



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**Facultat de Medicina
Departament de Cirurgia**

TESIS DOCTORAL

**PAPEL DE LA IL-1 EN EL RIESGO DE APARICIÓN
DE METÁSTASIS A DISTANCIA EN PACIENTES CON
CARCINOMA ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO**

Autor:

Carolina Bothe González

Directores:

Dr. Xavier León Vintró

Dr. Luis Vila Navarro

Dra. Mercedes Camacho Pérez de Madrid

Tutor:

Dr. Xavier León Vintró

Barcelona, 2015

*“La vida no es la que uno vivió, sino la que uno recuerda y
cómo la recuerda para contarla.”*

Gabriel García Márquez

Agradecimientos

Al Dr. León, uno de mis grandes maestros en la Otorrinolaringología. Mil gracias por el apoyo continuo, por todas sus enseñanzas y por proporcionarme las herramientas que permitieron desarrollar este trabajo.

Al todo el equipo de laboratorio, especialmente a Luis, Mercedes y Sonia. Son un ejemplo de perseverancia, dedicación y trabajo en equipo.

Al jefe y a cada uno de los adjuntos y compañeros del servicio de ORL de Sant Pau, por contribuir en mi crecimiento profesional y personal durante los 4 años de residencia y hacer de ella una de las etapas más bonitas.

A Alejo, mi compañero de vida, por creer en mi, alegrarme cada día y estar a mi lado en todo momento.

A mis padres, por enseñarme tantas cosas a través de su ejemplo. A ellos y a mi hermana gracias por su amor y apoyo incondicional en todos mis proyectos.

INFORME DE LOS DIRECTORES DE TESIS

Barcelona, Septiembre de 2015

Xavier León Vintró, consultor Sénior del Servicio de Otorrinolaringología y Patología Cervico-Facial del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona y Profesor titular de Otorrinolaringología de la UAB, Luís Vila Navarro Investigador principal del Instituto de Investigación Biomédica Sant Pau y Mercedes Camacho Pérez de Madrid Investigadora principal de Instituto de Investigación Biomédica Sant Pau;

Certifican: Que la Tesis doctoral

“Papel de la IL-1 en el riesgo de aparición de metástasis a distancia en pacientes con carcinoma escamoso de cabeza y cuello”

presentada por Carolina Bothe González para optar al título de Doctor de la Universidad Autónoma de Barcelona se ha realizado bajo nuestra dirección y cumple todos los requisitos necesarios para ser defendida delante del Tribunal de evaluación correspondiente.

Xavier León Vintró

Luis Vila Navarro

Mercedes Camacho Pérez de Madrid

ÍNDICE

Página

Agradecimientos	
Informe de los directores	
Siglas y abreviaturas	
1. INTRODUCCIÓN	15
1.1. Factores predictivos de aparición de metástasis a distancia en CECC	19
1.2. Mediadores moleculares involucrados en el desarrollo de metástasis en CECC	21
1.3. Perfiles genéticos relacionados con metástasis a distancia en CECC	30
1.4. Papel de la IL-1 en la carcinogénesis y metástasis	32
1.4.1. Descripción de la IL-1	32
1.4.2. Estructura y secreción de la IL-1	33
1.4.3. Receptores y vía de señalización de la IL-1	35
1.4.4. Funciones biológicas de la IL-1	37
1.4.5. IL-1 y carcinogénesis	38
1.4.6. Mecanismos potenciales de bloqueo de la IL-1 en CECC	42
2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS	45
3. OBJETIVOS	49
4. PACIENTES Y MÉTODOS	53
4.1. Pacientes	55
4.2. Métodos	56
4.3. Métodos estadísticos	60

5.	RESULTADOS	63
5.1.	Resultados clínicos	65
5.1.1.	Comparación de los niveles de expresión transcripcional de IL-1 entre el tumor y las muestras de mucosa sana	65
5.1.2.	Correlación entre los niveles de expresión transcripcional de la vía IL-1 en el tumor	66
5.1.3.	Relación entre la expresión transcripcional de IL-1 y el control de la enfermedad	67
5.1.4.	Análisis del secretoma	73
5.1.5.	Correlación entre los valores de expresión transcripcional de IL-1 α y otros genes de la vía IL-1	75
5.1.6.	Correlación entre los valores de expresión transcripcional de IL-1 α y genes involucrados en el proceso de metástasis	76
5.2.	Resultados del estudio experimental	78
5.2.1.	Caracterización del panel de líneas celulares	78
5.2.2.	Niveles de expresión transcripcional de los componentes de la vía IL-1 en el panel de líneas celulares	80
5.2.3.	Efecto del tratamiento con IL-1 de las células endoteliales en la adhesión de las células tumorales al endotelio	81
5.2.4.	Papel de la IL-1 en la transmigración celular	85
6.	DISCUSIÓN	89
6.1.	Biomarcadores de metástasis a distancia en CECC	91
6.2.	IL-1 como marcador de metástasis a distancia	95
6.3.	Moléculas relacionadas con la vía de la IL-1 en el desarrollo de metástasis en CECC	100
6.4.	Influencia de la IL-1 sobre la capacidad de adhesión tumoral al endotelio y la transmigración	103
6.5.	Papel del receptor antagonista de IL-1 (IL-1Ra) en el CECC	106
7.	CONCLUSIONES	109
8.	BIBLIOGRAFÍA	113

SIGLAS Y ABREVIATURAS

AP-1: proteína activadora - 1

CCR: Receptor de quimioquina

CECC: Carcinoma escamoso de cabeza y cuello

COX-2: Cicloxigenasa - 2

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

EMT: Transición epitelial mesenquimal

FAK: Quinasas de adhesión focal

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos – macrófagos

ICAM: Molécula de adhesión intercelular

IL: Interleuquina

IL-1Ra: Receptor antagonista de IL-1

IL1R1 o 2: Receptor tipo 1 o 2 de interleuquina

iNOS: Óxido nitrosintetasa inducible

M-CSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos

MEC: Matriz extracelular

MMP: Metaloproteinasas

mPGES: Prostaglandina E sintetasa microsomal

MVEC: Células endoteliales microvasculares

NFκB: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PGE₂: Prostaglandina E₂

SCC-4: línea celular de carcinoma escamoso 4

SCC-9: línea celular de carcinoma escamoso 9

TGF: Factor de crecimiento transformante

TNF: Factor de necrosis tumoral

TLR: Receptor Toll like

VCAM: Molécula de adhesión celular vascular

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Los carcinomas escamosos de cabeza y cuello (CECC) son un grupo heterogéneo de tumores que se originan en el epitelio del tracto aerodigestivo superior; incluyendo la cavidad oral, orofaringe, hipofaringe y laringe. De los 500.000 casos de tumores de cabeza y cuello diagnosticados anualmente en el mundo, los carcinomas escamosos representan el 90% y corresponden al quinto tumor maligno más frecuente en humanos¹⁻⁶. Las variables pronósticas de estos tumores son la localización, tamaño, afectación de ganglios linfáticos regionales y la presencia de metástasis a distancia⁷⁻¹⁰.

Los CECC producen principalmente enfermedad loco-regional. A diferencia de los tumores de pulmón, mama, páncreas, riñón o estómago cuya incidencia de metástasis a distancia es alta, los CECC presentan tasas relativamente bajas de metástasis que varían entre el 4 y el 26% según las series publicadas⁷⁻¹³. La frecuencia de metástasis reportada en la literatura depende del tipo de estudio y de las características de los pacientes incluidos. En el momento del diagnóstico del tumor es menor al 5%¹³, mientras que en estudios realizados en autopsias, los porcentajes ascienden hasta el 40-50%¹³⁻¹⁵. En la mayoría de casos la diseminación ocurre en los primeros dos años del diagnóstico. Los principales órganos afectados son los pulmones (70-85 % de casos), seguido de hueso (15-39%) e hígado (10-30%)^{7, 13-15}.

El control loco-regional de los pacientes con CECC ha mejorado en los últimos 50 años gracias a la introducción de nuevas técnicas quirúrgicas, a la optimización en los tratamientos de radioterapia y quimioterapia, y a la estandarización de los esquemas terapéuticos. A pesar de ello, no se ha observado un incremento en la supervivencia global, exceptuando los tumores de orofaringe los cuales se relacionan en un alto porcentaje con el virus del papiloma humano^{7, 13}. Una justificación de la ausencia de paralelismo entre la mejoría en el control loco-regional de la enfermedad y la supervivencia global, estaría en la persistencia o aumento en la frecuencia de metástasis a distancia y la aparición de segundas neoplasias^{7, 11}. El desarrollo de metástasis a distancia disminuye la posibilidad de curación y ocasiona un descenso dramático en la supervivencia^{7, 12}.

Además de los factores clínicos, estudios moleculares sugieren que la biología tumoral y susceptibilidad de los tejidos del huésped –mediadas por la expresión de determinados patrones de genes y proteínas– son determinantes en la aparición de metástasis linfática y hematógena¹¹. Se ha demostrado que los pacientes con CECC tienen alteraciones significativas en la respuesta inmunológica, inflamatoria y en la angiogénesis, las cuales estimulan el crecimiento tumoral y desarrollo de metástasis¹⁶. Aunque el origen de las señales y los mecanismos subyacentes iniciales no son del todo conocidos, se cree que las citoquinas pro-inflamatorias producidas en el microambiente tumoral son importantes en la progresión e invasión¹⁶⁻¹⁸.

Con el descenso en la mortalidad por recurrencia loco-regional y complicaciones perioperatorias, el fracaso en el tratamiento de las metástasis a distancia se ha convertido en un predictor mayor de mortalidad en pacientes con CECC, y ha llevado a que uno de los objetivos actuales en la oncología de cabeza y cuello sea desarrollar agentes antimetastásicos para uso clínico. El entendimiento de los mecanismos moleculares responsables de la invasión tumoral y de la metástasis, permitiría identificar marcadores biológicos con capacidad predictiva sobre el comportamiento de los CECC y sería el punto de partida para crear agentes terapéuticos con dianas específicas.

1.1. FACTORES PREDICTIVOS DE LA APARICIÓN DE METÁSTASIS EN CARCINOMA ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO

Los factores de riesgo clínico-patológicos de aparición de metástasis a distancia han sido estudiados por múltiples autores con el objetivo de identificar a los pacientes de alto riesgo que se puedan beneficiar de tratamientos adyuvantes. En estudios de órgano-preservación en neoplasias de laringe, se ha visto que la quimioterapia reduce la aparición de metástasis a distancia^{7, 19}. Debido a que la proporción de pacientes con CECC que desarrolla metástasis a distancia es reducida y el tratamiento con agentes quimioterapéuticos implica toxicidad importante, no parece adecuado aplicar protocolos de tratamiento sistémico en todos los pacientes.

Se han identificado factores predictivos clínicos con un nivel de significación variable según las series, dentro de los cuales destacan la localización del tumor primario, el estadio tumoral, el control loco-regional, la presencia de metástasis ganglionares y el grado de diferenciación del tumor.

Los pacientes con buen control loco-regional tienen menor riesgo de aparición de metástasis a distancia^{8, 9, 20}. En un estudio realizado en 1880 pacientes con CECC en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau se encontró una tasa de metástasis del 10% (179 pacientes); en el grupo de pacientes con recaída loco-regional fue del 18%, mientras que en pacientes con buen control loco-regional la frecuencia de metástasis fue del 5% ($p < 0.0001$)⁸. En otras series se han encontrado tasas de metástasis hasta del 23% en pacientes que mantienen control loco-regional posterior al tratamiento^{11, 21-23}. El desarrollo de metástasis en este grupo de pacientes se genera por una diseminación subclínica presente desde el momento en que se realiza el tratamiento loco-regional del tumor; estos focos metastásicos continúan su crecimiento durante el seguimiento hasta que se hacen clínicamente evidentes⁸. La principal conclusión que puede obtenerse de la valoración de estos estudios es que el control loco-regional es necesario pero no suficiente para asegurar supervivencia libre de enfermedad a largo plazo¹¹.

La mayor incidencia de metástasis a distancia se observa en tumores primarios localizados en hipofaringe^{7-9, 13}. Los tumores de supraglotis y orofaringe tienen un riesgo intermedio de metástasis, y los de glotis y cavidad oral son los de menor riesgo^{8, 13}. En el análisis multivariante del estudio mencionado en el Hospital Sant Pau, la localización del

tumor en hipofaringe y supraglotis fue un factor de riesgo independiente para el desarrollo de metástasis⁸.

La extensión ganglionar es un factor de riesgo significativo en todos los estudios. La presencia de ganglios linfáticos (pN+), el número de ganglios positivos, la afectación linfática bilateral o contralateral y la localización de adenopatías en la parte inferior del cuello son factores pronósticos que influyen en la aparición de metástasis^{7-10, 13, 20, 24}. La presencia de metástasis ganglionares con ruptura capsular es un factor conocido de mal pronóstico aun en pacientes con ganglios menores de 3 cm o en cuellos clínicamente N0^{8, 9, 20, 25}.

El grado de diferenciación tumoral también influye en la tendencia a metastatizar, siendo los tumores mal diferenciados o de alto grado los de mayor riesgo^{7-10, 20}. Los tumores pobremente diferenciados representan células tumorales que han perdido las características epiteliales y son de naturaleza más primitiva. Se correlacionan con la transición epitelio a mesenquima que implica el paso de células epiteliales a células mesenquimales individuales y móviles. Lo anterior explica por qué los tumores mal diferenciados tienen mayores tasas de extensión extracapsular, invasión perineural y linfovascular¹⁰.

A nivel molecular se han descrito factores relacionados con el riesgo de aparición de metástasis a distancia en pacientes con CECC como la pérdida de expresión de E-cadherina²⁶, la baja expresión de desmoplakina²⁷, la sobre-expresión de vimentina²⁸ y el aumento de $\alpha\beta$ -cristalina (HspB5), una proteína con capacidad de caperona frente al VEGF²⁹. La mayoría de estas moléculas están relacionadas con la transición epitelial – mesenquimal. Por otra parte, se ha estudiado la influencia de las citoquinas pro-inflamatorias en la angiogénesis tumoral e invasión del endotelio vascular. Destaca la interleuquina-1 (IL-1) por su sobreexpresión en carcinomas invasivos. En modelos experimentales de tumores pancreáticos y melanoma, la IL-1 estimula la proliferación tumoral y el desarrollo de metástasis a distancia mediante la inducción de angiogénesis y el aumento de moléculas de adhesión^{18, 30-37}. En relación a la influencia de la IL-1 en los CECC, hay pocos estudios concluyentes. Se sugiere una asociación entre la producción elevada de IL-1 y la aparición de metástasis^{16, 38-40}.

1.2. MEDIADORES MOLECULARES Y DESARROLLO DE METÁSTASIS EN CECC

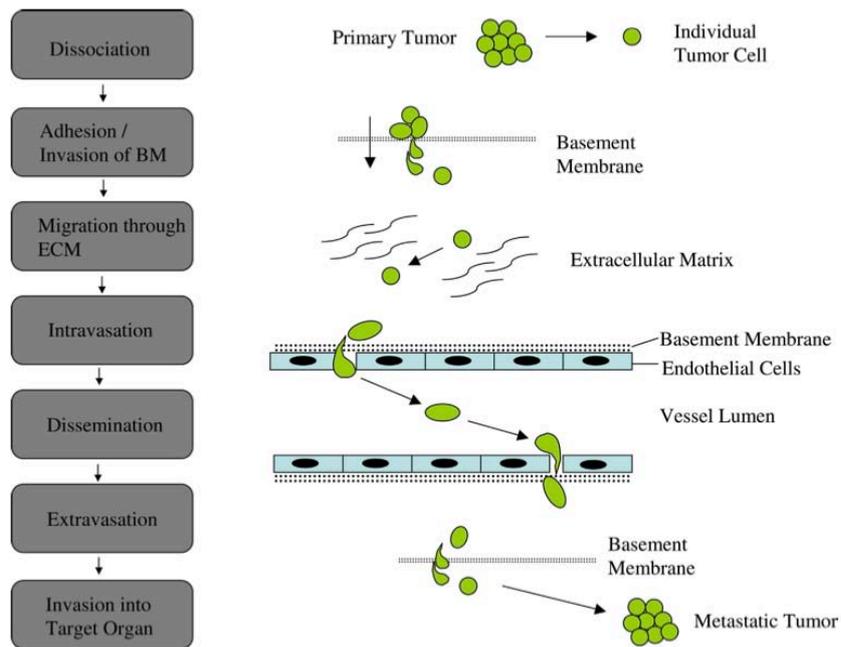
En los últimos años el estudio del microambiente tumoral ha adquirido mayor relevancia; se ha enfocado la atención en los componentes del estroma y en las moléculas que en él se producen ya que han demostrado ser determinantes en la proliferación y adquisición de invasividad tumoral.

La diseminación metastásica de un tumor no se deriva del drenaje pasivo de las células tumorales hacia el torrente linfático o vascular, sino que implica un proceso dinámico dependiente de la biología tumoral, basado en interacciones entre las células neoplásicas y las células de los tejidos del huésped^{4, 11, 41}.

Los CECC están constituidos por una amalgama de tipos celulares y de mediadores solubles que determinan en gran medida la evolución del tumor. Además de las células tumorales, lo constituyen células mesenquimales (fibroblastos, miofibroblastos y células vasculares) e inmunológicas (leucocitos), las cuales se comunican a través de citoquinas y factores de crecimiento⁴¹. Las evidencias acumuladas indican que la interacción entre las células tumorales y las células del estroma y los leucocitos son particularmente relevantes en la progresión del tumor⁴¹⁻⁴³. El diálogo que se establece entre los distintos tipos celulares constituyentes de la masa tumoral se realiza principalmente a través de mediadores solubles. Estos inducen la activación de factores nucleares que regulan la expresión génica en las células presentes en el tumor. Gran parte de estos mediadores se puede clasificar como mediadores inflamatorios a tenor de sus actividades biológicas y a su invariable presencia en cualquier proceso inflamatorio.

Entre las células del estroma cabe destacar a los fibroblastos asociados al tumor y a las células del endotelio vascular. Los mecanismos moleculares que subyacen en las acciones protumorales de dichos tipos celulares incluyen la liberación de citoquinas, factores de crecimiento, prostanoides y proteasas que actúan promoviendo el crecimiento tumoral, la angiogénesis, el ataque inmunológico y la migración de las células tumorales^{41, 44-48}. Las células tumorales son fuente de factores que actúan sobre las células vecinas del estroma, modificándolas hacia fenotipos que por un lado podrían considerarse pro-inflamatorios mediante la inducción de quimioquinas y prostanoides⁴⁹⁻⁵¹, y por otro lado anti-inflamatorios reduciendo el ataque inmunológico^{52, 53}.

En el desarrollo de la metástasis se ponen en marcha una serie de pasos secuenciales, 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 conductos 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 ^{4, 11}. 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 apoptosis¹³. En la siguiente figura se representan los principales pasos de la metástasis.



Pasos secuenciales de la metástasis

Tomado de: Molecular mediators of metástasis in head and neck squamous cell carcinoma⁴

Los estudios realizados sobre los mecanismos moleculares de la metástasis buscan determinar los niveles de expresión de las proteínas involucradas. Los mediadores biológicos que se han descrito se pueden estudiar dentro del papel que juegan en los pasos de la cascada metastásica. A continuación se describen los más estudiados.

MOLÉCULAS DE ADHESIÓN:

- **E-Cadherina/Cateninas**

El proceso de metástasis se inicia cuando las células tumorales se desprenden del tumor primario. Para esto se requiere una pérdida o disfunción de los mecanismos de adhesión célula-célula. En los tejidos epiteliales la adhesión celular está mediada por la familia de las cadherinas, glucoproteínas transmembrana dependientes de calcio responsables de mantener la integridad tisular. La E-cadherina (o cadherina epitelial) es la principal molécula implicada. La región intracelular que se encuentra en el citoplasma conecta el citoesqueleto de actina a las cadherinas mediante un complejo de proteínas llamadas cateninas. La disminución o disfunción de la E-Cadherina y de las cateninas conlleva a la pérdida de adhesión celular con la consiguiente disociación de células tumorales de la masa tumoral. En varios tipos de tumores epiteliales incluyendo los CECC, se ha observado una relación entre la expresión reducida de E-Cadherina y la presencia de metástasis^{4, 26, 54-56}. Esta relación se ha verificado de dos maneras: baja expresión de cadherina en el tumor primario en pacientes N+, y niveles significativamente menores de cadherina en las metástasis ganglionares comparadas con los niveles del tumor primario^{54, 56-58}.

Dado que la adhesión celular mediada por la E-Cadherina depende de la integridad del sistema de cateninas, la expresión alterada y localización aberrante de algunos subtipos de cateninas se ha propuesto como predictor de metástasis^{55, 59, 60}. La baja expresión de E-cadherina en los carcinomas también se ha relacionado un menor grado de diferenciación⁶⁰.

- **Integrinas**

Para que ocurra la migración de las células tumorales se debe establecer una adherencia y contacto temporal entre estas y la MEC. Las moléculas de adhesión que se han relacionado con la aparición de metástasis son las integrinas y el receptor CD44.

Las integrinas actúan como un puente directo entre las células tumorales y la MEC. De esta manera transducen señales captadas de los componentes de la MEC hacia las células tumorales y dirigen la degradación de barreras para permitir la migración tumoral.

La familia de las integrinas esta constituida por más de 20 proteínas transmembrana formadas por dos cadenas (α y β) que interaccionan con componentes de la MEC. A nivel

intracelular interactúan con proteínas que las conectan funcionalmente con el citoesqueleto y con enzimas que desencadenan cascadas de señalización. La expresión aberrante de integrinas se ha implicado en la invasión tumoral y en la aparición de metástasis en CEEC. Varios autores han encontrado niveles elevados de integrina αv - $\beta 6$ en CEEC con diseminación. El aumento de la integrina αv - $\beta 6$ ha demostrado aumentar la movilidad celular en CEEC, así como incrementar el crecimiento tumoral y activar vías de degradación de la MEC (a través de metaloproteinasas)^{4, 61, 62}.

- **CD44**

La familia de CD44 está formada por glicoproteínas transmembrana implicadas en la adhesión entre células y los diferentes componentes de la MEC. Actúan como receptores de superficie para el ácido hialurónico. Hay múltiples isoformas de CD44. Existe controversia sobre la relación entre los niveles de expresión de los CD44 y el pronóstico de los CECC^{4, 63}. Algunos autores coinciden en que hay una expresión disminuida de determinadas isoformas de CD44 (CD44s, v4, v5, v6, v7 y v9) durante la progresión tumoral^{58, 64, 65}, mientras que otros sugieren que los CECC que expresan CD44s y CD44v6 tienen menor supervivencia⁶³.

ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

Para que las células tumorales puedan invadir el estroma, entrar y salir del torrente hemático/linfático e invadir los órganos a distancia, se requiere la acción de enzimas proteolíticas que degraden los componentes de la MEC y la membrana basal. Existen cuatro tipos de enzimas proteolíticas: metaloproteinasas de la MEC (conocidas como MMP), cistein-proteasas, serin-proteasas y aspartato-proteasas.

Las MMP son endopeptidasas dependientes de zinc capaces de degradar diversos componentes de la MEC y la membrana basal. La expresión y actividad aumentada de estas enzimas, en particular la MMP-1, MMP-2 y MMP-9 se ha visto relacionada con mayor invasión, metástasis y peor pronóstico en CECC. La co-expresión de la MMP-1 y MMP-2 en la superficie de células de CECC parece tener un papel importante en el desarrollo de metástasis⁶⁶⁻⁶⁸. En un estudio de pacientes con CECC tratados con radioterapia o quimio-radioterapia, el aumento en la expresión de MMP-9 se relacionó con menor control local de la enfermedad y disminución en la supervivencia⁶⁹.

Uno de los mecanismos para controlar la acción proteolítica de las MMP es la producción de inhibidores tisulares de metaloproteinasas (conocidos como TIMP). Los TIMP teóricamente tendrían un efecto “anti-invasivo” y sería lógico relacionar niveles elevados de TIMP con bajo riesgo de metástasis, sin embargo los resultados no son concluyentes^{4, 68}.

Las vías de señalización responsables del aumento de expresión de las MMP, involucran al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y a diversas integrinas. Niveles elevados de EGRF en CECC se han correlacionado con el incremento de MMP (especialmente la MMP-9)^{70, 71}.

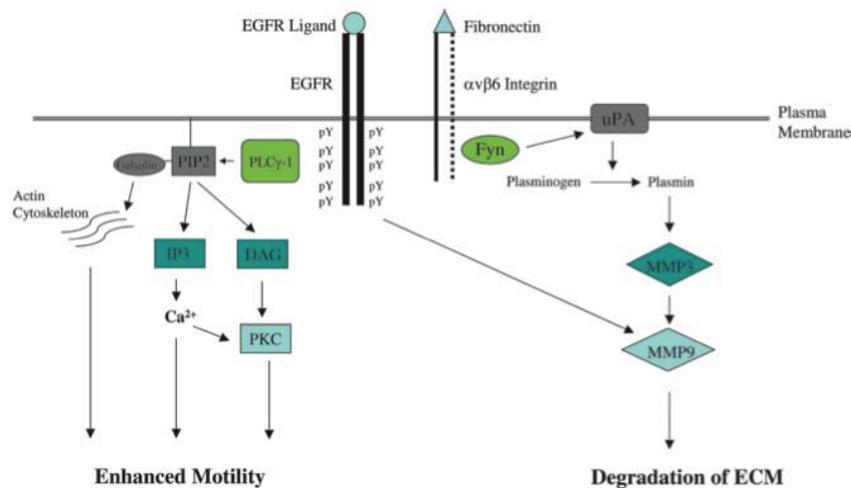
RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) pertenece a la familia de receptores transmembrana con actividad tirosín quinasa, compuesta por cuatro miembros: erbB1,2, 3 y 4.

Su presencia en cantidades elevadas se ha relacionado con la progresión y metástasis en los CECC⁷². La expresión de EGFR ha demostrado predecir la supervivencia y recaída locorregional^{71, 73, 74}. El EGFR promueve la invasión y metástasis mediante el aumento de movilidad celular, cambios en el citoesqueleto y en la adhesión celular, control de la producción de enzimas proteolíticas de la MEC y el estímulo de la angiogénesis.

Una de las principales enzimas activadas por el EGFR es la Fosfolipasa C Gamma1 (PLC γ -1). La PLC γ -1, inducida por múltiples factores de crecimiento, es importante en la regulación de la movilidad celular. Se cree que la sobreexpresión del EGFR en CECC estimula a la vía de la PLC γ -1, la cual desencadena una migración celular alterada propia de los tumores en progresión. En diversos tipos de tumores, incluido el CECC, los niveles de PLC γ -1 son significativamente más altos comparados con tejido sano. Thomas y cols demostraron mediante experimentos in-vitro con líneas celulares de CECC que al inhibir la señalización de la PLC γ -1, se disminuía la invasión de las células tumorales a través de las barreras de la MEC⁷⁵.

En la siguiente figura se presenta la vía de señalización del EGFR con los elementos implicados en la invasión y metástasis.



Elementos implicados en vías de señalización de invasión y metástasis en CECC.

- La unión del ligando al EGFR induce fosforilación de PLC γ-1 que activa la movilización de proteínas modificadoras de actina mediante la hidrólisis de PIP2 (fosfoinosítido bifosfato) a DAG (diacilglicerol) e IP3 (inositol trifosfato). Lo anterior conlleva al aumento de movilidad y migración celular.
 - Las integrinas presentes en la superficie celular interactúan con elementos de la MEC como la fibronectina, induciendo activación de metaloproteinasas (MMP) que degradan la MEC y facilitan la invasión tumoral.
- Tomado de: Molecular mediators of metástasis in head and neck squamous cell carcinoma⁴

QUINASAS DE ADHESIÓN FOCAL

Las quinasas de adhesión focal (FAK) son proteínas intracelulares con actividad tirosín-quinasa que interactúan con las integrinas dentro de los complejos de adhesión focal. Su fosforilación está mediada por vías de señalización del EGFR. Las FAK se encuentran sobre-expresadas en CECC, generando disociación o separación de las células tumorales, aumento de movilidad de las mismas e invasión^{4, 76}. Su sobre-expresión se relaciona con comportamiento tumoral agresivo y afectación ganglionar⁷⁷.

FACTORES ANGIOGÉNICOS

Los tumores sólidos no pueden crecer más de 2 o 3 mm de diámetro sin formar vasos sanguíneos. El desarrollo de neovascularización es un hecho crítico para la progresión tumoral y aparición de metástasis¹³. Los protagonistas de la angiogénesis son el VEGF y la IL-8, factores inducidos por la hipoxia y por la IL-1¹⁶. Hay otras moléculas con capacidad angiogénica como el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de

crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y los factores transformantes α y β (TGF- α y TGF- β). El VEGF se encuentra sobre-expresado en la mayoría de tipos tumorales^{11, 24}. La co-expresión de VEGF e IL-8 en niveles elevados se asocia a mayor agresividad del tumor y menor supervivencia en CECC^{16, 78, 79}. Actualmente existen tratamientos que bloquean al VEGF o regulan su vía de señalización^{13, 80}. El Bevacizumab, un anticuerpo monoclonal frente al VEGF aprobado para el tratamiento de cáncer de colon en combinación con quimioterapia, ha demostrado mejorar la respuesta al tratamiento así como aumentar la supervivencia global.

RECEPTORES DE QUIMIOQUINAS

Las quimioquinas son una superfamilia de moléculas proinflamatorias inducibles y secretadas, involucradas en un amplio espectro de respuestas inmunológicas. Actúan como quimiotácticos que activan tipos específicos de leucocitos.

La predilección del desarrollo de la metástasis en un órgano específico depende de una variedad de factores. Una de las hipótesis más recientes propone que los factores quimiotácticos producidos por las células estromales e inmunológicas llevan a las células invasoras al tejido de potencial crecimiento secundario⁸¹.

Dos de las quimioquinas expresadas de forma constitutiva en los ganglios linfáticos (CCL-19 y CCL-21) comparten el receptor de quimioquina 7 (CCR7). Estudios en cáncer de mama han reportado un aumento en la expresión de CCR-7 en tumores con metástasis⁸². Wang y cols⁸¹ estudiaron la expresión de receptores de quimioquinas en líneas celulares metastásicas de CECC, encontrando de manera consistente una expresión elevada de CCR-7 asociado a niveles de expresión disminuidos o nulos de CCR-6. Este patrón es similar al manifestado por las células inmunológicas durante el proceso de maduración normal y migración a ganglios linfáticos desde sitios periféricos de inflamación. Concluyeron que el gradiente de expresión de estos dos receptores de quimioquinas, permite a las células de CECC acceder a los ganglios linfáticos cervicales.

La siguiente tabla recoge las principales moléculas implicadas en la metástasis de CECC.

Molécula	Nivel de expresión	Rol en la metástasis de CECC
E-Cadherina	Disminuido	Promueve disociación de células tumorales
Cateninas	Disminuido o aberrante	Promueve disociación de células tumorales
Integrinas	Elevado o aberrante	Promueve migración de células tumorales
CD44	Controvertido	Promueve movilidad-migración de células tumorales
Metaloproteinasas (MMP-1,2, 9)	Elevado	Promueve movilidad de células tumorales a través de la MEC y membranas basales
EGFR	Elevado	Promueve todos los pasos de la metástasis. Induce a PLC γ -1, FAK y MMP
PLC γ -1	Elevado	Promueve movilidad celular (inducido por EGFR)
FAK	Elevado	Promueve disociación y movilidad de células tumorales (inducido por EGFR)
VEGF e IL-8	Elevado	Inducen angiogénesis, necesaria para la progresión e invasión tumoral.
Receptores de quimioquinas (CCR-6 y 7)	CCR-6: Disminuido CCR-7: Elevado	Dirigen a las células tumorales a los ganglios linfáticos y tejidos de potencial crecimiento secundario.

Mediadores moleculares en la metástasis de CECC

Modificado de Howell y cols⁴

MICROMETÁSTASIS Y CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES

El modelo tradicional y secuencial de la diseminación metastásica ha sido cuestionado por algunos autores, argumentando que los sistemas vascular y linfático están íntimamente relacionados entre si en el tumor primario así como en los ganglios regionales, y por lo tanto las células tumorales tienen igual oportunidad de pasar a un sistema u otro. Este hecho se refleja en algunas series en donde las tasas de metástasis son similares en pacientes N0 y N+ y pone en duda que la afectación de ganglios linfáticos cervicales sea un paso intermediario en la cascada metastásica¹¹.

Estudios recientes objetan el concepto de metástasis como evento tardío en el cáncer. En pacientes con diversos tipos de tumores – incluidos los CECC – se ha documentado la presencia de células tumorales circulantes con capacidad de diseminación temprana^{11, 83}. La detección de células tumorales circulantes en sangre periférica se ha relacionado con

peor pronóstico⁸³ y en algunos casos con la presencia clínica de metástasis a distancia^{84, 85}.

Sólo 0.01% de células tumorales circulantes son capaces de desencadenar crecimiento tumoral en una localización a distancia¹³. Se desconoce la biología intrínseca de la célula tumoral y del huésped que permite que la célula tumoral circulante se deposite en un tejido convirtiéndose en una micrometástasis a distancia y eventualmente en una metástasis clínicamente detectable⁸⁴⁻⁸⁶. En tumores de mama y colon, la presencia de células micrometastásicas circulantes se relaciona con peor pronóstico⁸⁷. En un estudio realizado en 162 pacientes con CECC tratados quirúrgicamente, se estudió la presencia de micrometástasis en médula ósea encontrando una menor supervivencia libre de metástasis en pacientes que presentaban micrometástasis y >2 adenopatías en el momento de la cirugía⁸⁷.

La diseminación de las células tumorales circulantes puede darse incluso antes de la consolidación del tumor primario. La progresión de estas células podría explicar el desarrollo de carcinomas con primario desconocido (CUP) o *N sin T*⁸³. En pacientes que han recibido tratamiento por cáncer de mama, la presencia de células tumorales circulantes en médula ósea se correlaciona con recaída local, lo cual sugiere que la recirculación de células tumorales desde localizaciones a distancia hacia el tumor primario contribuye a la recurrencia tumoral⁸³.

El fallo en el control de la enfermedad metastásica puede deberse a que las micrometástasis presentes en el momento del diagnóstico del tumor primario no son clínicamente evidentes y por lo tanto no son tenidas en cuenta en el tratamiento inicial de estos pacientes¹¹. El significado clínico de las micrometástasis debe ser estudiado con mayor profundidad. Su presencia en determinadas situaciones clínicas apunta a que el desarrollo de metástasis a distancia depende de la biología tumoral más que de la progresión de la enfermedad a través de los linfáticos regionales¹¹.

1.3. PERFILES GENÉTICOS RELACIONADOS CON METÁSTASIS A DISTANCIA EN CECC

El proceso de la carcinogénesis resulta de la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas que le confieren a la célula tumoral propiedades selectivas para su crecimiento y conllevan en último término al desarrollo de metástasis⁸⁸. Más que la alteración en regiones aisladas de genes, la diseminación tumoral a distancia se debe a la suma de aberraciones en varios genes y se traduce en la desregulación de diversas vías moleculares⁸⁹.

El potencial metastásico parece estar codificado en el material genético del tumor primario. Asumiendo que hay cambios genéticos específicos en la célula tumoral que le confieren capacidad de diseminación, el estudio del tumor permitiría detectar diferencias entre la expresión génica de tumores metastásicos y no-metastásicos. La identificación de estos perfiles ayudaría a mejorar la estadificación del TNM y a instaurar tratamientos sistémicos apropiados⁵. Se han publicado varios estudios sobre las “huellas o firmas metastásicas”, en referencia a los perfiles genéticos responsables del fenotipo metastásico. En neoplasias de mama y próstata los resultados son prometedores; de hecho actualmente existen perfiles genéticos en cáncer de mama validados y disponibles en el mercado⁵. Las tecnologías que se emplean para encontrar dichos perfiles son los *microarrays* de ADN que determinan la expresión de miles de genes y la qPCR-RT (Reacción en Cadena Polimerasa Cuantitativa con Transcriptasa Reversa) que permite cuantificar de manera más precisa la expresión de un número más limitado de fragmentos de ADN.

En un estudio de 70 muestras de CECC, Colella y cols⁸⁸ encontraron una correlación entre el perfil genético presente en la muestra de tumor primario y la muestra de tejido metastásico (en cada individuo), indicando que el potencial metastásico viene codificado en el tumor primario. Además identificaron 46 genes con expresión desregulada relacionados con la aparición de metástasis. Estos genes están involucrados en procesos de adhesión celular, remodelación de la matriz extracelular y regulación del ciclo celular. Algunos de ellos han sido relacionados con el comportamiento metastásico en otras neoplasias de origen epitelial⁸⁸. Giri y cols² encontraron que los pacientes con metástasis a distancia expresan genes que reprimen la apoptosis y estimulan la replicación y

reparación de ADN, además de genes relacionados con la angiogénesis y la interacción de la célula con la matriz extracelular tales como las cadherinas.

Roepman y cols³ compararon 45 muestras de carcinoma escamoso de cavidad oral y orofaringe en pacientes pN+ y 37 muestras de pN0, encontrando un perfil de 102 genes predictores de metástasis ganglionar. En la validación independiente de 22 muestras, el perfil predictor alcanzó una precisión del 100% para los casos N0 y de 77% para los N+. En un estudio que pretendía determinar la expresión de genes implicados en metástasis a distancia, se compararon 11 muestras de CECC de pacientes que desarrollaron metástasis con 8 muestras de pacientes que no desarrollaron metástasis en un seguimiento de 3 años⁹⁰. Sólo 150 genes de los más de 17.000 estudiados presentaron expresión diferenciada entre los dos grupos, sin que llegase a demostrarse un perfil específico asociado a la aparición de metástasis. En otro estudio se analizó la expresión de genes relacionados en la adquisición de metástasis a distancia en 34 muestras de tumores primarios de hipofaringe⁸⁹. Los autores identificaron 164 genes potencialmente involucrados. Sin embargo aclararon que no se pueden considerar predictores de metástasis debido al tamaño reducido de la cohorte y la falta de validación cruzada de datos.

Chung y cols¹ estudiaron 60 muestras de CECC mediante *microarrays*, las cuales fueron divididas en cuatro subtipos con distinto comportamiento. El subtipo tumoral con peor pronóstico se caracterizó por expresar altos niveles de TGF- α y activar la vía del EGFR. Concluyeron que esta huella genética podría servir para predecir la aparición de metástasis y seleccionar pacientes que se pudiesen beneficiar de tratamiento con inhibidores del EGFR. Varios de los genes identificados en el grupo de peor pronóstico (antígeno 1 del penfigoide buloso, P-cadherina, Laminina gamma 2 y colágeno XVII- α) también han sido descritos en tumores agresivos de mama y pulmón.

Al superponer las diferentes listas de genes desregulados en CECC, la proporción de genes en común es baja⁵. Las discrepancias en la significancia de los genes identificados se deben a que las muestras tumorales estudiadas son de diferentes localizaciones, al uso de diferentes plataformas de *microarrays* y al empleo de análisis bioestadísticos heterogéneos. El descubrimiento de perfiles de expresión génica en los CECC supone un gran avance en la oncología, sin embargo se requiere de estudios que validen su relevancia clínica.

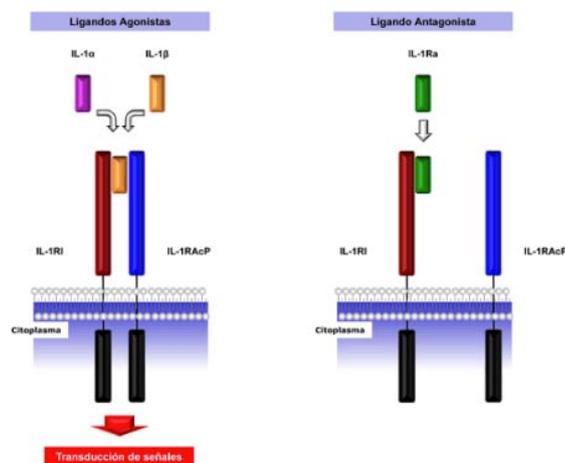
1.4. PAPEL DE LA IL-1 EN LA CARCINOGENÉISIS Y METÁSTASIS

Los pacientes con CECC se caracterizan por presentar alteraciones en la respuesta inmunológica, inflamatoria y en la angiogénesis, lo cual se traduce clínicamente en fenotipos tumorales agresivos y de peor pronóstico¹⁶. Estos procesos están mediados por citoquinas pro-inflamatorias producidas en el microambiente tumoral cuya principal exponente es la Interleuquina 1.

1.4.1. Descripción de la IL-1

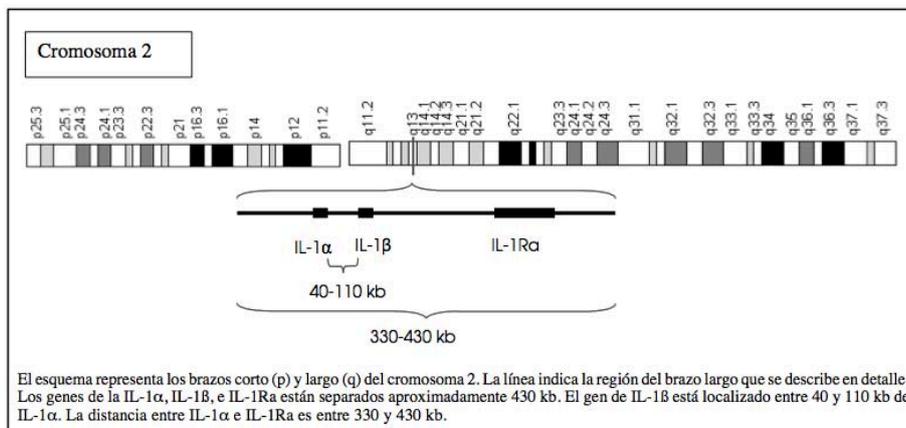
La interleuquina 1 (IL-1) es una molécula con un interés particular por su papel orquestador de la respuesta inflamatoria. Se trata de una citoquina pleiotrópica con funciones determinantes en la inflamación, inmunidad y hematopoyesis⁹¹⁻⁹³. Desempeña funciones fisiológicas diversas; desde la inducción de la permeabilidad vascular durante la sepsis, hasta la producción de hormonas hipofisarias o estimulación de procesos autoinmunes. Su producción debe estar regulada para evitar efectos negativos sobre el sistema vascular, endocrino, inmunológico, hematopoyético y sobre el tejido conectivo^{94, 95}.

Los principales miembros de la familia de la IL-1 son dos proteínas agonistas: IL-1 α e IL-1 β y una antagonista: el receptor antagonista de IL-1 (IL-1Ra); un inhibidor fisiológico que se une al receptor de la IL-1 sin transmitir la señal de activación.



Moléculas agonistas: IL-1 α e IL-1 β y receptor antagonista de IL-1: IL-1Ra

Las 11 moléculas que constituyen la familia de la IL-1 están codificadas por 11 genes diferentes que se localizan en el brazo largo del cromosoma 2, en la región 2q12-q21⁹⁵. Los genes de la IL-1 α , IL-1 β e IL-1Ra están separados 430 kb. La IL-1 α y la IL-1 β son codificadas por dos genes de longitudes diferentes pero con organización similar que comprenden 7 exones. A nivel de DNA ambos genes muestran una homología de aproximadamente 45%⁹⁶. Los loci polimórficos de estos genes están implicados en una amplia gama de enfermedades.⁹⁷



Localización de genes de la IL-1.

Tomado de: Bases moleculares de la familia de la interleuquina⁹⁷

1.4.2. Estructura y Secreción de la IL-1

Diversos tipos de células producen y secretan IL-1 ante inflamación, estrés u otros estímulos ambientales. La principal fuente de IL-1 son las células del sistema inmune innato (macrófagos y monocitos), sin embargo las células epiteliales, endoteliales y fibroblastos también la pueden producir. La producción de la IL-1 es inducida por productos bacterianos como los lipopolisacáridos y otras citoquinas como el TNF, IL-2, IL-3, IL-12, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de células madre y factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF). Otros inductores de la secreción de IL-1 son el daño tisular (hiperosmolaridad, isquemia), sustancias neuroactivas (sustancia P, anfetaminas), moléculas inflamatorias (PCR, α -1-antitripsina, cristales de urato y de pirofosfato de calcio), factores de la coagulación (plasminógeno, trombina), lípidos (factor

activador de plaquetas, LDL oxidadas) y algunos medicamentos como anfotericina-B, bleomicina y colchicina^{97, 98}.

La IL-1 β no está presente en condiciones homeostáticas. Es producida y secretada sólo en contexto de inflamación. Los pacientes con procesos infecciosos e inflamatorios presentan concentraciones plasmáticas elevadas de IL-1 β , sugiriendo un rol sistémico de esta molécula. Por el contrario la IL-1 α , presente dentro de la célula en condiciones fisiológicas, es indetectable en fluidos del cuerpo^{93, 95, 99}.

Tanto la IL-1 α como la IL-1 β son sintetizadas como precursores de 31 KDa y posteriormente procesadas por proteasas para adquirir su forma madura de 17 KDa⁹⁸. La proIL-1 α es procesada por la calpaina y la IL-1 β por la caspasa-1 o enzima convertidora de IL-1 β ⁹³.

El precursor de la IL-1 α (proIL-1 α) tiene 271 aminoácidos y es sintetizado en los ribosomas asociados a microtúbulos. La proIL-1 α es biológicamente activa y permanece en el citosol y en la superficie celular. Cuando las células mueren se libera pro-IL1 α , que puede ser clivada por proteasas extracelulares⁹⁸. La forma madura de 159 aminoácidos se produce por acción de proteasas de membrana llamadas calpains.

La IL-1 β después de ser sintetizada, permanece inicialmente en el citosol hasta ser clivada y transportada fuera de la célula. Para ser funcional debe ser procesada por la enzima convertidora de IL1- β (ICE). Al parecer la pro-IL1- β es liberada y procesada por proteasas extracelulares (gelatinasa-B, MMP-2, 3 y 9) dando lugar a la forma madura biológicamente activa^{97, 98}.

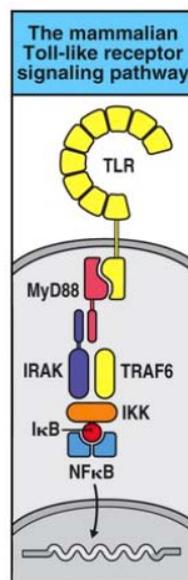
El IL-1Ra también es traducido como una proteína de 17 kDa. Después de su procesamiento, es secretado al ambiente extracelular. La homología en la secuencia proteica de las formas maduras de IL-1 β y de IL-1Ra es del 26%, similar a la existente entre IL-1 α e IL-1 β (23%)⁹⁷.

Como se ha mencionado, la IL-1 α y β difieren en su localización dentro del compartimiento celular y ambiental: la IL-1 β es activa únicamente en forma de molécula secretada, actuando de manera paracrina o sistémica, mientras que la IL-1 α es activa

dentro del núcleo, en el citosol o asociada a la membrana celular, su secreción es muy limitada, por lo tanto actúa principalmente por mecanismos autocrinos o yuxtacrinos^{93, 95}.

1.4.3. Receptores y vía de señalización de la IL-1

Los receptores de IL-1 pertenecen a la superfamilia de inmunoglobulinas, cuyos miembros participan en la respuesta inmune innata y en la inflamación^{95, 100}. La superfamilia de receptores IL-1/*Toll like* (TLR) incluye también receptores para la IL-18 y para productos bacterianos. Todos ellos comparten secuencias similares en sus regiones citosólicas; a estas regiones se les conoce como dominio TIR (receptor de interleuquina Toll)¹⁰⁰.



Estructura y vía de señalización de los IL-1/*Toll-like* receptors

Tomado de: Immunobiology: The immune system in health and disease¹⁰¹

La IL-1 se une a dos tipos de receptores de membrana con consecuencias diferentes para la célula blanco. La unión al receptor tipo 1 (IL-1R1) produce un cambio conformacional del receptor que genera la transducción de una señal, por lo tanto es el receptor biológicamente activo. Por el contrario, el receptor tipo 2 (IL-1R2) capta a la IL-1 pero no transduce la señal, actúa como antagonista o *decoy* y reduce los niveles elevados de IL-1^{95, 97}.

El IL-1R1 es una glicoproteína transmembrana de 80 kDa que se expresa de forma constitutiva en la mayoría de células y se une principalmente a la IL-1 α . La transducción

de la señal a través del IL-1R1 requiere el reclutamiento de la proteína accesoria (IL-1RAcP).

El antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra) se une con afinidad al IL-1R1, sin embargo no activa el reclutamiento de la proteína accesoria y por consiguiente no desencadena transducción de la señal. La IL-1 β es el ligando con menor afinidad al IL-1R1^{91, 97, 102}.

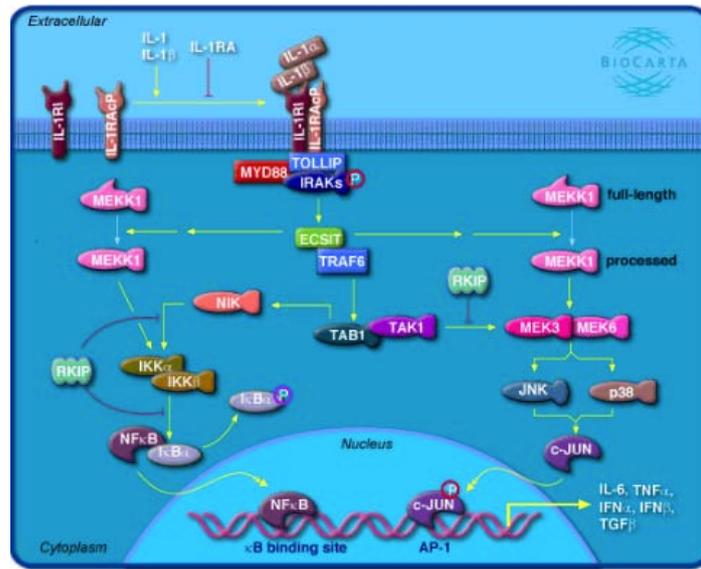
El receptor tipo 2 (IL-1R2) es una glicoproteína de 68 kDa expresada en las mismas células que el IL-1R1 con excepción de las células endoteliales. IL-1R2 no es capaz de transducir la señal pues carece de un dominio citoplasmático necesario. La acción inhibitoria o neutralizadora del IL-1R2 se explica por dos vías: por un lado “secuestra” a la proteína accesoria (IL-1RAcP) e impide que ésta interactúe con el receptor activo (IL-1R1), y por otra parte se une a la IL-1 sustrayéndola de los complejos de señalización IL-1/IL-1R1⁹⁴.

La vía de señalización de la IL-1 inicia con la unión de ésta al IL-1R1. Se requiere el reclutamiento de una proteína accesoria (IL-1RAcP) que actúa como co-receptor para formar un complejo heterodimérico. La asociación de estas dos moléculas permite el reclutamiento de las proteín-quinazas asociadas a IL-1R1: IRAK-1, IRAK-2 e IRAK-M y de la proteína adaptadora MyD88 (factor de diferenciación mielóide 88). Posteriormente IRAK se disocia de este complejo y se une a TRAF-6 (factor 6 asociado al receptor de TNF)^{94, 103}.

Una secuencia compleja de eventos de fosforilación/desfosforilación y ubiquitinación de diferentes quinazas conlleva a la activación de proteínas que participan en la transducción y translocación de factores transcripcionales al núcleo, principalmente el NF κ B (factor nuclear κ B) y la AP-1 (proteína activadora -1)¹⁰³.

A través de la proteína asociada a TRAF conocida como ECSIT (intermediario de señalización evolutivamente conservado en las vías Toll), se produce una señal que lleva a la activación de c-jun mediante el sistema de señalización MAP quinasa/JNK (proteín quinasa activada por mitógeno / quinasa c-jun N-terminal). Toda esta compleja cascada lleva a la inducción de los genes blanco de la IL-1 tales como IL-6, IL-8, MCP-1, COX-2, I κ B α , IL-1 α , IL-1 β , MPK-1¹⁰³.

El siguiente esquema resume la vía de señalización de la IL-1.



Vía de señalización de la IL-1

La unión de la IL-1 α e IL-1 β desencadena la dimerización del receptor y una consecuente cascada de quinasas asociadas al receptor de la IL-1 (IRAK) con fosforilación de varios intermediarios proteicos de la vía de señalización, que finaliza con la activación de factores de transcripción (principalmente NF κ B y AP-1) responsables de los efectos biológicos en la célula diana. La unión del antagonista del receptor (IL-1Ra) no desencadena señal.

Tomado de: Biocarta® IL-1 signaling pathway

1.4.4. Funciones biológicas de la IL-1

Una de las principales actividades biológicas de la IL-1 es la regulación de la inflamación. Al igual que el TNF α , la IL-1 es considerada una citoquina “de alarma” pues da inicio a la respuesta inflamatoria mediante la inducción de una cascada de genes pro-inflamatorios, dentro de los que destacan la COX-2 (ciclooxigenasa 2), la iNOS (óxido nítrico sintetasa inducible), la mPGES-1 (prostaglandina E sintetasa microsomal), metaloproteinasas, quimioquinas y citoquinas^{50, 93, 95}. La reacción es amplificada gracias a la inducción de sus propios genes (*feedback* positivo) y a la expresión de factores de adhesión como la ICAM-1 (molécula de adhesión intracelular-1) e integrinas endoteliales para permitir el paso de leucocitos del torrente sanguíneo a los tejidos^{93, 95}.

En células sometidas a hipoxia aumenta la expresión de pro-IL1 α . Posterior a la muerte celular por necrosis, la pro-IL1 α liberada genera una respuesta inflamatoria “estéril”. Por el contrario, en la muerte celular por apoptosis, la IL-1 α se concentra en focos nucleares

densos y no se libera al ambiente. Esto explica porque no se genera respuesta inflamatoria ante la apoptosis⁹³.

En cuanto a la acción sobre el sistema inmunológico, se sabe que la IL-1 estimula la proliferación y diferenciación de células tanto del sistema innato (fagocitos, natural killers, granulocitos, etc) como del adquirido (linfocitos T y B). Sus efectos son más pronunciados sobre los linfocitos T, reflejados en la expansión de los CD4+ ante estímulos de antígenos y en una respuesta potenciada de los mismos ⁹³.

La IL-1 también cumple un papel importante en la hematopoyesis, promueve la formación y maduración de elementos formes de la sangre mediante la producción de factores estimuladores de colonias^{93,95}. En el cáncer y la inflamación crónica, diversas citoquinas proinflamatorias incluyendo la IL-1 β inducen la expansión de células mieloides inmaduras dentro de la médula ósea. Estas células salen inmaduras a la circulación sistémica y migran hacia la zona del tumor, focos inflamatorios, ganglios linfáticos y bazo. Posteriormente las células mieloides inmaduras son activadas por productos inflamatorios y adquieren propiedades inmunosupresoras e invasivas ⁹³.

1.4.5. IL-1 y Carcinogénesis

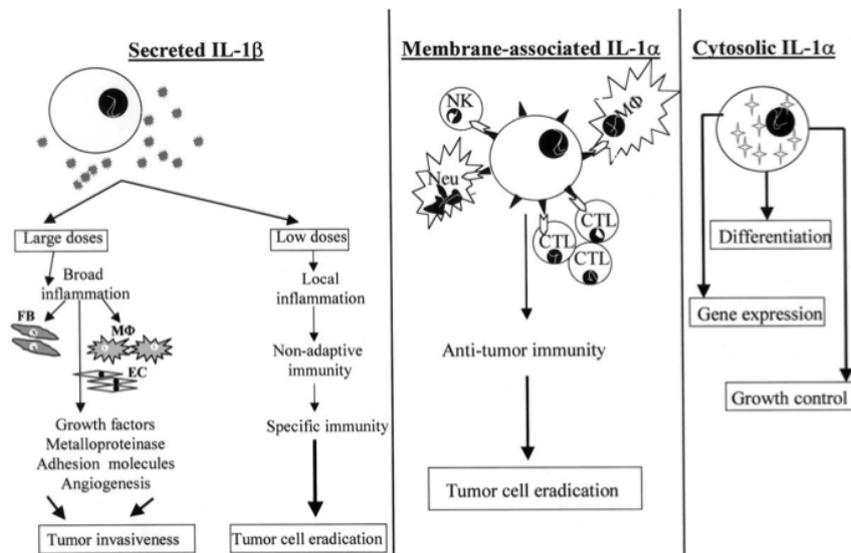
Estudios realizados en modelos murinos han encontrado que la sobre-expresión de IL-1 a nivel gástrico y hepático esta relacionada con la presencia de inflamación espontanea, el desarrollo de lesiones pre-neoplásicas y en algunos casos la aparición de tumores. En ratones con aumento de expresión de IL-1 β en células epiteliales gástricas se observó una respuesta inflamatoria local exacerbada, desencadenada por activación del NK-kB, que llevó al desarrollo de hiperplasia y carcinogénesis de las células gástricas¹⁰⁴. De forma similar, la sobre-expresión de IL-1 α en hepatocitos generó una cascada de eventos que contribuyeron al desarrollo de carcinoma hepatocelular¹⁰⁵.

Krelin y cols¹⁰⁶ demostraron una relación entre la inflamación desencadenada por la IL-1 y la inducción de carcinogénesis química en ratones tras la administración de 3-metilcolantreno (3-MCA), un carcinógeno implicado en la iniciación y progresión tumoral. Concluyeron que la carcinogénesis por 3-MCA está sujeta a fenómenos inflamatorios dependientes de la expresión de IL-1.

La IL-1 se encuentra en concentraciones elevadas en el ambiente tumoral donde es producida por las células inmunológicas, estromales y por las mismas células malignas. La evidencia indica que la IL-1 promueve el crecimiento e invasividad del tumor^{16, 17, 40, 107, 108}, no obstante podría estar involucrada en mecanismos de inmunidad anti-tumoral⁹⁵.

La localización de la molécula de IL-1 dentro del compartimiento celular determina sus funciones biológicas. La IL-1 α asociada a la membrana tiene una acción inmunoestimuladora, actúa como molécula de adhesión permitiendo interacción con células efectoras del sistema inmune. La IL-1 α citosólica, también conocida como Pro-IL1 α , ejerce control sobre la proliferación celular, regula el ciclo celular y la apoptosis. Pertenece al grupo de “citoquinas con función dual” ya que puede entrar en el núcleo e inducir las funciones homeostáticas y por otra parte liberarse al microambiente ante la necrosis iniciando la reacción inflamatoria⁹⁵.

La IL-1 secretada (principalmente IL-1 β) tiene acciones antagónicas según su concentración: en bajas dosis parece inducir inflamación y activación de inmunidad protectora, mientras que en altas dosis genera reacciones inflamatorias extensas con daño tisular, necrosis y aumento de invasión tumoral^{95,93}. En la siguiente figura se resumen los efectos biológicos de la IL-1 en el microambiente tumoral en función del patrón de expresión de la molécula.

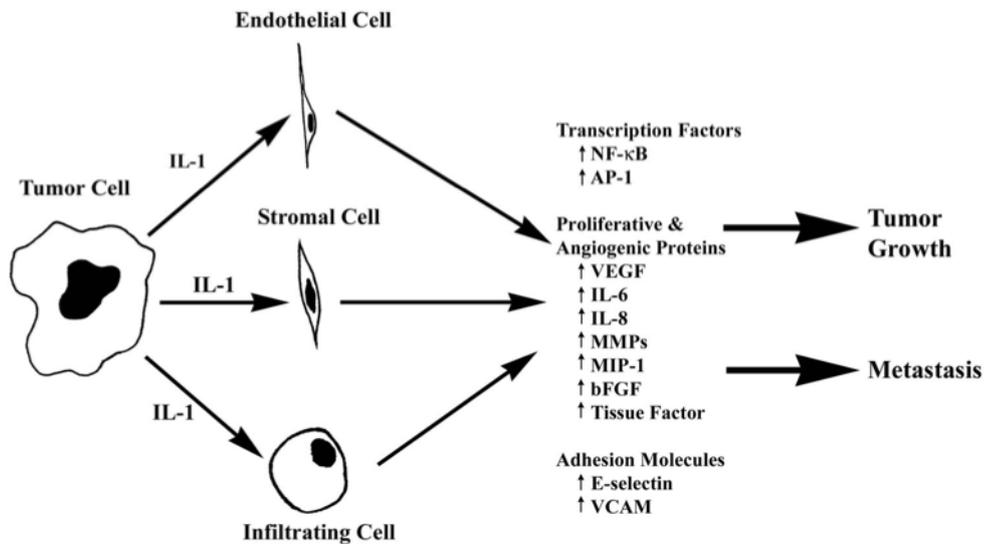


Patrón de expresión de IL-1 y efectos biológicos en el ambiente tumoral.

Tomado de: Interleukin-1 a major pleiotropic cytokine in tumor-host interactions⁹⁵

El efecto que predomina en determinada red de citoquinas esta influenciado por diversos factores tales como el tipo de interleuquina, la concentración, forma y localización de la molécula dentro del compartimiento celular, el tipo de neoplasia y el estadio tumoral ⁹⁵. El tipo de IL-1 que predomina en un tumor varía en función de la histología y localización del mismo. Eralaj y cols¹⁸ encontraron que las líneas celulares de carcinoma escamoso y melanoma presentaban un incremento de IL-1 α , mientras que tumores de colon y pulmón presentaban mayor cantidad de IL-1 β .

La IL-1 promueve la expresión de genes pro-metastásicos como metaloproteinasas, factores angiogénicos (VEGF), factores de crecimiento, citoquinas (IL-6, IL-8, TGF- β y TNF- α) y moléculas de adhesión^{95,94}. La estimulación de factores angiogénicos y factores de adhesión es determinante en el crecimiento del tumor y en el desarrollo de metástasis^{95,94,93}. En el siguiente esquema se representa el modelo de crecimiento tumoral y metástasis inducido por la IL-1.



Modelo de crecimiento tumoral e inducción de metástasis mediado por IL-1.

Tomado de: Interleukin-1 and cáncer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cáncer treatment ⁹⁴

En modelos experimentales de melanoma se ha visto que la administración de IL-1 tras la inyección de células tumorales incrementa el número de metástasis³¹. Por otra parte, la intervención farmacológica con bloqueantes del receptor de la IL-1 o la supresión de la IL-1, reduce las metástasis en diversos modelos ^{18, 31, 94, 109}.

La IL-1 induce la expresión de moléculas de adhesión como la VCAM-1 (molécula de adhesión celular vascular-1) y la ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular-1) en el endotelio vascular, y promueve la formación de prostaglandina E₂ (PGE₂)^{50, 107, 110, 111}. La PGE₂ es un prostanóide con actividad pro-tumoral que a su vez induce la proliferación e inhibe la apoptosis de las células tumorales; promueve la metástasis y la angiogénesis mediante la inducción de MMPs, VEGF y FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), la supresión del ataque inmune y la inflamación crónica^{45, 112}.

La habilidad de la IL-1 para promover la proliferación tumoral y metástasis está mediada en gran parte por el desarrollo de neovascularización¹⁸. La IL-1 junto con la hipoxia son los principales reguladores de la expresión de VEGF, que es a su vez el factor angiogénico de mayor relevancia^{16, 17, 94, 109}. Otros factores pro-angiogénicos como el FGF, la IL-8 o la PGE₂ también están regulados por la IL-1³⁹. La supresión de la expresión de la IL-1 o la incorporación al medio del antagonista del receptor de la IL-1, reduce la angiogénesis experimental in vitro promovida por células tumorales^{17, 94, 99}. En ensayos de permeabilidad endotelial in vitro en líneas de melanoma se observó que sólo las líneas con producción de IL-1 presentaban aumento en la permeabilidad, la cual se inhibía mediante la aplicación de IL-1Ra¹⁸.

En los tumores en progresión se producen citoquinas inducidas por la hipoxia como la IL-1, IL-6, IL-8, el VEGF y el factor de necrosis tumoral^{16, 94}. Chen y cols^{16, 113} realizaron estudios en modelos murinos de carcinoma escamoso oral y cutáneo en progresión, así como en tejido tumoral de pacientes con CECC, encontrando expresión incrementada de IL-1 α , IL-6, IL-8, GM-CSF y VEGF. En pacientes con CECC observaron un aumento significativo en los niveles séricos de IL-6, IL-8 y VEGF, comparado con controles sanos y con pacientes con papilomas escamosos benignos. Un 75% de los pacientes que desarrollaron enfermedad progresiva, presentaba aumento de alguna de las citoquinas proinflamatorias.

Hay evidencias que demuestran la presencia incrementada de citoquinas proinflamatorias en diferentes tumores sólidos en progresión. Los pacientes con tumores productores de IL-1 tienen en general mal pronóstico^{16, 94, 95, 114}. Concretamente la IL-1 está sobre-expresada en varios tipos de tumores metastásicos. La mayoría de estudios han sido realizados en tumores invasivos de páncreas³⁵⁻³⁷ y melanoma^{30-34, 94}, aunque también se ha reportado su rol en CECC³⁸⁻⁴⁰, neoplasias de mama^{30, 115}, pulmón^{18, 116} y próstata³⁰. Otras citoquinas como la IL-6 se han correlacionado con el estadio tumoral en

pacientes con tumor epitelial ovárico^{117, 118}, carcinoma renal metastásico¹¹⁹, carcinoma colorrectal¹²⁰ y carcinoma escamoso de esófago¹²¹. Se ha observado aumento en la expresión de IL-8 en cáncer colorrectal¹²⁰, carcinoma hepatocelular¹²², melanoma metastásico¹²³ y cáncer de endometrio¹²⁴. Los pacientes con carcinoma invasivo de mama y cáncer pulmonar de célula pequeña presentan aumento de VEGF sérico^{125, 126}.

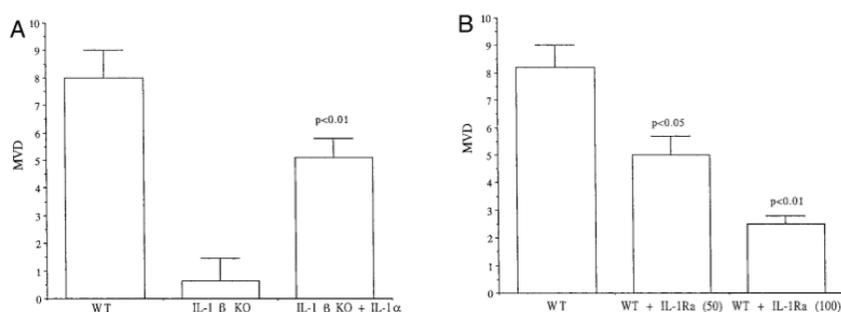
1.4.6. Mecanismos potenciales de bloqueo de la IL-1 en CECC

Existe una relación entre la inflamación crónica y la carcinogénesis. La respuesta inflamatoria autolimitada que se desencadena ante injurias tisulares, se ve descontrolada en procesos neoplásicos donde el estímulo continuo de las células tumorales genera una producción exagerada de citoquinas y quimioquinas^{41, 94}.

Teniendo en cuenta el rol de la IL-1 en la progresión del cáncer, los mecanismos de bloqueo de IL-1 estudiados para frenar el curso de enfermedades inflamatorias podrían extrapolarse a los tumores de cabeza y cuello. Hasta la fecha, se han aprobado 3 agentes para bloquear la actividad de la IL-1 en enfermedades inflamatorias: el receptor antagonista de IL-1: Anakinra (Kineret®), el receptor *decoy* soluble: Rilonacept (Arcalyst®) y el anticuerpo monoclonal anti-IL1 β : Canakinumab (Ilaris®)⁹⁹.

La forma recombinante del receptor antagonista de la IL-1 (IL-1Ra) conocido como Anakinra, fue el primer tratamiento biológico anti IL-1 aprobado para la artritis reumatoide así como para otras enfermedades reumatológicas y síndromes inflamatorios sistémicos⁹⁹. IL-1Ra es una proteína presente de manera fisiológica que bloquea competitivamente los receptores de IL-1 en linfocitos T y fibroblastos, por lo tanto inhibe la actividad de la IL1- α y β . El Anakinra tiene buena absorción en humanos, excelente perfil de seguridad y se puede administrar por diversas vías⁹⁹. Su vida media corta (4-6 horas) implicaría una administración diaria en pacientes con cáncer. Los receptores de IL-1 se regeneran rápidamente por lo tanto sería necesario administrar dosis elevadas para conseguir niveles sostenidos de IL-1Ra capaces de saturar los receptores de IL-1 y neutralizar tanto el crecimiento tumoral como la angiogénesis^{18, 94}. La aplicación de Anakinra en el tratamiento del cáncer se encuentra en investigación. Su administración aislada o en combinación con quimioterapia sería una herramienta útil en tumores productores de IL-1^{18, 94}.

Se han realizado estudios con IL-1Ra en diferentes tipos de tumores con el objetivo de dilucidar sus mecanismos de acción y comprobar su efectividad como agente antineoplásico⁹⁴. Voronov y cols³⁰ realizaron un estudio experimental en modelos murinos de melanoma, adenocarcinoma de mama y próstata y encontraron menor aparición de metástasis en ratones *knockout* con inactivación de IL-1 β . En ratones no modificados genéticamente (*wild type*) demostraron una disminución en la angiogénesis y el crecimiento tumoral mediante el uso IL-1Ra. Los resultados de dicho estudio se presentan en las siguientes gráficas.



Cuantificación de la densidad microvascular (MVD) en muestras de ratones con melanoma WT (*wild type*) y KO (*knockout*) para IL-1 β . (A) Se compara la MVD en ratones WT, IL-1 β KO y en ratones IL-1 β KO al adicionar IL-1 α . (B) Se observa la disminución en la MVD al adicionar 50 y 100 mcgr de IL-1 α Ra humana recombinante.

Tomado de: IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis³⁰

En otro estudio realizado en líneas celulares de adenocarcinoma de colon, se observó un bloqueo en la producción de VEGF tras la administración de IL-1Ra. Se cuantificaron los niveles de IL-1 β , IL-1Ra y VEGF, encontrando que cuanto menor era el ratio IL-1Ra/IL-1 β (es decir mayor cantidad de IL-1 β), mayor era la concentración de VEGF¹²⁷. Elaraj y cols¹⁸ estudiaron xenoinjertos de varios tipos de tumores humanos implantados en ratones y encontraron que la administración sistémica de IL-1Ra disminuyó el crecimiento tumoral, la densidad de vascularización y el desarrollo de metástasis en los casos de tumores con secreción significativa de IL-1 (no así en las líneas tumorales no productoras de IL-1). Concluyeron que el receptor antagonista actúa mediante el bloqueo de receptores de IL-1 y mediante inhibición de otras moléculas angiogénicas del microambiente tumoral como IL-8 y VEGF.

La neutralización de la IL-1 mediante anticuerpos anti IL-1 β (Canakinumab) o a través del receptor *decoy* soluble IL-1R2 (Rilonacept) también ha demostrado efectividad en el tratamiento de enfermedades inflamatorias^{94, 99}. El IL-1R2 y el IL-1Ra actúan de forma

sinérgica para bloquear la actividad de la IL-1. La combinación de estas dos moléculas podría ser de utilidad en el tratamiento del cáncer^{94, 128}.

Otras aproximaciones terapéuticas para bloquear la IL-1 como anticuerpos anti IL-1 α , inhibidores de la enzima convertidora de IL-1 β (Caspasa 1)¹²⁹, “atrapadores de citoquinas”¹³⁰ o vacunas dirigidas contra la IL-1 β , se encuentran en estudio. Los experimentos con vacunas han demostrado efectos antitumorales durante los primeros días tras la inoculación, sin embargo generan efectos colaterales importantes secundarios a la respuesta inflamatoria exagerada⁹⁵. Los resultados tras inoculación de IL-1 β son variables; en algunos modelos activa la inmunidad antitumoral mientras que en otros parece aumentar la capacidad de invasión de las células malignas. La contradicción en los resultados puede ser debida al uso de diferentes dosis de IL-1, a la aplicación en tumores con diferente histología, estadio y red local de citoquinas^{94, 95}.

2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

JUSTIFICACIÓN

Una de las principales causas del deterioro en la supervivencia de pacientes con CECC es la aparición de metástasis a distancia. Los factores de mal pronóstico clínico-patológicos contemplados en la práctica clínica tienen una capacidad limitada para predecir el riesgo de metástasis a distancia, lo cual hace necesaria la identificación de nuevos marcadores precisos y fiables.

La diseminación metastásica es un proceso activo que se genera a partir de células tumorales que han adquirido propiedades que les confieren la posibilidad de migrar del tumor primario y depositarse en órganos a distancia. Este complejo proceso requiere de la interacción entre células tumorales, moléculas del microambiente y factores del huésped.

Estudios sobre biología tumoral han encontrado que las citoquinas producidas por el tumor y el estroma circundante son moléculas importantes en la patogenicidad y progresión de los CECC. La IL-1 es una citoquina con propiedades proinflamatorias, proangiogénicas e inmunoregulatoras que estimula el crecimiento tumoral y parece estar implicada en el desarrollo de metástasis.¹⁶ La presencia de niveles elevados de IL-1 en diferentes tipos de tumores sólidos se ha asociado con mayor agresividad y peor pronóstico.^{18, 94, 95} En pacientes con CECC, la IL-1 podría estar relacionada con los mecanismos que promueven la aparición de metástasis.

El disponer de biomarcadores con capacidad de detectar el riesgo de metástasis a distancia, tendría una marcada relevancia en el pronóstico de pacientes con CECC, ya que permitiría identificar a aquellos pacientes con alto riesgo e implementar tratamientos adecuados y oportunos para impedir la aparición de metástasis a distancia.

HIPÓTESIS

La hipótesis del presente estudio es que la expresión de la IL-1 juega un papel relevante en la diseminación metastásica en pacientes con CECC, existiendo una relación entre los niveles elevados de IL-1 y la aparición de metástasis a distancia.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Objetivo principal:

Determinar la existencia de una relación entre los niveles de expresión de la IL-1 y el riesgo de aparición de metástasis a distancia en pacientes con carcinoma escamoso de cabeza y cuello.

Objetivos secundarios:

- Establecer una relación entre las variables clínicas (localización del tumor, extensión loco-regional, tratamiento) y los niveles de IL-1 con la aparición de metástasis a distancia en una muestra de pacientes con CECC tratados en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.
- Comparar los niveles de expresión de los componentes de la familia de la IL-1 en muestras de tumor y en muestras de mucosa sana.
- Determinar la expresión de los componentes de la familia de la IL-1 en un panel de diferentes líneas de CECC.
- Estudiar los posibles mecanismos mediante los cuales actúa la IL-1 en el desarrollo de metástasis: estudios de adhesión endotelial y trans migración celular.
- Estudiar el efecto in-vitro que tiene el receptor antagonista (IL-1Ra) en líneas de CECC.

4. PACIENTES Y MÉTODOS

4. PACIENTES Y MÉTODOS

4.1. PACIENTES

Se obtuvieron biopsias de tumor de 154 pacientes consecutivos afectados de CECC confirmado histológicamente, tratados en nuestro centro con intención radical entre 2004 y 2010. Todos los pacientes fueron evaluados por el Comité de Oncología y la decisión terapéutica (quimioterapia de inducción, cirugía, radioterapia o quimio-radioterapia) fue basada en los protocolos institucionales.

Los datos clínicos fueron extraídos de una base de datos en la cual se registra la información (estatus clínico, características del tumor, tratamiento y seguimiento) de todos los pacientes con CECC atendidos en nuestro centro desde 1985¹³¹.

En la siguiente tabla se describen las características de los pacientes incluidos en el estudio.

Características		Nº pacientes (%)
Número de pacientes	154	
Edad	62.5 años (Rango: 38.1 - 92.3 años)	
Sexo	Masculino	139 (90.3%)
	Femenino	15 (9.7%)
Localización del tumor	Cavidad oral - Orofaringe	65 (42.2%)
	Laringe - Hipofaringe	89 (57.8%)
Categoría de T	T1-2	80 (51.9%)
	T3-4	74 (48.1%)
Categoría de N	cN0	90 (58.4%)
	cN+	64 (41.6%)
Diferenciación tumoral	Bien diferenciado	9 (5.8%)
	Moderadamente diferenciado	128 (83.1%)
	Mal diferenciado	17 (11%)
Tratamiento	Cirugía ± radioterapia	43 (27.9%)
	(Quimio)-radioterapia	111 (72.1%)
Quimioterapia de inducción	No	112 (72.7%)
	Si	42 (27.3%)

La media de seguimiento de los pacientes fue de 4.8 años (rango: 2.3 a 10 años). Durante el periodo de seguimiento, 46 pacientes (29.9%) presentaron recidiva local, 23 pacientes (14.9%) recidiva regional y 18 pacientes (11.7%) metástasis a distancia.

Este estudio forma parte de un proyecto de investigación desarrollado con la ayuda 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), aprobado por el comité de ética de investigación clínica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y bajo los principios de la Declaración de Helsinki.

4.2. MÉTODOS

Todas las determinaciones se realizaron en el Laboratorio de Angiología, Biología Vascul ar e Inflamación (LABVI) del Instituto de Investigación Biomédica del Hospital Sant Pau, dirigido por el Dr. Luis Vila.

- **Análisis de la expresión del mRNA**

Inmediatamente tras la obtención de las biopsias, una parte del tejido se estabilizó mediante inclusión en RNA-later (Quiagen GmbH, 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. Para las células en cultivo el RNA total se extrajo usando Ultraspec (Biotecx Laboratories, Inc., Houston, TX) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La transcripción inversa se realizó a partir de 1 μ g de RNA con el kit “High-CapacitycDNA Archive Kit” con hexámeros aleatorios (Applied Biosystems, Foster City, CA). La expresión de RNAm 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.

- **Determinación de IL-1 α liberada por las muestras tumorales de CECC (Obtención del Secretoma)**

Para esta parte del estudio se utilizaron biopsias de tejido tumoral de 35 pacientes. Fragmentos de tejido de 100-200 mg se incubaron en 0.5 mL de DMEM (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel) sin suero durante 48 horas en la estufa de CO₂. El medio de cultivo se almacenó a -80°C hasta el análisis de la IL-1 α .

- **Cultivo de células tumorales**

Se obtuvieron líneas SCC-4 (CRL-1624™, carcinoma de lengua) y SCC-9 (CRL-1629™, carcinoma de lengua) de la Colección Americana de Cultivos (ATCC®: *American Type Culture Collection*) y se cultivaron según indicaciones del proveedor.

- **Aislamiento y cultivo de células endoteliales microvasculares humanas (MVEC)**

Las células endoteliales microvasculares humanas (MVEC) se aislaron de prepucio de humano adulto (descripción de la técnica en referencias ^{49, 50}). Todos los estudios experimentales se realizaron con MVEC purificadas con Dynabeads® CD-31 entre los pases 2 y 6.

- **Análisis de la expresión proteica de IL-1 α e IL-1 β**

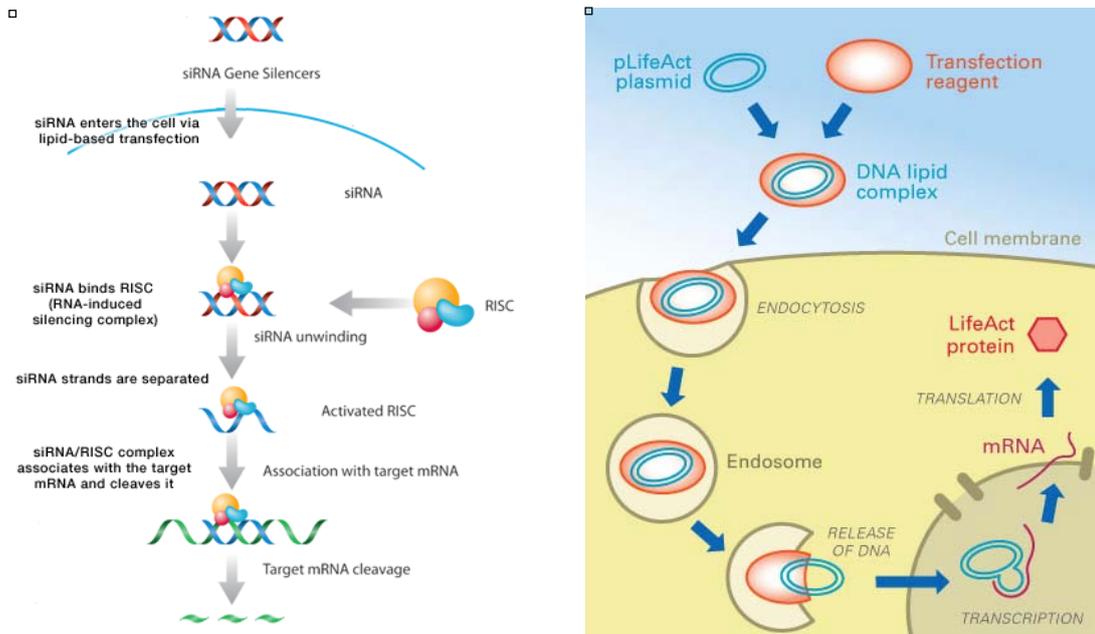
El análisis cuantitativo de IL-1 α e IL-1 β en el medio de cultivo se realizó mediante ELISA específica de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La IL-1 α se obtuvo de R&D Systems (Minneapolis, MN) y la IL-1 β de eBioscience (San Diego, CA).

• **Transfección de células tumorales: plásmido/siRNA**

Para los experimentos de *knockdown* de genes se silenció la IL-1 α , (siRNA ID:s7266) y como control negativo se utilizó una secuencia aleatoria (Silencer™ control negativo#1 ID:4390843) de Ambion®. Para la transfección se empleó un plásmido que codifica la secuencia completa de IL-1 α pCMV6-IL-1 α (SC324639) y como control negativo el vector vacío PrecisionShuttle mammalian vector pCMV6-AC (PS100020) de Origene Technologies (Rockville, MD).

Se realizó transfección del siRNA y de los plásmidos mediante nucleofección utilizando Nucleofector™ (Amaxa Inc) y el kit “Amaxa Cell Line Nucleofector kit V” siguiendo las recomendaciones del fabricante¹³².

Se suspendieron 3-5 x 10⁶ células en la fase exponencial de crecimiento en 100 μ L de “Nucleofector Solution V”, se mezclaron con 3 μ g de siRNA o plásmido y se realizó electroporación con el programa X-001. Posteriormente, las células fueron suspendidas en 500 μ L de medio de cultivo atemperado y se cultivaron en medio completo por 6 horas. Transcurridas las 6 horas se cambió por medio sin suero conteniendo 0.5% BSA. La sobre-expresión y el bloqueo o *knockdown* de genes se verificó midiendo los niveles de IL-1 α en el medio de cultivo mediante ELISA.

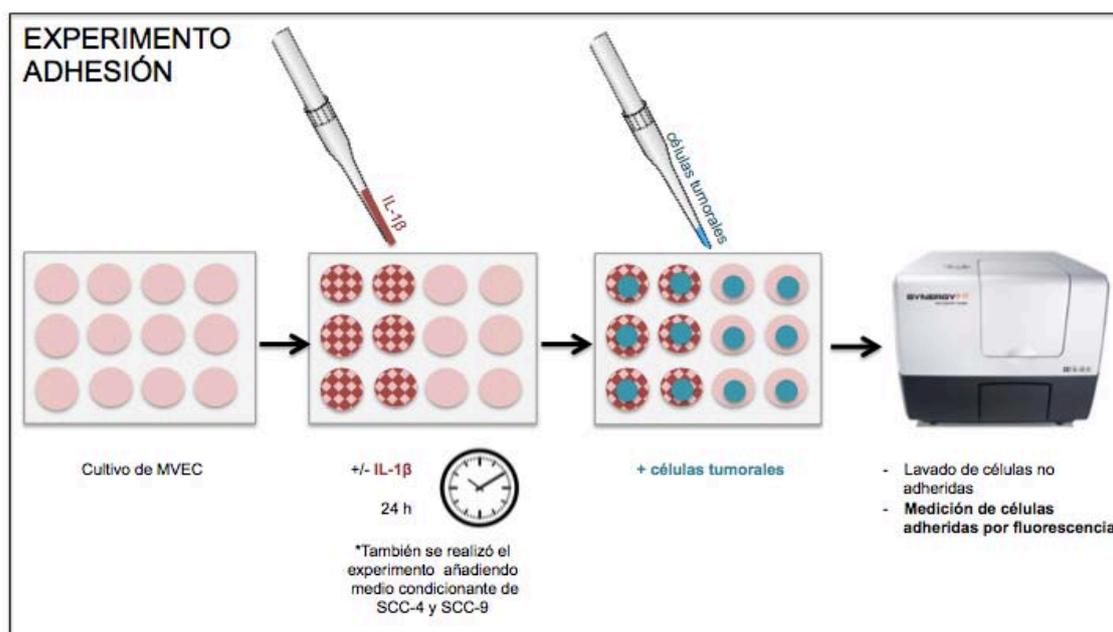


Izquierda: Técnica de *Knockdown* mediante silenciamiento de RNA (siRNA) . Derecha: transfección con plásmido
 Esquemas tomados de la página web de: Santa Cruz Biotechnology e Ibidi® respectivamente

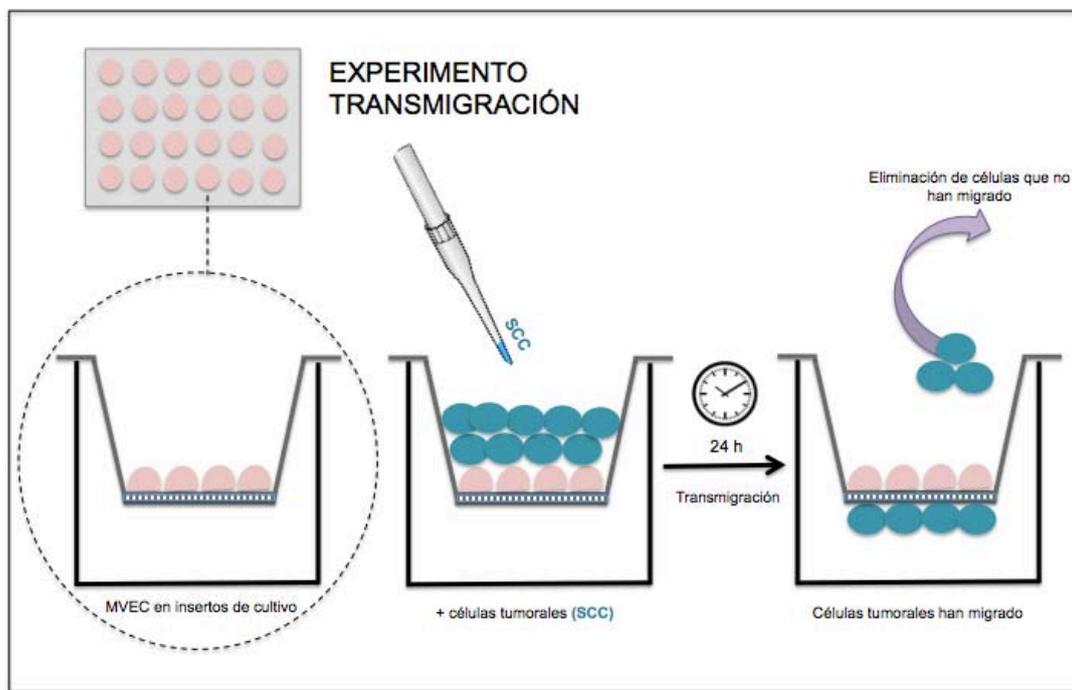
• **Ensayos de adhesión de células tumorales y migración transendotelial**

Las células tumorales se mantuvieron durante una noche en medio sin suero con 0.5% BSA, se tripsinizaron y se suspendieron en PBS a una densidad de 1×10^6 células/mL. Se adicionó 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametil-indocarbocianina perclorato (DiI, Sigma) en etanol para conseguir una concentración final de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Después de realizar un doble lavado de las células con medio sin suero, estas se suspendieron en DMEM con 0.5% BSA a una densidad celular adecuada.

Para el experimento de adhesión, las MVEC se cultivaron en placas de cultivo de 12 pocillos hasta la confluencia. Posteriormente se trataron o no con IL-1 β por 24 horas en MCDB con 1% SBF. Para los ensayo de adhesión las células MVEC se lavaron dos veces con PBS y se añadieron 0.5mL de DMEM con 1% FBS. Se mantuvieron en estufa de cultivo a 37°C durante 5 minutos y seguidamente se adicionaron 1×10^6 células tumorales marcadas fluorescentes suspendidas en 0.5 mL de medio y se incubaron a 37°C por 30 minutos. Las células no adheridas se lavaron exhaustivamente con PBS tras lo cual se añadieron 150 μL de 1% Triton X-100 a cada pocillo. La fluorescencia se midió en un Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader (Biotek) usando un set de filtro 530/590. El número de células se determinó mediante una curva de número de células/fluorescencia, que se realizó en cada ensayo.



Para los experimentos de trans migración endotelial, las MVEC se colocaron en insertos de cultivo Millicell (Millipore, Billerica, MA) placa de 24 pocillos 8- μm PET y se dejó que formaran una monocapa confluyente. Una vez alcanzada la confluencia, el medio de cultivo de los insertos se extrajo y los insertos se transfirieron a nuevos pocillos con 600 μL de DMEM sin suero con 0.5% BSA. Se añadieron 2.5×10^5 células tumorales marcadas fluorescente en 0.35 mL de medio a la parte superior de los insertos y se dejó que transmigrasen a través del endotelio por 24 horas. Transcurridas las 24 horas se eliminaron las células que no migraron y los insertos se colocaron en nuevos pocillos que contenían 0.5% tripsina en PBS. Las células desprendidas se centrifugaron y se lisaron. La fluorescencia se midió de la misma forma que en los experimentos de adhesión.



4.3 MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Para los datos con una distribución normal, la comparación entre dos variables se llevó a cabo con el test t-Student. Cuando los datos no seguían una distribución normal, se utilizó el test no paramétrico U de Mann-Whitney (o Wilcoxon Rank Sum Test). Para determinar la asociación entre variables, se realizó una transformación logarítmica en

base 10 con la finalidad de normalizar la distribución de las variables. Así una vez normalizados los datos, se utilizó el test de correlación de Pearson. Se consideró como significativo un valor de “p” menor de 0.05.

Se utilizó el método de árbol de clasificación y regresión (CART) para categorizar el valor continuo del nivel de expresión de mRNA de IL-1 α , considerando la aparición de metástasis a distancia como variable dependiente. Mediante el análisis CART se dividieron los datos en segmentos homogéneos de acuerdo a la variable dependiente.

La supervivencia libre de metástasis a distancia se calculó según las categorías definidas por el árbol de clasificación y regresión, usando el método de Kaplan-Meier. Las diferencias entre las tasas 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 metástasis a distancia y como variables independientes: la localización del tumor primario (cavidad oral – orofaringe vs. laringe-hipofaringe), extensión local (T1-2 vs. T3-4), extensión regional (N0 vs. N+), tipo de tratamiento (cirugía \pm radioterapia vs radioterapia/quimioterapia), uso de quimioterapia de inducción y categoría de IL-1 α definida por método CART. El análisis estadístico se realizó con software SPSS v. 17.0 (SPS, Chicago, IL) y software Sigma-Plot.

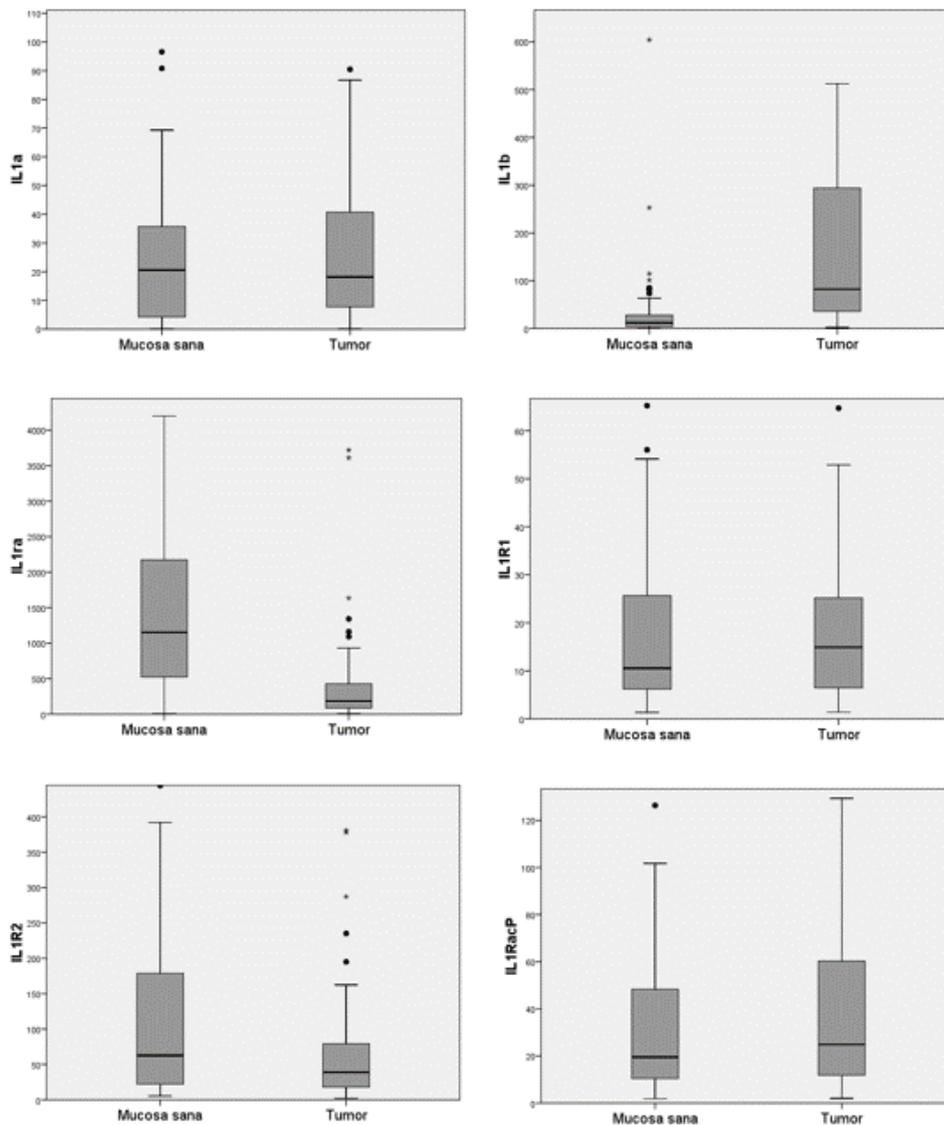
5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. RESULTADOS CLÍNICOS

5.1.1. Comparación de los niveles de expresión transcripcional de IL-1 entre el tumor y las muestras de mucosa sana

Las siguientes figuras muestran la distribución de los valores de expresión transcripcional de la IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-1R1, IL-1R2 y IL-1RacP en las muestras de mucosa normal y de tumor.



RESULTADOS

La siguiente tabla muestra los valores de significación estadística en la comparación de los niveles de expresión de los diferentes genes implicados en la vía de la IL-1 entre la mucosa sana y el tumor (test de Wilcoxon para datos apareados).

	P
IL-1 α	0.6
IL-1 β	0.0001
IL-1Ra	0.0001
IL-1R1	0.537
IL-1R2	0.049
IL-1RacP	0.264

Las muestras de tumor contaron con unos niveles de expresión de IL-1 β significativamente superiores comparados con la mucosa sana, apareciendo la situación contraria para el IL-1Ra. En el caso del IL-1R2, las muestras de tumor presentaron una expresión inferior a la mucosa sana, con unas diferencias al límite de la significación estadística. No aparecieron diferencias entre la mucosa sana y el tumor en la expresión de los genes responsables de la codificación de la IL-1 α , IL-1R1 y IL-1RacP.

5.1.2. Correlación entre los niveles de expresión transcripcional de la vía IL-1 en el tumor

Existió una correlación significativa entre los valores de expresión de los diferentes componentes de la vía de la IL-1, siendo especialmente manifiesto el elevado grado de correlación que apareció entre los valores de la IL-1 α y la IL-1 β .

		IL-1 α	IL-1 β	IL-1ra	IL-1R1	IL-1R2	IL-1RacP
IL-1 α	Pearson Correlation	1	,901**	,434**	,752**	,430**	,920**
	Sig. (2-tailed)		,000	,000	,000	,000	,000
IL-1 β	Pearson Correlation	,901**	1	,422**	,738**	,427**	,865**
	Sig. (2-tailed)	,000		,000	,000	,000	,000
IL-1ra	Pearson Correlation	,434**	,422**	1	,527**	,758**	,467**
	Sig. (2-tailed)	,000	,000		,000	,000	,000
IL-1R1	Pearson Correlation	,752**	,738**	,527**	1	,471**	,886**
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000		,000	,000
IL-1R2	Pearson Correlation	,430**	,427**	,758**	,471**	1	,435**
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000		,000
IL-1RacP	Pearson Correlation	,920**	,865**	,467**	,886**	,435**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000	,000	

5.1.3. Relación entre la expresión transcripcional de IL-1 y el control de la enfermedad

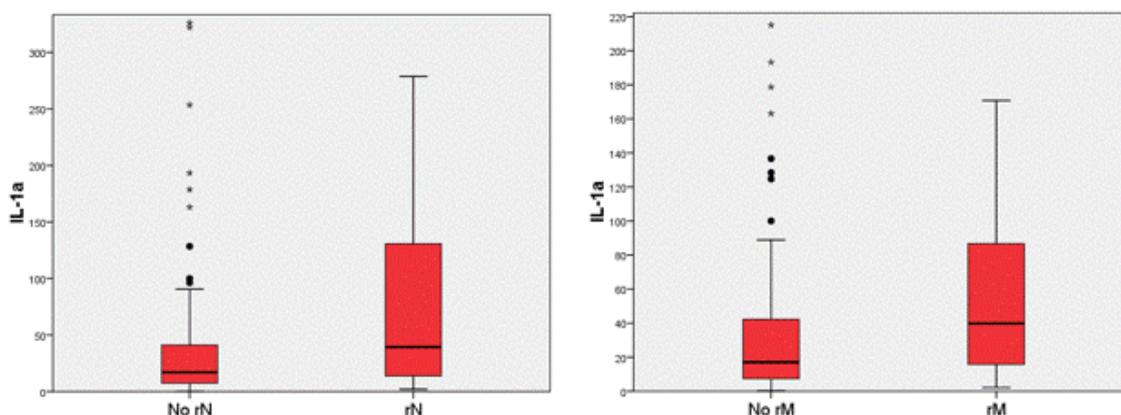
De los 154 pacientes incluidos en esta parte del estudio, un total de 46 pacientes (29.9%) tuvieron una recidiva local del tumor, 23 (14.9%) una recidiva regional y 18 (11.7%) metástasis a distancia.

Se procedió a comparar los valores de expresión transcripcional a nivel del tumor de los componentes de la vía de la IL-1 en relación con la supervivencia ajustada y el control local, regional y a distancia de la enfermedad. La siguiente tabla muestra los valores de la significación estadística en función del control de la enfermedad,

	IL-1 α	IL-1 β	IL-1ra	IL-1R1	IL-1R2	IL-1racP
Supervivencia	0,328	0,989	0,851	0,778	0,944	0,178
Control local	,696	,423	,549	,317	,541	,104
Control regional	,012	,215	,200	,842	,226	,472
Control a distancia	,016	,879	,193	,422	,327	,233

Tan sólo aparecieron diferencias significativas para los niveles de expresión de la IL-1 α en el control regional y a distancia de la enfermedad.

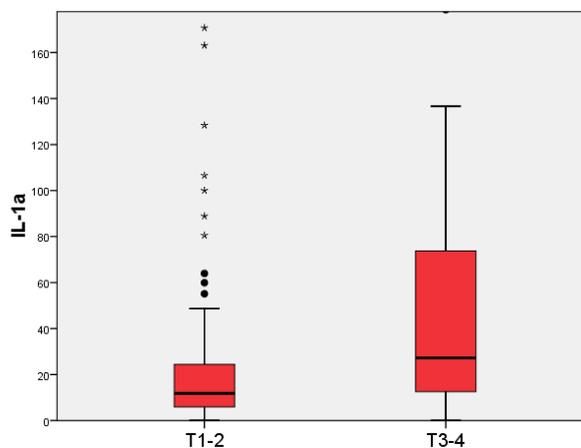
La siguiente figura muestra la distribución de los valores de expresión de la IL-1 α en función de la presencia de recidiva de la enfermedad a nivel regional o a distancia.



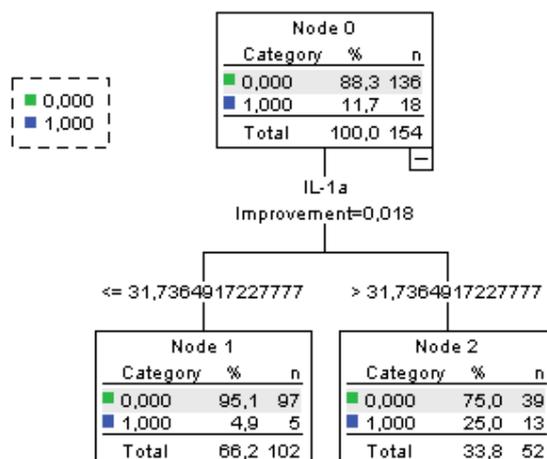
No aparecieron diferencias significativas en los valores de expresión transcripcional de la IL-1 α en función de la localización primaria del tumor (cavidad oral-orofaringe versus

RESULTADOS

laringe-hipofaringe), la afectación regional en el momento del diagnóstico (N0 versus N+) o el tipo de tratamiento empleado (cirugía ± radioterapia versus radioterapia-quimioradioterapia). Los pacientes con tumores iniciales (T1-T2) contaron con unos niveles de expresión de IL-1 α más reducidos que los pacientes con tumores localmente avanzados T3-T4 (student t-test, P=0.043). La siguiente figura muestra la distribución de los valores de transcripción de IL-1 α en función de la categoría de extensión local del tumor en el momento del diagnóstico.

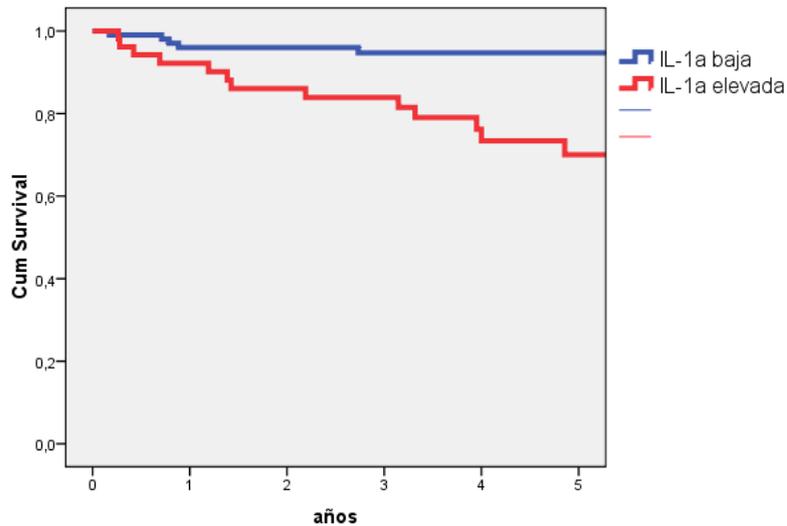


A continuación se procedió a establecer la existencia de un punto de corte con capacidad pronóstica para definir diferencias en el riesgo de aparición de recidiva a nivel regional o a distancia mediante una técnica de partición recursiva. El modelo CART no encontró un punto de corte en los valores de IL-1 α con capacidad para clasificar los pacientes en función de la aparición de una recidiva a nivel regional. Por el contrario, se clasificó a los pacientes en función del riesgo de aparición de metástasis a distancia, tal como aparece en la siguiente figura.



RESULTADOS

Utilizando la aparición de metástasis a distancia como la variable dependiente, el modelo CART clasificó a los pacientes en dos categorías: pacientes con expresión baja (n=102, 66.2%) y elevada (n=52, 33.8%) de IL-1 α . La siguiente figura muestra las curvas de supervivencia libre de metástasis a distancia en función de la categoría de expresión de IL-1 α .



La supervivencia libre de metástasis a distancia a los 5 años para los pacientes con unos niveles elevados de IL-1 α fue del 70.0% (IC 95%: 55.9 - 84.1%), en tanto que para los pacientes con unos niveles de expresión bajos fue del 94.7% (IC 95%: 90.2 - 99.2%). Existieron diferencias significativas en los valores de la supervivencia libre de metástasis a distancia en función de la expresión de la IL-1 α (p=0.0001).

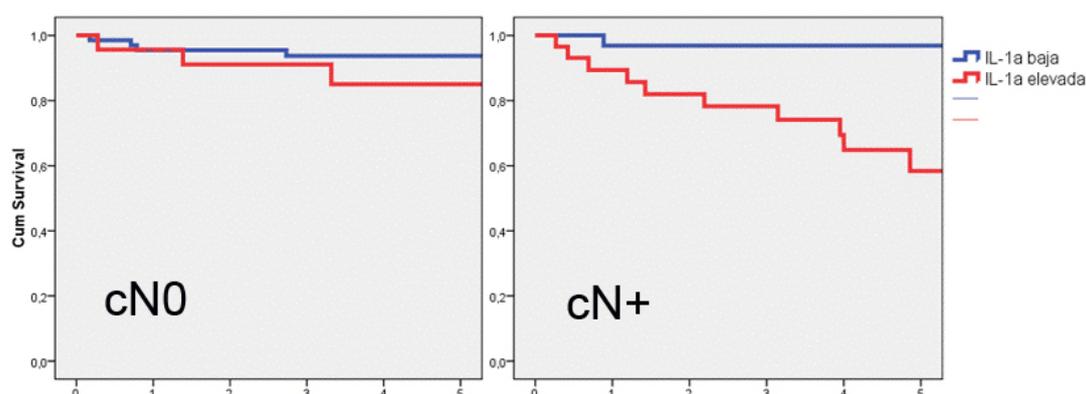
Se realizó un análisis multivariante, considerando la aparición de metástasis a distancia como la variable dependiente.

		HR	IC 95% HR	P
Localización	Cavidad oral – orofaringe	1		0.37
	Laringe - Hipofaringe	1.56	0.58-4.19	
Extensión local	cT1-T2	1		0.44
	cT3-T4	0.66	0.23-1.88	
Extensión regional	cN0	1		0.11
	cN+	2.33	0.82-6.60	
Tratamiento	Cirugía \pm radioterapia	1		0.21
	(Quimio)-radioterapia	0.53	0.20-1.44	
IL-1α	Baja	1		0.002
	Alta	5.35	1.81-15.84	

RESULTADOS

La única variable que se relacionó de forma significativa con la aparición de metástasis a distancia fue la categoría de expresión de la IL-1 α . Considerando a los pacientes con unos niveles bajos de IL-1 α como categoría de referencia, los pacientes con unos niveles elevados contaron con un riesgo 5.3 veces superior de sufrir la aparición de metástasis a distancia (IC 95%: 1.8-15.8).

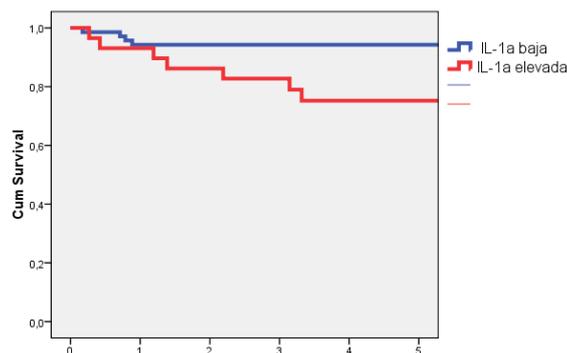
La otra variable que contó con una tendencia a relacionarse con la aparición de metástasis a distancia fue la categoría de afectación regional en el momento del diagnóstico. Los pacientes N+ tuvieron una tendencia hacia un mayor riesgo de aparición de metástasis a distancia (HR 2.33, IC 95%: 0.82 - 6.60, P=0.11). Se analizó la supervivencia libre de metástasis a distancia en función de los niveles de expresión de IL-1 α considerando la categoría de afectación regional en el momento del diagnóstico. Las siguientes figuras muestran las curvas de supervivencia libres de metástasis a distancia para los pacientes cN0 (n=90) y cN+ (n=64).



La supervivencia libre de metástasis fue en ambos casos superior para el grupo de pacientes con niveles bajos de IL-1 α si bien en el caso de los pacientes cN0 las diferencias no alcanzaron la significación estadística (P=0.268). Por el contrario, para los pacientes cN+ el riesgo de aparición de metástasis a distancia fue significativamente mayor en los casos con IL-1 α elevada (P=0.003).

Igualmente se analizó el riesgo de aparición de metástasis a distancia en función del control loco-regional de la enfermedad. Se analizaron de forma independiente los 99 pacientes para los cuales el tratamiento inicial había conseguido el control de la enfermedad a nivel loco-regional.

RESULTADOS

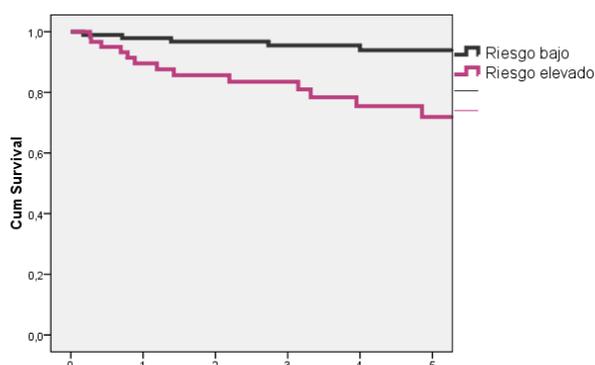


Considerando sólo los pacientes con control loco-regional, existieron diferencias significativas en los valores de la supervivencia libre de metástasis a distancia en función de la categoría de expresión de la IL-1 α (P=0.010). La supervivencia libre de metástasis a los 5 años para los pacientes con unos niveles bajos de IL-1 α fue del 94.3% (IC 95%: 88.9 - 99.7%) y para los pacientes con unos niveles elevados del 75.2% (IC 95%: 59.4 – 91.0%), P=0.01.

A partir de variables clínicas como la extensión loco-regional de la enfermedad y la presencia de metástasis ganglionares con ruptura capsular, se definieron dos grupos de pacientes en función del riesgo (alto o bajo) de aparición de metástasis a distancia.

El grupo de alto riesgo quedó constituido por un total de 60 pacientes que cumplieron alguno de los siguientes criterios: pacientes con tumor localmente avanzado (T4) y/o con afectación ganglionar extensa (N2-3) y/o con metástasis ganglionares con ruptura capsular. La supervivencia libre de metástasis a distancia a los 5 años para los pacientes incluidos en el grupo de riesgo elevado fue de 71.9% (IC 95%: 58.2-85.6%). Los pacientes que no cumplieron ninguno de los criterios de alto riesgo (n=94) se clasificaron dentro del grupo de bajo riesgo y contaron con una supervivencia libre de metástasis a los 5 años del 93.9% (IC 95%: 88.6-99.2).

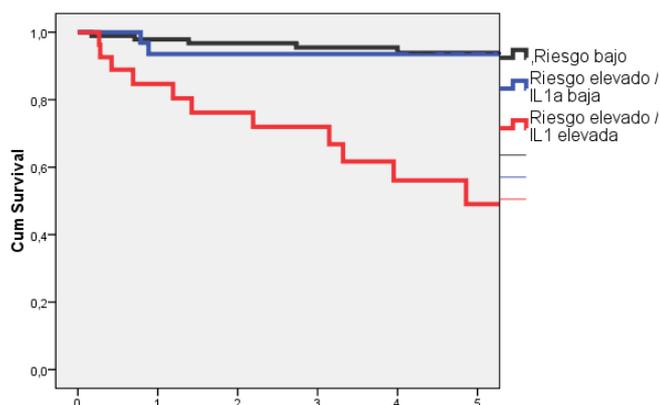
La siguiente figura muestra la supervivencia libre de metástasis en función de los grupos de riesgo definidos de acuerdo con las características clínicas de los pacientes.



RESULTADOS

Existieron diferencias significativas en la supervivencia libre de metástasis en función del grupo de riesgo ($P=0.001$).

Se procedió a clasificar a los pacientes incluidos en el grupo de alto riesgo ($n=60$) en función de los niveles de expresión de IL-1 α . La supervivencia libre de metástasis a distancia para los pacientes con unos niveles de expresión bajos fue del 93.5% (IC 95%: 84.9-100%), muy similar a la que presentaron los pacientes incluidos en el grupo de bajo riesgo definido por características clínicas. Para los pacientes incluidos en el grupo de alto riesgo que presentaron unos niveles de expresión de IL-1 α elevados, el riesgo de aparición de metástasis a distancia se incrementó de forma notable. La supervivencia libre de metástasis a los 5 años para estos pacientes disminuyó al 49.1% (IC 95%: 26.6-71.6%). Existieron diferencias significativas en la supervivencia libre de metástasis para los pacientes con riesgo clínico elevado en función del nivel de expresión de la IL-1 α ($P=0.002$).

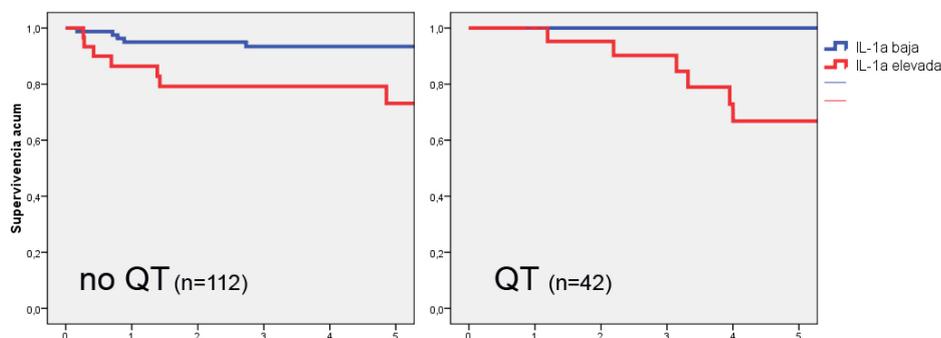


Se dispuso de información relativa al estatus del virus del papiloma humano (HPV) para 40 de los 49 pacientes con carcinomas de la orofaringe incluidos en el estudio. Un 20% de los pacientes ($n=8$) con carcinomas de orofaringe fueron HPV+ (7 casos HPV-16 y 1 caso HPV-51). No existieron diferencias significativas en los valores de expresión de la IL-1 α en función del estatus HPV ($P=0.377$). Ninguno de los pacientes HPV+ sufrió la aparición de metástasis a distancia, frente a un 12.5% de los pacientes HPV-.

Uno de los objetivos terapéuticos del tratamiento con quimioterapia de inducción en los pacientes con tumores avanzados es la reducción en la aparición de metástasis a distancia. De nuestra muestra de pacientes, un total de 42 (27.3%) iniciaron el tratamiento con quimioterapia de inducción. Se analizó la supervivencia libre de

RESULTADOS

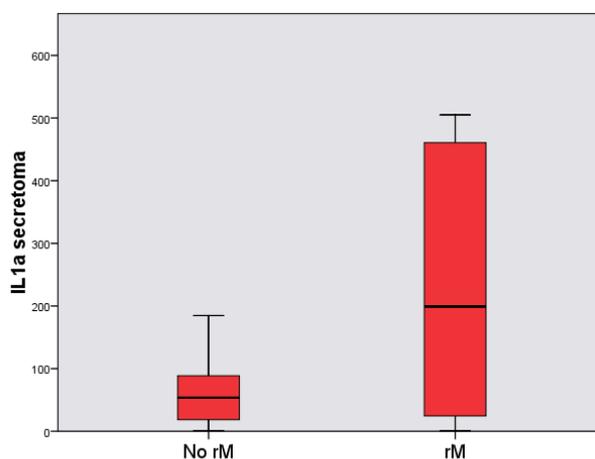
metástasis a distancia en función de que los pacientes hubiesen recibido o no un tratamiento inicial con quimioterapia de inducción de acuerdo con la categoría de expresión de la IL-1 α .



Existieron diferencias significativas en la supervivencia libre de metástasis tanto para el grupo de pacientes que no habían recibido quimioterapia de inducción ($P=0.007$) como para el de pacientes que iniciaron el tratamiento con quimioterapia de inducción ($P=0.025$).

5.1.4. Análisis del secretoma

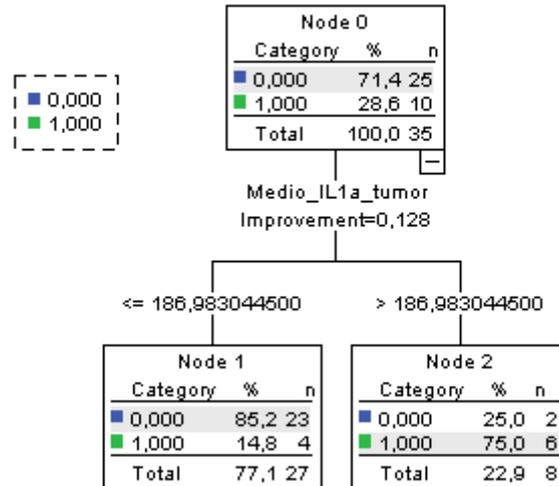
De los 35 pacientes incluidos en esta parte del estudio, un total de 10 pacientes (28.6%) sufrieron la aparición de metástasis a distancia. La siguiente figura muestra la distribución de los valores de concentración de la IL-1 α en el secretoma en función de la aparición de metástasis a distancia.



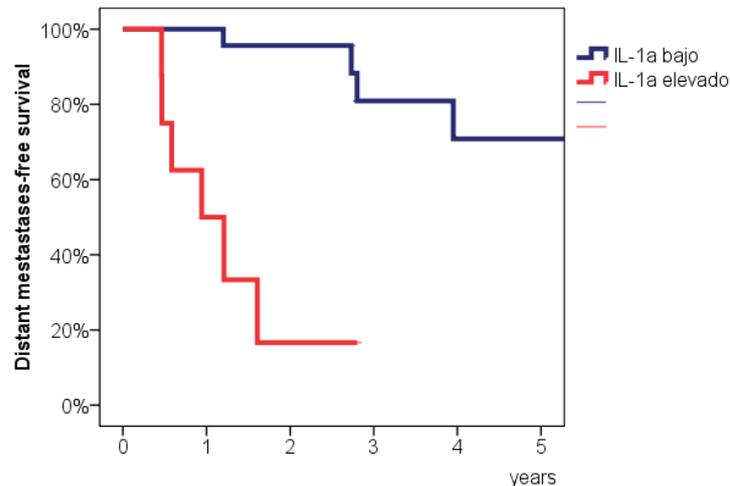
RESULTADOS

Los pacientes con metástasis a distancia contaron con unos niveles de expresión de IL-1 α significativamente superiores que los pacientes sin metástasis (P=0.006).

Utilizando la aparición de metástasis a distancia como variable dependiente, el método CART clasificó a los pacientes en función del valor de la concentración de la IL-1 α .

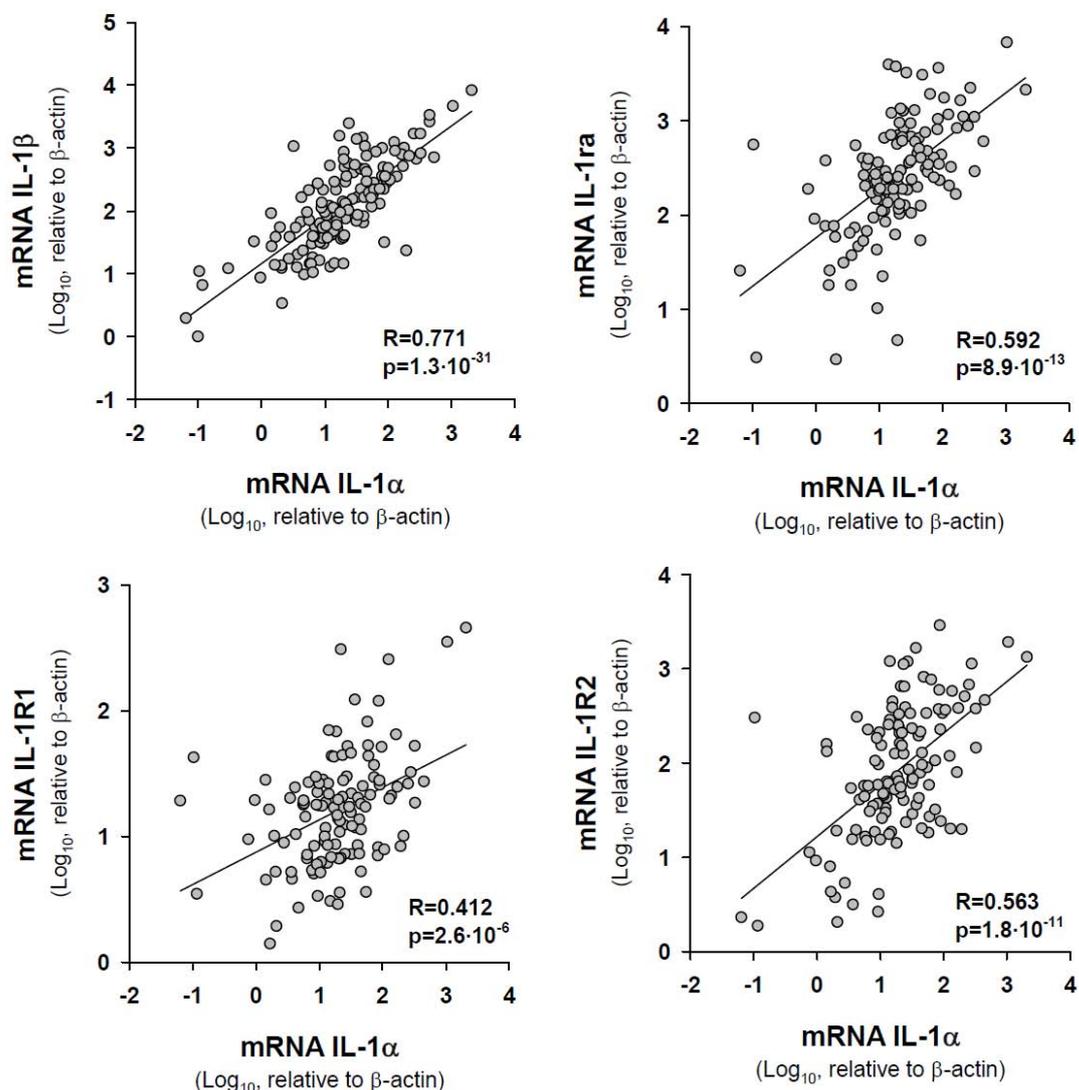


Los pacientes con una concentración de IL-1 α en el secretoma sobre el punto de corte determinado por el método CART (n=8) contaron con un riesgo de aparición de metástasis a distancia significativamente superior que los pacientes con una concentración de IL-1 α inferior (n=27) P=0.0001. La siguiente figura muestra las curvas de supervivencia libre de metástasis a distancia en función de la concentración de IL-1 α en el secretoma.



5.1.5. Correlaciones entre los valores de expresión transcripcional de IL-1 α y otros genes de la vía IL-1

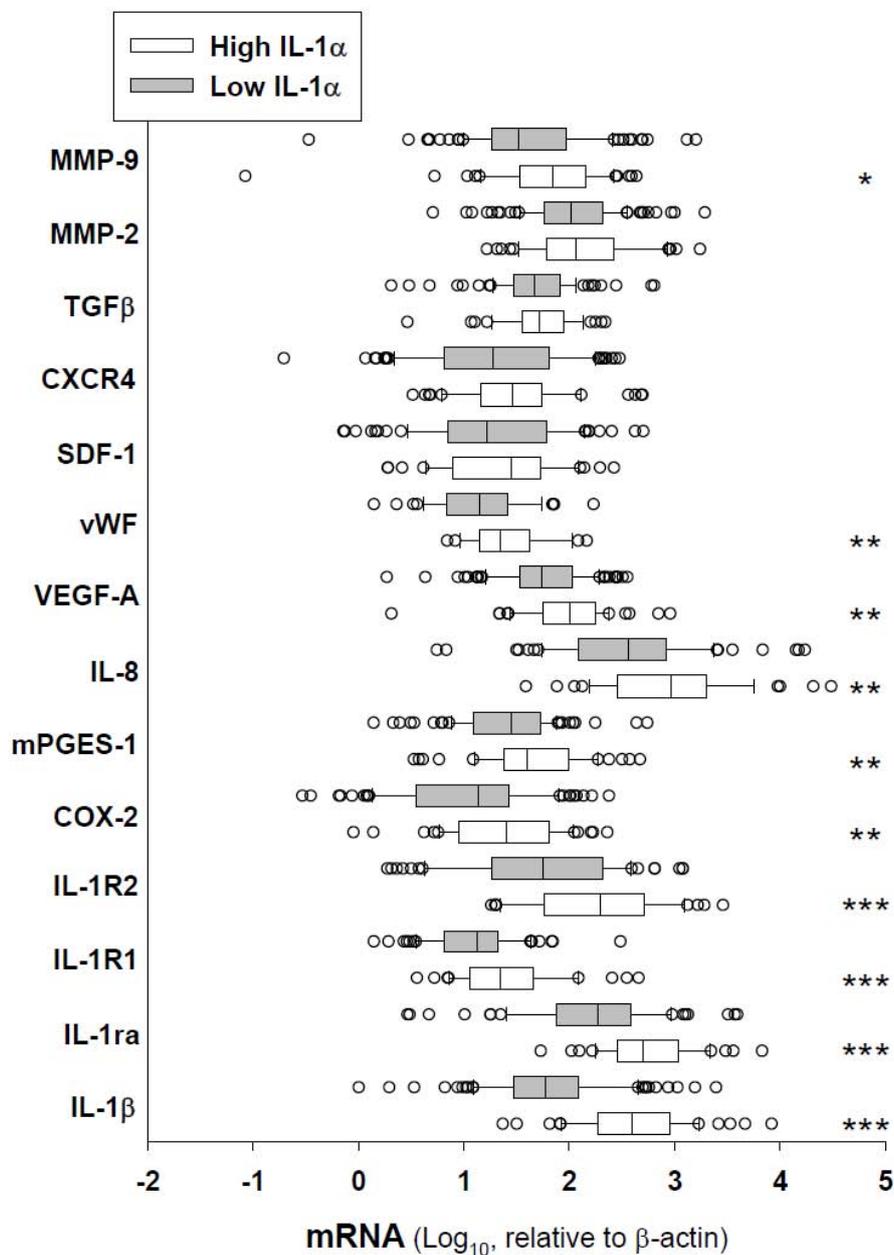
Se estudió a continuación la relación a nivel transcripcional de la expresión de la IL-1 α y algunos de los genes pertenecientes a la vía de la IL-1. Las siguientes figuras muestran la asociación entre la expresión de la IL-1 α y el resto de componentes de la familia de la IL-1.



Apareció una relación elevadamente significativa entre los niveles de expresión de IL-1 α y el resto de componentes de la familia de la IL-1 a nivel del tumor, especialmente en el caso de la IL-1 β .

5.1.6. Relación entre los niveles de expresión transcripcional de IL-1 α y genes involucrados en el proceso de metástasis

Finalmente, se procedió a determinar la existencia de diferencias en los niveles de expresión de un panel de genes relacionados con los procesos de diseminación y metástasis en función de las categorías de expresión de IL-1 α para los pacientes incluidos en el estudio. La siguiente figura muestra la distribución de los valores de expresión de los genes analizados en función de que los pacientes contasen con unos niveles de expresión bajos o elevados de IL-1 α .



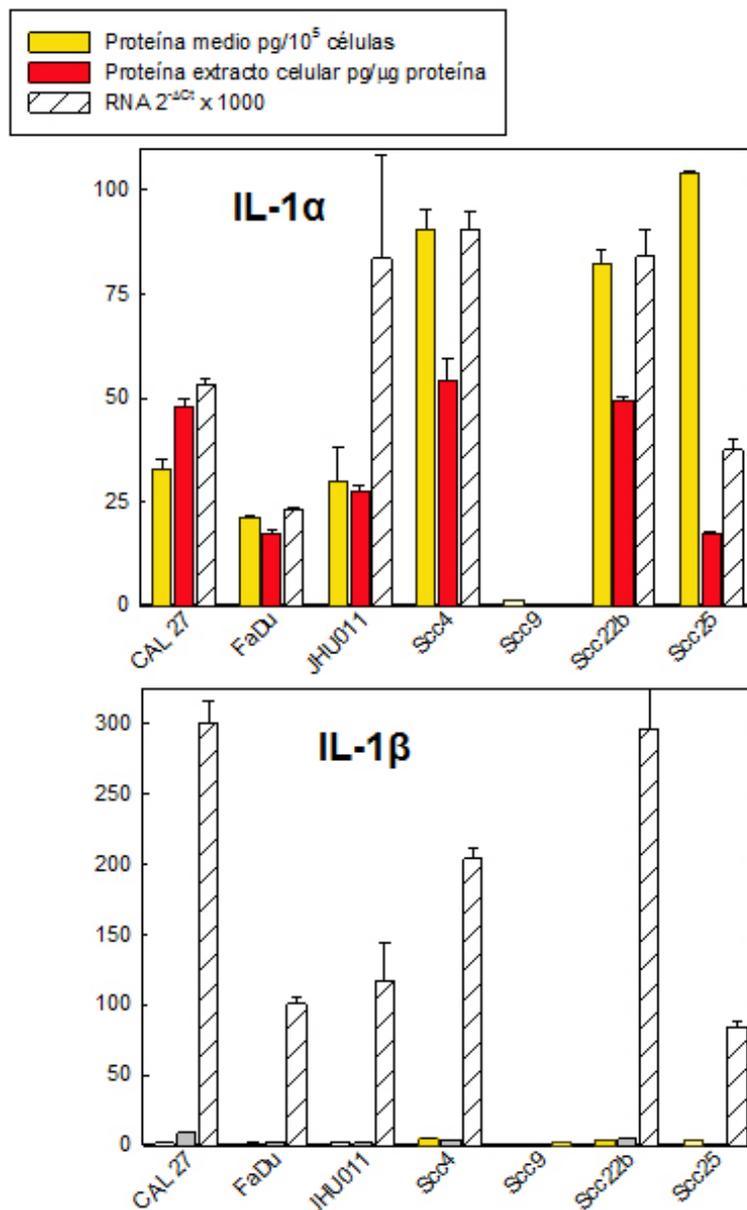
RESULTADOS

La mayoría de los genes evaluados contaron con unos niveles de expresión incrementados en el grupo de pacientes con IL-1 α alta. De forma característica, las diferencias más significativas correspondieron a aquellos genes relacionados con los procesos de angiogénesis, tales como los genes implicados en la vía de síntesis de la PGE2 (COX-2 and mPGES-1), VEGF y IL-8. Este hallazgo fue consistente con el incremento en la expresión de un marcador de células endoteliales como es el von Willebrand Factor (vWF) en el grupo de pacientes con unos niveles elevados de IL-1 α . Por el contrario, no aparecieron diferencias significativas en los niveles de expresión en función de la categoría de expresión de IL-1 α para otros genes relacionados con la vía IL-1 como fueron la citoquina SDF-1 o su receptor (CXCR4), o el promotor del proceso de transición epitelial-mesenquimal TGF β .

5.2. RESULTADOS DEL ESTUDIO EXPERIMENTAL

5.2.1. Caracterización del panel de líneas celulares

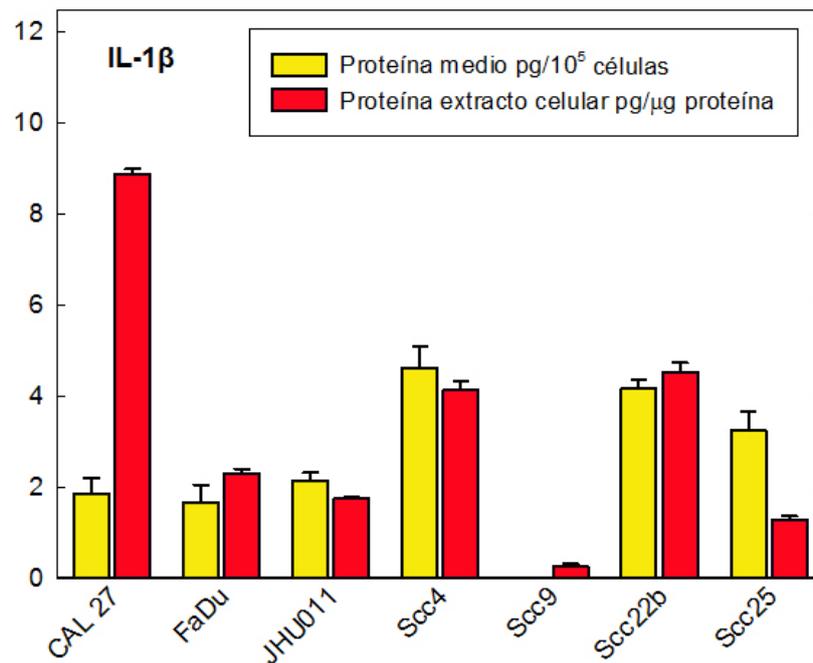
Se procedió en primer lugar a caracterizar los niveles de expresión de la IL-1 α y la IL-1 β para el panel de líneas celulares de CECC, tanto a nivel de expresión transcripcional como de concentración de citoquina tanto en el medio como a nivel del extracto celular. Las siguientes figuras muestran la expresión de ambas citoquinas en el panel de líneas celulares analizadas.



RESULTADOS

Tal como puede observarse, la concentración de IL-1 α tanto a nivel del medio como del extracto celular fue muy superior a la de IL-1 β .

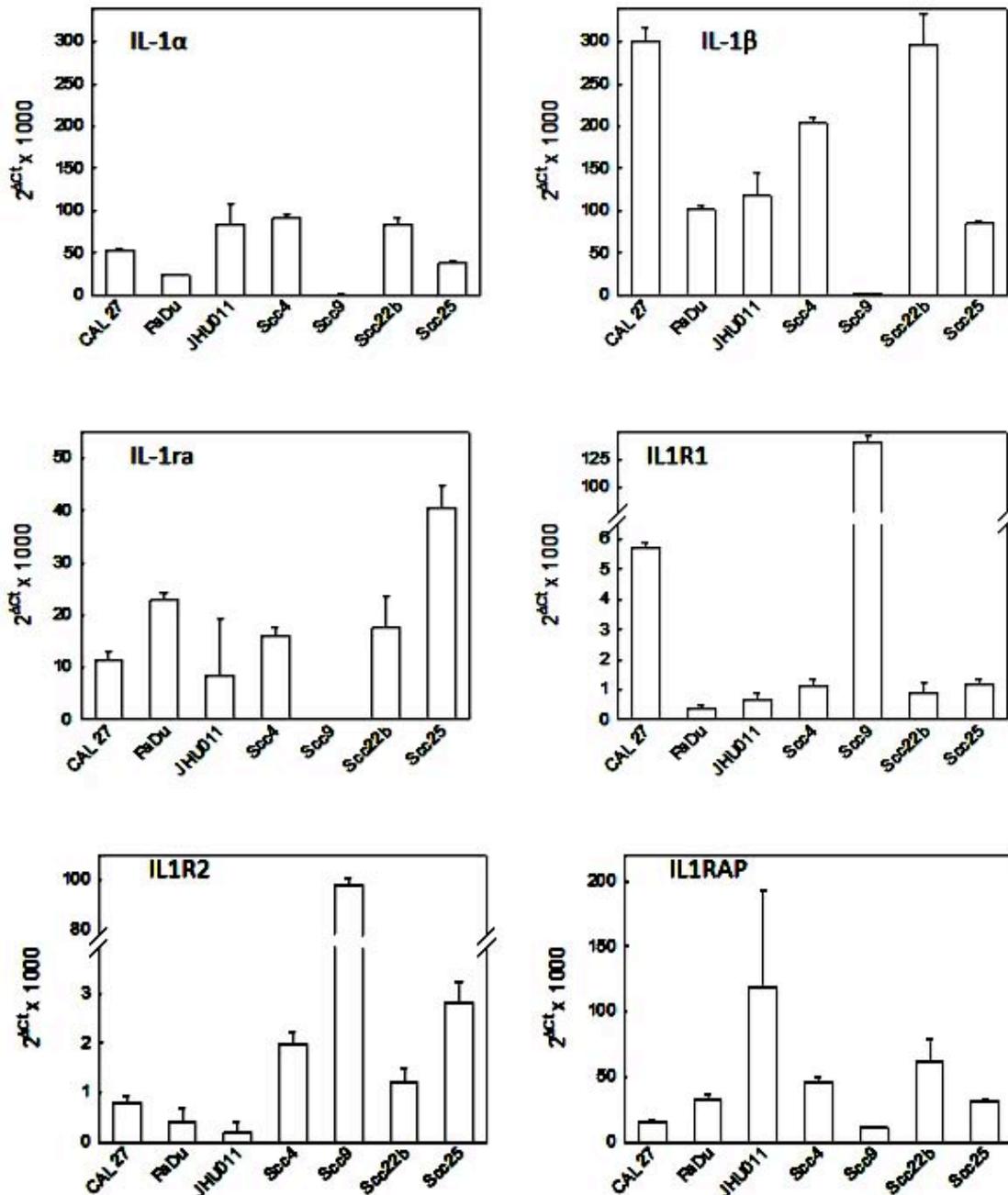
En la siguiente figura aparecen los valores de expresión de la IL-1 β a una escala que hace más visible las diferencias existentes entre las diferentes líneas celulares estudiadas.



La principal conclusión de esta parte del estudio fue que existían diferencias notables en cuanto al nivel de expresión de la IL-1 α y la IL-1 β entre las diferentes líneas celulares. A nivel de la producción de IL-1 α la línea con un nivel de expresión más elevado fue la SCC4, en tanto que la SCC9 prácticamente no contaba con expresión de IL-1 α o IL-1 β .

5.2.2. Niveles de expresión transcripcional de los componentes de la vía IL-1 en el panel líneas celulares

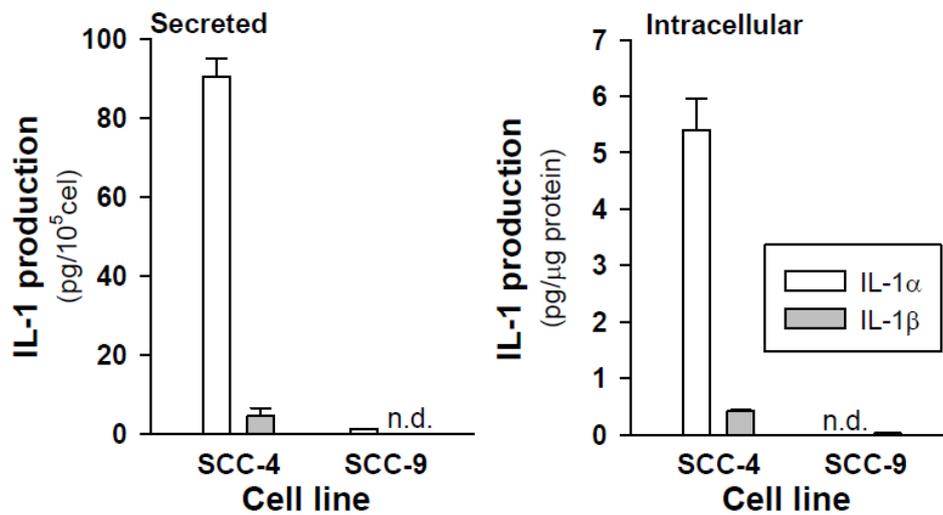
La siguiente figura muestra los valores de expresión a nivel transcripcional de los genes incluidos en la vía de la IL-1.



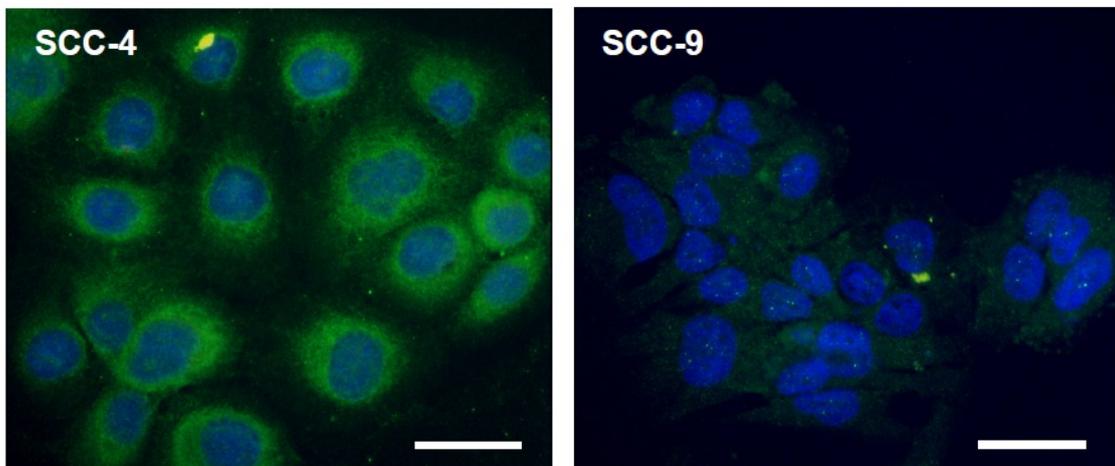
Destaca el hecho de que SCC9, que fue la línea con una menor expresión de las citoquinas IL-1 α e IL-1 β , fue la línea que contó con los niveles de expresión más elevados de los genes que codifican los receptores.

5.2.3. Efecto del tratamiento con IL-1 de las células endoteliales en la adhesión de las células tumorales al endotelio

Para los experimentos funcionales se escogieron las líneas tumorales con unos niveles de expresión extremos de IL-1 α : SCC4 (expresión elevada) y SCC9 (expresión baja). La siguiente figura muestra los niveles de IL-1 α e IL-1 β secretados al medio y los niveles intracelulares de las líneas escogidas para la realización de los estudios experimentales (n=3).

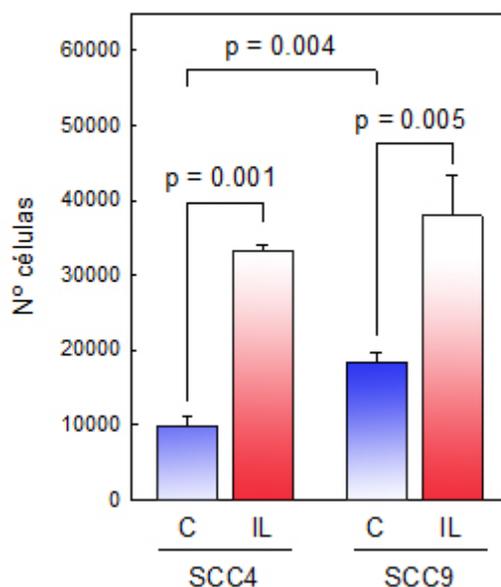


En un estudio de inmunofluorescencia realizado con ambas líneas, pudo verificarse la positividad para IL-1 en el caso de las células SCC4 y la negatividad en la SCC9.



RESULTADOS

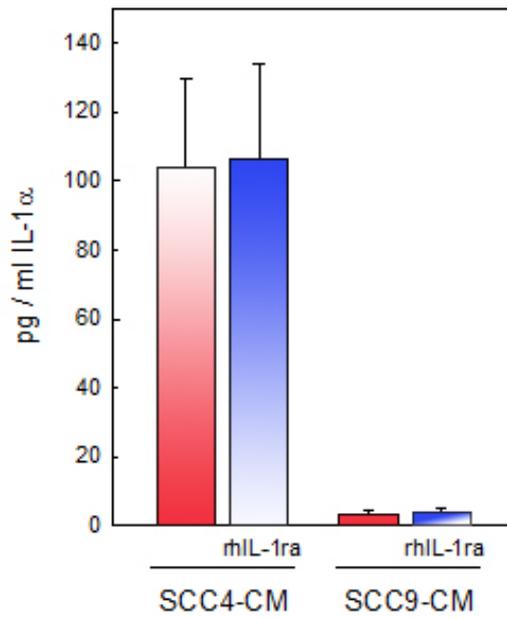
El tratamiento de las células endoteliales (MVEC) con IL-1 comportó un incremento significativo de la capacidad de adhesión de las células tumorales. Tal como puede apreciarse en la siguiente figura, el pre-tratamiento durante 24 horas de las células endoteliales con IL-1 (IL) condujo a un incremento en la capacidad de adhesión de ambas líneas celulares de carcinoma en relación con los controles (C) (media \pm s.e.m. SCC4 n=3, SCC9 n=7), sin embargo no se observaron diferencias significativas entre las dos líneas celulares (SCC4 y SCC9).



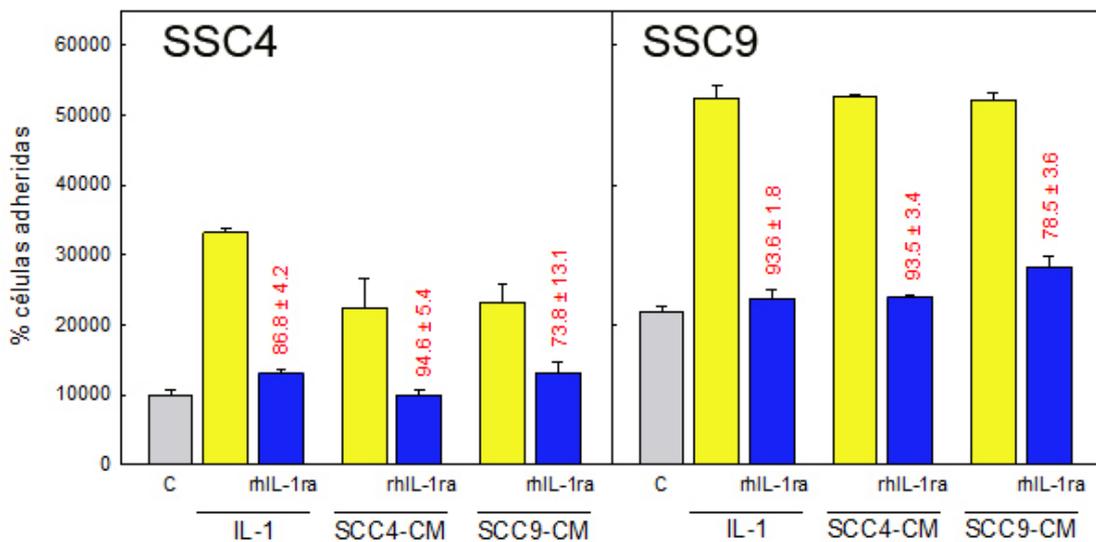
Posteriormente se analizó la capacidad de adhesión de las células tumorales al endotelio en ausencia o presencia del inhibidor de IL-1 (rhIL-1ra) después de haber tratado a las células endoteliales con IL-1 o con el medio condicionante obtenido de las líneas celulares SCC4 y SCC9.

En primer lugar se comprobó la existencia de diferencias en la concentración de IL-1 α en los medios condicionantes en función de que procediesen de la línea SCC4 y SCC9. La siguiente figura muestra cómo las concentraciones de IL-1 α fueron muy superiores en el medio condicionante correspondiente a la línea SCC4.

RESULTADOS

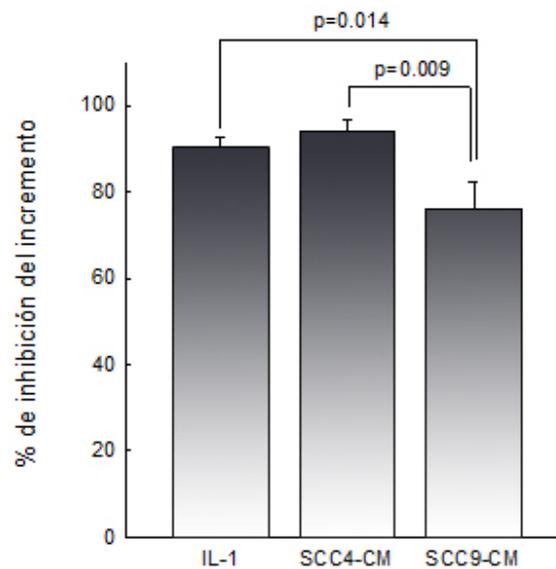


Pudo comprobarse como la adhesión de las células tumorales de ambas líneas evaluadas se incrementó de forma significativa en relación al control (C) tanto al tratar las células endoteliales con IL-1 como al hacerlo con el medio condicionante de SCC4 o SCC9, y que en todas las ocasiones el inhibidor de IL-1 (rhIL-1ra) consiguió revertir este incremento hasta unos valores cercanos al control (media \pm s.e.m. n=3).



RESULTADOS

El efecto de incremento en la capacidad de adhesión apareció tanto al tratar las células endoteliales con el medio condicionante de SCC4 (rico en producción de IL-1) como con el medio de SCC9 (con una escasa expresión de IL-1). Por ese motivo, se procedió a un análisis comparativo del porcentaje de inhibición de la adhesión a MVEC inducido por el tratamiento con IL-1 y con los medios condicionantes. La siguiente figura muestra el porcentaje de inhibición sobre el incremento en la capacidad de adhesión, producido por el inhibidor de la IL-1 (rhIL-1ra) en cada una de las condiciones experimentales.

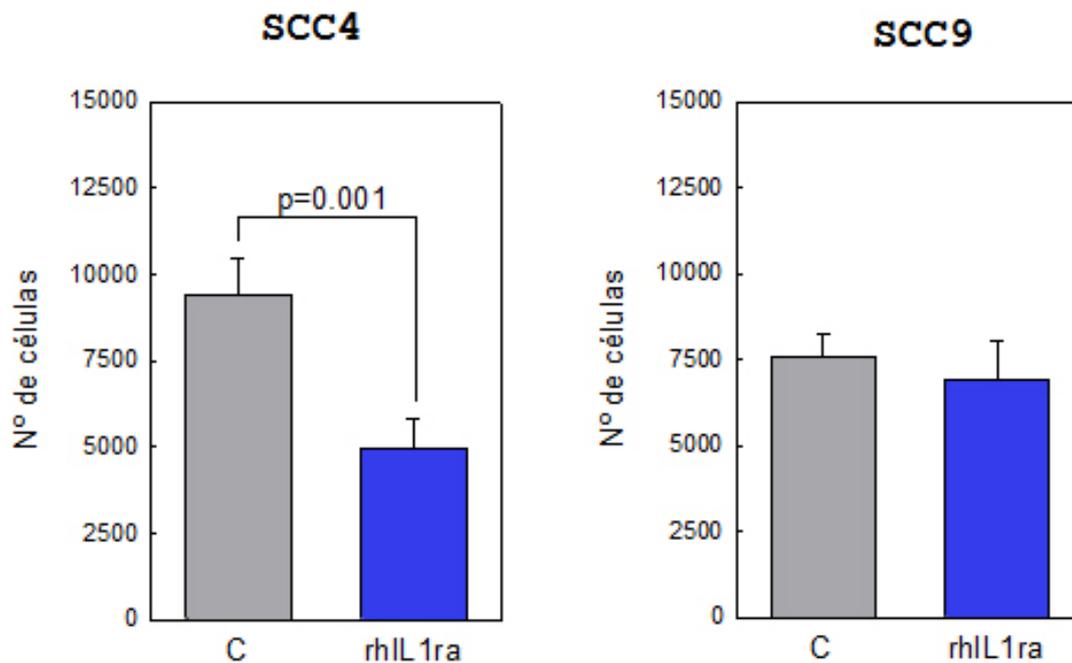


Se pudo comprobar como el porcentaje de inhibición del incremento de la capacidad de adhesión inducido por el medio condicionante de SCC4 (rico en IL-1) fue semejante al observado al tratar las células endoteliales con IL-1, y significativamente superior al obtenido al tratarlas con el medio condicionante de SCC9.

5.2.4. Papel de la IL-1 en la trans migración celular

En el siguiente experimento se evaluó la influencia de la IL-1 en la capacidad de trans migración de las células tumorales a través de una monocapa de MVEC in vitro. Ambas líneas tumorales consiguieron migrar a través de la barrera de MVEC. La trans migración media de las SCC-4 fue mayor que la de las SCC-9. Sin embargo la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0.08$).

Se comparó el número de células con capacidad migratoria en condiciones basales con el número de células que migraron tras bloquear la actividad de la vía IL-1 con IL-1Ra recombinante (rhIL-1ra). La siguiente figura muestra el número de células con capacidad migratoria en función de la inhibición de la actividad de la IL-1 para cada una de las líneas celulares estudiadas (media \pm s.e.m. $n=7$).



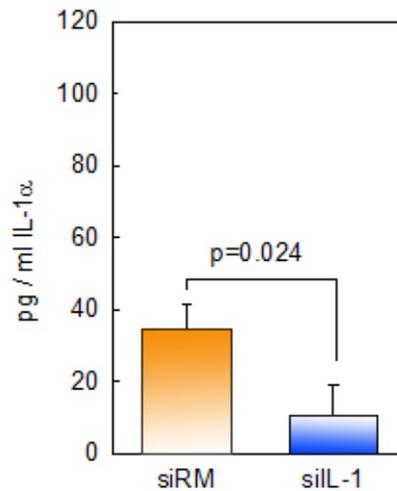
El bloqueo de la actividad de la IL-1 comportó una disminución significativa de la capacidad de trans migración celular para la línea SCC4 (con una elevada actividad IL-1), en tanto que no modificó de forma sustancial la capacidad migratoria de la línea celular SCC9 (que no cuenta con actividad IL-1).

A continuación se procedió a manipular la expresión del gen responsable de la codificación de la IL-1 α y se analizaron las repercusiones sobre la capacidad de

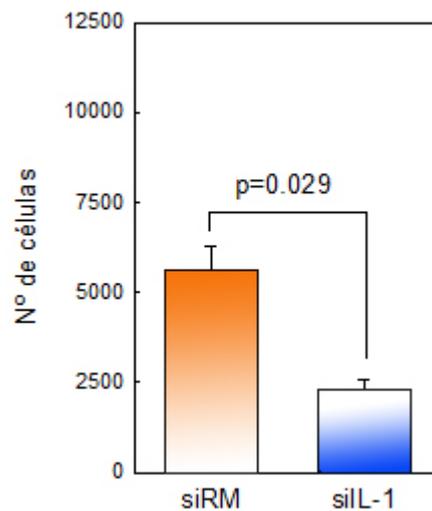
RESULTADOS

transmigración de las líneas celulares de carcinoma. En primer lugar se reprimió o silenció la expresión de la IL-1 α en la línea celular SCC4 mediante siIL-1 α . Pudo verificarse como la capacidad de síntesis de IL-1 α en la línea silenciada era significativamente inferior a la correspondiente a la línea control.

La siguiente figura muestra la concentración en el medio de la línea SCC4 silenciada (siIL-1) en relación al control (siRM).



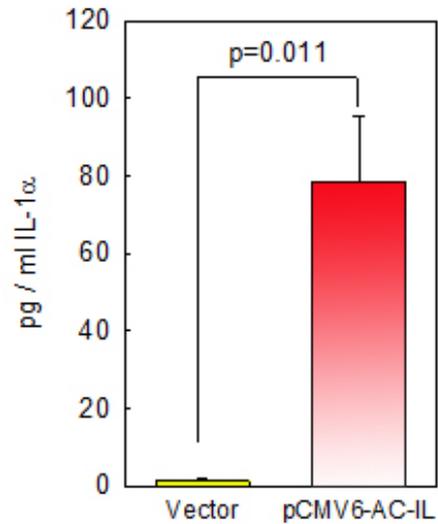
Se comprobó cómo el silenciamiento de IL-1 α en la línea SCC4 condujo a una disminución significativa de su capacidad de trans migración (media \pm s.e.m. n=3).



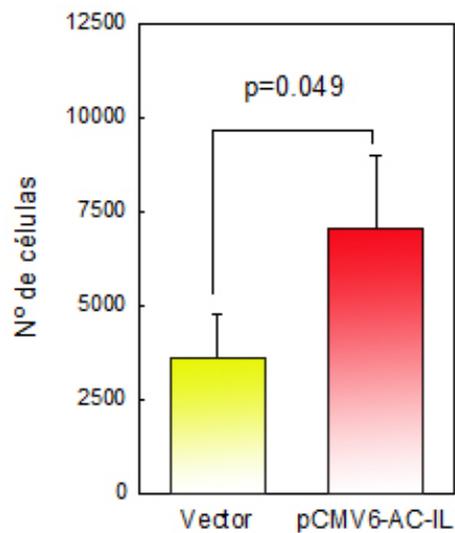
En el caso de la línea SCC9, que en condiciones basales no expresa IL-1, se indujo la expresión de IL-1 α mediante transfección. Pudo comprobarse la expresión de IL-1 α en la

RESULTADOS

línea transfectada en relación con la línea control (vector o línea con plásmido vacío). La siguiente figura muestra la concentración en el medio de la línea SCC9 transfectada (pCMV6-AC-IL) en relación con el control.



Se produjo un incremento significativo en la capacidad de trans migración en la línea transfectada en relación con el control, tal como aparece en la siguiente figura (media \pm s.e.m. n=5).



6. DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

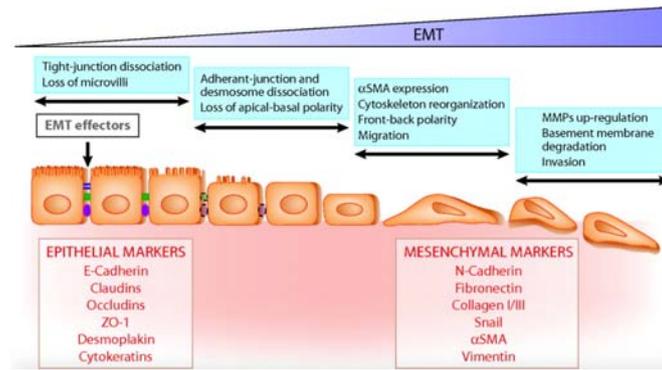
6.1. BIOMARCADORES DE METÁSTASIS A DISTANCIA EN CECC

Los CECC presentan comportamientos variables en cuanto al potencial de invasión y diseminación que no son del todo predecibles con las variables clínicas empleadas en la práctica. La necesidad de detectar nuevos marcadores ha dado lugar a la investigación de alteraciones moleculares que puedan predecir el potencial metastásico. Hasta la fecha se han descrito pocos biomarcadores relacionados con la aparición de metástasis en CECC, la mayoría de las moléculas identificadas están involucradas en la transición epitelial – mesenquimal.

El desprendimiento y migración de la célula tumoral implica la pérdida de polaridad epitelial y la adquisición del fenotipo mesenquimal mediante un proceso conocido como “transición epitelial - mesenquimal” (EMT por sus siglas en inglés). Esta transición se caracteriza por la disrupción de los enlaces célula-célula, el cambio de morfología celular (a forma fibroblastoide fusiforme), el aumento de interacciones célula-estroma y el descenso en la división celular⁴¹. La EMT no sólo ocurre en células tumorales, también se presenta durante el desarrollo embriológico y en procesos de fibrosis. Hay evidencia creciente de la presencia de EMT en varios tipos de neoplasias con metástasis a distancia^{28, 41, 83, 107}. Los cambios moleculares relacionados con la EMT son la regulación a la baja o inhibición de marcadores epiteliales (como E-cadherina, desmoplakina, plakoglobina y queratina), el aumento de expresión de marcadores mesenquimales (vimentina, fibronectina y actina alfa de músculo liso) y la activación del EGFR^{28, 133-135}.

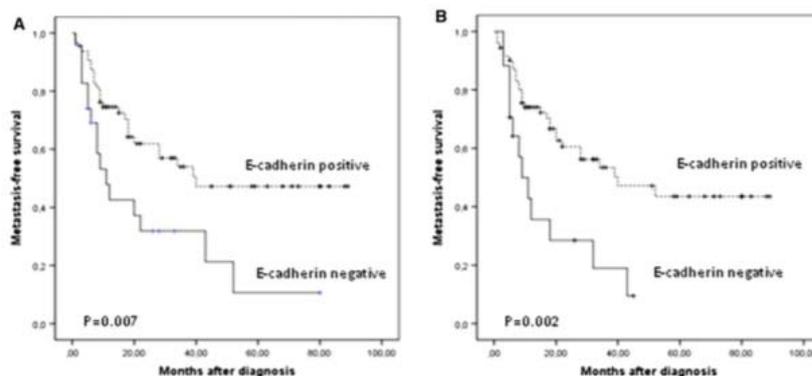
En la siguiente figura se representan los principales eventos y moléculas involucradas en la EMT.

DISCUSIÓN



EMT: Transición Epitelial – Mesenquimal ¹³⁶

Los niveles bajos o la pérdida de expresión de la E-cadherina en CECC se relacionan con un mayor riesgo de desarrollar metástasis a distancia. Rodrigo y cols²⁶ realizaron un estudio de casos y controles en pacientes con CECC estadio IV tratados quirúrgicamente: 44 pacientes con metástasis a distancia y 44 pacientes libres de metástasis a 3 años de seguimiento. Estudiaron algunas proteínas involucradas en adhesión, migración y proliferación celular en muestras tumorales y encontraron que la pérdida de expresión de la E-Cadherina se correlacionó con un mayor riesgo de aparición de metástasis a distancia ($p= 0.002$), mientras que el resto de moléculas no presentaron relación estadística significativa. A continuación se presentan las curvas de supervivencia libre de metástasis en función de la expresión de E-Cadherina.



Supervivencia libre de metástasis en función de los niveles de expresión de E-Cadherina

Análisis inmunohistoquímico de E-Cadherina mediante anticuerpos Dako (A) y confirmación de resultados con anticuerpos BD (B). Tomado de: Immunohistochemical markers of distant metástasis in laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinomas²⁶

Nijkamp y cols²⁸ también encontraron que los CECC con baja expresión de E-cadherina presentaban mayor incidencia de metástasis comparados con tumores con alta expresión (81% vs 19%, $p= 0.004$). En el mismo estudio, midieron la expresión de la vimentina, una

proteína filamentososa del citoesqueleto presente en células mesenquimales; encontraron una tendencia entre la expresión elevada de vimentina y el riesgo de metástasis. Los pacientes con niveles bajos de E-cadherina y niveles elevados de vimentina (fenotipo EMT) presentaron una incidencia significativamente mayor de metástasis a distancia comparado con el resto de pacientes (100% vs 44%, $p=0.008$).

Se ha demostrado que los marcadores inflamatorios IL-1 β y COX-2 están implicados en la EMT, que a su vez se relaciona con la diseminación ganglionar y a distancia en los CECC. En un estudio de 146 pacientes con CECC, la expresión de IL-1 β se relacionó positivamente con la afectación ganglionar (a mayor cantidad de IL-1 β , mayor frecuencia de metástasis ganglionares) y con los niveles de COX-2. Mientras que se observó una relación inversa entre la expresión de IL-1 β y E-cadherina ($p<0.05$)¹⁰⁷. Varios autores han identificado el rol de la IL-1 β como potenciador de la actividad de la COX-2^{137, 138} y han estudiado la influencia de ambas moléculas en la disminución de la E-cadherina (a través del represor transcripcional *snail*), contribuyendo de esta forma a la EMT^{107, 137}.

La desmoplakina también ha sido estudiada como marcador pronóstico de metástasis, exhibiendo un comportamiento similar a la E-cadherina. La desmoplakina es el desmosoma más abundante en el epitelio. Su función es contribuir a la integridad tisular manteniendo la adhesión entre las células. Partiendo de que la regulación a la baja de proteínas desmosomales se relaciona con mayor capacidad metastásica, Papagerakis y cols²⁷ estudiaron la expresión de desmoplakina en una cohorte de 37 pacientes con carcinoma escamoso de orofaringe. A los dos años de seguimiento, 7 pacientes (19%) desarrollaron metástasis a distancia. La formación de metástasis se asoció significativamente con la expresión de desmoplakina ($p=0.02$). La tinción de desmoplakina en los 7 casos de metástasis fue negativa o focal con distribución alterada, por el contrario los tumores no metastásicos mostraron expresión marcada de la misma. El estudio inmunohistoquímico también permitió establecer una relación entre la desmoplakina y el grado de diferenciación tumoral: mayor expresión de desmoplakina en tumores altamente diferenciados y expresión disminuida o ausente en tumores mal diferenciados.

Otro estudio reciente encontró una asociación significativa entre la molécula $\alpha\beta$ -cristalina y la presencia de metástasis a distancia en CECC²⁹. La $\alpha\beta$ -cristalina es una proteína de shock térmico (HSP) expresada en gran variedad de tumores que estimula el plegamiento y secreción de VEGF, promoviendo la angiogénesis tumoral. Su expresión se ve

DISCUSIÓN

incrementada en situaciones de estrés y se relaciona con mal pronóstico. En pacientes con expresión alta de $\alpha\beta$ -cristalina la supervivencia libre de metástasis fue significativamente menor que en pacientes con expresión baja de la misma (36% vs 86%, $p=0.005$).

Además de las moléculas descritas -la mayoría de ellas implicadas directamente en la EMT-, el aumento en la expresión de citoquinas proinflamatorias en el tejido tumoral se ha relacionado con la progresión de la enfermedad. En nuestro estudio se evaluó la influencia de la IL-1 en el microambiente tumoral y se encontró una relación con el riesgo de diseminación a distancia.

6.2. IL-1 COMO MARCADOR DE METÁSTASIS A DISTANCIA

Estudios realizados en melanoma³⁰⁻³³, tumores de páncreas³⁵⁻³⁷, mama¹¹⁵, pulmón^{18, 116} y CECC^{38, 40, 139} han reportado la asociación entre concentraciones elevadas de IL-1 dentro del microambiente tumoral y el desarrollo de un fenotipo agresivo con mayor riesgo de diseminación. En el presente estudio, realizado en una cohorte amplia de pacientes con CECC, se encontró una relación entre la expresión elevada de IL-1 α y la aparición de metástasis a distancia.

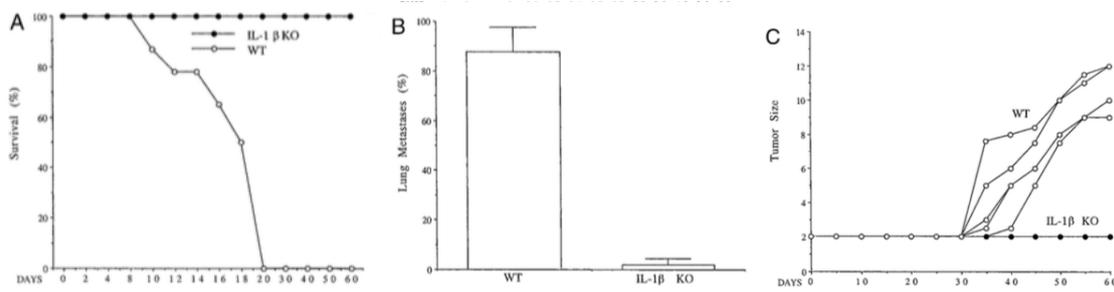
Los mecanismos exactos mediante los que la IL-1 promueve el crecimiento tumoral no están del todo claros. Se cree que esta citoquina estimula la activación de factores de transcripción (principalmente NF κ B y AP-1) que a su vez promueven la expresión de genes implicados en la proliferación celular, invasividad (metaloproteinasas) y angiogénesis (VEGF, IL-6, IL-8, TNF α y TGF β)^{38, 40, 94}. En modelos de melanoma, la activación de IL-1 endógena promueve la proliferación tumoral a través de vías moleculares que involucran la secreción de radicales libres de oxígeno, óxido nítrico, COX-2 y la activación de NF- κ B y c-Jun⁹³.

La IL-1 puede tener un comportamiento autocrino estimulando a la propia célula tumoral a proliferar e invadir, o puede actuar de manera paracrina induciendo la expresión de genes pro-metastásicos y angiogénicos en las células del microambiente^{94, 137}. La mayoría de autores coincide en que la activación de factores angiogénicos es el principal mecanismo que utiliza la IL-1 para promover diseminación tumoral^{18, 30, 37, 38, 140}. La angiogénesis es un proceso determinante en la proliferación de tumores sólidos mediante el cual se provee de oxígeno y nutrientes a las células tumorales. Los neovasos que nutren el tumor constituyen una puerta de entrada para que las células malignas accedan a la circulación sistémica y eventualmente se implanten en órganos a distancia.

El modelo experimental de metástasis en melanoma ejecutado por Voronov y cols⁹³ puso de manifiesto el rol de la IL-1 en el desarrollo de metástasis a distancia. Los autores demostraron que tras la inoculación de melanoma en ratones con inactivación de IL-1 β (*knockout*) estos no desarrollaron metástasis y presentaron mayor supervivencia, mientras que los ratones *wild type* (sin modificaciones genéticas y con presencia de IL-1 β) murieron a los 20 días a causa de las metástasis pulmonares. Como se puede

DISCUSIÓN

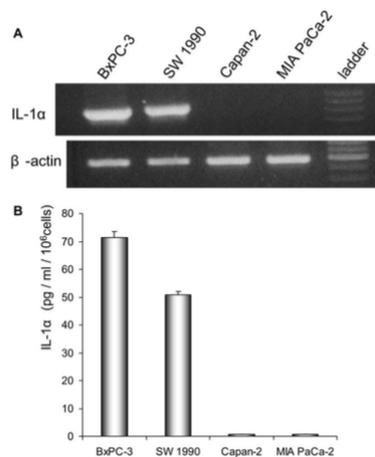
observar en las siguientes gráficas, la frecuencia de las metástasis y el tamaño tumoral fueron mayores en los ratones *wild type* comparados con los *knockout*.



Comparación de la tasa de supervivencia (A), metástasis pulmonares (B) y tamaño tumoral (C) en modelo murino de melanoma *wild type* (WT) vs *knockout* (IL-1 β KO)

Tomado de: IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis³⁰

En cáncer de páncreas, Matsuo y cols³⁷ encontraron que las líneas tumorales conocidas por su alta tendencia a desarrollar metástasis hepáticas presentaban un aumento constante y significativo en la expresión de IL-1 α comparado con las líneas no metastásicas. Sus resultados resaltaron el rol de la IL-1 en la angiogénesis y en la interacción de las células tumorales con el endotelio vascular. En la siguiente gráfica se observa la expresión de IL-1 α en las diferentes líneas tumorales.



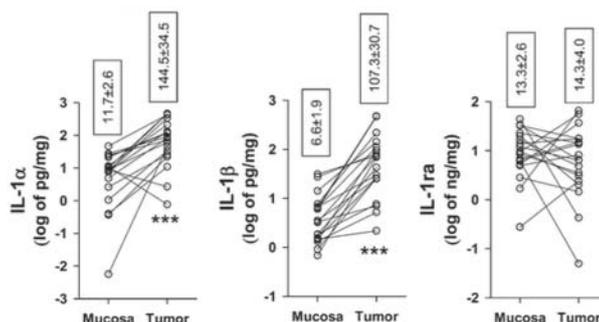
Expresión elevada de IL-1 α en líneas de cáncer de páncreas altamente metastásicas (BxPC-3 y SW1990) comparada con líneas no metastásicas (Capan-2 y MIA PaCa-2). (A) Detección del RNAm de IL-1 α mediante RT-PCR.

(B) Cuantificación de proteína IL-1 α mediante ELISA. Tomado de: Interleukin-1 α secreted by pancreatic cells promotes angiogenesis and its therapeutic implications³⁷

DISCUSIÓN

En cuanto a los CECC, hay pocos estudios que relacionan a la IL-1 con el desarrollo de metástasis. La mayoría de las publicaciones proviene del grupo de Chen Z. y Dong G. de Bethesda, Maryland. En sus primeros estudios, los autores realizaron determinaciones de un amplio panel de citoquinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, GM-CSF, VEGF, TGF- β y FGF entre otras) en líneas de carcinoma escamoso y cuantificaron los niveles séricos de las mismas en pacientes con CECC. Al estudiar el sobrenadante, encontraron expresión elevada de IL-1 α , IL-6, IL-8 y GM-CSF¹³⁸, con iguales hallazgos en el análisis inmunohistoquímico in situ de las muestras¹⁶. En el estudio de los niveles séricos se obtuvieron concentraciones significativamente más elevadas de IL-6, IL-8 y VEGF en pacientes con CECC comparados con muestras del grupo control ($p < 0.05$)¹⁶. En publicaciones posteriores, reportaron una producción elevada de IL-1 α en metástasis linfáticas y pulmonares de CECC en un modelo murino. Estos resultados les llevaron a concentrar su estudio en torno a la IL-1. Demostraron que para contribuir en el crecimiento y diseminación tumoral, la IL-1 α induce la activación transcripcional del NF- κ B y la AP-1 y promueve la expresión de IL-8^{38, 40, 141}.

El equipo investigador de LABVI del Instituto de Investigación Biomédica de Sant Pau, había reportado previamente un aumento en los niveles de IL-1 α e IL-1 β en muestras de CECC hasta 10 veces superior comparado con mucosa sana apareada. Aunque se trataba de una muestra pequeña (20 pacientes), se obtuvieron diferencias significativas¹³⁸.



Comparación de los niveles de IL-1 α , IL-1 β e IL-1Ra en 20 muestras de CECC y mucosa sana. * $P < 0.001$**

Tomado de: Interaction between head and neck squamous cell carcinoma cells and fibroblasts in the biosynthesis of PGE2¹³⁸

En el presente estudio se evaluaron muestras de 154 pacientes con CECC. Se encontró que la expresión transcripcional de IL-1 β fue significativamente superior en muestras de tumor comparada con muestras de mucosa sana. Por su parte, la IL-1 α fue la única molécula de la familia IL-1 cuya expresión se relacionó significativamente

con el control a distancia. La supervivencia libre de metástasis a 5 años fue menor en los pacientes con niveles elevados de IL-1 α comparada con los pacientes con niveles bajos de IL-1 α (70% vs 94% respectivamente).

Las muestras tumorales contaron con niveles menores de receptor antagonista (IL-1Ra) que la mucosa sana. El IL-1Ra es un inhibidor fisiológico de la IL-1 que se une a los receptores sin transmitir señal de activación. Es lógico pensar que el tumor cuente con una menor cantidad de IL-1Ra, ya que esta molécula constituye un mecanismo de bloqueo de la citoquina. Al haber menor expresión de IL-1Ra, hay mayor oportunidad para que la IL-1 presente en el tumor interactúe con los receptores y genere complejos de señalización.

En el análisis multivariante, la categoría de expresión de IL-1 α fue la única variable que se relacionó de forma significativa con la aparición de metástasis a distancia. Los pacientes con niveles elevados de IL-1 α presentaron un riesgo 5.3 veces superior de desarrollar metástasis. La afectación regional en el momento del diagnóstico presentó una tendencia a relacionarse con la aparición de metástasis a distancia, de manera que los pacientes N+ tuvieron una tendencia 2.3 veces superior de presentar metástasis comparada con los N0.

Algunos autores destacan el incremento en el riesgo de metástasis a distancia en pacientes con recidivas a nivel loco-regional después del tratamiento^{142, 143}. La aparición de metástasis en estos pacientes puede ser una consecuencia natural de la progresión de la enfermedad no controlada con el tratamiento loco-regional, así como una manifestación de la agresividad intrínseca del tumor que lo hace resistente al tratamiento. Los pacientes que consiguen control loco-regional también pueden desarrollar metástasis a distancia; la explicación más probable en estos casos es una diseminación subclínica no identificada en el momento del tratamiento, que se hace evidente posteriormente. Nuestros resultados demuestran que en ambos escenarios (pacientes con y sin control loco-regional) la expresión de IL-1 α tiene un valor pronóstico significativo en cuanto al riesgo de metástasis a distancia.

La combinación de datos clínicos con biomarcadores -como los niveles de IL-1- podría ser útil en la práctica hospitalaria para detectar a la población con riesgo elevado de desarrollar metástasis a distancia, con el fin de instaurar tratamientos adyuvantes para mejorar la supervivencia libre de enfermedad. En nuestro estudio se obtuvieron

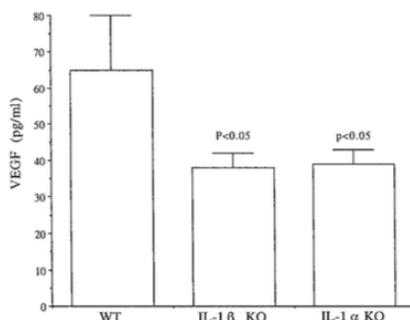
DISCUSIÓN

resultados interesantes al analizar conjuntamente los factores clínicos clásicos de mal pronóstico y los niveles de IL-1. Los pacientes con expresión elevada de IL-1 α y factores clínicos desfavorables presentaron un riesgo de metástasis a distancia alrededor del 50%, mientras que en los pacientes con niveles bajos de IL-1 α y factores de clínicos de alto riesgo la supervivencia libre de metástasis a distancia fue del 93.5% muy similar a la que presentaron los pacientes del grupo de bajo riesgo clínico.

6.3. MOLÉCULAS RELACIONADAS CON LA VÍA DE LA IL-1 EN EL DESARROLLO DE METÁSTASIS EN CECC

Las alteraciones moleculares producidas por la IL-1 que condicionan un comportamiento tumoral más agresivo están mediadas directa o indirectamente por la inducción de la angiogénesis. La IL-1 coordina la activación de otras citoquinas pro-inflamatorias y su presencia es invariable durante la angiogénesis^{39, 93, 144}.

Varias publicaciones sobre CECC y otros tumores sólidos, relacionan de manera positiva a la IL-1 con la actividad de la IL-8, el VEGF, el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) y el factor 1 α inducido por hipoxia (HIF-1 α), factores protagonistas en la neovascularización^{18, 30, 35, 93, 94}. En el modelo de melanoma de Voronov y cols³⁰ se demostró el rol de la IL-1 en la producción de VEGF. Se cultivaron células de melanoma B16 con tejido peritoneal de ratones sin alteraciones genéticas (*wild type*) y de ratones con inactivación de IL-1 α e IL-1 β (*knockout*). Se cuantificó la producción de VEGF en el sobrenadante de cada cultivo y se encontró una producción elevada de VEGF en el cultivo de ratones *wild type*, mientras que en los ratones *knockout* la secreción de VEGF fue significativamente menor.

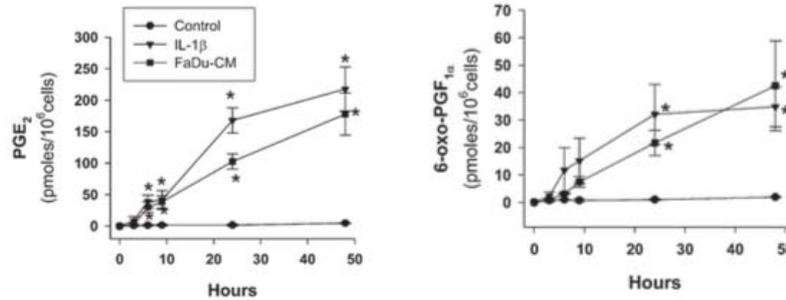


Secreción de VEGF obtenida en el sobrenadante del cultivo de células de melanoma B16 con tejido de ratones *wild type* (WT) y de ratones *knockout* IL- α e IL-1 β (KO)

Tomado de: IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis³⁰

Otras moléculas influenciadas por la IL-1 son las enzimas responsables de la producción de PGE₂, el prostanoide más relevante en el microambiente tumoral. La IL-1 activa al complejo enzimático COX-2/mPGES-1 generando un aumento en la síntesis de PGE₂^{50, 138, 145}. La PGE₂ promueve el crecimiento, la angiogénesis y la supervivencia de las células malignas.

Alcolea y cols¹³⁸ del equipo de LABVI del Hospital Sant Pau, encontraron que tras cultivar fibroblastos con medio condicionante de la línea FaDu - carcinoma escamoso de hipofaringe – que cuenta con alto contenido de IL-1, aumentó la producción de PGE₂ de forma consistente con el incremento en la COX-2 y mPGES-1 en los fibroblastos.



Liberación de prostanoides por fibroblastos incubados sin (control) y con 10U/ml de IL-1β recombinante humana o con medio condicionante de FaDu. *P<0.05 al comparar con controles. Tomado de: Interaction between head and neck squamous cell carcinoma cells and fibroblasts in the biosynthesis of PGE₂¹³⁸

En una publicación reciente, St. John¹³⁹ describió un circuito molecular que relaciona a la IL-1β con la expresión de la E-Cadherina en CECC, a través de una vía dependiente de la COX-2. Como se ha mencionado, la IL-1 estimula la actividad de la COX-2/PGE₂. Estas a su vez activan represores transcripcionales de la E-Cadherina (en concreto el represor *snail*) que se unen al promotor del gen, consiguiendo un descenso en los niveles de expresión de E-Cadherina. El resultado de esta vía constituye un punto clave de la EMT.

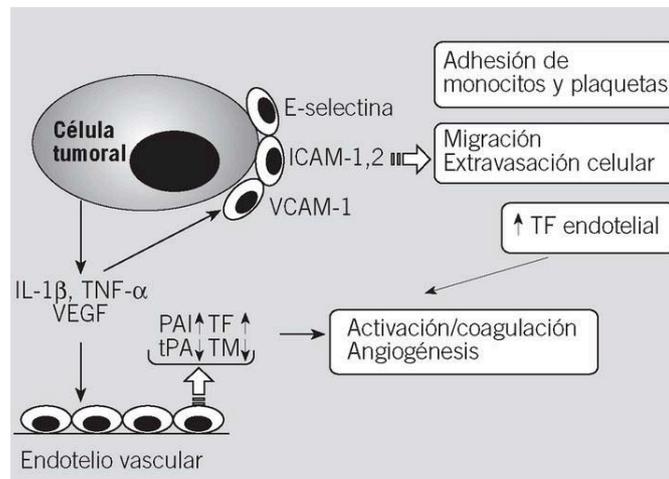
El rol de la IL-1 en la angiogénesis se ha confirmado mediante estudios experimentales en los que tras inyectar células tumorales a ratones *IL-1β knockout* o ratones *wild type* con neutralización de IL-1β, no se detectan fenómenos de angiogénesis¹⁴⁴. El uso de Anakinra (IL-1Ra) ha demostrado ejercer un bloqueo adicional sobre la IL-8, añadiendo un mecanismo en la reducción de la angiogénesis tumoral^{18, 38}. Otros agentes antiinflamatorios como los inhibidores de la COX e inhibidores del NF-kB también son efectivos en la regulación a la baja de la angiogénesis y hay estudios que sugieren su utilidad en el cáncer^{146,147}. Todo lo anterior lleva a considerar a la IL-1 como “citoquina maestra”, en cuya vía convergen distintos estímulos angiogénicos y cuya función es dirigir y regular la expresión de múltiples moléculas en la progresión tumoral.

En el presente estudio se observó que las variaciones en la expresión de IL-1 α en el tumor se correlacionaron no sólo con las variaciones en los genes de la familia IL-1 sino también con los genes implicados en la angiogénesis (VEGF, IL-8, COX-2 y mPGES-1). Además se encontró una relación con los genes que codifican para metaloproteinasas, principalmente el gen de la MMP-9, conocido por su rol en la invasión tumoral y desarrollo de metástasis en CECC^{66-68, 94}.

6.4. INFLUENCIA DE LA IL-1 SOBRE LA CAPACIDAD DE ADHESIÓN TUMORAL AL ENDOTELIO Y LA TRANSMIGRACIÓN

La adherencia de las células tumorales al endotelio vascular es un paso inicial fundamental de la metástasis. Esta interacción está controlada por distintas moléculas dentro de las que destacan las endotoxinas y las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 y TNF^{31, 148}, que también dirigen el tránsito vascular de los leucocitos durante la infección/inflamación.

Uno de los tejidos diana de la IL-1 es el endotelio vascular. Actividades como la congestión vascular, infiltración celular y formación de coágulo están reguladas por esta citoquina. Estudios realizados en líneas de melanoma demuestran que la IL-1 media la adhesividad de células tumorales al endotelio mediante el aumento de expresión de moléculas de adhesión como la VCAM-1^{32, 34, 148, 149}.



Interacciones entre las células tumorales y el endotelio vascular

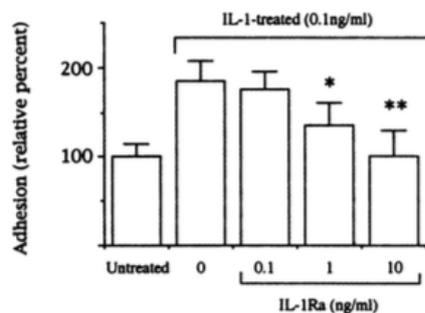
Tomado de: Pathogenic mechanisms of thrombosis in neoplasia: therapeutic implications¹⁵⁰

Nuestros resultados indican que el tratamiento de MVEC con IL-1 aumenta la adhesión de las células tumorales y que la IL-1α producida por las células tumorales regula la trans migración de las mismas a través del endotelio. Para llegar a estos resultados se realizaron experimentos funcionales con dos líneas de CECC con niveles de expresión extrema de IL-1α: la línea SCC-4 con expresión elevada y la SCC-9 con expresión muy baja.

DISCUSIÓN

Las células endoteliales fueron tratadas con IL-1 recombinante y con el medio condicionante de las dos líneas tumorales: el medio de SCC-4 rico en IL-1 α y el medio SCC-9 con escasa concentración de IL-1 α . Se evaluó el porcentaje de adhesión de las células tumorales, observando en los 3 casos un incremento significativo en la capacidad de adhesión en relación a los controles. La administración de IL-1Ra consiguió revertir dicho incremento hasta valores cercanos al control en todas las situaciones experimentales. Llama la atención que el medio condicionante de SCC-9, con baja cantidad de IL-1 α , hubiese generado un aumento en la adhesión. Esto pudo deberse a la actividad de otros factores estimulantes de adhesión celular presentes en el medio. El porcentaje de inhibición de IL-1Ra sobre la capacidad de adhesión fue similar en los casos de pre-tratamiento con IL-1 y con medio condicionante de SCC-4 y significativamente inferior en el tratamiento con medio condicionante de SCC-9.

Vidal-Vanaclocha y cols³¹ también encontraron en un modelo murino, que la administración de IL-Ra condujo a una disminución en la adhesión (mediada por IL-1) de las células de melanoma a las células endoteliales de sinusoides hepáticos. Así mismo observaron que el uso de IL-1Ra redujo el número de metástasis hepáticas y el volumen tumoral.



Adhesión de células de melanoma B16MH al endotelio sinusoidal hepático

Se compara la adhesión en células sin tratar, en células pre-tratadas con IL-1 y tras la administración de IL-1Ra a diferentes concentraciones. (*P<0.05, **P<0.01) Tomado de: Interleukin-1 receptor blockade reduces the number and size of murine B16 melanoma hepatic metastases³¹

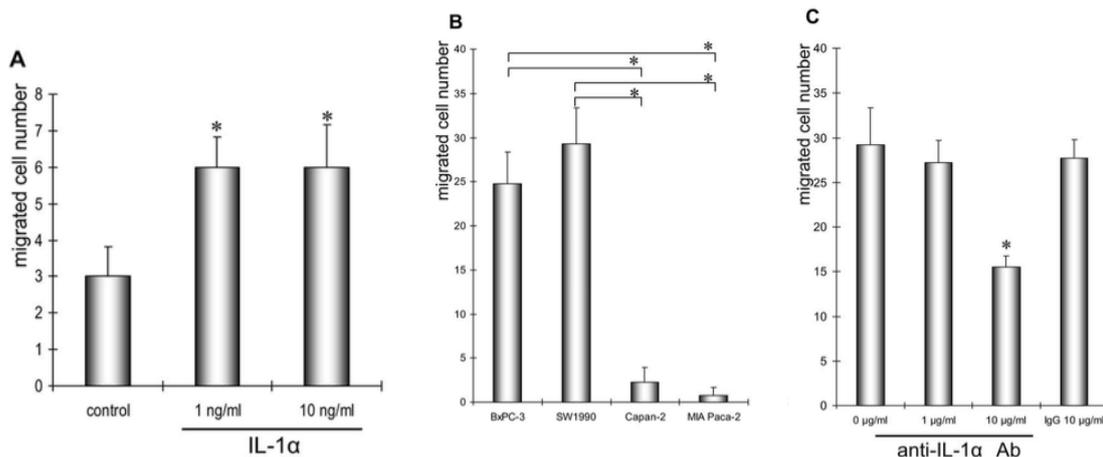
En un estudio posterior, los mismos autores propusieron que la adhesión de células tumorales al endotelio es mediada por la IL-1 gracias a un aumento en la expresión de receptores de manosa y a la producción de factores de crecimiento por las células endoteliales.¹⁴⁸

DISCUSIÓN

En cuanto a la transmigración de células tumorales a través del endotelio, nuestros resultados demuestran que la IL-1 tiene un papel relevante. Esta conclusión se basa en que la presencia de IL-1Ra redujo significativamente la transmigración de la línea productora de IL-1 (SCC-4), mientras que no generó ningún efecto en las células no productoras de IL-1 (SCC-9). Adicionalmente, la manipulación del gen que codifica para IL-1 condujo a un cambio en la transmigración de las líneas celulares: al silenciar el gen en la línea SCC-4 disminuyó la transmigración y al realizar transfección de IL-1 en las SCC-9 se obtuvo un incremento en la transmigración.

Matsuo³⁷ y cols obtuvieron resultados similares a los nuestros en líneas de cáncer de páncreas.

Su estudio difirió del nuestro en que compararon la capacidad de migración de las células endoteliales (no de las tumorales) en condiciones basales, tras tratamiento con IL-1 α recombinante y tras incubación con medio condicionante obtenido de un panel de líneas de cáncer de páncreas: líneas altamente metastásicas y con elevada expresión de IL-1 α (BxPC-3 y SW1990) y líneas con poca tendencia a dar metástasis y baja expresión de IL-1 α (Capan-2 y MIA PaCa-2). La migración de las células fue significativamente mayor al estar expuestas a IL-1 α y al medio condicionante de las líneas productoras de IL-1 α . El tratamiento con anticuerpos anti-IL-1 α de las células cultivadas con medio condicionante de SW1990, consiguió una inhibición importante en la actividad migratoria.



(A) Efecto de IL-1 α recombinante sobre la migración de células endoteliales. (B) Comparación de la migración de células cultivadas con medio condicionante de líneas de Ca páncreas. (C) Efecto del tratamiento con anticuerpos anti-IL-1 α sobre la migración de células cultivadas con medio condicionante de SW1990. (*P<0.01) Tomado de:

Interleukin-1 α secreted by pancreatic cells promotes angiogenesis and its therapeutic implication³⁷

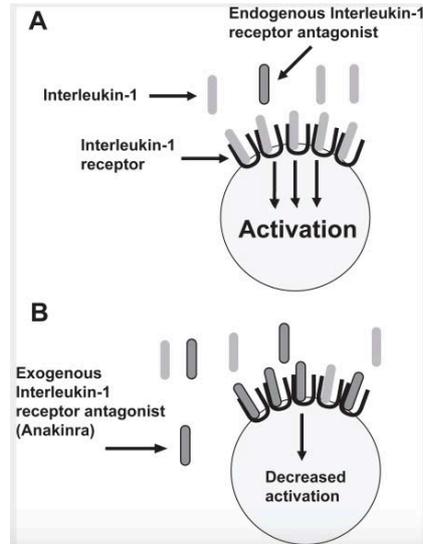
6.5. PAPEL DEL RECEPTOR ANTAGONISTA DEL IL-1 (IL-1Ra) EN EL CECC

La actividad de la red de citoquinas y células inflamatorias/inmunológicas presentes en el microambiente tumoral influye en la evolución de las neoplasias malignas. La inclinación de la balanza hacia la inmunidad anti-tumoral o la inflamación pro-tumoral determina el destino del tumor: destrucción de células malignas y limitación del proceso vs progresión tumoral⁹³. Como se ha visto, la IL-1 es una citoquina pro-inflamatoria abundante en el microambiente tumoral. Al parecer sus efectos varían en función del patrón de expresión, la isoforma predominante (IL-1 α o IL-1 β), la localización y cantidad de la misma, el tipo de tumor, etc. A pesar de ello, en la realidad ambas moléculas se expresan e inducen mutuamente su producción. En nuestro estudio, la IL-1 α fue la molécula relacionada con el desarrollo de metástasis a distancia, pero existió una correlación significativa entre los niveles de expresión transcripcional de IL-1 α e IL-1 β .

Aunque la IL-1 existe de forma fisiológica y cumple múltiples funciones importantes a nivel sistémico, su presencia incrementada en el microambiente tumoral tiene efectos perjudiciales que pueden llevar a la aparición de metástasis a distancia. La habilidad de la IL-1 para contribuir en el crecimiento e invasión tumoral esta dada por la influencia que ejerce sobre otras citoquinas, quimioquinas, moléculas pro-inflamatorias y pro-angiogénicas. Esto la convierte en un objetivo molecular atractivo para intervención terapéutica, ya que bloqueando a esta única molécula, se podrían inhibir diferentes vías donde convergen mecanismos de angiogénesis e inflamación.

Experimentos en modelos murinos de diferentes estirpes tumorales han demostrado que el bloqueo de la IL-1 mediante el uso del receptor antagonista IL-1Ra^{18, 30-34} o anticuerpos anti-IL-1^{37, 39}, consigue disminuir el crecimiento tumoral y la tasa de metástasis a través de la inhibición de la angiogénesis. Nuestros resultados confirman la capacidad de IL-1Ra de reducir la adhesividad y la trans migración de células de CECC a través del endotelio.

El fármaco para bloquear a la IL-1 más estudiado y con mayor experiencia en cuanto a uso clínico es el Anakinra, una versión recombinante del receptor antagonista de IL-1 (IL-1Ra) que se une a los receptores sin transmitir la señal de activación y previene la unión de la IL-1 α o IL-1 β a su receptor.



Mecanismo de acción de IL-1Ra (Anakinra)

(A) Unión de IL-1 a sus receptores con activación de la señal. (B) Unión de IL-1Ra a los receptores sin desencadenar transducción de la señal y bloqueando la unión de la IL-1. Tomado de: Biological therapies for the treatment of juvenile idiopathic arthritis¹⁵¹

Este agente está aprobado por la FDA para el tratamiento de la artritis reumatoide y de los síndromes periódicos asociados a criopirina (conocidos como “CAPS”), pero también ha demostrado ser útil en una amplia gama de enfermedades de índole inflamatoria, autoinmune y metabólica¹⁵². La idea extensiva de bloquear a la IL-1 para tratar patologías tan diversas se debe a que es la principal citoquina relacionada con la respuesta inmune e inflamatoria innata. Este vínculo se explica porque el dominio citoplasmático de los receptores de la familia de IL-1 es homólogo al segmento citoplasmático de los receptores “*toll*”. Los receptores “*toll - like*” (TLR) están involucrados en la transducción de múltiples señales inflamatorias como la inducción de la COX-2 o la expresión de moléculas de adhesión celular^{152, 153}.

El uso de Anakinra en humanos ha demostrado un buen perfil de seguridad, adecuada absorción y penetración a los tejidos al ser administrado de forma subcutánea o endovenosa. Su vida media corta (máximo 6 horas) hace que deba administrarse una inyección subcutánea diaria en pacientes con artritis reumatoide. Esto sería un inconveniente en el tratamiento de pacientes oncológicos. Para asegurar una entrega sostenida y estable de IL-1Ra a los tejidos, Bar y cols¹⁴⁴ idearon un sistema celular microencapsulado que libera cantidades bajas y continuas de IL-1Ra. Mediante técnicas de ingeniería genética programaron a las células para que la producción y secreción de IL-1Ra fuese continua. Las células encapsuladas en microesferas, estaban aisladas o

protegidas pero a la vez eran permeables a la entrada de nutrientes del ambiente (asegurando su viabilidad) y a la salida de IL-1Ra. El sistema fue aplicado en un modelo murino de fibrosarcoma con elevada expresión de IL-1 β . El experimento demostró que la entrega continua de IL-1Ra en ratones tratados con las microesferas redujo la angiogénesis e inhibió el crecimiento del tumor, mientras que los ratones del grupo control desarrollaron tumores agresivos e hipervascularizados. La propuesta de estos autores constituye una aproximación más real al uso del IL-1Ra como tratamiento contra el cáncer.

La administración del receptor antagonista Anakinra sola o en combinación con protocolos de quimioterapia podría ser de utilidad en el tratamiento de pacientes con tumores de diferentes localizaciones e histologías (incluidos los CECC) en los que se haya confirmado una expresión elevada de IL-1. El objetivo de su administración sería reducir el crecimiento e invasividad del tumor y aliviar los efectos colaterales de la inflamación generada por el tumor, como la caquexia y el daño tisular.¹⁴⁴ En el *National Cancer Institute* hay registro de estudios clínicos con Anakinra en fases I y II, en pacientes con tumores avanzados o metastásicos en quienes ha fallado la quimioterapia de primera línea o se han negado a recibir tratamiento adyuvante estándar. Los resultados de estos estudios podrían llevar en un futuro a la aplicación de tratamientos biológicos como el Anakinra en pacientes con tumores invasivos de cabeza y cuello.

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. No aparecieron diferencias significativas en los niveles de expresión transcripcional de la IL-1 α entre las muestras de tumor y de mucosa sana. La expresión transcripcional de IL-1 β fue significativamente mayor en muestras de tumor comparada con muestras de mucosa sana. La situación contraria ocurrió con IL-1Ra, cuyos niveles fueron menores en las muestras tumorales.
2. La IL-1 α fue la única molécula de la familia IL-1 y la única variable del análisis multivariante, que se relacionó de forma significativa con la aparición de metástasis a distancia. Los niveles elevados de IL-1 α tanto a nivel transcripcional como de proteína se relacionaron con mayor riesgo de metástasis a distancia.
3. La expresión elevada de IL-1 α en el tumor se correlacionó con la expresión de genes implicados en la angiogénesis como VEGF, IL-8, COX-2 y mPGES-1.
4. En los estudios experimentales realizados en líneas de CECC, la expresión de IL-1 α modificó la adhesión endotelial y la transmigración:
 - El tratamiento de las MVEC con IL-1 aumentó la capacidad de adhesión de las células tumorales al endotelio.
 - Las líneas celulares con expresión elevada de IL-1 α presentaron mayor transmigración a través del endotelio que las células con baja expresión de IL-1 α .
 - El receptor antagonista (IL-1Ra) redujo la adhesividad y la transmigración de células de CECC productoras de IL-1.
5. La combinación de factores clínicos de alto riesgo (como la afectación loco-regional o extensión ganglionar extracapsular) y los niveles de expresión de la IL-1 permitieron delimitar al grupo de pacientes con CECC con mayor riesgo de metástasis a distancia. La supervivencia libre de metástasis a distancia a los 5 años en los pacientes con expresión elevada de IL-1 α y factores clínicos de alto riesgo fue del 49%, mientras que en los pacientes con niveles de expresión baja de IL-1 α y factores de alto riesgo clínico fue del 93.5%.

8. BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Chung CH, Parker JS, Karaca G, Wu J, Funkhouser WK, Moore D, et al. Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. *Cancer cell*. 2004;5:489-500.
2. Giri U, Ashorn CL, Ramdas L, Stivers DN, Coombes K, El-Naggar AK, et al. Molecular signatures associated with clinical outcome in patients with high-risk head-and-neck squamous cell carcinoma treated by surgery and radiation. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2006;64:670-7.
3. 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. *Nature genetics*. 2005;37:182-6.
4. Howell GM, Grandis JR. Molecular mediators of metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Head & neck*. 2005;27:710-7.
5. Lallemand B, Evrard A, Chambon G, Sabra O, Kacha S, Lallemand JG, et al. Gene expression profiling in head and neck squamous cell carcinoma: Clinical perspectives. *Head & neck*. 2010;32:1712-9.
6. Sankaranarayanan R, Masuyer E, Swaminathan R, Ferlay J, Whelan S. Head and neck cancer: a global perspective on epidemiology and prognosis. *Anticancer research*. 1998;18:4779-86.
7. Coca-Pelaz A, Rodrigo JP, Suarez C. Clinicopathologic analysis and predictive factors for distant metastases in patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Head & neck*. 2012;34:771-5.
8. Leon X, Quer M, Orus C, del Prado Venegas M, Lopez M. Distant metastases in head and neck cancer patients who achieved loco-regional control. *Head & neck*. 2000;22:680-6.
9. Garavello W, Ciardo A, Spreafico R, Gaini RM. Risk factors for distant metastases in head and neck squamous cell carcinoma. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*. 2006;132:762-6.
10. Chen TC, Hsu CW, Lou PJ, Ko JY, Yang TL, Chen CN, et al. The clinical predictive factors for subsequent distant metastasis in patients with locoregionally advanced oral squamous cell carcinoma. *Oral oncology*. 2013;49:367-73.
11. Allen CT, Law JH, Dunn GP, Uppaluri R. Emerging insights into head and neck cancer metastasis. *Head & neck*. 2013;35:1669-78.
12. Li X, Di B, Shang Y, Zhou Y, Cheng J, He Z. Clinicopathologic risk factors for distant metastases from head and neck squamous cell carcinomas. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*. 2009;35:1348-53.

13. 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 oncology*. 2012;48:775-9.
14. Kotwall C, Sako K, Razack MS, Rao U, Bakamjian V, Shedd DP. Metastatic patterns in squamous cell cancer of the head and neck. *American journal of surgery*. 1987;154:439-42.
15. Nishijima W, Takooda S, Tokita N, Takayama S, Sakura M. Analyses of distant metastases in squamous cell carcinoma of the head and neck and lesions above the clavicle at autopsy. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*. 1993;119:65-8.
16. Chen Z, Malhotra PS, Thomas GR, Ondrey FG, Duffey DC, Smith CW, et al. Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 1999;5:1369-79.
17. Dinarello CA. Why not treat human cancer with interleukin-1 blockade? *Cancer metastasis reviews*. 2010;29:317-29.
18. Elaraj DM, Weinreich DM, Varghese S, Puhmann M, Hewitt SM, Carroll NM, et al. The role of interleukin 1 in growth and metastasis of human cancer xenografts. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12:1088-96.
19. American Society of Clinical O, Pfister DG, Laurie SA, Weinstein GS, Mendenhall WM, Adelstein DJ, et al. American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline for the use of larynx-preservation strategies in the treatment of laryngeal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24:3693-704.
20. Liao CT, Wang HM, Chang JT, Ng SH, Hsueh C, Lee LY, et al. Analysis of risk factors for distant metastases in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer*. 2007;110:1501-8.
21. Lim JY, Lim YC, Kim SH, Kim JW, Jeong HM, Choi EC. Predictive factors of isolated distant metastasis after primary definitive surgery without systemic treatment for head and neck squamous cell carcinoma. *Oral oncology*. 2010;46:504-8.
22. Leemans CR, Tiwari R, Nauta JJ, van der Waal I, Snow GB. Regional lymph node involvement and its significance in the development of distant metastases in head and neck carcinoma. *Cancer*. 1993;71:452-6.
23. Alvi A, Johnson JT. Development of distant metastasis after treatment of advanced-stage head and neck cancer. *Head & neck*. 1997;19:500-5.
24. Sano D, Myers JN. Metastasis of squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Cancer metastasis reviews*. 2007;26:645-62.
25. 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 otolaryngology-- head & neck surgery*. 2013;139:483-8.

26. Rodrigo JP, Martinez P, Allonca E, Alonso-Duran L, Suarez C, Astudillo A, et al. Immunohistochemical markers of distant metastasis in laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinomas. *Clinical & experimental metastasis*. 2014;31:317-25.
27. Papagerakis S, Shabana AH, Pollock BH, Papagerakis P, Depondt J, Berdal A. Altered desmoplakin expression at transcriptional and protein levels provides prognostic information in human oropharyngeal cancer. *Human pathology*. 2009;40:1320-9.
28. Nijkamp MM, Span PN, Hoogsteen IJ, van der Kogel AJ, Kaanders JH, Bussink J. Expression of E-cadherin and vimentin correlates with metastasis formation in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2011;99:344-8.
29. van de Schootbrugge C, Bussink J, Span PN, Sweep FC, Grenman R, Stegeman H, et al. alphaB-crystallin stimulates VEGF secretion and tumor cell migration and correlates with enhanced distant metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *BMC cancer*. 2013;13:128.
30. Voronov E, Shouval DS, Krelin Y, Cagnano E, Benharroch D, Iwakura Y, et al. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100:2645-50.
31. Vidal-Vanaclocha F, Amezaga C, Asumendi A, Kaplanski G, Dinarello CA. Interleukin-1 receptor blockade reduces the number and size of murine B16 melanoma hepatic metastases. *Cancer research*. 1994;54:2667-72.
32. Anasagasti MJ, Olaso E, Calvo F, Mendoza L, Martin JJ, Bidaurrezaga J, et al. Interleukin 1-dependent and -independent mouse melanoma metastases. *Journal of the National Cancer Institute*. 1997;89:645-51.
33. Giavazzi R, Garofalo A, Bani MR, Abbate M, Ghezzi P, Boraschi D, et al. Interleukin 1-induced augmentation of experimental metastases from a human melanoma in nude mice. *Cancer research*. 1990;50:4771-5.
34. Chirivi RG, Garofalo A, Padura IM, Mantovani A, Giavazzi R. Interleukin 1 receptor antagonist inhibits the augmentation of metastasis induced by interleukin 1 or lipopolysaccharide in a human melanoma/nude mouse system. *Cancer research*. 1993;53:5051-4.
35. Schmieder A, Multhoff G, Radons J. Interleukin-33 acts as a pro-inflammatory cytokine and modulates its receptor gene expression in highly metastatic human pancreatic carcinoma cells. *Cytokine*. 2012;60:514-21.
36. Xu D, Matsuo Y, Ma J, Koide S, Ochi N, Yasuda A, et al. Cancer cell-derived IL-1alpha promotes HGF secretion by stromal cells and enhances metastatic potential in pancreatic cancer cells. *Journal of surgical oncology*. 2010;102:469-77.
37. Matsuo Y, Sawai H, Ochi N, Yasuda A, Takahashi H, Funahashi H, et al. Interleukin-1alpha secreted by pancreatic cancer cells promotes angiogenesis and its therapeutic implications. *The Journal of surgical research*. 2009;153:274-81.
38. Wolf JS, Chen Z, Dong G, Sunwoo JB, Bancroft CC, Capo DE, et al. IL (interleukin)-1alpha promotes nuclear factor-kappaB and AP-1-induced IL-8 expression, cell survival,

and proliferation in head and neck squamous cell carcinomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2001;7:1812-20.

39. Chen Z, Colon I, Ortiz N, Callister M, Dong G, Pegram MY, et al. Effects of interleukin-1alpha, interleukin-1 receptor antagonist, and neutralizing antibody on proinflammatory cytokine expression by human squamous cell carcinoma lines. *Cancer research*. 1998;58:3668-76.

40. Dong G, Chen Z, Kato T, Van Waes C. The host environment promotes the constitutive activation of nuclear factor-kappaB and proinflammatory cytokine expression during metastatic tumor progression of murine squamous cell carcinoma. *Cancer research*. 1999;59:3495-504.

41. Spano D, Heck C, De Antonellis P, Christofori G, Zollo M. Molecular networks that regulate cancer metastasis. *Seminars in cancer biology*. 2012;22:234-49.

42. Hu M, Polyak K. Microenvironmental regulation of cancer development. *Current opinion in genetics & development*. 2008;18:27-34.

43. Bhowmick NA, Moses HL. Tumor-stroma interactions. *Current opinion in genetics & development*. 2005;15:97-101.

44. Franco OE, Shaw AK, Strand DW, Hayward SW. Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis. *Seminars in cell & developmental biology*. 2010;21:33-9.

45. Wang D, Dubois RN. Prostaglandins and cancer. *Gut*. 2006;55:115-22.

46. Shimoda M, Mellody KT, Orimo A. Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression. *Seminars in cell & developmental biology*. 2010;21:19-25.

47. Hakelius M, Koskela A, Reyhani V, Ivarsson M, Grenman R, Rubin K, et al. Interleukin-1-mediated effects of normal oral keratinocytes and head and neck squamous carcinoma cells on extracellular matrix related gene expression in fibroblasts. *Oral oncology*. 2012;48:1236-41.

48. Erez N, Truitt M, Olson P, Arron ST, Hanahan D. Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner. *Cancer cell*. 2010;17:135-47.

49. Bru A, Souto JC, Alcolea S, Anton R, Remacha A, Camacho M, et al. Tumour cell lines HT-29 and FaDu produce proinflammatory cytokines and activate neutrophils in vitro: possible applications for neutrophil-based antitumour treatment. *Mediators of inflammation*. 2009;2009:817498.

50. Casos K, Siguero L, Fernandez-Figueras MT, Leon X, Sarda MP, Vila L, et al. Tumor cells induce COX-2 and mPGES-1 expression in microvascular endothelial cells mainly by means of IL-1 receptor activation. *Microvascular research*. 2011;81:261-8.

51. Souto JC, Vila L, Bru A. Polymorphonuclear neutrophils and cancer: intense and sustained neutrophilia as a treatment against solid tumors. *Medicinal research reviews*. 2011;31:311-63.

52. Blaheta RA, Powerski M, Hudak L, Juengel E, Jonas D, von Knethen A, et al. Tumor-endothelium cross talk blocks recruitment of neutrophils to endothelial cells: a novel mechanism of endothelial cell anergy. *Neoplasia*. 2009;11:1054-63.
53. Houghton AM. The paradox of tumor-associated neutrophils: fueling tumor growth with cytotoxic substances. *Cell cycle*. 2010;9:1732-7.
54. Tanaka N, Odajima T, Ogi K, Ikeda T, Satoh M. Expression of E-cadherin, alpha-catenin, and beta-catenin in the process of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *British journal of cancer*. 2003;89:557-63.
55. Chow V, Yuen AP, Lam KY, Tsao GS, Ho WK, Wei WI. A comparative study of the clinicopathological significance of E-cadherin and catenins (alpha, beta, gamma) expression in the surgical management of oral tongue carcinoma. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2001;127:59-63.
56. Rodrigo JP, Dominguez F, Alvarez C, Manrique C, Herrero A, Suarez C. Expression of E-cadherin in squamous cell carcinomas of the supraglottic larynx with correlations to clinicopathological features. *European journal of cancer*. 2002;38:1059-64.
57. Shinohara M, Hiraki A, Ikebe T, Nakamura S, Kurahara S, Shirasuna K, et al. Immunohistochemical study of desmosomes in oral squamous cell carcinoma: correlation with cytokeratin and E-cadherin staining, and with tumour behaviour. *The Journal of pathology*. 1998;184:369-81.
58. Bankfalvi A, Krassort M, Buchwalow IB, Vegh A, Felszeghy E, Piffko J. Gains and losses of adhesion molecules (CD44, E-cadherin, and beta-catenin) during oral carcinogenesis and tumour progression. *The Journal of pathology*. 2002;198:343-51.
59. Hirvikoski P, Kumpulainen EJ, Virtaniemi JA, Helin HJ, Rantala I, Johansson RT, et al. Cytoplasmic accumulation of alpha-catenin is associated with aggressive features in laryngeal squamous-cell carcinoma. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1998;79:546-50.
60. Andrews NA, Jones AS, Helliwell TR, Kinsella AR. Expression of the E-cadherin-catenin cell adhesion complex in primary squamous cell carcinomas of the head and neck and their nodal metastases. *British journal of cancer*. 1997;75:1474-80.
61. Ramos DM, But M, Regezi J, Schmidt BL, Atakilit A, Dang D, et al. Expression of integrin beta 6 enhances invasive behavior in oral squamous cell carcinoma. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2002;21:297-307.
62. Li X, Yang Y, Hu Y, Dang D, Regezi J, Schmidt BL, et al. Alphavbeta6-Fyn signaling promotes oral cancer progression. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278:41646-53.
63. Kawano T, Nakamura Y, Yanoma S, Kubota A, Furukawa M, Miyagi Y, et al. Expression of E-cadherin, and CD44s and CD44v6 and its association with prognosis in head and neck cancer. *Auris, nasus, larynx*. 2004;31:35-41.
64. Kunishi M, Kayada Y, Yoshiga K. Down-regulated expression of CD44 variant 6 in oral squamous cell carcinomas and its relationship to regional lymph node metastasis. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 1997;26:280-3.

65. Sato S, Miyauchi M, Takekoshi T, Zhao M, Kudo Y, Ogawa I, et al. Reduced expression of CD44 variant 9 is related to lymph node metastasis and poor survival in squamous cell carcinoma of tongue. *Oral oncology*. 2000;36:545-9.
66. Kawata R, Shimada T, Maruyama S, Hisa Y, Takenaka H, Murakami Y. Enhanced production of matrix metalloproteinase-2 in human head and neck carcinomas is correlated with lymph node metastasis. *Acta oto-laryngologica*. 2002;122:101-6.
67. P OC, Rhys-Evans PH, Eccles SA. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*. 2001;127:813-20.
68. Kurahara S, Shinohara M, Ikebe T, Nakamura S, Beppu M, Hiraki A, et al. Expression of MMPs, MT-MMP, and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis. *Head & neck*. 1999;21:627-38.
69. Viros D, Camacho M, Zarranonandia 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 oncology*. 2013;49:322-5.
70. Kusakawa J, Harada H, Shima I, Sasaguri Y, Kameyama T, Morimatsu M. The significance of epidermal growth factor receptor and matrix metalloproteinase-3 in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *European journal of cancer Part B, Oral oncology*. 1996;32B:217-21.
71. P OC, Rhys-Evans P, Modjtahedi H, Court W, Box G, Eccles S. Overexpression of epidermal growth factor receptor in human head and neck squamous carcinoma cell lines correlates with matrix metalloproteinase-9 expression and in vitro invasion. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2000;86:307-17.
72. Muller S, Su L, Tighiouart M, Saba N, Zhang H, Shin DM, et al. Distinctive E-cadherin and epidermal growth factor receptor expression in metastatic and nonmetastatic head and neck squamous cell carcinoma: predictive and prognostic correlation. *Cancer*. 2008;113:97-107.
73. Ang KK, Berkey BA, Tu X, Zhang HZ, Katz R, Hammond EH, et al. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer research*. 2002;62:7350-6.
74. Rubin Grandis J, Melhem MF, Gooding WE, Day R, Holst VA, Wagener MM, et al. Levels of TGF-alpha and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *Journal of the National Cancer Institute*. 1998;90:824-32.
75. Thomas SM, Coppelli FM, Wells A, Gooding WE, Song J, Kassis J, et al. Epidermal growth factor receptor-stimulated activation of phospholipase Cgamma-1 promotes invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer research*. 2003;63:5629-35.
76. Schneider GB, Kurago Z, Zaharias R, Gruman LM, Schaller MD, Hendrix MJ. Elevated focal adhesion kinase expression facilitates oral tumor cell invasion. *Cancer*. 2002;95:2508-15.
77. Canel M, Secades P, Rodrigo JP, Cabanillas R, Herrero A, Suarez C, et al. Overexpression of focal adhesion kinase in head and neck squamous cell carcinoma is independent of fak gene copy number. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12:3272-9.

78. Bancroft CC, Chen Z, Dong G, Sunwoo JB, Yeh N, Park C, et al. Coexpression of proangiogenic factors IL-8 and VEGF by human head and neck squamous cell carcinoma involves coactivation by MEK-MAPK and IKK-NF-kappaB signal pathways. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2001;7:435-42.
79. Eisma RJ, Spiro JD, Kreutzer DL. Role of angiogenic factors: coexpression of interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in patients with head and neck squamous carcinoma. *The Laryngoscope*. 1999;109:687-93.
80. Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine*. 2006;355:2542-50.
81. Wang J, Xi L, Hunt JL, Gooding W, Whiteside TL, Chen Z, et al. Expression pattern of chemokine receptor 6 (CCR6) and CCR7 in squamous cell carcinoma of the head and neck identifies a novel metastatic phenotype. *Cancer research*. 2004;64:1861-6.
82. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*. 2001;410:50-6.
83. Kang Y, Pantel K. Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients. *Cancer cell*. 2013;23:573-81.
84. Nichols AC, Lowes LE, Szeto CC, Basmaji J, Dhaliwal S, Chapeskie C, et al. Detection of circulating tumor cells in advanced head and neck cancer using the CellSearch system. *Head & neck*. 2012;34:1440-4.
85. Jatana KR, Balasubramanian P, Lang JC, Yang L, Jatana CA, White E, et al. Significance of circulating tumor cells in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck: initial results. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*. 2010;136:1274-9.
86. Wirtschaffter A, Benninger MS, Moss TJ, Umiel T, Blazoff K, Worsham MJ. Micrometastatic tumor detection in patients with head and neck cancer: a preliminary report. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*. 2002;128:40-3.
87. Colnot DR, Nieuwenhuis EJ, Kuik DJ, Leemans CR, Dijkstra J, Snow GB, et al. Clinical significance of micrometastatic cells detected by E48 (Ly-6D) reverse transcription-polymerase chain reaction in bone marrow of head and neck cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004;10:7827-33.
88. Colella S, Richards KL, Bachinski LL, Baggerly KA, Tsavachidis S, Lang JC, et al. Molecular signatures of metastasis in head and neck cancer. *Head & neck*. 2008;30:1273-83.
89. Cromer A, Carles A, Millon R, Ganguli G, Chalmel F, Lemaire F, et al. Identification of genes associated with tumorigenesis and metastatic potential of hypopharyngeal cancer by microarray analysis. *Oncogene*. 2004;23:2484-98.

90. Braakhuis BJ, Senft A, de Bree R, de Vries J, Ylstra B, Cloos J, et al. Expression profiling and prediction of distant metastases in head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of clinical pathology*. 2006;59:1254-60.
91. Dinarello CA. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clinical and experimental rheumatology*. 2002;20:S1-13.
92. Dinarello CA. Keep up the heat on IL-1. *Blood*. 2012;120:2538-9.
93. Voronov E, Dotan S, Krelin Y, Song X, Elkabets M, Carmi Y, et al. Unique Versus Redundant Functions of IL-1alpha and IL-1beta in the Tumor Microenvironment. *Frontiers in immunology*. 2013;4:177.
94. Lewis AM, Varghese S, Xu H, Alexander HR. Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. *Journal of translational medicine*. 2006;4:48.
95. Apte RN, Voronov E. Interleukin-1--a major pleiotropic cytokine in tumor-host interactions. *Seminars in cancer biology*. 2002;12:277-90.
96. Nicklin MJ, Weith A, Duff GW. A physical map of the region encompassing the human interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-1 receptor antagonist genes. *Genomics*. 1994;19:382-4.
97. Velez-Castrillón S CJ, Correa PA, Anaya JM. . Bases moleculares de la familia de la interleuquina-1. *Revista Colombiana de Reumatología*. 2004;11:11-39.
98. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. 1996;87:2095-147.
99. Dinarello CA, Simon A, van der Meer JW. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nature reviews Drug discovery*. 2012;11:633-52.
100. Dunne A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*. 2003;2003:re3.
101. Janeway CA TP, Walport M, Shlomchik MJ. *Immunobiology: the immune system in health and disease* 5th ed. New York: Garland Science; 2001.
102. Cullinan EB, Kwee L, Nunes P, Shuster DJ, Ju G, McIntyre KW, et al. IL-1 receptor accessory protein is an essential component of the IL-1 receptor. *Journal of immunology*. 1998;161:5614-20.
103. Weber A, Wasiliew P, Kracht M. Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Science signaling*. 2010;3:cm1.
104. Tu S, Bhagat G, Cui G, Takaishi S, Kurt-Jones EA, Rickman B, et al. Overexpression of interleukin-1beta induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice. *Cancer cell*. 2008;14:408-19.
105. Sakurai T, He G, Matsuzawa A, Yu GY, Maeda S, Hardiman G, et al. Hepatocyte necrosis induced by oxidative stress and IL-1 alpha release mediate carcinogen-induced compensatory proliferation and liver tumorigenesis. *Cancer cell*. 2008;14:156-65.

106. Krelin Y, Voronov E, Dotan S, Elkabets M, Reich E, Fogel M, et al. Interleukin-1beta-driven inflammation promotes the development and invasiveness of chemical carcinogen-induced tumors. *Cancer research*. 2007;67:1062-71.
107. Dong GW, Do NY, Lim SC. Relation between proinflammatory mediators and epithelial-mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. *Experimental and therapeutic medicine*. 2010;1:885-91.
108. Woods KV, El-Naggar A, Clayman GL, Grimm EA. Variable expression of cytokines in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines and consistent expression in surgical specimens. *Cancer research*. 1998;58:3132-41.
109. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*. 2011;117:3720-32.
110. Camacho M, Godessart N, Anton R, Garcia M, Vila L. Interleukin-1 enhances the ability of cultured human umbilical vein endothelial cells to oxidize linoleic acid. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270:17279-86.
111. Camacho M, Lopez-Belmonte J, Vila L. Rate of vasoconstrictor prostanoids released by endothelial cells depends on cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin I synthase activity. *Circulation research*. 1998;83:353-65.
112. Greenhough A, Smartt HJ, Moore AE, Roberts HR, Williams AC, Paraskeva C, et al. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis*. 2009;30:377-86.
113. Chen Z, Smith CW, Kiel D, Van Waes C. Metastatic variants derived following in vivo tumor progression of an in vitro transformed squamous cell carcinoma line acquire a differential growth advantage requiring tumor-host interaction. *Clinical & experimental metastasis*. 1997;15:527-37.
114. Lathers DM, Young MR. Increased aberrance of cytokine expression in plasma of patients with more advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cytokine*. 2004;25:220-8.
115. Wang FM, Liu HQ, Liu SR, Tang SP, Yang L, Feng GS. SHP-2 promoting migration and metastasis of MCF-7 with loss of E-cadherin, dephosphorylation of FAK and secretion of MMP-9 induced by IL-1beta in vivo and in vitro. *Breast cancer research and treatment*. 2005;89:5-14.
116. Gemma A, Takenaka K, Hosoya Y, Matuda K, Seike M, Kurimoto F, et al. Altered expression of several genes in highly metastatic subpopulations of a human pulmonary adenocarcinoma cell line. *European journal of cancer*. 2001;37:1554-61.
117. Berek JS, Chung C, Kaldi K, Watson JM, Knox RM, Martinez-Maza O. Serum interleukin-6 levels correlate with disease status in patients with epithelial ovarian cancer. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1991;164:1038-42; discussion 42-3.
118. Watson JM, Sensintaffar JL, Berek JS, Martinez-Maza O. Constitutive production of interleukin 6 by ovarian cancer cell lines and by primary ovarian tumor cultures. *Cancer research*. 1990;50:6959-65.

119. Blay JY, Rossi JF, Wijdenes J, Menetrier-Caux C, Schemann S, Negrier S, et al. Role of interleukin-6 in the paraneoplastic inflammatory syndrome associated with renal-cell carcinoma. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1997;72:424-30.
120. Ueda T, Shimada E, Urakawa T. Serum levels of cytokines in patients with colorectal cancer: possible involvement of interleukin-6 and interleukin-8 in hematogenous metastasis. *Journal of gastroenterology*. 1994;29:423-9.
121. Oka M, Yamamoto K, Takahashi M, Hakozaki M, Abe T, Iizuka N, et al. Relationship between serum levels of interleukin 6, various disease parameters and malnutrition in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer research*. 1996;56:2776-80.
122. Sakamoto K, Masuda T, Mita S, Ishiko T, Nakashima Y, Arakawa H, et al. Interleukin-8 is constitutively and commonly produced by various human carcinoma cell lines. *International journal of clinical & laboratory research*. 1992;22:216-9.
123. Scheibenbogen C, Mohler T, Haefele J, Hunstein W, Keilholz U. Serum interleukin-8 (IL-8) is elevated in patients with metastatic melanoma and correlates with tumour load. *Melanoma research*. 1995;5:179-81.
124. Chopra V, Dinh TV, Hannigan EV. Serum levels of interleukins, growth factors and angiogenin in patients with endometrial cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 1997;123:167-72.
125. Obermair A, Kucera E, Mayerhofer K, Speiser P, Seifert M, Czerwenka K, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in human breast cancer: correlation with disease-free survival. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1997;74:455-8.
126. Salven P, Ruotsalainen T, Mattson K, Joensuu H. High pre-treatment serum level of vascular endothelial growth factor (VEGF) is associated with poor outcome in small-cell lung cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1998;79:144-6.
127. Konishi N, Miki C, Yoshida T, Tanaka K, Toiyama Y, Kusunoki M. Interleukin-1 receptor antagonist inhibits the expression of vascular endothelial growth factor in colorectal carcinoma. *Oncology*. 2005;68:138-45.
128. Burger D, Chicheportiche R, Giri JG, Dayer JM. The inhibitory activity of human interleukin-1 receptor antagonist is enhanced by type II interleukin-1 soluble receptor and hindered by type I interleukin-1 soluble receptor. *The Journal of clinical investigation*. 1995;96:38-41.
129. Rudolphi K, Gerwin N, Verzijl N, van der Kraan P, van den Berg W. Pralnacasan, an inhibitor of interleukin-1beta converting enzyme, reduces joint damage in two murine models of osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2003;11:738-46.
130. Economides AN, Carpenter LR, Rudge JS, Wong V, Koehler-Stec EM, Hartnett C, et al. Cytokine traps: multi-component, high-affinity blockers of cytokine action. *Nature medicine*. 2003;9:47-52.

131. 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 otorrinolaringologica espanola*. 2002;53:185-90.
132. Camacho M, Rodriguez C, Guadall A, Alcolea S, Orriols M, Escudero JR, et al. Hypoxia upregulates PGI-synthase and increases PGI(2) release in human vascular cells exposed to inflammatory stimuli. *Journal of lipid research*. 2011;52:720-31.
133. Chen LH, Tsai KL, Chen YW, Yu CC, Chang KW, Chiou SH, et al. MicroRNA as a Novel Modulator in Head and Neck Squamous Carcinoma. *Journal of oncology*. 2010;2010:135632.
134. Crowe DL, Milo GE, Shuler CF. Keratin 19 downregulation by oral squamous cell carcinoma lines increases invasive potential. *Journal of dental research*. 1999;78:1256-63.
135. Paccione RJ, Miyazaki H, Patel V, Waseem A, Gutkind JS, Zehner ZE, et al. Keratin down-regulation in vimentin-positive cancer cells is reversible by vimentin RNA interference, which inhibits growth and motility. *Molecular cancer therapeutics*. 2008;7:2894-903.
136. Aroeira LS, Aguilera A, Sanchez-Tomero JA, Bajo MA, del Peso G, Jimenez-Heffernan JA, et al. Epithelial to mesenchymal transition and peritoneal membrane failure in peritoneal dialysis patients: pathologic significance and potential therapeutic interventions. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2007;18:2004-13.
137. St John MA, Dohadwala M, Luo J, Wang G, Lee G, Shih H, et al. Proinflammatory mediators upregulate snail in head and neck squamous cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15:6018-27.
138. Alcolea S, Anton R, Camacho M, Soler M, Alfranca A, Aviles-Jurado FX, et al. Interaction between head and neck squamous cell carcinoma cells and fibroblasts in the biosynthesis of PGE2. *Journal of lipid research*. 2012;53:630-42.
139. St John MA. Inflammatory mediators drive metastasis and drug resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *The Laryngoscope*. 2015;125 Suppl 3:S1-11.
140. Matsuo Y, Sawai H, Funahashi H, Takahashi H, Sakamoto M, Yamamoto M, et al. Enhanced angiogenesis due to inflammatory cytokines from pancreatic cancer cell lines and relation to metastatic potential. *Pancreas*. 2004;28:344-52.
141. Smith CW, Chen Z, Dong G, Loukinova E, Pegram MY, Nicholas-Figueroa L, et al. The host environment promotes the development of primary and metastatic squamous cell carcinomas that constitutively express proinflammatory cytokines IL-1alpha, IL-6, GM-CSF, and KC. *Clinical & experimental metastasis*. 1998;16:655-64.
142. Leibel SA, Scott CB, Mohiuddin M, Marcial VA, Coia LR, Davis LW, et al. The effect of local-regional control on distant metastatic dissemination in carcinoma of the head and neck: results of an analysis from the RTOG head and neck database. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1991;21:549-56.
143. Spector JG, Sessions DG, Haughey BH, Chao KS, Simpson J, El Mofly S, et al. Delayed regional metastases, distant metastases, and second primary malignancies in

squamous cell carcinomas of the larynx and hypopharynx. *The Laryngoscope*. 2001;111:1079-87.

144. Bar D, Apte RN, Voronov E, Dinarello CA, Cohen S. A continuous delivery system of IL-1 receptor antagonist reduces angiogenesis and inhibits tumor development. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2004;18:161-3.

145. Camacho M, Dilme J, Sola-Villa D, Rodriguez C, Bellmunt S, Siguero L, et al. Microvascular COX-2/mPGES-1/EP-4 axis in human abdominal aortic aneurysm. *Journal of lipid research*. 2013;54:3506-15.

146. Thun MJ, Henley SJ, Patrono C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *Journal of the National Cancer Institute*. 2002;94:252-66.

147. Huang S, Pettaway CA, Uehara H, Bucana CD, Fidler IJ. Blockade of NF-kappaB activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis. *Oncogene*. 2001;20:4188-97.

148. Vidal-Vanaclocha F, Alvarez A, Asumendi A, Urcelay B, Tonino P, Dinarello CA. Interleukin 1 (IL-1)-dependent melanoma hepatic metastasis in vivo; increased endothelial adherence by IL-1-induced mannose receptors and growth factor production in vitro. *Journal of the National Cancer Institute*. 1996;88:198-205.

149. Burrows FJ, Haskard DO, Hart IR, Marshall JF, Selkirk S, Poole S, et al. Influence of tumor-derived interleukin 1 on melanoma-endothelial cell interactions in vitro. *Cancer research*. 1991;51:4768-75.

150. Lopez-Pedreria C, Barbarroja N, Velasco F. [Pathogenic mechanisms of thrombosis in neoplasia: therapeutic implications]. *Medicina clinica*. 2004;122:190-6.

151. Stoll ML, Gotte AC. Biological therapies for the treatment of juvenile idiopathic arthritis: Lessons from the adult and pediatric experiences. *Biologics : targets & therapy*. 2008;2:229-52.

152. Dinarello CA, van der Meer JW. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans. *Seminars in immunology*. 2013;25:469-84.

153. Dinarello CA. An expanding role for interleukin-1 blockade from gout to cancer. *Molecular medicine*. 2014;20 Suppl 1:S43-58.