inducible factor 1 alpha stabilization: a role for phosphatidylinositol 3'-kinase. *Cancer Res.* 2002;62:4469–77.
49. Liao SY, Darcy KM, Randall LM, Tian C, Monk BJ, Burger RA, et al. Prognostic relevance of carbonic anhydrase-IX in high-risk, early-stage cervical cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol.* 2010;116:452–8.
50. Ito S, Fukusato T, Nemoto T, Sekihara H, Seyama Y, Kubota S. Coexpression of glucose transporter 1 and matrix metalloproteinase-2 in human cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94:1080–91.
51. Guo-Qing P, Yuan Y, Cai-Gao Z, Hongling Y, Gonghua H, Yan T. A study of association between expression of hOGG1, VDAC1, HK-2 and cervical carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2010;29:129.
52. Hoof L, van der Veldt AA, van Diest PJ, Hoekstra OS, Berkhof J, Teule GJ, et al. [18F]fluorodeoxyglucose uptake in recurrent thyroid cancer is related to hexokinase I expression in the primary tumor. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:328–34.
53. Paudyal B, Oriuchi N, Paudyal P, Tushima Y, Higuchi T, Miyakubo M, et al. Clinicopathological presentation of varying 18F-FDG uptake and expression of glucose transporter 1 and hexokinase II in cases of hepatocellular carcinoma and cholangiocellular carcinoma. *Ann Nucl Med.* 2008;22:83–6.
54. Warburg O. The metabolism of tumors. New York: RS Smith Editors; 1931.
55. Mayer A, Höckel M, Horn LC, Schmidberger H, Vaupel P. GLUT-1 staining of squamous cell carcinomas of the uterine cervix identifies a novel. Element of invasion. *Int J Oncol.* 2011;38:145–50.
56. Amann T, Hellerbrand C. GLUT1 as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *Expert Opin Ther Targets.* 2009;13:1411–27.
57. Hedley D, Pintilie M, Woo J, Morrison A, Birle D, Fyles A, et al. Carbonic anhydrase IX expression, hypoxia, and prognosis in patients with uterine cervical carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2003;9:5666–74.
58. Rudlowski C, Becker AJ, Schroder W, Rath W, Buttner R, Moser M. GLUT1 messenger RNA and protein induction relates to the malignant transformation of cervical cancer. *Am J Clin Pathol.* 2003;120:691–8.
59. Mayer A, Hockel M, Vaupel P. Carbonic anhydrase IX expression and tumor oxygenation status do not correlate at the microregional level in locally advanced cancers of the uterine cervix. *Clin Cancer Res.* 2005;11:7220–5.
60. Marshall MJ, Neal FE, Goldberg DM. Isoenzymes of hexokinase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, phosphoglucomutase and lactate dehydrogenase in uterine cancer. *Br J Cancer.* 1979;40:380–90.