

TRABAJO DE SUFICIENCIA INVESTIGADORA.

Tema: Capacidad pronóstica del eje SDF-1 / CXCR4 en pacientes con Carcinoma Escamoso de Cabeza y Cuello.

Autora: Zenaida Piñeiro Aguín.

Dirección del trabajo de investigación: Doctor Xavier León Vintró / Doctor Luís Vila Navarro.

Índice:

1. Introducción.
2. Revisión y actualización bibliográfica.
3. Hipótesis de trabajo.
4. Objetivos del trabajo.
5. Material y métodos.
6. Resultados.
7. Discusión.
8. Conclusiones.
9. Bibliografía.

1. INTRODUCCIÓN.

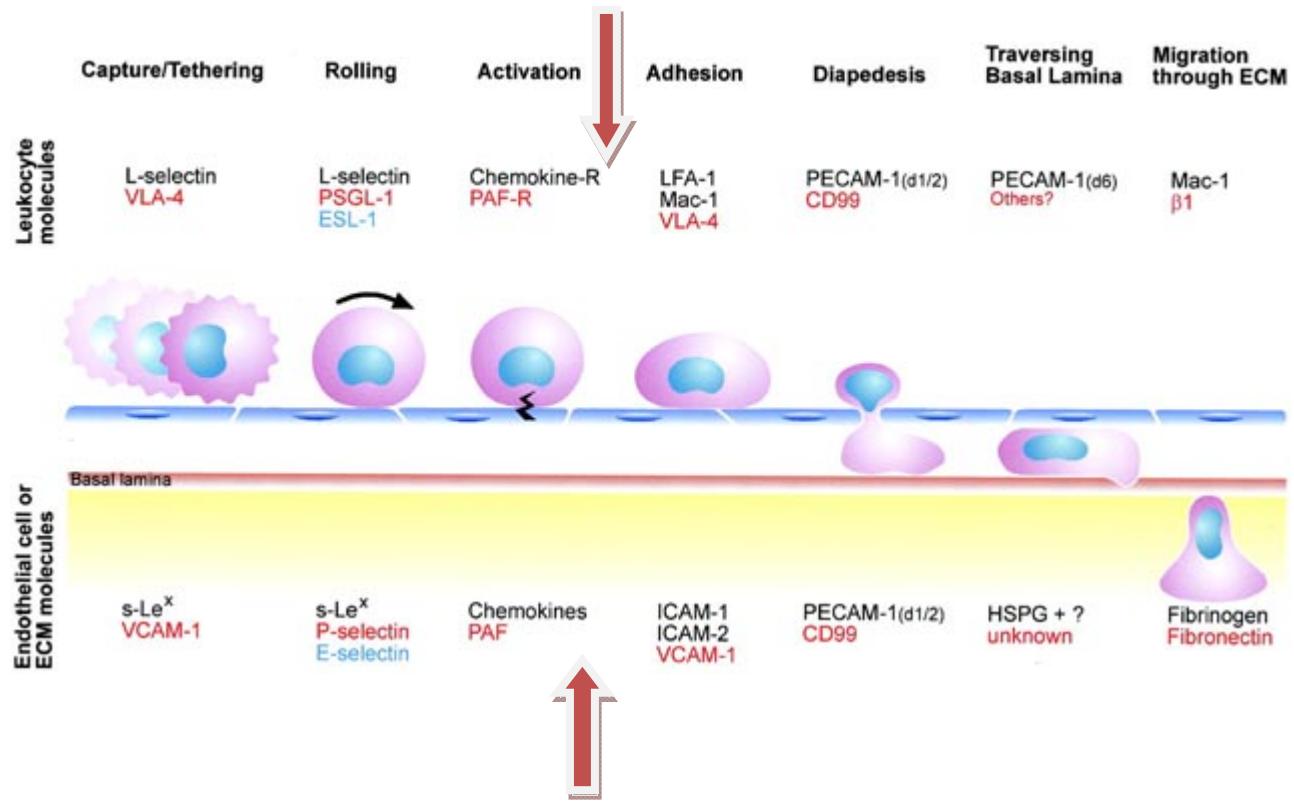
Las quimioquinas, una familia de pequeñas citoquinas proinflamatorias, son las principales responsables de la dirección migracional o quimiotaxis de los leucocitos a los tejidos linfoides y del reclutamiento de los leucocitos hacia los lugares de infección o daño tisular.^{1,2}

Sin embargo estas quimioquinas, como el SDF1 (Stromal – Derived - Factor -1) están implicadas en otros procesos biológicos como la angiogénesis, angioestasis, embriogénesis, hematopoyesis, linfopoyesis y en la patogénesis del VIH.³

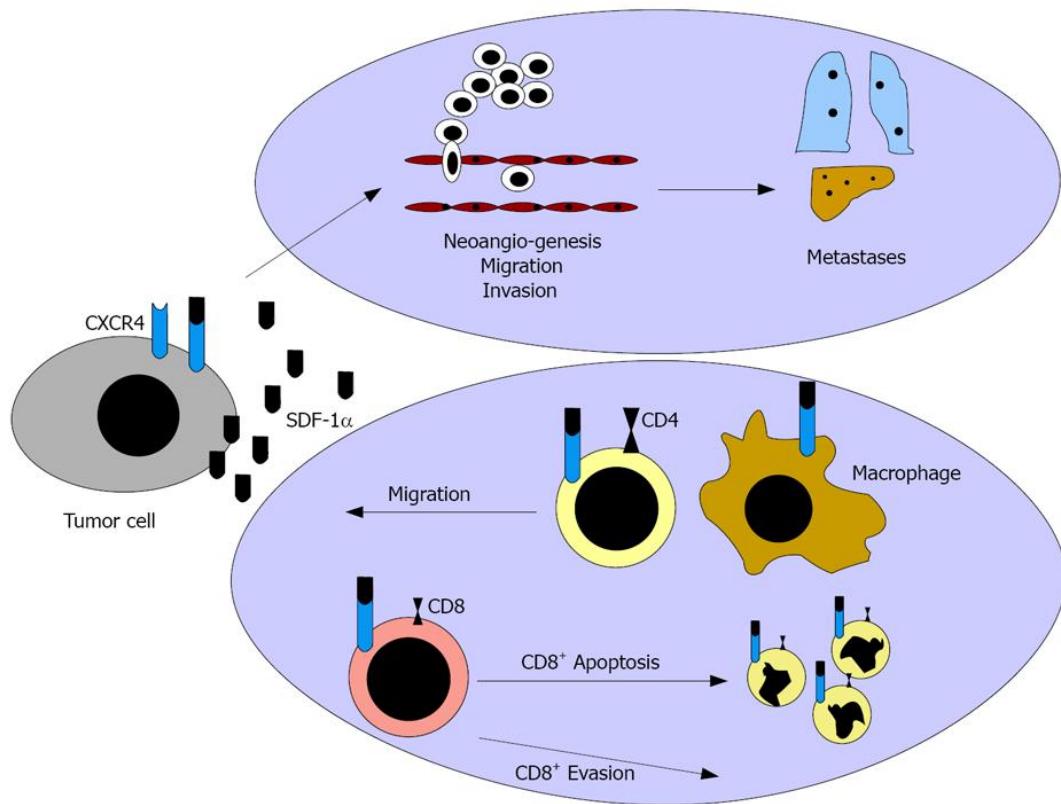
Más recientemente se ha establecido que las células cancerígenas aprovechan estas señales a través de las citoquinas, valiéndose de diferentes mecanismos, para la iniciación y progresión de las metástasis primarias.^{4,5}

Los receptores de quimioquinas son proteínas transmembrana con siete dominios, que pertenecen al grupo de las proteínas G que ejercen su acción a través de sus subunidades $\beta\alpha$ que activan e inhiben diferentes enzimas como la fosforilasa fosfatidil inositol kinasa o la adenilato-ciclasa. A través de estas acciones ejercen su función enviando señales intracelulares.⁶ Teleológicamente estos receptores interactúan con mensajeros químicos solubles (las quimioquinas) atrayendo glóbulos blancos a las áreas de inflamación.^{1,2,3}

En la siguiente figura están representadas las diferentes fases de la quimiotaxis en la migración leucocitaria elaborada por Muller y Homey en 2002 donde se aprecia el papel de las quimioquinas, destacadas en la fase previa a la adhesión, la activación.⁷



Los diferentes tumores expresan diferentes receptores de estas quimioquinas, sin embargo, solo el receptor de quimioquinas CXCR4 aparece expresado en la mayoría de los tipos de cáncer. Células de al menos 23 tipos diferentes de cáncer expresan este receptor independientemente de su estirpe, mesenquimal, epitelial y hematopoyética.⁸



En la figura publicada en 2008 por Schimanski y col. podemos apreciar como la célula tumoral a través del eje SDF-1/ CXCR4 no solo produce neoangiogénesis, migración e invasión, sino que reduce el riesgo de rechazo de las células tumorales a través de un mecanismo indirecto mediado por las células T (CD8 +) que produce una apoptosis de las mismas e incluso permite la fuga de las células tumorales del sistema inmune.⁹

La importancia del eje SDF1/CXCR4 en el desarrollo ha sido además demostrada neutralizando la interacción entre estas dos moléculas mediante polipéptidos sintéticos.

CXCR4 ha sido implicado también en la progresión tumoral y el desarrollo de varios tumores como el cáncer de mama, de próstata y carcinoma de células claras de riñón.¹⁰

El mecanismo por el cual CXCR4 regula la progresión tumoral todavía no está claro. Se ha propuesto un mecanismo a través de la interacción con CCR6 /CCL20 dado que este eje promueve la proliferación y adhesión al colágeno de diferentes tipos de células tumorales, dado que CXCR4 promueve la expresión de CCL20. La expresión de CCL20

es aumentada mediante diferentes estímulos proinflamatorios como IL-1 β , TNF- α y LPS. Además esta quimioquina atrae de forma selectiva a las células que expresan CCR6: Linfocitos T memoria, células NK (natural Killers), células TH 17(Linfocitos T helper que producen IL-17, implicada en el reclutamiento de neutrófilos) y células dendríticas a los lugares donde se produce invasión por patógenos.

Así pues CXCR4 ha sido extensamente estudiado por su implicación en los diferentes tipos de tumores. Por otra parte, en los tumores epiteliales no se expresa de forma incrementada con SDF1, el único ligando de CXCR4 y se expresa en grandes cantidades en otros distritos corporales específicos. Sustentando esta hipótesis ha sido demostrado que SDF1 se produce en mayor cantidad en los lugares de metástasis. Recientemente, se ha sugerido que en el estroma tumoral se secreta en grandes cantidades SDF1 apoyando el concepto de que esta quimioquina es fundamental es el soporte de los eventos protumorigénicos locales, como el crecimiento y supervivencia de las células tumorales. Además la expresión de SDF1 en las células del estroma tumoral recluta progenitores endoteliales para la angiogénesis.⁴

Niveles disminuidos de SDF1 en los tejidos tumorales han sido detectados en tumores en varias localizaciones y también en tumores de distintas estirpes celulares incluidos en carcinomas de laringe y orofaringe.¹¹

El papel de SDF1 en los tejidos es similar al de un “guía químico”, indicando donde deben desplazarse o donde deben quedarse las células que expresan su receptor CXCR4. Así es bien conocido su papel en la migración celular para la formación de los diferentes órganos en diversos animales durante la embriogénesis.¹

También es importante su papel en el mantenimiento de las Stem cells o células madre del sistema Hematopoyético en su lugar, como en la médula ósea. En estas localizaciones la concentración de SDF1 es elevada.

Debido a esta función el eje SDF1 /CXCR4 se considera clave en la capacidad metastásica de los tumores sólidos. Las células tumorales expresan en su membrana el receptor específico de SDF1: CXCR4. Así mismo las localizaciones más frecuentes de metástasis presentan elevados niveles de SDF1.

La principal vía de diseminación de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello son las metástasis de los ganglios linfáticos regionales. Además, la presencia de enfermedad metastásica en los ganglios cervicales es el factor más importante que determina el tratamiento y el pronóstico de estos pacientes.¹²

Por tanto, es fundamental conocer los mecanismos implicados en el desarrollo de las metástasis si queremos avanzar en el control de la enfermedad.

El proceso de metástasis es complejo. Las células metastásicas deben abandonar el tumor primario, migrar a través de los tejidos adyacentes, invadir los vasos sanguíneos y/o linfáticos, sobrevivir dentro de ellos, ser capaces de instalarse y proliferar en los ganglios linfáticos o en los órganos a distancia.^{13,14}

Para llevar a cabo estos pasos las células tumorales deben poseer una serie de características adquiridas a través de sucesivas alteraciones genéticas. También hay que tener en cuenta la interacción con las células vecinas y el tejido adyacente.¹⁵

2. REVISIÓN Y ACTUALIZACIÓN BIBLIOGRÁFICA.

- a) Papel del eje SDF-1/CXCR4 en la señalización, locomoción, quimiotaxis y adhesión.¹

El eje SDF-1/ CXCR4 fue ampliamente estudiado de forma inicial en el sistema hematolinfopoyético. Posteriormente se conoció el papel del eje en las células progenitoras o Stem cells de varios tejidos del organismo como los progenitores de las células pigmentarias de la retina, las stem-cells neuronales o las células germinales primordiales, dado que estas expresaban en superficie el receptor CXCR4. Además el eje es un regulador del “tráfico celular” dado que está presente en la inducción de motilidad, respuesta quimiotáctica, adhesión y secreción de metaloproteinasas y factores angiopoyéticos.

Otra de las acciones en las que ha demostrado estar implicado el eje SF-1/ CXCR4 es en la proliferación y supervivencia celular. Se ha postulado una acción secretora de SDF-1 no solo del estroma, sino también de las propias stem-cells que podrían secretarlo a su vez, ejerciendo un papel paracrino y autocrino en su propia supervivencia y desarrollo.

Por una parte, SDF-1 puede inducir apoptosis de los linfocitos T y a la vez no afecta a las células progenitoras hematológicas de la médula ósea. El efecto de SDF-1 en las células progenitoras podría ser más indirecto y afectar de una forma más significativa a las moléculas de adhesión favoreciendo su desarrollo.

Es bien conocido que SDF1modula la adhesión celular a fibrinógeno, fibronectina, estroma y endotelio. Este mecanismo está en relación directa con la expresión “de novo” de integrinas celulares en la superficie de las mismas células. Así mismo la expresión del receptor CXCR4 en la superficie celular parece favorecer la interacción de la célula con las moléculas de adhesión en el estroma.

En cuanto al efecto en la vasculogénesis tumoral se conoce bien que SDF-1 se expresa en niveles más elevados cuando existe hipoxia e isquemia. Las células progenitoras del endotelio poseen también el receptor CXCR4.

Varias quimioquinas están en relación con la proliferación y supervivencia celular regulando estas de una forma negativa o positiva según cada molécula. Sin embargo el papel de SDF-1 continúa siendo controvertido. Su comportamiento en los diferentes tipos celulares mediado a través de diferentes quinasas (MAPK, AKT) es contradictorio dado que no todos los tipos de tumor presentan una mayor proliferación o incremento de la supervivencia a mayor concentración de SDF-1.

b) SDF-1 en el cáncer de cabeza y cuello.^{9,11,14}

El carcinoma escamoso de cabeza y cuello metastatiza de forma predominante a los nódulos linfáticos. En un estudio realizado con ARNm detectando CXCR4 y su expresión en la superficie de las células tumorales en cinco líneas celulares diferentes y en tejido tumoral de forma directa, SDF1 induce movilización rápida de calcio intracelular en la línea de células metastásicas así como una rápida fosforilación de ERK-1/2. Además la adhesión celular a fibronectina y colágeno se vio aumentada en las células tratadas con SDF1 mientras que en células tratadas con inhibidores de ERK-1/2 se reducía el efecto de SDF1. Se comprobó además que SDF1 aumentaba la secreción de la MMP-9 (matrix metalloproteinasa 9). (16) El tratamiento de una línea de células cancerígenas (carcinoma de cavidad oral) con SDF1 demuestra que se eleva la MMP13 y se eleva el potencial invasivo de estas células de manera autocrina-paracrina activándose el receptor CXCR4 (17). Estas teorías de la progresión tumoral y la remodelación tisular en la matriz extracelular mediado por MMP se apoyan también en estudios comparativos con las enfermedades autoinmunes donde MMP1 (que tiene como función principal la de degradar el colágeno intersticial extracelular) interactúa con las proteínas G transmembrana y entre ellas con CXCR4 y PAR-1 (Protease activated receptor) que influencian significativamente en la activación de los

fibroblastos en la Artritis Reumatoide y en el cáncer. (18) En otro estudio publicado por Daly et al. en 2008 se demuestra que los fibroblastos y miofibroblastos que rodean el tejido tumoral tienen un rol principal en la secreción de HGF (Hepatocyte grow factor, también implicado en el desarrollo de metástasis) y SDF-1 y su interacción con las células del carcinoma de cavidad oral. Añadiendo anticuerpos bloqueadores de HGF y SDF se reduce el nivel de invasión.¹⁹

En 2004 Almofti y col. Realizaron un estudio en 61 pacientes con Carcinoma escamoso de cavidad oral correlacionando los datos clínico-patológicos. No se halló correlación entre la expresión de SDF-1 en las células tumorales y si se asoció la mayor expresión de su receptor CXCR4 con peor pronóstico y metástasis linfáticas con alta significación estadística.²⁰

Estudios comparativos con Carcinoma Escamoso versus Carcinoma Adenoide Quístico se han encontrado diferencias de expresión de receptores de quimioquinas.²¹ El Carcinoma Escamoso expresa receptores CCR5 / CCR7 y su tendencia es a la diseminación Linfógena dando lugar a metástasis locorregionales.

El Carcinoma Adenoide Quístico expresa receptores CXCR4 y su tendencia es a la diseminación Hematógena dando lugar a metástasis a distancia con mayor frecuencia que el carcinoma escamoso.

Las células de Carcinoma Escamoso tras el tratamiento con Cisplatino expresan de forma más acusada el receptor CXCR4 (up-regulation) en superficie. Así parece que las células responden al SDF-1.

SDF-1 reduce el número de apoptosis en el tumor por lo que el eje CXCR4/SDF1 parece estar en relación a la supervivencia de las células tumorales²².

El polimorfismo de SDF1-3 y su receptor en pacientes con carcinoma de cabeza y cuello se asocia a peor pronóstico en el cáncer de cavidad oral.²³

En otro estudio el polimorfismo (G801A) en el gen de SDF-1 se asocia a estadíos avanzados de Carcinoma oral en un estudio caso-control con 159 pacientes, asociándose también especialmente a los mayores consumidores de alcohol.²⁴

c) CXCR4 y Carcinoma de cabeza y cuello.

Es poco conocida la implicación de este receptor en este tipo de tumores. La expresión de este receptor parece beneficiar no solo la migración y proliferación si no también las metástasis.

Sin embargo se sabe poco sobre como regulan las citoquinas la expresión de CXCR4 en las células cancerígenas. La expresión de este receptor en los leucocitos y las células epiteliales es regulada por múltiples citoquinas como INF, IL, TNF... Pero la expresión de estas citoquinas parece no ser uniforme.

Se han publicado estudios sobre el carcinoma de la mucosa oral en relación al eje CXCR4 / SDF1.

En el Carcinoma escamoso sabemos que se produce primariamente un cambio genético y también fenotípico en las células de las mucosas denominado metaplasia. Se ha propuesto que estos cambios están en relación a lo que se denomina EMT: Epithelial mesenchymal transition que podría explicar la metaplasia como la adquisición de características mesenquimales en un epitelio.²⁵

Células pre-tumorales en la mucosa con fenotipo similar al fibroblasto expresan SDF-1.

En un estudio polaco publicado en octubre de 2009 se evidencia que cierto polimorfismo en el gen SDF-1 se asocia a un mayor riesgo de padecer cáncer de laringe.²⁷

d) Cancer stem cells y el eje CXCR4/SDF1.^{28,29}

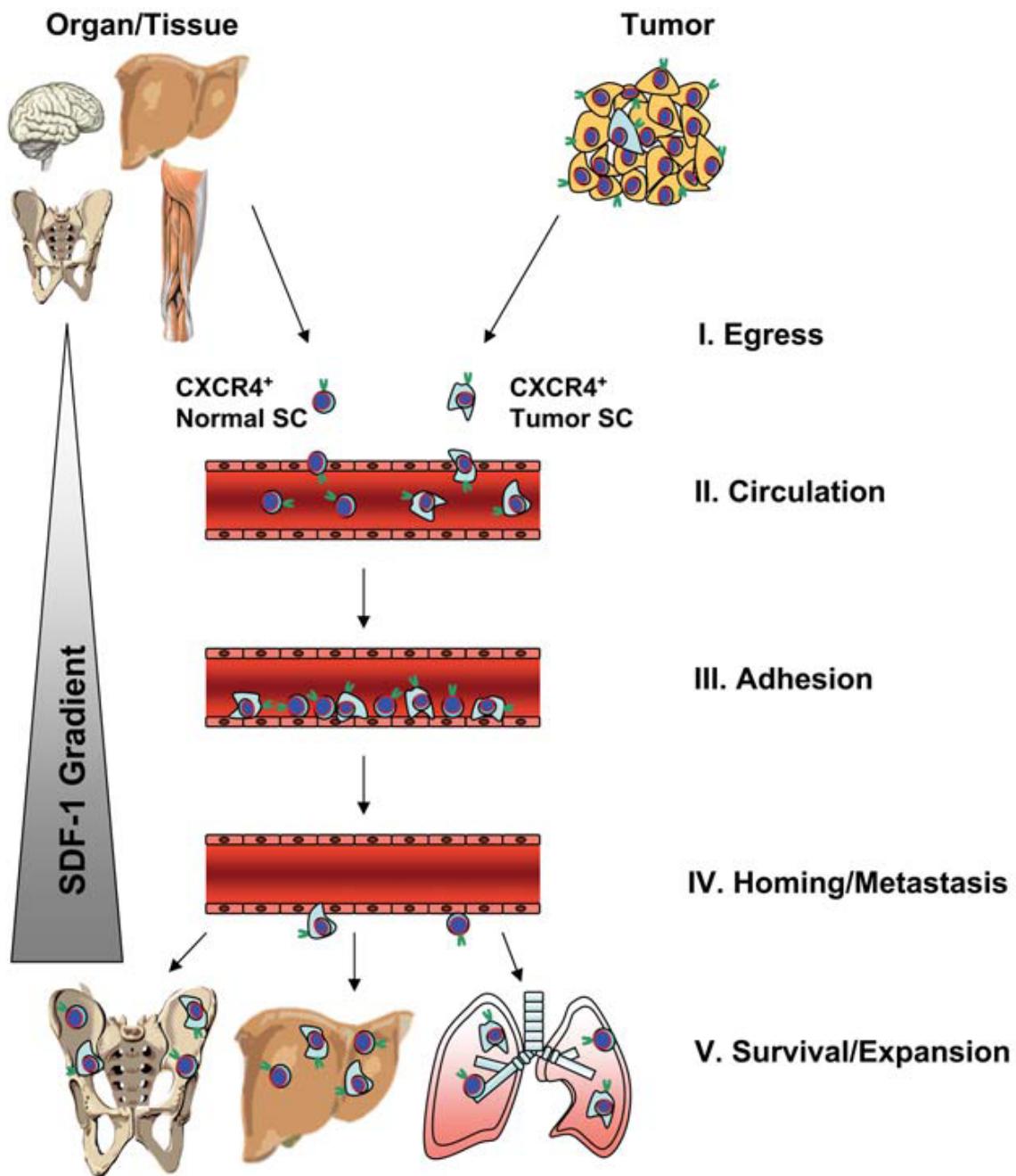
La regulación del tráfico de las diferentes células hematopoyéticas normales y su permanencia en la médula ósea se produce a través del eje SDF1/CXCR4. Además este receptor también se expresa en otras células madre no hematopoyéticas.

Recientemente varios estudios sugieren la presencia de células cancerígenas que comparten ciertas características con las Stem Cells que se denominan Cancer Stem cells. Ellas constituyen un reservorio de células autosuficientes capaces de mantener el crecimiento tumoral. En particular, la mayoría expresan el receptor CXCR4 que responde a señales mediante gradiente de SDF1 sugiriendo que esta subpoblación celular es capaz mediante este eje de iniciar una metástasis.²⁸

e) Nuevos fármacos: Antagonistas de CXCR4.

Inicialmente se desarrollaron los antagonistas de CXCR4 en el tratamiento del VIH, subsecuentemente se apreció que inducían leucocitosis y se utilizan de forma habitual para movilizar células madre hematopoyéticas. Además, debido a que CXCR4 tiene un papel en la interferencia de las células de la leucemia, su desarrollo y tratamiento, así como en otros tipos de cáncer estos pueden tener una aplicación nueva. Uno de estos fármacos que se utiliza en la actualidad es el Plerixafor (AMD 3100, - Genzyme

Corporation) Es una molécula “Bycyclam” que antagoniza con SDF1. Actúa de forma sinérgica en la médula ósea a G-CSF movilizando células madre a la circulación periférica.^{30,31}



El rol del eje SDF-1/CXCR4 en la migración y circulación de las células y las metástasis de las células pluripotenciales malignas (CSC: Cancer Stem cells). La migración de las células normales y las células malignas pluripotenciales es un proceso de múltiples pasos en las que:

- 1-** Las células dejan su nicho habitual o el tumor primario (CSC y células madre pluripotenciales) y entran en la circulación periférica.
- 2-** La llegada a su destino (células normales pluripotenciales) o al lugar de metástasis (CSC) por vía de la sangre periférica o vía linfática.
- 3-** Adherencia al endotelio.
- 4-** Invasión de los tejidos.
- 5-** Proliferación y expansión en la nueva localización que proporciona soporte para el desarrollo de las células.

Es la descripción del proceso fisiológico de la hipótesis de que SDF-1 juega un papel primordial en la migración de estas células CXCR4+ (normales o tumorales).

SC: Stem cell; SDF: Stromal derived factor.³²

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO.

La expresión de los genes del eje SDF1/ CXCR4 está implicado en los mecanismos de carcinogénesis en los carcinomas escamosos de cabeza y cuello, pudiendo contar con capacidad pronóstica.

4. OBJETIVOS DEL TRABAJO.

- 1- Evaluar la expresión de los genes del eje SDF1/ CXCR4 en carcinomas de cabeza y cuello, y compararlos con la expresión en mucosa sana.
- 2- Evaluar la capacidad pronóstica de la expresión de los genes del eje SDF1/ CXCR4 en carcinomas de cabeza y cuello.

5. MATERIAL Y MÉTODOS.

Nuestro estudio se llevó a cabo en el Hospital de Santa Creu i Sant Pau (Barcelona), con muestras obtenidas de las piezas quirúrgicas y biopsias de 76 pacientes con Ca. Escamoso de Cabeza y Cuello del Servicio de Otorrinolaringología desde el año 2003 hasta el año 2010. Se obtuvieron muestras representativas del tumor, así como de mucosa sana para cada uno de los pacientes incluidos en el presente estudio. El estudio fue aprobado por el comité de ética del Hospital y todos los pacientes fueron informados y firmaron el consentimiento.

a) Características clínicas.

La siguiente tabla muestra las características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio.

Tabla

| | | | |
|--------------|----------------------------|----|-------|
| LOCALIZACION | CAVIDAD ORAL OROFARINGE | 26 | 34.2% |
| | LARINGE HIPOFARINGE | 50 | 65.8% |
| T | T 1-2 | 36 | 47.4% |
| | T 3-4 | 40 | 52.6% |
| N | N0 | 48 | 63.1% |
| | N+ | 28 | 36.9% |
| TRATAMIENTO | RADIOTERAPIA | 37 | 48.7% |
| | CIRUGÍA + RADIOTERAPIA | 39 | 51.3% |

b) Determinación de la expresión de SDF1 – CXCR4

Se llevó a cabo una determinación de los niveles de expresión de los genes SDF1 y CXCR4 en las muestras de tumor y de mucosa sana mediante una técnica de PCR cuantitativo.

Las muestras fueron inmediatamente estabilizadas por inclusión en RNA-later® (Quiagen GmbH, Hilden, Germany) tras la biopsia y fueron conservados a -80°C hasta su procesamiento.

Tras procesar las muestras con Trizol® reagent según las instrucciones de la

manofactura.

Se realiza la extracción de ARN según nuestro protocolo. La Transcripción Inversa se realiza con 2 μ g de RNA por 40 μ l de reagente. La mezcla de reacción contiene 1 X PCR buffer, MgCL2 (5mM), dNTPs (250 μ M cada uno), Inhibidor de RNasa (1 unit/ μ l), Trasncriptasa Inversa MultiScribe (2.5 U/ μ l), Hexámeros Random (2.5 μ M) (Toso dde Applied Byosystems, Foster City, California, USA.)

Las muestras fueron incubadas durante 30 minutos a 42°C y posteriormente calentadas hasta 99°C. La expresión de mRNA de los genes seleccionados fue estudiado por real-time PCR en ABI Prism 7000 usando ensayos prediseñados (TaqMan Gene Expression Assays; Applied Biosystems). Dos μ l de reacción de real-time fueron amplificados usando TaqMan Universal PCR Master Mix y los parámetros universales de la Termocicladora. La expresión de mRNA fue cuantificada usando en método comparativo Ct (User bulletin 2, Applies Biosystems) y normalizado con controles endógenos de β - actina.

Los resultados cuantitativos de los distintos mRNA en tumor y mucosa se expresan con valores relativos obtenidos de fibroblastos dérmicos, expuestos como 10 U/mL IL-1 β por 24 horas (sistema de calibración).

c) Valoración clínica.

Se evaluó la supervivencia ajustada correspondiente a cada uno de los pacientes incluidos en el estudio, considerando como causa de censura la muerte como consecuencia del fracaso a nivel local, regional o a distancia de la enfermedad.

d) Métodos estadísticos.

Se llevó a acabo un estudio comparativo de los valores de expresión de los genes SFF1 y CXCR4 correspondientes a las muestras de tumor y mucosa sana mediante un análisis

de T de student para caso apareados.

Para la evaluación de la capacidad pronóstica de los genes SDF1 y CXCR4 se utilizó un método de clasificación por análisis de partición recursiva (RPA) de acuerdo con el método CHAID, considerando como variable dependiente la supervivencia ajustada, y como variables independientes los niveles de expresión de SDF1 y CXCR4. A partir de los resultados obtenidos mediante este método de análisis, se definieron diferentes grupos de pacientes en función de los niveles de la expresión de los genes evaluados.

Se evaluó la función de supervivencia ajustada correspondiente a cada uno de los grupos definidos mediante la técnica RPA con el método actuarial de Kaplan_ Meier.

Finalmente, se procedió a la realización de un análisis multivariante de acuerdo con el método de riesgos proporcionales de Cox, incluyendo como variable dependiente la supervivencia ajustada, y como variables independientes las características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio (localización del tumor, categoría de extensión local T y regional N, y el tipo de tratamiento utilizado), así como la categoría de expresión del eje SDF1-CXCR4 definida a partir del análisis RPA.

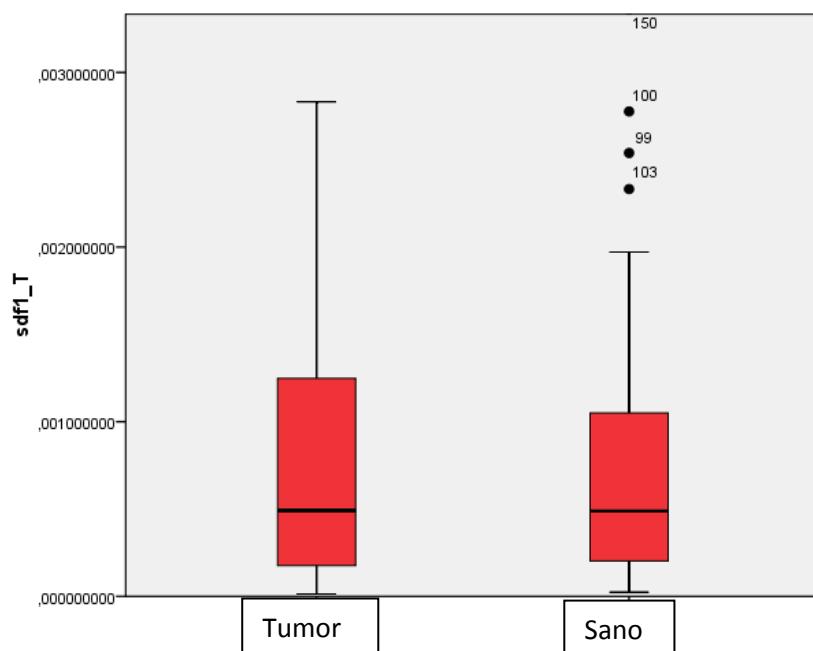
El análisis estadístico se realizó mediante el programa SPSS versión 17.0.

6. RESULTADOS

a) Comparación de la expresión de SDF1 – CXCR4 entre tumor y mucosa sana.

La siguiente gráfica de cajas muestra los valores correspondientes a los niveles de expresión de SDF1 en tumor y mucosa sana.

Figura.



La siguiente tabla muestra los valores correspondientes a los niveles de expresión de SDF1 en tumor y mucosa sana, así como el resultado del análisis de T de student para caso apareados.

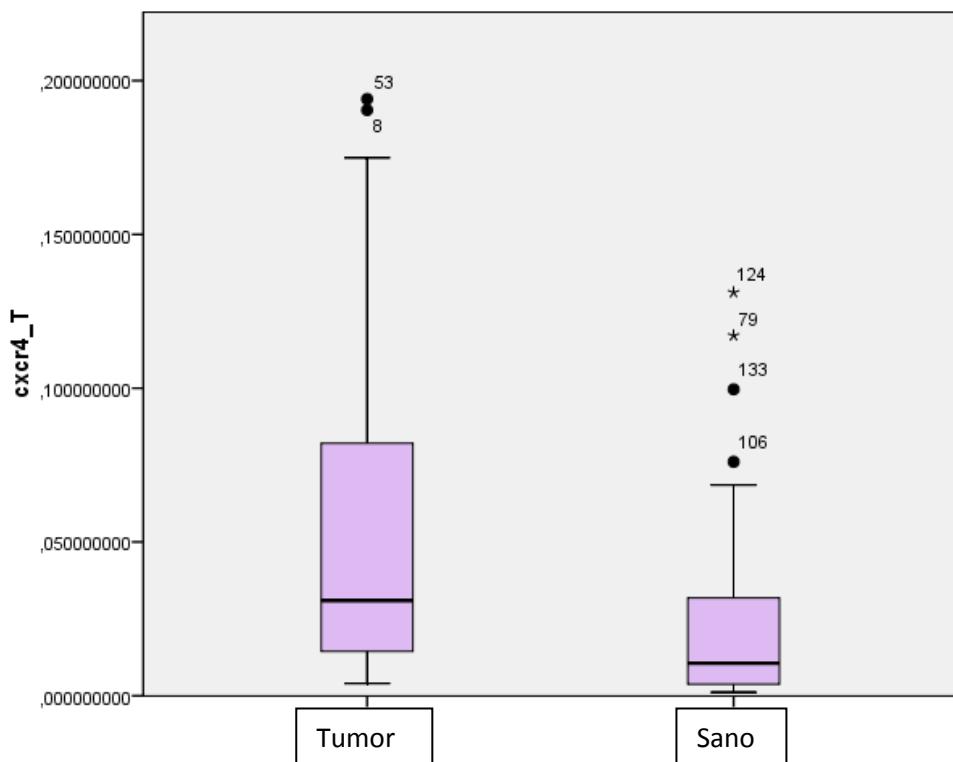
| | | Mean | Std. Deviation | Std. Error Mean |
|--------|--------|--------------|----------------|-----------------|
| Pair 1 | sdf1_T | ,00389431606 | ,013666376225 | ,001588683966 |
| | sdf1_S | ,01878261420 | ,142152839526 | ,016524931936 |

| | | Correlation | Sig. |
|--------|-----------------|-------------|------|
| Pair 1 | sdf1_T & sdf1_S | ,033 | ,778 |

No aparecieron diferencias significativas en los niveles de expresión de SDF1 entre tumor y mucosa sana ($P=0.778$).

La siguiente gráfica de cajas muestra los valores correspondientes a los niveles de expresión de CXCR4 en tumor y mucosa sana.

Figura.



La siguiente tabla muestra los valores correspondientes a los niveles de expresión de CXCR4 en tumor y mucosa sana, así como el resultado del análisis de T de student para caso apareados.

| | Mean | Std. Deviation | Std. Error Mean |
|--------|-------------------------|----------------|-----------------|
| Pair 1 | cxcr4_T ,07456938785 | ,110111601550 | ,012800213678 |
| | cxcr4_S ,02923466348 | ,061029331655 | ,007094515699 |

| | Correlation | Sig. |
|--------|----------------------------|------|
| Pair 1 | cxcr4_T & cxcr4_S -,086 | ,464 |

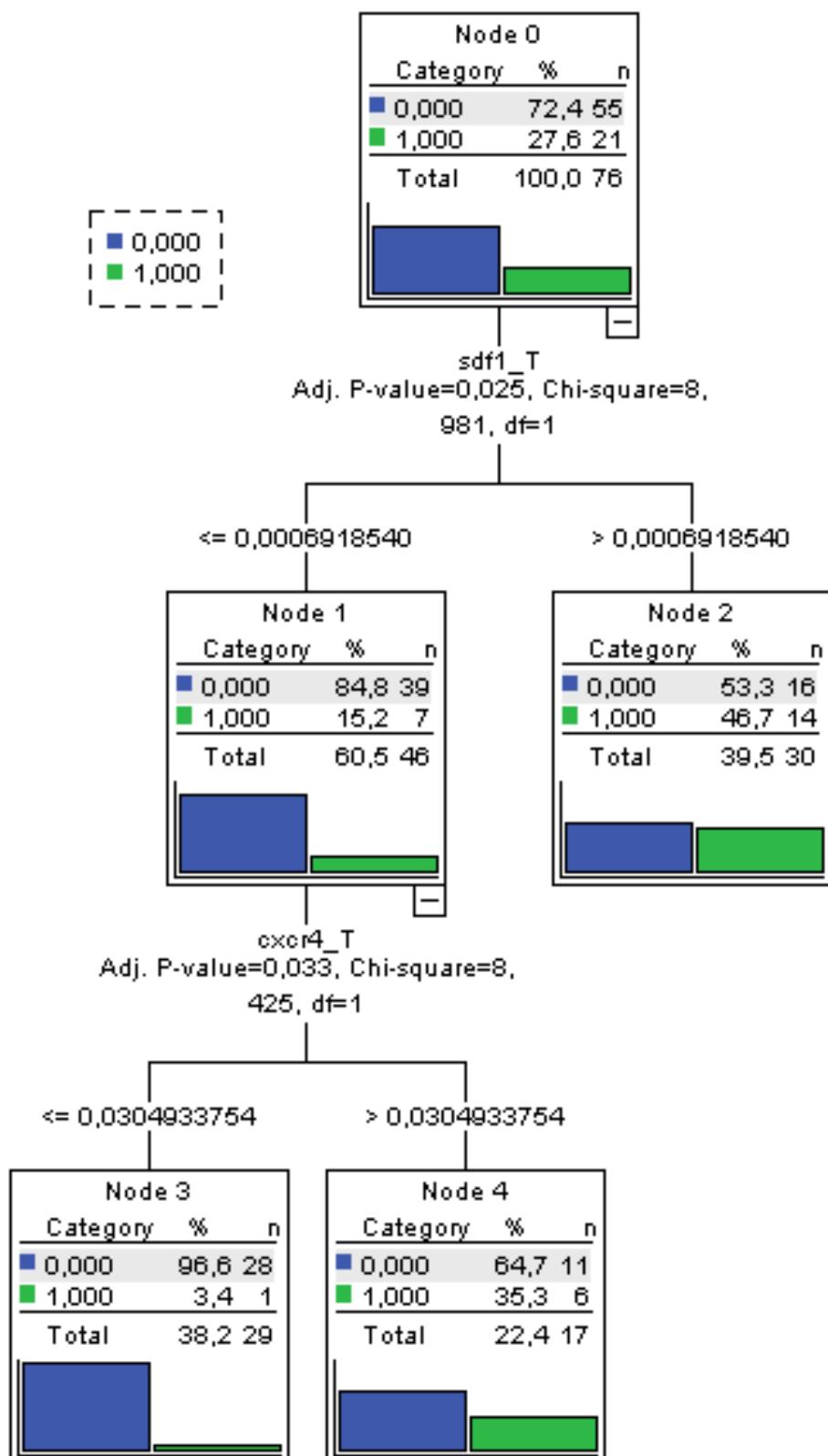
Los valores de expresión de CXCR4 en las muestras de mucosa fueron superiores a los correspondientes a los hallados en mucosa sana, si bien las diferencias quedaron al límite de la significación estadística.

- b) Capacidad pronóstica de la expresión de SDF1-CXCR4 en las muestras de tumor.

La siguiente figura muestra el resultado obtenido al realizar el estudio de RPA considerando como variable dependiente la supervivencia ajustada y como variables independientes los niveles de expresión de los genes de SDF-1 y CXCR4.

Figura.

CE_COD



Se clasificaron los pacientes de acuerdo con los niveles de expresión de SDF1 y CXCR4, obteniéndose 3 grupos de pacientes:

Grupo 1: Pacientes con niveles bajos de expresión de SDF-1 y receptor CXCR4 (n=29).

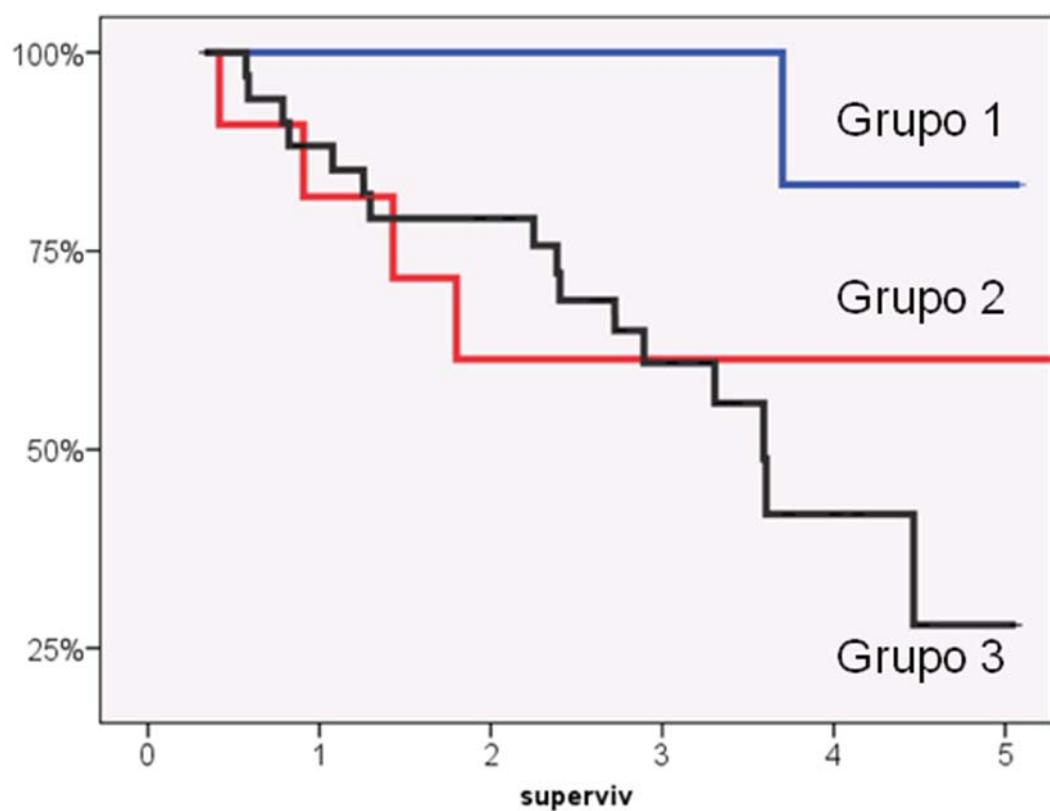
Grupo 2: Pacientes con niveles bajos de SDF-1 y niveles elevados de receptor CXCR4 (n=17).

Grupo 3: Pacientes con niveles elevados de SDF-1 (n=30).

La supervivencia actuarial ajustada a los 5 años para cada uno de los grupos fue del 86% en el Grupo 1, del 61% en el Grupo 2 y del 29% en el Grupo 3. Existieron diferencias significativas en la supervivencia en función de los niveles de expresión de SDF-1 y CXCR4 ($p= 0.004$)

La siguiente figura muestra las curvas de supervivencia actuarial ajustada de acuerdo con la clasificación obtenida al aplicar el método de clasificación RPA.

FIG SUPERVIVENCIA.



Finalmente, se llevó a cabo un estudio multivariante incluyendo como variable dependiente la supervivencia ajustada y como variables independientes variables clínicas con capacidad pronostica como la categoría de extensión local y regional, la localización del tumor y el tipo de tratamiento, así como la categoría de clasificación obtenida de la aplicación del método RPA.

| | | Sig. | Exp(B) | 95,0% CI for Exp(B) | |
|--------------|--------------------|------|--------|---------------------|---------|
| | | | | Lower | Upper |
| Grupo | 1 | | 1 | | |
| | 2 | ,023 | 13,641 | 1,435 | 129,666 |
| | 3 | ,009 | 16,768 | 2,000 | 140,574 |
| Trat | RT | | 1 | | |
| | Cir +- RT | ,369 | 1,510 | ,615 | 3,707 |
| T | 1-2 | | 1 | | |
| | 3-4 | ,249 | 2,017 | ,611 | 6,654 |
| N | 0 | | 1 | | |
| | + | ,657 | 1,240 | ,480 | 3,207 |
| Localización | Laringe- hipof. | | 1 | | |
| | Cav oral- orof. | ,015 | 3,721 | 1,287 | 10,771 |

De acuerdo con los resultados obtenidos, la categoría de clasificación de acuerdo con los niveles de expresión de SDF1-CXCR4 fue la variable que contó con una mayor capacidad pronóstica. En relación a la categoría de referencia, los pacientes con unos niveles de expresión baja de SDF1 y de CXCR4 (grupo 1), los pacientes con niveles de SDF1 baja pero CXCR4 elevados contaron con un riesgo relativo de mortalidad 13,6

veces superior (IC 95% 1.4-129.6), y los pacientes con niveles de expresión de SDF1 elevados (grupo 3) con un riesgo 16.7 veces superior (IC 95%: 2.0-140.5).

Sólo la localización del tumor apareció como variable con capacidad pronóstica, con una peor supervivencia correspondiente a los pacientes con tumores localizados en la cavidad oral-orofaringe. La categoría de extensión local T, regional N y el tipo de tratamiento realizados no aparecieron como variables con capacidad pronóstica independiente en este modelo de supervivencia.

7. DISCUSIÓN.

En los últimos años se ha avanzado de forma amplia en el conocimiento de biomarcadores o “targets” que puedan predecir la actividad biológica del tumor, la sensibilidad o resistencia a quimioterápicos y a la radioterapia, y además la posibilidad de metástasis o recurrencia de la enfermedad partiendo de las características biológicas de las células tumorales.

Este campo nos aporta día a día nuevos datos sobre las diferencias entre los tumores de una misma estirpe celular e incluso las semejanzas entre los diferentes tipos de tumor y su comportamiento. Así pues es interesante tanto la visión global de los tumores como la caracterización particular de cada subtipo hasta llegar a la individualidad.

El estudio de las quimioquinas y su papel en el cáncer tiene una larga trayectoria, pero, en el caso de los tumores del área ORL todavía no existen estudios consistentes que demuestren un papel esencial de las mismas en la biología estos tumores.

De forma concreta existen pocos estudios de investigación básica de los carcinomas del área ORL que incluyan el eje SDF-1/CXCR4.

En nuestro estudio destaca la asociación de la supervivencia con los niveles de SDF-1, aun cuando comparando las muestras pareadas de mucosa sana y tumor no existan

diferencias estadísticamente significativas de una forma cuantitativa al realizar el análisis del ARNm mediante PCR. El grupo de pacientes en cuyo tumor se expresan niveles elevados de SDF-1 presentó una supervivencia mucho menor (riesgo relativo de muerte 16 veces superior) que los grupos con SDF-1 disminuido. Así pues los niveles de esta molécula en el tumor parecen ser un factor pronóstico en nuestro estudio.

Como apoyan otros estudios, SDF-1 podría tener un papel no solo a nivel de metástasis a distancia, sino también a nivel tumoral en el crecimiento local y la proliferación “in situ”. Dado que solo analizamos las muestras obtenidas del tumor primario, se puede reconocer una tendencia a un mayor crecimiento tumoral en aquellos tumores con SDF-1 elevado.

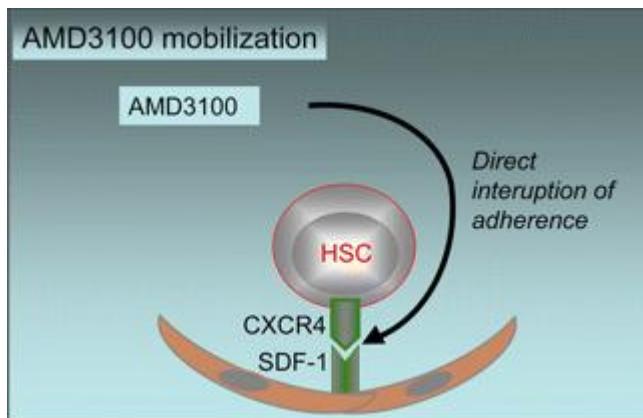
En cuanto a la supervivencia, se debe destacar que en los Carcinomas de cabeza y cuello, una categoría N mayor (metástasis a nivel ganglionar) se asocia a peor pronóstico y disminución de la supervivencia. SDF-1 podría tener un papel crucial en este punto de la historia natural de esta estirpe tumoral, dado que es uno de los principales señuelos bioquímicos para la metástasis. En la literatura se describe una correlación entre aumento de las metástasis ganglionares y la elevación de la expresión de CXCR4 en los estudios de carcinomas de cabeza y cuello de Almofti et al ²⁰, Katayama et al ¹¹, Ishikawa et al. ³³ y Lee et al. ³⁴ Sin embargo, la falta de estudios amplios en esta área nos impide relacionar otros aspectos clinicopatológicos de estos tumores con la expresión elevada de CXCR4.

Se debe destacar también que la determinación de mayores niveles de expresión de los genes de CXCR4 (receptor de SDF-1) en las muestras de tumor y de mucosa sana mediante una técnica de PCR cuantitativo, mostró una asociación con peor pronóstico en función de la expresión disminuida de SDF-1. Esta subdivisión en dos grupos resulta interesante de cara a la caracterización de los diferentes tumores. La posibilidad de

bloquear el receptor CXCR4 con los diferentes fármacos ya existentes en el mercado y utilizados en otras estirpes tumorales, hace de este receptor una potencial diana terapéutica.

Los primeros péptidos antagonistas de CXCR4 (llamados T22, T134, y T140) fueron descubiertos buscando compuestos con potencial anti-VIH-1 (CXCR4 también actúa como hemos mencionado como coreceptor en las Células T en la infección). En particular los T22 bloquean la acción de CXCR4 uniéndose a una región del receptor que permite la entrada del virus a la célula.^{35,36} T140 es el antagonista más activo, es un péptido de 14 residuos con la limitación más importante en su baja estabilidad en el suero.^{37,38} Debido a este T14012. Recientemente, se ha sintetizado un péptido cíclico nuevo antagonista denominado POL3026³⁹ con mejores propiedades farmacocinéticas y actividad antagonista potente sobre CXCR4. En cáncer, la eficacia de T140 como bloqueante de CXCR4 ha sido publicada en vivo e in vitro incluyendo leucemia⁴⁰, mama⁴¹ y cáncer de pulmón⁴² y melanoma maligno.⁴³

Dentro de otras pequeñas moléculas no peptídicas, Byciclam y Cyclams como AMD3100 tienen propiedades antagonistas de CXCR4 y una pequeña actividad agonista.^{44,45,46,47}



La capacidad antitumoral de AMD3100 se ha demostrado en el cáncer de mama bloqueando la producción de CXCL12 inducida (SDF1 inducida) por la activación “in

vitro” de HER2/neu ⁴⁸ e inhibe in vivo e crecimiento tumoral. ⁴⁹ Esta actividad antineoplásica ha sido demostrada en las células cancerígenas pancreáticas, cáncer colorrectal y glioblastoma. ^{50,51,52} Además CXCR4 juega un papel fundamental en las células de la leucemia y su microdesarrollo. El uso potencial de este fármaco en los cánceres de origen hematológico ha sido estudiado ampliamente y también en la movilización de las células madre hematopoyéticas. ^{53,54} Incluso se ha visto que en las neoplasias hematológicas, las células tumorales utilizan CXCR4 para la diseminación y progresión de la enfermedad dado que el eje SDF1/CXCR4 es crucial para el tráfico de permanencia y migración de las células de esta estirpe a los tejidos linfáticos ⁵⁵ Como se ha expuesto previamente, las células estromales de la médula ósea producen de forma fisiológica SDF1 y la activación de las células a través de su receptor CXCR4 induce a las células de leucemia a la migración hacia la propia médula ósea proporcionando así crecimiento y resistencia a los fármacos ⁵⁶. AMD3100 es capaz de movilizar las células leucémicas de su microdesarrollo en el estroma e inhibe las interacciones de adhesión tumor-estroma, esto hace que las células leucémicas sean accesibles para los fármacos convencionales. ⁵⁶ AMD3100 ha sido utilizado como un agente en la disruptión de la interacción entre las células del mieloma y el estroma de la médula ósea y las células del linfoma del manto. ^{57,58} Por tanto, el control el eje SDF1 / CXCR4 es una aproximación terapéutica ideal en los pacientes con leucemia. Se ha demostrado que en las células leucémicas, están implicados varios factores, entre los que se incluye la activación de CXCR4, que inducen la activación de PI3K. Así, la actuación de inhibidores selectivos de PI3K ha sido investigada para bloquear de forma indirecta el eje de SDF1/CXCR4 en la leucemia linfática crónica donde regulan la migración, la adhesión al estroma y su resistencia inducida por las células del estroma y su interacción. ⁵⁹ AMD3100 fue utilizado con éxito en experimentos in vivo e in vitro con éxito en ambos haciendo

regresión de de cáncer de ovario.⁶⁰ Han sido publicados resultados positivos en el tratamiento de la infección por VIH1 y la migración de las células cancerígenas con Anticuerpos contra CXCR4.⁶¹ La limitación en el uso de estos anticuerpos es la alta frecuencia de receptores CXCR4 que son heterogéneos en su conformación y su modificación postranslacional reduce la función y especificidad por parte de estos anticuerpos.⁶²

La interacción de SDF1 y sus receptores se basa en la actuación como un atrayente o “señuelo” dependiente del tipo celular. Se aumenta así la evidencia que CXCR4 está implicado en los diferentes caminos de la tumorogénesis y puede convertirse en una diana terapéutica importante para nuevos fármacos, tanto antimetastásicos como anti cancerígenos en general.⁶³

Así pues, no debería hacerse una monoterapia de anticuerpos contra uno de los receptores de forma aislada, o al menos, se debe valorar el tipo de receptor que existe de forma mayoritaria en el tejido que queremos tratar. Aun no existen estudios en la literatura que expliquen la apetencia de los diferentes tumores para metastatizar en diferentes tejidos. En el caso de los carcinomas de cabeza y cuello es poco frecuente la metástasis cerebral, en los carcinomas pulmonares es una localización frecuente a pesar de que está espacialmente más distante. Estas incógnitas en cuanto a la localización heterogénea de las metástasis podrían tener una respuesta en los mecanismos de quimiotaxis mediados por las quimioquinas y sus receptores. Por otra parte se debe estudiar a fondo el papel del eje SDF1/CXCR4 en las metástasis de tipo linfógeno y las de tipo hematógeno, dado que las señales que reciben, así como los receptores de estas células deben ser diferentes para migrar por uno u otro camino. Es claro, que otras quimioquinas deben estar implicadas en este proceso y será un largo camino para llegar a esclarecer estas interacciones.

La expresión de los genes que codifican el eje SDF-1/CXCR4 cuenta pues con capacidad pronóstica en los Carcinomas de cabeza y cuello.

8. CONCLUSIONES.

Existe una correlación estadísticamente significativa entre la expresión aumentada de CXCR4 en las células tumorales de los carcinomas de cabeza y cuello y una disminución de la supervivencia.

Existe una correlación que asocia una mayor expresión de SDF1 en las células del tejido tumoral del carcinoma de cabeza y cuello a una peor supervivencia de forma significativa, a pesar de no demostrarse una diferencia significativa en la expresión de SDF-1 en tumor frente a mucosa sana.

En este estudio se demuestra que los pacientes que muestran un peor pronóstico son aquellos cuyas muestras analizadas presentaban una mayor expresión de SDF1.

La expresión de los genes que codifican el eje SDF-1/CXCR4 cuenta con una capacidad pronóstica significativa en pacientes con Carcinoma Escamoso de Cabeza y Cuello.

Para poder aclarar las posibles aplicaciones del manejo del eje SDF-1/ CXCR4 se deben realizar estudios más amplios en este campo a nivel de los Carcinomas de cabeza y cuello.

9. BIBLIOGRAFÍA.

1. Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature*. 1996 Aug 29;382(6594):829-33.
2. 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 Jan 7;269(1):232-7.
3. Oberlin E, Amara A, Bachelerie F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Schwartz O, Heard JM, Clark-Lewis I, Legler DF, Loetscher M, Baggiolini M, Moser B. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature*. 1996 Aug 29;382(6594):833-5. Erratum in: *Nature* 1996 Nov 21;384(6606):288.
4. Miki J, Furusato B, Li H, Gu Y, Takahashi H, Egawa S, Sesterhenn IA, McLeod DG, Srivastava S, Rhim JS. Identification of putative stem cell markers, CD133 and CXCR4, in hTERT-immortalized primary nonmalignant and malignant tumor-derived human prostate epithelial cell lines and in prostate cancer specimens. *Cancer Res*. 2007 Apr 1;67(7):3153-61.
5. Kucia M, Jankowski K, Reca R, Wysoczynski M, Bandura L, Allendorf DJ, Zhang J, Ratajczak J, Ratajczak MZ. CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. *J Mol Histol*. 2004 Mar;35(3):233-45.
6. Crocker AK, Allan AL. Cancer stem cells: implications for the progression and treatment of metastatic disease. *J Cell Mol Med*. 2008 Apr;12(2): 374-9
7. Homey B, Müller A, Zlotnik A. Chemokines: agents for the immunotherapy of cancer? *Nat Rev Immunol*. 2002 Mar;2(3):175-84.
8. Burger JA, Kipps TJ. "CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment." *Blood* 2006 Mar 1;107(5):1761-7.

9. Schimanski CC, Galle PR, Moehler M. Chemokine receptor CXCR4- prognostic factor for gastrointestinal tumors. *World J Gastroenterol.* 2008 Aug 14;14(30):4721-4.
10. Gangadhar T, Nandi S, Salgia R. "The role of chemokine receptor CXCR4 in lung cancer." *Cancer Biol Ther.* 2010 Mar 18;9(6).
11. Katayama A, Ogino T, Bandoh N, Nonaka S, Harabuchi Y. Expression of CXCR4 and its Down-regulation by IFN- α in Head and neck Squamous cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005;11(8)April 15.
12. Ferlito A, Rinaldo A, Robbins KT, et al. Changing concepts in the surgical management of the cervical node metastasis. *Oral Oncol* 2003;39: 495-35.
13. Meyer T, Hart IR. Mechanism of tumour metastasis. *Eur Cancer* 1998; 34:214-21
14. Petruzzelli GJ. The Biology of tumor invasion, angiogenesis and lymph node metastasis. *ORL J Otorinolaringol Relat Spe.* 2000; 62:178-85.
15. Rodrigo JP, Cabanillas R, Chiara MD, García-Pedrero J, Fresno MF, Suárez C. Alteraciones moláculares en las metástasis ganglionares y sus tumores primarios en los carcinomas epidermoides de la laringe. *Acta Otor Espa.* 2008 vol 59, num3; 114-119.
16. Samara GJ, Lawrence DM, Chiarelli CJ, Valentino MD, Lyubsky S, Zucker S, Vaday GG. CXCR4-mediated adhesion and MMP-9 secretion in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Lett.* 2004 Oct 28; 214(2): 231-41.
17. Tan CT, Chu CY, Lu YC, Chang CC, Lin BR, Wu HH, Liu HL, Cha ST, Prakash E, Ko JY, Kuo ML. CXCL12/CXCR4 promotes laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinoma metastasis through MMP-13 dependent invasion via ERK1/AP-1 pathway. *Carcinogenesis* 2008 Aug; 29(8): 1519-27.
18. Eck SM, Blackburn JS, Schmucker AC, Burrage PS, Brinkerhoff CE. Matrix metalloproteinase and G protein coupled receptors: co-conspirators in the pathogenesis of autoimmune disease and Cancer. *J. Autoimmun.* 2009 Nov-Dec; 33(3-4): 214-21.

19. Daly A, McIlreavey L, Irwin CR. Regulation of HGF and SDF-1 expression by oral fibroblast, implications for invasion of oral cancer. *Oral Oncol.* 2008 Jul; 44(7): 646-51.
20. Almofti A, Uchida D, Begum NM, Tomizuka Y, Iga H, Yoshida H, Sato M. The clinicopathological significance of the expresión of CXCR4 protein in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.* 2004 Jul;25(1):65-71.
21. Muller A, Sonkoly E, Eulert C, Gerber PA, Kubitzka R, Schirlau K, Franken-Kunkel P, Poremba C, Snyderman C, Klotz LO, Ruzicka T, Bier H, Zlotnik A, Whiteside TL, Homey B, Hoffmann TK. Chemokine receptors in head and neck cancer: association with metastatic spread and regulation during chemotherapy. *Int. J. Cancer* 2006 May 1: 118, 2147-2157.
22. Masayuki T, Koichiro H, Shingo Y, Shigehiro O, Hideo S, Masaru N, Nobuyuki K. Up-regulation of stromal cell derived factor 1 α and its receptor CXCR4 expression accompanied with epithelial-mesenchymal transition in human oral squamous cell carcinoma. *Oncology reports* 19: 993-998, 2008.
23. Khadei B, Razmkhah M, Erfani N, Gharagozloo M, Ghaderi A. SDF-1 and CCR5 genes polymorphism in patients with head and neck cancer. *Pathol Oncol Res.* 2008 Mar;14(1): 45-50.
24. Vairaktaris E, Vylliotis A, Spyridonodou S, Derka S, Vassiliou S, Nkenke E, Yapiyakis C, Serefoglou Z, Neukam FW, Patsouris E. A DNA polymorphism of stromal-derived-factor -1 is associated with advanced stages of oral cancer. *Anticancer Re.* 2008 Jan-Feb; 28 (1A): 271-5
25. Kang, Y. and Massague, J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell* 118, 277-279. (2004).
26. Kalluri, R. and Neilson, E. G. (2003). Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J. Clin. Invest.* 112, 1776-1784.
27. Kruszyna L, Lianeri M, Rydzanicz M, Szyfter K, Jagodziński PP. SDF1-3'A Gene Polymorphism is Associated with Laryngeal Cancer. *Pathol Oncol Res.* 2009 Oct 16.
28. Gelmini S, Magoni , Serio M, Romagnani P, Lazzeri E. The critical role of SDF1/CXCR4 axis in cancer and cancer stem cells metastasis. *J.Endocrinol Invest.* 2008 Sep;31 (9): 809-19.

29. Crocker AK, Allan AL. Cancer stem cells: implications for the progression and treatment of metastatic disease. *J Cell Mol Med.* 2008 Apr;12(2): 374-90
30. Burger JA, Peled A. CXCR4 antagonist: targeting the microenvironment in leukemia and another cancers. *Leukemia.* 2009 Jan; 23(1): 43-52.
31. Uy GL, Rettig MP, Cashen AF. Plerixafor, a CXCR4 antagonist for the mobilization of hematopoietic stem cells. *Expert Opin Biol Ther.* 2008 Nov; 8(11): 1797-804.
32. Kucia 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* Volume 23 Issue 7, Pages 879 - 894
33. 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 Journal Oncol* 2006;28:61-6.
34. Lee JI, Yoon HJ. Prognostic significance of CXCR4 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg med path rad.* Vol 107. n°5, may 2005.
35. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. "HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seventransmembrane, G protein-coupled receptor," *Science*, vol. 272, no. 5263, pp. 872-877, 1996.
36. Deng H, Liu R, Ellmeier W, et al., "Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1," *Nature*, vol. 381, no. 6584, pp. 661-666, 1996.
37. Masuda N, Nakashima H, Ueda T, et al., "A novel anti-HIV synthetic peptide, T-22 ([Tyr5,12, Lys7]-polyphemusinII)," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 189, no. 2, pp. 845-850, 1992.
38. Tamamura H, Arakaki R, Funakoshi H, et al., "Effective lowly cytotoxic analogs of an HIV-cell fusion inhibitor, T22 ([Tyr5,12, Lys7]-polyphemusin II)," *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, vol. 6, no. 2, pp. 231-238, 1998.
39. DeMarco SJ, Henze H, Lederer A, et al., "Discovery of novel, highly potent and selective β -hairpin mimetic CXCR4 inhibitors with excellent anti-HIV activity and pharmacokinetic profiles," *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, vol. 14, no. 24, pp. 8396-8404, 2006.
40. Burger M, Hartmann T, Krome M, 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*, vol. 106, no. 5, pp. 1824-1830, 2005.

41. Tamamura H, Fujisawa M, Hiramatsu K, et al., “Identification of a CXCR4 antagonist, a T140 analog, as an antirheumatoid arthritis agent,” *FEBS Letters*, vol. 569, no. 1–3, pp. 99–104, 2004.
42. Burger M, Glodek A, Hartmann T, et al., “Functional expression of CXCR4 (CD184) on small-cell lung cancer cells mediates migration, integrin activation, and adhesion to stromal cells,” *Oncogene*, vol. 22, no. 50, pp. 8093–8101, 2003.
43. Takenaga M, Tamamura H, Hiramatsu K, et al., “A single treatment with microcapsules containing a CXCR4 antagonist suppresses pulmonary metastasis of murine melanoma,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 320, no. 1, pp. 226–232, 2004.
44. Donzella G.A., Schols D, Lin S. W, et al., “AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 coreceptor,” *Nature Medicine*, vol. 4, no. 1, pp. 72–77, 1998.
45. De Clercq E, Yamamoto N, Pauwels R, et al., “Potent and selective inhibition of human immunodeficiency virus (HIV)-1 and HIV-2 replication by a class of bicyclams interacting with a viral uncoating event,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 89, no. 12, pp. 5286–5290, 1992.
46. De Clercq E, “The bicyclam AMD3100 story,” *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 2, no. 7, pp. 581–587, 2003.
47. De Clercq E, “The AMD3100 story: the path to the discovery of a stem cell mobilizer (Mozobil),” *Biochemical Pharmacology*, vol. 77, no. 11, pp. 1655–1664, 2009.
48. Tamamura H, Hori A, Kanzaki N, et al., “T140 analogs as CXCR4 antagonists identified as anti-metastatic agents in the treatment of breast cancer,” *FEBS Letters*, vol. 550, no. 1–3, pp. 79–83, 2003.
49. Smith MCP, Luker KE, Garbow JR, et al., “CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer,” *Cancer Research*, vol. 64, no. 23, pp. 8604–8612, 2004.
50. Marchesi F, Monti P, Leone BE, et al., “Increased survival, proliferation, and migration in metastatic human pancreatic tumor cells expressing *Cancer Research*, vol. 64, no. 22, pp. 8420–8427, 2004. functional CXCR4,”
51. Yasumoto K, Koizumi K, Kawashima A, et al., “Role of the CXCL12/CXCR4 axis in peritoneal carcinomatosis of gastric cancer,” *Cancer Research*, vol. 66, no. 4, pp. 2181–2187, 2006.
52. Ottaiano A, Franco R, Talamanca A, et al., “Overexpression of both CXC chemokine receptor 4 and vascular endothelial growth factor proteins predicts early distant relapse in stage II-III colorectal cancer patients.” *Clinical Cancer Research*, vol. 12, no. 9, pp. 2795–2803, 2006.
53. Broxmeyer HE, Cooper S, Hangoc G, Kim CH. “Stromal cell-derived factor-1/CXCL12 selectively counteracts inhibitory effects of myelosuppressive chemokines on hematopoietic progenitor cell proliferation in vitro,” *Stem Cells and Development*, vol. 14, no. 2, pp. 199–203, 2005.

54. Cashen AF, Nervi B, DiPersio J “AMD3100: CXCR4 antagonist and rapid stem cell-mobilizing agent,” *Future Oncology*, vol. 3, no. 1, pp. 19–27, 2007.
55. Sipkins DA, Wei X, Wu JW, et al., “In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment,” *Nature*, vol. 435, no. 7044, pp. 969– 973, 2005.
56. Burger JA, Peled A, “CXCR4 antagonists: targeting the microenvironment in leukemia and other cancers,” *Leukemia*, vol. 23, no. 1, pp. 43–52, 2009.
57. Azab AK, Runnels JM, Pitsillides C, et al., “CXCR4 inhibitor AMD3100 disrupts the interaction of multiple myeloma cells with the bone marrow microenvironment and enhances their sensitivity to therapy,” *Blood*, vol. 113, no. 18, pp. 4341–4351, 2009.
58. Kurtova AV, Tamayo AT, Ford RJ, and Burger JA. “Mantle cell lymphoma cells express high levels of CXCR4, CXCR5, and VLA-4 (CD49d): importance for interactions with the stromal microenvironment and specific targeting,” *Blood*, vol. 113, no. 19, pp. 4604–4613, 2009.
59. Niedermeier M, Hennessy BT, Knight ZA, et al., “Isoform-selective phosphoinositide 3-kinase inhibitors inhibit CXCR4 signaling and overcome stromal cellmediated drug resistance in chronic lymphocytic leukemia: a novel therapeutic approach,” *Blood*, vol. 113, no. 22, pp.5549–5557, 2009.
60. Scotton CJ, Wilson JL, Scott K, et al., “Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer,” *Cancer Research*, vol. 62, no. 20, pp. 593
61. Kuritzkes DR, “HIV-1 entry inhibitors: an overview,” *Current Opinion in HIV and AIDS*, vol. 4, no. 2, pp. 82–87, 2009.
62. Farzan M, Babcock G J, Vasilieva N, et al., “The role of post-translational modifications of the CXCR4 amino terminus in stromal-derived factor 1 α association and HIV-1 entry,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 33, pp. 29484–29489, 2002.