

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

FACULTAT DE MEDICINA

Departament de Cirurgia

Unitat Docent de l'Hospital de Sant Pau

Año 2015

**LA EXPRESIÓN DEL EJE CXCL12/CXCR4
COMO PREDICTOR DE LA RESPUESTA A
NIVEL REGIONAL
EN PACIENTES CON CARCINOMAS
ESCAMOSOS
DE CABEZA Y CUELLO**

Tesis presentada por Santiago Diez Tejerina

y dirigida por los Doctores:

X.León Vintró, M.Camacho Pérez de Madrid y J.García Lorenzo

para optar al grado de Doctor

**A Pradi, Pablo, Lucía y Tichu
a mis padres y a Paquita
por moldearme como soy**

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis: Xavier, Mercedes y Jacinto, por su inestimable ayuda, apoyo y orientación en el desarrollo de esta tesis. Sobre todo a Xavi por su brillante lucidez en la génesis de esta tesis y por su incansable trabajo de corrección. Muchas gracias a los tres, tengo una deuda impagable con todos vosotros.

Al departamento de ORL del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, en especial a su director, Prof. Dr. M. Quer i Agustí, por saber contagiar a todos los que nos hemos formado en nuestra especialidad junto a él, la necesidad del estudio, el trabajo diario y el esfuerzo personal como parte de la atención que debemos dispensar a nuestros pacientes, sobre todo a los que padecen enfermedades oncológicas.

También quiero agradecer a todos sus facultativos, residentes, enfermeras y personal administrativo de ORL, por poner a mi disposición de forma desinteresada, no sólo sus dependencias sino también sus consejos y ánimos que he recibido siempre de todos ellos, haciéndome sentir como en casa durante la realización de esta tesis.

A mis compañeros y colegas del Hospital Esperit Sant: Núria, Cristina y Zenaida. Por aguantarme en estos últimos meses tan duros. Ze, gracias por la ayuda en la búsqueda de la bibliografía.

Agradezco también a todos los pacientes del Hospital de Sant Pau y del Hospital Esperit Sant en Santa Coloma de Gramenet, no sólo a los que hayan podido ser objeto de análisis en esta tesis, sino a todos los que al haberlos tratado, me han enseñado la importancia del conocimiento como el principal recurso para poder ofrecer un tratamiento adecuado, ajustado y digno.

A la Dra. M^a del Prado Venegas Pizarro, por todo el tiempo que le he robado.

Finalmente, a todas las personas que me han ayudado en la realización de esta tesis y que, por olvido involuntario u omisión, no han sido reconocidos.

**LA EXPRESIÓN DEL EJE CXCL12/CXCR4 COMO
PREDICTOR DE LA RESPUESTA A NIVEL
REGIONAL
EN PACIENTES CON CARCINOMAS
ESCAMOSOS
DE CABEZA Y CUELLO**

Índice

	<i>Página</i>
Índice	1
 1.- Introducción	 5
▪ 1.1.- Desarrollo de metástasis ganglionares en pacientes con CECC.	7
▪ 1.2.- Mecanismos asociados a la persistencia o recidiva tumoral tratados con radioterapia o quimioterapia.	12
✓ 1.2.1.- Resistencia a la radioterapia.	13
✓ 1.2.2.- Resistencia a la quimioterapia.	17
I.- <i>Resistencia al cisplatino</i>	
II.- <i>Resistencia a los taxanos.</i>	
✓ 1.2.3.- Resistencia a los inhibidores del EGFR.	18
▪ 1.3.- Mecanismos asociados a la recidiva ganglionar.	20
✓ 1.3.1.- Papel del eje CXCL12/CXCR4 en los tumores.	22
✓ 1.3.2.- Expresión de CXCL12/CXCR4 en los pacientes con CECC.	29
✓ 1.3.3.- Relación entre la expresión de CXCL12/CXCR4 y la afectación regional.	31
✓ 1.3.4.- Modificaciones a nivel celular inducidas por el eje CXCL12/CXCR4.	34
✓ 1.3.5.- Significado clínico de la expresión del eje CXCL12/CXCR4.	39

2.- Justificación e Hipótesis	44
▪ 2.1.- Justificación.	
▪ 2.2.- Hipótesis.	
3.- Objetivos	46
4.- Material y Métodos	48
▪ 4.1.- Pacientes.	49
▪ 4.2.- Muestras biológicas.	54
▪ 4.3.- Estadística.	55
5.- Resultados	56
▪ 5.1.- Expresión de CXCL12/CXCR4 en el tumor.	57
▪ 5.2.- Expresión de CXCL12/CXCR4 en metástasis ganglionares.	60
▪ 5.3.- Estudio de la supervivencia libre de recidiva regional.	64
▪ 5.4.- Estudio de la supervivencia libre de metástasis a distancia.	69
▪ 5.5.- Relación entre los niveles de expresión del eje CXCL12/ CXCR4 genes implicados en procesos de diseminación.	71

	<i>Página</i>
5.- Discusión	78
6.- Conclusiones	100
7.- Bibliografía	102

1.- Introducción

El asegurar el control loco-regional de la enfermedad es un elemento de la máxima importancia en el manejo de los pacientes con carcinomas escamosos de cabeza y cuello (CECC). El fracaso en la consecución de este objetivo comporta la persistencia o la recidiva de la enfermedad. De forma adicional, los pacientes pueden presentar la aparición de metástasis a distancia, bien como consecuencia de la diseminación del tumor primario de forma previa al diagnóstico de la enfermedad, o como resultado de la persistencia de la enfermedad a nivel loco-regional una vez efectuado el tratamiento. Ambos escenarios, la persistencia de enfermedad loco-regional o la aparición de metástasis a distancia, representan un gran desafío terapéutico.

Existen ocasiones donde son posibles tratamientos de rescate, pero la rentabilidad oncológica de tales tratamientos suele ser escasa e implica con frecuencia la realización de procedimientos notablemente agresivos que comportan una gran morbilidad y deterioro en la calidad de vida de estos pacientes¹.

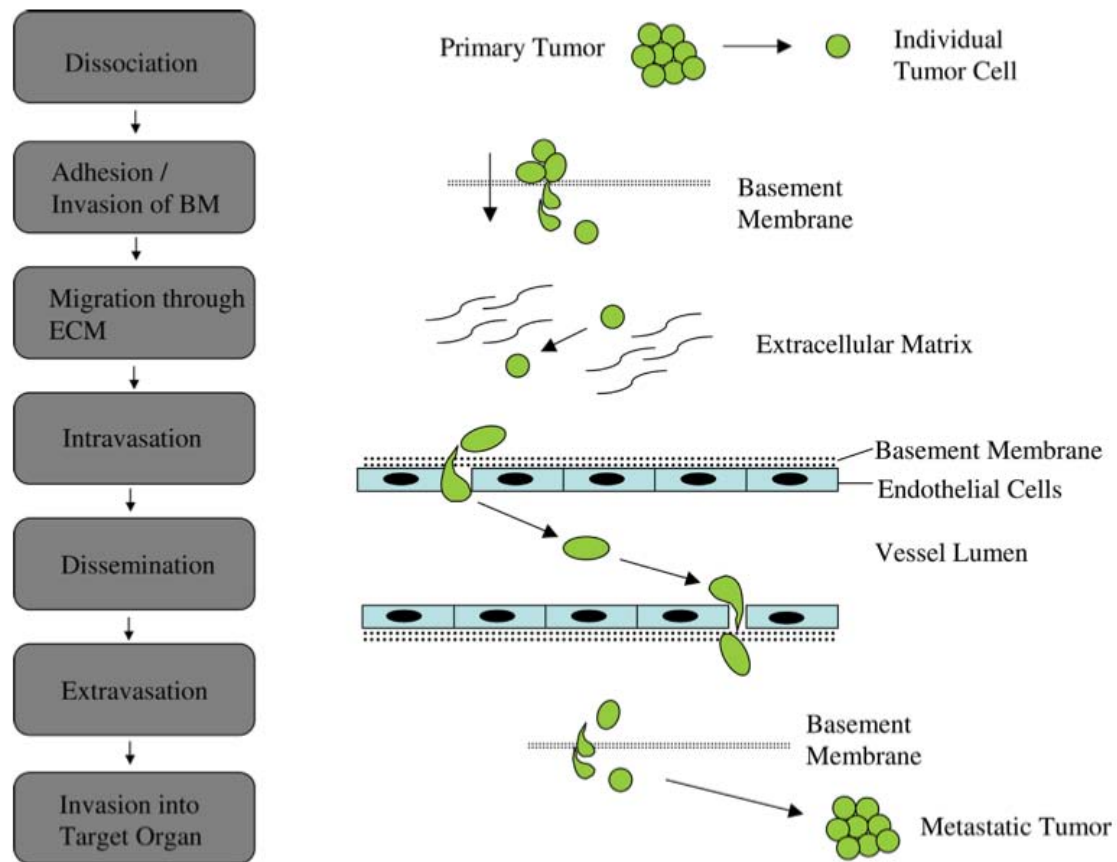
Hasta fechas muy recientes era muy limitado el conocimiento de los factores que contribuyen a la persistencia, recidiva y/o diseminación metastásica de la enfermedad. El conocimiento de los mecanismos biológicos implicados en el desarrollo de los procesos tumorales, nos podría permitir dilucidar los factores implicados en la resistencia a los tratamientos y rediseñar estrategias terapéuticas con la finalidad de impedir el proceso de recidiva.

1.1.- Desarrollo de metástasis ganglionares en los pacientes con carcinomas escamosos de cabeza y cuello

La diseminación metastásica de un tumor no se deriva del simple drenaje pasivo de las células tumorales hacia el torrente linfático o vascular, si no que implica un proceso dinámico y activo, dependiente de la biología tumoral y basado en interacciones entre las células neoplásicas y las células de los tejidos del huésped^{2,3,4}.

En el desarrollo de la metástasis se ponen en marcha una serie de pasos secuenciales que empezando por la separación de las células tumorales del tumor primario, seguido de la migración de las mismas a través de la matriz extracelular (**MEC**) y la membrana basal, el paso a los vasos linfáticos y sanguíneos, su supervivencia en la circulación regional o sistémica y finalmente la extravasación e implantación en ganglios regionales o en órganos parenquimatosos a distancia^{2,3}. Sólo una proporción de células tumorales con propiedades invasivas consigue sobrevivir hasta llegar a un órgano a distancia.

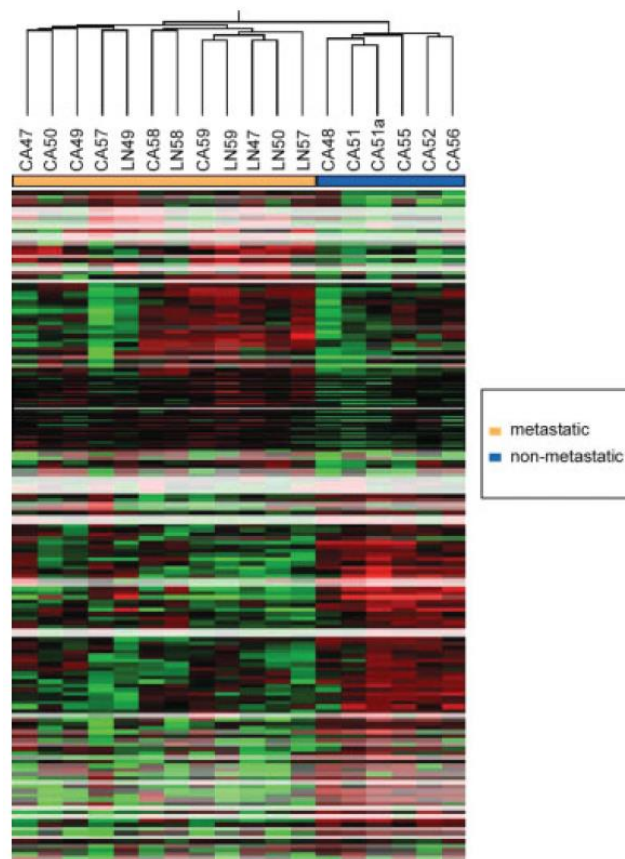
Para pasar todas las etapas mencionadas, se requieren adaptaciones moleculares selectivas que involucran la adhesión, proteólisis, angiogénesis y resistencia a la apoptosis⁵.



No todas las células de un tumor tienen capacidad de metastatizar. Las que cuentan con dicha capacidad forman una subpoblación con unas características antigénicas, bioquímicas y metabólicas diferenciadas. Esto podría explicar que, en ocasiones, un mismo tratamiento con quimioterapia o radioterapia consiga unos niveles de respuesta diferentes en la localización primaria del tumor que en las metástasis de las áreas ganglionares del mismo tumor.

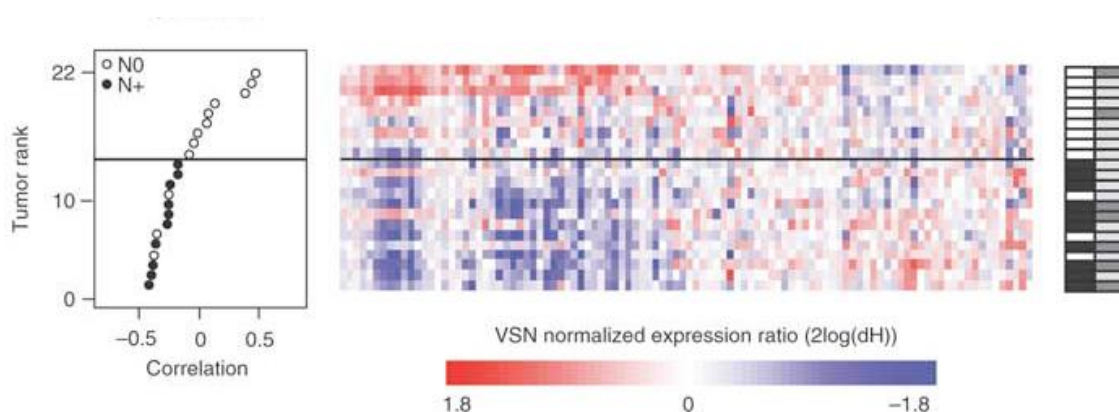
Estas diferencias en el comportamiento fenotípico, vienen determinadas a partir de los cambios que a nivel genético permiten que la célula tumoral adquiera las características necesarias para metastatizar a nivel de los ganglios cervicales.

Méndez y cols.⁶ llevaron a cabo un estudio en el que compararon la diferente expresión genética de las células del tumor primario de pacientes con metástasis ganglionares respecto a las del tumor presente en la metástasis ganglionar, así como el de las células del tumor primario de pacientes sin diseminación a nivel regional. La comparación correspondiente a las células del tumor primario de los pacientes sin diseminación ganglionar y las células de las adenopatías metastásicas, reveló la presencia de un grupo de 160 genes que se expresaron de forma diferenciada entre ambos tipos celulares. El análisis de la agrupación jerárquica y del componente principal utilizando este grupo de 160 genes, evidenció que las muestras de los tumores no metastatizados (N-), fueran distinguibles tanto de los tumores primarios de los pacientes N+, como del tumor correspondiente a las metástasis a nivel ganglionar.



Muchos de los cambios de expresión que aparecieron de forma diferencial en las células del tumor metastático ganglionar lo hicieron también a nivel del tumor primario correspondiente, si bien fue posible identificar algunos genes que, de forma significativa, se expresaron de forma diferenciada entre ambos tipos celulares. Entre los genes que contaron con una mayor capacidad de definir la población con capacidad de metastatización ganglionar destacaron: la supresión de la transglutaminasa-3, un enzima glutamil-transferasa que cataliza la formación de enlaces covalentes entre proteínas estructurales; la supresión de la queratina 16, y la sobre-expresión de la proteína ribosomal S27 (pS27).

Roepman y cols.⁷, a partir de un estudio con series de ADN de pacientes con carcinomas de cabeza y cuello, desarrollaron un predictor compuesto por 102 genes con la capacidad de diferenciar la existencia de metástasis ganglionares con una fiabilidad global del 86%. La siguiente figura muestra los resultados de la serie utilizada en la validación del predictor.



En un estudio in vitro, Zhuang y cols.⁸ desarrollaron un modelo experimental de metástasis ganglionar, incrementando la capacidad de diseminación a partir de

pases sucesivos de una línea celular de carcinoma de cavidad oral en un modelo murino. Los autores consiguieron una línea modificada con una alta capacidad de metastatización regional. En comparación con la línea parental, la línea modificada contó con una mayor capacidad de proliferación y de resistencia a la apoptosis, así como de promoción de la angiogénesis. Además, es un estudio de series en que se comparó la línea parental y la modificada, se identificaron diferencias en la expresión de 1341 genes, relacionados con el ciclo celular, la adhesión, la linfangiogénesis, y la regulación de apoptosis entre otros. Algunos de los genes sobre-expresados en la línea modificada fueron JAM2, TNC, CTSC, LAMB1, VEGF-C, HAP-LN1, y otros estaban infra- expresados: ACPP, GDF9 y FGF11.

La conclusión que puede extraerse de todos estos estudios es que existen patrones de expresión genética que son los responsables del comportamiento biológico correspondiente a las células tumorales con capacidad de metastatización.

1.2.- Mecanismos asociados a la persistencia o recidiva tumoral en pacientes tratados con radioterapia o quimioterapia

El término *resistencia al tratamiento* se aplica a la situación en la que las células tumorales son capaces de sobrevivir a pesar de su exposición al tratamiento. Esta habilidad puede ser una propiedad intrínseca de las células tumorales, o bien adquirirse tras la exposición a un determinado tipo de tratamiento. En cualquier caso, las células que persisten tras un tratamiento específico serán en principio resistentes a la repetición del mismo tratamiento, pero además cuentan, con frecuencia, con la capacidad de ser resistentes a otros tratamientos no relacionados. En este caso se considera que la célula tumoral cuenta con un *fenotipo multirresistente*, concepto que subyace en la observación clínica de que los tumores recidivados son biológicamente más agresivos y refractarios al tratamiento que las lesiones iniciales.

El concepto de “resistencia” no es aplicable al tratamiento quirúrgico. Las únicas razones que justifican una persistencia o recidiva tumoral en un paciente tratado con cirugía son unos márgenes de resección insuficientes a nivel local o regional, ya sea como consecuencia de una exéresis limitada, la capacidad del tumor de dar lugar a una afectación subclínica a distancia de los márgenes de resección aparentes (“skip metastasis”), o a la infiltración de estructuras no resecables durante el acto operatorio. Además debemos considerar que las mucosas adyacentes al tumor cuentan con frecuencia con cambios pre malignos que pueden degenerar a medio-largo plazo, haciendo difícil la diferenciación entre recidiva local o aparición de una segunda neoplasia en un campo de cancerificación.

1.2.1.- Resistencia a la radioterapia

Existen estirpes tumorales que son intrínsecamente más sensibles al tratamiento con radioterapia, como es el caso de la mayoría de linfomas y seminomas. En general, los CECC se consideran sensibles a la radioterapia, si bien en función de la localización y extensión del tumor, y de características intrínsecas del tumor y del paciente, las posibilidades de control de la enfermedad son muy variables. Es de destacar el hecho de que tumores individuales de apariencia muy similar en el momento del diagnóstico pueden exhibir respuestas muy diferentes a un mismo tratamiento.

En la actualidad, el concepto de radiosensibilidad incluye el conocimiento de una serie de mecanismos biológicos que gobiernan la respuesta de las células tumorales al tratamiento con radioterapia, incluyendo la repoblación, reparación, redistribución y oxigenación celular. En una revisión de las vías responsables en la resistencia a la radioterapia, Perri y cols.⁹ señalaron que estudios pre-clínicos y clínicos indican que las principales vías relacionadas incluían la del **EGFR** (receptor del factor de crecimiento epidérmico), la **PI3K/Akt/mTOR** (Fosfoinositol 3-quinasa ó PI3K /Proteinquinasa B ó Akt/ diana de rapamicina en células de mamífero ó mTOR), y la vía dependiente de la actividad de **p53**. Toda esta serie de mecanismos implica tanto a la propia célula tumoral, como a elementos celulares no neoplásicos que conforman el microambiente tumoral y que en la actualidad se reconoce que cuentan con un papel fundamental en el desarrollo de los procesos de carcinogénesis. Cada uno de estos factores puede ser visto como una espada de doble filo de manera que, modificaciones en el nivel de actividad

de estos mecanismos pueden incrementar o disminuir el efecto terapéutico¹⁰. Por ejemplo, si una célula tumoral ha adquirido un defecto en la capacidad de reparación del ADN, es más probable que no sea capaz de recuperarse del daño inducido por la radioterapia y sufra en consecuencia un proceso de muerte celular. Sin embargo, la alteración en la vía de reparación del ADN puede haber habilitado a la célula tumoral a acumular una serie de alteraciones genéticas no letales que permitan tolerar el daño inducido por el tratamiento con radioterapia, o a repararlos de una manera inadecuada, de forma que el resultado sólo sirva para incrementar la inestabilidad genética subyacente. De manera similar, el incremento en la proliferación celular que es inducido por el tratamiento con la radioterapia puede ser el elemento responsable del proceso de repoblación celular, pero puede a su vez hacer más susceptible al tumor al tratamiento con la radioterapia al inducir la entrada en mitosis de células con daño no reparado en el ADN.

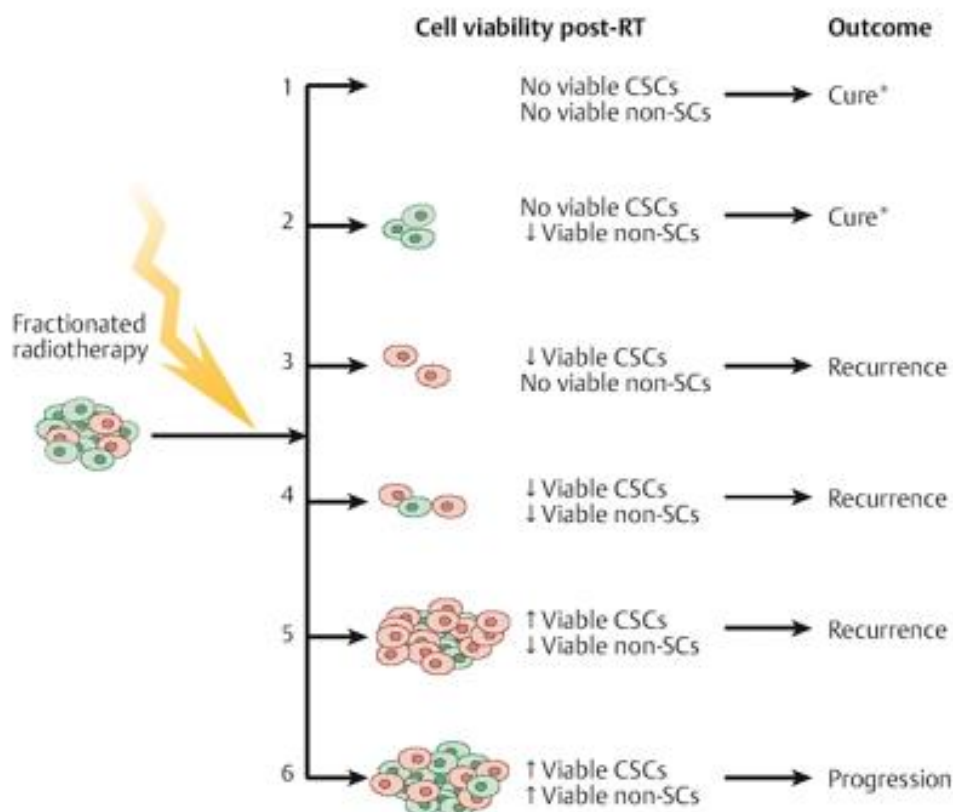
Los estudios de radiobiología clásicos señalan que el tumor está compuesto de diferentes compartimentos celulares y que el compartimento más importante es el formado por las denominadas *células clonogénicas*, definidas en estudios “in vitro” como las células con capacidad de llevar a cabo divisiones sucesivas y generar colonias. No existe un conocimiento claro del fenotipo correspondiente a estas células ni de su ubicación dentro del tumor, de manera que todas las células tumorales deberían ser consideradas como elementos de riesgo con capacidad potencial de provocar una recidiva del tumor en caso de no ser controladas de forma adecuada tras el tratamiento.

Recientemente, este concepto se ha refinado y cristalizado a partir de la noción de que los tumores contienen *células pluripotenciales tumorales (cáncer stem*

cells **CSC**), que son capaces de una replicación ilimitada y tienen la capacidad de autoregeneración. Las CSC suponen una pequeña minoría del total de la carga celular del tumor. El resto de células sitas en los llamados compartimentos de amplificación y diferenciación postmitótica cuentan con una capacidad de replicación limitada y no son capaces de reproducir el crecimiento de la totalidad del tumor.

El concepto de CSC ha supuesto un cambio en el paradigma terapéutico oncológico, de manera que en la actualidad este tipo de células son consideradas como la diana primaria del tratamiento con radioterapia^{11,12}.

Es hipotéticamente posible para una única CSC superviviente el actuar como el elemento que conduce a la recidiva del tumor, incluso tras una respuesta clínica completa finalizado el tratamiento.



Existen claras evidencias que avalan la hipótesis de las CSC en los CECC^{13,14}. Algunos estudios “in vitro” e “in vivo” han demostrado como las CSC reflejan unos patrones específicos de marcadores de superficie y perfiles de expresión genética. Estos marcadores de membrana difieren en función del tipo de tumor. En el caso de los CECC los estudios realizados coinciden en señalar como marcadores de CSC la expresión de **CD44**, **Oct-4**, **ALDH1** y **Bmi-1**¹⁵⁻¹⁶. Estos marcadores identifican una población con capacidad de división repetida, sin envejecimiento celular y dan lugar a la formación de tumores tras su inyección en ratones atímicos.

Hay datos que señalan que las CSC se localizan de forma preferente en los nichos hipóxicos dentro del tumor. Es un hecho reconocido que las células tumorales en áreas hipóxicas son menos sensibles a la acción terapéutica de las radiaciones ionizantes. La capacidad de resembrar las áreas hipóxicas puede ser uno de los mecanismos utilizados por las CSC para sobrevivir al efecto terapéutico de la radioterapia.

De forma adicional, las células pluripotenciales tumorales cuentan con un incremento intrínseco en la resistencia a la irradiación. Uno de los mecanismos que justificarían este incremento en la resistencia es el aumento de la capacidad de respuesta frente al daño al ADN.

1.2.2.- Resistencia a la quimioterapia

I.- Resistencia al cisplatino

El cisplatino (**CDDP**) es el agente citotóxico más importante en el tratamiento de los pacientes con CECC. Cuenta con un papel bien establecido en los protocolos de quimioterapia de inducción como fármaco asociado a la radioterapia en los tratamientos concomitantes y como agente activo en las pautas de quimioterapia paliativa. El CDDP ejerce su efecto biológico a través de su unión al ADN bloqueando así su replicación y/o impidiendo su transcripción, induciendo de este modo la muerte celular.

Existen diferentes mecanismos de resistencia a la quimioterapia basada en platinos que pueden ser divididos en dos grupos¹⁷:

- a) El fracaso del agente en alcanzar la diana ADN: las células resistentes cuentan con la capacidad de reducir la concentración intracelular del platino, bien a partir de impedir su entrada o bien incrementando su salida.
- b) Incremento en la capacidad celular de superar el daño inducido por el platino: mecanismo facilitado por la actividad de agentes intracelulares como el glutatión (**GSH**) o las metaloproteínas.

II.- Resistencia a los taxanos

Los taxanos (como el docetaxel, paclitaxel o cabazitaxel) son quimioterápicos utilizados en el tratamiento de los CECC que actúan a través de una inhibición de la función de los microtúbulos.

Estas sustancias, a partir de la estabilización del guanosindifosfato (**GDP**), un nucleótido implicado en la división celular, se unen a las tubulinas, proteínas globulares (de tipo α y β) que forman los microtúbulos de los husos cromáticos, produciendo un mal funcionamiento de éstos, dando como resultado final la alteración en la progresión del ciclo celular, al producir una parada en la mitosis celular, impidiendo por tanto la división celular.

Hay diversos factores que pueden contribuir a la resistencia a los taxanos. Estudios “in vitro” han demostrado que son sustrato de la bomba de multirresistencia a fármacos. Por otra parte, variaciones en los isotipos de tubulina (en concreto la tubulina β II, **β T-II**) parecen influir en la sensibilidad a su acción terapéutica¹⁸.

1.2.3.- Resistencia a los inhibidores de EGFR

El tratamiento con anticuerpos monoclonales con capacidad de bloquear el receptor del factor de crecimiento epidérmico (**EGFR**) como el *cetuximab*, aparece en la actualidad como una estrategia terapéutica adecuada en el tratamiento concomitante con radioterapia¹⁹ o asociado a CDDP-5 fluoruracilo en aquellas terapias con finalidad paliativa²⁰.

Entre los mecanismos descritos de resistencia al tratamiento con inhibidores del EGFR destacan las mutaciones en este receptor.

Éstas pueden comportar un dominio extracelular truncado que se asocie con una activación constitutiva del dominio intracelular tirosin-quinasa independiente del ligando.

Otros mecanismos pueden ser la amplificación de **Erb B-2** o la activación de vías de señalización alternativas que antagonicen la actividad pro-apoptótica y antiproliferativa de los tratamientos con cetuximab como la vía PI3K/Akt^{21,22}.

1.3.- Mecanismos asociados a la recidiva ganglionar

Los CECC cuentan con una marcada predisposición hacia la afectación regional. En el momento del diagnóstico, entre un 40-50% de los pacientes afectos de CECC cuentan con la presencia de metástasis a nivel de las áreas ganglionares cervicales. El porcentaje de afectación ganglionar depende en gran medida tanto de factores clínicos como son la localización del tumor primario, su extensión local y el grado de infiltración; como de factores biológicos que permiten la capacidad de progresión de las células tumorales a través del sistema linfático y la proliferación a nivel ganglionar.

La afectación ganglionar es uno de los factores pronósticos de mayor importancia en los carcinomas escamosos de cabeza y cuello²³. A igualdad de extensión local de la enfermedad, la aparición clínica de metástasis ganglionares reduce en un 50% las posibilidades de supervivencia.

El esquema de tratamiento de los pacientes con CECC incluye la realización de tratamiento sobre las áreas ganglionares si los pacientes tienen la presencia de metástasis ganglionares en el momento del diagnóstico de la enfermedad (**cN+**), y de aquellos pacientes sin evidencia clínica de afectación regional (**cN0**) pero en los que el riesgo de afectación subclínica sea superior al 15-20%²⁴. Como consecuencia, con la excepción de los pacientes con tumores iniciales de glotis y tumores muy superficiales de determinadas localizaciones de cavidad oral, la mayoría de pacientes con un CECC son tributarios de un tratamiento terapéutico o electivo a nivel de las áreas ganglionares.

El tratamiento de las áreas ganglionares incluye cirugía, radioterapia o quimio-radioterapia, o una combinación de las mismas en función del grado de afectación ganglionar.

Dependiendo de la extensión del tumor y del tipo de tratamiento empleado, entre un 10% y un 25% de los pacientes con CECC sufren la aparición de recidivas del tumor a nivel ganglionar^{25,26}. Diferentes estudios han analizado los factores relacionados con el control regional de enfermedad en pacientes con carcinomas escamosos de cabeza y cuello. Entre los factores con capacidad pronóstica se han citado la categoría de extensión de la enfermedad a nivel regional^{26,27}, el nivel de localización de las adenopatías metastásicas²⁸, la existencia de adenopatías con ruptura capsular^{29,30}, o el nivel de infiltración en profundidad del tumor primario de la resección quirúrgica^{25,31}.

Los condicionantes necesarios para la aparición de una recidiva regional son por un lado, que el tumor cuente con la capacidad biológica de dar lugar a la aparición de metástasis a nivel regional y por otro, que el tumor cuente con la capacidad de superar el tratamiento realizado a nivel regional.

Disponer de biomarcadores con capacidad de diferenciar el riesgo de recidiva regional, contaría con una elevada relevancia clínica en tanto que permitiría intensificar el tratamiento a nivel regional en aquellos pacientes con una mayor probabilidad de fracaso.

Hasta el momento son escasos los estudios que han evaluado factores moleculares relacionados con el control de la enfermedad a nivel regional. En un estudio realizado en pacientes con CECC en el que se cuantificó la expresión de

CXCL12 (quimiocina también conocida como **SDF-1**), factor derivado del estroma -1 (Stromal Derived Factor-1) y **CXCR4** (receptor de la quimiocina CXCL12) a nivel transcripcional mediante RT-PCR en 71 pacientes con carcinomas de cabeza y cuello tratados mayoritariamente con cirugía,

Clatot y cols.³² encontraron que los pacientes con una expresión baja de CXCL12, contaron con una disminución significativa en la supervivencia libre de recidiva metastásica, incluyendo tanto las recidivas regionales como las metástasis a distancia.

El presente estudio tiene como objetivo el profundizar en la hipótesis que la expresión del **eje CXCL12/CXCR4** juega un papel en el control de la enfermedad a nivel regional.

1.3.1.- Papel del eje CXCL12/CXCR4 en los tumores

El sistema de *quimiocinas* o *quimioquinas*, es un grupo de pequeñas citoquinas que, en el género humano, incluye unas 48 proteínas que juegan un papel importante en la migración de células leucocitarias. Se han descrito para ellas unos 19 receptores³³. Algunas de éstas se han visto implicadas en los procesos de carcinogénesis en los CECC.

Las quimioquinas son una gran familia de proteínas de pequeño tamaño relacionadas estructuralmente y que regulan el tráfico celular del sistema inmune, jugando además un papel importante en los procesos de inflamación, infección, daño tisular, alergia, enfermedad cardiovascular y diseminación tumoral^{34,35}.

Table 1. CXCL, C and, CX₃C Chemokine/Receptor Families

CXCL Chemokine/Receptor Family				
Systematic Name	Human Chromosome	Human Ligand	Mouse Ligand	Chemokine Receptor(s)
CXCL1	4q12-q13	GRO α /MGS α - α	GRO/KC?	CXCR2 > CXCR1
CXCL2	4q12-q13	GRO β /MGS α - β	GRO/KC?	CXCR2
CXCL3	4q12-q13	GRO γ /MGS α - γ	GRO/KC?	CXCR2
CXCL4	4q12-q13	PF4	PF4	Unknown
CXCL5	4q12-q13	ENA-78	LIX?	CXCR2
CXCL6	4q12-q13	GCP-2	CK α -3	CXCR1, CXCR2
CXCL7	4q12-q13	NAP-2	Unknown	CXCR2
CXCL8	4q12-q13	IL-8	Unknown	CXCR1, CXCR2
CXCL9	4q21.21	Mig	Mig	CXCR3
CXCL10	4q21.21	IP-10	IP-10	CXCR3
CXCL11	4q21.21	I-TAC	Unknown	CXCR3
CXCL12	10q11.1	SDF-1 α / β	SDF-1	CXCR4
CXCL13	4q21	BLC/BCA-1	BLC/BCA-1	CXCR5
CXCL14	Unknown	BRAK/bolekine	BRAK	Unknown
(CXCL15)	Unknown	Unknown	Lungkine	Unknown
C Chemokine/Receptor Family				
Systematic Name	Human Chromosome	Human Ligand	Mouse Ligand	Chemokine Receptor(s)
XCL1	1q23	Lymphotactin/SCM-1 α /ATAC	Lymphotactin	XCR1
XCL2	1q23	SCM-1 β	Unknown	XCR1
CX ₃ C Chemokine/Receptor Family				
Systematic Name	Human Chromosome	Human Ligand	Mouse Ligand	Chemokine Receptor(s)
CX3CL1	16q13	Fractalkine	Neurotactin	CX3CR1
CC Chemokine/Receptor Family				
Systematic Name	Human Chromosome	Human Ligand	Mouse Ligand	Chemokine Receptor(s)
CCL1	17q11.2	I-309	TCA-3, P500	CCR8
CCL2	17q11.2	MCP-1/MCAF	JE?	CCR2
CCL3	17q11.2	MIP-1 α /LD78 α	MIP-1 α	CCR1, CCR5
CCL4	17q11.2	MIP-1 β	MIP-1 β	CCR5
CCL5	17q11.2	RANTES	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5
(CCL6)		Unknown	C10, MRP-1	Unknown
CCL7	17q11.2	MCP-3	MARC?	CCR1, CCR2, CCR3
CCL8	17q11.2	MCP-2	MCP-2?	CCR3
(CCL9/10)		Unknown	MRP-2, CCF18 MIP-1 γ	Unknown
CCL11	17q11.2	Eotaxin	Eotaxin	CCR3
(CCL12)		Unknown	MCP-5	CCR2
CCL13	17q11.2	MCP-4	Unknown	CCR2, CCR3
CCL14	17q11.2	HCC-1	Unknown	CCR1
CCL15	17q11.2	HCC-2/Lkn-1/MIP-1 δ	Unknown	CCR1, CCR3
CCL16	17q11.2	HCC-4/LEC	LCC-1	CCR1
CCL17	16q13	TARC	TARC	CCR4
CCL18	17q11.2	DC-CK1/PARC AMAC-1	Unknown	Unknown
CCL19	9p13	MIP-3 β /ELC/exodus-3	MIP-3 β /ELC/exodus-3	CCR7
CCL20	2q33-q37	MIP-3 α /LARC/exodus-1	MIP-3 α /LARC/exodus-1	CCR6
CCL21	9p13	6CKine/SLC/exodus-2	6CKine/SLC/exodus-2/TCA-4	CCR7
CCL22	16q13	MDC/STCP-1	ABCD-1	CCR4
CCL23	17q11.2	MPIF-1	Unknown	CCR1
CCL24	7q11.23	MPIF-2/Eotaxin-2	Unknown	CCR3
CCL25	19p13.2	TECK	TECK	CCR9
CCL26	7q11.23	Eotaxin-3	Unknown	CCR3
CCL27	9p13	CTACK/ILC	ALP/CTACK/ILC ESKine	CCR10*

CXCR4 es un receptor transmembrana de 7 dominios, acoplado a una proteína G (G-protein-coupled receptor, **GPCR**), que une de forma específica con la quimiocina SDF-1, también conocida como CXCL-12. El CXCR4 es uno de los receptores de quimioquina mejor estudiados debido a su papel como correceptor para la entrada del virus HIV-1 a nivel celular³⁶.

Chemokine	Chemokine receptor(s)	Role in HNSCC
CXCL12 (SDF-1)	CXCR4	Invasion Migration Adhesion Motility Metastasis High tumor stage Lymph node and distant metastasis CXCR4 expression correlated with Poor prognosis
CCL19 CCL21	CCR7	Invasion Adhesion Migration Metastasis High tumor stage Lymph node metastasis CCR7 expression correlated with Poor prognosis
CXCL8 (IL-8)	CXCR1 CXCR2	Proliferation Invasion Migration Elevated serum level of CXCL8 in patients with recurrent or metastatic HNSCC
CXCL5	CXCR2	Proliferation Invasion
CXCL14	Not identified	Expression of CXCL14: reduces proliferation and migration in HNSCC cells
CCL20	CCR6	Down regulation of CCR6: lymph node metastasis

El receptor CXCR4 fue clonado por primera vez en 1994 y fue denominado inicialmente como “*leukocyte-expressed seven transmembrane domain receptor*” (**LESTR**), debido a su expresión abundante en determinadas subpoblaciones de leucocitos³⁷. El gen CXCR4 se encuentra expresado de forma constitutiva y la

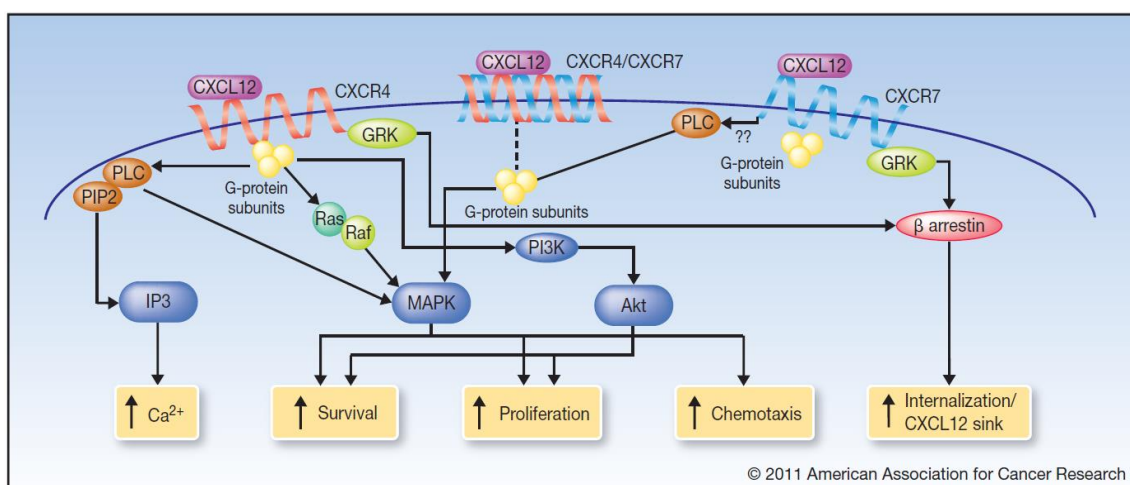
proteína CXCR4 aparece en la mayoría de las células leucocitarias incluyendo: linfocitos, monocitos, células NK y células dendríticas. Además aparece en la musculatura vascular lisa, células endoteliales, células del tracto gastrointestinal, neuronas de la microglia y astrocitos. Hasta hace escasamente unos años, CXCR4 se había reconocido como el único receptor de CXCL12, pero en la actualidad se reconoce la existencia de otro receptor para el ligando que se ha denominado CXCR7³⁸.

La actividad del eje CXCL12/CXCR4 es un elemento crítico en el desarrollo normal. A diferencia de lo que sucede con otras citoquinas, el déficit de CXCL12 o CXCR4 ocasiona la muerte intrauterina o poco después del nacimiento en ratones. La señal CXCL12/CXCR4 es requerida durante el desarrollo del sistema hematopoyético, cardíaco, vascular y nervioso. La ausencia de su expresión durante el periodo embrionario conduce a la aparición de defectos en la formación mieloide, la formación del septum ventricular y la aparición de alteraciones en el desarrollo del cerebelo y la vascularización del tracto gastrointestinal^{39,40,41}.

En el individuo adulto la actividad de CXCL12/CXCR4 se encuentra relacionada con la homeostasis y la retención de células progenitoras hematopoyéticas a nivel de médula ósea. Estas células progenitoras expresan niveles elevados de CXCR4 y resultan atraídas por el CXCL12 producido por las células del estroma en nichos especializados medulares⁴².

Existe una elevada evidencia de que el eje CL12/CXCR4 se encuentra sobre-expresado en una gran cantidad de modelos tumorales tanto epiteliales como mesenquimales⁴³, incluyendo los tumores pulmonares⁴⁴, de mama⁴⁵, renales^{46,47}, de próstata⁴⁸, pancreáticos⁴⁹ y gastrointestinales⁵⁰.

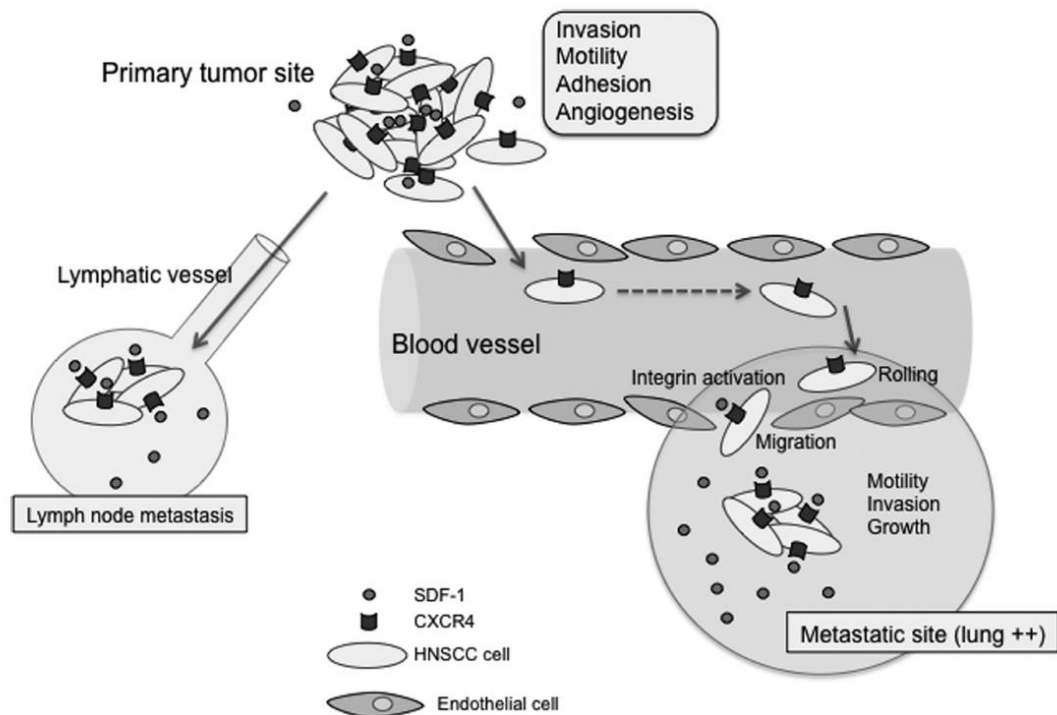
Al igual que otros GPCRs, la unión de CXCL12 con CXCR4 activa una proteína G heterotrimérica que regula la actividad de varias vías intracelulares, incluyendo la activación de la fosfolipasa-C, fosfoinositol-3 quinasa (**PI3K**), y la inactivación de la adenil-ciclasa. La señalización a través de la vía de la PI3K promueve a su vez la activación de vías como Akt (Protein quinasa B o **PKB**), **PAK** y **Cdc42**, que se encuentran involucradas en el proceso de polarización celular y polimerización de la actina. Además, la señalización de CXCR4 vía **MEK** ½ (también llamada MAPKK) y **ERK** ½ (sinónimo de MAP quinasa) y tirosin-quinasas como **Src**, conduce a la transcripción de genes involucrados en los procesos de migración, supervivencia y progresión a través del ciclo celular⁵¹.



En gran medida, el mecanismo de metastatización se asemeja al tráfico de los leucocitos y stem cells, proceso regulado por la actividad del eje CXCL12/CXCR4⁵². Se ha podido comprobar como la activación de CXCR4 conducen a una sobre-expresión de metaloproteinasas (**MMP**), lo que incrementa la capacidad de invasión celular a partir de la degradación del colágeno⁵³.

Además, la secreción paracrina de CXCL12 puede estimular la supervivencia y la proliferación de una variedad de líneas celulares tanto benignas como malignas⁵⁴. Por otro lado, la neoangiogénesis tumoral puede aparecer promovida a partir de la expresión de CXCL12, dado que actúa como un potente quimiotáctico de células endoteliales que expresan CXCR4⁵⁵. A partir de un modelo de cáncer de mama, Liang y cols.⁵⁶ han demostrado como la actividad CXCL12/CXCR4 promueve la angiogénesis y la progresión tumoral a partir de un incremento en la expresión de **VEGF** (factor de crecimiento endotelial vascular/ *Vascular Endothelial Growth Factor*) a través de la activación de la vía PI3k/Akt.

En caso de sobre-expresión de CXCR4 por parte del tumor, se produce un incremento en la movilidad celular y la capacidad invasiva a partir de la actividad de las MMP y la inducción del mecanismo de transición epitelial mesenquimal, se promueve la angiogénesis y la entrada de las células en la circulación linfática y vascular. A partir de aquí y a expensas de la existencia de gradientes en la concentración de CXCL12, se produce una migración de estas células tumorales hacia órganos con niveles elevados del ligando, tal como muestra el esquema tomado de Albert y cols.⁵⁷.

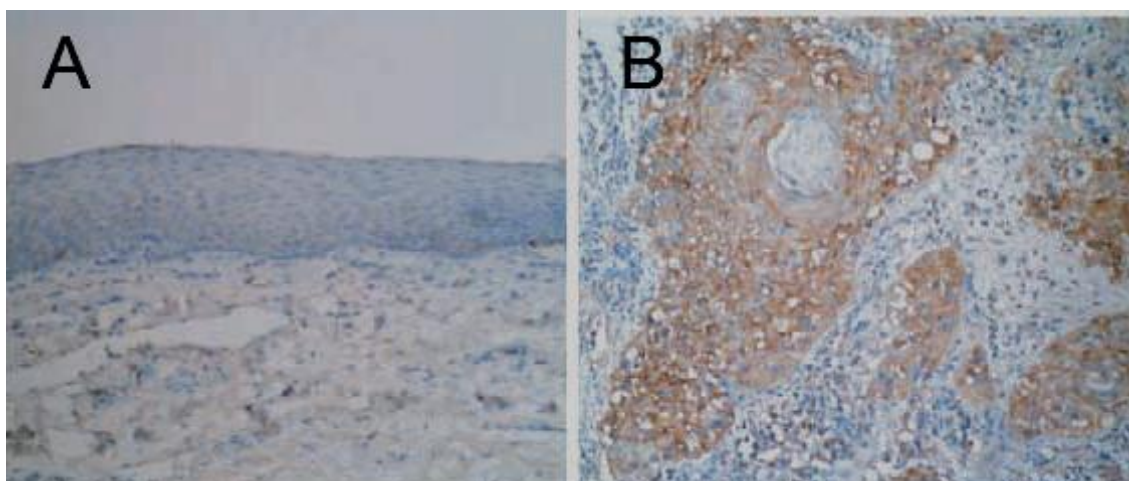


En un experimento llevado a cabo con líneas celulares de CECC por Uchida y cols.⁵⁸ pudo determinarse como se producía una migración de las células tumorales a favor del gradiente de CXCL12, pero tan sólo para aquellas líneas que contaban con la expresión de CXCR4; esta migración se alteraba al bloquear el receptor. Los mismos autores realizaron un experimento con una línea de carcinoma de cavidad oral que no expresaba CXCR4. La inducción en la expresión de CXCR4 mediante transfección de un vector comportó la adquisición de la capacidad de migración a favor de gradiente de CXCL12⁵⁹. Este proceso de migración se comprobó que era dependiente de la activación de las vías ERK ½ y Akt/PKB.

1.3.2.- Expresión de CXCL12/CXCR4 en los pacientes con CECC

Diferentes estudios realizados mediante inmunohistoquímica han encontrado en muestras de CECC una expresión del CXCR4 entre el 29-100% y de CXCL12 entre el 40-93%⁵⁷. La heterogeneidad en la expresión sería consecuencia de la inclusión de tumores de localizaciones diferentes y de la discrepancia inherente al tipo de ensayo realizado.

En otro estudio en muestras de pacientes con CECC, Katayama y cols.⁶⁰ pudieron observar una negatividad frente a CXCR4 en el epitelio normal, en tanto que apareció una expresión frente a CXCR4 en el 29% de las muestras, preferentemente a nivel de membrana celular y citoplasmática. La siguiente figura muestra un ejemplo de positividad en tumor (B) frente a la negatividad aparecida en la mucosa sana (A), reportada en dicho estudio.



El CXCL12 no se encontraba presente en las células tumorales. Apareció una tinción negativa o moderada en las células del estroma asociadas al tumor a nivel de la localización primaria, en tanto que la positividad inmunohistoquímica fue muy manifiesta en el estroma adyacente a las células tumorales en los casos de adenopatías metastásicas cervicales. Un estudio realizado con líneas celulares de CECC mostró unos resultados comparables.

Otro estudio inmunohistoquímico realizado en 90 pacientes con carcinomas de cavidad oral, Ishikawa y cols.⁶¹ encontraron una positividad frente a CXCR4 en un 30% de los tumores, con una expresión preferente a nivel del margen de infiltración tumoral. Igualmente, el autor encontró positividad en la expresión de CXCR4 en tres de ocho líneas celulares de tumor, en tanto que en ningún caso apareció positividad frente a CXCL12.

En otro estudio realizado en pacientes con carcinomas linguales, Delibasi y cols.⁶² encontraron igualmente como la positividad de CXCR4 aparecía especialmente en el frente de infiltración tumoral.

Por su parte, Tan y cols.⁶³ evaluaron un total de 30 tumores de laringe e hipofaringe, encontrando una positividad inmunohistoquímica frente a CXCR4 en el 53.5% de los casos apareciendo tinción en las células tumorales a nivel de la membrana e intracitoplasmático, frente a CXCL12 en el 40% de los casos, con la positividad correspondiente al citoplasma de las células del estroma y los linfocitos adyacentes.

Otros autores han comprobado como la positividad frente a CXCR4 corresponde a las células tumorales^{64,65}, en tanto que la positividad de CXCL12 en el tumor aparece a expensas de las células del estroma y que en las células tumorales aparecen negativas^{66,67}.

Clatot y cols.⁶⁸ evaluaron la expresión a nivel transcripcional de CXCR4 y CXCL12 en muestras del tumor y del estroma de CECC separados mediante técnicas de microdissección, observado una mayor expresión de ambos genes en las muestras del estroma (P=0.012 y P<0.0001, respectivamente). De acuerdo con sus resultados, el estroma del microambiente tumoral es el principal responsable de la expresión de CXCR4 y sobre todo de CXCL12 a nivel tumoral.

1.3.3.- Relación entre expresión de CXCL12 / CXCR4 y la afectación regional

Diferentes autores han encontrado una relación significativa entre la actividad del eje CXCR4/CXCL12 y la afectación ganglionar en los pacientes con CECC.

En una cohorte de 90 pacientes con carcinomas de cavidad oral, el porcentaje de pacientes con positividad frente a CXCR4 para los pacientes afectados de metástasis ganglionares (**N+**), fue significativamente superior que para los que no tenían ganglios afectos (**N0**) : 46% versus 18% (P=0.0035).⁶¹

En un estudio realizado de 30 pacientes con carcinomas localizados en la laringe e hipofaringe, Tan y cols.⁶³ encontraron una relación significativa entre la inmunopositividad frente a CXCR4 y la afectación regional. El porcentaje de positividad para los pacientes N+ fue del 73.7%, frente al 18.2% de los pacientes N0 (P=0.003).

En el caso de la CXCL12, apareció una tendencia hacia la mayor afectación regional en los pacientes N+ (52.6%) frente al 18.2% en N0 ($P=0.06$). Igualmente, los autores describieron una mayor tendencia a la aparición de metástasis a distancia para los pacientes CXCR4 ($P=0.01$) ó CXCL12 positivos ($P=0.14$). De acuerdo con sus resultados, la positividad frente a CXCR4 aparecía más asociada con la capacidad metastásica del tumor a nivel regional y a distancia, que de la positividad frente a CXCL12.

Igualmente, a partir de un grupo de 74 pacientes con carcinomas de cavidad oral, Lee y cols.⁶⁴ describieron una asociación entre la expresión de CXR4 y la afectación regional ($P=0.037$).

En un estudio inmunohistoquímico realizado en 47 pacientes con carcinomas de lengua, Albert y cols.⁶⁹ encontraron una asociación entre la positividad a CXCR4 y la afectación ganglionar ($P=0.01$), en tanto que no apareció tal relación al evaluar la CXCL12.

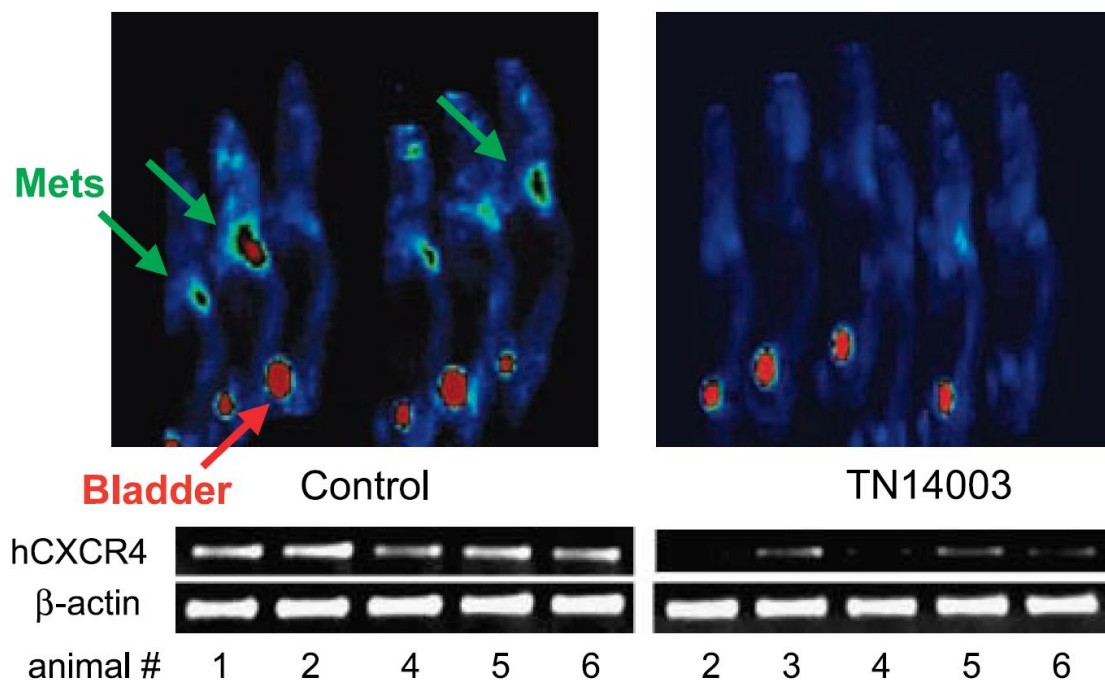
Además de la asociación con la expresión a nivel inmunohistoquímico, Ueda y cols.⁶⁵ encontraron una relación significativa entre la expresión a nivel transcripcional de CXCR4 y la afectación regional en un grupo de 25 pacientes con CECC.

A partir de los resultados de otro estudio experimental, Uchida y cols.⁵⁹ pudieron comprobar como la inoculación de una línea celular de CECC que no expresa CXCR4 (*línea IH*) comportaba un crecimiento local del tumor, pero sin capacidad

de diseminación ganglionar. La inducción de la expresión de CXCR4 mediante transfección, condujo a una adquisición de la capacidad de dar lugar a metástasis a nivel regional.

Yoon y cols.⁷⁰ realizaron un estudio en un modelo murino a partir de la selección de clones celulares de líneas de CECC con elevado (**M+**) o escaso (**M0**) potencial de metastatización. Se pudo comprobar como los clones M+ contaban con una capacidad de expresión superior de CXCR4 que los M0, que no mostraron actividad CXCR4 ni a nivel transcripcional ni de proteína. Los clones M+ adquirieron unos cambios morfológicos compatibles con el proceso de *transición epitelial-mesenquimal* (disminución en la expresión de E-cadherina e incremento de vimentina e integrinas). Las células M+ contaron con un incremento en la expresión de *Snail*, uno de los factores de transcripción que induce el mecanismo de transición epitelial-mesenquimal. El bloqueo de CXCR4 condujo a una disminución en la proliferación y la capacidad de invasión mediada por CXCL12 en los clones M+ (las células M0/CXCR4 negativas carecieron de capacidad de metastatización aún en presencia de CXCL12).

La siguiente figura, muestra la diferencia en la aparición de metástasis a distancia en función del bloqueo de CXCR4 (TN14003- especímenes con CXCR4 bloqueado).



A partir de una evaluación de la densidad microvascular, pudo determinarse como el bloqueo de CXCR4 condujo a una reducción significativa de la angiogénesis.

1.3.4.- Modificaciones a nivel celular inducidas por la actividad del eje CXCL12/CXCR4

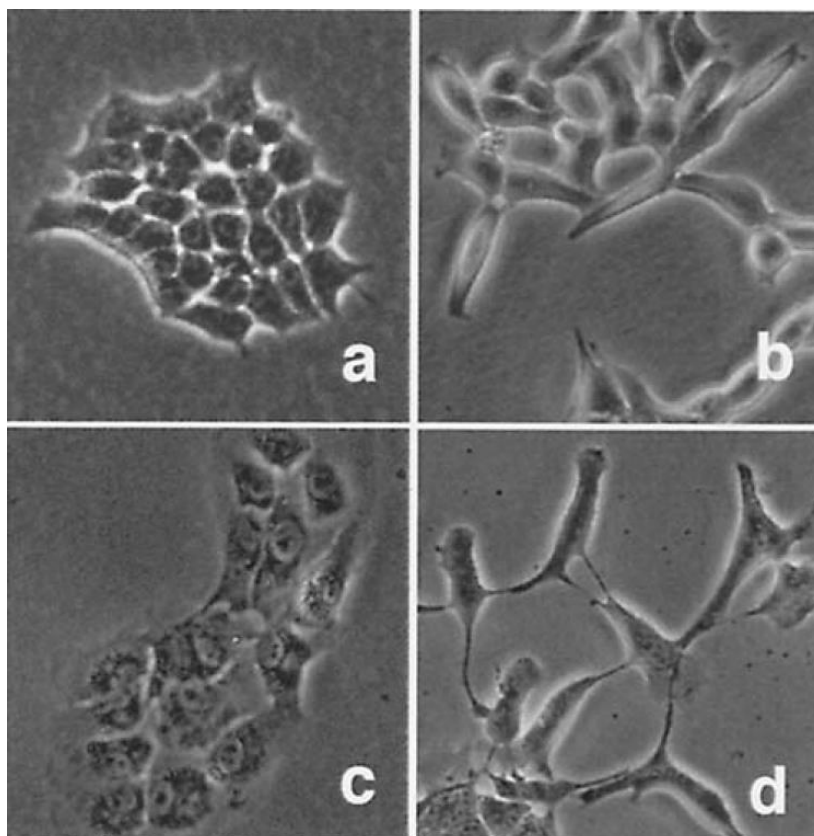
En un estudio realizado con 5 líneas celulares de CECC, Samara y cols.⁷¹ pudieron determinar la existencia de expresión a nivel transcripcional de CXCR4. La activación del receptor a partir de la adición de CXCL12 condujo a una fosforilación de ERK $\frac{1}{2}$ y un incremento en la adhesividad celular y la capacidad de migración. Igualmente se pudo comprobar un incremento en la expresión de **MMP-9** (metaloproteinasa-9).

En un estudio desarrollado en un panel de 6 líneas celulares de CECC, Katayama y cols.⁶⁰ encontraron que ninguna de las líneas expresaba CXCL12, en tanto que tres de ellas aparecieron como positivas frente a CXCR4. En estas líneas positivas pudieron comprobar que tanto la proliferación como la capacidad de migración de las células dependían de la activación con CXCL12.

Ishikawa y cols.⁶¹ alcanzaron unas conclusiones similares al estudiar un panel de 8 líneas de carcinoma de cavidad oral. De acuerdo con sus resultados, el bloqueo del eje CXCL12/CXCR4 comportó una disminución significativa de la capacidad migratoria y de la invasividad.

Para Onoue y cols.⁷² la activación con CXCL12 de líneas celulares de carcinoma de cavidad oral CXCR4 positivas, indujo una serie de cambios morfológicos compatibles con el proceso de transición epitelial-mesenquimal.

La siguiente figura muestra la morfología correspondiente a dos de las líneas estudiadas antes (Fig. a y c) y después de la adición de CXCL12 (Fig. b y d).



Estos cambios morfológicos se vieron acompañados de una pérdida en la expresión de E-cadherina y la adquisición de positividad frente a la vimentina, elementos fenotípicos característicos del proceso de transición epitelial-mesénquimal. Se comprobó cómo este proceso de transición era dependiente de la activación de la vía PI3k-Akt.

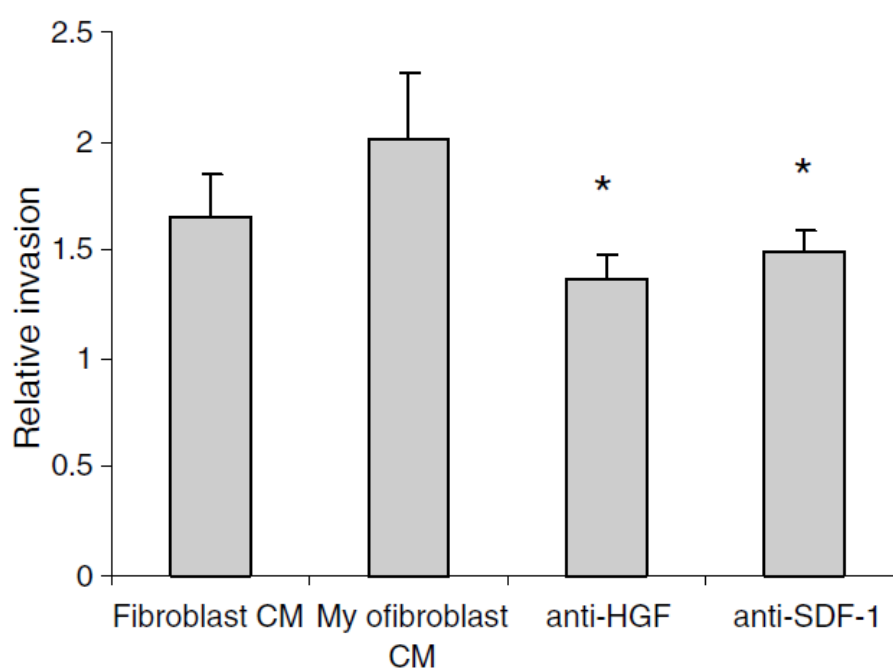
Según Rehman y cols.⁷³ la capacidad de promover la invasión y metástasis inducida por la activación de CXCR4 por CXCL12 dependería de la activación de la vía de **NFκB**, de forma independiente de la activación de las vías PI3K/Akt y ERK/MAPK.

Hong y cols.⁷⁴ evaluaron dos líneas celulares de carcinoma de cavidad oral que expresaban CXCR4 e indujeron su anulación funcional mediante **siRNA** (*small interfering RNA*). Las líneas inhibidas mostraron una reducción significativa en la velocidad de crecimiento y la capacidad invasiva. Sin embargo, no todos los autores encuentran que la activación del eje CXCL12/CXCR4 cuente con la capacidad de regular la proliferación celular, por lo que es posible que este efecto sea dependiente en gran medida de las características intrínsecas de la línea celular analizada.

Tan y cols.⁶³ estudiaron dos líneas de carcinoma de laringe (HEp-2) e hipofaringe (Fadu) y pudieron determinar como el tratamiento con CXCL12 incrementó la capacidad de migración e invasión, incremento que quedaba anulado a partir del bloqueo de CXCR4, en tanto que no se producían modificaciones significativas en la proliferación celular.

Por su parte, a partir de líneas celulares de carcinoma de nasofaringe, Hu y cols.⁷⁵ llegaron a unas conclusiones similares en cuanto a la capacidad del eje CXCL12/CXCR4 de regular la capacidad migratoria y metastásica. Las líneas tumorales con capacidad metastásica contaron con una respuesta quimiotáctica “in vitro” a la CXCL12, en tanto que las no metastásicas, no contaron con esta respuesta. El bloqueo de CXCR4 condujo a una disminución en la capacidad migratoria celular, y a una inhibición de la capacidad de diseminación a nivel ganglionar y a distancia en un modelo experimental.

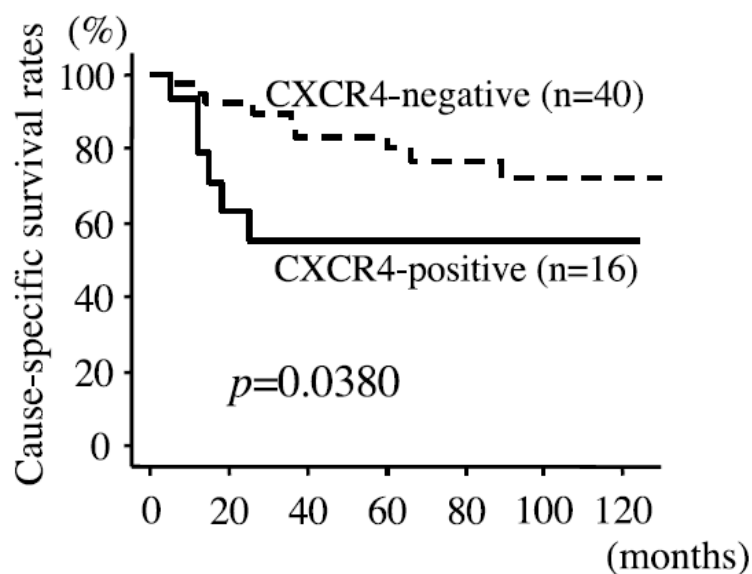
Tal como se puso de manifiesto, las células tumorales no sintetizan CXCL12, que depende para su producción de la colaboración de elementos del microambiente tumoral. Daly y cols.⁷⁶ estudiaron en un modelo “in vitro” la producción por parte de los fibroblastos activados o miofibroblastos de CXCL12 y **HGF** (Hepatocyte Growth Factor), dos de las citoquinas con mayor capacidad biológica a nivel de los CECC. A partir de un cultivo de miofibroblastos pudo determinarse como la **IL-1 α** y el medio condicionante de la línea de carcinoma de cavidad oral CA1, indujeron un incremento en la expresión de CXCL12 y HGF, en tanto que **TGF- β** (Transformant Growth Factor- β) inhibía la expresión de forma significativa. El medio condicionante de miofibroblastos activados incrementó de forma significativa la capacidad de invasión de líneas celulares de CECC en un ensayo en Matrigel. La anulación de CXCL12 o HGF mediante anticuerpos neutralizantes, redujo este incremento en la invasividad mediado por el medio condicionante de los miofibroblastos.



Takabayashi y cols.⁷⁷ demostraron como los lipopolisacáridos bacterianos cuentan con la capacidad de inducir “in vitro” la invasión de una línea celular de carcinoma de cavidad oral a partir de la inducción de la expresión de CXCR4 y el incremento en la actividad de la vía CXCL12/CXCR4. De acuerdo con los autores, a partir de este mecanismo, la sobreinfección local podría contar con la capacidad de favorecer la invasión tumoral.

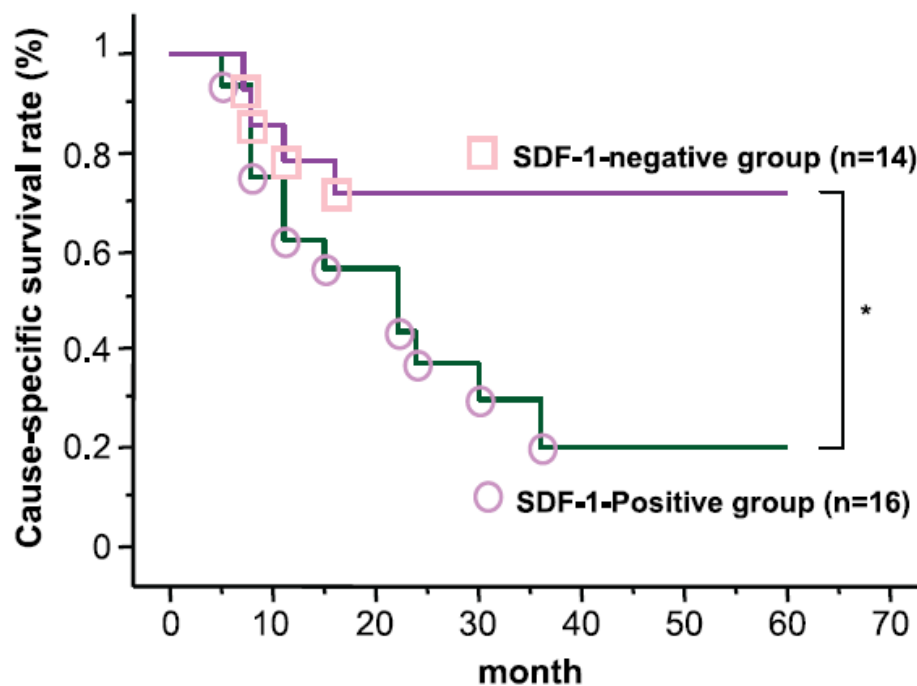
1.3.5.- Significado clínico de la expresión del eje CXCL12/CXCR4

En un grupo de 56 pacientes con carcinomas de cavidad oral tratados mayoritariamente con cirugía, Katayama y cols.⁶⁰ encontraron positividad inmunohistoquímica frente a CXCR4 en el 28.6% de los pacientes. La positividad frente a CXCR4 se relacionó con la afectación regional y con la supervivencia libre de metástasis a distancia. Los autores encontraron una diferencia significativa en la supervivencia ajustada en función de la expresión de CXCR4, tal como aparece en la siguiente figura.

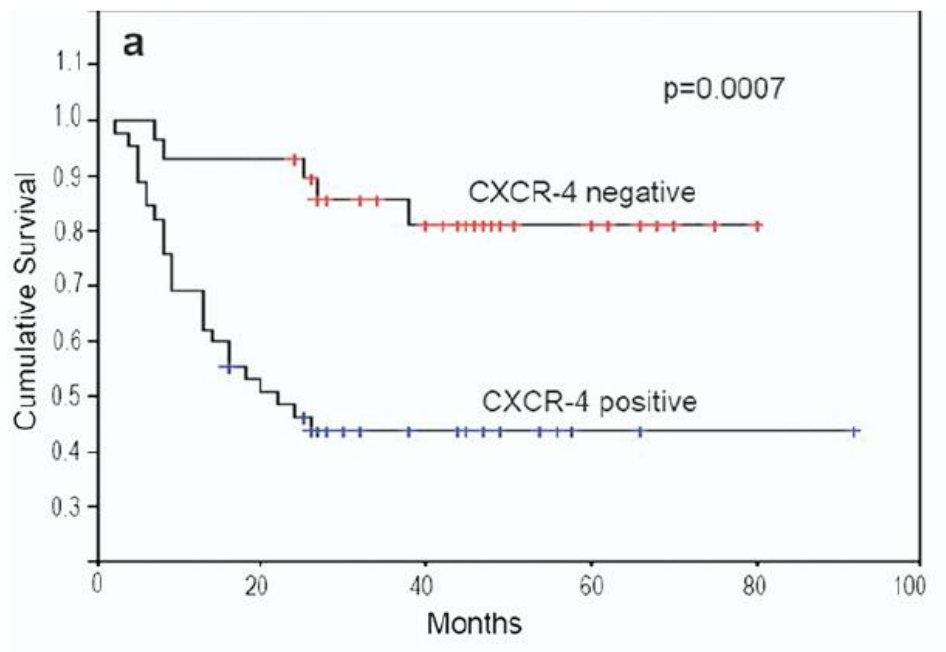


De acuerdo con los resultados de este estudio, en un análisis multivariante el riesgo de mortalidad asociado al tumor fue 3.73 veces superior para el grupo de pacientes positivos frente al CXCR4 ($P=0.0475$).

En el estudio realizado por Uchida y cols.⁵⁹ de 30 pacientes con carcinomas de cavidad oral con afectación ganglionar, pudo determinarse una relación significativa entre la positividad inmunohistoquímica frente a CXCR4 y CXCL12 y la supervivencia. La supervivencia a los 5 años para los pacientes CXR4 positivos fue del 39.1%, frente al 71.4% en el caso de los pacientes negativos ($P=0.035$). Para los pacientes CXCL12 positivos la supervivencia a los 5 años fue del 25% y para los pacientes negativos del 71.4% ($P=0.023$).



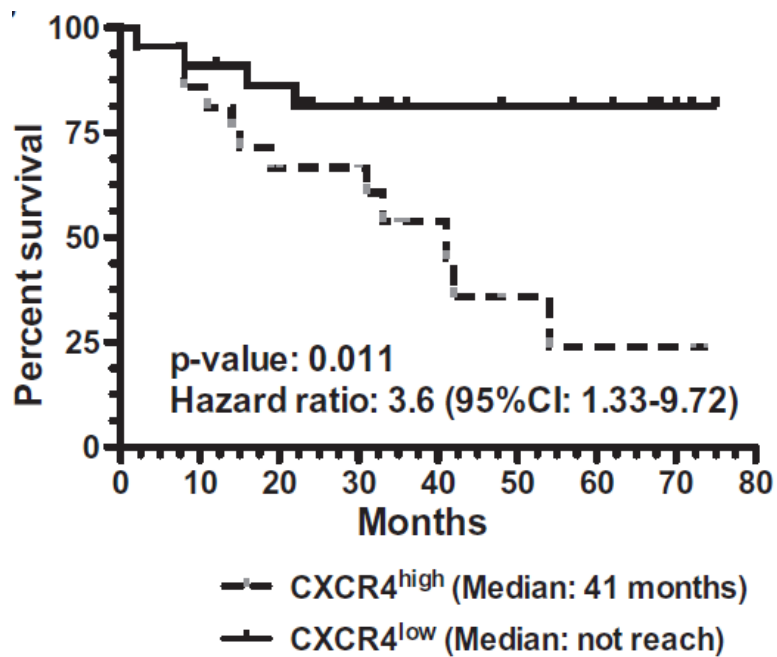
De acuerdo con los resultados obtenidos por Lee y cols.⁶⁴ en un grupo de 74 pacientes con carcinomas de cavidad oral, de los cuales un 60% mostraron positividad frente a CXCR4, existieron diferencias significativas en la supervivencia de acuerdo con el status CXCR4.



De acuerdo con un análisis multivariante, los pacientes CXCR4 positivos tuvieron un riesgo de mortalidad 3.9 veces superior que los negativos (*IC 95%:1.5-10.3*, $P=0.006$).

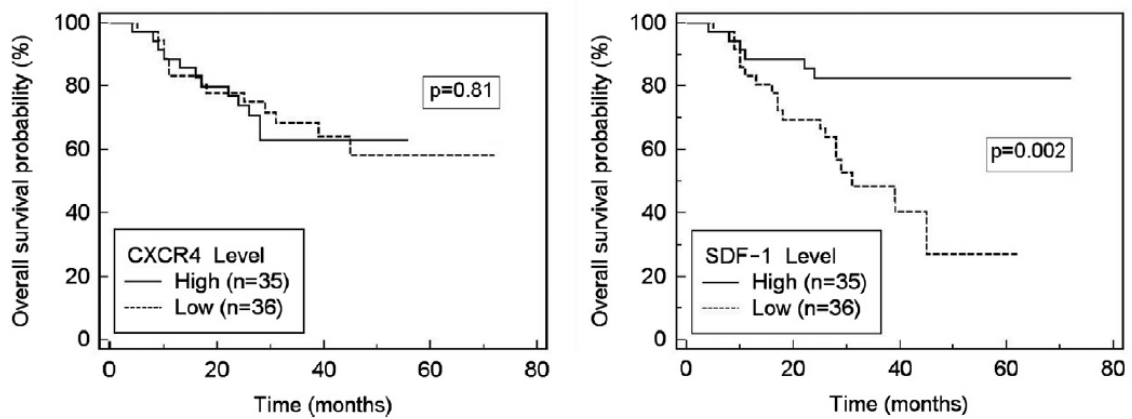
Albert y cols.⁶⁹ analizaron los resultados de 47 pacientes con carcinomas de lengua tratados con cirugía y encontraron una relación significativa entre la

expresión a nivel inmunohistoquímico de CXCR4 y la supervivencia, asociación que no apareció al analizar la expresión de CXCL12. La siguiente figura muestra las curvas de supervivencia en función de la positividad de CXCR4.



Clatot y cols.³² analizaron un total de 71 pacientes con CECC tratados con cirugía y radioterapia postoperatoria y evaluaron la expresión del eje CXCR4/CXCL12 a nivel transcripcional mediante **RT-PCR** (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*). Los autores encontraron diferencias significativas en la supervivencia ajustada a favor de los pacientes con unos niveles elevados de CXCL12. Los pacientes con unos niveles de expresión elevados de CXCL12, contaron con un mejor pronóstico que los pacientes con unos niveles bajos, en tanto que no

aparecieron diferencias al considerar la expresión de CXCR4, tal como aparece en las siguientes figuras:



De acuerdo con los resultados en un estudio multivariante, las variables que se relacionaron con la supervivencia libre de metástasis fueron: los niveles intratumorales bajos de CXCL12 ($P=0.021$) y la existencia de adenopatías metastásicas con extensión extraganglionar ($P=0.001$).

2.- Justificación e hipótesis

2.1.- Justificación

Prácticamente no existen biomarcadores que señalen y pronostiquen la posibilidad de control de la enfermedad a nivel ganglionar en los pacientes que padecen un carcinoma escamoso de cabeza y cuello.

La oportunidad de disponer de un marcador con capacidad predictiva a dicho nivel posibilitaría la intensificación del tratamiento regional en aquellos pacientes con un mayor riesgo de fracaso del tratamiento, lo que podría mejorar el control de la diseminación a nivel cervical y a la postre la supervivencia de estos enfermos.

Existen indicios que revelan que la expresión del eje CXCL12/CXCR4 a nivel transcripcional, pueda estar relacionado con el control de la enfermedad a nivel regional en pacientes con CECC.

La justificación del presente trabajo es analizar la capacidad pronóstica del eje CXCL12/CXCR4 en el control ganglionar de pacientes afectados de CECC.

2.2.- Hipótesis

El incremento en la expresión transcripcional de CXCR4 y la disminución de CXCL12 se relacionarían con la aparición de recidivas a nivel ganglionar en los pacientes con carcinomas escamosos de cabeza y cuello.

3.- Objetivos

El objetivo global del presente trabajo de investigación es analizar la relación entre la expresión a nivel transcripcional del eje CXCL12/CXCR4 y el control de la enfermedad a nivel regional en pacientes con CECC.

Como objetivos concretos se plantean:

1. Determinar la existencia de diferencias en los niveles de expresión de CXCR4/CXCL12 entre el tejido tumoral y la mucosa sana.
2. Evaluar la existencia de diferencias en los niveles de expresión de CXCL12/CXCR4 en función de la localización, la extensión local o regional del tumor o el estatus HPV en muestras de CECC.
3. Analizar la relación entre los niveles de expresión de CXCL12/CXCR4 y el control regional de la enfermedad.
4. Estudiar la correlación existente entre los niveles de expresión del eje CXCL12/CXCR4 y los correspondientes a genes relacionados con la respuesta al tratamiento y la capacidad de diseminación.

4.- Material y métodos

4.1.- Pacientes

El presente estudio se realizó a partir de las biopsias de los tumores obtenidos de 130 pacientes diagnosticados de forma consecutiva y afectos de CECC confirmados histológicamente que fueron tratados en el *Hospital de Santa Creu i Sant Pau* (Barcelona) con intención radical entre los años 2004 y 2010 (ambos incluidos).

Todos los pacientes fueron evaluados por el comité de oncología de cabeza y cuello del centro y la decisión terapéutica ya fuera con: quimioterapia de inducción **(PQ)**, cirugía, radioterapia **(RT)** o quimio-radioterapia **(PQ-RT)**, fue basada en los protocolos institucionales vigentes en aquel momento.

Se excluyeron del estudio un total de 19 pacientes por distintas razones. Dos pacientes que no recibieron tratamiento con intención radical, otros dos por haberse perdido antes de completar 3 años de seguimiento y 15 pacientes afectos de tumores con un bajo potencial de afectación regional (T1N0 de glotis).

La totalidad de pacientes incluidos en el estudio (n=111), recibieron un tratamiento electivo o terapéutico sobre las áreas ganglionares.

Los pacientes tratados con radioterapia recibieron un tratamiento con radioterapia externa conformada 3D.

Un total de 40 pacientes (36.0%) iniciaron la secuencia terapéutica con un tratamiento de quimioterapia de inducción. El tratamiento con quimioterapia de

inducción consistió en la administración de 3 ciclos de CDDP-5 con fluoruracilo (n=32 pacientes) o CDDP-5 con fluoruracilo-docetaxel (n=8 pacientes).

El tratamiento sobre la localización primaria del tumor consistió en la práctica de cirugía en 28 ocasiones (25.2%) y un tratamiento con radioterapia o quimioradioterapia en 83 (74.8%).

El tratamiento cervical en los pacientes tratados con RT o PQ-RT sobre la localización primaria del tumor y con afectación ganglionar concomitante (N+), consistió en la administración de una dosis de 70-72 Gy sobre las áreas ganglionares en riesgo. En estos mismos pacientes que empezaron el tratamiento con RT o PQ-RT y eran pacientes sin afectación clínica ganglionar cervical (**cN0**), consistió en la administración de radioterapia electiva a dosis de 50 Gy.

Los pacientes tratados con quimioradioterapia concomitante recibieron tres ciclos de CDDP a dosis de 100 mg/m² los días 1, 21 y 43 del tratamiento con radioterapia, o carboplatino semanal a dosis de 1.5 AUC.

Para los pacientes N+ que recibieron un tratamiento con RT o PQ-RT a nivel de la localización primaria del tumor, se procedió a la realización de vaciamientos en función de la respuesta a nivel regional evaluada a las 10-12 semanas mediante técnicas de imagen o PET. Se realizaron vaciamientos cervicales tras finalizar el tratamiento con radioterapia o quimioradioterapia sobre la localización primaria del tumor en 20 ocasiones.

El tratamiento cervical para los pacientes en los que el tumor primario fue tratado quirúrgicamente consistió en la realización de vaciamientos cervicales funcionales o radicales, uni o bilaterales, dependiendo de la categoría de extensión regional y de la localización y extensión local del tumor primario.

Se realizaron un total de 49 vaciamientos cervicales, 5 radicales y 44 funcionales o selectivos.

Los criterios de tratamiento adyuvante con radioterapia o quimioradioterapia postoperatoria para los pacientes tratados con un vaciamiento cervical, se mantuvieron constantes a lo largo del periodo de estudio: la presencia de más de dos adenopatías metastásicas y/o la presencia de adenopatías metastásicas con ruptura capsular.

De los 28 pacientes en los cuales el tratamiento inicial de las áreas ganglionares fue quirúrgico, en 16 (57.1%) se realizó un tratamiento adyuvante a nivel cervical con radioterapia (9 pacientes) o quimioradioterapia postoperatorias (7 pacientes).

La siguiente tabla describe las características de los 111 pacientes incluidos en este estudio.

Características		Nº pacientes (%)
Edad	61.2 años (Rango: 38.2 - 92.3 años)	
Sexo	Masculino	98 (88.3%)
	Femenino	13 (11.7%)
Localización del tumor	Cavidad oral - Orofaringe	51 (45.9%)
	Laringe - Hipofaringe	60 (54.1%)
Categoría de T	T1-2	49 (44.1%)
	T3-4	62 (55.9%)
Categoría de N	cN0	56 (50.5%)
	cN+	55 (49.5%)
Diferenciación tumoral	Bien diferenciado	3 (2.7%)
	Mod. diferenciado	95 (85.6%)
	Mal diferenciado	13 (11.7%)
Tratamiento primario	Cirugía ± radioterapia	28 (25.2%)
	(Quimio)-radioterapia	83 (74.8%)
Tratamiento cervical	Cirugía ± radioterapia	48 (43.2%)
	(Quimio)-radioterapia	63 (56.8%)
Quimioterapia de inducción	No	71 (64.0%)
	Si	40 (36.0%)

Los datos clínicos utilizados en el presente estudio se obtuvieron de una base de datos oncológica que incluye información epidemiológica, terapéutica y de seguimiento de la totalidad de pacientes con tumores malignos de cabeza y cuello diagnosticados y tratados en el *Hospital de la Santa Creu i Sant Pau* desde 1985⁷⁸.

El seguimiento de los pacientes incluyó la realización de una exploración completa del área ORL a intervalos de dos meses durante el primer año de seguimiento, cada tres meses durante el segundo año, y cada cuatro meses a partir del tercer año de seguimiento.

Las variables principales del presente estudio fueron: la aparición de una recidiva a nivel ganglionar y la supervivencia libre de recidiva regional, definida como el intervalo de tiempo entre el diagnóstico del tumor y el diagnóstico de la recidiva a nivel regional. Se consideraron además la supervivencia libre de recidiva local y libre de metástasis a distancia, así como la supervivencia ajustada. En todos los casos se realizó un seguimiento de mínimo de 3 años.

Esta tesis forma parte de un proyecto de investigación desarrollado en el contexto de las becas FIS “*Papel del eje IL-1/NF- κ B en los carcinomas escamosos de cabeza y cuello*” (PI11/02380) y “*Herramienta de predicción de respuesta a la radioterapia basada en la expresión de genes relacionados con la transición epitelial-mesenquimal en cáncer de cabeza y cuello*” (PI14/01918). Ambos proyectos de investigación fueron aprobados por el Comité de Ensayos e Investigación Clínica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

4.2.- Muestras biológicas

Para la totalidad de pacientes incluidos en el estudio se dispuso de una muestra de tumor obtenida de forma previa a cualquier tipo de tratamiento oncológico.

Inmediatamente tras la obtención de la biopsia, una parte del tejido se estabilizó mediante inclusión en *RNAlater* (QiagenGmbH, Hilden, Alemania) y se almacenó a -80°C hasta su procesamiento.

Los tejidos fueron homogeneizados en 1 ml. de Trizol (*Invitrogen, Carlsbad, CA*). La extracción del RNA se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. La transcripción inversa se realizó a partir de 1 µg. de RNA con el kit "*High-CapacitycDNA*".

La expresión de mRNA se estudió mediante PCR a tiempo real en un *ABI Prism 7900HT* utilizando ensayos prediseñados validados (*TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems*) y parámetros de amplificación universales. La expresión relativa de cada transcrito se expresó como el cociente de *transcrito del gen/ transcrito β -actina*.

Se dispuso además de una muestra de mucosa sana biopsiada a más de 5 cm. del límite del tumor para 47 de los pacientes incluidos en el estudio.

4.3.- Estadística

La comparación de variables continuas en función de una variable cualitativa dicotómica se efectuó mediante el test t-Sudent para muestras independientes o casos apareados. La valoración de las variables continuas en función de más de dos variables cualitativas se llevó a cabo con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

Se utilizó un análisis de partición recursiva (*Classification and Regression Tree, CRT*) para categorizar los valores de expresión de mRNA considerando la aparición de recidiva a nivel regional como variable dependiente.

Las correlaciones entre variables continuas se evaluaron con el test de correlación de Pearson.

Los cálculos de supervivencia actuarial se realizaron usando el método de Kaplan-Meier. Las diferencias entre las curvas de supervivencia se compararon mediante el test log-rank.

Se realizó un análisis multivariante usando el modelo de regresión de Cox. Se tomó como variable dependiente la supervivencia libre de recidiva regional y como variables independientes la localización del tumor primario (cavidad oral – orofaringe vs. laringe-hipofaringe), extensión local (T1-T2 vs. T3-T4), extensión regional (N0 vs. N+), tipo de tratamiento (cirugía ± radioterapia vs. radioterapia/quimioterapia), y la categoría de expresión del eje CXCL12/CXCR4 definida por método de partición recursiva.

El análisis estadístico se realizó con software SPSS v. 17.0.

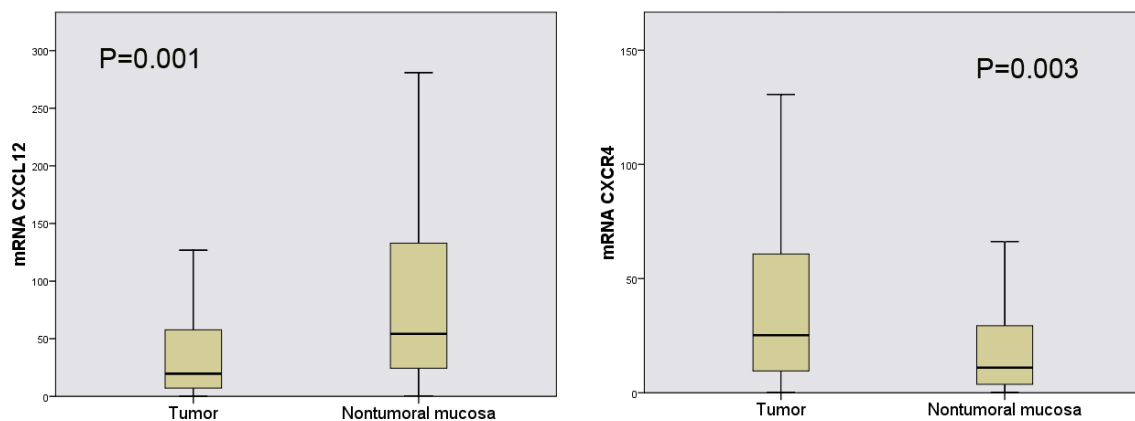
5.- Resultados

5.1.- Expresión de CXCL12 y CXCR4 en el tumor

En cuanto a los resultados de la expresión de la CXCL12 en las muestras de tumor fueron significativamente inferiores a los de la mucosa sana ($P=0.001$).

Por el contrario, los valores de expresión del CXCR4 en las muestras de tumor, fueron significativamente superiores respecto a los de la mucosa sana ($P=0.003$).

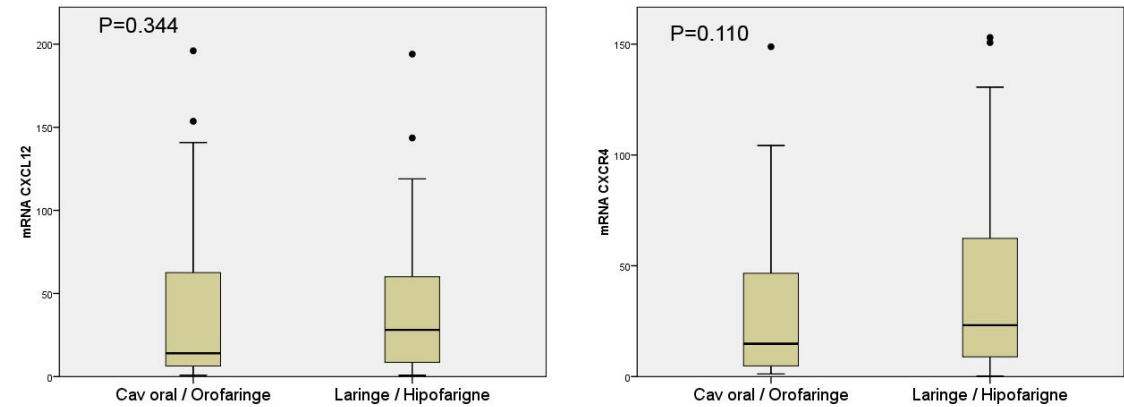
La siguiente figura muestra la distribución de la expresión de ambos genes en función del tipo de tejido analizado:



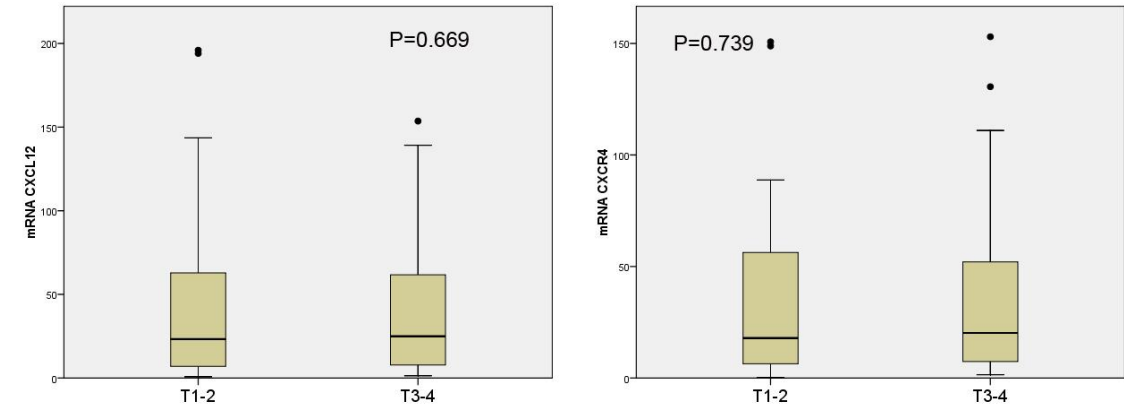
No aparecieron diferencias significativas en los valores de expresión de la CXCL12 ni del CXCR4 en el tejido tumoral en función de: la localización del tumor (cavidad oral-orofaringe *versus* laringe-hipofaringe), la categoría de extensión local del tumor (T1-T2 *versus* T3-T4) o la presencia de afectación ganglionar regional en el momento del diagnóstico (N0 *versus* N+).

Las gráficas siguientes ilustran los resultados de los valores de la expresión de la CXCL12 y del CXCR4 del tejido tumoral en función de:

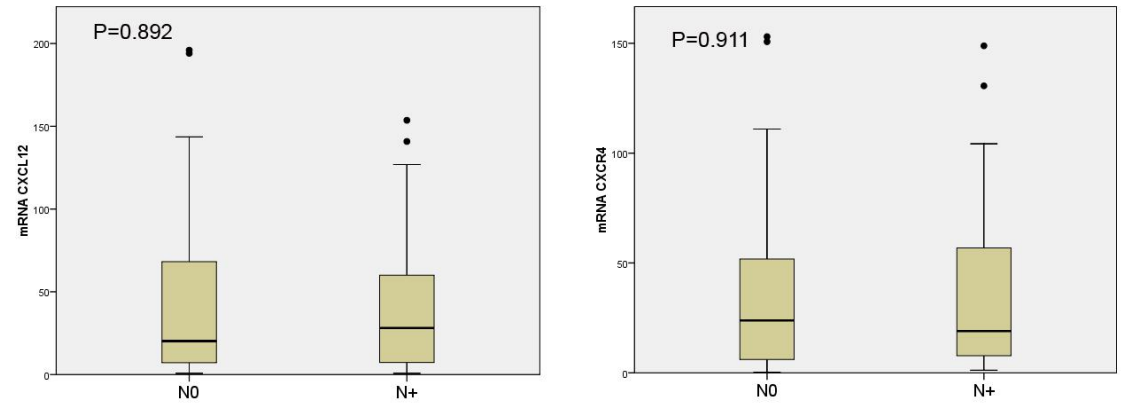
- Localización del tumor:



- Extensión local del tumor (T):

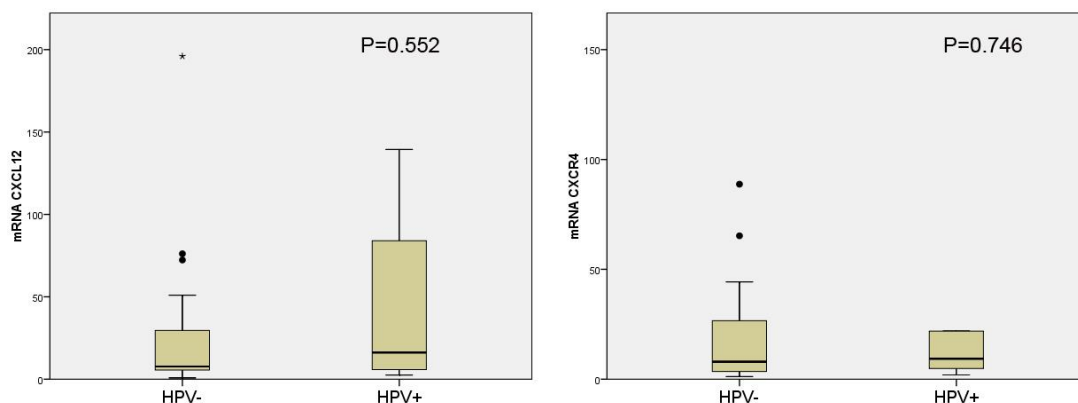


- Afectación regional ganglionar (N) en el momento del diagnóstico:



De los 41 pacientes con carcinomas de localización en orofaringe, se dispuso de información relativa al status del virus del papiloma humano (**HPV**) en 38 ocasiones. El porcentaje de pacientes HPV+ en esta cohorte de pacientes fue del 18.4%.

No aparecieron diferencias significativas en los valores de expresión de la CXCL12 ni del CXCR4 en función del status HPV, para los pacientes con carcinomas de esta localización.



El análisis de partición recursiva no encontró diferencias en los valores de expresión de CXCL12 ni de CXCR4 en función del status ganglionar en el momento del diagnóstico inicial (N0 versus N+).

5.2.- Expresión de CXCL12 y CXCR4 en metástasis ganglionares

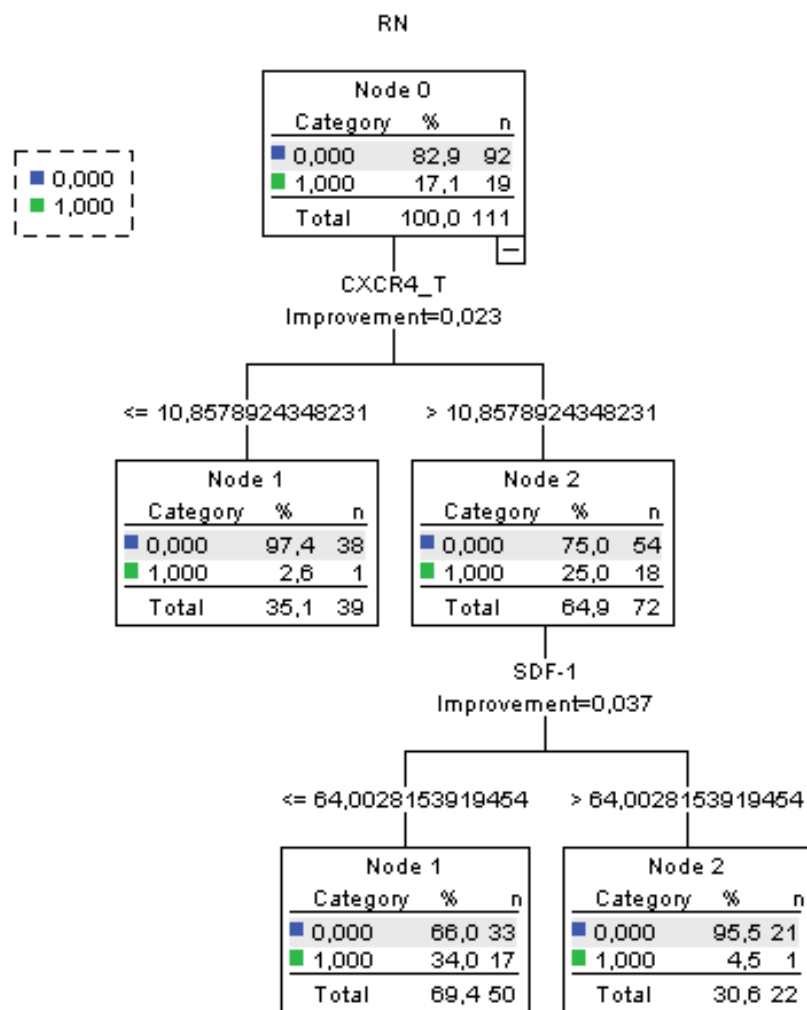
El tratamiento realizado sobre las áreas ganglionares incluyó vaciamientos cervicales en 48 pacientes, 5 de los cuales (10.4%) mostraron la presencia de metástasis ganglionares con ruptura capsular (**R+**).

No aparecieron diferencias significativas en los valores de expresión de la CXCL12 ni del CXCR4 en función de la presencia de adenopatías metastásicas con ruptura capsular en las piezas de los vaciamientos cervicales ($P=0.743$ y $P=0.948$, respectivamente).

Durante el periodo de seguimiento un total de 28 pacientes (25.2%) sufrieron una recidiva local de la enfermedad, 19 (17.1%) una recidiva regional, y 14 (12.6%) la aparición de metástasis a distancia.

El análisis de partición recursiva no encontró relación significativa entre los valores de expresión de la CXCL12 ni del CXCR4 ni del control local de la enfermedad.

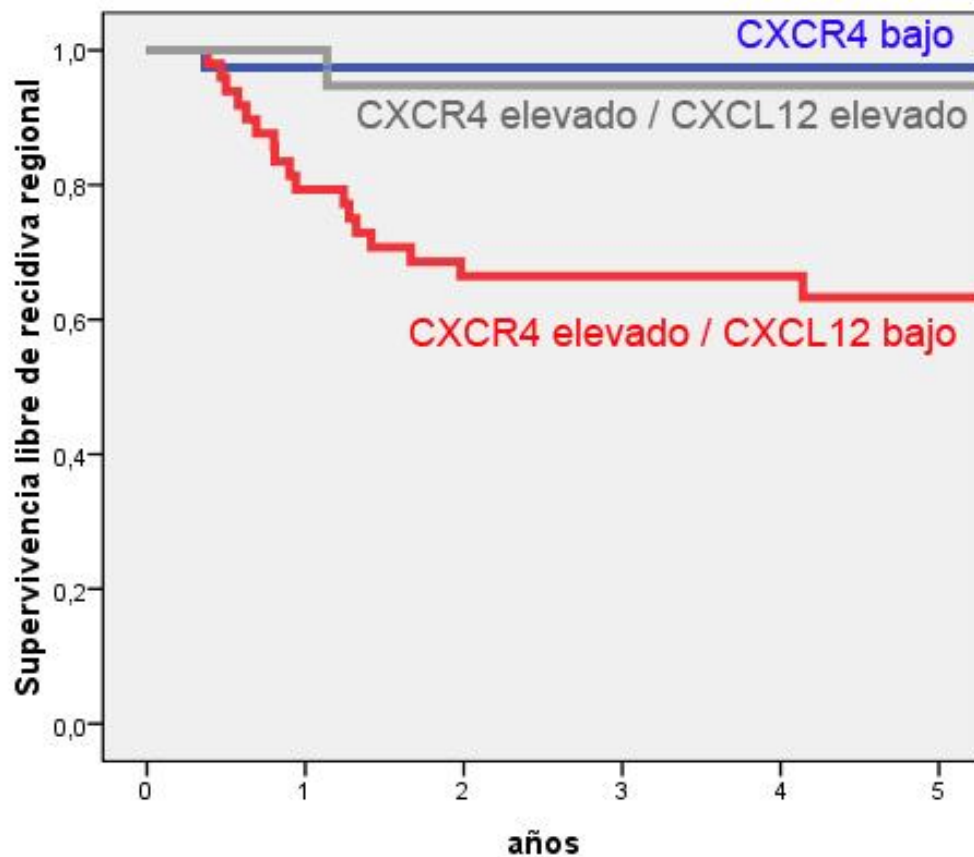
Al considerar como variable dependiente el control regional, el análisis de partición recursiva llevó a cabo un árbol de clasificación con una primera ramificación dependiente del valor de expresión del CXCR4 y una segunda ramificación para los pacientes con unos valores de expresión elevados de CXCR4 en función del valor de expresión del CXCL12.



Se definieron tres grupos de pacientes:

- Los pacientes con unos valores de expresión de CXCR4 bajos (**nodo 1**, n=39, 35.1%), con un riesgo bajo de recidiva regional.
- Pacientes con valores de expresión de CXCL12 elevados y CXCR4 elevados (**nodo 3**, n=22, 19.8%), también con un riesgo de recidiva regional bajo.
- Y los pacientes con unos valores de expresión baja de CXCL12 y elevados de CXCR4 (**nodo 2**, n=50, 45.0%), con un riesgo elevado de aparición de recidiva regional.

La siguiente figura muestra las curvas de supervivencia libre de recidiva regional en función de la clasificación obtenida mediante el método de partición recursiva.



La supervivencia libre de recidiva regional a los 5 años para los pacientes con valores bajos de CXCR4 (nodo 1), fue del **97.4%** (IC 95%: 92.5-100).

Para los pacientes con valores elevados de CXCL12 y de CXCR4 del **94.7%** (IC 95%: 84.8-100).

Finalmente, para los pacientes con valores bajos de CXCL12 y elevados de CXCR4 del **63.3%** (IC 95%:49.2-77.4).

Lógicamente se pudo comprobar como existieron diferencias significativas en la supervivencia libre de recidiva regional en función de los valores de expresión de CXCL12 y CXCR4 (P=0.001).

La siguiente tabla muestra los valores de la supervivencia actuarial a los 5 años libre de recidiva local, regional y a distancia de la enfermedad, así como la supervivencia ajustada en función de las categorías de expresión del eje CXCL12/CXCR4.

	Nodo 1 CXCR4 bajo	Nodo 2 CXCR4 elevado/ CXCL12 bajo	Nodo 3 CXCR4 elevado/ CXCL12 bajo	P
Local	71.3% (57.0-85.6)	71.5% (58.2-84.8)	78.0% (58.4-97.6)	0.734
Regional	97.4% (92.5-100)	63.3% (49.2-77.4)	94.7% (84.8-100)	0.001*
Distancia	90.7% (80.6-100)	83.5% (72%-95.0)	78.8% (59.8-97.8)	0.460
Ajustada	66.9% (51.1-82.7)	67.6% (53.9-81.3)	67.5% (44.8-90.2)	0.994

No aparecieron diferencias significativas en el control local o a distancia de la enfermedad o en la supervivencia ajustada en función de la expresión del eje CXCL12/CXCR4.

5.3.- Estudio de la supervivencia libre de recidiva regional

Se realizó un análisis multivariante considerando como variable dependiente la supervivencia libre de recidiva regional y como variables independientes: la localización del tumor primario, su extensión local y regional, el tipo de tratamiento realizado a nivel regional, así como la clasificación de los pacientes en función de la expresión de CXCL12/CXCR4, agrupando en una única categoría los pacientes con niveles bajos de CXCR4 (nodo 1) y CXCL12 elevada / CXCR4 elevada (nodo 3).

De acuerdo con los resultados del análisis multivariante, la única variable que se relacionó de forma significativa con la supervivencia libre de recidiva regional fue la expresión del eje CXCL12/CXCR4. Contando como categoría de referencia a los pacientes incluidos en los nodos 1 y 3, los pacientes con unos niveles de expresión bajos de CXCL12 y elevados de CXCR4 (nodo 2), contaron con un riesgo de recidiva regional **10.7** veces superior (*IC 95%: 2.4-47.2; P=0.002*).

La siguiente tabla muestra un resumen de los resultados del análisis multivariante de la supervivencia libre de recidiva regional:

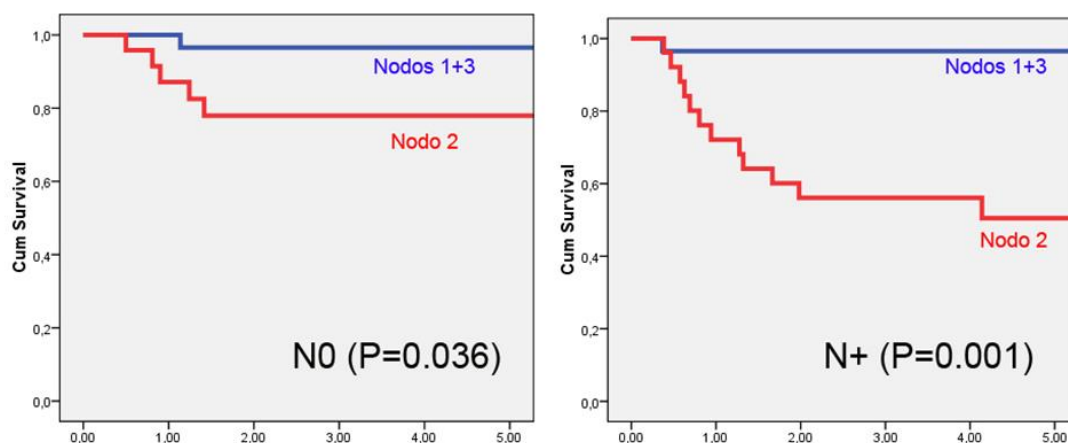
		HR (IC 95%)	P
T	T1-T2	1	
	T3-T4	0,83 (0.031-2.22)	0,724
N	N0	1	
	N+	2,51 (0.91-6.95)	0,075
Localización	Cavidad Oral- Orofaringe	1	
	Laringe-Hipofaringe	1,69 (0.62-4.54)	0,299
Tto. regional	Cirugía ± RT	1	
	RT / CT-RT	0,87 (0.33-2.29)	0,790
CXCL12/CXCR4	CXCR4 bajo CXCL12 alto/CXCR4 alto	1	
	CXCL12 bajo/ CXCR4 alto	10,71 (2.42-47.42)	0,002*

También se analizó la capacidad pronóstica de la expresión del eje CXCL12/CXCR4 sobre el control regional de la enfermedad en función del estadio ganglionar inicial.

La supervivencia libre de recidiva regional a los 5 años para los pacientes sin afectación ganglionar inicial (N0) con una expresión baja de CXCL12/ elevada de CXCR4 (nodo 2), fue del 78.0% (IC 95%: 60.5-95.5); en tanto que para el resto de pacientes (nodos 1+3) fue del 96.6% (IC 95%: 89.9-100).

En el caso de los pacientes con afectación ganglionar inicial (N+), la supervivencia libre de recidiva regional a los 5 años para los pacientes con una expresión baja de CXCL12 /elevada de CXCR4 (nodo 2) fue del 50.5% (IC 95%: 30.1-70.9), y para el resto de pacientes (nodos 1+3) del 96.6% (IC 95%: 89.9-100).

Las gráficas inferiores muestran las curvas de supervivencia libres de recidiva regional en función de la categoría de expresión del eje CXCL12/CXCR4, considerando de forma conjunta los nodos 1 y 3.

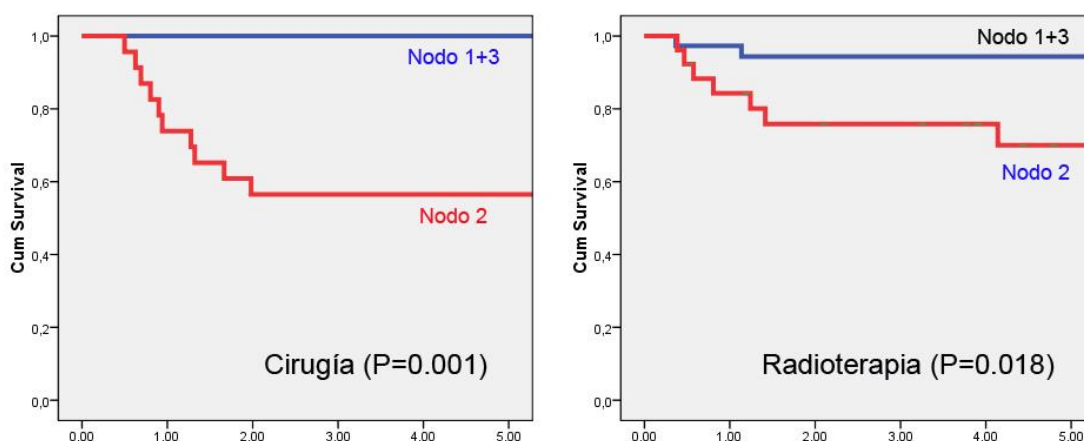


Se observó cómo los pacientes con una expresión baja de CXCL12/ elevada de CXCR4 (nodo 2) contaron con una supervivencia libre de recidiva regional significativamente inferior, tanto en el caso de los pacientes N0 ($P=0.036$) como en los pacientes N+ ($P=0.001$).

De los pacientes tratados con cirugía a nivel ganglionar ($n=48$), la supervivencia actuarial a los 5 años libre de recidiva regional para los pacientes con CXCL12 bajo / CXCR4 alto fue del 56.5% (IC 95%: 36.4-76.6), en tanto que para el resto de pacientes fue del 100%.

En el caso de los pacientes tratados con radioterapia o quimioradioterapia ($n=63$), la supervivencia libre de recidiva regional a los 5 años para los pacientes con CXCL12 bajo / CXCR4 alto fue del 70.0% (IC 95%: 51.0-89.0) y para el resto de pacientes del 94.3% (IC 95%: 86.7-100).

Las siguientes figuras muestran las curvas de supervivencia libre de recidiva regional en función del tipo de tratamiento efectuado sobre las áreas ganglionares.



Se apreciaron diferencias significativas en el control regional de la enfermedad en función del nivel de expresión del eje CXCL12/CXCR4 tanto para los pacientes que fueron tratados con un vaciamiento cervical ($P=0.001$) como para los pacientes que recibieron un tratamiento con radioterapia o quimiorradioterapia a nivel ganglionar ($P=0.018$).

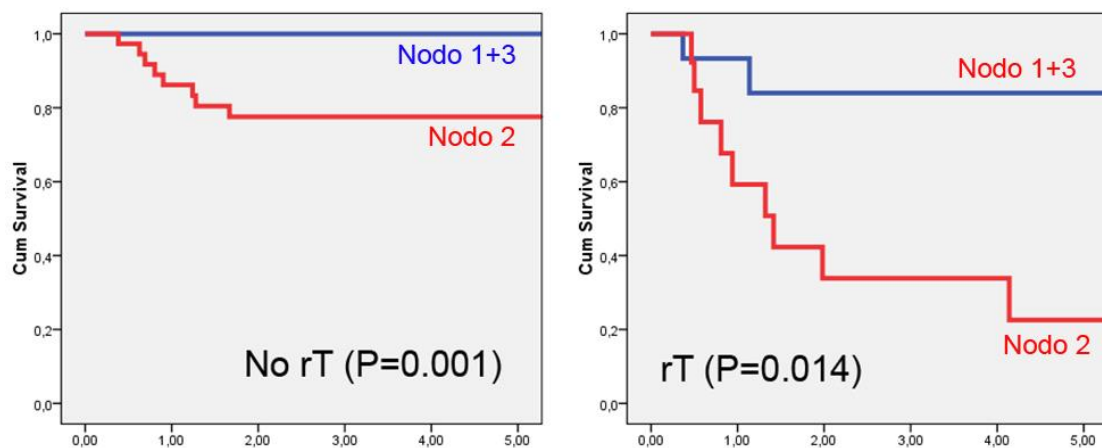
Se analizaron también los resultados en función del control obtenido a nivel local con el tratamiento inicial.

Para los pacientes en los que el tratamiento inicial consiguió el control local de la enfermedad ($n=83$), la supervivencia libre de recidiva regional a los 5 años para los pacientes con CXCL12 bajo / CXCR4 alto fue del 77.6% (IC 95%: 63.9-91.3) y para el resto de pacientes del 100%.

En el caso de los pacientes que contaron con una recidiva local de la enfermedad ($n=28$), la supervivencia libre de recidiva regional a los 5 años para los pacientes

con CXCL12 bajo / CXCR4 alto fue del 22.6% (IC 95%: 0.0-48.0) y para el resto de pacientes del 84.0% (IC 95%: 63.3-100)

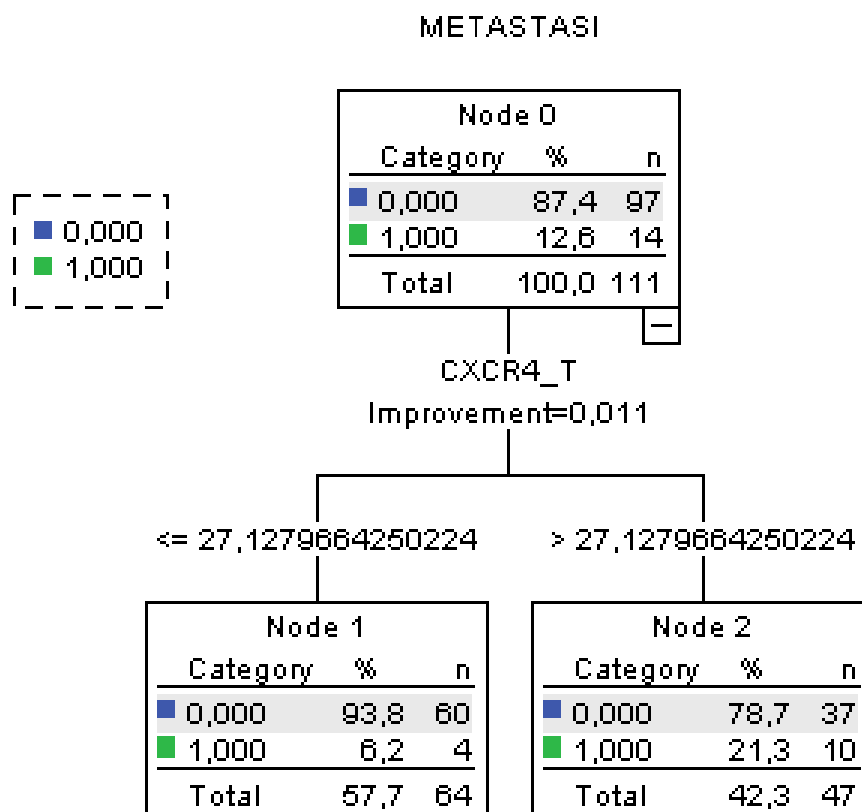
La siguiente figura muestra las curvas de supervivencia libres de recidiva regional en función de la categoría de expresión del eje CXCL12/CXCR4, considerando de forma conjunta los nodos 1 y 3, en función del control local de la enfermedad conseguido con el tratamiento inicial.



Al igual que en los casos anteriores, observamos un deterioro significativo en la supervivencia libre de recidiva regional para los pacientes con unos niveles bajos de CXCL12 / elevados de CXCR4 tanto en aquellos casos en los que el tratamiento inicial consiguió el control local de la enfermedad (no rT, P=0.001) como en los pacientes con una recidiva local (rT, P=0.014).

5.4.- Estudio de la supervivencia libre de metástasis a distancia

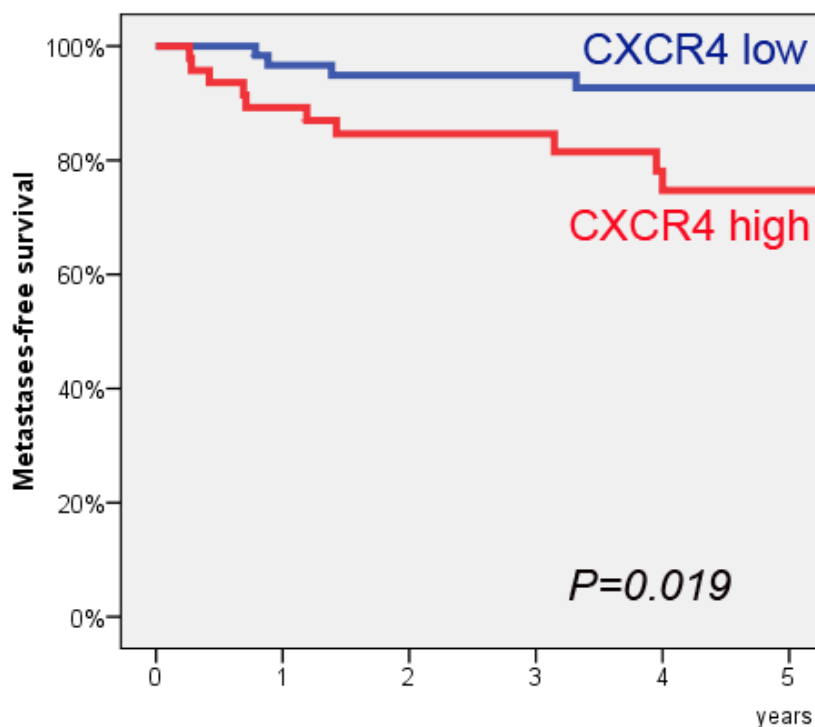
Finalmente, al considerar como variable dependiente la aparición de metástasis a distancia, el análisis de partición recursiva clasificó a los pacientes en función del nivel de expresión del CXCR4, sin incluir el CXCL12 en el árbol de clasificación.



Se definieron dos categorías de pacientes en función del riesgo de aparición de metástasis a distancia: pacientes con un nivel de expresión bajo de CXCR4 (n=64, 57.7%), que contaron con un riesgo bajo de aparición de metástasis y pacientes con expresión elevada de CXCR4 (n=47, 42.3%), con un riesgo de diseminación a distancia elevado. De acuerdo con el análisis de partición recursiva, el valor del punto de corte en el nivel de expresión del CXCR4 con una

mayor capacidad pronóstica en relación a la aparición de metástasis a distancia (27.13), fue superior al que definió las categorías en función del control regional (10.85) de la enfermedad.

La siguiente figura muestra las curvas de supervivencia actuarial libre de metástasis a distancia en función de las categorías de expresión obtenidas mediante el análisis de partición recursiva.



La supervivencia libre de metástasis a distancia a los 5 años para los pacientes con unos niveles de expresión bajos de CXCR4 de acuerdo con este nuevo análisis de partición recursiva (n=64) fue del 92.7% (IC 95%: 85.8-99.7). En cambio para los pacientes con unos niveles de expresión elevados (n=47) resultó del 74.7% (IC 95%: 60.6-88.8).

Existieron diferencias significativas en la supervivencia libre de metástasis a distancia en función del nivel de expresión de CXCR4 (P=0.019)

5.5.- Relación entre los niveles de expresión del eje CXCL12/CXCR4 y genes implicados en procesos de diseminación

Se llevó a cabo un estudio de correlación entre los valores de expresión transcripcional del eje CXCL12/CXCR4 y otros genes relacionados con la respuesta al tratamiento y la capacidad de diseminación. Entre ellos se incluyeron: las vías de la ciclooxigenasa (**COX**), **NFκB**, la interleucina-1 (**IL-1**), los marcadores leucocitarios (**CD45**, **MPO**, **MPC-1**), las metaloproteinasas 2 y 9 (**MMP-2**, **MMP-9**), las co-caperonas (**Hsp-90**) y las superóxido dismutasas: 1,2 y 3(**SOD-1 2 y 3**).

Las siguientes tablas, muestran los resultados numéricos de las correlaciones de Pearson obtenidas entre todas las variables estudiadas (en negrita, las correlaciones con significación estadística relacionadas con la vía CXCL12/CXCR4):

		CXCL12	CXCR4	COX-2	mPGES-1	mPGES-2	PGIS
CXCL12	Pearson	1	,473** ,000	,186 ,051	-,005 ,962	-,124 ,396	,243* ,011
CXCR4	Pearson	,473** ,000	1	,442** ,000	,154 ,108	,098 ,504	,335** ,000
COX-2	Pearson	,186 ,051	,442** ,000	1	,382** ,000	,338* ,018	,157 ,102
mPGES-1	Pearson	-,005 ,962	,154 ,108	,382** ,000	1	,919** ,000	,053 ,582
mPGES-2	Pearson	-,124 ,396	,098 ,504	,338* ,018	,919** ,000	1	,052 ,727
PGIS	Pearson	,243* ,011	,335** ,000	,157 ,102	,053 ,582	,052 ,727	1

		CXCL12	CXCR4	IL-1a	IL-1b	VEGF	MMP-2	MMP-9
CXCL12	Pearson	1	,473** ,000	-,012 ,899	-,054 ,572	,031 ,747	,092 ,339	,117 ,221
CXCR4	Pearson	,473** ,000	1	-,023 ,812	,088 ,361	,194* ,041	,241* ,011	,146 ,125
IL-1a	Pearson	-,012 ,899	-,023 ,812	1	,651 ,000	,217* ,022	-,042 ,664	-,030 ,753
IL-1b	Pearson	-,054 ,572	,088 ,361	,651** ,000	1	,251** ,008	,158 ,098	,123 ,198
VEGF	Pearson	,031 ,747	,194* ,041	,217* ,022	,251** ,008	1	,195* ,040	,128 ,179
MMP-2	Pearson	,092 ,339	,241* ,011	-,042 ,664	,158 ,098	,195* ,040	1	,411 ,000
MMP-9	Pearson	,117 ,221	,146 ,125	-,030 ,753	,123 ,198	,128 ,179	,411 ,000	1

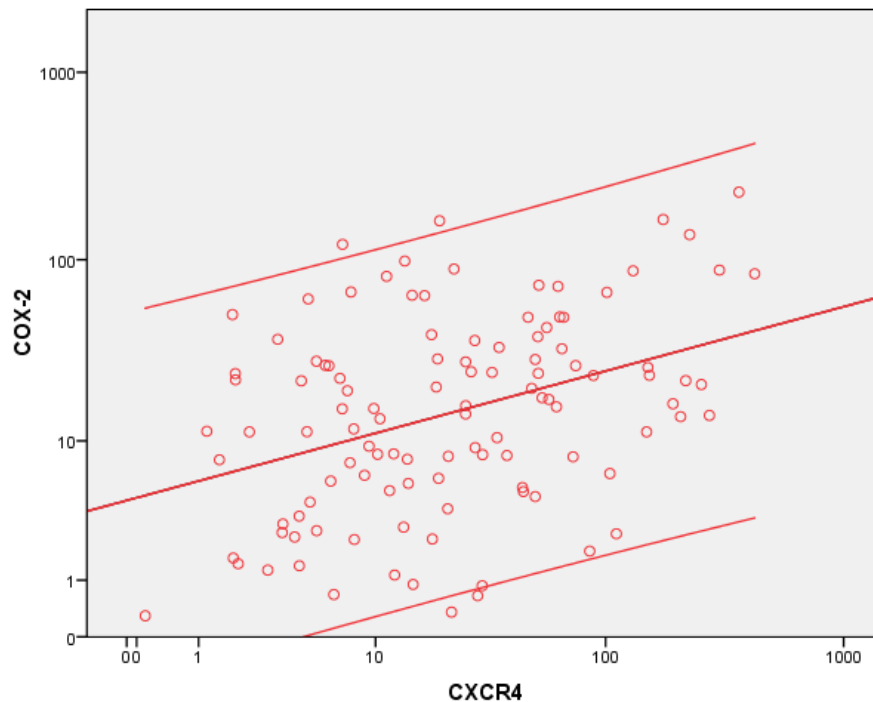
		CXCL12	CXCR4	CD45	MPO	NF-kB(p65)
CXCL12	Pearson	1	,473** ,000	,101 ,326	-,016 ,885	,011 ,910
CXCR4	Pearson	,473** ,000	1	,067 ,517	,001 ,989	,099 ,301
CD45_T	Pearson	,101 ,326	,067 ,517	1	,169 ,121	,170 ,098
MPO_T	Pearson	-,016 ,885	,001 ,989	,169 ,121	1	-,003 ,976
NF-kB(p65)	Pearson	,011 ,910	,099 ,301	,170 ,098	-,003 ,976	1

		CXCL12	CXCR4	SOD1	SOD2	SOD3	Hsp90AA
CXCL12	Pearson	1	,473 ,000	,226 ,056	,241* ,042	,060 ,616	,145 ,226
CXCR4	Pearson	,473** ,000	1	,108 ,365	,106 ,377	-,066 ,579	,116 ,331
SOD1(Cu/Zn)	Pearson	,226 ,056	,108 ,365	1	,679** ,000	-,058 ,631	,714** ,000
SOD2(Mn)	Pearson	,241* ,042	,106 ,377	,679** ,000	1	-,058 ,627	,683** ,000
SOD3(ec)	Pearson	,060 ,616	,679 ,579	-,058 ,631	-,058 ,627	1	,003 ,980
Hsp90AA	Pearson	,145 ,226	,116 ,331	,714** ,000	,683** ,000	,003 ,980	1

La expresión de CXCL12 se correlacionó, además de con CXCR4, sólo con el nivel de expresión de la **PGIS** (sintetasa específica de la síntesis de la prostaciclina o PGI₂) y la SOD-2.

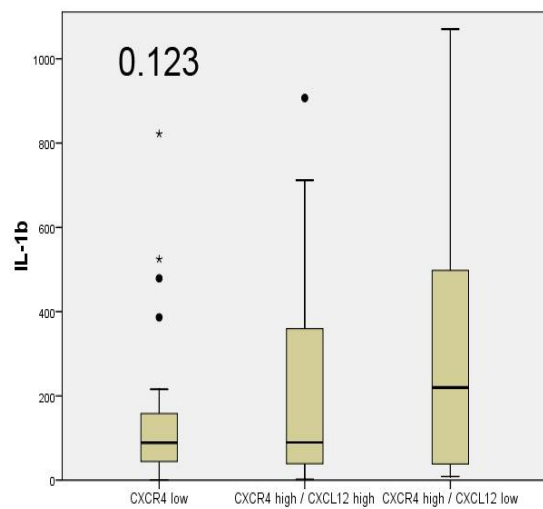
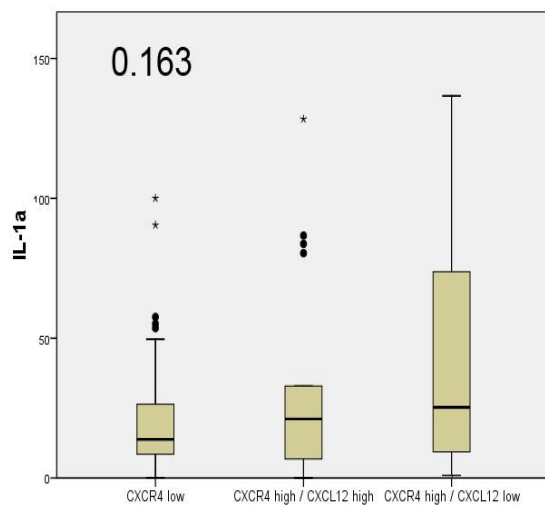
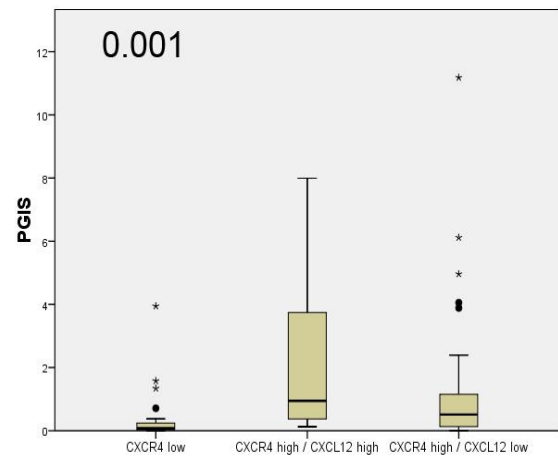
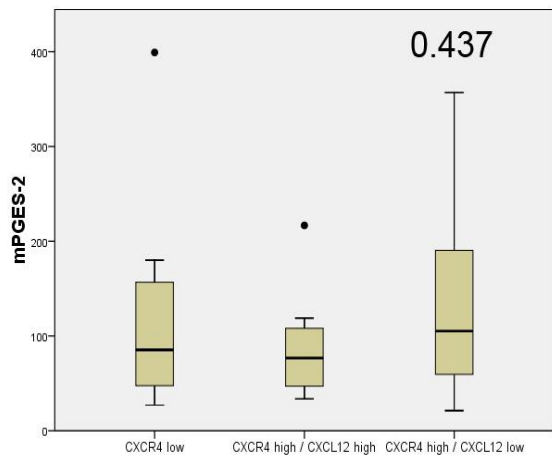
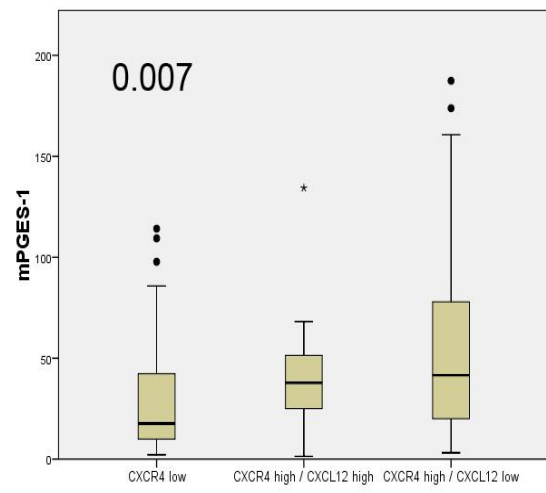
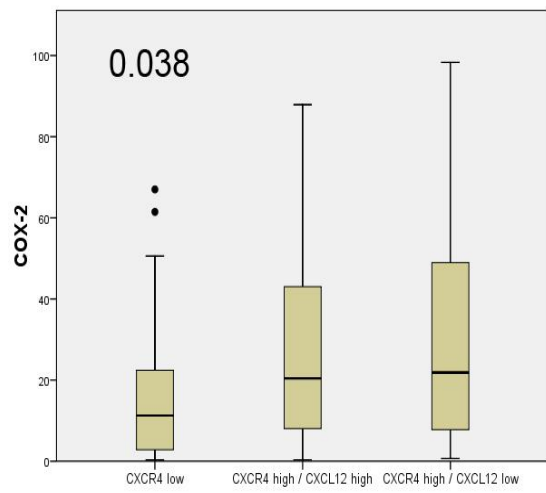
En el caso del CXCR4, además de con CXCL12, apareció una correlación que alcanzó el grado de significación estadística con COX-2, PGIS, y en menor medida con VEGF y MMP-2.

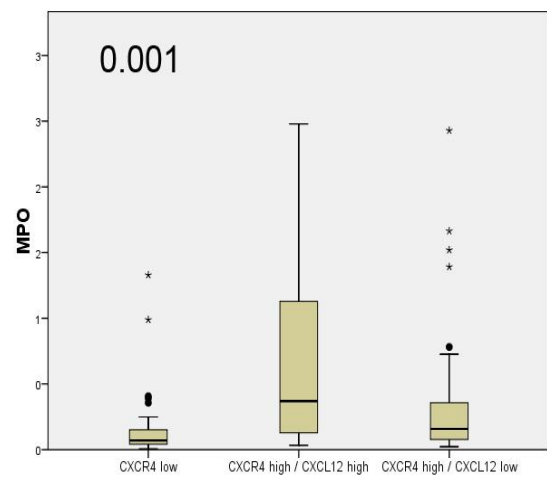
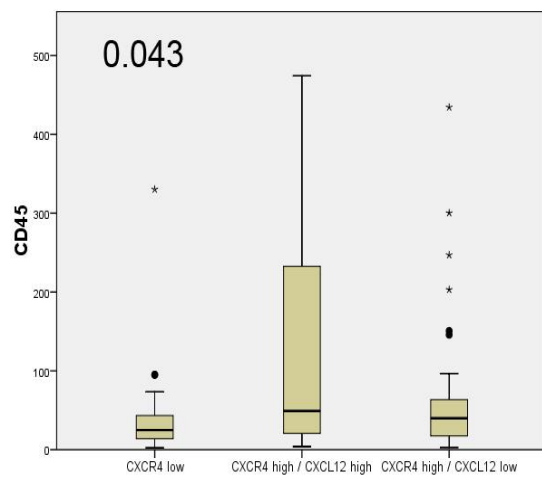
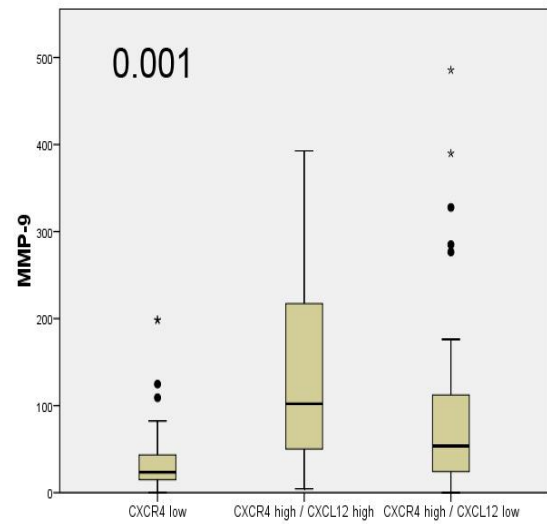
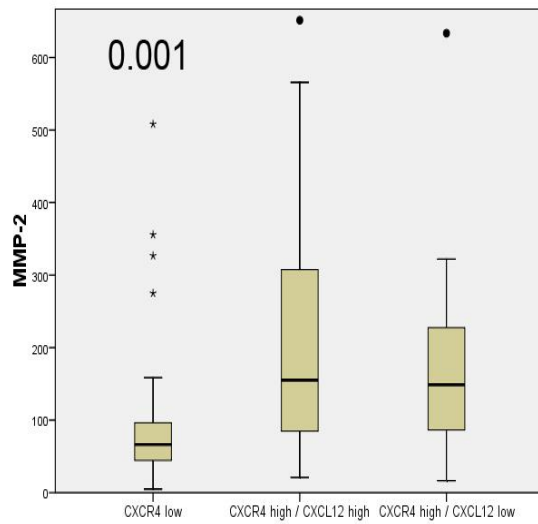
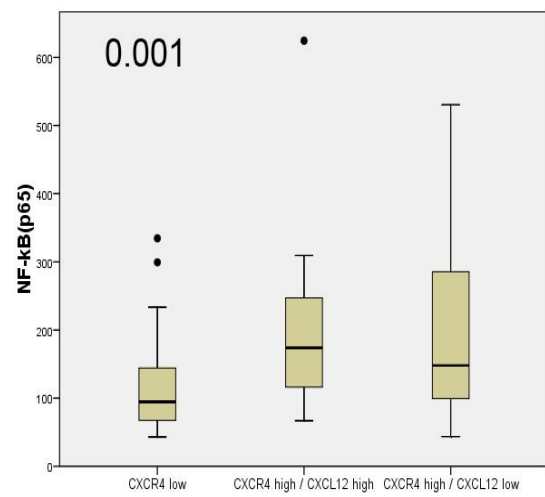
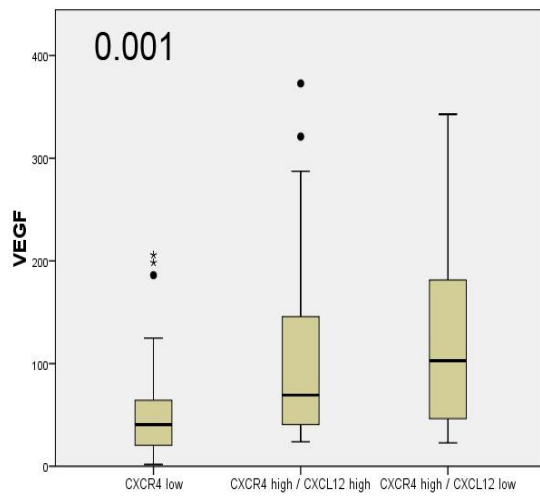
Cabe destacar la correlación existente entre CXCR4 y COX-2. La siguiente figura muestra a nivel gráfico la correlación existente entre los valores de expresión de ambos genes.

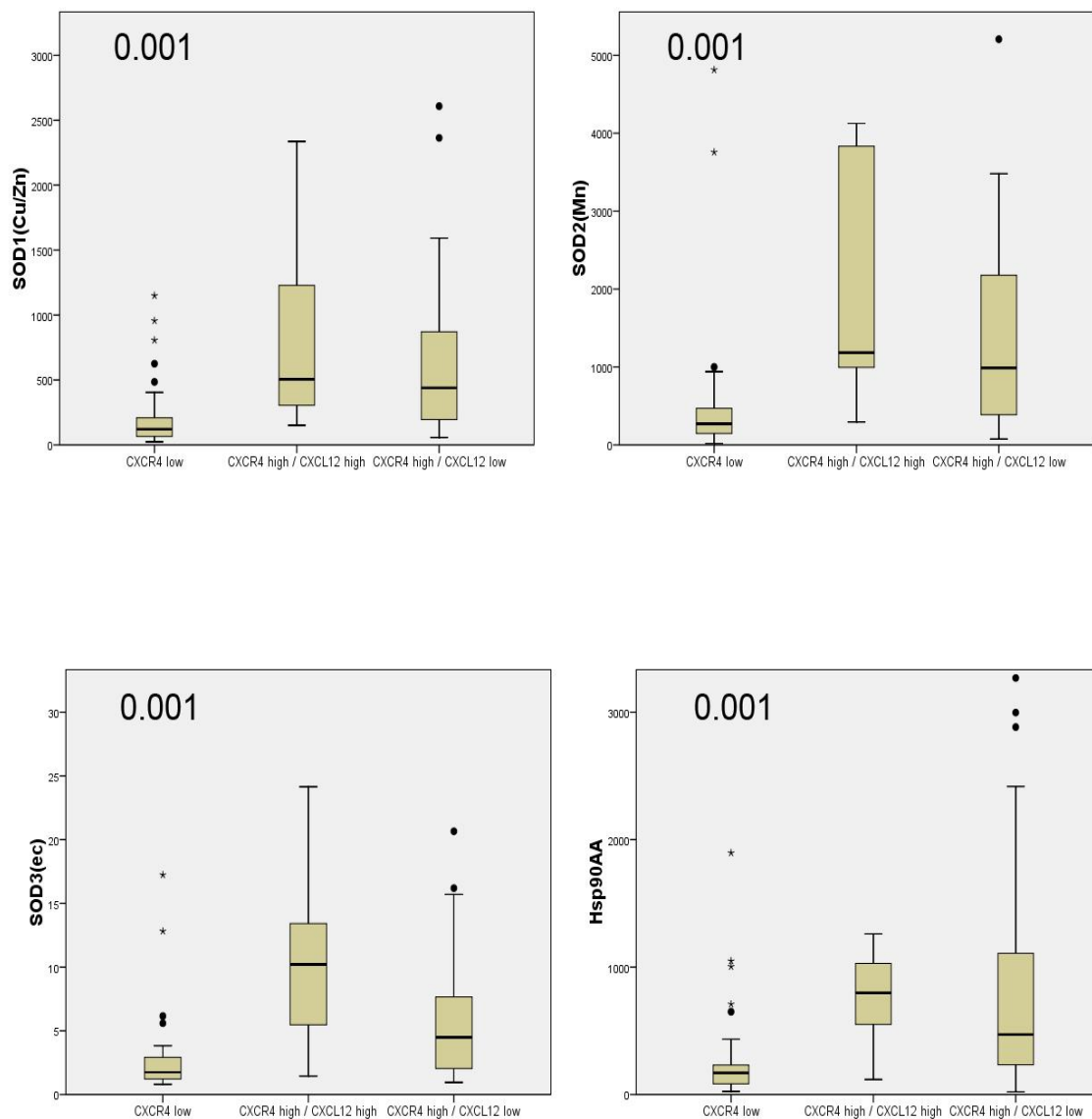


Se procedió a continuación a evaluar la distribución de los valores de expresión de los diferentes genes analizados en función de la categoría de expresión del eje CXL12/CXR4 con capacidad pronóstica en el control regional de la enfermedad (*nodo 1*: CXCR4 bajo, *nodo 2*: CXCL12 alto / CXCR4 alto y *nodo 3*: CXCL12 bajo / CXCR4 alto).

Las siguientes gráficas muestran los diagramas de caja (*boxplots*) que resumen la distribución de los genes evaluados en función de las diferentes categorías, así como el valor de significación correspondiente al test no paramétrico de Kruskal-Wallis.







El grupo de pacientes con unos niveles bajos de CXCR4 contaron también con una expresión disminuida de COX-2, mPGES-1, PGIS, VEGF, NFκB, MMP-2, MMP-9, CD45, MPO, las superóxido dismutasas, y la Hsp90.

En general, para los pacientes con unos niveles de expresión elevados de CXCR4, no aparecieron diferencias significativas en los valores de expresión de estos genes en función de la expresión de CXCL12.

6.- Discusión

Los pacientes con presencia de adenopatías metastásicas en el momento del diagnóstico (N+) reciben, además del tratamiento sobre la localización primaria del tumor, un tratamiento específico sobre las áreas ganglionares. Este tratamiento consiste, dependiendo de la extensión de la afectación regional, en la realización de vaciamientos cervicales, radioterapia o quimioradioterapia, o un combinación de estos tratamientos.

Salvo los casos de tumores iniciales de localización glótica (T1-T2) y de algunos tumores muy superficiales de cavidad oral, dado el riesgo de afectación ganglionar oculta, para la mayoría de pacientes con CECC sin afectación ganglionar (N0) está indicado igualmente la realización de un tratamiento electivo, que dependiendo del tratamiento efectuado sobre la localización primaria del tumor, suele consistir en una cirugía ganglionar o radioterapia²⁴.

La aparición de una recidiva regional comporta un mal pronóstico. Un porcentaje variable de pacientes con recidiva a este nivel, entre el 26%⁷⁹ y el 88%⁸⁰ dependiendo de las series, no son considerados candidatos a tratamiento de rescate con intención radical. Para los pacientes sometidos a tratamientos de rescate, los resultados obtenidos consiguen el control de la enfermedad entre el 35% y el 60%⁸¹.

El disponer de biomarcadores con una capacidad predictiva del control de la enfermedad a nivel cervical en los pacientes con carcinomas de cabeza y cuello, contaría con una elevada utilidad. Permitiría intensificar los tratamientos en aquel grupo de pacientes con un mayor riesgo de fracaso regional, de lo que podría

derivarse un incremento en el control final de la enfermedad y a la postre en un hipotético aumento de la supervivencia.

Así como existen una gran cantidad de estudios que analizan la relación entre la expresión de diferentes vías de carcinogénesis y el control de la enfermedad a nivel local⁸², son muy pocos los que analizan de forma específica la existencia de biomarcadores con capacidad pronóstica a nivel regional.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, la evaluación de la expresión del eje CXCL12/CXCR4 a nivel transcripcional permite clasificar a los pacientes en función del riesgo de sufrir una recidiva del tumor a nivel ganglionar una vez completado el tratamiento oncológico.

Los pacientes con unos niveles de expresión bajos de CXCR4 contarían con un riesgo bajo de recidiva regional. Para los pacientes con una expresión elevada de CXCR4, el riesgo de recidiva ganglionar se relacionaría con la expresión del CXCL12: los pacientes con unos niveles de expresión elevados contarían con un riesgo bajo de recidiva, en tanto que los pacientes con unos valores de expresión de CXCL12 bajos serían los que contarían con una mayor probabilidad de recidiva del tumor a nivel regional.

Cabe destacar el hecho que las categorías de expresión del eje CXCL12/CXCR4 obtenidas a partir del sistema de partición recursiva, mantuvieron de una forma sistemática la capacidad pronóstica, tanto al considerar la afectación ganglionar inicial (N0 versus N+) como al considerar el tipo de tratamiento efectuado sobre las áreas ganglionares (cirugía *versus* radioterapia o quimioradioterapia) o el

control sobre la localización primaria del tumor conseguido con el tratamiento inicial.

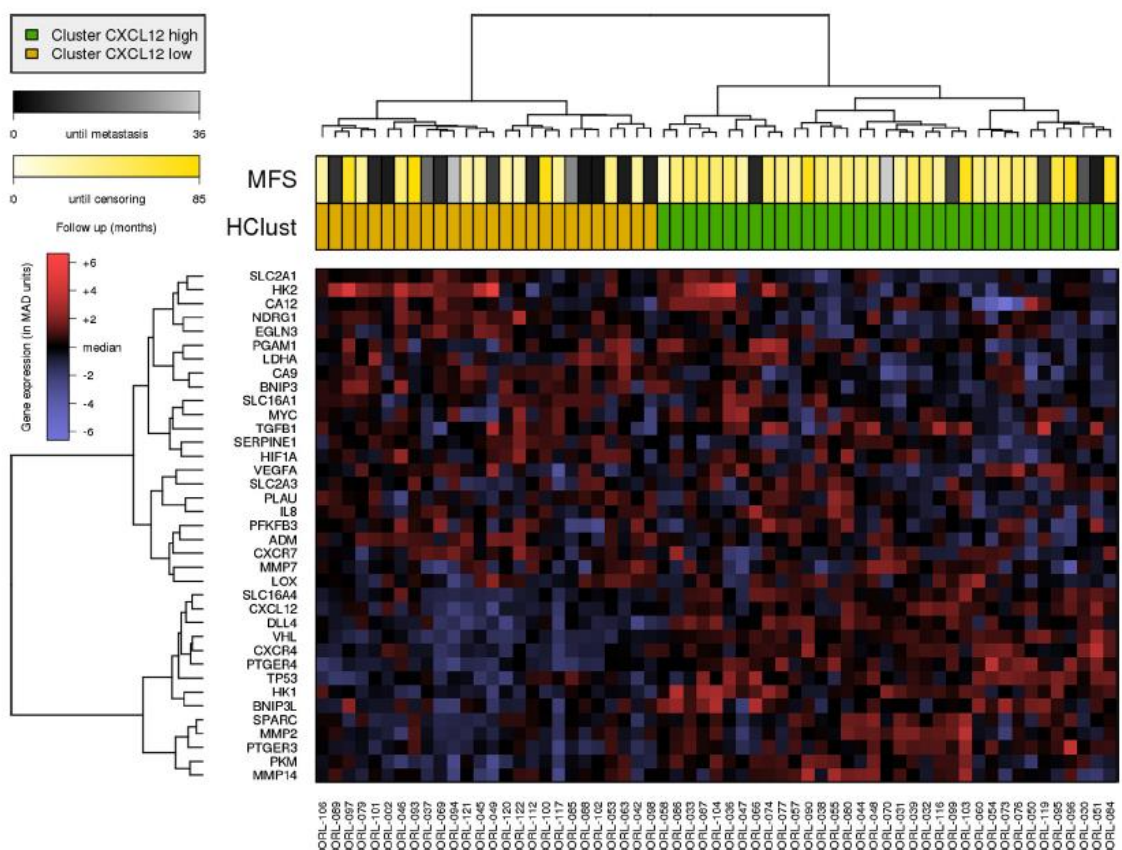
Pensamos que esta consistencia en el mantenimiento de la capacidad pronóstica de la expresión del eje CXCL12/CXCR4 en estas diferentes situaciones, avala su utilidad como un biomarcador de control regional de la enfermedad.

En un estudio realizado en 71 pacientes con CECC tratados mayoritariamente con cirugía y radioterapia postoperatoria, Clatot y cols.³² también encontraron una relación entre el riesgo de recidiva metastásica y el nivel de expresión del CXCL12 medido mediante PCR. Los pacientes con unos niveles bajos de expresión de CXCL12 contaron con un riesgo significativamente superior de recidiva metastásica, definida como una recidiva regional o a distancia de la enfermedad. De acuerdo con los resultados de un estudio multivariante, las variables que se relacionaron con la supervivencia libre de metástasis fueron un nivel de expresión bajo de CXCL12 ($P=0.021$) y la presencia de adenopatías metastásicas con ruptura capsular ($P=0.001$). Los autores no encontraron relación entre la presencia de metástasis ganglionares con ruptura capsular en los vaciamientos realizados en su cohorte de pacientes y los niveles de expresión de CXCL12 ($P=0.66$).

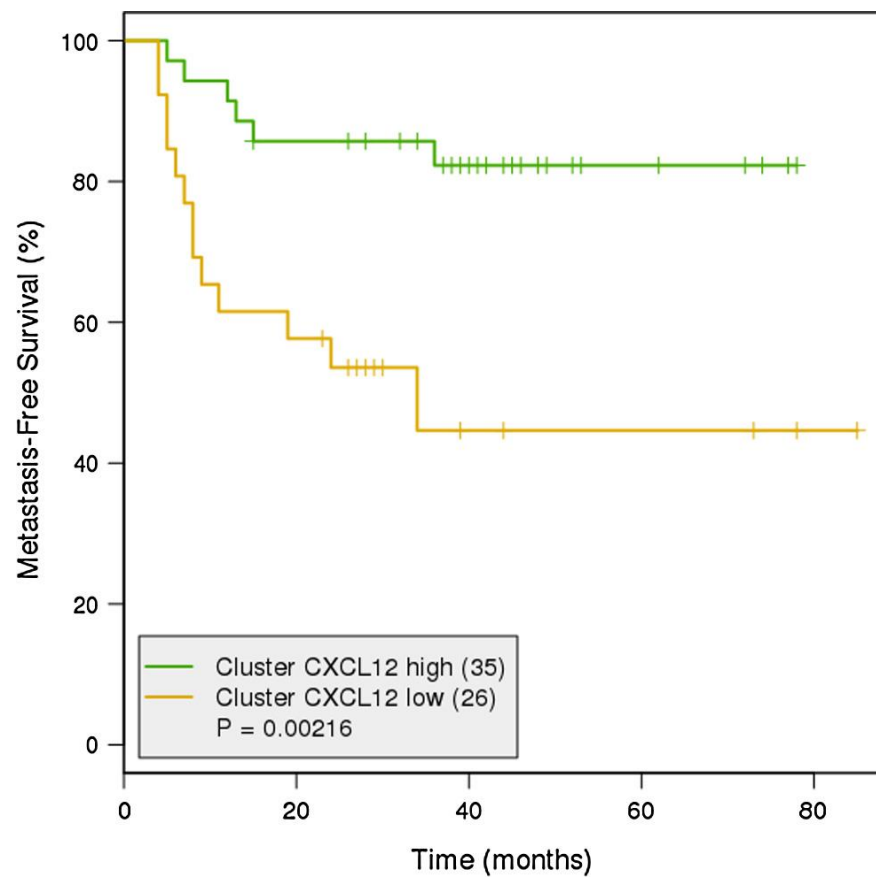
De acuerdo con nuestros resultados, no encontramos relación entre la presencia de adenopatías metastásicas con ruptura capsular y la expresión de CXCL12 o CXCR4 en nuestro grupo de pacientes ($P=0.948$ y $P=0.743$, respectivamente).

En otro estudio realizado por el mismo grupo de autores, se valoró la expresión transcripcional de 42 genes en una cohorte de 61 pacientes con CECC y se

evaluó la supervivencia libre de metástasis, definida como la aparición de enfermedad fuera de la localización primaria del tumor⁸³. A partir de un análisis no supervisado se definió un “cluster” de pacientes con un elevado potencial de metastatización definido como “**CXCL12 bajo**”. En estos, los genes relacionados con las interacciones con la matriz extracelular y el proceso inflamatorio (*MMPs*, *CXCL12*, *TGF-β*, *PLAU* y *PTGER3-4*) se encontraban infraexpresados, mientras que muchos genes relacionados con hipoxia (*HIF-1α*, *VEGF-A* y *BNIP3*) y con el metabolismo del lactato (*SLC16A1*, *LDHA*, *CA-9* y *SLC2A1*) se encontraban sobreexpresados. El grupo opuesto denominado “**CXCL12 elevado**”, de mejor pronóstico, contó con un perfil de expresión justamente opuesto.



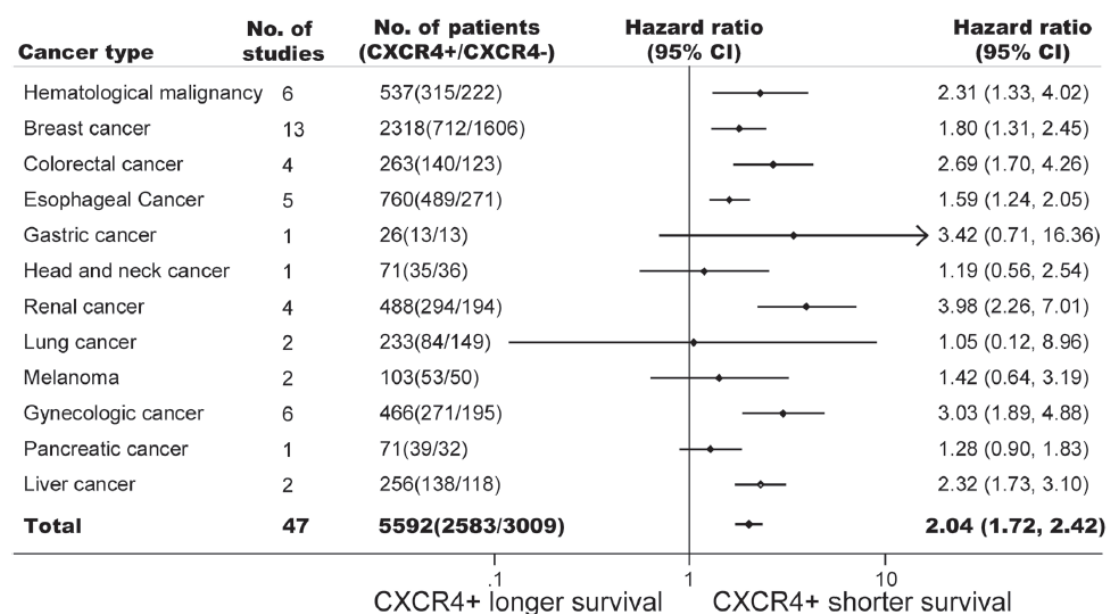
La siguiente figura muestra la supervivencia libre de metástasis para los dos grupos de pacientes:



Otros autores han encontrado un empeoramiento de la supervivencia en pacientes con tumores de CECC con expresión elevada de CXCR4^{60,64,66,69}, pero sin especificar si el deterioro de la supervivencia era debido a un fracaso en el control local, regional o a distancia de la enfermedad.

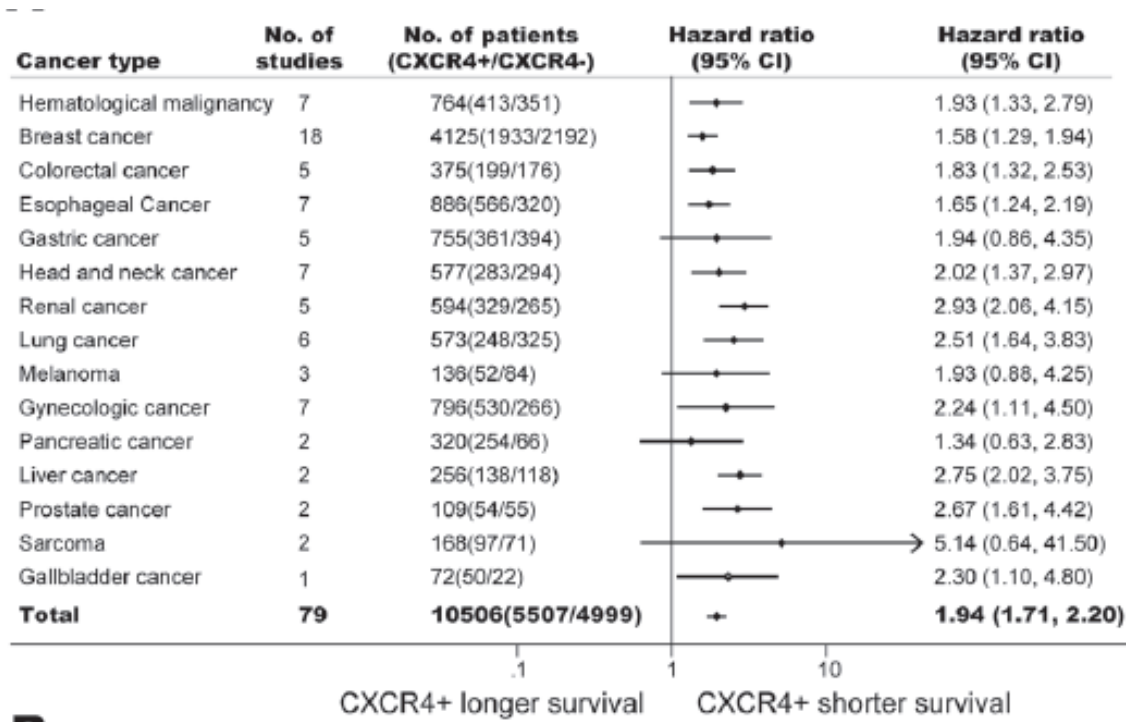
A este respecto, es interesante la reciente revisión y meta-análisis hecho por Zhao y cols.⁸⁴, en la que se seleccionan y analizan 85 estudios, de diferentes tipos de cánceres, de los cuales 7 son de pacientes con CECC. En ellos se mide la relación entre la sobreexpresión del CXCR4 y la supervivencia global y la supervivencia libre de recidiva.

El estudio de la sobreexpresión de CXCR4 y la supervivencia libre de recidiva en 12 tipos diferentes de cáncer está resumido en el siguiente gráfico.



Se puede observar que en el único estudio analizado sobre CECC no resultó concluyente en cuanto a ésta relación, HR=1.19 (IC95%: 0.58-2.54).

Sin embargo, al analizar la relación entre la sobreexpresión CXCR4 y la supervivencia global en 7 estudios realizados con pacientes con CECC, los autores encontraron una asociación significativa entre sobre-expresión CXCR4 y una menor supervivencia, con un HR=2.20 (IC95%: 1.37-2.97).



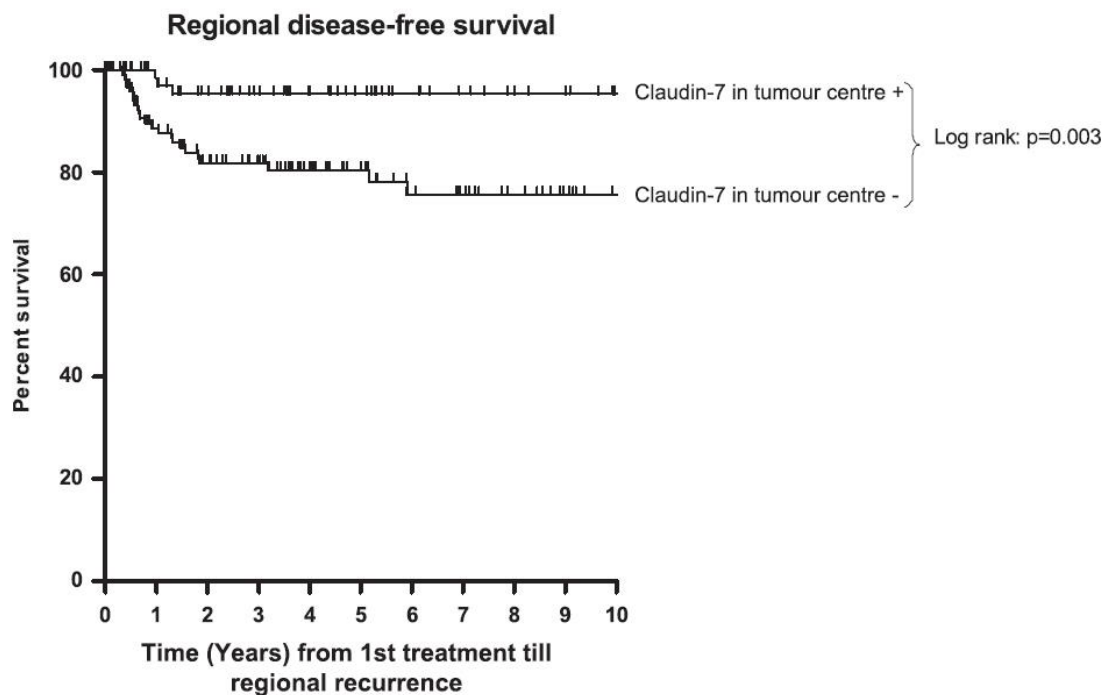
Los autores concluyen proponiendo la sobre-expresión de CXCR4 como un factor de riesgo independiente de la disminución de la supervivencia.

En otro estudio en el que se analizan biomarcadores con capacidad pronóstica en relación al control regional de la enfermedad en pacientes con carcinomas escamosos de cabeza y cuello, Melchers y cols.⁸⁵ encontraron una relación entre la expresión de la **claudina-7**, una proteína implicada en la formación de las “*zónula occludens*” (tight junctions) intercelulares y el riesgo de recidiva ganglionar.

Los autores llevaron a cabo un estudio inmunohistoquímico en que evaluaron la expresión de **E-cadherina**, una proteína que participa en la adhesión celular, **EpCAM**, cuya expresión debilita la adhesión mediada por la E-cadherina y la claudina-7, en una cohorte de 227 pacientes con carcinomas de cavidad oral y

orofaringe tratados de forma quirúrgica. Encontraron una relación entre la ausencia de expresión de E-cadherina a nivel de membrana y la sobre-expresión citoplasmática de EpCAM y la afectación ganglionar (pN+).

En el caso de la claudina-7, un 38% de los pacientes mostraron positividad sin que ésta se asociase con la afectación ganglionar. Sin embargo, pudo observarse una relación significativa entre la positividad frente a la claudina-7 y el control regional. Los pacientes con positividad a la claudina-7 tuvieron una supervivencia libre de recidiva regional significativamente más elevada, tal como muestra el siguiente gráfico:



No existieron diferencias significativas en el control local o a distancia de la enfermedad y la expresión de claudina-7. De acuerdo con los resultados de un estudio multivariante, las variables que se relacionaron de forma significativa con

el control regional de la enfermedad fueron la categoría de afectación ganglionar pN (HR=5.0, IC 95%: 2.0-12.7) y la expresión de la Claudina-7 (HR=0.19, IC 95%: 0.21-0.87).

Una de las condiciones necesarias para que un paciente sufra la aparición de una recidiva a nivel regional es, en primer lugar, que el tumor cuente con la capacidad de diseminación a nivel regional. En este sentido, existen numerosos estudios realizados mayoritariamente a partir de un análisis inmunohistoquímico de las muestras, que han encontrado una relación significativa entre la actividad del eje CXCL12/CXCR4 y la aparición de metástasis ganglionares en los pacientes con carcinomas escamosos de cabeza y cuello. Diferentes estudios han encontrado que los tumores de pacientes con CECC y afectación regional en el momento del diagnóstico (N+), tenían unos niveles de positividad inmunohistoquímica frente al CXCR4 significativamente superiores^{60,61,63,64,67,69}.

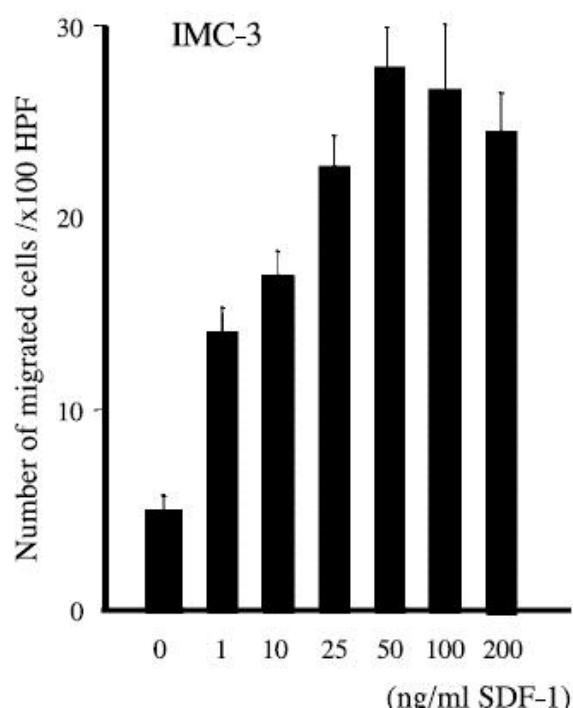
A nivel de expresión transcripcional, Ueda y cols.⁶⁵ encontraron una relación significativa de los valores de CXCR4 mRNA medido mediante RT-PCR y el estado ganglionar en 25 pacientes con carcinomas escamosos de cabeza y cuello. En el lecho tumoral, la positividad del CXCL12 apareció expresada de forma preferente a nivel de las células del estroma^{60,63,68}, sin que aparecieran diferencias significativas en los niveles de expresión del tumor primario en función de la presencia de metástasis ganglionares en el momento del diagnóstico, ya fuera en estudios inmunohistoquímicos^{63,67} o de análisis de la expresión transcripcional³².

De acuerdo con nuestros resultados, no existieron diferencias significativas en la expresión transcripcional de CXCL12 ni de CXCR4 en relación al estado ganglionar en el momento del diagnóstico inicial.

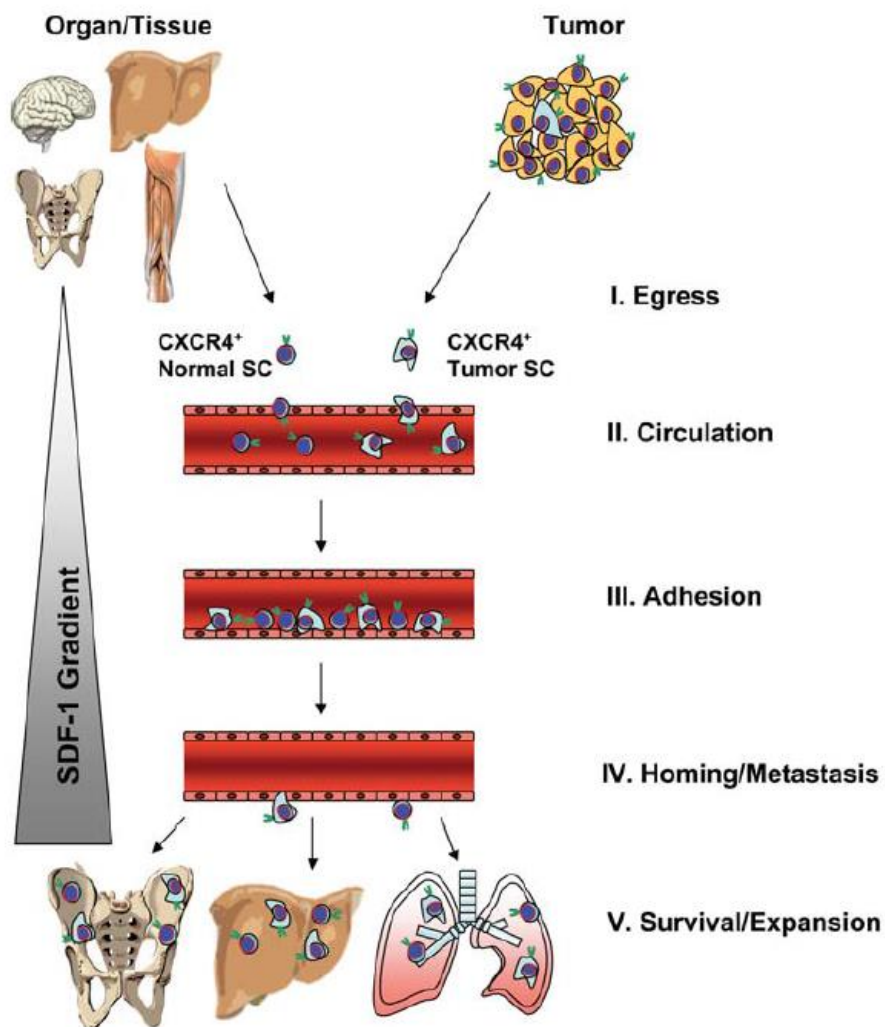
Quedaría por determinar si existen mecanismos de regulación postranscripcionales que modificasen la expresión de las proteínas diana de este eje y que pudieran justificar la discrepancia entre los resultados obtenidos en los diferentes estudios inmunohistoquímicos y los obtenidos a partir de nuestras determinaciones de mRNA.

Uchida y cols.⁵⁹ y Katayama y cols.⁶⁰ encontraron un gradiente en la expresión de CXCL12 entre la localización primaria del tumor y las áreas ganglionares, de manera que, el grado de positividad en los ganglios metastásicos fue significativamente superior al que estaba presente en la localización primaria del tumor.

La siguiente figura muestra como en un experimento de quimiotaxis, la migración de una línea celular de CECC que era CXCR4 positiva (IMC-3), se incrementó de forma dosis dependiente a la concentración de CXCL12⁶⁰.



A partir de estos hallazgos los autores establecieron una hipótesis de acuerdo con la cual, las metástasis a nivel ganglionar o a distancia dependerían de células tumorales CXCR4 positivas en función de un gradiente de CXCL12.



Una hipótesis que puede establecerse a partir de nuestros resultados, es que uno de los mecanismos que favorecería la aparición de metástasis ganglionares o a distancia sería la positividad de CXCR4.

Las células tumorales con una escasa expresión de CXCR4, no tendrían el receptor adecuado para movilizarse a partir de la existencia de un gradiente de CXCL12.

La otra condición para que se produjese la migración celular sería la existencia de dicho gradiente. En los tumores con unos niveles de expresión elevados a nivel del microambiente tumoral de CXCL12, no existirían discrepancias notables entre la concentración local de CXCL12 y la existente en los órganos diana, por lo que no se establecería un gradiente adecuado que indujese la migración de la célula tumoral. Por el contrario, los tumores con unos niveles de expresión bajos de CXCL12 serían aquellos que contarían con dicho gradiente, justificando nuestros hallazgos y los establecidos por el grupo de Clatot y cols.^{32,83}.

Estudios “in vitro” han podido determinar cómo este incremento en la capacidad de diseminación a nivel ganglionar relacionada con la expresión del eje CXCL12/CXCR4, sería consecuencia de una serie de alteraciones en el comportamiento celular relacionadas con la activación de dicho eje.

La activación del eje CXCL12/CXCR4 en líneas celulares de CECC comportó un incremento “in vitro” de la capacidad de migración e invasión. Entre los mediadores que justifican este incremento en la agresividad celular mediada por CXCL12/CXCR4 se han podido estudiar la activación de las vías:

ERK-1/2^{59,60,63,71,73}, Akt^{59,60,73} y NFκB⁷³.

Por su parte, el bloqueo del eje CXCL12/CXCR4 comportó una disminución de la capacidad invasiva y migración celular^{66,74}, así como de la capacidad de inducir “in vivo” la aparición de metástasis en modelos experimentales^{59,66}. Este

incremento en la capacidad de invasión y metastatización se ha correlacionado con el incremento en la actividad de MMP-9^{64,71} y MMP-13⁶³.

Por otra parte, varios autores han comprobado la capacidad del eje CXCL12/CXCR4 en inducir “in vitro” los cambios fenotípicos relacionados con el proceso de transición epitelial-mesenquimal, como uno de los elementos favorecedores de la capacidad de invasión y metástasis por parte de las células tumorales^{70,72}.

El otro elemento a considerar, en el caso de que un paciente sufra la aparición de una recidiva a nivel regional, es que los depósitos metastásicos existentes a nivel de las áreas ganglionares hayan contado con la capacidad de resistir el tratamiento efectuado a dicho nivel.

En el caso de un tratamiento quirúrgico, la recidiva suele aparecer fuera de las áreas tratadas o en caso de tumores extensos, con afectación ganglionar extracapsular, a nivel del lecho de resección.

En recidivas tras radioterapia o quimioradioterapia, las recidivas afectan áreas marginales no incluidas en los campos de tratamiento o, con una mayor frecuencia, aparecen en las áreas de drenaje del tumor inicial, indicando una capacidad por parte del tumor a nivel regional de resistencia frente al tratamiento administrado.

A partir de datos indirectos como la capacidad de inducir el proceso de transición epitelial-mesenquimal y la relación existente entre la promoción de este proceso y la resistencia al tratamiento^{86,87}, sería sensato considerar que las células que

cuentan con una activación del eje CXCL12/CXCR4 contarían con una menor sensibilidad a los tratamientos con radioterapia o quimioradioterapia.

Hasta donde sabemos, no existen estudios que hayan analizado la existencia de diferencias en la sensibilidad a los tratamientos oncológicos en función del nivel de activación de CXCL12/CXCR4 en los CECC. Sin embargo, existen evidencias obtenidas de otros modelos tumorales que señalan este eje como diana terapéutica.

Actualmente se han desarrollado tres clases de antagonistas CXCR4:

- (1) antagonistas no péptidos de CXCR4: **AMD3100** y **AMD3465**⁸⁸;
- (2) antagonistas peptídicos: **T140** y su análogo **TN14003**⁸⁹, **ALX40-4C**⁹⁰, o **BKT140**; y (3) anticuerpos anti-CXCR4: **MDX-1338**.

Estudios experimentales han evidenciado como el tratamiento concomitante con **AMD3100** añadido a la radioterapia, conduce a una disminución en la proliferación celular e incrementa el control en tumores de pulmón, mama⁹¹ o próstata⁹². Por otra parte, estudios “in vitro” e “in vivo” han demostrado como el antagonista peptídico **BKT140**, incrementó los efectos terapéuticos del cisplatino, el paclitaxel o la radioterapia en un modelo de carcinoma pulmonar no microcítico⁹³.

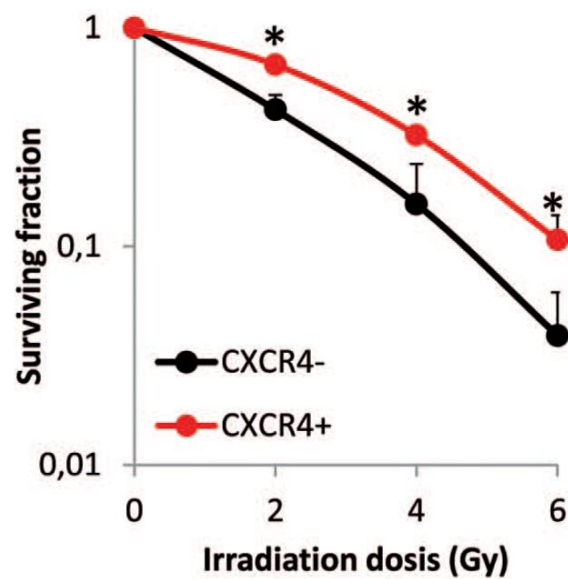
No existen ensayos clínicos que hayan evaluado la capacidad terapéutica de la inhibición de CXCR4 en combinación con tratamientos con radioterapia. Los datos preclínicos obtenidos en diferentes modelos tumorales indican que la expresión intratumoral de CXCL12 se incrementa tras el tratamiento la irradiación a partir de la activación de las vías TGF- β y HIF-1 α .

La presencia de CXCL12 promovería el reclutamiento de monocitos y macrófagos circulantes que participarían en los procesos de neo-vascularización y repoblación

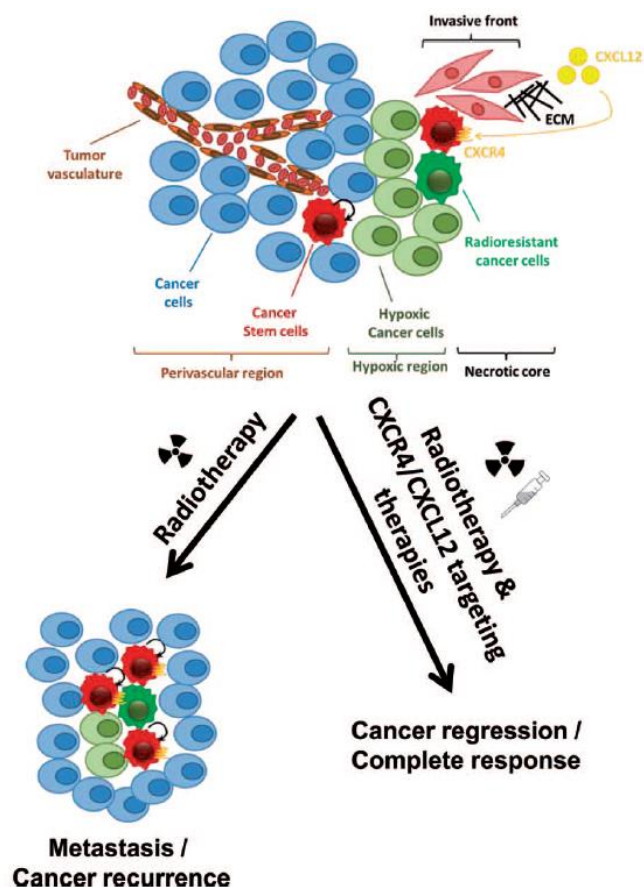
celular. Uno de los mecanismos que justificarían una actividad como radiopotenciador de los inhibidores de CXCR4, sería la capacidad de disminuir estos procesos de neovascularización y linfangiogénesis^{91,94}.

Por otra parte tal como se señalaba anteriormente, la vía CXCL12/CXCR4 se encuentra ampliamente activada en las “*cancer stem cells*” (CSC) de diferentes tipos de tumor, incluidos los CECC y su actividad es crucial para el mantenimiento de las características clonogénicas y el potencial carcinogénico de estas células, así como para el desarrollo de la capacidad de resistencia a los tratamientos.

De acuerdo con los resultados obtenidos por Traumann y cols.⁹⁵, la sobre-expresión de CXCR4 podría ser uno de los acontecimientos biológicos asociados a la resistencia al tratamiento con radioterapia. Los autores desarrollaron unos clones radioresistentes de células de carcinoma prostático, que compartían características propias de las CSC como son: la positividad frente a CD133, ALDH, ABCG2 y CXCR4, así como un incremento en la potencialidad clonogénica, de formación de esferas y de migración. Una comparación entre las células parenterales y los clones radioresistentes evidenció que estos últimos, además de tener un incremento en la expresión de vías que se han relacionado con las “*stem cells*” como Wnt, Notch y TGF- β , contaron con un incremento marcado en la actividad CXCR4. A partir de una comparación en la radiosensibilidad de las células tumorales en función de su expresión de CXCR4; los autores pudieron comprobar como las células CXCR4 positivas contaron con una mayor resistencia al tratamiento que las negativas.

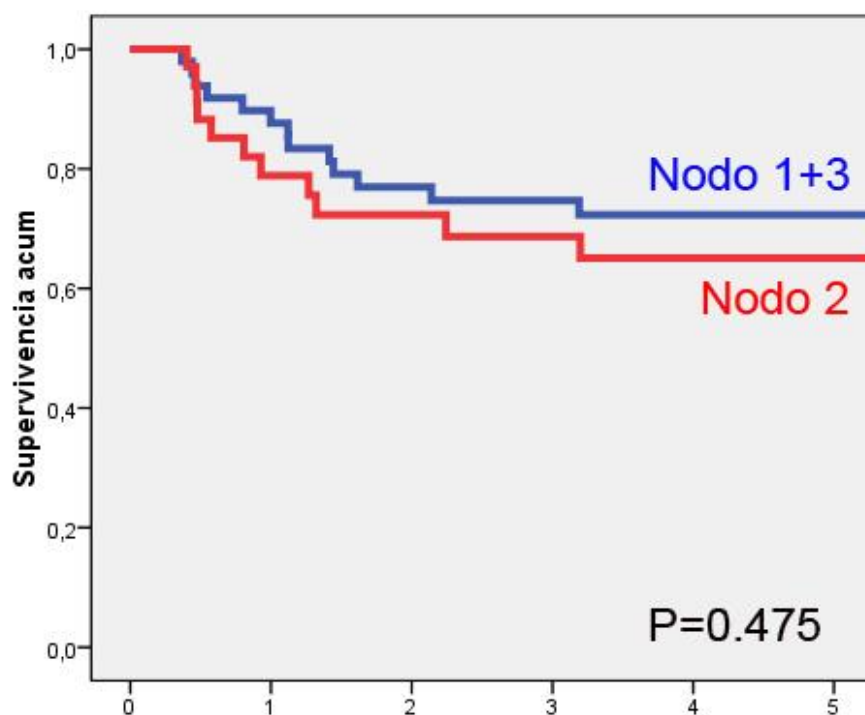


Dado que la curación de los tumores sólo puede ser conseguida si se elimina la totalidad de las “*cancer stem cells*”, de acuerdo con los autores el tratamiento con terapias dirigidas al bloqueo de la actividad CXCR4 en combinación con los tratamientos estándar podría contar con un papel terapéutico relevante.

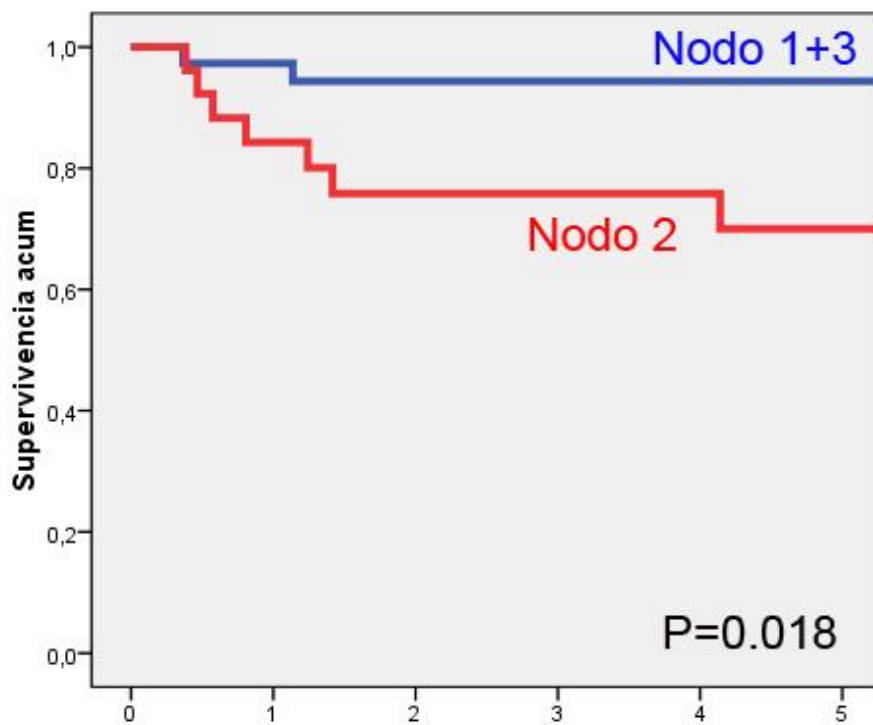


Quedaría por determinar las causas que determinan la existencia de una diferencia en el comportamiento a nivel local y regional del tumor en función de la actividad del eje CXCL12/CXCR4.

A nivel de la localización primaria del tumor y considerando tan sólo el grupo de pacientes tratados de forma no quirúrgica, no encontramos diferencias en el control local conseguido con el tratamiento en función de las categorías de expresión de CXCL12/CXCR4.



Por el contrario, sí que aparecieron diferencias en el control regional al considerar los pacientes tratados de manera no quirúrgica a nivel cervical.

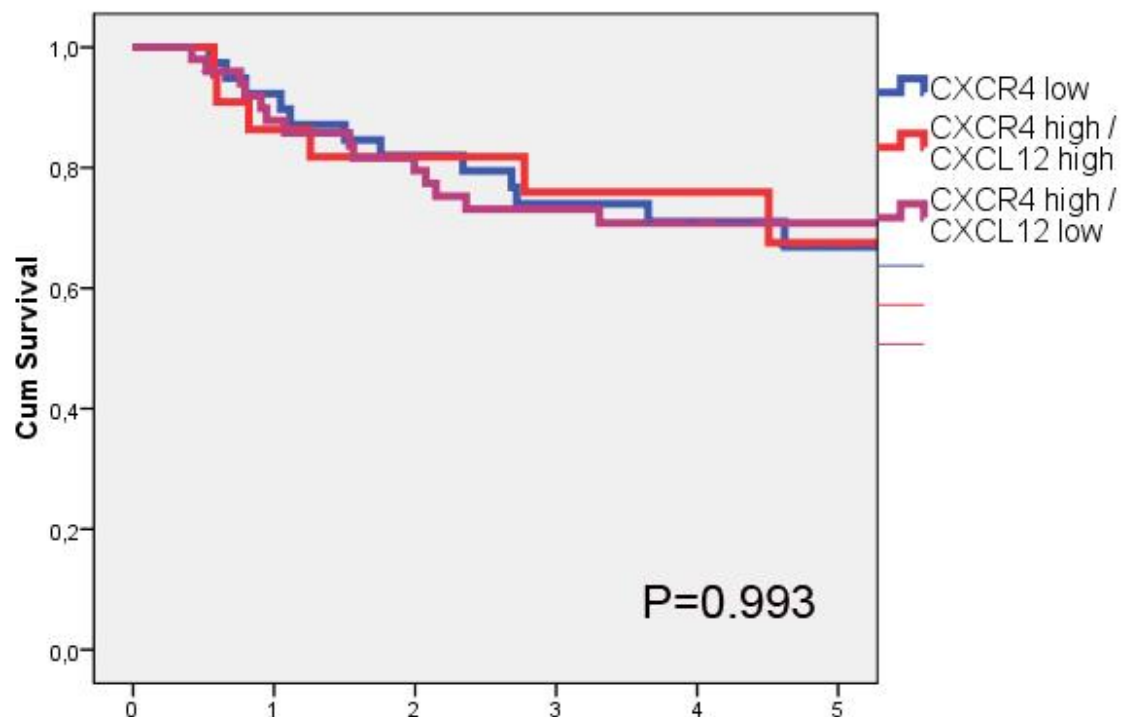


Además de atribuir estas diferencias a que la categorización de los pacientes se realizó en función del control regional de la enfermedad, otra explicación plausible sería la posibilidad de que el nivel de activación del eje CXCL12/CXCR4 sea diferente en el tumor primario y en la localización regional.

Tal como ha quedado establecido a partir de los estudios realizados por diferentes autores, los niveles de expresión del CXCL12 eran superiores en el tejido linfático, y esta diferencia de expresión sería la que crea el gradiente que facilita la metastatización ganglionar de las células CXCR4 positivas. La presencia de un microambiente tumoral rico en CXCL12 actuando sobre una población de células tumorales CXCR4 positivas activaría el receptor. Esta activación del receptor a nivel regional podría ser la responsable de cambios en la sensibilidad de las células tumorales al tratamiento con quimioterapia o quimioradioterapia. De acuerdo con esta hipótesis, el nivel de ligando presente en la localización primaria

del tumor no contaría con la capacidad de activar de manera suficiente el receptor, y en consecuencia, no alteraría su sensibilidad a los tratamientos.

Un elemento de discrepancia en nuestros resultados en relación con los obtenidos con el resto de autores, sería la ausencia de capacidad pronóstica en relación a la supervivencia ajustada en función de la expresión del eje CXCL12/CXCR4. Una mayoría de los autores revisados han señalado que los pacientes con unos niveles elevados de CXCR4 contaron con una peor supervivencia, en tanto que de acuerdo con nuestros resultados, no aparecieron diferencias en la supervivencia final de la enfermedad de acuerdo con la categoría de expresión del eje CXCR4/CXCL12, tal como muestran las siguientes curvas de supervivencia.



Pensamos que son varios los motivos que podrían explicar esta discrepancia. En primer lugar, la mayoría de trabajos evalúan la actividad del eje CXCL12/CXCR4 a partir de un estudio inmunohistoquímico. Tal como señalamos previamente, es posible la existencia de mecanismos de regulación post-transcripcional que pudiesen modificar los niveles de actividad determinados a partir de la cuantificación de la expresión genética medida mediante PCR. Por otra parte, existen diferencias notables entre las características de los pacientes analizados en nuestra serie, que incluye pacientes con tumores primarios de diferentes localizaciones y tratados mayoritariamente con radioterapia o quimioradioterapia, y las correspondientes al resto de estudios, que incluyen preferentemente pacientes tratados de forma quirúrgica.

De acuerdo con nuestros resultados, existió una correspondencia entre las categorías de expresión del eje CXCL12/CXCR4 definidas por el análisis de partición recursiva y los niveles de expresión correspondientes a genes relacionados con la respuesta inflamatoria (COX-2, mPGES-1, EP2), la síntesis de PGI (PGIS), la promoción de angiogénesis (VEGF), la degradación de la matriz extracelular (MMP-2, MMP-9), la actividad antioxidante (SOD-1, SOD-2, SOD-3) y la actividad de las chaperonas (Hsp90AA, Hsp90AB, Hsp90B1).

Las diferencias aparecieron básicamente en relación con la expresión de CXCR4. Los tumores con unos niveles de expresión baja de CXCR4 contaron con unos niveles de expresión igualmente disminuidos de COX-2 y mPGES-1, PGIS, MMP-2 y MMP-9, VEGF, NFkB, CD-45, mieloperoxidasa (MPO), Hsp90, y las diferentes superóxido-dismutasas (1, 2 y 3).

Este perfil de expresión es compatible con tumores de mejor pronóstico y con una mayor sensibilidad al tratamiento con radioterapia o quimioradioterapia. Diferentes estudios desarrollados a partir de los pacientes incluidos en el presente trabajo, han encontrado una relación entre el pronóstico de la enfermedad y los niveles de expresión transcripcional de MMP-9⁹⁶, NFkB⁹⁷ y PGIS⁹⁸.

Dentro del grupo de pacientes con unos niveles elevados de CXCR4, no aparecieron diferencias significativas entre los valores de expresión de los diferentes genes evaluados y las categorías de expresión definidas de CXCL12 mediante el análisis de partición recursiva.

Las principales limitaciones del presente estudio se deben a que se trata de un estudio retrospectivo, realizado en una única institución con un número limitado de pacientes, disponiendo tan sólo de datos referentes a la actividad transcripcional de CXCL12/CXCR4 a nivel de la localización primaria del tumor. Pensamos que la posibilidad de disponer de información de la expresión inmunohistoquímica de la vía, así como de su actividad a nivel de las áreas ganglionares serían elementos que permitirían avanzar en el estudio de la relación existente entre la expresión del eje CXCL12/CXCR4 como biomarcador con capacidad pronóstica en relación al control regional de la enfermedad en pacientes con carcinomas de cabeza y cuello.

7.- Conclusiones

1. *La expresión de CXCL12 fue significativamente inferior en las muestras de tumor, en tanto que la de CXCR4 fue significativamente superior que la correspondiente a muestras de mucosa sana.*
2. *No existieron diferencias significativas en los niveles de expresión de CXCL12/CXCR4 en función de la localización, la extensión local o regional del tumor, o el estatus HPV.*
3. *Existieron diferencias significativas en el control regional de la enfermedad en función de la expresión de CXCL12/CXCR4. Los pacientes con una expresión baja de CXCR4, o con una expresión elevada de CXCR4 y de CXCL12 contaron con un riesgo bajo de recidiva del tumor a nivel regional (2.6% y 4.5%, respectivamente). Por el contrario, los pacientes con una expresión elevada de CXCR4 y baja de CXCL12 contaron con un riesgo elevado de sufrir una recidiva del tumor a nivel regional (34.0%). De acuerdo con los resultados de un análisis multivariante, los pacientes con una expresión elevada de CXCR4 y baja de CXCL12 tuvieron un riesgo 10.7 veces superior de sufrir una recidiva del tumor a nivel regional. La relación entre la expresión del eje CXCL12/CXCR4 y el control regional de la enfermedad se mantuvo de manera independiente a la categoría de extensión inicial del tumor a nivel regional, el tipo de tratamiento realizado sobre las áreas ganglionares, o el control local de la enfermedad.*
4. *Apareció una correlación entre la expresión de CXCL12 y PGIS, así como de CXCR4 y COX-2, PGIS, VEGF y MMP-2.*

8.- Bibliografía

1. Goodwin WJ, Jr. Salvage surgery for patients with recurrent squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: when do the ends justify the means? *Laryngoscope*. 2000;110(3 Pt 2 Suppl 93):1-18.
2. Howell GM, Grandis JR. Molecular mediators of metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2005;27(8):710-7.
3. Allen CT, Law JH, Dunn GP, Uppaluri R. Emerging insights into head and neck cancer metastasis. *Head Neck*. 2013;35(11):1669-78.
4. Spano D, Heck C, De Antonellis P, Christofori G, Zollo M. Molecular networks that regulate cancer metastasis. *Semin Cancer Biol*. 2012;22(3):234-49.
5. Takes RP, Rinaldo A, Silver CE, Haigentz M, Jr., Woolgar JA, Triantafyllou A, et al. Distant metastases from head and neck squamous cell carcinoma. Part I. Basic aspects. *Oral Oncol*. 2012;48(9):775-9.
6. Mendez E, Fan W, Choi P, Agoff SN, Whipple M, Farwell DG, et al. Tumor-specific genetic expression profile of metastatic oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2007;29(9):803-14.
7. Roepman P, Wessels LF, Kettelarij N, Kemmeren P, Miles AJ, Lijnzaad P, et al. An expression profile for diagnosis of lymph node metastases from primary head and neck squamous cell carcinomas. *Nat Genet*. 2005;37(2):182-6.
8. Zhuang Z, Jian P, Longjiang L, Bo H, Wenlin X. Oral cancer cells with different potential of lymphatic metastasis displayed distinct biologic behaviors and gene expression profiles. *J Oral Pathol Med*. 2010;39(2):168-75.
9. Perri F, Pacelli R, Della Vittoria Scarpato G, Cella L, Giuliano M, Caponigro F, et al. Radioresistance in head and neck squamous cell carcinoma: Biological bases and therapeutic implications. *Head Neck*. 2015;37(5):763-70.
10. Harrington K, Jankowska P, Hingorani M. Molecular biology for the radiation oncologist: the 5Rs of radiobiology meet the hallmarks of cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2007;19(8):561-71.
11. Baumann M, Krause M, Hill R. Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(7):545-54.
12. Koch U, Krause M, Baumann M. Cancer stem cells at the crossroads of current cancer therapy failures--radiation oncology perspective. *Semin Cancer Biol*. 2010;20(2):116-24.
13. Mannelli G, Gallo O. Cancer stem cells hypothesis and stem cells in head and neck cancers. *Cancer Treat Rev*. 2012;38(5):515-39.

14. Zhang Z, Filho MS, Nor JE. The biology of head and neck cancer stem cells. *Oral Oncol.* 2012;48(1):1-9.
15. Bhaijee F, Pepper DJ, Pitman KT, Bell D. Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma: a review of current knowledge and future applications. *Head Neck.* 2012;34(6):894-9.
16. Allegra E, Trapasso S, Pisani D, Puzzo L. The role of BMI1 as a biomarker of cancer stem cells in head and neck cancer: a review. *Oncology.* 2014;86(4):199-205.
17. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene.* 2012;31(15):1869-83.
18. Cullen KJ, Schumaker L, Nikitakis N, Goloubeva O, Tan M, Sarlis NJ, et al. beta-Tubulin-II expression strongly predicts outcome in patients receiving induction chemotherapy for locally advanced squamous carcinoma of the head and neck: a companion analysis of the TAX 324 trial. *J Clin Oncol.* 2009;27(36):6222-8.
19. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 2006;354(6):567-78.
20. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kaweck i A, Rotte y S, et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med.* 2008;359(11):1116-27.
21. Rabinowits G, Haddad RI. Overcoming resistance to EGFR inhibitor in head and neck cancer: a review of the literature. *Oral Oncol.* 2012;48(11):1085-9.
22. Price KA, Cohen EE. Mechanisms of and therapeutic approaches for overcoming resistance to epidermal growth factor receptor (EGFR)-targeted therapy in squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN). *Oral Oncol.* 2015;51(5):399-408.
23. Layland MK, Sessions DG, Lenox J. The influence of lymph node metastasis in the treatment of squamous cell carcinoma of the oral cavity, oropharynx, larynx, and hypopharynx: N0 versus N+. *Laryngoscope.* 2005;115(4):629-39.
24. Weiss MH, Harrison LB, Isaacs RS. Use of decision analysis in planning a management strategy for the stage N0 neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1994;120(7):699-702.
25. Vergeer MR, Doornaert PA, de Bree R, Leemans CR, Slotman BJ, Langendijk JA. Postoperative elective nodal irradiation for squamous cell carcinoma of the head and neck: outcome and prognostic factors for regional recurrence. *Ann Oncol.* 2011;22(11):2489-94.

26. Olsen KD, Caruso M, Foote RL, Stanley RJ, Lewis JE, Buskirk SJ, et al. Primary head and neck cancer. Histopathologic predictors of recurrence after neck dissection in patients with lymph node involvement. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1994;120(12):1370-4.
27. Mamellet G, Pampurik J, Luboinski B, Lancar R, Lusinch A, Bosq J. Lymph node prognostic factors in head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Surg.* 1994;168(5):494-8.
28. Kowalski LP, Bagietto R, Lara JR, Santos RL, Silva JF, Jr., Magrin J. Prognostic significance of the distribution of neck node metastasis from oral carcinoma. *Head Neck.* 2000;22(3):207-14.
29. de Juan J, Garcia J, Lopez M, Orus C, Esteller E, Quer M, et al. Inclusion of extracapsular spread in the pTNM classification system: a proposal for patients with head and neck carcinoma. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 2013;139(5):483-8.
30. Wenzel S, Sagowski C, Kehrl W, Metternich FU. The prognostic impact of metastatic pattern of lymph nodes in patients with oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2004;261(5):270-5.
31. An SY, Jung EJ, Lee M, Kwon TK, Sung MW, Jeon YK, et al. Factors related to regional recurrence in early stage squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Clin Exp Otorhinolaryngol.* 2008;1(3):166-70.
32. Clatot F, Picquenot JM, Choussy O, Gouerant S, Moldovan C, Schultheis D, et al. Intratumoural level of SDF-1 correlates with survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2011;47(11):1062-8.
33. Zlotnik A., Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* 2000 Feb;12(2):121-7.
34. Ransohoff RM. Chemokines and chemokine receptors: standing at the crossroads of immunobiology and neurobiology. *Immunity.* 2009;31(5):711-21.
35. Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Lett.* 2008;267(2):226-44.
36. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science.* 1996;272(5263):872-7.
37. Loetscher M, Geiser T, O'Reilly T, Zwahlen R, Baggiolini M, Moser B. Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes. *J Biol Chem.* 1994;269(1):232-7.

38. Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KY, Harriague J, Moepps B, et al. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem*. 2005;280(42):35760-6.
39. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*. 1996;382(6592):635-8.
40. Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, et al. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature*. 1998;393(6685):591-4.
41. Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*. 1998;393(6685):595-9.
42. Aiuti A, Webb IJ, Bleul C, Springer T, Gutierrez-Ramos JC. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med*. 1997;185(1):111-20.
43. Balkwill F. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Semin Cancer Biol*. 2004;14(3):171-9.
44. Phillips RJ, Burdick MD, Lutz M, Belperio JA, Keane MP, Strieter RM. The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(12):1676-86.
45. Smith MC, Luker KE, Garbow JR, Prior JL, Jackson E, Piwnica-Worms D, et al. CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res*. 2004;64(23):8604-12.
46. Pan J, Mestas J, Burdick MD, Phillips RJ, Thomas GV, Reckamp K, et al. Stromal derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) and CXCR4 in renal cell carcinoma metastasis. *Mol Cancer*. 2006;5:56.
47. Schrader AJ, Lechner O, Templin M, Dittmar KE, Machtens S, Mengel M, et al. CXCR4/CXCL12 expression and signalling in kidney cancer. *Br J Cancer*. 2002;86(8):1250-6.
48. Taichman RS, Cooper C, Keller ET, Pienta KJ, Taichman NS, McCauley LK. Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res*. 2002;62(6):1832-7.
49. Koshiba T, Hosotani R, Miyamoto Y, Ida J, Tsuji S, Nakajima S, et al. Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression. *Clin Cancer Res*. 2000;6(9):3530-5.

50. Schimanski CC, Galle PR, Moehler M. Chemokine receptor CXCR4-prognostic factor for gastrointestinal tumors. *World J Gastroenterol*. 2008;14(30):4721-4.
51. Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*. 2010;16(11):2927-31.
52. Kucia M, Reca R, Miekus K, Wanzeck J, Wojakowski W, Janowska-Wieczorek A, et al. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem Cells*. 2005;23(7):879-94.
53. Brand S, Dambacher J, Beigel F, Olszak T, Diebold J, Otte JM, et al. CXCR4 and CXCL12 are inversely expressed in colorectal cancer cells and modulate cancer cell migration, invasion and MMP-9 activation. *Exp Cell Res*. 2005;310(1):117-30.
54. Williams SA, Harata-Lee Y, Comerford I, Anderson RL, Smyth MJ, McColl SR. Multiple functions of CXCL12 in a syngeneic model of breast cancer. *Mol Cancer*. 2010;9:250.
55. Mirshahi F, Pourtau J, Li H, Muraine M, Trochon V, Legrand E, et al. SDF-1 activity on microvascular endothelial cells: consequences on angiogenesis in vitro and in vivo models. *Thromb Res*. 2000;99(6):587-94.
56. Liang Z, Brooks J, Willard M, Liang K, Yoon Y, Kang S, et al. CXCR4/CXCL12 axis promotes VEGF-mediated tumor angiogenesis through Akt signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;359(3):716-22.
57. Albert S, Riveiro ME, Halimi C, Hourseau M, Couvelard A, Serova M, et al. Focus on the role of the CXCL12/CXCR4 chemokine axis in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2013;35(12):1819-28.
58. Uchida D, Begum NM, Almofti A, Nakashiro K, Kawamata H, Tateishi Y, et al. Possible role of stromal-cell-derived factor-1/CXCR4 signaling on lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Exp Cell Res*. 2003;290(2):289-302.
59. Uchida D, Begum NM, Tomizuka Y, Bando T, Almofti A, Yoshida H, et al. Acquisition of lymph node, but not distant metastatic potentials, by the overexpression of CXCR4 in human oral squamous cell carcinoma. *Lab Invest*. 2004;84(12):1538-46.
60. Katayama A, Ogino T, Bando N, Nonaka S, Harabuchi Y. Expression of CXCR4 and its down-regulation by IFN-gamma in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2005;11(8):2937-46.

61. Ishikawa T, Nakashiro K, Hara S, Klosek SK, Li C, Shintani S, et al. CXCR4 expression is associated with lymph-node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2006;28(1):61-6.
62. Delilbasi CB, Okura M, Iida S, Kogo M. Investigation of CXCR4 in squamous cell carcinoma of the tongue. *Oral Oncol*. 2004;40(2):154-7.
63. Tan CT, Chu CY, Lu YC, Chang CC, Lin BR, Wu HH, et al. CXCL12/CXCR4 promotes laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinoma metastasis through MMP-13-dependent invasion via the ERK1/2/AP-1 pathway. *Carcinogenesis*. 2008;29(8):1519-27.
64. Lee JI, Jin BH, Kim MA, Yoon HJ, Hong SP, Hong SD. Prognostic significance of CXCR-4 expression in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;107(5):678-84.
65. Ueda M, Shimada T, Goto Y, Tei K, Nakai S, Hisa Y, et al. Expression of CC-chemokine receptor 7 (CCR7) and CXC-chemokine receptor 4 (CXCR4) in head and neck squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx*. 2010;37(4):488-95.
66. Ueda M, Shimada T, Goto Y, Tei K, Nakai S, Hisa Y, et al. Expression of CC-chemokine receptor 7 (CCR7) and CXC-chemokine receptor 4 (CXCR4) in head and neck squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx*. 2010;37(4):488-95.
67. Almofti A, Uchida D, Begum NM, Tomizuka Y, Iga H, Yoshida H, et al. The clinicopathological significance of the expression of CXCR4 protein in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2004;25(1):65-71.
68. Clatot F, Cornic M, Berghian A, Marchand V, Choussy O, El Ouakif F, et al. CXCL12 and CXCR4, but not CXCR7, are primarily expressed by the stroma in head and neck squamous cell carcinoma. *Pathology*. 2015;47(1):45-50.
69. Albert S, Hourseau M, Halimi C, Serova M, Descatoire V, Barry B, et al. Prognostic value of the chemokine receptor CXCR4 and epithelial-to-mesenchymal transition in patients with squamous cell carcinoma of the mobile tongue. *Oral Oncol*. 2012;48(12):1263-71.
70. Yoon Y, Liang Z, Zhang X, Choe M, Zhu A, Cho HT, et al. CXC chemokine receptor-4 antagonist blocks both growth of primary tumor and metastasis of head and neck cancer in xenograft mouse models. *Cancer Res*. 2007;67(15):7518-24.
71. Samara GJ, Lawrence DM, Chiarelli CJ, Valentino MD, Lyubsky S, Zucker S, et al. CXCR4-mediated adhesion and MMP-9 secretion in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Lett*. 2004;214(2):231-41.

72. Onoue T, Uchida D, Begum NM, Tomizuka Y, Yoshida H, Sato M. Epithelial-mesenchymal transition induced by the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 system in oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Oncol*. 2006;29(5):1133-8.
73. Rehman AO, Wang CY. SDF-1alpha promotes invasion of head and neck squamous cell carcinoma by activating NF-kappaB. *J Biol Chem*. 2008;283(29):19888-94.
74. Hong JS, Pai HK, Hong KO, Kim MA, Kim JH, Lee JI, et al. CXCR-4 knockdown by small interfering RNA inhibits cell proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma cells. *J Oral Pathol Med*. 2009;38(2):214-9.
75. Hu J, Deng X, Bian X, Li G, Tong Y, Li Y, et al. The expression of functional chemokine receptor CXCR4 is associated with the metastatic potential of human nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2005;11(13):4658-65.
76. Daly AJ, McIlreavey L, Irwin CR. Regulation of HGF and SDF-1 expression by oral fibroblasts--implications for invasion of oral cancer. *Oral Oncol*. 2008;44(7):646-51.
77. Takabayashi T, Takahashi N, Okamoto M, Yagi H, Sato M, Fujieda S. Lipopolysaccharides increase the amount of CXCR4, and modulate the morphology and invasive activity of oral cancer cells in a CXCL12-dependent manner. *Oral Oncol*. 2009;45(11):968-73.
78. Leon X, Orus C, Quer M. [Design, maintenance, and exploitation of an oncologic database for patients with malignant tumors of the head and neck]. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2002;53(3):185-90.
79. Krol BJ, Righi PD, Paydarfar JA, Cheng ET, Smith RM, Lai DC, et al. Factors related to outcome of salvage therapy for isolated cervical recurrence of squamous cell carcinoma in the previously treated neck: a multi-institutional study. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2000;123(4):368-76.
80. Bernier J, Bataini JP. Regional outcome in oropharyngeal and pharyngolaryngeal cancer treated with high dose per fraction radiotherapy. Analysis of neck disease response in 1646 cases. *Radiother Oncol*. 1986;6(2):87-103.
81. Leon X, Ganán L, Costey M, Kolanczak K, Orus C, Quer M. [Isolated lymphatic recurrences in patients with head and neck carcinomas]. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2003;54(10):710-7.
82. Ganci F, Sacconi A, Manciocco V, Spriano G, Fontemaggi G, Carlini P, Blandino G. Radioresistance in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Possible Molecular Markers for Local Recurrence and New Putative

Therapeutic Strategies. En: Contemporary Issues in Head and Neck Cancer Management. Loredana G. Marcu. InTech, 2015. ISBN 978-953-51-2135-0178.

83. Clatot F, Gouerant S, Mareschal S, Cornic M, Berghian A, Choussy O, et al. The gene expression profile of inflammatory, hypoxic and metabolic genes predicts the metastatic spread of human head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2014;50(3):200-7.
84. Zhao H, Guo L, Zhao H, Zhao J, Weng H, Zhao B. CXCR4 over-expression and survival in cancer: a system review and meta-analysis. *Oncotarget.* 2015;6(7):5022-40.
85. Melchers LJ, Bruine de Bruin L, Schnell U, Slagter-Menkema L, Mastik MF, de Bock GH, et al. Lack of claudin-7 is a strong predictor of regional recurrence in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2013;49(10):998-1005.
86. Chung CH, Parker JS, Ely K, Carter J, Yi Y, Murphy BA, et al. Gene expression profiles identify epithelial-to-mesenchymal transition and activation of nuclear factor-kappaB signaling as characteristics of a high-risk head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2006;66(16):8210-8.
87. Chu PY, Hu FW, Yu CC, Tsai LL, Yu CH, Wu BC, et al. Epithelial-mesenchymal transition transcription factor ZEB1/ZEB2 co-expression predicts poor prognosis and maintains tumor-initiating properties in head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2013;49(1):34-41.
88. De Clercq E. The bicyclam AMD3100 story. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2(7):581-7.
89. Burger M, Hartmann T, Krome M, Rawluk J, Tamamura H, Fujii N, et al. Small peptide inhibitors of the CXCR4 chemokine receptor (CD184) antagonize the activation, migration, and antiapoptotic responses of CXCL12 in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood.* 2005;106(5):1824-30.
90. Doranz BJ, Filion LG, Diaz-Mitoma F, Sitar DS, Sahai J, Baribaud F, et al. Safe use of the CXCR4 inhibitor ALX40-4C in humans. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2001;17(6):475-86.
91. Kozin SV, Kamoun WS, Huang Y, Dawson MR, Jain RK, Duda DG. Recruitment of myeloid but not endothelial precursor cells facilitates tumor regrowth after local irradiation. *Cancer Res.* 2010;70(14):5679-85.
92. Domanska UM, Timmer-Bosscha H, Nagengast WB, Oude Munnink TH, Kruizinga RC, Ananias HJ, et al. CXCR4 inhibition with AMD3100 sensitizes prostate cancer to docetaxel chemotherapy. *Neoplasia.* 2012;14(8):709-18.

93. Fahham D, Weiss ID, Abraham M, Beider K, Hanna W, Shlomai Z, et al. In vitro and in vivo therapeutic efficacy of CXCR4 antagonist BKT140 against human non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2012;144(5):1167-75 e1.
94. Kioi M, Vogel H, Schultz G, Hoffman RM, Harsh GR, Brown JM. Inhibition of vasculogenesis, but not angiogenesis, prevents the recurrence of glioblastoma after irradiation in mice. *J Clin Invest.* 2010;120(3):694-705.
95. Trautmann F, Cojoc M, Kurth I, Melin N, Bouchez LC, Dubrovskaya A, et al. CXCR4 as biomarker for radioresistant cancer stem cells. *Int J Radiat Biol.* 2014;90(8):687-99.
96. Viros D, Camacho M, Zarraonandia I, Garcia J, Quer M, Vila L, et al. Prognostic role of MMP-9 expression in head and neck carcinoma patients treated with radiotherapy or chemoradiotherapy. *Oral Oncol.* 2013;49(4):322-5.
97. Quintana A, Aviles FX, Terra X, Alcolea S, Camacho M, Quer M, et al. Overexpression of the nuclear factor-kappa B (p65) in association with local failure in patients with head and neck carcinoma undergoing radiotherapy or chemoradiotherapy. *Head Neck.* 2013;35(3):370-5.
98. Camacho M, Pineiro Z, Alcolea S, Garcia J, Balart J, Terra X, et al. Prostacyclin-synthase expression in head and neck carcinoma patients and its prognostic value in the response to radiotherapy. *J Pathol.* 2015;235(1):125-35.