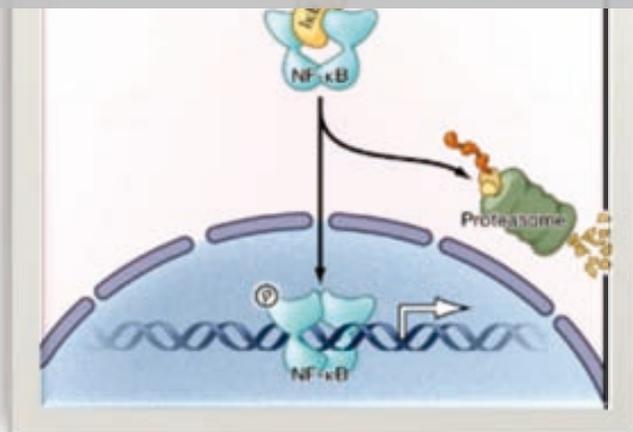
**TESIS DOCTORAL:****PAPEL PRONÓSTICO del FACTOR
NUCLEAR KAPPA-B en los CARCINOMAS
ESCAMOSOS de CABEZA y CUELLO
TRATADOS con RADIOTERAPIA****Autora:****ANA QUINTANA SANJUÁS.****Directores:****XAVIER LEÓN VINTRÓ.****LUIS VILA NAVARRO.****MERCEDES CAMACHO PÉREZ De MADRID.**

Universidad Autònoma de Barcelona.
Facultad de Medicina.
Departamento de Cirugía.



Tesis doctoral

**“Papel pronóstico del factor nuclear kappa-B en
los carcinomas escamosos de cabeza y cuello
tratados con radioterapia”**

Ana Quintana Sanjuás
2012

Dirigida por:
Dr. Xavier León Vintró.
Dr. Luis Vila Navarro.
Dra. Mercedes Camacho Pérez De Madrid.

Para Antonio y Ana.

Gracias por estar siempre a mi lado
y enseñarme a amar y a reir.

AGRADECIMIENTOS:

Una vez finalizada la tesis doctoral, tengo la obligación de mostrar mi más sentida y sincera gratitud a las personas que me han ayudado en la elaboración de este trabajo, ya que sin ellas no habría sido posible.

Quiero mostrarle mi mayor agradecimiento a los Dr. Luis Vila Navarro, Dra. Mercedes Camacho Pérez De Madrid y especialmente al Dr. Xavier León Vintró, que me han dirigido en este trabajo y sin los que no habría podido culminarlo. Gracias por todos los conocimientos transmitidos y por haberme brindado la posibilidad de trabajar a su lado, aprendiendo de ellos esta profesión que tanto me apasiona que es la medicina.

Mi gratitud al Dr. Miquel Quer Agustí por haber confiado en mí y haberme apoyado desde el primer momento que se planteó esta tesis.

A todos los miembros del Servicio de Otorrinolaringología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, médicos adjuntos y residentes, enfermeras y secretaria, por su inestimable ayuda en la realización de este trabajo. Gratitud que empezó el primer día de mi rotación en el Servicio ya hace más de dos años y medio. Gracias por haberme acogido y haber hecho que me sintiese como una más.

Agradecimiento a los miembros del Laboratorio de Mediadores de la Inflamación del Instituto Recerca del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, gracias a los cuales este proyecto tiene sentido. En especial destacar mis agradecimientos al Dr. David Virós Porcuna, ya que sin su trabajo y dedicación como becario (2009-2010) en este Laboratorio no habría sido posible que todo esto se llevase a cabo.

Por último, en la parte personal, mi gratitud a Ana, por ese apoyo incondicional que siempre muestras cuando empiezo algo nuevo. A Antonio, porque aunque no estás a mi lado, creo que te sentirías orgulloso de este trabajo de tu niña. Y a Manuel, por lo que siempre decimos “gracias por este compartir”.

Índice

I. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1. Características estructurales de la vía del factor nuclear kappa-B	3
2. Vías de activación del NF-κB	8
2.1. Vía canónica o clásica	8
2.2. Vía alternativa	10
2.3. Vías de activación atípica	11
2.4. Modificación de la actividad post-transcripcional	12
3. Papel del NF-κB en la carcinogénesis	12
3.1. Mecanismos de activación del NF-κB en los carcinomas de cabeza y cuello	15
3.2. Papel del NF-κB en la regulación del ciclo celular	18
3.3. Regulación de la apoptosis	19
3.4. Inflamación: metabolismo de las prostaglandinas	23
3.5. Inflamación: citoquinas	28
3.6. Angiogénesis	31
3.7. Invasión tisular y metástasis	35
4. Posibilidades terapéuticas sobre la vía del NF-κB	43
4.1. Terapia molecular dirigida	44
4.2. Agentes naturales como inhibidores del NF-κB	50
5. Implicaciones clínicas de la actividad del NF-κB en los pacientes con carcinoma de cabeza y cuello	60
II. <u>JUSTIFICACIÓN</u>	69
III. <u>HIPÓTESIS</u>	73
IV. <u>OBJETIVOS</u>	77
V. <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	81
1. Análisis de la expresión del NF-κB en los carcinomas de cabeza y cuello	83

2. Estudio de la capacidad pronóstica de la expresión del NF- κ B en relación al control local de la enfermedad en pacientes tratados con radioterapia o quimioradioterapia	87
3. Manipulación de las muestras y determinación de los diferentes genes evaluados	92
3.1. Aislamiento de ARN con TRIzol	92
3.2. Cuantificación de la expresión del ARN mediante Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)	94
4. Técnicas estadísticas	100
4.1. Análisis de la expresión del NF- κ B en los carcinomas de cabeza y cuello	100
4.2. Estudio de la capacidad pronóstica del NF- κ B	101

VI. RESULTADOS

103

1. Análisis de la expresión del NF- κ B en los carcinomas de cabeza y cuello	105
1.1. Relación entre la expresión del p65 (NF- κ B) en las muestras de tumor y mucosa sana	105
1.2. Relación entre los valores de expresión del p65 (NF- κ B) y variables clínicas en pacientes con carcinoma escamoso de cabeza y cuello	108
1.3. Relación entre los valores de expresión del p65 (NF- κ B) y los correspondientes a otros genes implicados en sus vías de señalización en las muestras de tumor	114
2. Estudio de la capacidad pronóstica de la expresión del NF- κ B en relación al control local de la enfermedad en pacientes tratados con radioterapia o quimioradioterapia	121

VII. DISCUSIÓN

139

1. Análisis de la expresión del NF- κ B en los carcinomas de cabeza y cuello	139
---	-----

1.1. Relación entre los niveles de expresión del NF- κ B en el tumor y mucosa sana	139
1.2. Relación entre los niveles de expresión del NF- κ B en el tumor y variables clínicas	141
1.3. Relación entre los niveles de expresión del NF- κ B en el tumor y los niveles de expresión de genes relacionados con la actividad del complejo NF- κ B	143
2. Estudio de la capacidad pronóstica de la expresión del NF- κ B en relación al control local de la enfermedad en pacientes tratados con radioterapia o quimio-radioterapia	153
VIII. <u>CONCLUSIONES</u>	171
IX. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	175
X. <u>ANEXO</u>	191

I. Introducción

1.- CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LA VÍA DEL FACTOR NUCLEAR KAPPA-B:

El factor nuclear kappa-B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) fue descrito en 1986 por el Premio Nobel David Baltimore¹ como un factor nuclear que favorecía la expresión del gen responsable de la cadena ligera κ de las inmunoglobulinas. En un primer momento se pensó que la actividad de dicho factor quedaba limitada a los linfocitos B. Posteriormente se comprobó su presencia en la mayor parte de los tipos celulares animales como un elemento fundamental en la respuesta celular ante situaciones de estrés.

El factor nuclear kappa-B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) no es una proteína única sino un conjunto de dímeros formados por un pequeño grupo de proteínas altamente relacionadas, que comparten unas secuencias determinadas conocidas como locus κ B. Los miembros de la familia del NF- κ B comparten homología estructural con la oncoproteína retroviral v-Rel, por lo que son clasificados como proteínas NF- κ B/Rel. En los mamíferos se han descrito un total de cinco proteínas pertenecientes a la familia NF- κ B/Rel que pueden ser clasificadas en dos grupos en función del requerimiento de procesamiento proteolítico (Fig 1). Un grupo (clase II) lo forman la proteína RelA, también conocida como p65, y las proteínas RelB y c-Rel. La característica de las proteínas que forman este grupo es que no requieren procesamiento proteolítico sintetizándose en sus formas maduras. El segundo grupo (clase I) lo forman la proteína NF- κ B1 (también conocida como p105) y la NF- κ B2 (también conocida como p100), que son sintetizadas en forma de precursores (Tabla 1).

Las dos clases de proteínas NF- κ B contienen un dominio N-terminal que cuenta con una longitud aproximada de unos 300 aminoácidos, el Rel homology domain (RHD). El RHD es responsable de la asociación de las subunidades en dímeros activos, de la localización nuclear del NF- κ B y su unión al ADN, y de la asociación con los inhibidores NF- κ B específicos. El RHD puede ser dividido en tres regiones estructurales: el NTD (N-terminal domain), el DD (dimerization domain) y el polipéptido NLS.

Las de la clase II cuentan con unas secuencias TAD (Terminal Binding Domain) que actúan como dominios de activación, y que serán las responsables de regular la transcripción de los genes diana.

Las proteínas de la clase I (p100 y p105) cuentan con una serie de secuencias repetidas en la porción C-terminal tipo anquirina, que impiden la entrada de la proteína en el núcleo. La actividad proteolítica dependiente de la ubiquitina consigue la escisión de estas secuencias C-terminales, lo que resulta en la producción de las formas maduras de proteína p50 y p52 respectivamente. El procesamiento proteolítico de la p105 es constitutivo, en tanto que el de la p100 se encuentra inducido por señales específicas relacionadas con la vía alternativa de activación del NF- κ B. Las formas maduras de las proteínas de la clase I contienen el dominio RHD pero carecen del dominio de modulación de la transcripción TAD.

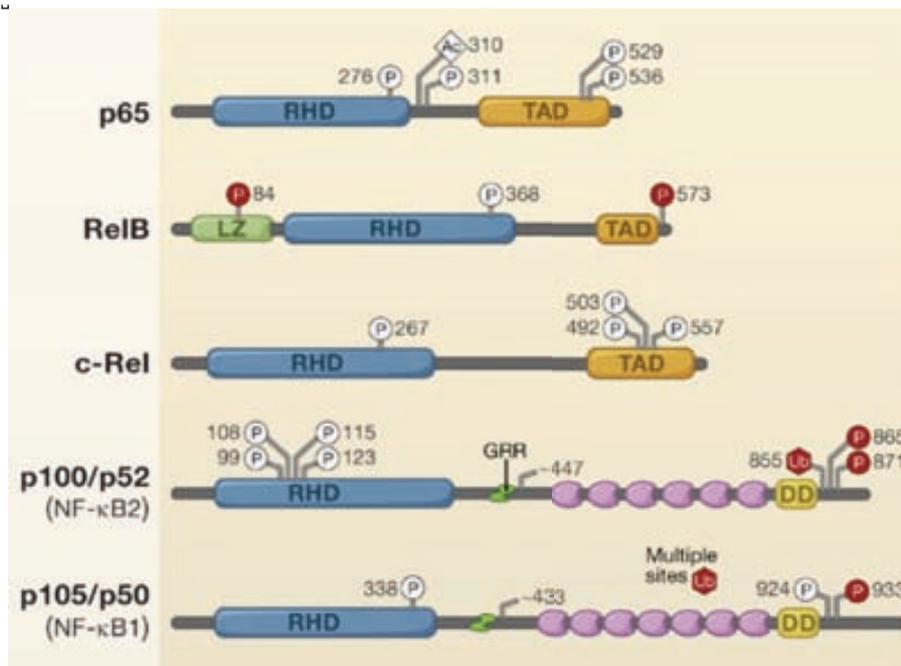


Figura 1. NF- κ B / familia Rel.

La familia NF- κ B está compuesta por cinco miembros: p50, p52, p65 (RelA), c-Rel y RelB, codificados por NFKB1, NFKB2, RELA, REL y RELB respectivamente. Los cinco miembros comparten un N-terminal Rel homology domain (RHD) responsable de la unión de las proteínas en homodímeros y heterodímeros, la localización nuclear del NF- κ B y la unión al ADN. RHD, Rel homology domain; TAD, dominio de modulación de la transcripción.

Clase	Proteína	Alias	Gen	Locus
I	NF- κ B1	p105→p50	NFKB1	4q24
	NF- κ B2	p100→p52	NFKB2	10q24
II	RelA	p65	RELA	11q13
	RelB		RELB	19q13.2-19q13
	c-Rel		REL	2p13-p12

Tabla 1. Proteínas NF- κ B.

Las cinco proteínas que forman la familia NF- κ B en los mamíferos pueden ser clasificadas en dos clases, en función de la necesidad de procesamiento proteolítico. Las de la clase I son sintetizadas en sus formas precursoras (p105 y p100), necesitando de la actividad proteolítica dependiente de ubiquitina para dar lugar a sus formas maduras (p50 y p52). Las de la clase II no necesitan este procesamiento, siendo sintetizadas en sus formas maduras.

Estas proteínas forman varios homo y heterodímeros. Estos dímeros quedan localizados en el citoplasma de las células no estimuladas unidos con unos inhibidores específicos conocidos como inhibidores de las proteínas κ B ($I\kappa$ B), que se unen a las proteínas NF- κ B a nivel de la porción RHD. Las proteínas $I\kappa$ B incluyen la $I\kappa$ B α , la $I\kappa$ B β y la $I\kappa$ B ϵ , que atrapan los dímeros de NF- κ B en el citoplasma, y el Bcl-3, que actúa como un coactivador transcripcional para los homodímeros de p50 y p52. Todas las $I\kappa$ B contienen 6-7 repeticiones de péptidos (anquirinas), que median su unión a la porción correspondiente de los dímeros de NF- κ B (Fig 2). $I\kappa$ B α , $I\kappa$ B β y $I\kappa$ B ϵ contienen un dominio de regulación en la porción amino-terminal que contiene dos serinas, cuya fosforilación comporta su degradación. $I\kappa$ B α , $I\kappa$ B β y $I\kappa$ B ϵ se unen de forma preferente a los dímeros del NF- κ B que contienen al menos una subunidad RelA (p65) o c-Rel.

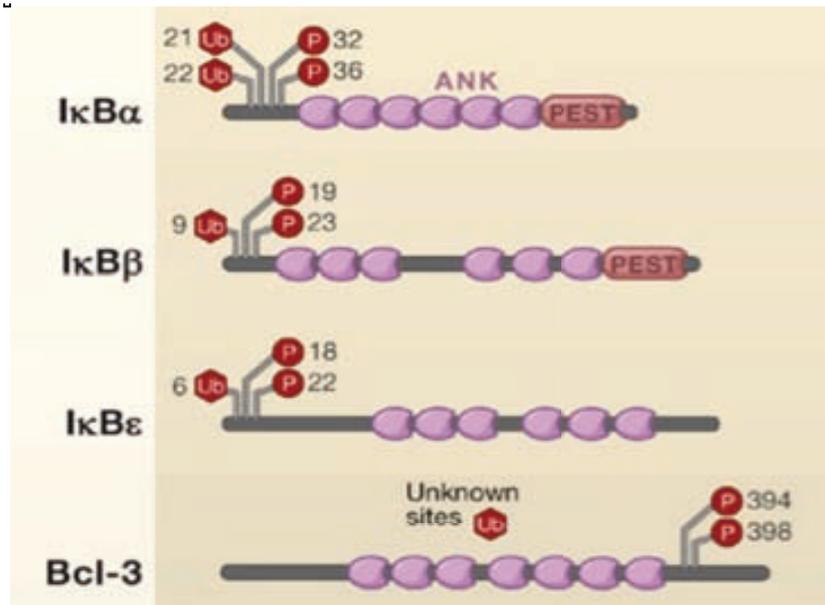


Figura 2. Inhibidores de las proteínas κ B (I κ B).

Todas las proteínas I κ B están caracterizadas por la presencia de seis a siete repeticiones de dominios anquirina, que son los responsables de la unión al dímero NF κ B correspondiente. ANK, anquirina.

Actuando inmediatamente por encima de la unión I κ B/NF- κ B se sitúa el complejo I κ B quinasa (IKK). El complejo IKK se encuentra formado por tres subunidades: dos catalíticas (IKK α e IKK β) y una unidad reguladora (IKK γ /NEMO) (Fig 3). El IKK activado conduce a la fosforilación de dos residuos de serina en la porción amino-terminal de las proteínas I κ B, permitiendo su ubiquitinación y degradación a partir de la actividad del proteosoma.

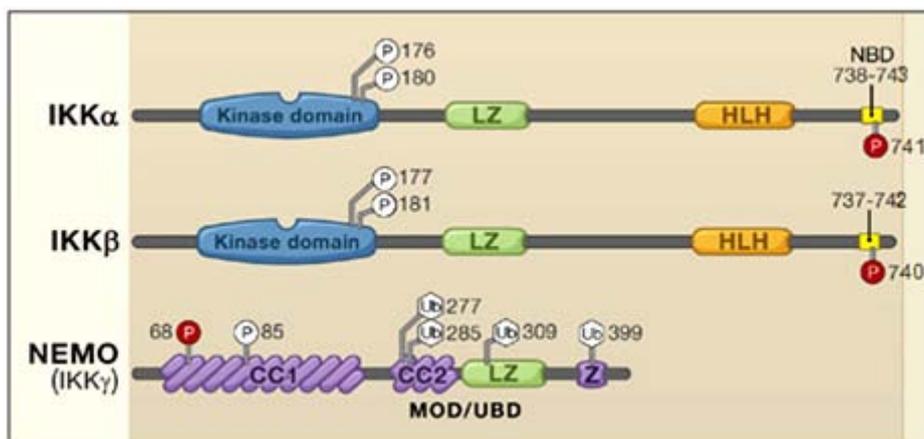


Figura 3. Proteínas del complejo I κ B quinasa (IKK).

El complejo está formado por tres proteínas: IKK α e IKK β (con actividad catalítica gracias al dominio cinasa que presentan) y IKK γ /NEMO que es la unidad reguladora de todo el complejo.

El proteosoma está compuesto por unos complejos proteicos de gran tamaño presentes a nivel citoplasmático y nuclear que tienen como principal función la degradación de las proteínas innecesarias o dañadas a partir de un proceso de proteólisis.

Una vez degradadas las proteínas I κ B, los dímeros de NF- κ B quedan liberados y pasan entonces al núcleo, donde activan toda una serie de programas de transcripción a través de los cuales ejerce su función biológica (Fig 4).

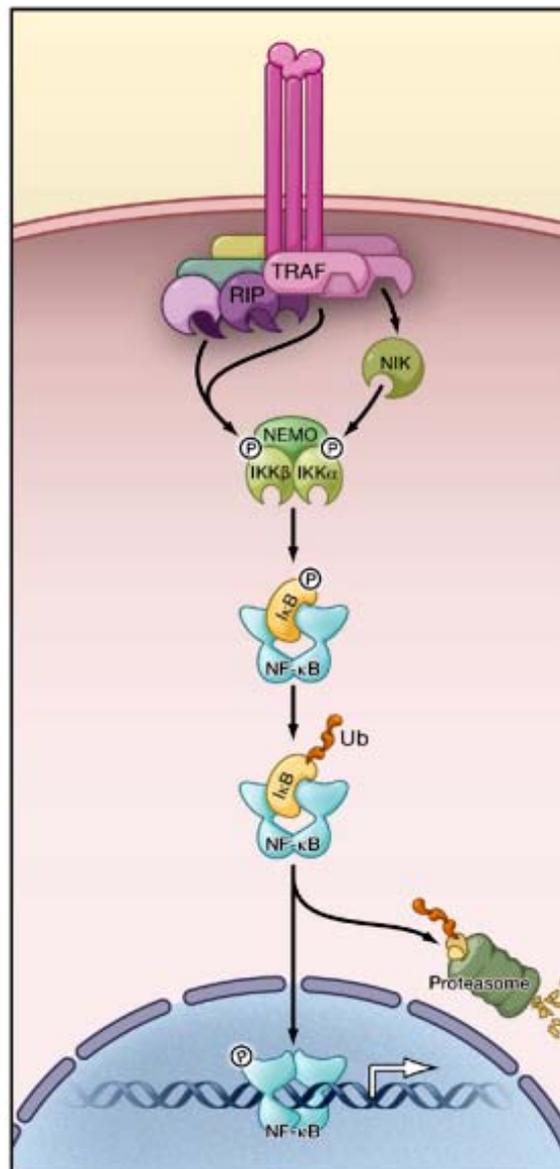


Figura 4. Regulación de la actividad transcripcional del NF- κ B.

En la célula inactiva, el NF- κ B se localiza en el citoplasma. El complejo IKK activado provoca la fosforilación de las I κ B, lo que lleva a su ubiquitinación y degradación, quedando los dímeros del NF- κ B libres. Se produce entonces su traslocación hacia el núcleo celular donde se unen al ADN y regulan la transcripción de gran cantidad de genes.

El NF- κ B es utilizado por las células eucariotas como un elemento regulador de los genes que controlan la proliferación celular y su supervivencia. La activación del NF- κ B activa la expresión de genes relacionados con la proliferación celular y que protegen a la célula en situaciones que de otra manera conducirían a la muerte celular por vía de la apoptosis.

Dada la gran capacidad biológica con que cuenta su dominio de activación TAD, la subunidad RelA (p65) es la responsable de la mayor parte de la actividad transcripcional correspondiente al NF- κ B. El dímero p50:c-Rel es menos abundante y parece contar con una cinética más lenta. Ambos dímeros, p65:p50 y c-Rel:p50 se regulan a partir de su unión con las I κ B. Por otro lado, el dímero p100:RelB aparece en el citoplasma de las células no activadas, y el procesamiento proteolítico de la p100 es el que permite la formación de la unidad activa p52:RelB.

2.- VÍAS DE ACTIVACIÓN DEL NF- κ B:

Existen dos mecanismos principales de activación del NF- κ B conocidas como la vía canónica o clásica y la vía alternativa en función de si la activación involucra la degradación del I κ B o el procesamiento de p100.

2.1. Vía canónica o clásica:

Esta vía se aplica a los dímeros compuestos por p65:p50 y c-REL:p50, que se encuentran cautivos en el citoplasma celular como consecuencia de su unión a los I κ B. Existe una amplia cantidad de agonistas que participan en la respuesta inflamatoria, incluyendo el factor de necrosis tumoral α (TNF α), lipopolisacáridos, la interleuquina 1 (IL-1), ligandos para los receptores toll-like (TLRs) y situaciones que provocan estrés celular, que conducen a la activación de TAK1, que a su vez activa el complejo IKK. El complejo IKK activado fosforila las moléculas de I κ B a nivel de las serinas presentes en la porción N-terminal, permitiendo su ubiquitinación y degradación por parte del proteosoma

26S, liberando los dímeros del NF- κ B y permitiendo su traslocación hacia el núcleo. La vía clásica incluye las subunidades IKK γ /NEMO, IKK α y IKK β , y depende principalmente de la actividad de la subunidad IKK β sobre el heterodímero p65:p50.

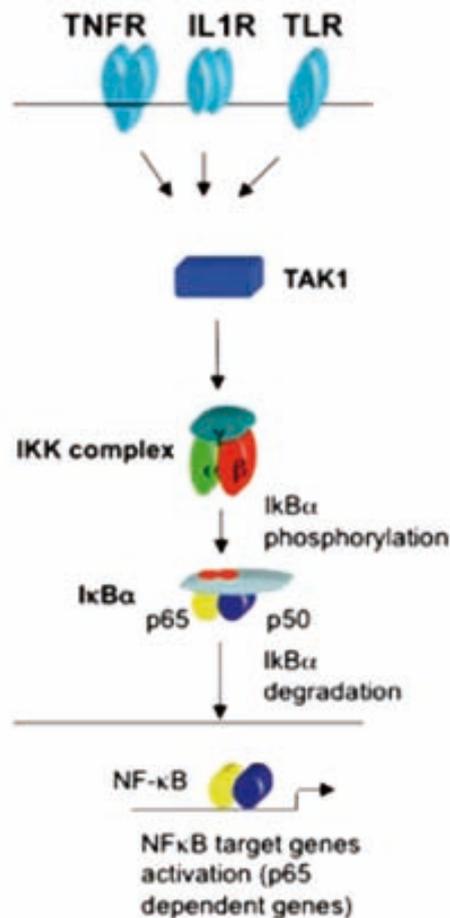


Figura 5. Vía clásica o canónica de activación del NF- κ B.

Ante diferentes estímulos, como el TNF, las interleuquinas, los lipopolisacáridos,..., se activa al TAK1, que activa a su vez al complejo IKK. Éste fosforila a las I κ B, provocando su ubiquitinización y degradación en el proteosoma. El NF- κ B queda libre, traslocándose hacia el núcleo. Los dímeros compuestos por p65:p50 y c-Rel:p50 son activados por esta vía.

En diferentes líneas de carcinoma escamoso de cabeza y cuello, Tamatani y cols² demostraron que el incremento de la actividad de NF- κ B respecto a las células epiteliales normales podía ser atribuido a la rápida fosforilación y degradación de la I κ B α como consecuencia de un incremento de la actividad IKK α .

2.2. Vía alternativa:

La vía alternativa depende de la activación de un subgrupo de la superfamilia de receptores del TNF como el CD40 o el receptor de la linfotoxina β (LT β R), que actúa estabilizando la quinasa inductora del NF- κ B (NIK). La NIK activa la IKK α , que a su vez fosforila el precursor p100 e induce la degradación mediada por el proteosoma del segmento C-terminal, y la formación del dímero activo p52:RelB que pasará al núcleo donde ejercerá su función transcripcional, actuando sobre un grupo de genes diferentes a los regulados por la otra vía. La actividad de esta vía es importante en el desarrollo de los órganos linfoides y la inmunidad mediada por las células B.

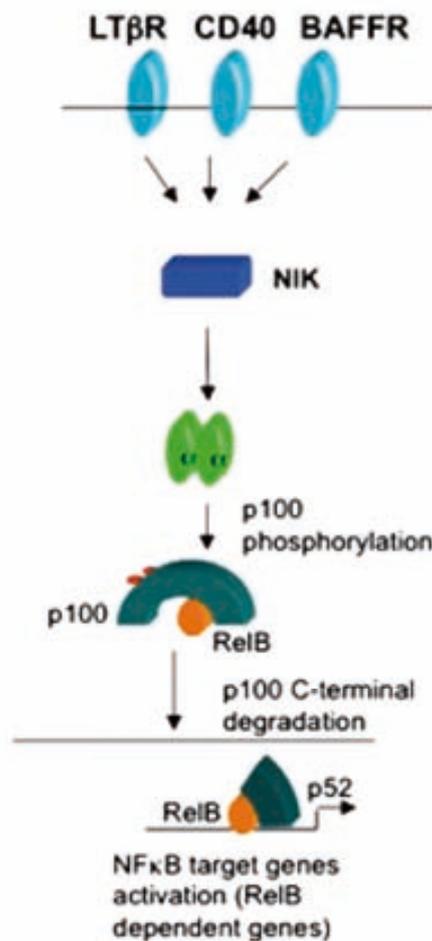


Figura 6. Vía alternativa de activación del NF- κ B.

Una superfamilia de los receptores del TNF son los responsables de la activación de NIK, que condiciona la activación del IKK, específicamente IKK α . Así se fosforila el precursor p100 y se transforma en su forma madura p52, permitiendo que el dímero formado por p52-RelB se trasloque al núcleo para ejercer su función.

2.3. Vías de activación atípica.

A los mecanismos de activación descritos, se añaden dos vías adicionales. Una aparece como resultado de la hipoxia y aparece como consecuencia de la fosforilación de la $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ por parte de miembros de la familia Src.

En líneas celulares de hepatoma, neuroblastoma y carcinoma de colon, Lluís y cols³ evidenciaron como a partir de las 24h de hipoxia se elevaban los niveles de mROS (mitochondrial reactive oxygen species), y de forma paralela aumentaban los niveles nucleares del NF- κ B (p65/p50) así como los del HIF-1 α (hypoxia inducible factor-1 α) (Fig 7). La activación del NF- κ B se producía a partir de la fosforilación en los residuos tirosina del $\text{I}\kappa\text{B}$ a través de a estimulación del c-Src, sin que se produjese una degradación del $\text{I}\kappa\text{B}$.

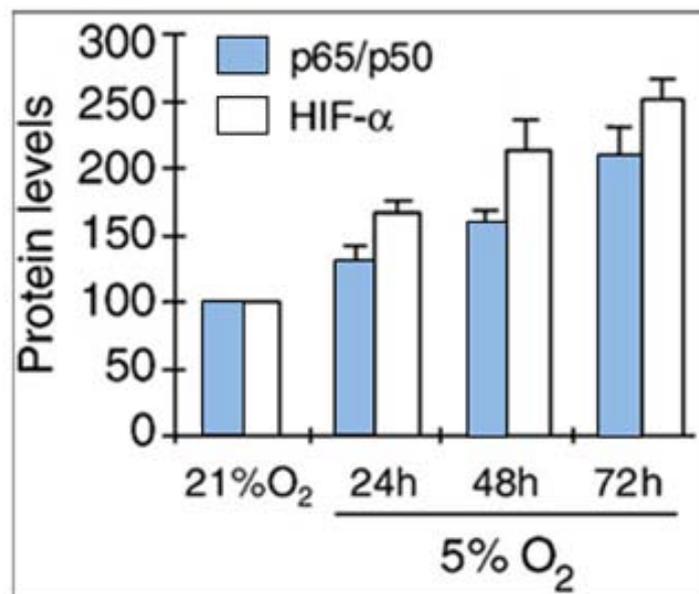


Figura 7. Niveles de p65/p50 y HIF NF- κ B (p65/p50) y HIF-1 α en situación de normoxia e hipoxia.

En una línea celular de hepatoma se comprobó que los valores correspondientes a los heterodímeros p65/p50 y HIF1- α a nivel nuclear en una situación de hipoxia se elevaban con respecto a la situación de normoxia (tomado de Lluís y cols³).

Por otra parte, la infra-regulación del NF- κ B condujo a una disminución de la resistencia celular a la hipoxia, produciéndose un incremento significativo en la muerte celular inducida por la hipoxia³.

La segunda vía atípica de activación se ha observado en células expuestas a radiación ultravioleta de longitud de onda corta (254 nm), que induce la

degradación de la I κ B α vía el proteosoma. De todas formas, en ambas vías la activación del NF- κ B es más lenta y menos intensa que la correspondiente a las vías de activación convencionales.

2.4. Modificación de la actividad post-transcripcional.

Además de estos mecanismos de regulación, la actividad del complejo NF- κ B está sujeto a modificaciones post-transcripcionales asociadas básicamente a la fosforilación en lugares específicos de RelA que siguen unos patrones característicos dependientes del tipo celular y del estímulo. Estas fosforilaciones específicas comportan efectos muy importantes en la actividad de la proteína. Cada vez es más aparente que la fosforilación de RelA a diferentes niveles actúa como un elemento integrador de diferentes señales, pudiendo controlar la cinética y la capacidad de transactivación correspondiente a RelA.

Uno de los genes diana regulados por el NF- κ B activado es el correspondiente al I κ B α . Se crea un circuito por el cual la actividad del NF- κ B promueve la transcripción del gen I κ B α y un incremento de su actividad inhibidora, con lo que se consigue un cese rápido de la actividad NF- κ B una vez cesa la señal que condujo a su activación.

3.- PAPEL DEL NF- κ B EN LA CARCINOGENESIS.

El NF- κ B fue identificado originalmente como un regulador de los genes responsables de las cadenas ligeras κ de las inmunoglobulinas. Posteriormente se ha asociado con la carcinogénesis a partir de la descripción de la proteína v-Rel del retrovirus Rev-T, que en modelos de células tumorales de aves induce la proliferación y resistencia a la apoptosis⁴. Desde entonces, se ha comprobado como los factores de transcripción de la familia Rel regulan la expresión de más de 150 genes.

Las situaciones de estrés o daño celular comportan una respuesta por parte de las células normales hacia un estado anti-apoptótico mediado por la activación del NF- κ B. La similitud de los perfiles de expresión genética existentes entre esta respuesta de protección celular y la presente en las células tumorales de los carcinomas escamosos condujo a los investigadores a evaluar el posible papel del NF- κ B en la carcinogénesis.

El proceso de carcinogénesis requiere seis alteraciones esenciales en la fisiología celular: autosuficiencia en las señales de crecimiento; insensibilidad a los mecanismos que inducen la inhibición en la proliferación celular; evasión de la apoptosis; inmortalización; inducción de la angiogénesis; y capacidad de invasión tisular y de metastatización⁵.

EL NF- κ B es capaz de inducir varias de estas alteraciones a nivel celular. El NF- κ B contribuye a la inducción de cinco clases de genes que se han implicado en la carcinogénesis de los carcinomas de cabeza y cuello (revisado por Allen y cols⁶). La siguiente tabla muestra los productos de los genes diana regulados por la actividad del NF- κ B.

Función en carcinomas de cabeza y cuello	GEN
Progresión del ciclo celular	Ciclina D1
Regulación de la apoptosis	Bcl-XL A1/Bfl-1 IAP-1/IAP-2 TRAF1, TRAF2 mdm2
Inflamación-angiogénesis	TNF α IL-1,6,8 GRO α VEGF
Invasión tisular-metástasis	MMPs, TIMPs heparinasa uPA
Resistencia al tratamiento	P-glicoproteína GADD45 V-GCS

Tabla 2. Productos de los genes diana regulados por la actividad del NF- κ B.

La exposición a carcinógenos y la inflamación crónica son dos situaciones que subyacen en la promoción de los carcinomas de cabeza y cuello. Uno de los mecanismos moleculares y celulares que conectaría la inflamación crónica con la carcinogénesis sería la vía del NF- κ B.

Loercher y cols⁷ examinaron el patrón de expresión genética diferencial entre queratinocitos normales, transformados y metastásicos mediante técnicas de microarrays de ADN, explorando el papel del NF- κ B en los cambios genéticos y fenotípicos adquiridos durante la progresión del tumor. El NF- κ B modulaba la expresión de más del 60% de los 308 genes que contaron con una expresión diferencial entre los queratinocitos normales y los metastásicos, relacionándose directa o indirectamente con la modulación de vías relacionadas con la proliferación, apoptosis, adhesión y angiogénesis. Se determinó la presencia de elementos de unión al NF- κ B en la región promotora del 63% de los genes sobre expresados y del 33% de los infra expresados. Por su parte, la inactivación del NF- κ B comportó una inhibición de las características fenotípicas de malignidad, incluyendo la proliferación, supervivencia celular, migración y angiogénesis.

En un estudio inmunohistoquímico desarrollado por Kourelis y cols⁸ se pudo apreciar como la inmunorreactividad frente al NF- κ B (p65) se incrementaba de forma significativa a lo largo del proceso de carcinogénesis para el carcinoma de la laringe. La siguiente tabla (Tabla 3) muestra los valores de positividad citoplasmática (C) y nuclear (N) correspondientes a muestras de mucosa normal (n=119), hiperplásica (n=83), displásica (n=75), y de carcinoma escamoso con diferentes grados de diferenciación (n=97).

	NF- κ B							
	0		+		++		+++	
	C	N	C	N	C	N	C	N
Normal	19 (16.0)	111 (93.3)	65 (54.6)	2 (1.7)	33 (27.7)	4 (3.4)	2 (1.7)	2 (1.7)
Hyperplasia	4 (4.8)	57 (68.7)	27 (32.5)	4 (4.8)	39 (47.0)	10 (12.0)	13 (15.7)	12 (14.5)
Dysplasia	4 (5.3)	54 (72.0)	28 (37.3)	6 (8.0)	29 (38.7)	8 (10.7)	14 (18.7)	7 (9.3)
SCC grade I		11 (61.1)	4 (22.2)		10 (55.6)	5 (27.8)	4 (22.2)	2 (11.1)
SCC grade II	1 (2.3)	28 (65.1)	5 (11.6)	3 (7.0)	26 (60.5)	2 (4.7)	11 (25.6)	10 (23.3)
SCC grade III	1 (2.8)	26 (72.2)	8 (22.2)		11 (30.6)	2 (5.6)	16 (44.4)	8 (22.2)

Tabla 3. Valores del NF- κ B en mucosa normal, hiperplásica, displásica y carcinoma escamoso (tomado de Kourelis y cols⁸).

Existió una tendencia significativa hacia la positividad tanto citoplasmática como nuclear para el NF- κ B en función de la progresión histológica (coeficiente de correlación de Spearman $r_s= 0.419$, $P<0.001$ y $r_s=0.241$, $P<0.001$ respectivamente), alcanzando una positividad máxima en el caso del tumor.

3.1. Mecanismos de activación del NF- κ B en los carcinomas de cabeza y cuello.

La activación constitutiva del NF- κ B en los carcinomas escamosos de cabeza y cuello es un hecho bien establecido². Se han descrito una diversidad de estímulos que inducirían esta activación, incluyendo factores de crecimiento, citoquinas, y situaciones que provocan estrés genotóxico, incluida la radioterapia.

Aunque raro en células normales, se ha descrito que diversos modelos tumorales, incluyendo los carcinomas de cabeza y cuello, cuentan con una activación constitutiva del NF- κ B, jugando un papel fundamental en la proliferación de las células tumorales^{9,10}. Adicionalmente, los carcinomas escamosos de cabeza y cuello y las células del microambiente tumoral producen una serie de citoquinas con capacidad de modular la actividad del NF- κ B¹¹. Entre las sustancias que actúan sobre el NF- κ B destaca el factor de necrosis tumoral- α (tumor necrosis factor- α , TNF α), que es quizá el activador más potente, actuando a través de la vía clásica de activación, provocando la fosforilación de IKK que lleva a la degradación mediada por ubiquitinación del I κ B α ¹².

Jackson-Bernitsas y cols¹³ estudiaron el mecanismo a través del cual se producía la activación constitutiva del NF- κ B en las células de los carcinomas escamosos de cabeza y cuello. De acuerdo con sus resultados, el NF- κ B se encontraba transcripcionalmente activo en la totalidad de las líneas celulares de carcinoma de cabeza y cuello evaluadas. La activación constitutiva del NF- κ B dependió de la actividad autocrina de los productos derivados de los genes regulados por el NF- κ B a través de la vía del TNF α , quedando esta vía bloqueada con la administración de anticuerpos anti-TNF¹¹.

El transforming growth factor- α (TGF α) es una proteína que actúa con gran afinidad sobre el epithelial growth factor receptor (EGFR) y que aparece sobreexpresado en un 90% de los carcinomas escamosos de cabeza y cuello¹⁴. La estimulación producida por EGFR comporta una activación del NF- κ B a través de la vía del Akt, una protein-quinasa que juega un papel fundamental en múltiples procesos celulares como el metabolismo de la glucosa, la proliferación celular, la apoptosis, la transcripción y la migración celular. Se ha comprobado como la inhibición farmacológica del EGFR conduce a una disminución en la actividad del NF- κ B.

En un estudio experimental desarrollado con líneas celulares de carcinoma escamoso de cabeza y cuello, Bancroft y cols¹⁵ demostraron que el tratamiento con Cetuximab® (C225, anticuerpo monoclonal dirigido contra el dominio externo del EGFR, inhibiendo de manera competitiva la unión con ligandos endógenos) disminuía de forma significativa la actividad del NF- κ B respecto a un anticuerpo isotópico (isotipo) (Fig 8).

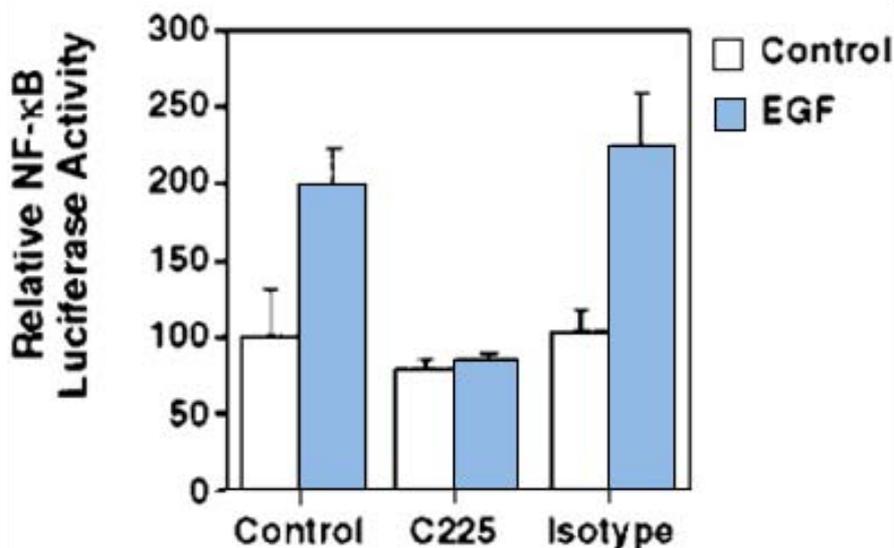


Figura 8. Efecto del Cetuximab® (C225) sobre la actividad del NF- κ B conseguida a partir de la inhibición del EGFR.

Exponiendo a una línea celular de carcinoma escamoso de cabeza y cuello (UM-SCC-9) a 2 μ /ml de C225 y a un anticuerpo isotópico control, se comprobó que el C225 inhibe fuertemente al NF- κ B inducido por EGFR con respecto al isotipo (tomado de Bancroft y cols¹⁵).

Una forma alternativa de activación de la vía Akt independiente del EGFR en los carcinomas de cabeza y cuello resulta de la estimulación del receptor de la quimioquina 7 (CCR7)¹⁶.

Otra quinasa que se ha implicado en la activación del NF- κ B en los carcinomas de cabeza y cuello es la casein quinasa II (CK2). Los niveles de expresión elevados de la CK2 se correlacionan con la agresividad tumoral. Se ha demostrado que la CK2 induce la activación del NF- κ B a través de la activación de IKK β ¹⁷.

El transforming growth factor β (TGF β) es un elemento esencial en la regulación de la homeostasis de los epitelios. Ejerce su actividad a través de un receptor que cuenta con tres subunidades: T β RI, T β RII y T β RIII. El TGF β inhibe de forma potente la proliferación epitelial a partir de la sobrerregulación de los genes ciclin-quinasa dependientes p15^{INK4b}, p21^{Cip1} y p57^{Kip2}, y la represión de los genes c-MYC y ID1. Los carcinomas escamosos de cabeza y cuello presentan con frecuencia una expresión disminuida del receptor T β RII, lo que conlleva la presencia de fenotipos menos diferenciados y de mayor agresividad. Cohen y cols¹⁸ encontraron una asociación entre la reducción en la expresión de los receptores del TGF β y un incremento de la actividad de la vía del NF- κ B. Por otra parte, la restitución de la actividad de la vía del TGF β en líneas celulares de carcinoma escamoso condujo a una inhibición del NF- κ B, tanto de la actividad constitutiva como de la conseguida a partir de la estimulación con el TNF α .

El humo del tabaco contiene sustancias carcinógenas que son responsables en gran medida de la aparición de carcinomas a nivel de las vías aerodigestivas. Entre los mecanismos de inducción carcinogénica derivados del uso del tabaco se encuentra la activación del NF- κ B. Anto y cols¹⁹ analizaron el efecto del condensado de humo de cigarrillo sobre la actividad del eje del NF- κ B en varios tipos celulares, incluidas líneas de carcinoma de cabeza y cuello. De acuerdo con sus resultados, el humo de tabaco provocaba la activación del NF- κ B siguiendo una cinética similar a la que corresponde a la activación por parte del TNF α . La activación del NF- κ B era consecuencia del incremento en la actividad de la IKK, y se correspondía con la fosforilación y degradación del I κ B α . Por su parte, Rohrer y cols²⁰ describieron unos hallazgos similares en un modelo de

lesión premaligna consistente en células de cavidad oral transformadas por acción del virus papiloma.

El proceso inflamatorio crónico comporta un incremento local de especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species, ROS) y especies reactivas de nitrógeno (reactive nitrogen species, RNS), que son productos generados de forma fisiológica durante los procesos de metabolismo celular. Entre estas moléculas se incluyen los peróxidos y superóxidos, y el óxido nítrico, inestables desde un punto de vista químico y con un papel importante en la señalización celular. Bradburn y cols²¹ estudiaron los mecanismos a través de los cuales la inflamación crónica puede inducir la aparición de tumores a nivel de las mucosas de cabeza y cuello, encontrando que la adición de especies reactivas a cultivos celulares de carcinomas de cabeza y cuello inducían la activación del NF- κ B a partir de su disociación del I κ B y la consecuente inducción de la transcripción de genes regulados por NF- κ B.

Por otra parte, la radioterapia cuenta con la capacidad de inducir la actividad del NF- κ B en las células tumorales. Tamatani y cols²² expusieron una línea celular de carcinoma de cavidad oral a radioterapia, pudiendo comprobar como se aumentaba la actividad NF- κ B en relación a las células no expuestas, con un incremento en la translocación nuclear de la proteína p65.

3.2. Papel del NF- κ B en la regulación del ciclo celular.

La ciclina D1 es una proteína de la familia de las ciclinas que está implicada en la regulación del ciclo celular. Su síntesis se inicia durante la fase G1 del ciclo, y regula la progresión a través del checkpoint G1/S del ciclo celular. Utilizando un I κ B mutado que no puede ser fosforilado o degradado por el proteosoma, Guttridge y cols²³ y Hinz y cols²⁴ mostraron como la supresión de la actividad del eje NF- κ B provocaba un enlentecimiento del ciclo celular, que podía recuperarse mediante la transfección de plásmidos con actividad ciclina D1.

En un estudio desarrollado por Ruan y cols²⁵ en que se evaluaba *in vitro* el efecto correspondiente a un inhibidor del NF- κ B (DHMEQ), pudo comprobarse como el bloqueo de su actividad comportaba una disminución de la actividad

del promotor de la ciclina D1 (Fig 9), siendo esta disminución dosis dependiente.

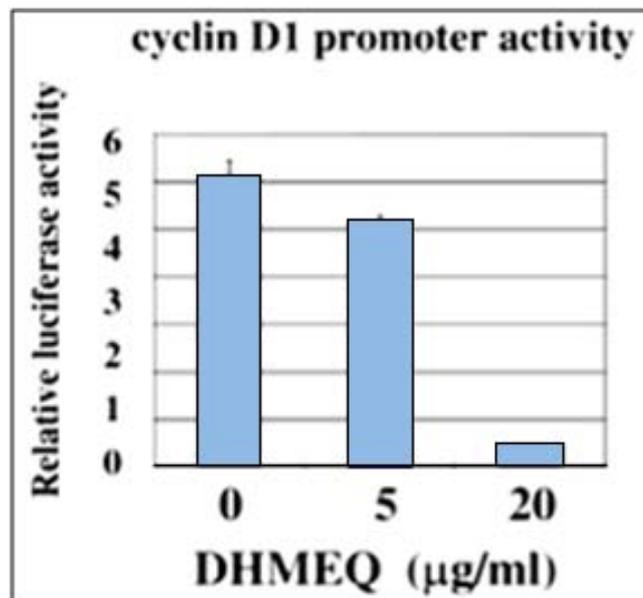


Figura 9. Efectos del DHMEQ en la actividad del promotor de la ciclina D1.

La exposición de las células KB a una dosis de 5 a 20 µg/ml de DHMEQ conllevó una disminución dosis dependiente de la actividad del promotor de la ciclina D1 (tomado de Ruan y cols²⁵).

Por otra parte, en pacientes con carcinomas de cabeza y cuello en los cuales se bloqueó farmacológicamente la vía del NF-κB, pudo comprobarse una disminución en la expresión del gen CCND1, responsable de la codificación de la ciclina D1²⁶.

3.3. Regulación de la apoptosis.

El NF-κB modula la expresión de proteínas implicadas en el mecanismo de la apoptosis (revisado en Karin & Lin²⁷). El bloqueo de la vía del NF-κB a partir de la transfección de formas mutadas de IκBα no sensibles a la acción proteolítica del proteosoma condiciona una recuperación de la apoptosis dependiente de las caspasas inducida por el TNFα en líneas celulares de carcinoma de cabeza y cuello²⁸. Además, el NF-κB cuenta con la capacidad de inhibir directamente la apoptosis a partir de la promoción de la expresión de genes homólogos al Bcl-2 (Bcl-X_L y A1/Bfl-1). En un estudio *in vitro* desarrollado con líneas celulares de

carcinoma escamoso de cabeza y cuello, Duffey y cols²⁹ encontraron que la supresión del NF- κ B redujo la viabilidad celular en un 70%-90% (Fig 10).

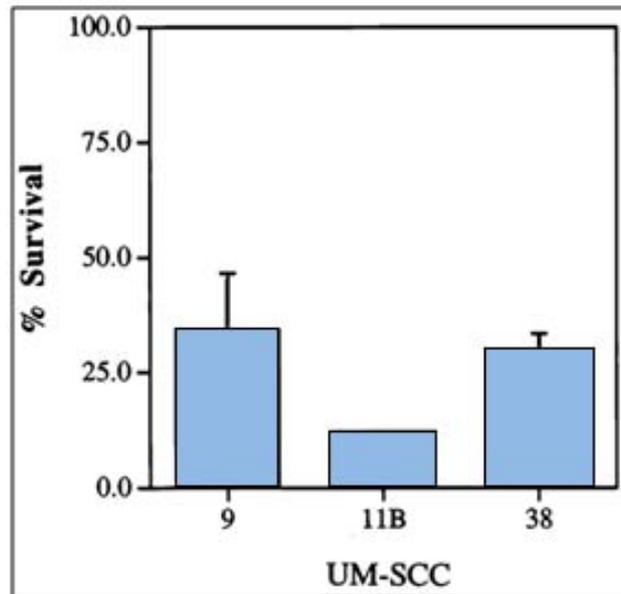


Figura 10. Supervivencia de tres líneas celulares (UM-SCC-9, -11B y -38).

Partiendo de la base de que los factores de transcripción del NF- κ B/Rel regulan genes involucrados en la supervivencia celular, se estudió cómo influye la anulación de la actividad del NF- κ B mediante la transfección de un I κ B α resistente a la degradación por el proteosoma. Se comprobó que pasadas 72 horas de la transfección, la viabilidad celular se redujo en las tres líneas celulares en un 70-90% (tomado de Duffey y cols²⁹).

Ruan y cols²⁵ realizaron un estudio en que se evaluó un inhibidor específico (DHMEQ). Comprobaron la existencia de un incremento en la tasa de apoptosis proporcional al nivel de inhibición del NF- κ B en dos líneas celulares de carcinoma escamoso (células YCU-H891 y KB) (Fig 11).

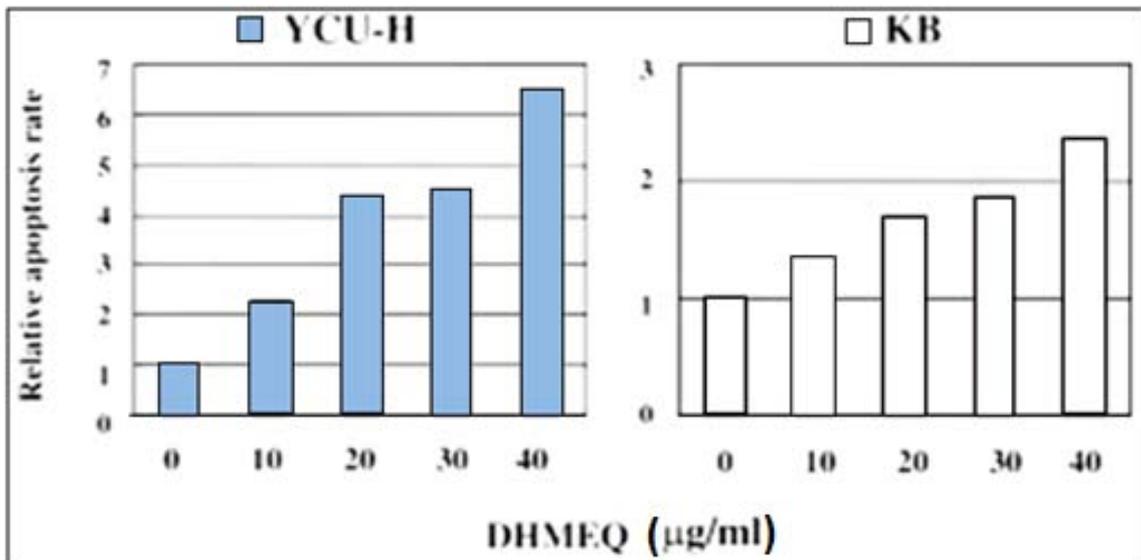


Figura 11. Efectos del DHMEQ en la inducción de apoptosis en las células YCU-H891 y KB.

El tratamiento de ambas líneas celulares durante 48 horas con 10-40 µg/ml de DHMEQ supuso un incremento dosis dependiente de los niveles de nucleosomas citoplasmáticos, lo que es un indicativo de apoptosis celular (tomado de Ruan y cols²⁵).

En el mismo estudio, Ruan y cols²⁵ llevaron a cabo una evaluación de los efectos del DHMEQ sobre los niveles de expresión del Bcl-XL, y no se evidenciaron diferencias significativas en función del grado de inhibición del NF-κB. Este resultado sugiere que la apoptosis inducida por la inhibición del NF-κB no depende de la proteína Bcl-XL.

En un estudio desarrollado por Loercher y cols³⁰ en carcinomas escamoso de cabeza y cuello se encontró que NF-κB regulaba el nivel de expresión de la proteína inhibidora de apoptosis-1 (IAP-1) pero no los niveles de Bcl-XL.

Además, el NF-κB inhibe la apoptosis a partir de la inducción de la IL-6, que a su vez actúa activando la transcripción del efector STAT3, que ejerce un papel regulador de la expresión del sistema Bcl en los carcinomas de cabeza y cuello³¹. STAT3 actúa como mediador en la expresión de diversos genes en respuesta a determinados estímulos celulares y juega así un papel importante en multitud de procesos celulares como la proliferación celular y la apoptosis.

Otra vía por la cual el NF-κB cuenta con la capacidad de regular el mecanismo de apoptosis es a través de la interacción con p53. El NF-κB puede inhibir directamente la actividad de la p53 a partir de la sobre regulación de la proteína mdm2³². La mdm2 es un importante regulador negativo de la p53, actuando como una ubiquitina ligasa que se une a la p53 y la marca de manera que pasa

a ser degradada por el proteosoma, actuando además como un represor de la transcripción del gen.

Las mutaciones en p53 son un hecho muy habitual en los carcinomas de cabeza y cuello, lo que conduce a la sobreproducción y acúmulo de la proteína mutada a nivel celular. En líneas celulares de carcinoma, Weisz y cols³³ encontraron una relación entre la proteína p53 mutada y la actividad transcripcional del NF- κ B en respuesta al TNF α . Del mismo modo, al estudiar mediante inmunohistoquímica pacientes con carcinomas de cabeza y cuello, estos autores encontraron una correlación entre la p53 mutada y la activación constitutiva del NF- κ B (Fig 12).

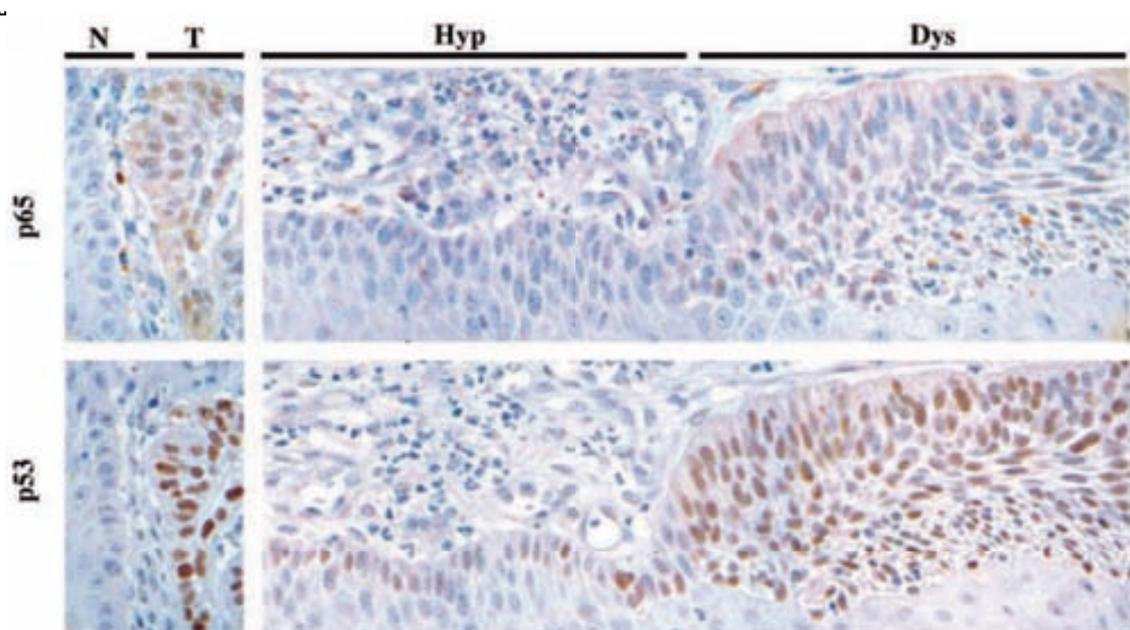


Figura 12. Resultados inmunohistoquímicos en la tinción del NF- κ B p65 y del p53.

Se analizó la expresión del NF- κ B p65 y del p53 en carcinomas de cabeza y cuello. En todos los tumores con mutación del p53, el incremento de la tinción para p65 nuclear estaba presente en las zonas con una intensa tinción para p53. *N*, tejido normal; *T*, tejido tumoral; *Hyp*, hiperplasia; *Dys*, displasia (tomado de Weisz y cols³³).

En un estudio reciente, Lee y cols³⁴ han evaluado de forma conjunta diferentes vías implicadas en la regulación de la apoptosis en los carcinomas escamosos de cabeza y cuello. La hipótesis de los autores es que existen alteraciones en la red de señales que implican al NF- κ B, STAT3 y p53, que contarían con la capacidad de modular la expresión del sistema BAX (pro-apoptótico)/Bcl-XL (anti-apoptótico). En un estudio desarrollado en líneas celulares, los autores encontraron que el NF- κ B y el STAT3 eran coactivados de forma conjunta, y

que ambos contaban con la capacidad de modular el sistema BAX/Bcl-XL. La disminución de la actividad de p53 comportaba un incremento en la activación de NF- κ B y STAT3, y en consecuencia de la resistencia a la apoptosis inducida por Bcl-XL. La restitución de la actividad p53 comportó la supresión de la actividad nuclear de NF- κ B y STAT3, y del cociente BAX/Bcl-XL, induciendo la apoptosis. De acuerdo con los resultados, los autores propusieron un modelo en el cual la activación de NF- κ B y STAT3 junto con la disfunción de p53 alterarían el equilibrio del sistema BAX-Bcl-XL favoreciendo la supervivencia de las células tumorales.

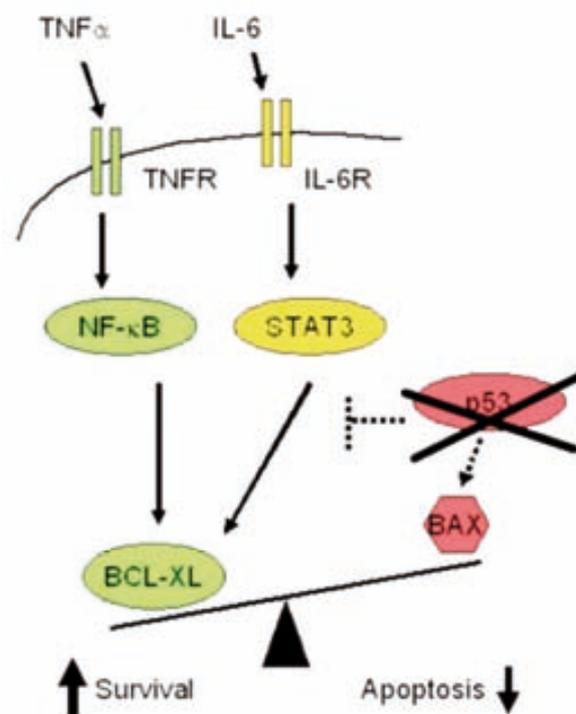


Figura 13. Activación del NF- κ B y STAT3, junto con disfunción del p53. Una señal conjunta del NF- κ B, STAT3 y p53 modulan el sistema BAX/BCL-XL y por tanto la supervivencia celular. En el carcinoma escamoso de cabeza y cuello, la activación conjunta del NF- κ B y STAT3 junto con la disfunción del p53, aumenta la expresión relativa del BCL-XL y por tanto la supervivencia celular (tomado de Lee y cols³⁴).

3.4. Inflamación: metabolismo de las prostaglandinas.

Otra de las vías que conectan la actividad del NF- κ B con la respuesta inflamatoria es a través de la síntesis de las prostaglandinas (PG). Una de las dianas finales de la actividad NF- κ B es la ciclooxigenasa-2 (COX-2), uno de los

enzimas reguladores de la síntesis de PG. La sobreexpresión de COX-2 promueve la carcinogénesis actuando a diferentes niveles, y es un hecho habitual en los carcinomas escamosos de cabeza y cuello³⁵.

La biosíntesis de la prostaglandina E₂ (PGE₂) implica la oxidación e isomerización del ácido araquidónico (AA) a partir de tres reacciones enzimáticas. El paso metabólico inicial corresponde a la liberación del AA desde la membrana celular a partir de la acción de la fosfolipasa A₂. El AA es metabolizado entonces a prostaglandina G₂ (PGG₂) y a prostaglandina H₂ (PGH₂) a partir de las actividades ciclooxigenasa y peroxidasa del enzima ciclooxigenasa (COX). Hasta la fecha se han descrito tres isoformas del enzima COX, la COX-1 y COX-3 codificadas por el gen COX-1, y la COX-2 codificada por el gen COX-2. La COX-1 es un enzima constitutivo presente en la mayoría de tejidos, y regula la producción de los prostanoïdes necesarios para el mantenimiento de la homeostasis. En contraste, la COX-2 es un enzima inducible, que no se expresa en condiciones normales, en tanto que lo hace en respuesta a la presencia de hormonas, factores de crecimiento, citoquinas pro-inflamatorias, endotoxinas bacterianas o la acción de determinados oncogenes. La PGH₂ es el precursor común de los prostanoïdes bioactivos (PGs y tromboxanos), cuya síntesis depende de sintetasas específicas, que cuentan con diferentes estructuras y una distribución tisular y celular específica. Los enzimas que catalizan la conversión de PGH₂ a PGE₂ son conocidos como PGE-sintetasas (PGES). Hasta el momento se han identificado tres proteínas con actividad PGES: microsomal-PGES (mPGES)-1, y mPGES-2; y citosólica-PGES (cPGES). Por último, la actividad de la PGE₂ se ejerce a través de una familia de receptores celulares designados como EP1, EP2, EP3 y EP4, que se acoplan a diferentes vías de transducción de señal intracelular (Fig 14).

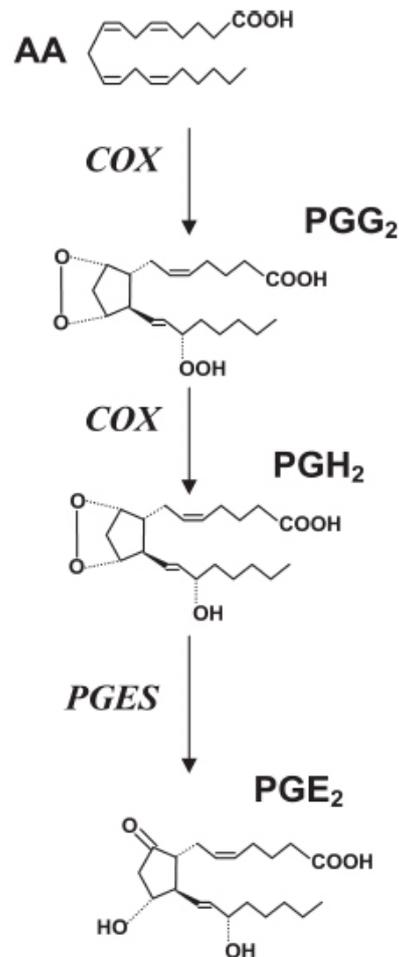


Figura 14. Vía metabólica de la PGE₂.

Se han detectado unos niveles elevados de PG en carcinomas de diferentes localizaciones, incluyendo los carcinomas escamosos de cabeza y cuello³⁶.

Existen evidencias de que el incremento en los niveles de PGE₂ en los carcinomas de cabeza y cuello está asociado a la sobre-expresión de la COX-2³⁷, y de que esta sobre-expresión es un acontecimiento precoz en el proceso de la carcinogénesis, apareciendo en las lesiones pre-neoplásicas^{38,39}.

La PGE₂ está implicada en los fenómenos de carcinogénesis y desarrollo del tumor estimulando su crecimiento a partir de la inducción de diferentes factores de crecimiento⁴⁰, inhibiendo la apoptosis⁴¹, promoviendo la angiogénesis⁴², alterando los mecanismos inmunitarios con capacidad de contrarrestar al tumor⁴³, o modulando la capacidad invasiva de las células tumorales y su potencialidad metastásica a partir de la modulación de la actividad de las metaloproteinasas (MMP)⁴⁴.

En un estudio de la actividad a nivel transcripcional de los genes implicados en el metabolismo de la PGE₂ en carcinomas de cabeza y cuello, Camacho y cols⁴⁵ demostraron un incremento significativo en la expresión de COX-2 y cPGES, en tanto que no existieron diferencias significativas en la expresión de COX-1 y mPGES-1 y -2 entre el tejido tumoral y el correspondiente a mucosa sana (Fig 15).

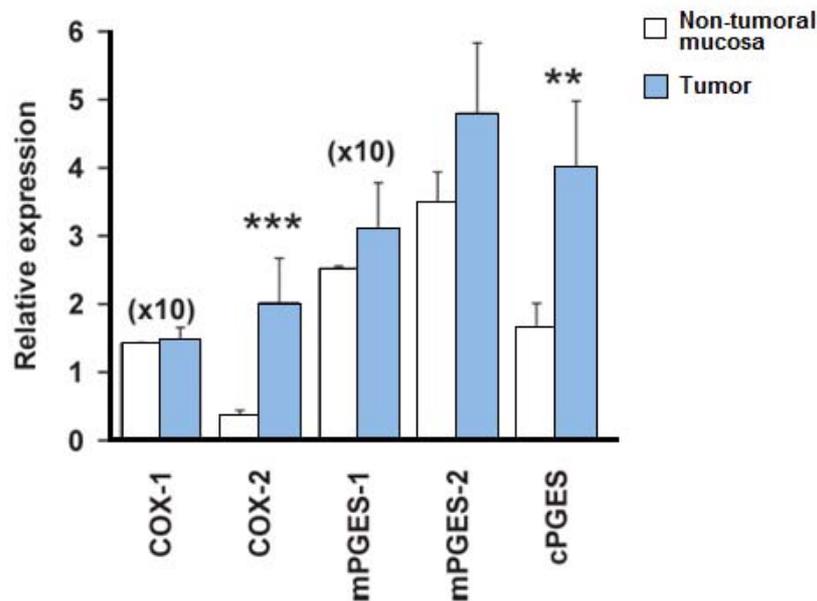


Figura 15. Estudio de la actividad a nivel transcripcional de los genes implicados en el metabolismo de la PGE₂ en carcinomas de cabeza y cuello.

Se demostró un incremento significativo en la expresión de COX-2 y cPGES, en tanto que no existieron diferencias significativas en la expresión de COX-1 y mPGES-1 y -2 entre el tejido tumoral y el correspondiente a mucosa sana (tomado de Camacho y cols⁴⁵).

Sawhney y cols⁴⁶, a partir de un estudio inmunohistoquímico realizado con muestras de mucosa sana, lesiones premalignas y carcinomas escamosos de cavidad oral, complementado con un estudio *in vitro* desarrollado en líneas celulares, demostraron que la activación del NF- κ B y la sobreexpresión de la COX-2 eran acontecimientos paralelos que aparecían de forma precoz en el proceso de carcinogénesis, permaneciendo elevados en los carcinomas ya establecidos (Tabla 4).

Histología	Casos (n)	NF-κB		COX-2
		Citoplasmático	Nuclear	
Mucosa normal	15	26%	0%	20%
Lesión premaligna	78	68%	51%	65%
Carcinoma	107	68%	58%	65%

Tabla 4. Expresión el NF-κB y COX-2.

Porcentajes de positividad a las tinciones citoplasmáticas y nuclear del NF-κB, así como a la COX-2 en diferentes tipos celulares (tomado de Sawhney y cols⁴⁶).

En un estudio in vitro desarrollado con líneas celulares de lesiones hiperplásicas y de carcinoma de cavidad oral, los autores demostraron una activación y translocación nuclear del NF-κB y un incremento en la actividad COX-2 inducido de forma dosis dependiente por la adición de extractos de tabaco. La adición de curcumina, un potente inhibidor del NF-κB, contó con la capacidad de suprimir la actividad de la COX-2. Por otro lado, la adición a un cultivo de células de carcinoma de cavidad oral de celecoxib, un inhibidor específico de la COX-2, condujo a una inhibición de la activación del NF-κB inducida por la adición de los extractos de tabaco, señalando la interrelación entre las vías metabólicas del NF-κB y la COX-2. Igualmente, Raju y cols⁴⁷ demostraron como la expresión constitutiva del NF-κB en una línea celular de carcinoma de cabeza y cuello quedaba modulada mediante la adición de celecoxib. La administración de celecoxib comportó un bloqueo dosis-dependiente de la capacidad de unión del NF-κB a las porciones promotoras del ADN celular de los genes sobre los que ejerce una función de regulación. Kourelis y cols⁸, a partir de un amplio estudio inmunohistoquímico desarrollado en muestras de mucosa normal, lesiones precancerosas y carcinomas de la laringe, no encontraron una relación significativa entre la positividad frente a la COX-2 y la actividad nuclear del NF-κB (p65) ($r_s=0.08$, $P=0.121$), en tanto que sí que apareció esta relación al considerar la actividad citoplasmática del NF-κB (p65) ($r_s=0.352$, $P<0.001$).

3.5. Inflamación: citoquinas.

Además de promover la proliferación y la supervivencia celular, el NF- κ B proporciona ventajas selectivas para el crecimiento en el microambiente tumoral a partir de la estimulación de citoquinas proinflamatorias y proangiogénicas. La IL-1, IL-6, IL-8 y el growth-related oncogene 1 (GRO-1) inducen la respuesta inflamatoria, promueven la angiogénesis y la migración celular, y actúan como quimiotácticos para los leucocitos, situaciones todas ellas que favorecen el desarrollo del tumor. Todos los genes que codifican estas citoquinas cuentan con lugares de unión en la zona promotora para la familia NF- κ B, y aparecen sobreexpresados en los pacientes con carcinomas escamosos de cabeza y cuello (revisado en Chang AA⁴⁸).

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

La IL-1 tiene un interés particular por su papel orquestador de la respuesta inflamatoria. La IL-1 es liberada principalmente por leucocitos, pero también por otros tipos celulares. Las células cancerígenas producen IL-1 directamente y/o inducen su producción en las células del microambiente tumoral⁴⁹. La IL-1 es una citoquina pluripotente involucrada en respuestas fisiológicas como la inducción de permeabilidad vascular, la fiebre y liberación adicional de otras citoquinas. También la IL-1 promueve la producción de prostanoídes mediante la inducción de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y la PGES-1 microsomal (mPGES-1)⁵⁰. La IL-1 se ha hallado incrementada en diversos tipos de tumor e implicada en la progresión tumoral a través de la inducción de factores de crecimiento, proteasas y factores pro-angiogénicos⁴⁹.

La familia de la IL-1 está compuesta por tres miembros, dos de los cuales son activos (agonistas) la IL-1 α y la IL-1 β , y el tercero es una proteína antagonista de los receptores de la IL-1 (IL-1ra). La IL-1 α y la IL-1 β están codificadas por genes distintos pero son funcionalmente similares uniéndose a los mismos receptores. Ambas proteínas difieren en la forma en que son procesadas. Mientras la IL-1 α es activa en la forma precursora, la IL-1 β requiere su escisión

de la forma de 33 KDa a 17 KDa por la caspasa-1 (también conocida como *Interleukin converting Enzyme*, ICE), siendo la forma madura de la IL-1 β la única activa. A su vez la caspasa-1 requiere activación por unos complejos denominados inflamosomas.

Existen dos receptores de la IL-1, IL-1RI y IL-1RII, que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas, con centros de unión similares. El IL-1RI es el biológicamente activo y se expresa de forma ubicua, mientras que el IL-1RII traduce señal de forma deficiente y de hecho actúa como antagonista. Posteriormente a la unión al receptor IL-1RI, la IL-1RaP (IL-1 receptor accessory protein) se une al complejo facilitando la transducción de señal y siendo esencial para ella (revisado en Lewis y cols⁵¹).

Después de la unión de la IL-1 al IL-1RI y formado el complejo [IL-1/IL-1RI/IL-1RaP] la señal se inicia mediante el reclutamiento de la proteína adaptadora MyD88 al dominio intracelular TIR (Toll-IL-1-Receptor) del complejo receptor prosiguiendo con la fosforilación de diversas cinasas para finalmente translocar el factor nuclear NF- κ B al núcleo (Fig 16). La siguiente figura esquematiza el mecanismo de activación del NF- κ B por parte de la IL-1.

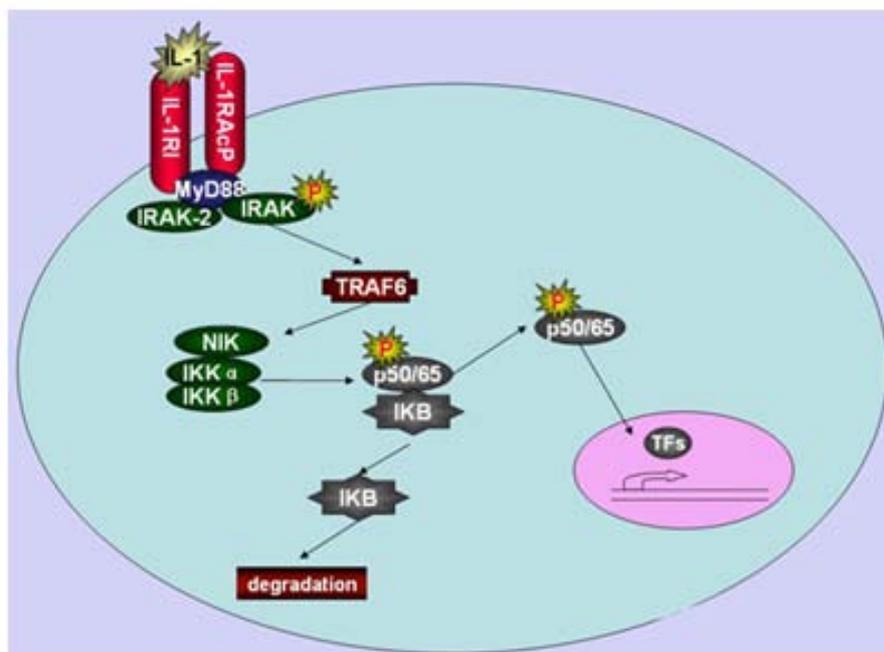


Figura 16. Modelo propuesto de activación del NF- κ B por parte de la IL-1 en el carcinoma escamoso de cabeza y cuello.

En un modelo desarrollado en líneas celulares de carcinoma pancreático, Niu y cols⁵² han descrito un incremento de la IL-1 α a expensas de la sobre-expresión de factores de crecimiento como el EGF. La IL-1 α contaría con una capacidad de estimulación autocrina de la actividad del NF- κ B, que una vez translocado a nivel nuclear regularía la expresión de una serie de genes que favorecerían la progresión tumoral, entre ellos el responsable de la IL-1 α , resultado en un feedback positivo que ayudaría a mantener el NF- κ B activado del forma constitutiva (Fig 17).



Figura 17. Modelo propuesto de activación del NF- κ B constitutivo en el carcinoma pancreático (tomado de Niu y cols⁵²).

Streicher y cols⁵³ obtuvieron unos resultados similares al analizar líneas celulares de carcinoma de mama. El EGFR activado condujo a la activación del NF- κ B, que a su vez promovió la transcripción de la IL-1. Una vez sintetizada y liberada por las células tumorales, la IL-1 apareció como un factor de activación del NF- κ B.

3.6. Angiogénesis.

Los factores inducibles por hipoxia (HIFs) facilitan la adquisición celular de O_2 y la adaptación de la célula a su privación a partir de la regulación de la expresión de una gran cantidad de genes que se encuentran implicados en muchos de los procesos del metabolismo celular y que se relacionan además con la promoción de la carcinogénesis. La actividad del HIF depende de unos heterodímeros compuestos por una subunidad α inducible y sensible a las concentraciones tisulares de O_2 , de la cual se han descrito hasta el momento 3 tipos distintos (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α), y una subunidad β que se encuentra expresada de forma constitutiva a nivel celular, conocida también como ARNT.

Las subunidades α se encuentran formadas por cuatro dominios: el dominio bHLH para la unión al ADN, el dominio PAS para la dimerización, el dominio regulador (oxygen-dependent degradation domain, ODD), y unos dominios de transactivación en la porción C-terminal. EL HIF-1 α aparece expresado de forma ubicua, siendo el principal factor implicado en la regulación tisular de la respuesta a la hipoxia en la mayoría de tejidos. La expresión del HIF-2 α , por el contrario, queda limitada a unos tipos celulares concretos. Finalmente, no se conoce en la actualidad de forma completa el papel jugado por el HIF-3 α en la regulación de la hipoxia.

La subunidad β cuenta con los dominios bHLH y PAS, en tanto que carece del dominio ODD, apareciendo expresada de forma constitutiva en la totalidad de tejidos en condiciones aerobias.

En condiciones aerobias, la proteína supresora de tumores von Hippel-Landau (pVHL) induce la degradación por vía del proteosoma de los HIFs- α . Por el contrario, en condiciones de hipoxia se produce una estabilización de las subunidades HIFs- α , con la consiguiente traslocación nuclear y heterodimerización con la subunidad HIF- β , uniéndose a los elementos reguladores de los genes diana. La estabilización del HIF- α y la actividad reguladora sobre el ADN aparece inducida ante concentraciones de O_2 inferiores al 6%, alcanzando un nivel de actividad máxima con tensiones de O_2 del 0.5%.

La expresión del HIF se ha visto implicada en puntos clave del proceso de promoción de la carcinogénesis, especialmente a partir de la inducción de la angiogénesis, principalmente a expensas de la activación de genes responsables de la producción de sustancias pro-angiogénicas como el VEGF, pero también interviniendo en la regulación del metabolismo y la proliferación celular, la dediferenciación y la aparición de metástasis (revisado en Rankin et al⁵⁴) (Fig 18).

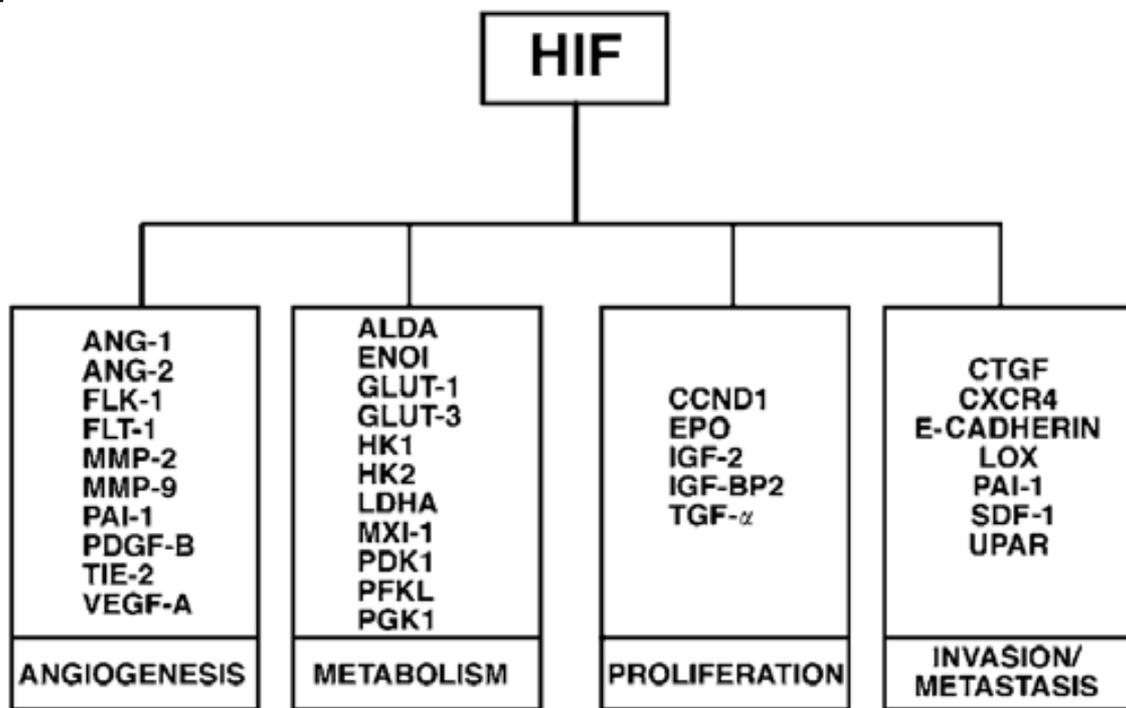


Figura 18. Genes regulados por el factor inducible por hipoxia (HIF) que se encuentran relacionados con mecanismos implicados en la tumorigénesis.

El HIF regula la expresión de cerca de 100 genes implicados en la tumorigénesis, incluyendo angiogénesis, metabolismo, proliferación, invasión tisular y metástasis (tomado de Rankin y cols⁵⁴).

En condiciones de hipoxia se produce una fosforilación de la IκB, liberándose el NF-κB, que cuenta con la capacidad de promover la transcripción del HIF-1α, incrementándose en consecuencia los niveles de mRNA y de proteína⁵⁵ (Fig 19).

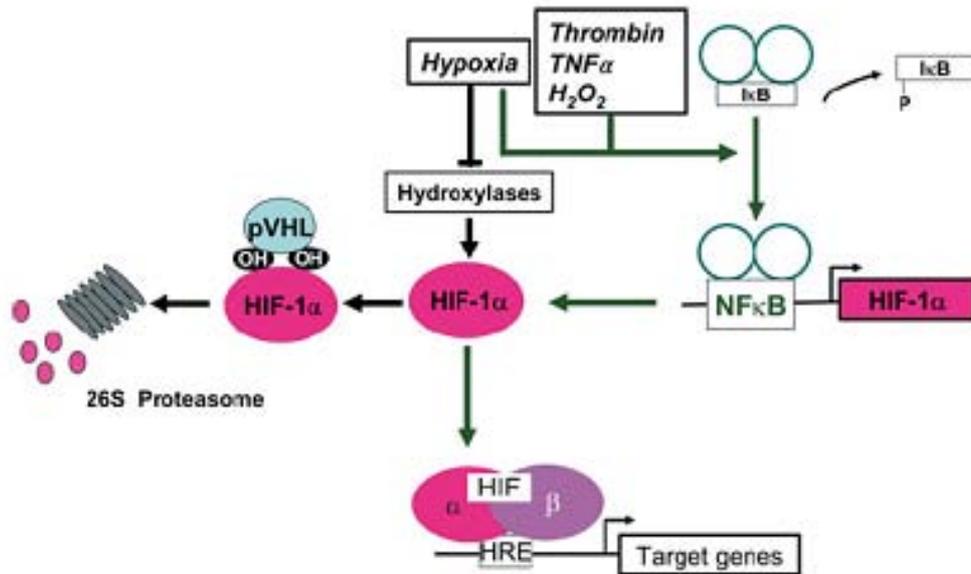


Figura 19. Representación esquemática de la relación entre HIF-1 α y NF- κ B en condiciones de hipoxia (tomado de Görlach y cols⁵⁵).

Además de la estabilización del HIF-1 α en condiciones de hipoxia, van Uden y cols⁵⁶ describieron como el complejo NF- κ B es un modulador directo de la expresión del HIF-1 α de forma dependiente de la estimulación con el TNF α en situación de normoxia.

En modelos tumorales de carcinoma colonrectal⁵⁷ y carcinoma gástrico⁵⁸ se ha descrito una relación entre la activación del HIF-1 α a partir del complejo NF- κ B y la angiogénesis tumoral.

El VEGF es una proteína señalizadora implicada en la vasculogénesis (formación de novo del sistema circulatorio embrionario) y en la angiogénesis (crecimiento de vasos sanguíneos provenientes de vasos preexistentes). La actividad del VEGF provoca la degradación de la membrana basal a nivel vascular, permitiendo la emigración de las células endoteliales hacia el espacio intersticial, lo que dará lugar a la formación de nuevos vasos. Los VEGF pertenecen a la superfamilia de los factores de crecimiento derivados de las plaquetas. VEGF incluye las proteínas homodiméricas VEGF-A (que es la que se designa normalmente al hablar de VEGF), que cuenta con una potente actividad como antiangiogénico, y las proteínas VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y PlGF (placental growth factor).

La actividad del VEGF-A depende por una parte del HIF-1 α , tal como vimos anteriormente, pero también queda regulada por otros factores de crecimiento y

citoquinas, incluyendo los factores de crecimiento epidérmico (EGF) y el derivado de las plaquetas, la PGE₂ o la IL-6.

La familia de los VEGF ejerce su señal al actuar sobre unos receptores específicos de membrana, los VEGFR, compuestos por una serie de dominios extracelulares semejantes a las inmunoglobulinas, un dominio transmembrana, y un dominio intracelular con actividad tirosin-quinasa. Existen 3 receptores con afinidad VEGF específica. La estimulación del VEGFR-1 se relaciona fundamentalmente con los fenómenos de vasculogénesis embrionaria. El VEGFR-2 es el receptor angiogénico por excelencia, en tanto que el VEGFR-3 se ha implicado en los mecanismos asociados a la linfangiogénesis. EL VEGF-A cuenta con capacidad de actuar sobre los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2, en tanto que el VEGF-B estimula únicamente al VEGFR-1. Los VEGFC y VEGF-D se unen al VEGFR-2 y VEGFR-3, y finalmente el VEGF-E lo hace de forma exclusiva con el VEGFR-2 (Fig 20).

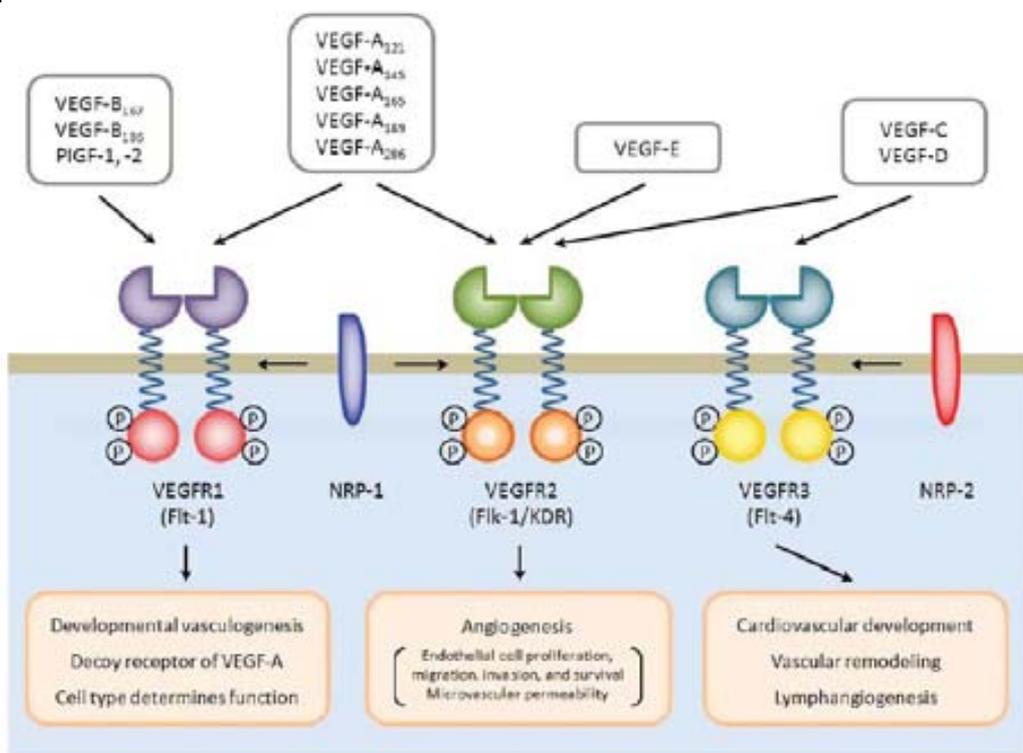


Figura 20. Componentes de la familia del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

Los carcinomas escamosos de cabeza y cuello cuentan con la tendencia a la sobreexpresión del VEGF, habiéndose comprobado una relación significativa

entre su nivel de expresión y la afectación ganglionar⁵⁹ y el pronóstico de la enfermedad.

En algunos modelos tumorales, como el carcinoma de ovario, se ha descrito un estímulo directo de la angiogénesis por parte del NF- κ B a partir de la inducción del vascular endothelial growth factor (VEGF)⁶⁰.

En un estudio con un inhibidor del NF- κ B (DHMEQ), Ruan y cols⁵ evidenciaron que un bloqueo del NF- κ B comportó una disminución muy significativa de la expresión del VEGF (Fig 21).

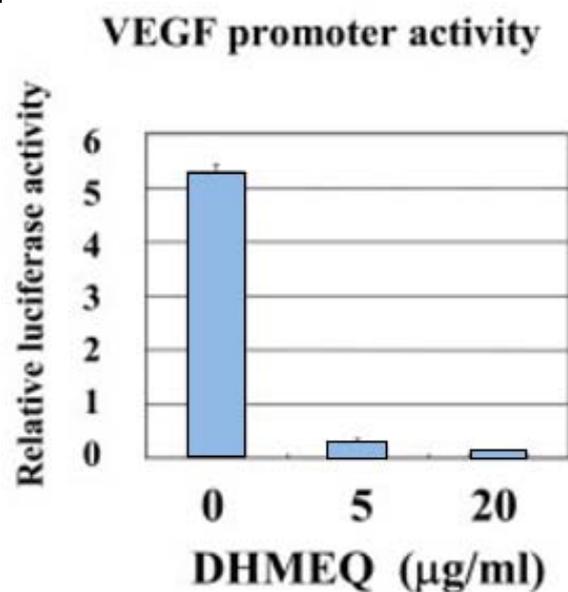


Figura 21. Efectos del DHMEQ sobre la expresión del promotor de VEGF.

La exposición de una línea celular a un inhibidor del NF- κ B (DHMEQ) a una dosis de 5-20 µg/ml, comportó una disminución dosis dependiente de la actividad del promotor de VEGF (tomado de Ruan y cols²⁵).

3.7. Invasión tisular y metástasis.

Otra característica de los tumores malignos es su capacidad de invasión y metastatización, que requiere la adquisición por parte de las células tumorales de una serie de capacidades fenotípicas que incluyen la pérdida de adhesividad intercelular, la degradación de la matriz extracelular, y la capacidad de migrar. Las proteínas que permiten la adquisición de estas habilidades se encuentran controladas por una variedad de factores, entre los que se incluye el NF- κ B. Las metaloproteinasas (MMP) son unos enzimas

proteolíticos que permiten la degradación de la matriz extracelular, y cuya expresión se encuentra regulada por el NF- κ B.

El primer miembro de la familia de las MMPs descubierto fue una colagenasa intersticial, descrita por Gross y Lapiere⁶¹ en 1962 en experimentos designados a explicar cómo la cola de los renacuajos, rica en colágeno, era reabsorbida durante el proceso de la metamorfosis.

A partir de su secreción por parte de las células, las MMPs han demostrado su participación en muchos procesos fisiológicos, incluyendo el recambio celular de los tejidos y los fenómenos de reparación durante la implantación del blastocito, la involución postlactancia o la reabsorción ósea. Dado que el colágeno representa la principal proteína estructural en todos los tejidos y el principal obstáculo para la migración de las células, desde un inicio se postuló que la actividad de los enzimas colagenolíticos jugaría un papel fundamental al facilitar la diseminación de las células tumorales.

Las MMP son miembros de una familia de proteínas dependientes del Zn^{2+} . Hasta el momento se han identificado más de 25 formas de MMP. La estructura básica de las MMP contiene los siguientes dominios: un péptido de señal que dirige a la MMP en el retículo endoplasmático durante su síntesis, un propéptido que mantiene la latencia del enzima hasta que es eliminado, la unidad catalítica, que contiene la zona de unión relacionada con el Zn^{2+} y que es la que ejerce la actividad enzimática, y finalmente un dominio hemopexina que es el que determina la especificidad del sustrato, y que cuenta con una pequeña zona de bisagra que permite a dicha región hemopexina el presentar el sustrato al core activo del dominio catalítico (Fig 22).

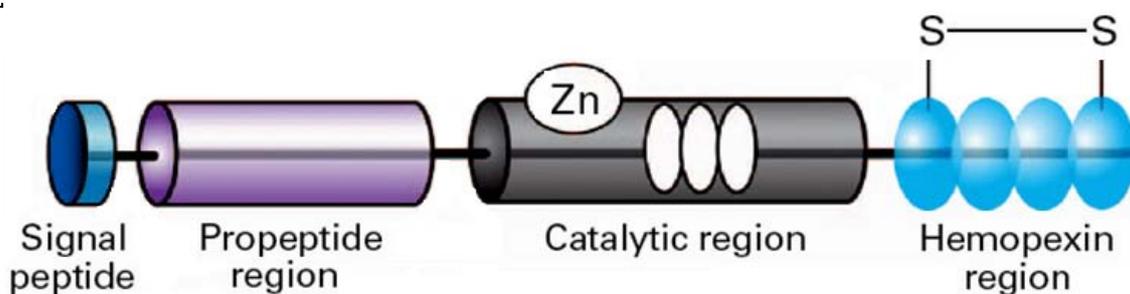


Figura 22. Estructura de las metaloproteinasas (MMPs).

La mayoría de MMP son secretadas como formas inactivas, con un propéptido que debe ser liberado para conseguir la forma activa del enzima. El propéptido contiene un residuo rico en cisteína que interactúa con el Zn^{2+} en la zona catalítica y previene la unión del sustrato.

Inicialmente, las MMP fueron nombradas en base a su función específica, basada en el sustrato sobre la que actuaban. A medida que aumentó el número de moléculas pertenecientes a la familia de las MMP se decidió nombrarlas a partir del nombre genérico de MMP con un sufijo numérico correspondiente al orden de descripción. En la actualidad se encuentran descritos hasta 25 tipos diferentes de MMP.

De los diferentes métodos de clasificación, el más utilizado es el que las agrupa en parte en función de la especificidad del sustrato sobre el que actúan, en parte en función de la localización celular que ocupan. Estos grupos son:

- colagenasas: MMP-1, -8, -13, -18.
- gelatinasas: MMP-2, -9.
- estromelisininas: MMP-3, -10, -11.
- matrilisininas: MMP-7, -26.
- MMP de membrana: MMP-14, -15, -16, -17, -24, -25.
- metaloelastasas: MMP-12
- enamelinina: MMP-20
- otras: MMP-19, -21, -22, -23, -27, -28.

Las colagenasas son capaces de degradar las fibras colágenas, siendo las únicas enzimas en los mamíferos que cuentan con dicha capacidad. Tradicionalmente, las colagenasas han agrupado las MMP 1, 8, 13, y 18. Adicionalmente, la MMP 14 ha mostrado capacidad de degradación del colágeno.

El sustrato fundamental de las gelatinasas es el colágeno tipo IV y la gelatina. Estas enzimas se distinguen por la presencia de un dominio adicional insertado en la unidad catalítica. Esta región adicional queda posicionada inmediatamente antes que la zona Zn^{2+} , sin alterar la estructura de la zona activa. Las gelatinasas son las MMP-2 y -9.

Las estromelisininas muestran una amplia capacidad para adherirse a diversas proteínas de la matriz extracelular, pero no cuentan con actividad sobre las

fibras colágenas. Los tres miembros canónicos de este grupo son las MMP-3, MMP-10 y MMP-11.

Las matrilisinas son enzimas con capacidad de degradar componentes de la matriz extracelular durante los procesos de remodelación tisular. Están representadas por las MMP 7 y 26.

Finalmente, existen MMP de membrana, las MMP-14, -15, -16, -17, -24 y -25, que quedan insertadas en la membrana plasmática a partir de un segmento transmembrana o un glicosilfosfatidilinositol (GPI).

La regulación transcripcional de las MMP es específica de los diferentes tipos celulares, de manera que cada célula muestra un fenotipo proteolítico en respuesta a unos estímulos determinados. Existen una serie de mecanismos por los cuales las células regulan la transcripción de los genes MMP.

A) Señales de activación transcripcional.

La mayoría de MMPs no se expresan en condiciones basales, pero su transcripción puede ser inducida por varias señales, que incluyen citoquinas, factores de crecimiento y productos derivados de la actividad de oncogenes. Además, otras situaciones como alteraciones en la forma celular, o estrés mecánico pueden inducir también la transcripción de los genes MMP. Dos de los factores que han sido estudiados más ampliamente son la interleuquina-1 β , que estimula la expresión de las MMPs, y el TGF- β (*transforming growth factor- β*), que en muchos tipos celulares inhibe su expresión.

Además, la expresión de las MMPs cuenta con componentes de expresión constitutiva e inducibles. Por ejemplo, las MMP-1 y -2 se encuentran expresadas de forma constitutiva en muchos tipos celulares, en tanto que la MMP-9 es altamente inducible.

B) Señales de transducción y factores nucleares.

Las vías a través de las cuales los activadores transcripcionales actúan sobre los genes MMP incluyen las vías MAPK, ERK1 y ERK2, que estimulan o inhiben la expresión de MMP en función del tipo celular, la oncoproteína AP1, la familia de proteínas ETS o el NF κ B. Los mecanismos que regulan estas vías

de transcripción tendrán pues consecuencias sobre la actividad proteolítica final a nivel celular.

En un estudio in vitro realizado a partir de una línea celular de epitelio escamoso, Hohberger y cols⁶² han descrito un modelo de microinvasión dependiente de la activación de la MMP-9. De acuerdo con el modelo, la presencia de células inflamatorias liberaría a nivel local $\text{TNF-}\alpha$, que conduciría a un incremento de la actividad del $\text{NF}\kappa\text{B}$, que a su vez induciría la transcripción de la MMP-9 favoreciendo los fenómenos de degradación de la membrana basal lo que permitiría la invasión del estroma subyacente (Fig 23).

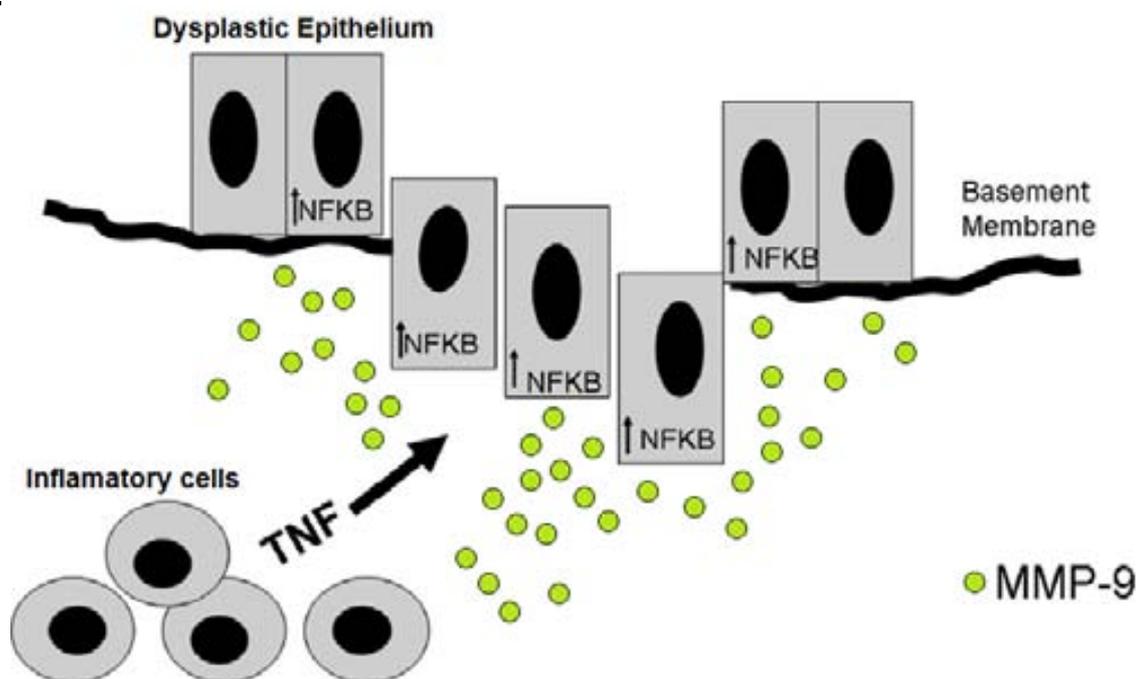


Figura 23. Modelo de microinvasión tumoral dependiente de la activación de la MMP-9.

Las células inflamatorias presentes en los tejidos liberarían $\text{TNF-}\alpha$ que llevaría a un incremento de la actividad del $\text{NF-}\kappa\text{B}$ y a la transcripción de la MMP-9, permitiendo la degradación de la membrana basal y así la invasión del estroma subyacente (tomado de Hohberger y cols⁶²)

Originariamente las MMPs se consideraron casi exclusivamente como sustancias que favorecían la invasión y la diseminación metastásica. Sin embargo, se ha visto que las MMPs están involucradas en varias etapas correspondientes al proceso de carcinogénesis:

- Proteólisis de la matriz extracelular.
- Modulación de la adhesión celular y migración.
- Modulación de la transición epitelial-mesenquimal.

- Procesamiento de citoquinas y sus receptores.
- Regulación de la proliferación celular.
- Regulación de la apoptosis.
- Regulación de la angiogénesis.
- Participación en la actividad de las stem cells.

Yan y cols⁶³ desarrollaron un estudio comparando líneas celulares de tumores de cabeza y cuello con baja capacidad de metastatización (TSCC y Tca 8113) con líneas de tumores de alta capacidad (Tb, TL y OSC-4). De acuerdo con sus resultados, en condiciones basales (*situación TNF α -*) la actividad NF- κ B de las líneas celulares de alta capacidad de metastatización fue superior. Además, cuando las células recibieron tratamiento con TNF α (*situación TN α +*), las líneas de alto potencial de metastatización incrementaron de forma mucho más importante la actividad NF- κ B que las que contaban con un potencial bajo (Fig 24).

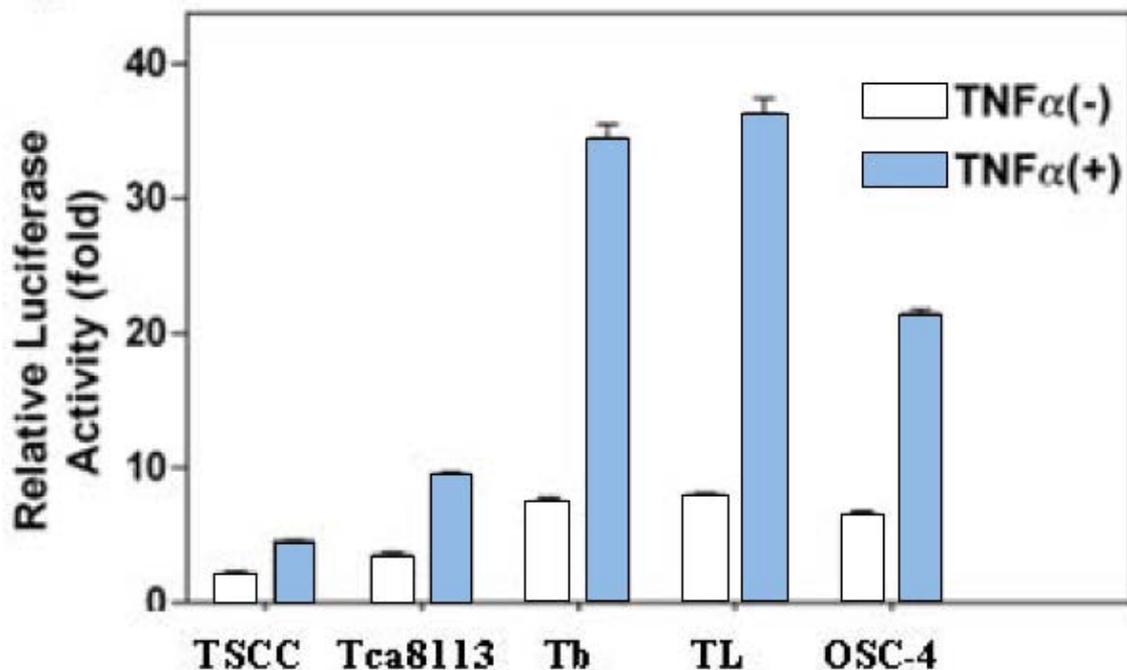


Figura 24. Incremento de la actividad constitutiva del NF- κ B en las líneas celulares de carcinoma escamoso de cabeza y cuello metastásico.

Se estudiaron dos tipos celulares: con baja capacidad metastásica (TSCC y Tca 8113) y con alta capacidad (Tb, TL y OSC-4). En condiciones basales se observó una mayor actividad constitutiva del NF- κ B en las de alta capacidad metastásica. Además cuando las células fueron tratadas con TNF α (TNF+), se incrementó la actividad del NF- κ B, incremento que fue superior en las células con alta capacidad metastásica (tomado de Yan y cols⁶³).

En el mismo estudio se realizó un test de migración celular realizado con las líneas celulares Tb y TL. El tratamiento con PDTC y BAY 11-7085, inhibidores específicos del NF- κ B, produjo una reducción significativa de la capacidad de migración celular, del orden del 25-35% ($P=0.001$). Esta disminución en la capacidad migratoria asociada al tratamiento inhibitor del NF- κ B se correlacionó con una disminución en los niveles de expresión de MMP-9 y VEGF⁶³.

También en el mismo estudio, para evaluar el efecto biológico en relación al potencial metastásico asociado con la actividad NF- κ B, se llevó a cabo un experimento consistente en la inoculación de células con alto potencial de metastatización (línea Tb) en dos grupos de ratones. Un grupo se correspondía con ratones control, en tanto que el otro grupo recibió un tratamiento con PDTC, una sustancia inhibidora del NF- κ B. A las seis semanas de la inyección, existieron diferencias significativas en la carga metastásica. El promedio de metástasis pulmonares correspondientes al grupo control fue de 72.2, en tanto que el grupo que recibió tratamiento con PDTC contó tan sólo con un promedio de 11.8 metástasis ($P=0.0002$) (Fig 25). En otro experimento *in vivo* en que se evaluaron las metástasis a nivel ganglionar, los resultados obtenidos fueron parecidos.

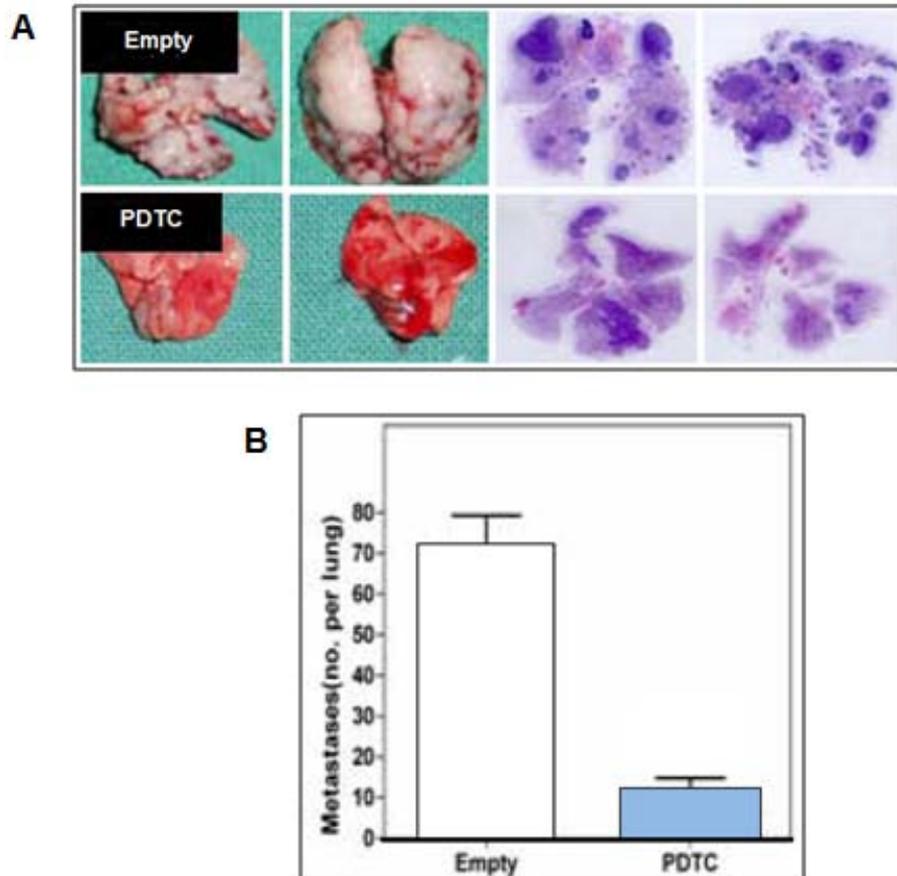


Figura 25. Supresión de la migración celular y capacidad metastásica de las células del carcinoma escamoso por inhibidores del NF- κ B.

Tras la inoculación en dos grupos de ratones (controles y tratados con PDTC) de células con alto poder metastásico (línea celular Tb), se observó que el promedio de metástasis pulmonares fue mucho menor en aquellos tratados con inhibidores del NF- κ B (tomado de Yan y cols⁶³).

A partir de los resultados conseguidos, la principal conclusión de los autores fue que la actividad del NF- κ B contribuyó de forma significativa al potencial metastásico tanto a nivel ganglionar como a distancia de los pacientes con carcinomas de cabeza y cuello.

A manera de síntesis, el siguiente esquema (Fig 26) resume la actividad metabólica derivada de la vía del NF- κ B en relación a la carcinogénesis de los carcinomas escamosos.

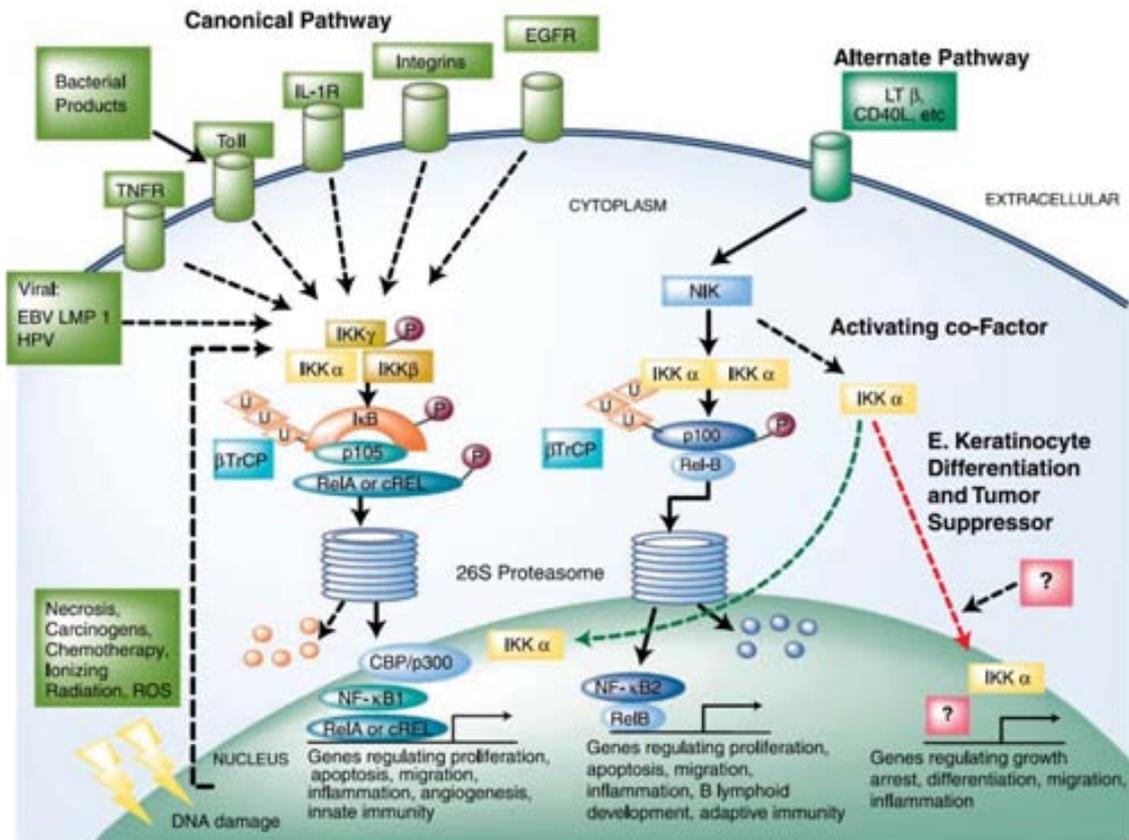


Figura 26. Papel del NF-κB en la carcinogénesis.

El NF-κB juega un papel importante en la carcinogénesis: autosuficiencia en las señales de crecimiento; insensibilidad a los mecanismos que inducen la inhibición en la proliferación celular; evasión de la apoptosis; inmortalización; inducción de la angiogénesis; y capacidad de invasión tisular y de metastatización.

4.- POSIBILIDADES TERAPÉUTICAS SOBRE LA VÍA DEL NF-κB.

Considerando la implicación de la vía del NF-κB en la carcinogénesis de diferentes modelos tumorales, han sido numerosos los intentos de llevar a cabo un control terapéutico de su activación. Brown y cols⁶⁴ realizaron una revisión de las posibilidades de actuación sobre la vía del NF-κB a diferentes niveles en pacientes con carcinomas de cabeza y cuello.

4.1. Terapia molecular dirigida.

A medida que ha ido aumentando el conocimiento de las vías implicadas en la activación del NF- κ B, se han incrementado las posibles dianas terapéuticas para controlar su activación.

A) Inhibición del proteosoma.

La vía canónica o clásica de activación del NF- κ B requiere la degradación del I κ B por el proteosoma. Se han diseñado varios inhibidores específicos y selectivos de la actividad del proteosoma. El mejor estudiado es el bortezomib, que ha iniciado su desarrollo a nivel clínico. El bortezomib (Velcade®) es una pequeña molécula que bloquea de forma selectiva la unidad catalítica del proteosoma. Ha sido aprobado su uso en el tratamiento del mieloma múltiple refractario y ha demostrado capacidad de inhibir la proliferación e inducir la apoptosis en una variedad de modelos tumorales, incluyendo los carcinomas de cabeza y cuello. En modelos preclínicos de cáncer de cabeza y cuello, el bortezomib ha demostrado tener capacidad de bloquear la activación del NF- κ B e inhibir el crecimiento tumoral, la radiorresistencia y la angiogénesis^{65,66}. En un estudio desarrollado en muestras de pacientes incluidos en un ensayo clínico con bortezomib y radioterapia, Allen y cols⁶⁷ pudieron constatar que el tratamiento con bortezomib inhibía la vía canónica de activación del NF- κ B, en tanto que la vía alternativa o las vías atípicas no se veían afectadas, lo que podría justificar la heterogeneidad en las respuestas observadas al tratamiento. Los primeros autores en publicar resultados clínicos obtenidos con bortezomib en el tratamiento de pacientes con carcinomas de cabeza y cuello fueron van Waes y cols²⁶, que evaluaron los resultados conseguidos con la administración endovenosa de bortezomib y radioterapia en el tratamiento de un grupo de 9 pacientes con recidivas. La totalidad de pacientes habían recibido previamente tratamiento con radioterapia, contando con recidivas a nivel local en siete ocasiones y regional y a distancia en dos. Con un perfil de toxicidad aceptable, se consiguieron respuestas en forma de disminución de la masa tumoral en 4 ocasiones y estabilización de al menos 3 meses de duración en 3 casos adicionales (Fig 27).

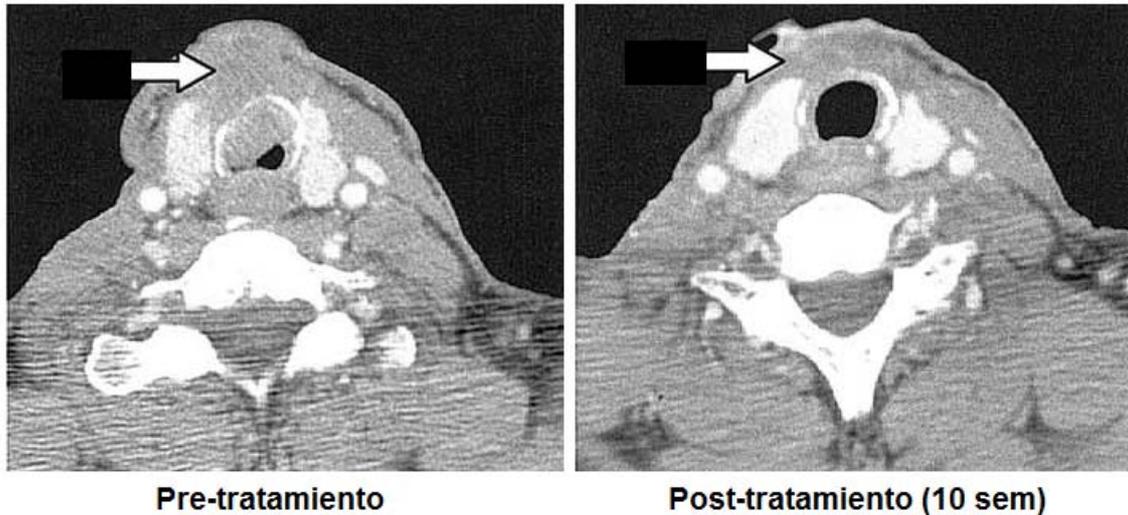


Figura 27. Tomografía computerizada en paciente tratado con bortezomib y radioterapia. A las 10 semanas de tratamiento se demostró una amplia reducción de la recidiva tumoral de laringe que infiltraba luz traqueal y región cervical anterior (tomado de van Waes y cols²⁶).

En el mismo estudio realizado sobre muestras del tumor pre y post-tratamiento, van Waes y cols²⁶ constataron la presencia de inhibición del proteosoma respecto a los niveles basales a las 24-48 horas de iniciado el tratamiento (Fig 28).

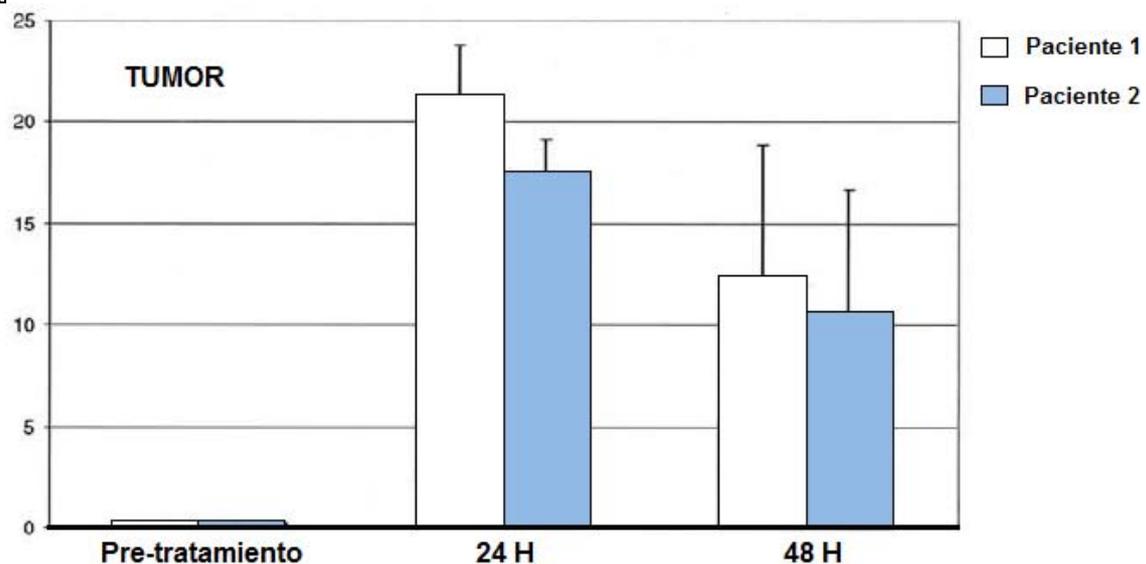


Figura 28. Inhibición de la actividad del proteosoma por el bortezomib. En biopsias tumorales seriadas obtenidas pre-tratamiento y a las 24 y 48 horas tras la administración de 0,6 mg/m² de bortezomib, se observó una inhibición significativa del proteosoma (tomado de van Waes y cols²⁶).

Recientemente, Chung y cols⁶⁸ han publicado los resultados correspondientes a un ensayo clínico fase II con bortezomib (inhibidor del proteosoma) y

docetaxel (perteneciente a la familia de los taxanos) en pacientes con carcinoma de cabeza y cuello recurrente o metastático. De los 21 pacientes evaluados, 1 (4%) consiguió una respuesta parcial superior al 50%, 10 (48%) mantuvieron la enfermedad estable, y 10 (48%) contaron con una progresión de la enfermedad. La mediana en la duración del beneficio clínico para los pacientes que consiguieron respuesta o estabilización de la enfermedad fue de 3.0 meses. La mediana de supervivencia para el conjunto de pacientes fue de 6.6 meses, contando los pacientes con respuesta o estabilización de la enfermedad con una mediana de supervivencia significativamente superior (9.4 meses) a la correspondiente a los pacientes con progresión de la enfermedad (4.3 meses) ($P=0.028$) (Fig 29).

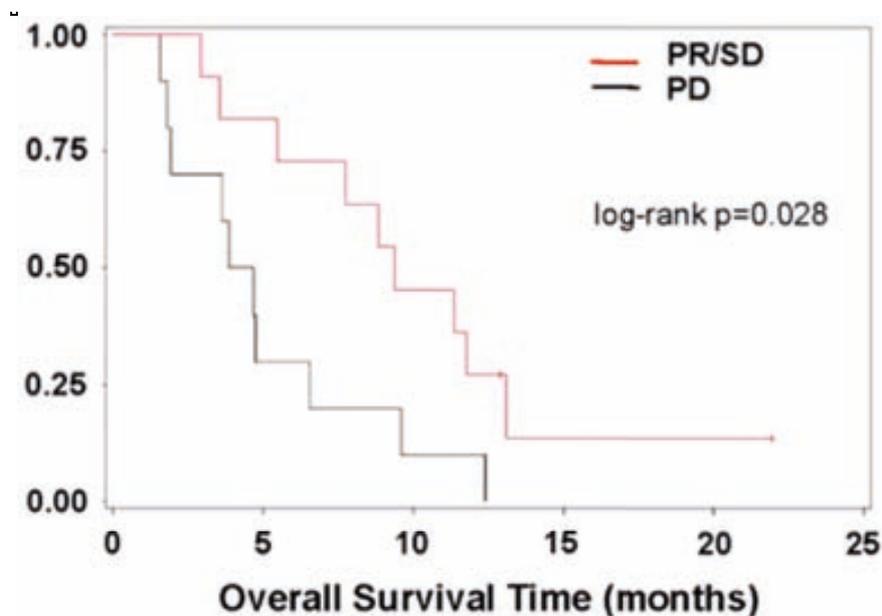


Figura 29. Supervivencia tras tratamiento con bortezomib y docetaxel. *PR/SD*, respuesta parcial/enfermedad estable; *PD*, progresión de la enfermedad (tomado de Chung y cols⁶⁸).

En el mismo estudio, al comparar el patrón de expresión genética de los tumores en función del grado de respuesta conseguido, los pacientes con progresión de la enfermedad contaron con un nivel de expresión más elevado de los genes asociados al NF- κ B activado, incluyendo NF- κ B1 (p105), las heat shock proteins 70 y 90, y la topoisomerasa II. Estos datos indican que el nivel de actividad de la vía del NF- κ B era relativamente más alto en los tumores que progresaron, y este incremento en la actividad NF- κ B podría justificar la resistencia al bortezomib.

Los autores realizaron un estudio con microarrays evaluando 111 genes modulados por el NF- κ B (Fig 30), observando como el análisis de jerarquización agrupó a una mayoría de los pacientes con progresión de la enfermedad. Concluyeron que la actividad basal del NF- κ B puede estar altamente relacionada con la progresión tumoral, y que una actividad elevada del NF- κ B podría corresponderse con una resistencia al bortezomib.

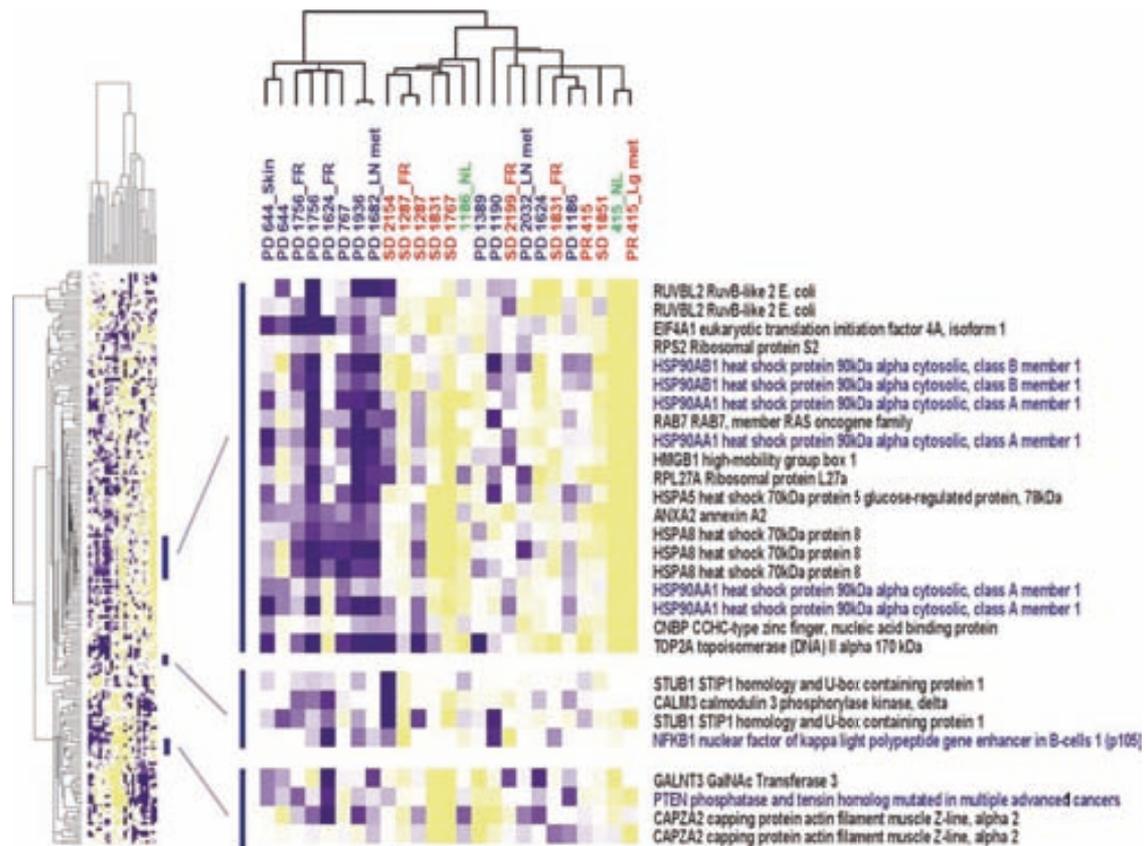


Figura 30. Expresión de los genes modulados por NF- κ B en tumores estables y tumores con progresión.

Se estudia la expresión de 111 genes modulados por NF- κ B en pacientes con PR/SD y PD, encontrando que los tumores de pacientes con PD tuvieron una mayor expresión de genes modulados por NF- κ B. *Rojo*, PR respuesta parcial y SD enfermedad estable; *azul*, PD progresión; *verde*, mucosa normal adyacente el tumor; *cuadros violetas*, alta expresión de genes; *cuadros amarillos*, baja expresión de genes (tomado de Chung y cols⁶⁸).

Chen y cols⁶⁹ analizaron las causas que justifican la variabilidad en la respuesta al bortezomib en líneas celulares de carcinoma de cabeza y cuello, llegando a la conclusión que la sensibilidad diferencial al bortezomib era consecuencia de las diferencias en la capacidad de supresión del proteosoma,



con la consiguiente degradación de las proteínas ubiquitinadas y la activación del NF- κ B.

B) Inhibición de la IKK.

Una manera alternativa de actuar sobre la activación de la vía del NF- κ B consiste en inhibir la actividad de la IKK. Existen diversas moléculas con esta capacidad, si bien los resultados conseguidos hasta el momento en líneas celulares de carcinomas de cabeza y cuello no han demostrado una excesiva efectividad⁶⁴.

C) Inhibición de la casein quinasa II (CK2).

La CK2 es una proteín-quinasa que cuenta con múltiples substratos, incluyendo el NF- κ B. Inicialmente, se describió que la CK2 activaba el NF- κ B en el contexto de la radiación ultravioleta. En líneas celulares de carcinoma de cabeza y cuello, se ha demostrado que además cuenta con un papel significativo en la activación de la IKK β y de RelA¹⁷. CK2 y sus dianas regulan un amplio abanico de procesos celulares, incluyendo la viabilidad celular, la protección de las células frente a la apoptosis, y la carcinogénesis. En un gran número de modelos tumorales se ha visto que las células tumorales cuentan con unos niveles de expresión elevados de CK2.

La apigenina, una flavona presente de forma natural en determinados vegetales como camomila y el espino blanco, presenta una serie de características llamativas: inhibe de forma selectiva la CK2, posee actividad anti-oxidante y anti-inflamatoria, y cuenta también con una acción estabilizadora de la IKK β y de modulación de la activación del NF- κ B. Se ha visto como esta sustancia tiene actividad en modelos tumorales de carcinoma de mama⁷⁰ y próstata⁷¹.

Una alternativa en la inhibición de esta molécula consiste en el uso de oligonucleótidos antisentido. Ahmad y cols⁷² han mostrado la capacidad terapéutica en experimentos *in vivo* e *in vitro*, en los cuales la disrupción de la CK2 con el tratamiento de las células con CK2-antisentido resultó en la inducción de apoptosis de manera cronológica y dosis dependiente.

D) Inhibición de la traslocación nuclear del NF- κ B.

El dehidroximetil-epoxiquinomicina (DHMEQ) es un derivado del antibiótico epoiquinomicina C que cuenta con la capacidad de bloquear la traslocación del NF- κ B al núcleo⁷³. En estudios realizados en dos líneas celulares de carcinoma de cabeza y cuello, Ruan y cols²⁵ describieron una reducción significativa en el crecimiento tumoral asociada a la inhibición de la actividad del NF- κ B. El tratamiento con DHMEQ indujo apoptosis de forma dosis-dependiente, disminuyendo la expresión de la ciclina D1 y el VEGF. Además, a bajas concentraciones el DHMEQ incrementó la sensibilidad de ambas líneas celulares al cisplatino (CDDP) (Fig 31). La siguiente figura (Fig 31) muestra los valores de viabilidad celular conseguidos con el tratamiento exclusivo de las líneas celulares con cisplatino o el efecto de la adición del DHMEQ.

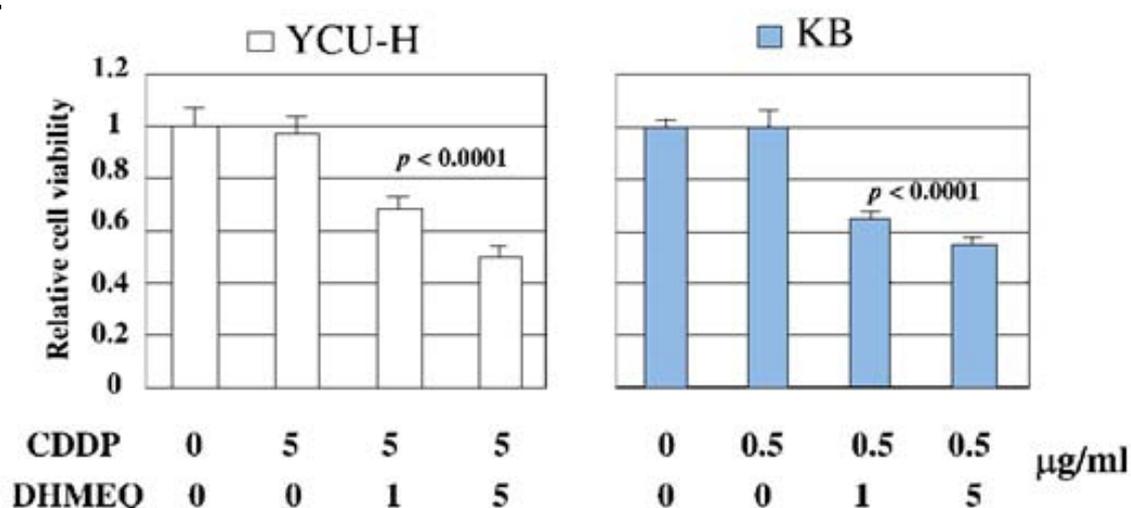


Figura 31. Efectos citotóxicos de la combinación de DHMEQ y cisplatino (CDDP) en dos líneas celulares (YCU-H891 y KB).

La adición de 1 a 5 μg/ml de DHMEQ al tratamiento con cisplatino (CDDP) mejoró significativamente el efecto inhibitor del crecimiento celular generado por el CDDP en comparación con el tratamiento con CDDP solo (tomado de Ruan y cols²⁵).

E) Degradación del NF- κ B.

El 5-Chloro-N-{2-[2-(4-chloro-phenyl)-3-methyl-butoxy]-5-trifluoromethyl-phenyl}-2-hydroxy-benzamide (CTFB) es una molécula que cuenta con actividad antitumoral.

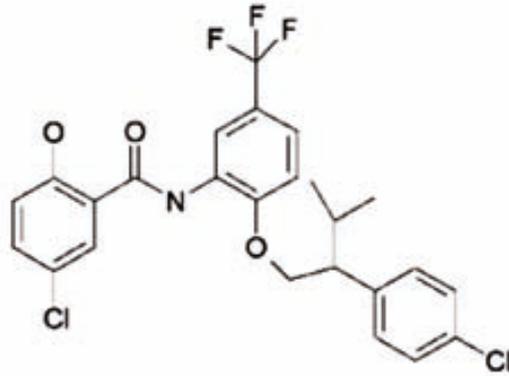


Figura 32. Estructura química del CTFB.

En un estudio realizado con líneas celulares de carcinoma de cabeza y cuello pudo comprobarse que entre sus acciones se incluía la degradación del NF- κ B como mecanismo responsable de dicha actividad antitumoral⁷⁴.

4.2. Agentes naturales como inhibidores del NF- κ B.

Existen sustancias naturales o sus derivados que han demostrado capacidad terapéutica, utilizándose habitualmente en las medicinas tradicionales de diversas culturas en todo el mundo. Un atractivo añadido de estas sustancias es que son relativamente asequibles, contando con unos niveles bajos de toxicidad. En el modelo tumoral de los carcinomas de cabeza y cuello, la curcumina es el producto al que se le ha prestado una mayor atención.

A) Curcumina.

La curcumina es un polifenol derivado de la *Cúrcuma longa* o cúrcuma, una planta herbácea adaptada a zonas áridas y que se encuentra en el Índico y el Sudeste asiático. El extracto de los rizomas de esta planta es utilizado como colorante alimentario. La cúrcuma es uno de los componentes del curry, al cual aporta coloración amarilla. Sus propiedades terapéuticas son conocidas desde antiguo, habiendo sido utilizada en la medicina Ayurvédica india tradicional. Estudios epidemiológicos han atribuido la baja incidencia de carcinoma de colon en la India al efecto preventivo y antioxidante de una dieta rica en curcumina y féculas.



Figura 33. Flor y rizomas de la cúrcuma.

Aggarwal y cols⁷⁵ fueron de los primeros autores que evaluaron *in vitro* el efecto del tratamiento con curcumina en el carcinoma de cabeza y cuello. De acuerdo con sus resultados, el tratamiento con curcumina de diferentes líneas celulares de carcinoma de cabeza y cuello inhibió la activación del NF- κ B a partir de una disminución directa dosis-dependiente en la actividad IKK, lo que condujo a una disminución en la fosforilación del I κ B β y el consiguiente secuestro a nivel citoplasmático del NF- κ B. Como consecuencia, se produjo una disminución de la expresión de genes modulados por el NF- κ B, incluyendo Bcl-2, ciclina D1, IL-6, COX-2 y MMP-9, lo que a su vez se tradujo en una inhibición de la proliferación celular y una inducción de la apoptosis.

Posteriormente, LoTempio y cols⁷⁶ en un estudio de diseño similar realizado con 4 líneas celulares de carcinoma de cabeza y cuello alcanzaron unos resultados similares. El tratamiento con curcumina, utilizando dimetil sulfóxido (DMSO) como disolvente, indujo una citotoxicidad dosis-dependiente (Fig 34), existiendo una relación significativa entre el porcentaje de muerte celular y las concentraciones de curcumina ($p < 0.0001$).

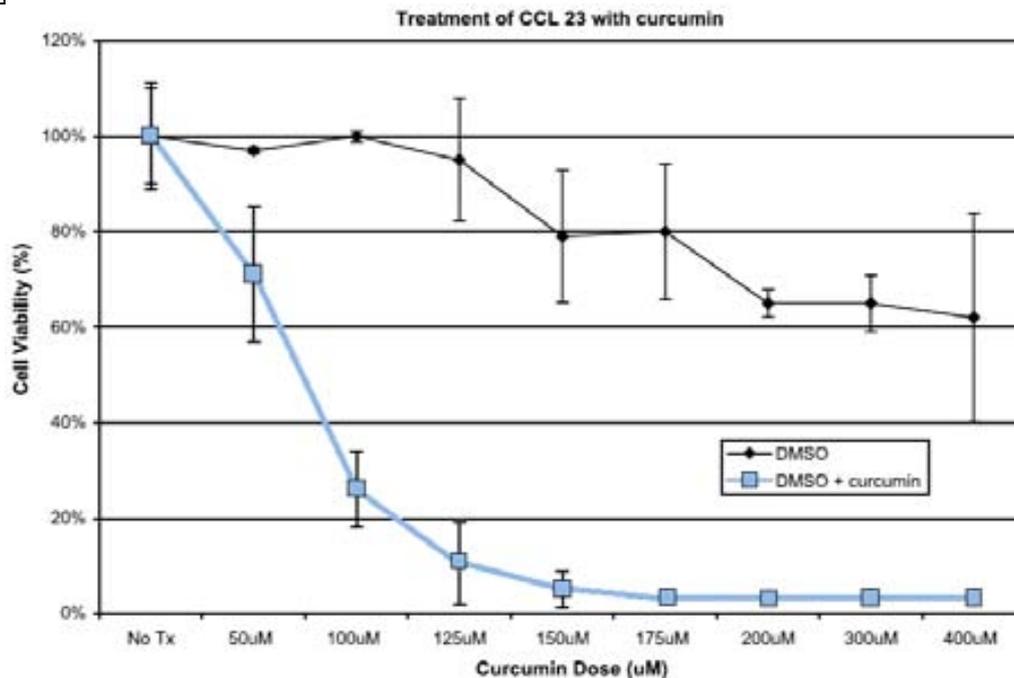


Figura 34. Inhibición del crecimiento de células de carcinoma escamoso de cabeza y cuello con curcumina.

La línea celular CCL23 representa un tumor laríngeo de crecimiento lento. Las células *in vitro* fueron sometidas a tratamiento con DMSO y DMSO-cúrcuma, observándose que con la cúrcuma se produjo un incremento de la citotoxicidad dosis dependiente (tomado de LoTempio y cols⁷⁶).

Este mismo grupo de investigadores llevaron a cabo un estudio experimental *in vivo* en un modelo murino. Una serie de ratones atímicos con xenoinjertos tumorales fueron tratados con curcumina endovenosa disuelta en DMSO, pero la toxicidad del tratamiento impidió conseguir resultados en relación al control tumoral. Una de las limitaciones en el tratamiento con curcumina reside en su escasa solubilidad en agua o suero. El disolvente requerido para su administración cuenta con una elevada toxicidad, lo que aparece como un elemento limitante en el caso de administración parenteral. Los autores optaron entonces por una administración tópica de una pasta de curcumina aplicada sobre la piel del animal que permitió la aplicación de dosis elevadas de curcumina sobre el xenoinjerto tumoral. El tratamiento tópico con curcumina consiguió una inhibición del crecimiento tumoral sin que los ratones tratados experimentasen una toxicidad significativamente elevada (Fig 35)⁷⁶.

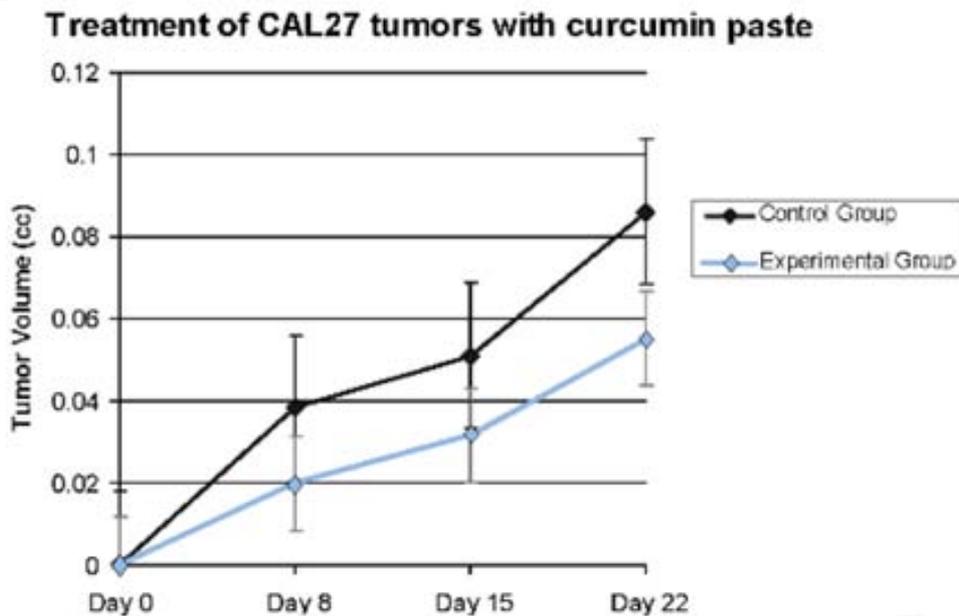


Figura 35. Inhibición del crecimiento de xenoinjertos tumorales.

La aplicación de pasta de cúrcuma sobre los xenoinjertos tumorales en ratones atímicos supuso una reducción del volumen tumoral con respecto a los ratones control a los que les aplicó suero salino (tomado de LoTempio y cols⁷⁶).

En un intento de mejorar la biodisponibilidad en la administración sistémica de la curcumina, Wang y cols⁷⁷ llevaron a cabo un estudio en el que se ensayó un tratamiento con curcumina disuelta en DMSO y administrada de forma liposomal. En un estudio *in vitro* pudo comprobarse como la viabilidad celular de los cultivos tratados con curcumina liposomal fue inferior a la correspondiente a la conseguida al incubar los cultivos sólo con liposomas. La supresión del crecimiento celular provocada por la curcumina liposomal no fue tan marcada como la conseguida con el tratamiento de la curcumina disuelta en DMSO (Fig 36), si bien los autores consideraron que esto podía ser debido a la toxicidad del DMSO.

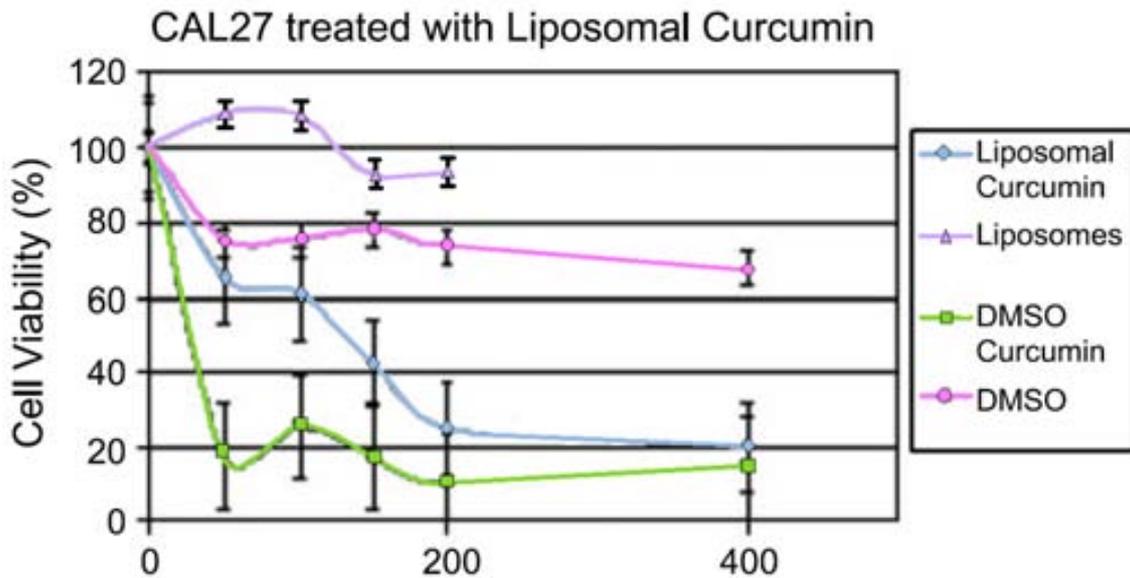


Figura 36. Inhibición del crecimiento celular con curcumina liposomal:

La línea celular CAL27 fue sometida *in vitro* a dosis crecientes de curcumina liposomal, sólo liposomas, curcumina disuelta en DMSO y sólo DMSO. Se observó que la inhibición del crecimiento conseguida con la curcumina liposomal fue superior que con sólo los liposomas, aunque sigue sin alcanzar el efecto conseguido con curcumina-DMSO. Los liposomas carecieron de toxicidad celular, mientras que el DMSO aislado contó con toxicidad (tomado de Wang y cols⁷⁷).

Estos investigadores, al analizar las líneas celulares tratadas con curcumina liposomal encontraron que no sólo se redujo la activación del NF- κ B, sino también la expresión de una batería de genes modulados por él mismo, como la ciclina D1, COX-2, MMP-9 y Bcl-2⁷⁷.

Al realizar un estudio *in vivo* realizado con ratones atómicos con xenoinjertos procedentes de las líneas celulares estudiadas⁷⁷, se pudo comprobar como la inyección endovenosa de curcumina liposomal comportó un crecimiento tumoral significativamente inferior al correspondiente a ratones inyectados tan sólo con liposomas o controles no tratados (Fig 37).

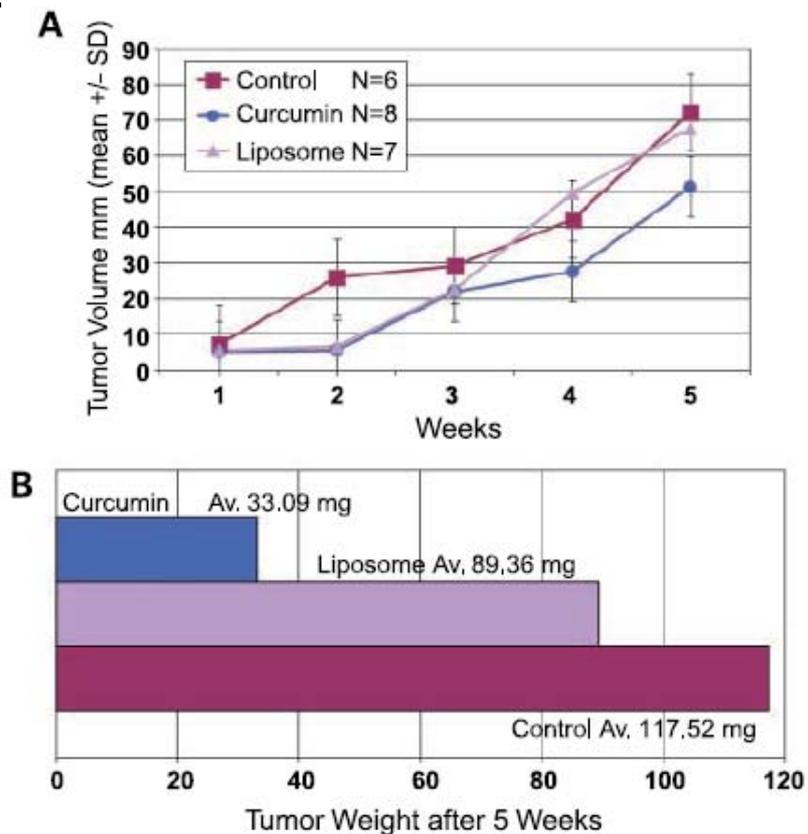


Figura 37. Acción de la curcumina liposomal sobre el crecimiento tumoral de xenoinjertos en ratones atímicos.

Los ratones fueron tratados con inyección intravenosa de suero salino (ratones control), con curcumina liposomal, o sólo con liposomas. Los tumores tratados con curcumina liposomal presentaron un aumento de volumen (A) y peso (B) tumorales significativamente menor que los tratados sólo con liposomas (tomado de Wang y cols⁷⁷).

Al realizar un estudio inmunohistoquímico de las muestras tumorales se pudo comprobar como los ratones tratados con curcumina liposomal contaron con una reducción significativa en el porcentaje y la intensidad de células tumorales que expresaron NF- κ B a nivel nuclear ($P < 0.05$), apareciendo también una reducción en el porcentaje de células que mostraron expresión citoplasmática⁷⁷.

Se realizó además en los tumores un análisis por Western blot de la actividad de I κ B α , lo que demostró igualmente una reducción significativa de la cantidad de I κ B α fosforilada en los tumores que habían recibido tratamiento con curcumina liposomal frente a los tratados sólo con liposomas⁷⁷.

B) Resveratrol.

Se trata de un polifenol abundante en la uva, las bayas y los cacahuetes. Se ha visto que cuenta con una actividad protectora muy potente frente a los tumores inducidos por derivados antracénicos. Además, se ha descrito que cuenta con la capacidad de inhibir una amplia variedad de células tumorales, incluyendo las de líneas celulares de carcinomas de cabeza y cuello a través de la supresión de la activación constitutiva del NF- κ B⁶⁴.

C) Ácido ent-11-hidroxi-15-oxo-kaur-16-en-19-oico.

Pteris es un género botánico de cerca de 280 especies de helechos. La *Pteris semipinnata* es una de las especies, utilizada en la medicina tradicional china en el tratamiento de la enteritis, la hepatitis y las mordeduras de serpiente, que contiene una sustancia, el ácido ent-11-hidroxi-15-oxo-kaur-16-en-19-oico (5F) que ha demostrado capacidad de inducir apoptosis en células de carcinoma de colon⁷⁸.



Figura 38. Pteris semipinnata.

En un extenso y reciente estudio, Vlantis y cols⁷⁹ analizaron la capacidad del 5F de inducir apoptosis en dos líneas celulares de carcinoma de la laringe. De acuerdo con sus resultados, el 5F disminuyó la viabilidad de los cultivos celulares de una forma dosis-dependiente a través de la inducción de la apoptosis (Fig 39).

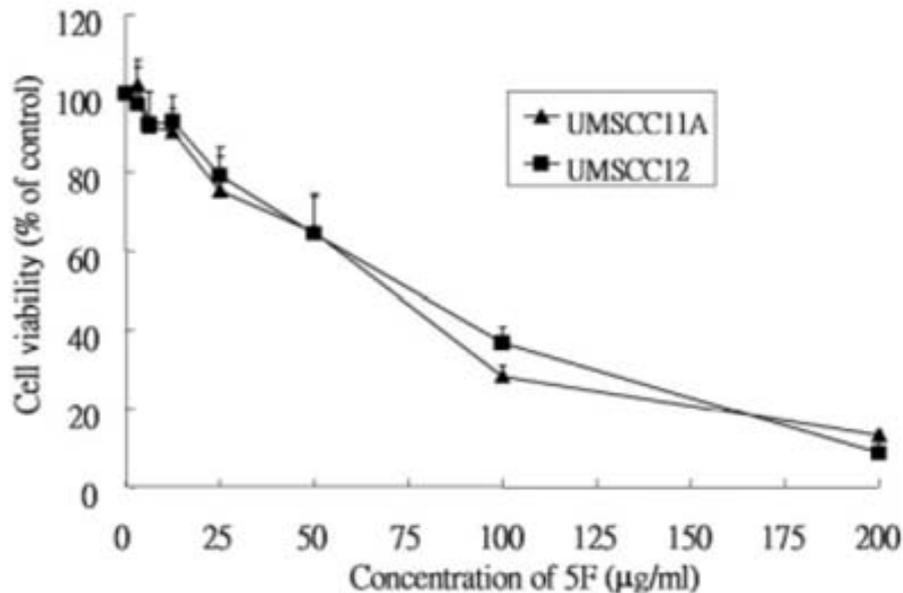


Figura 39. Inhibición de la proliferación celular en el carcinoma de laringe por el 5F. Dos líneas celulares UMSCC11A y UMSCC12 fueron tratadas a dosis crecientes de 5F. Se comprobó una disminución dosis-dependiente de la viabilidad celular (tomado de Vlantis y cols⁷⁹).

El 5F redujo de forma moderada el nivel basal de actividad del NF- κ B, pero se mostró como un potente inhibidor de la actividad inducida. Los mecanismos de actuación del 5F fueron la reducción de la actividad transcripcional y la inhibición de la degradación de la I κ B α , lo que impide la traslocación nuclear del NF- κ B.

En una evaluación del nivel de expresión de genes regulados por el NF- κ B, pudo apreciarse como el tratamiento con 5F condujo a una disminución en la expresión de COX-2, EGFR, ciclina D1 y survivina, en tanto que BAX apareció sobreexpresado⁷⁹.

D) Lupeol.

El lupeol, un compuesto químico presente en frutas como el mango, la uva, las fresas e higos, y en plantas medicinales (Fig 31). Cuenta con una acción antioxidante y anti-inflamatoria. Se ha descrito también su capacidad antitumoral en un modelo de carcinoma cutáneo⁸⁰ y de próstata⁸¹.

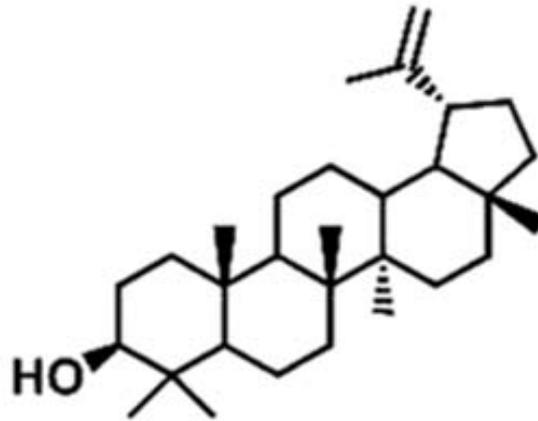


Figura 40. Estructura molecular del Lupeol.

Lee y cols⁸² evaluaron la capacidad terapéutica del lupeol en el carcinoma de cabeza y cuello con un esquema de análisis parecido al de los estudios anteriores. *In vitro* el tratamiento con lupeol condujo a una inhibición sustancial dosis dependiente del crecimiento celular en las diferentes líneas celulares estudiadas (Fig 41).

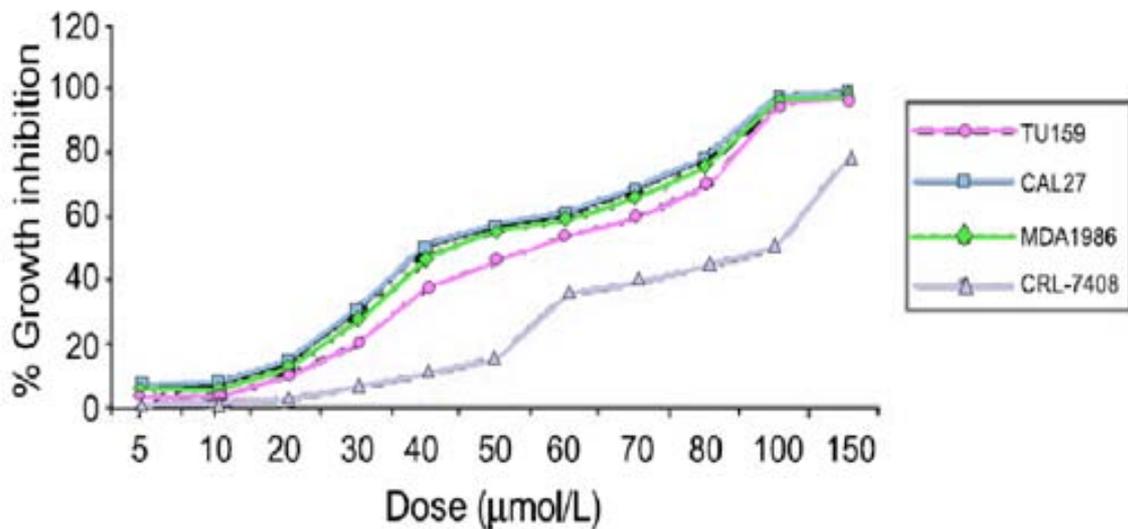


Figura 41. Inhibición del crecimiento celular por el lupeol.

Se sometió *in vitro* a cuatro líneas celulares de carcinoma escamoso de cabeza y cuello (TU159, CAL27, MDA1986 y CRL-7408) a dosis crecientes de lupeol. Se comprobó que el lupeol produjo una inhibición del crecimiento celular en todas las líneas celulares (tomado de Lee y cols⁸²).

Se comprobó que la disminución en la actividad del NF-κB en base a una inhibición de la fosforilación del IκBα apareció como el mecanismo responsable del la supresión del crecimiento tumoral. Por otra parte, pudo comprobarse

como el lupeol suprimía la movilidad celular y la invasividad a partir de la reversión de la transición epitelial-mesenquimal. Además, el lupeol potenció tanto *in vitro* como *in vivo* en un modelo animal la respuesta al tratamiento con cisplatino⁸².

E) Cefarantina.

La cefarantina es un alcaloide tomado de las raíces de una planta, la *Stephania cepharantha hayata* (Fig 33), que ha sido utilizada en la medicina tradicional japonesa para el tratamiento de la hemólisis provocada por determinados venenos de serpiente y en el tratamiento de las rinitis alérgicas. Se trata de una sustancia que cuenta con capacidad estabilizadora de las membranas celulares y que se ha implicado también en la regulación de las vías metabólicas señalizadas mediante citoquinas.



Figura 42. Stephania cepharantha hayata.

En un estudio *in vitro*, Tamatani y cols²² evidenciaron la capacidad de la cefarantina de inhibir la actividad del NF- κ B en líneas celulares de carcinoma de cavidad oral. La adición de la cefarantina a los cultivos celulares produjo una disminución dosis dependiente de la actividad NF- κ B (Fig 43).

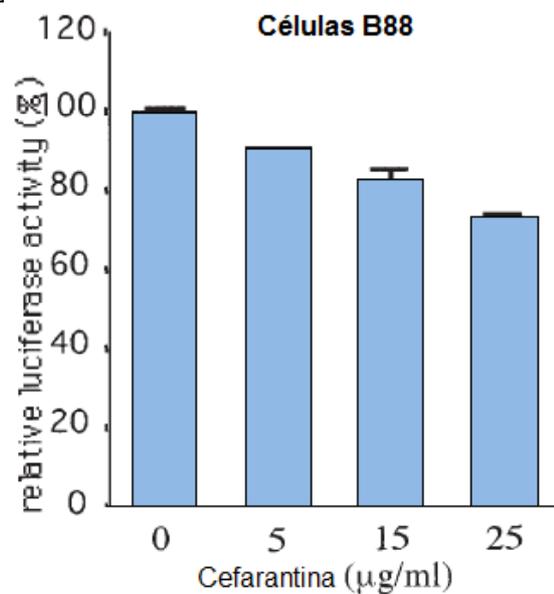


Figura 43. Inhibición de la actividad del NF-κB por la cefarantina.

La línea celular B88 de carcinoma epidermoide de cabeza y cuello fue sometida a dosis crecientes de cefarantina, detectándose una disminución dosis dependiente de la actividad del NF-κB (tomado de Tamatani y cols²²).

5.- IMPLICACIONES CLÍNICAS DE LA ACTIVIDAD DEL NF-κB EN LOS PACIENTES CON CARCINOMAS DE CABEZA Y CUELLO.

Además del papel jugado por el NF-κB en el desarrollo de la carcinogénesis en los carcinomas de cabeza y cuello, existen numerosas evidencias que señalan que su nivel de actividad se correlaciona con la supervivencia y la respuesta al tratamiento.

Zhang y cols⁷³ evaluaron un total de 45 pacientes con carcinomas escamosos de amígdala y 41 controles mediante un estudio inmunohistoquímico en que se determinó la presencia de la forma fosforilada activa del NF-κB con una técnica semiautomática. Además se evaluaron la expresión del epithelial growth factor receptor (EGFR), el Ki-67 y la forma fosforilada del Akt. La tinción inmunohistoquímica en el epitelio normal mostró positividad nuclear frente al NF-κB en la porción suprabasal, coincidiendo con el área de positividad frente al Ki-67, un indicador de replicación celular. Estos hallazgos son consistentes con el papel de renovación celular que corresponde a la porción basal del epitelio. En las áreas de displasia de alto grado adyacentes al carcinoma y en

el propio carcinoma escamoso se evidenció una tinción nuclear intensa que abarcaba todo el grosor del tejido epitelial (Fig 44).

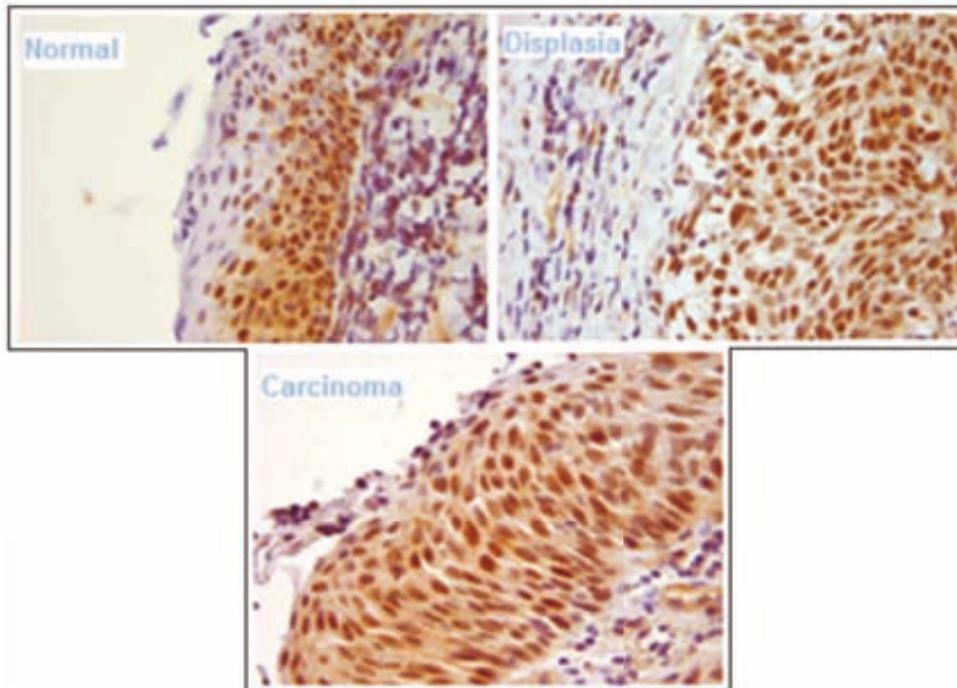


Figura 44. Distribución de la positividad NF- κ B detectado por inmunohistoquímica.

Mediante inmunohistoquímica se reveló una tinción nuclear positiva frente al NF- κ B en la porción suprabasal del epitelio normal. Esta positividad fue más intensa en áreas de displasia de alto grado y de carcinoma escamoso (tomado de Zhang y cols⁷³).

Los autores no encontraron diferencias significativas en la intensidad de tinción para el NF- κ B entre el epitelio de pacientes control y el epitelio de apariencia histológica normal adyacente al tumor, ni entre el epitelio displásico y las zonas de carcinoma infiltrante. Por el contrario, aparecieron diferencias significativas en la positividad para el NF- κ B entre los epitelios normales y las áreas de displasia o tumor (Tabla 5).

TINCIÓN para el NF-κB	Intensidad	%	Global
Epitelio normal control	0.97	42.1	54.03
Epitelio normal adyacente al tumor	1.07	51.32	64.61
Displasia	2.23	80	186.35
Carcinoma	2.22	76.36	179.66

Tabla 5. Valores promedio correspondientes a la intensidad de tinción para el NF-κB, porcentaje de células teñidas e intensidad global en tejido control (amígdala normal), epitelio normal adyacente a un carcinoma epidermoide de amígdala, tejido con displasia de alto grado y tejido con carcinoma epidermoide.

Se demostró una diferencia estadísticamente significativa en la positividad para el NF-κB entre los epitelios normales y las áreas de displasia o tumor (tomado de Zang y cols⁷³).

Evaluando la expresión de Ki-67, EGFR o p-Akt, no encontraron relación significativa con la supervivencia. Por el contrario, existió una relación entre el grado de positividad al NF-κB y la supervivencia (P=0.047).

Lee y cols⁸⁴ llevaron a cabo un estudio con microarrays de cDNA para evaluar la existencia de diferentes tipos de carcinoma en función de sus perfiles de expresión genética, para lo cual analizaron un total de 10 líneas celulares de carcinoma de cabeza y cuello. Los resultados de este estudio mostraron a partir del análisis de clusters no supervisado la existencia de dos tipos de tumores. Unas líneas celulares contaron con cambios genéticos relacionados con la p53, en tanto que otro grupo de tumores tuvieron alteraciones genéticas relacionadas con la sobre-expresión del NF-κB. Existieron diferencias significativas para cada uno de los clusters definidos en el análisis en el porcentaje de genes relacionados con cada una de las vías (Fig 45).

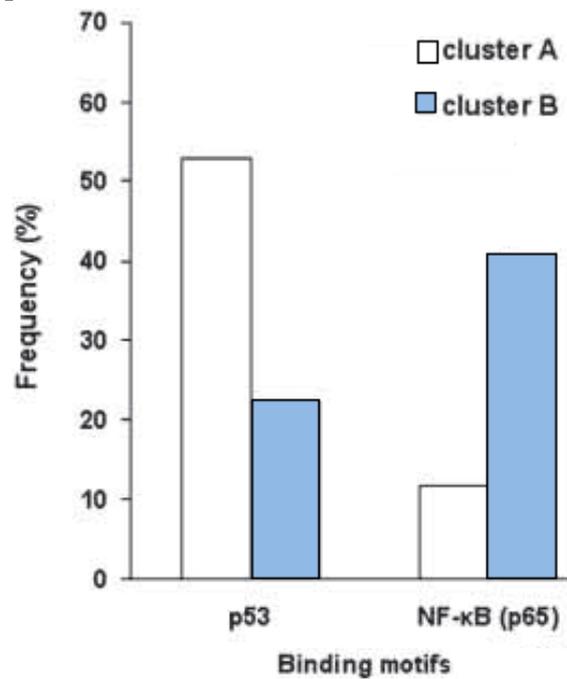


Figura 45. Actividad transcripcional p53 y NF-κB (p65) en función del cluster (tomado de Lee y cols⁸⁴).

A partir de un estudio inmunohistoquímico realizado en un tissue-array, los autores describieron una relación inversa significativa entre los niveles de positividad frente a la p53 y el NF-κB (Fig 46).

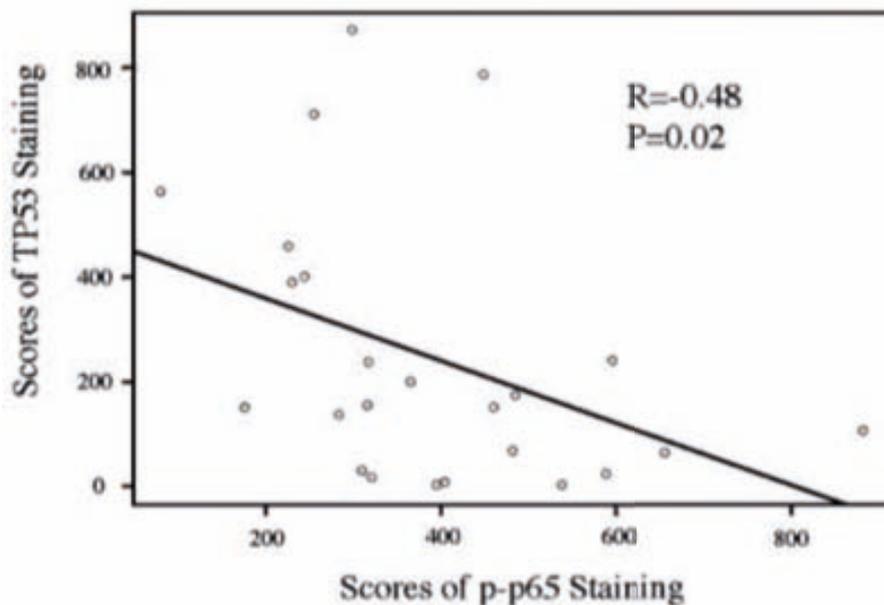


Figura 46. Inmunohistoquímica para el p53 y phospho-NF-κB p65.

El análisis con regresión lineal mostró una correlación inversa estadísticamente significativa entre el incremento de p53 y el decrecimiento de p65 (NF-κB) (tomado de Lee y cols⁸⁴).

De acuerdo con los autores, existirían dos perfiles de pacientes: un grupo de pacientes con mutaciones inactivantes de la p53, que contarían con una mayor probabilidad de control de la enfermedad^{85,86}, y otro grupo de pacientes que retendría el genotipo salvaje de la p53 (sin mutaciones) pero contaría con un perfil genético correspondiente a una respuesta frente al estrés relacionada con la sobre-expresión del NF-κB, que contaría con un peor pronóstico⁸³.

En un estudio desarrollado con microarrays a partir de material parafinado de 29 pacientes con carcinomas de cabeza y cuello, Chung y cols⁸⁷ definieron una lista de 75 genes que contaban con expresión diferencial en relación a la supervivencia libre de enfermedad. Un análisis del significado biológico de estos genes mostró que las principales vías implicadas en el pronóstico los pacientes afectaban la transición epitelial-mesenquimal, la activación del NF-κB, y la adhesión celular. De acuerdo con los resultados obtenidos definidos por los 75 genes con capacidad predictiva, se discriminaron dos grupos de pacientes en función del riesgo pronóstico (Fig 47).

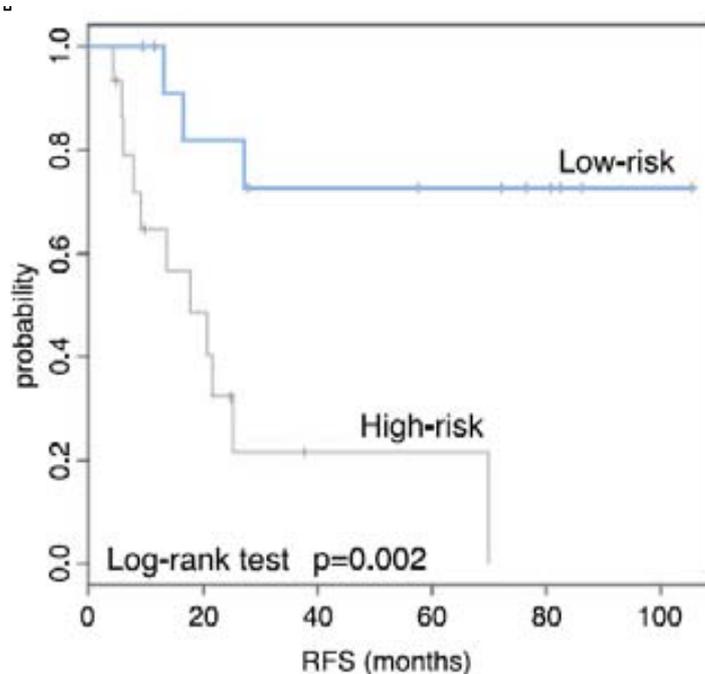


Figura 47. Supervivencia libre de enfermedad definida por 75 genes con capacidad predictiva para pacientes con tumores de cabeza y cuello.

Los pacientes con tumores clasificados como de alto riesgo tuvieron una supervivencia libre de enfermedad significativamente inferior con respecto a los pacientes con tumores de bajo riesgo (media de seguimiento 33 meses; media de supervivencia para el grupo de alto riesgo 11 meses; media para los de bajo riesgo 65 meses; $p=0,002$, long-rank test) (tomado de Chung y cols⁸⁷).

El mismo grupo de autores llevaron a cabo una validación del estudio de arrays utilizando una muestra de 60 pacientes con carcinoma escamoso de cabeza y cuello de los que se disponía de material congelado procedente de un estudio previo. Estudiando la supervivencia obtenida al aplicar las reglas de diagnóstico a la nueva población, se pudo observar que, aunque atenuadas, se mantenían las diferencias significativas (Fig 48).

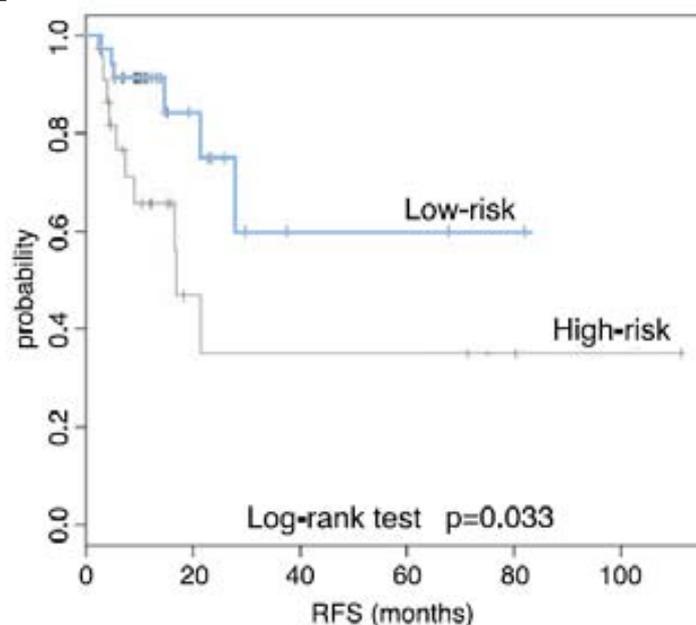


Figura 48. Supervivencia libre de enfermedad definida por 28 genes con capacidad predictiva.

Los pacientes con tumores clasificados como de alto riesgo contaron con una supervivencia libre de enfermedad inferior respecto a los pacientes con tumores de bajo riesgo (media de seguimiento 28 meses; media de supervivencia para el grupo de alto riesgo 27 meses; media para los de bajo riesgo 29 meses; $p=0,033$, long-rank test) (tomado de Chung y cols⁸⁷).

Los pacientes con carcinoma de cabeza y cuello cuentan con unos niveles incrementados a nivel tumoral de una serie de citoquinas y de factores de crecimiento que dependen de la modulación directa o indirecta de la actividad del NF- κ B en cooperación con otros factores de transcripción⁸⁸. Estos incrementos a nivel del tumor comportan un aumento de los niveles plasmáticos de determinadas citoquinas y factores de crecimiento, entre ellas la IL-6, IL-8, VEGF, hepatocyte growth factor (HGF) y GRO-1^{89,90}.

Allen y cols⁹¹ desarrollaron un estudio en que se analizaron de forma prospectiva las concentraciones plasmáticas basales y post-tratamiento durante el primer año de seguimiento en 30 pacientes con carcinoma de

orofaringe tratados con quimio-radioterapia. Del total de pacientes, un 30% sufrieron una persistencia o recidiva de la enfermedad. De acuerdo con los resultados conseguidos, un incremento longitudinal en los niveles de 3 o más de las citoquinas estudiadas se relacionaron con una peor supervivencia (Fig 49).

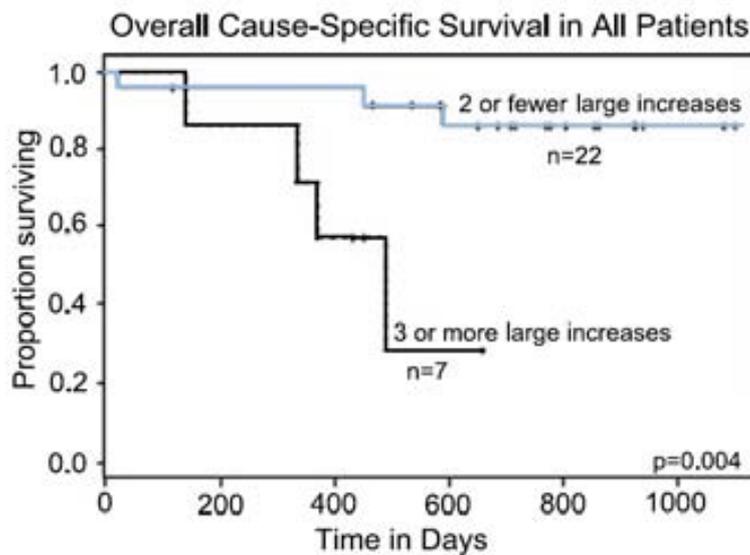


Figura 49. Supervivencia causa específica para 30 pacientes con carcinoma de orofaringe en los que se estudiaron varias citoquinas. Las curvas de Kaplan-Meier muestran que el incremento en los niveles de 3 o más citoquinas estaba relacionado con una peor supervivencia (tomado de Allen y cols⁹¹).

La conclusión de los autores fue que la monitorización de los niveles plasmáticos de citoquinas cuya expresión está regulada por el factor de transcripción NF- κ B puede ser útil como un biomarcador de respuesta en pacientes con carcinoma escamoso de cabeza y cuello tratados con quimio-radioterapia.

Por otra parte, existen evidencias obtenidas en diferentes estudios^{92,83,93,94} que señalan la existencia de una relación entre los niveles de expresión del NF- κ B evaluados mediante técnicas de inmunohistoquímica y el pronóstico de la enfermedad en pacientes con carcinomas escamosos de cabeza y cuello. De forma global, las conclusiones obtenidas por los diferentes autores señalan una relación significativa entre la actividad del complejo NF- κ B y un deterioro en el pronóstico de la enfermedad, especialmente a expensas de una disminución en



la tasa de control local en pacientes tratados con radioterapia. Un análisis más detallado de estos estudios se incluye en la Discusión del presente trabajo.

II. Justificación



Hasta el momento, la totalidad de estudios que han analizado la relación entre la expresión de NF- κ B y el control de la enfermedad en pacientes con un carcinoma escamoso de cabeza y cuello han utilizado técnicas de inmunohistoquímica, evaluando la actividad del NF- κ B de forma semicuantitativa o categórica. No existen estudios que hayan analizado la vía del NF- κ B a partir del análisis del nivel de expresión transcripcional.

III. Hipótesis

Existen evidencias en la literatura obtenidas a partir de estudios inmunohistoquímicos que señalan una implicación de la vía del NF- κ B en la carcinogénesis de los carcinomas escamosos de cabeza y cuello, así como la posibilidad de que la expresión de esta vía se encuentre relacionada con el resultado terapéutico. De acuerdo con la literatura consultada, existiría una relación significativa entre la expresión del NF- κ B y el control local de la enfermedad en pacientes tratados con radioterapia. De acuerdo con estos estudios, un incremento en los niveles de expresión del NF- κ B se relacionaría con un menor control local de la enfermedad a nivel local, con el consiguiente deterioro de la supervivencia.

La hipótesis planteada en el presente estudio es que el nivel de expresión transcripcional del complejo NF- κ B podría ser un marcador de radiosensibilidad, y podría utilizarse como una variable pronóstica a considerar en la elección del tratamiento con radioterapia o quimio-radioterapia en los pacientes con un carcinoma escamoso de cabeza y cuello.

IV. Objetivos

El objetivo principal del presente estudio es evaluar la existencia de relación entre el nivel de expresión a nivel transcripcional del NF- κ B y el control local de la enfermedad en pacientes con carcinoma escamoso de cabeza y cuello tratados con radioterapia o quimio-radioterapia.

Como objetivos secundarios se plantean:

- Comparar los niveles de expresión transcripcional del NF- κ B entre muestras de carcinoma y muestras de mucosa sana.
- Valorar la existencia de relación entre los valores de expresión del NF- κ B y variables clínicas como la localización primaria del tumor, la categoría de extensión local o regional, el antecedente de consumo de tóxicos, o el grado histológico del tumor.
- Analizar la existencia de relaciones significativas entre los valores de expresión del NF- κ B y los correspondientes a genes implicados en sus vías de señalización.
- Estudiar las relaciones entre los niveles de expresión transcripcional existentes entre los diferentes elementos que componen el complejo NF- κ B.

V. Material y métodos

En la realización del presente trabajo de investigación se llevaron a cabo dos estudios diferenciados:

- Análisis de la expresión de los niveles transcripcionales del NF- κ B en una muestra de pacientes con tumores de cabeza y cuello.
- Evaluación de la capacidad pronóstica de la expresión del NF- κ B en el control local de la enfermedad en pacientes con carcinomas de cabeza y cuello tratados con radioterapia.

La realización del estudio fue aprobada por el Comité de Ensayos y de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital de Sant Pau.

1.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL NF- κ B EN LOS CARCINOMAS DE CABEZA Y CUELLO.

El estudio fue realizado a partir de material de biopsia obtenido de pacientes diagnosticados en el Hospital de Sant Pau de Barcelona.

Los criterios de inclusión correspondientes a los pacientes incluidos en el presente estudio fueron:

- padecer un carcinoma escamoso localizado a nivel de cavidad oral, orofaringe, hipofaringe o laringe diagnosticado en el periodo 2004-2008.
- ausencia de antecedentes previos de lesiones tumorales a nivel de cabeza y cuello.
- posibilidad de obtención de una muestra de biopsia del tumor, con confirmación histológica de carcinoma escamoso, y de una muestra de mucosa sana obtenida de una localización alejada del tumor primario.

Los datos correspondientes a las características epidemiológicas, de tratamiento y de seguimiento de los pacientes se extrajeron de forma retrospectiva de una base de datos que, de forma prospectiva, recoge la información relevante de todos los pacientes con tumores malignos de cabeza

y cuello diagnosticados y tratados en el Hospital de Sant Pau de Barcelona desde 1985⁹⁵.

En base a los criterios de inclusión, se evaluaron un total de 76 pacientes con un tumor índice de cabeza y cuello para los cuales se dispuso de las muestras biológicas correspondientes.

Encontramos 68 paciente varones (89.5%) y 8 mujeres (11.5%). La tabla 6 muestra la distribución de los pacientes en función de la localización del tumor primario.

LOCALIZACIÓN TUMOR PRIMARIO	Frecuencia	Porcentaje (%)
CAVIDAD ORAL	12	15,8
OROFARINGE	14	18,4
HIPOFARINGE	9	11,8
LARINGE	41	53,9
TOTAL	76	100,0

Tabla 6. Localización del tumor primario.

Un porcentaje elevado de pacientes contaron con el antecedente de consumo de tóxicos como el alcohol y el tabaco. La tabla 7 muestra la distribución de los pacientes en función de los niveles de consumo de dichas sustancias.

HÁBITOS TÓXICOS		ALCOHOL			TOTAL
		NO	< 80 g/día	> 80 g/día	
TABACO	NO	7 (9,2%)	0	0	7 (9,2%)
	< 20 cig/día	4 (5,3%)	4 (5,3%)	2 (2,6%)	10 (13,2%)
	> 20 cig/día	9 (11,8%)	27 (35,5%)	23 (30,3%)	59 (77,6%)
TOTAL		20 (26,3%)	31 (40,8%)	25 (32,9%)	76 (100%)

Tabla 7. Consumo alcohol y tabaco.

Un 9.2% de los pacientes no contaron con el antecedente en el consumo de tóxicos, un 10.6% reconocían un consumo moderado (<20 cig/día y < 80 gr de

alcohol/día), en tanto que el 80.2% restante contaron con el antecedente de un consumo severo de alcohol y/o tabaco.

El grado histológico del tumor aparece en la siguiente tabla (Tabla 8), que demuestra un predominio de los tumores considerados como moderadamente diferenciados, tal como ocurre de forma habitual en estas localizaciones de cabeza y cuello (Tabla 8).

GRADO HISTOLÓGICO	Frecuencia	%	% Acumulado
BIEN DIFERENCIADO	7	9,2	9,2
MODERADAMENTE DIFERENCIADO	62	81,6	90,6
MAL DIFERENCIADO	7	9,2	100,0
Total	76	100,0	

Tabla 8. Grado histológico del tumor primario.

La tabla 9 muestra la distribución en función de la categoría de extensión local (T) y regional (N) de los pacientes en el momento del diagnóstico de acuerdo a los criterios establecidos por la 6ª edición de la clasificación TNM⁹⁶.

CLASIFICACIÓN TNM		N				Total
		0	1	1	3	
T	1	6 (7,9%)	1 (1,3%)	1 (1,3%)	0	8 (10,5%)
	2	19 (25%)	3 (3,9%)	5 (6,6%)	1 (1,3%)	28 (36,8%)
	3	14 (18,4%)	3 (3,9%)	8 (10,5%)	0	25 (32,9%)
	4	9 (11,8%)	2 (2,6%)	3 (3,9%)	1 (1,3%)	15 (19,7%)
Total		48 (63,2%)	9 (11,8%)	17 (22,4%)	2 (2,6%)	76 (100%)

Tabla 9. Categoría de extensión local (T) y regional (N) del tumor primario.

Ninguno de los pacientes incluidos en el estudio contaba con la presencia de metástasis a distancia en el momento del diagnóstico del tumor.

De acuerdo con la distribución de las categorías de extensión local y regional, los pacientes se encontraban en los siguientes estadios (Tabla 10).

ESTADIO	Frecuencia	%	% Acumulado
1	6	7,9	7,9
2	19	25	32,9
3	21	27,6	60,5
4	30	39,5	100
Total	76	100	

Tabla 10. Estadio en el momento del diagnóstico.

Un pequeño porcentaje de pacientes se agruparon en el estadio I, en tanto que el resto se distribuyó de manera bastante homogénea en el resto de los estadios.

A partir de las muestras incluidas en esta parte del estudio se llevaron a cabo las siguientes determinaciones:

- Estudio de los niveles de expresión del p65 (NF- κ B) en muestras de carcinoma y de mucosa sana.
- Estudio de expresión de una batería de genes que codifican proteínas promovidas o relacionadas con la actividad NF- κ B.

En esta parte del estudio se evaluó tan sólo la expresión del gen p65 al tratarse del gen responsable de la actividad de regulación transcripcional más importante asociada a la función del NF- κ B en el modelo tumoral que estamos evaluando.

La siguiente tabla (Tabla 11) muestra los genes evaluados en esta parte del estudio:

METABOLISMO del ÁCIDO ARAQUIDÓNICO	METALOPROTEINASAS (MMPs)	QUIMIOQUINAS	FACTORES de ANGIOGÉNESIS
COX-1		SDF-1	
COX-2	MMP-1	CXCR-4	
mPGES-1	MMP-2	CXCR-7	
mPGES-2	MMP-3	IL-8	
cPGES	MMP-9	RANTES	VEGF
EP-2	MMP-10	GCP-2	HIF-1 α
EP-3	MMP-13	MPC-1	
EP-4	TIMP-1	GRO- α	
PGDH-15		NAP-2	

Tabla 11. Genes estudiados relacionados con NF- κ B.

A partir de los resultados obtenidos, se compararon los valores de expresión correspondientes a la p65 (NF- κ B) en el tejido tumoral y la mucosa sana. Se evaluó la posible existencia de relación entre los valores de expresión del p65 (NF- κ B) y variables clínicas como la localización del tumor, las categorías de extensión local o regional, o el grado histológico. Finalmente, se llevó a cabo un análisis de la existencia de relaciones entre los valores de expresión del p65 (NF- κ B) y los correspondientes al resto de genes estudiados.

2.- ESTUDIO DE LA CAPACIDAD PRONÓSTICA DE LA EXPRESIÓN DEL NF- κ B EN RELACIÓN AL CONTROL LOCAL DE LA ENFERMEDAD EN PACIENTES TRATADOS CON RADIOTERAPIA O QUIMIO-RADIOTERAPIA.

El objetivo principal de esta parte del estudio consistió en evaluar la relación entre los niveles de expresión del NF- κ B y el control local de la enfermedad tras un tratamiento con radioterapia o quimio-radioterapia.

Para la elaboración de esta parte del estudio, se evaluó una cohorte de pacientes de acuerdo con los siguientes criterios de inclusión:

- padecer un carcinoma escamoso localizado a nivel de cavidad oral, orofaringe, hipofaringe o laringe diagnosticado en el periodo 2004-2008.
- ausencia de antecedentes previos de lesiones tumorales a nivel de cabeza y cuello.
- posibilidad de obtención de una muestra de biopsia del tumor, con confirmación histológica de un carcinoma escamoso.
- haber seguido tratamiento con radioterapia o quimio-radioterapia con intención radical.
- contar con un seguimiento mínimo de 12 meses.

En esta parte del estudio se analizaron un total de 77 pacientes. Encontramos 67 paciente varones (87%) y 10 mujeres (13%) con una edad media en el momento del diagnóstico de 63.4 años (desviación estándar 11.4 años, rango 63.4 a 85.9 años).

La población de pacientes incluidos en esta parte de estudio no fue idéntica a la utilizada en la primera parte, si bien hasta un total de 30 de los pacientes coincidieron en ambos estudios.

La siguiente tabla (Tabla 12) muestra la distribución de los pacientes en función de la localización del tumor primario:

LOCALIZACIÓN TUMOR PRIMARIO	Frecuencia	%
CAVIDAD ORAL	7	9.1
OROFARINGE	26	33.7
HIPOFARINGE	6	7.8
LARINGE	38	49.4
Total	77	100

Tabla 12. Localización del tumor primario.

La tabla 13 muestra la distribución en función de la categoría de extensión local (T) y regional (N) de los pacientes en el momento del diagnóstico de acuerdo a los criterios establecidos por la 6ª edición de la clasificación TNM⁹⁶.

CLASIFICACIÓN TNM		N				Total
		0	1	1	3	
T	1	11 (14,3%)	1 (1,3%)	0	0	12 (15,6%)
	2	26 (33,8%)	2 (2,6%)	8 (10,4%)	1 (1,3%)	37 (48,1%)
	3	13 (16,9%)	3 (3,9%)	3 (3,9%)	1 (1,3%)	20 (26%)
	4	4 (5,2%)	2 (2,6%)	2 (2,6%)	0	8 (10,4%)
Total		54 (70,1%)	8 (10,4%)	13 (16,9%)	2 (2,6%)	77 (100%)

Tabla 13. Categoría de extensión local (T) y regional (N) del tumor primario.

De acuerdo con la distribución de las categorías de extensión local y regional, los pacientes contaron los siguientes estadios (Tabla 14).

ESTADIO	Frecuencia	%
1	11	14,3
2	26	33,8
3	19	24,7
4	21	27,3
Total	77	100

Tabla 14. Estadio en el momento del diagnóstico.

La siguiente tabla (Tabla 15) muestra el tipo de tratamiento realizado en función de la categoría de extensión local (T) de la enfermedad para los pacientes incluidos en el presente estudio:

		TRATAMIENTO		Total
		RADIOTERAPIA	QUIMIO-RADIOTERAPIA	
T	1	12 (23,5%)	0	12 (15,6%)
	2	27 (52,9%)	10 (38,5%)	37 (48,1%)
	3	11 (21,6%)	9 (34,5%)	20 (26%)
	4	1 (2%)	7 (26,9%)	8 (10,4%)
Total		51 (66,3%)	26 (33,7%)	77 (100%)

Tabla 15. Tratamiento en función de la categoría de extensión local.



Existieron diferencias significativas en el tipo de tratamiento realizado en función de la categoría de extensión local de la enfermedad. Los pacientes con tumores más avanzados tendieron a realizar tratamiento con quimio-radioterapia concomitante (Fisher's exact test, $P=0.0001$).

La técnica de tratamiento con radioterapia no se modificó de forma sustancial durante el periodo de estudio. El tratamiento consistió en la administración de radioterapia externa utilizando 2 o 3 campos conformados. Un total de 56 pacientes (73%) recibieron radioterapia con un fraccionamiento convencional (2 Gy/día) hasta completar una dosis de 70-72 Gy, en tanto que 21 pacientes (27%) fueron tratados en régimen de hiperfraccionamiento (1.2 Gy/2 veces al día) hasta completar una dosis de 72-74 Gy. Con la excepción de los pacientes con tumores T1 de glotis, la radioterapia incluyó el tratamiento de las áreas ganglionares. En caso de tratamiento concomitante con quimioterapia, la mayoría de pacientes recibieron cisplatino a una dosis de 100 mg/m² administrada cada 3 semanas.

La secuencia terapéutica incluyó la realización de vaciamientos cervicales en 11 pacientes (14%). Salvo en un caso, la totalidad de cirugías realizadas a nivel cervical se realizaron una vez completado el tratamiento con radioterapia o quimio-radioterapia.

Un total de 21 pacientes (27.3%) sufrieron una recidiva del tumor a nivel local como localización exclusiva del fracaso terapéutico, 5 pacientes (6.5%) una recidiva ganglionar exclusiva, y 5 pacientes (6.5%) una recidiva conjunta local y regional. Seis pacientes (7.8%) contaron con la aparición de metástasis a distancia, en 2 ocasiones como la única localización de fracaso terapéutico.

En el momento del cierre del estudio, 48 pacientes (62.3%) se encontraban vivos y sin enfermedad, 1 paciente se encontraba vivo con metástasis a distancia), y 28 pacientes habían fallecido. Los fallecimientos fueron consecuencia de la evolución del tumor de cabeza y cuello en 13 ocasiones, como consecuencia de una segunda neoplasia no relacionada en 9, y por enfermedad intercurrente en ausencia de tumor de cabeza y cuello en 6. A efectos de cálculo de supervivencia, los dos pacientes vivos con enfermedad

fueron considerados como fallecidos como consecuencia de la evolución del tumor con fecha del último control.

La figura 50 muestra la curva de supervivencia actuarial ajustada para los pacientes incluidos en el estudio.

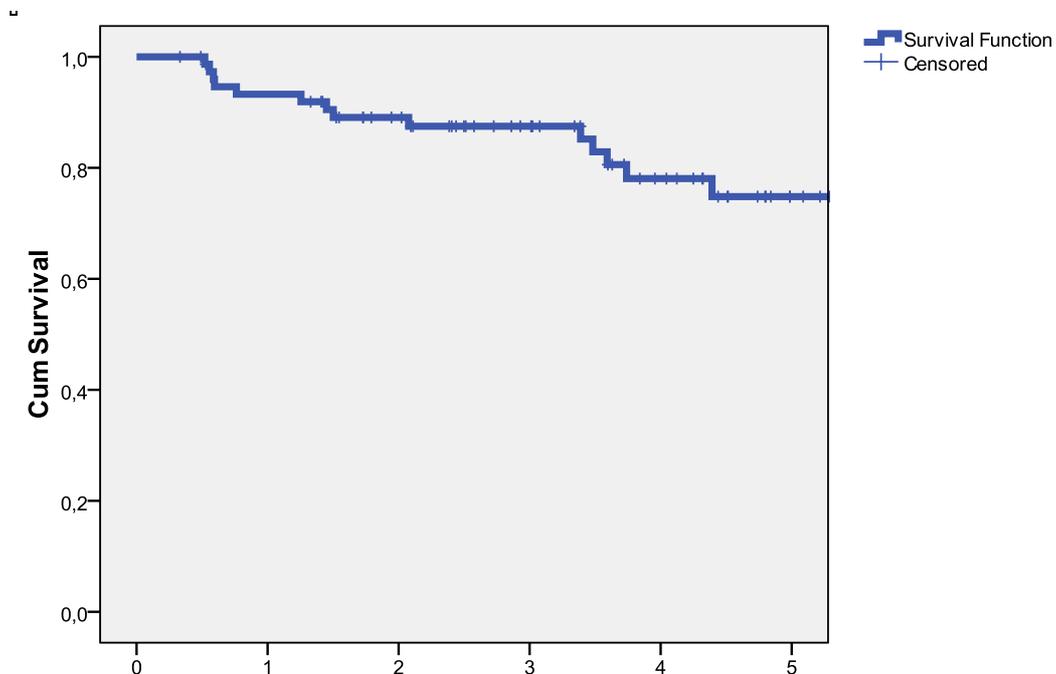


Figura 50. Supervivencia actuarial ajustada.

La supervivencia ajustada a los 5 años fue del 74.8% (IC 95%: 1.96*6.3).

En este apartado del estudio se procedió a la determinación de los niveles de expresión correspondientes a la totalidad de los componentes de la familia del NF- κ B: RelA(p65), p50(NF- κ B1), p52(NF- κ B2), RelB, y c-Rel.

Como medida indirecta de la actividad transcripcional del NF- κ B se efectuó una determinación de los valores de expresión de una batería de genes que se encuentran regulados por el NF- κ B. Las vías evaluadas incluyeron la actividad del ciclo celular (Ciclina D1), apoptosis (Bcl-XL), capacidad de invasión (MMP-2), y angiogénesis (VEGF).

3.- MANIPULACIÓN DE LAS MUESTRAS DE BIOPSIA Y DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE LOS DIFERENTES GENES EVALUADOS.

Para cada uno de los pacientes estudiados se obtuvo una muestra de tejido tumoral. En los pacientes incluidos en la primera parte del estudio, se dispuso además de una muestra de mucosa normal de vías aerodigestivas superiores obtenida de una localización alejada del tumor. Tras la obtención de las muestras se procedió a su inclusión en viales con 1 ml de solución RNALater® (Quiagen) para evitar la degradación del ARN. Las biopsias se mantuvieron a continuación a 4°C durante 24 horas, transcurridas las cuales se eliminó el RNALater® y se mantuvieron almacenadas a -80°C hasta su procesamiento.

De forma simultánea a la obtención de las muestras utilizadas en el presente estudio, se procedió a la obtención de biopsias correspondientes a tejido tumoral que fueron enviadas al departamento de Anatomía Patológica, confirmándose en la totalidad de los casos la presencia de carcinomas escamosos.

Se describe a continuación la secuencia utilizada para determinar la expresión de los genes evaluados en el presente estudio.

3.1. Aislamiento del ARN con TRIzol.

Material: - TRIzol Reagent® (Invitrogen)
- Cloroformo
- Isopropanol
- Etanol al 75% en agua
- Agua libre de RNAsa

- **Homogeneización:**

En primer lugar se añadió TRIzol® a las muestras de tejido a razón de 1ml de TRIzol® por cada 50-100 mg de tejido y se procedió a su homogeneización. Una vez homogeneizado el tejido, se procedió a eliminar el material insoluble centrifugando a 12.000 x g durante 10 min a 4°C. Se transfirió el sobrenadante a otro tubo para proseguir con la extracción del ARN.

- **Extracción del ARN:**

Para proceder a la extracción del ARN, en primer lugar se procedió a la incubación de las muestras durante 5 min a 15-30°C para permitir la completa disociación de los complejos de nucleoproteína. A continuación se añadieron 0.2 ml de cloroformo por ml de TRIzol® y se incubó de nuevo a 15-30°C durante 2-3 min. Se centrifugó la muestra a 12.000 xg durante 15 min a 4°C. Tras la centrifugación se forman dos fases: una fase inferior fenol-cloroformo, una interfase y una fase superior acuosa incolora. El ARN se encuentra exclusivamente en la fase acuosa. El volumen de la fase acuosa es aproximadamente el 60% del volumen de TRIzol® usado para la homogenización.

Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y se precipitó el ARN añadiendo 0.5 ml de isopropanol por ml de TRIzol® e incubando en un baño de agua y hielo durante 10 min. De nuevo se centrifugó a 12.000 xg a 4°C. EL ARN precipitado, no visible de forma previa al centrifugado, forma entonces un pellet en el fondo del tubo utilizado en la preparación. Se extrajo en sobrenadante y se lavó el pellet (x2) con 1 ml de etanol al 75%. Al final del proceso se procedió al secado del pellet de ARN al aire durante 5-10 min, y se disolvió en agua libre de ARNsas conservando la muestra a -80°C.

- **Determinación de la concentración y pureza del ARN:**

La concentración y pureza del ARN en disolución se determinó mediante espectrometría. Se analizó la absorbencia a 260 (A260), que permite calcular la concentración del ARN, y a 280 (A280), que permite calcular su pureza.

Los ácidos nucleicos tienen el máximo de absorción a 260 nm, por lo tanto a esta longitud de onda la absorción es proporcional a la concentración. La concentración del ARN se calculó utilizando el coeficiente de extinción del ARN. La A260 de una solución de ARN a la concentración de 40 µg/ml cuando la luz pasa por un camino óptico de un cm es 1, por lo tanto la concentración de ARN en µg/ml se calculó multiplicando la A260 por 40.

Los ácidos nucleicos durante la extracción van acompañados de proteínas que absorben a 280 nm. La relación de absorbencias 260/280 nm indica la pureza y en el caso del ARN debe ser ≥ 2.0 .

3.2. Cuantificación de la expresión del ARN mediante Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).

La RT-PCR es una técnica que permite la determinación de la expresión de un gen determinado. Se basa en la síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir del ARN mediante la reacción con transcriptasa inversa (transcripción inversa, RT) y la posterior amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Fig 51).

El análisis de la expresión del ARNm de las distintas proteínas se realizó por PCR cuantitativa o PCR en tiempo real (RT-q-PCR). Esta técnica, al contrario a la detección a punto final de la RT-PCR convencional, permite amplificar y simultáneamente cuantificar el producto de la amplificación.

La PCR cuantitativa se realiza en un termociclador con capacidad de hacer incidir sobre cada muestra un haz de luz de una longitud de onda determinada y de detectar la fluorescencia emitida por un fluorocromo excitado. En esta técnica se monitoriza la fluorescencia emitida durante la reacción de amplificación lo que representa la producción de amplicón durante cada ciclo.

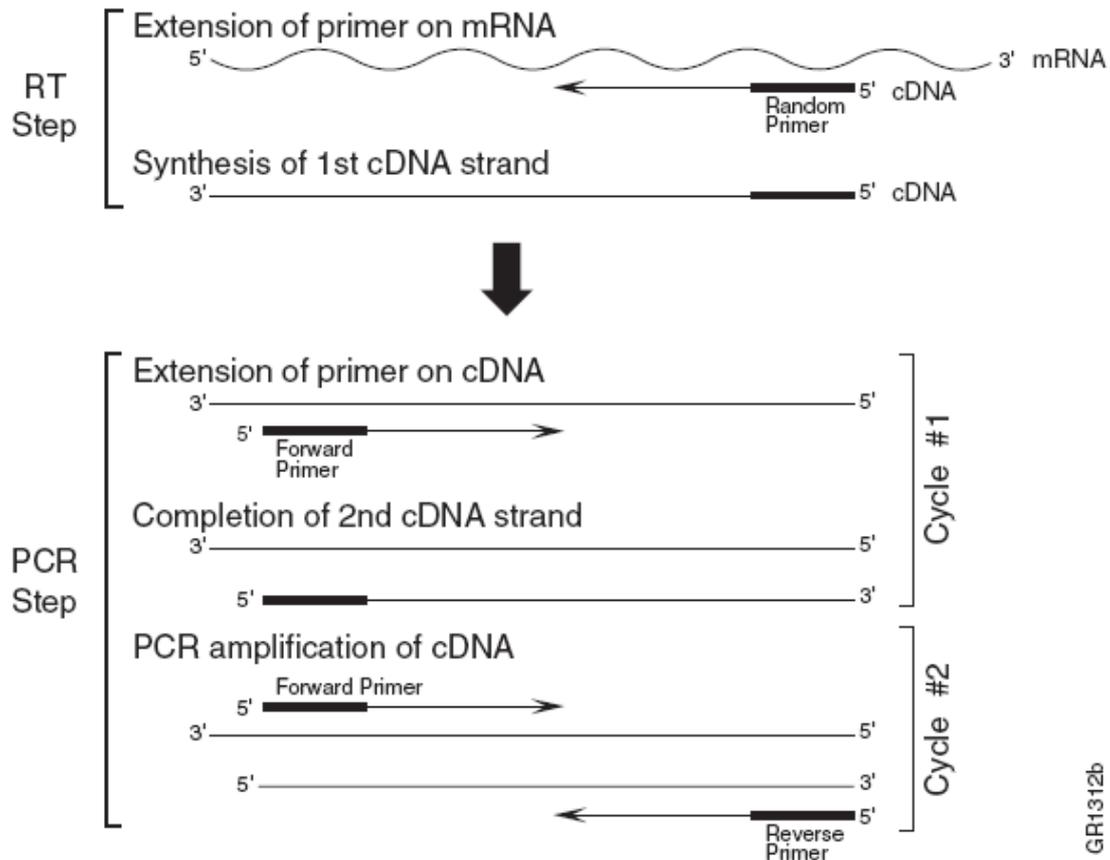


Figura 51. RT-PCR.

- **Transcripción inversa:**

Material: High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit®, Applied Biosystems

La transcripción inversa se realizó utilizando el KIT "High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit". La transcriptasa inversa sintetiza una cadena de ADN complementaria (ADNc) a la molécula de ARN a partir de un cebador. Este kit utiliza cebadores random para iniciar la síntesis de ADNc. Los cebadores random aseguran que la síntesis de la primera hebra ocurra eficientemente con todas las especies de ARN presentes.

El kit contiene los reactivos que combinados rinden una mezcla de reacción 2X. A esta mezcla se le añade un volumen igual de ARN. Para preparar la mezcla de reacción 2X para un volumen de reacción de 20 µl se utilizan los siguientes reactivos (Tabla 16):

Componente	Volumen (μ l) por reacción
Tampón de RT 10X	2.0
Mezcla de dNTP 25X (100mM)	0.8
Cebadores Random 10X	2.0
Transcriptasa Inversa	1.0
Inhibidor de RNAsas	1.0
H2O libre de Nucleasas	3.2
Total por reacción	10.0

Tabla 16. Reactivos que contiene cada 10 μ l de mezcla de reacción.

A cada 10 μ l de mezcla de reacción se le añadió 1 μ g de ARN disuelto en 10 μ l de H₂O y se procedió a la transcripción inversa en el termociclador. Las condiciones del ciclo para la retrotranscripción se reflejan en la tabla 17.

CONDICIONES del CICLO	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
TEMPERATURA	25°C	37°C	85°C	4°C
TIEMPO	10 min	120 min	5 min	∞

Tabla 17. Condiciones del ciclo para la retrotranscripción.

Finalizada la reacción de retrotranscripción, se extrajeron las muestras del termociclador y se guardaron a -80°C hasta su procesamiento.

- **Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RT-q-PCR):**

Material: - TaqMan 2X Universal PCR Master Mix®, Applied Biosystems
 - Gene Expression Assays®, Applied Biosystems

La PCR a tiempo real, igual que la PCR convencional, emplea un molde de ADNc, cebadores específicos (oligonucleótidos complementarios a una región determinada del ARN molde), desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) y ADN-polimerasa termoestable (Taq-polimerasa), pero además una sonda unida a un fluorocromo (FAM o VIC) que hibrida en el amplicón en la zona intermedia entre el cebador directo (forward) y el inverso (reverse).

Como cebadores para el presente estudio se utilizaron los TaqMan® Gene Expression Assays, que son un conjunto de cebadores y sonda optimizados para RT-q-PCR formulados a una concentración 20X.

Cada ensayo contiene tres oligonucleótidos con dianas específicas:

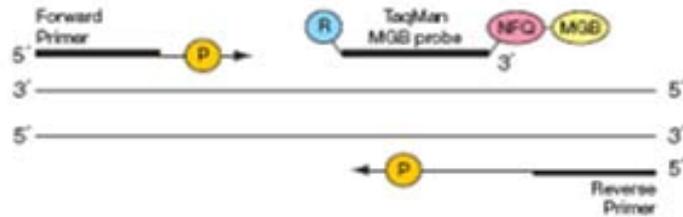
- Un par de cebadores no marcados.
- Una sonda TaqMan® que en el extremo 5' está marcada fluorescente con FAM™ (o VIC®) y contiene una porción minor groove binder (MGB), que incrementa la temperatura de fusión de la sonda sin incrementar la longitud, lo que permite sondas más cortas, y en el extremo 3' contiene un amortiguador de fluorescencia no fluorescente (NFQ).

La RT-q-PCR usando TaqMan Gene Expression Assays se basa en la actividad 5' exonucleasa de la ADN-polimerasa:

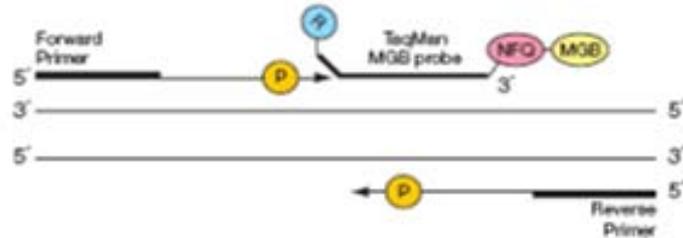
- Las sondas TaqMan hibridan en el ADNc molde entre los dos cebadores no marcados. La señal fluorescente en el extremo 5' de la sonda es amortiguada por el NFQ del extremo 3' mediante transferencia de energía de resonancia (FRET, mecanismo de transferencia de energía entre cromóforos).
- Durante la PCR, la Taq polimerasa alarga los cebadores no marcados usando el ADNc como molde. Cuando la polimerasa alcanza la sonda TaqMan la hidroliza por su actividad exonucleasa, lo que provoca la separación del fluorocromo del amortiguador y por tanto la emisión de fluorescencia. El equipo detecta la fluorescencia emitida que está relacionada con la cantidad de amplicón producido.
- En cada ciclo de PCR se liberan moléculas de fluorocromo, resultando en un incremento de la intensidad de fluorescencia, proporcional a la cantidad de amplicón sintetizado.

La TaqMan 2X Universal PCR Master Mix®, es una mezcla de los reactivos (excepto cebadores, sondas y molde) necesarios para realizar RT-q-PCR. La mezcla contiene la Taq-polimerasa, dNTPs, ROX™ que es un fluorocromo referencia interna que sirve para normalizar la señal del reportero durante el análisis para mejorar la precisión, (corrige las fluctuaciones causadas por cambios en concentración, volumen o efectos de la muestra) y tampones adecuados para la reacción.

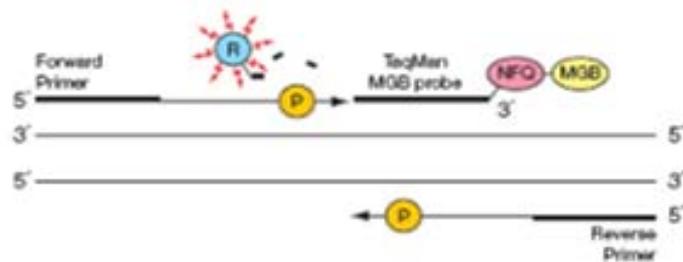
Polymerization



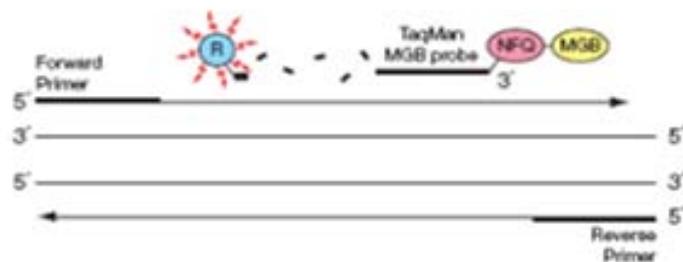
Strand displacement



Cleavage



Completion of polymerization



- = Nonfluorescent quencher
- = Minor groove binder
- = Reporter
- = AmpliTaq Gold DNA Polymerase, UP

Figura 52. Esquema PCR.

Para preparar la reacción de un volumen de 10 µl:

COMPONENTE	Volumen (µl) por Reacción
<i>20X TaqMan® Gene Expression Assays</i>	0.5
<i>2X TaqMan Universal PCR Master Mix@</i>	5.0
ADNc diluido	4.5

Tabla 18.

Las condiciones de ciclo fueron:

	Holding State	Holding State	Cycling State 40 cycles	
Temperature	50°C	95°C	95°C	60°C
Time	2 min	10 min	00:15 min	1 min
	Step 1	Step 1	Step 1	Step 2

Tabla 19. Condiciones de ciclo.

La curva de amplificación contiene la información para la cuantificación del ARN. La línea umbral (Threshold) es el nivel de detección o punto en el que la reacción alcanza una intensidad de fluorescencia por encima del ruido de fondo. Se sitúa en la fase exponencial de la amplificación. El ciclo en el cual la muestra alcanza este nivel se llama ciclo umbral (C_t). Este valor es el que se utiliza para realizar la cuantificación.

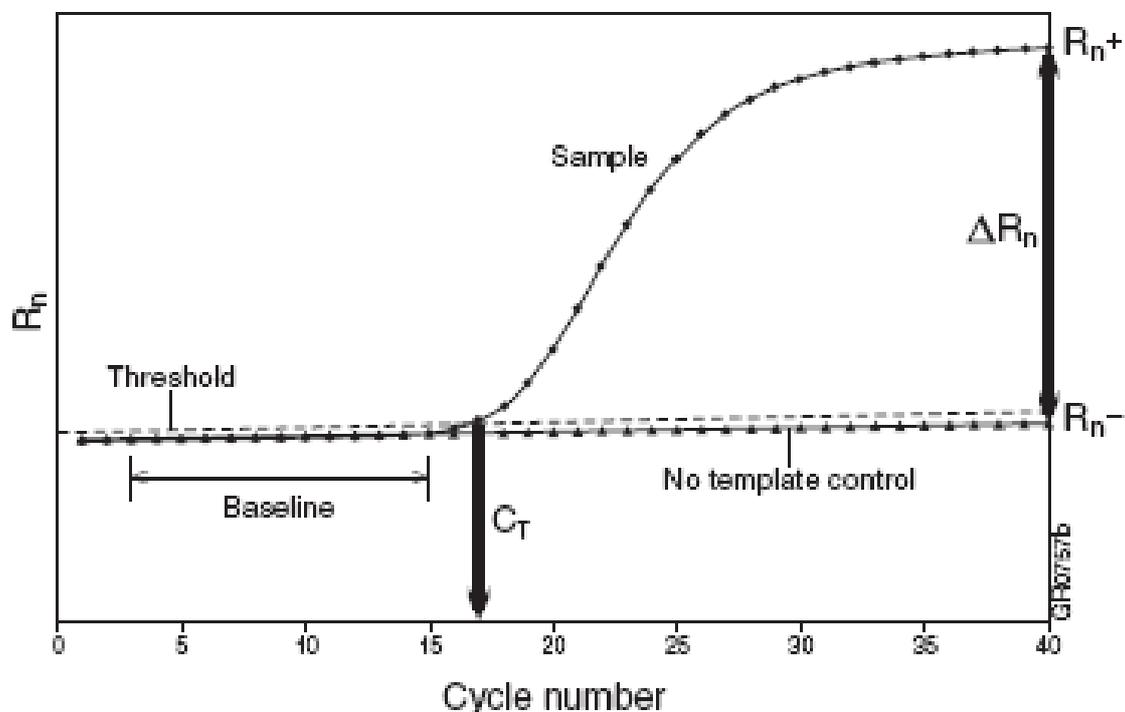


Figura 53. Medida de la expresión mediante RT-PCR.

Se realizó una cuantificación relativa, que no requiere curva de calibrado. La cuantificación relativa se basa en la comparación entre el nivel de expresión del

gen a estudiar *versus* un gen control (también llamado de referencia, interno o normalizado o, en inglés, *housekeeping gene*) que es considerado constante.

Se utilizó la fórmula:

$$2^{-\Delta C}$$

Donde ΔC se calcula:

$$\Delta C_T = C_{T \text{ gen diana}} - C_{T \text{ gen referencia}}$$

Como gen de referencia se usó la beta-actina, de manera que los resultados obtenidos ofrecen la expresión relativa del gen diana respecto a la beta-actina.

4.- TÉCNICAS ESTADÍSTICAS.

El estudio estadístico se realizó con el programa SPSS 17.0 para Windows.

4.1. Análisis de la expresión del NF- κ B en los carcinomas de cabeza y cuello.

Se procedió en primer lugar a realizar un estudio descriptivo de los valores de expresión del NF- κ B correspondientes al tejido tumoral y a la mucosa sana mediante estadísticos de tendencia central y el rango. Se confirmó la ausencia de una distribución normal mediante el test de Kolmogorov-Smirnof.

Las comparaciones en función de las diferentes variables consideradas se realizaron de acuerdo con los niveles de significación obtenidos con técnicas no paramétricas. Para la comparación de los niveles de expresión del NF- κ B entre el tejido tumoral y la mucosa sana se utilizó el test de Wilcoxon para medidas repetidas. La valoración de los niveles de expresión del NF- κ B en el tumor en relación a las diferentes variables clínicas consideradas se llevó a cabo utilizando la prueba U de Mann-Whitney en caso de variables

dicotómicas, y el test de Kruskal-Wallis en el caso de variables con más de dos categorías.

La correlación entre los niveles de expresión del NF- κ B y los genes relacionados con su actividad se realizó de acuerdo con los valores del coeficiente de correlación r de Pearson, considerando los valores de 0.4-0.6 como de correlación moderada, de 0.6-0.8 como de correlación alta, y de 0.8-1.0 como de correlación muy alta.

4.2. Estudio de la capacidad pronóstica de la expresión del NF- κ B.

En la evaluación del significado clínico de los valores de expresión del NF- κ B, la categorización de la variable continua correspondiente al valor de expresión se realizó de acuerdo con los resultados obtenidos con un análisis de partición recursiva, utilizando la técnica *de classification and regression trees* (CRT).

La supervivencia actuarial libre de recidiva local de la enfermedad y la supervivencia ajustada se calcularon de acuerdo con el método de Kaplan-Meier, utilizando el test log-rank para la comparación entre las curvas de supervivencia. Para la realización de los análisis multivariantes se utilizó el modelo de riesgos proporcionales de Cox.

Las correlaciones entre los niveles de expresión del NF- κ B y los genes relacionados con su actividad se realizaron de acuerdo con los valores del coeficiente de correlación r de Pearson, considerando los valores de 0.4-0.6 como de correlación moderada, de 0.6-0.8 como de correlación alta, y de 0.8-1.0 como de correlación muy alta.

VI. Resultados

1.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL NF-κB EN LOS CARCINOMAS DE CABEZA Y CUELLO.

1.1.- Relación entre la expresión del p65 (NF-κB) en las muestras de tumor y de mucosa sana.

No se dispuso de información referente a los valores de expresión del p65 (NF-κB) en la mucosa sana de dos de los pacientes incluidos en el presente estudio.

La tabla 20 muestra los valores de tendencia central y el rango correspondiente a las determinaciones de los valores de expresión del NF-κB obtenidos en muestras de tumor y de mucosa sana.

EXPRESIÓN del NF-κB	N	Media	Desv. Std	Mediana	Mínimo	Máximo
Tumor	76	0,2253	0,3784	0,1176	,0436	2,5722
Mucosa sana	74	0,3534	0,8180	0,1129	,0458	5,6480

Tabla 20. Expresión del NF-κB en muestras de tumor y de mucosa sana.

La distribución de los valores del p65 (NF-κB) tanto a nivel del tejido tumoral como de la mucosa sana no cumplió los criterios correspondientes a una distribución normal (test de Kolmogorov-Smirnof), lo que condicionó la conveniencia en la utilización de técnicas no paramétricas para el análisis estadístico de nuestros resultados.

DISTRIBUCIÓN de los valores del NF-κB	Tumor	Mucosa sana
N	76	74
Test de Kolmogorov-Smirnof	2,970	3,058
Asymp. Sig. (2-tailed)	0,000	0,000

Tabla 21. Distribución de los valores del p65 (NF-κB) a nivel tumoral y mucosa sana.

Los histogramas (Fig 54 y 55) muestran la distribución de los valores de expresión del p65 (NF- κ B) correspondientes al tejido tumoral y mucosa sana analizados.

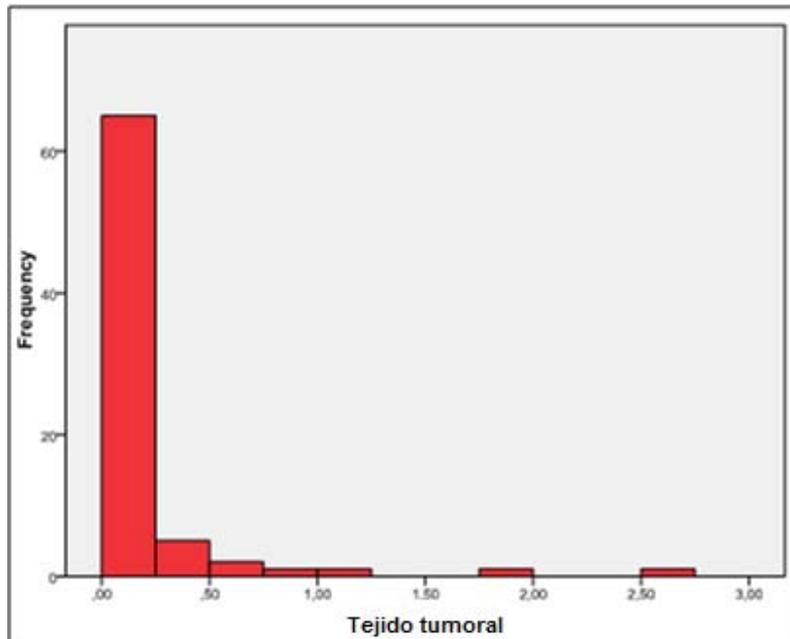


Figura 54. Distribución de los valores de expresión del NF- κ B en tejido tumoral.

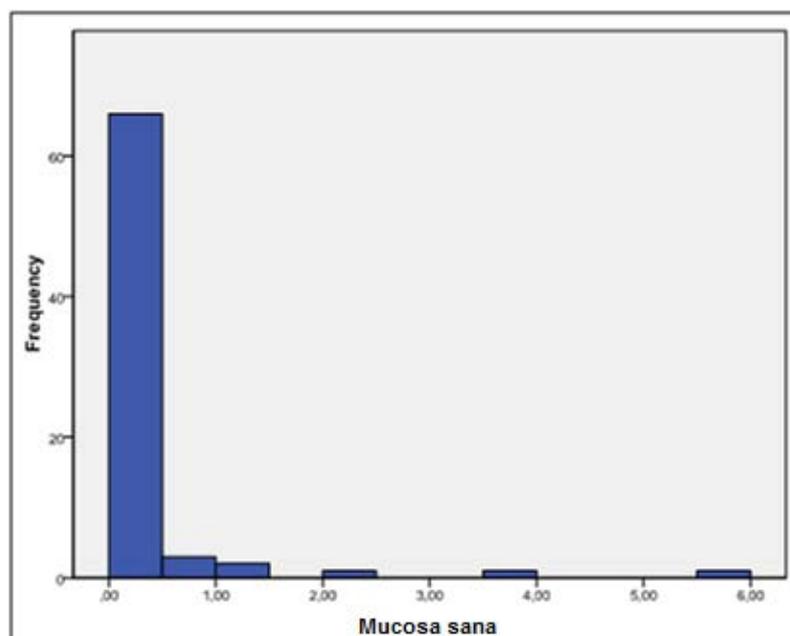


Figura 55. Distribución de los valores de expresión del NF- κ B en mucosa sana.

En primer lugar se compararon los valores de expresión correspondientes al p65 (NF- κ B) entre el tumor y la mucosa sana. El boxplot muestra los valores de expresión del p65 (NF- κ B) en las muestras de tumor y mucosa sana (Fig 56).

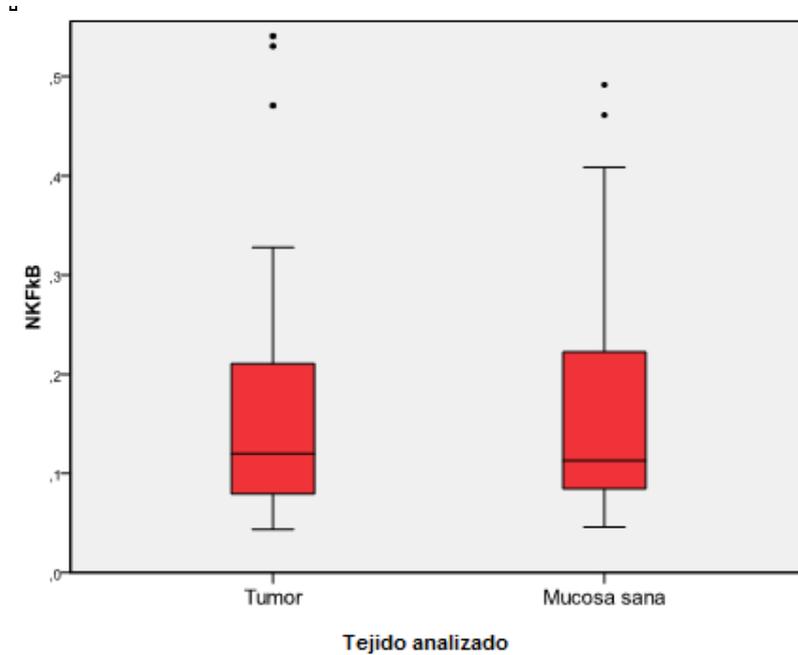


Figura 56. Comparación de la expresión del NF- κ B en tejido tumoral y mucosa sana.

No existieron diferencias significativa en la expresión del p65 (NF- κ B) entre las muestras de tumor y las de la mucosa sana (test de Wilcoxon para medidas repetidas $P=0.692$).

En el siguiente diagrama (Fig 57) se muestra la correlación existente entre los valores de expresión del p65 (NF- κ B) del tumor y la mucosa sana correspondiente. Dada la ausencia de normalidad en la distribución de los resultados, se procedió a realizar una transformación logarítmica de los datos.

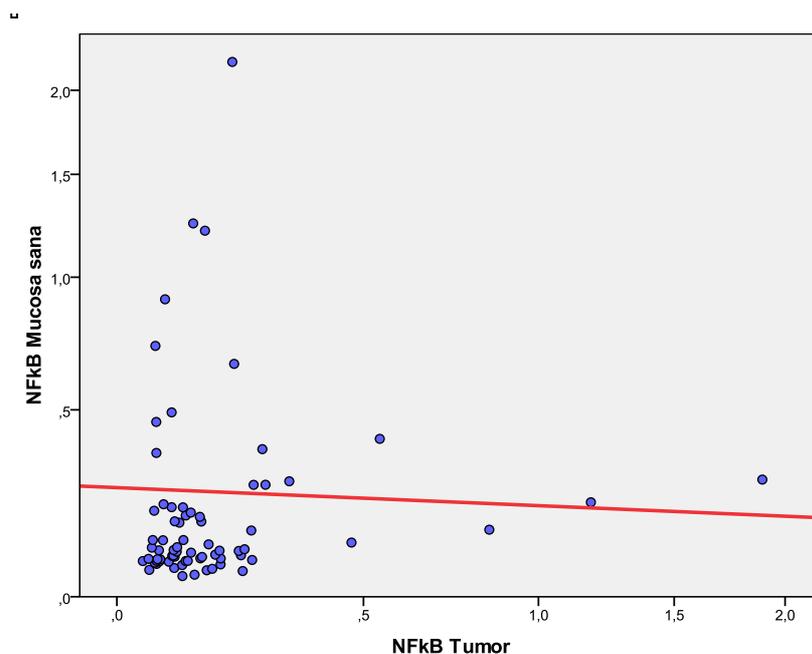


Figura 57. Correlación entre la expresión del NF-κB en tejido tumoral y mucosa sana.

No existió una correlación entre los valores de expresión del p65 (NF-κB) en la muestra del tumor y la mucosa sana. El valor correspondiente a coeficiente de correlación de Pearson fue de -0.056 (P=0.636)

1.2.- Relación entre los valores de expresión del p65 (NF-κB) y variables clínicas en pacientes con carcinomas escamosos de cabeza y cuello.

Se procedió a continuación a valorar la existencia de relación entre los niveles de expresión del p65 (NF-κB) y variables clínicas como la localización primaria del tumor, la categoría de extensión local o regional, el estadiaje tumoral o el antecedente en los consumos de tabaco y alcohol por parte de los pacientes. De cara a aumentar la potencia del estudio estadístico, se procedió a la agrupación de categorías para cada una de las variables analizadas.

A) Localización primaria del tumor.

Se apreció una tendencia según la cual los tumores localizados en cavidad oral-orofaríngea contaron con unos niveles de expresión más elevados del p65 (NF-κB) que los de localización laríngea-hipofaríngea (test U de Mann-Whitney,

P=0.086). La siguiente figura (Fig 58) muestra la distribución en los valores del p65 (NF-κB) en función de la localización primaria del tumor.

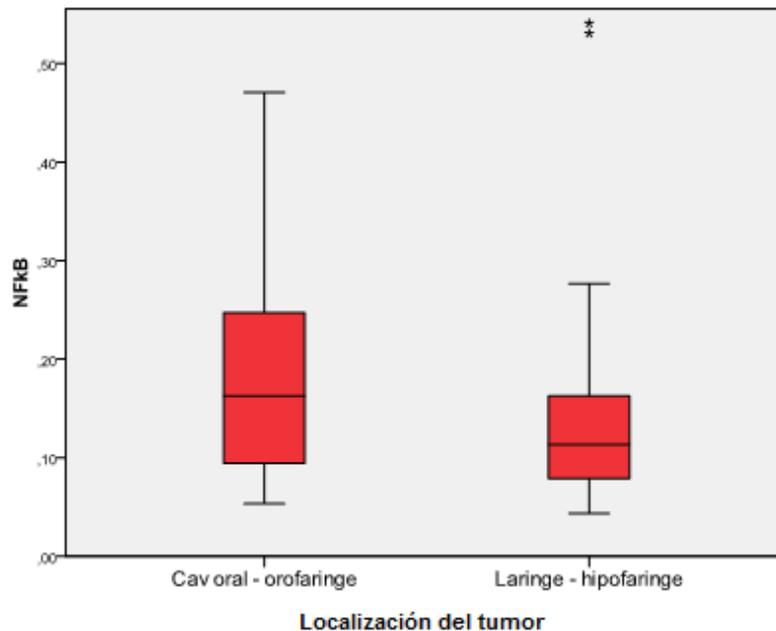


Figura 58. Expresión del p65 (NF-κB) en tumores localizados en cavidad oral-orofaringe y localizados en laringe-hipofaringe.

B) Categoría de extensión local (T).

No existieron diferencias significativas en los valores de expresión del p65 (NF-κB) en función de la categoría de extensión local del tumor (T1-2 vs T3-4) (test U de Mann-Whitney, P=0.872). La siguiente figura (Fig 59) muestra la distribución de los valores de expresión del p65 (NF-κB) en función de la extensión local de la enfermedad.

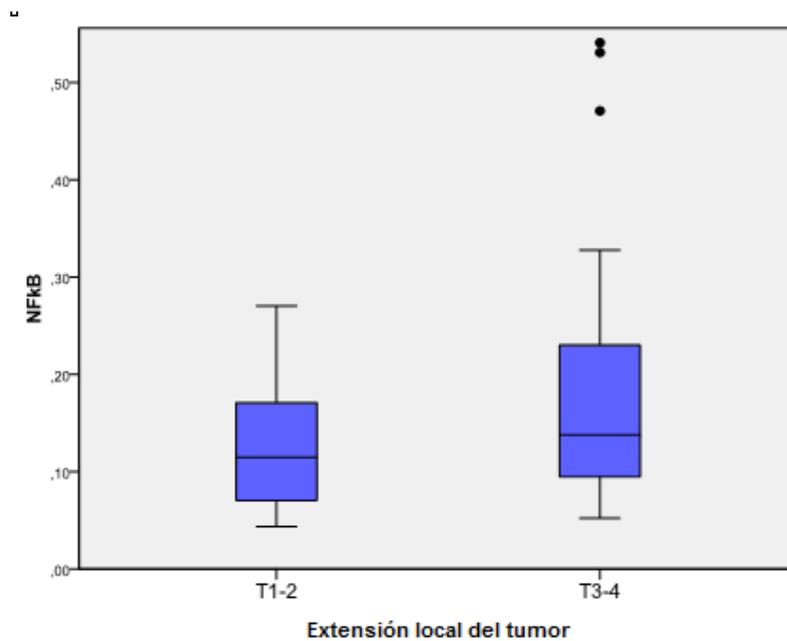


Figura 59. Expresión del p65 (NF-κB) en función de la extensión local del tumor.

C) Categoría de extensión regional (N).

Igualmente, no aparecieron diferencias significativas en los valores de expresión del p65 (NF-κB) en función de la categoría de extensión regional del tumor (N0 vs N+) (test U de Mann-Whitney, $P=0.293$). La siguiente figura (Fig 60) muestra la distribución de los valores de expresión del p65 (NF-κB) en función de la extensión regional de la enfermedad.

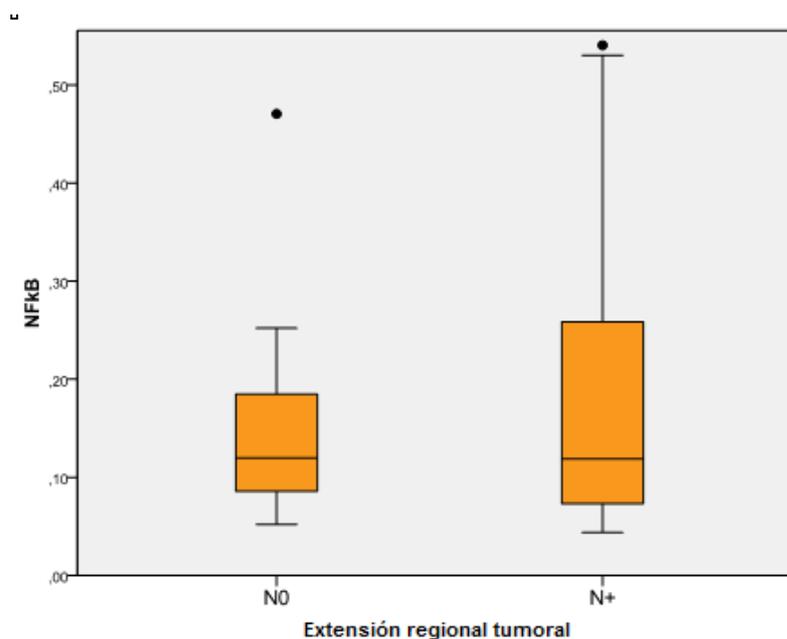


Figura 60. Expresión del p65 (NF-κB) en función de la extensión regional tumoral.

D) Estadaje de la enfermedad.

No existieron diferencias significativas en los valores de expresión del p65 (NF- κ B) en función del estadio de la enfermedad (I-II vs III-IV) (test U de Mann-Whitney, $P=0.753$). La siguiente figura (Fig 61) muestra la distribución de los valores de expresión del p65 (NF- κ B) en función del estadiaje del tumor.

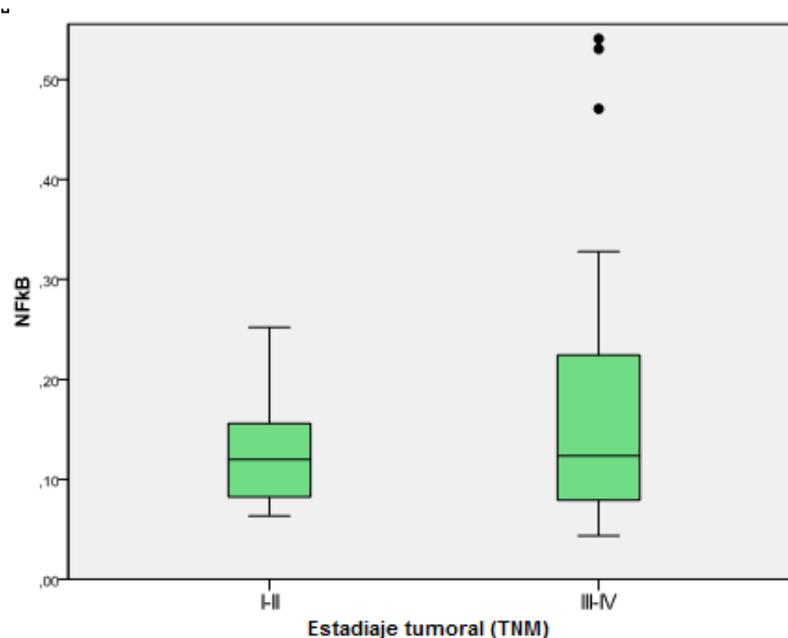


Figura 61. Expresión del p65 (NF- κ B) en función del estadiaje tumoral (TNM).

E) Consumo de tabaco.

En relación al consumo previo de tabaco, no existieron diferencias significativas en los valores de expresión del p65 (NF- κ B) en función de los niveles previos de consumo (no consumo vs < 20 cigarrillos/día vs >20 cigarrillos/día) (test de Kruskal-Wallis, $P=0.251$). La siguiente figura (Fig 62) muestra la distribución de los valores de expresión del p65 (NF- κ B) en función del consumo previo de tabaco.

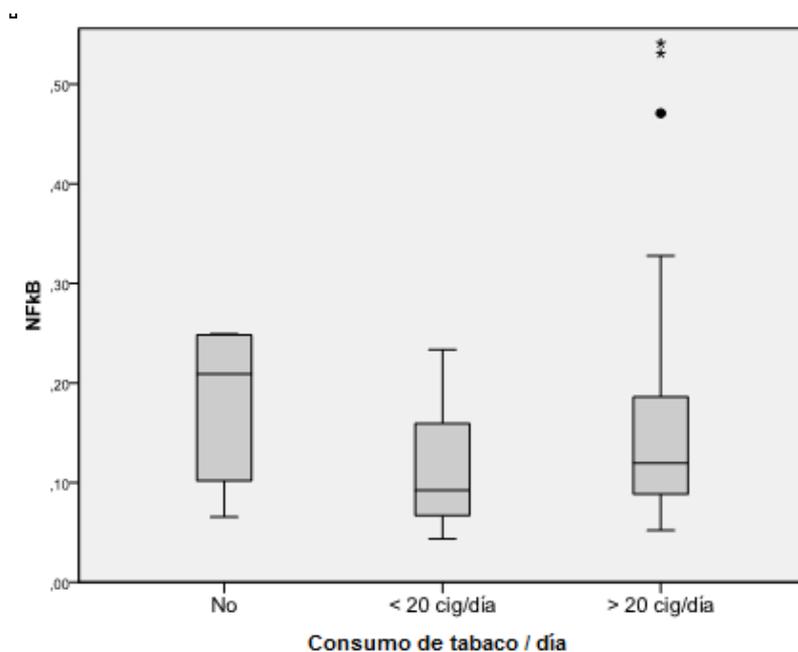


Figura 62. Expresión del p65 (NF-κB) en función del consumo de tabaco/día.

F) Consumo de alcohol.

Tampoco aparecieron diferencias significativas en los valores de expresión del p65 (NF-κB) en función de los niveles previos de consumo de alcohol (no consumo vs < 80 gr/día vs >80 gr/día) (test de Kruskal-Wallis, P=0.436). La siguiente figura (Fig 63) muestra la distribución de los valores de expresión del p65 (NF-κB) en función del consumo previo de alcohol.

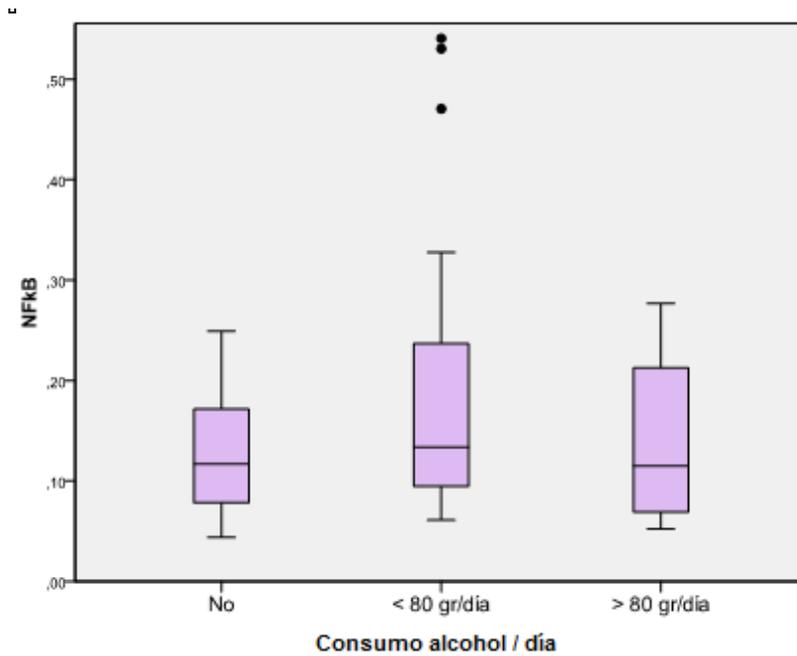


Figura 63. Expresión del p65 (NF-κB) en relación con el consumo de alcohol diario.

G) Grado histológico.

Finalmente, no aparecieron diferencias significativas al analizar los niveles de expresión del p65 (NF-κB) en función del grado histológico del tumor (test de Kruskal-Wallis, $P=0.904$). La siguiente figura (Fig 64) muestra la distribución de los valores del p65 (NF-κB) en función de las categorías de diferenciación histológica de los tumores incluidos en el presente estudio.

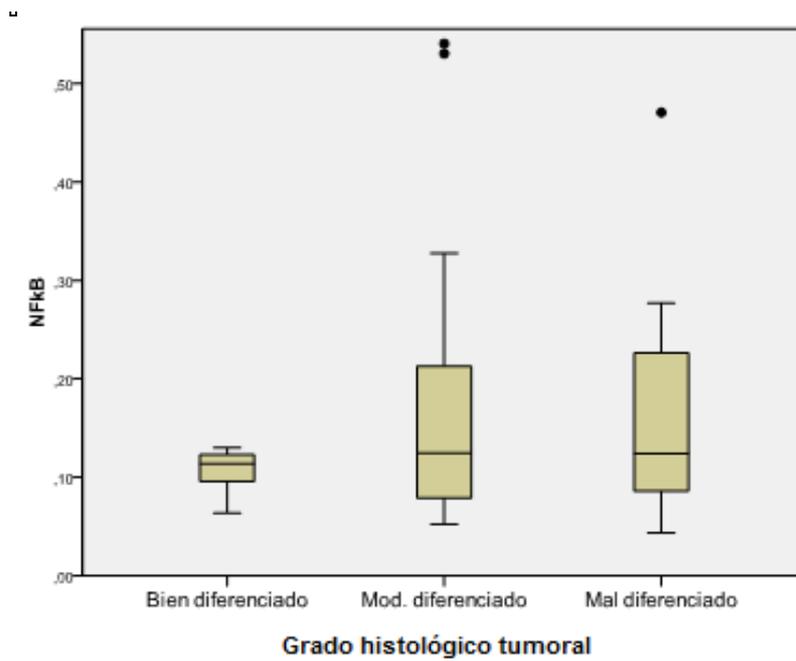


Figura 64. Expresión del p65 (NF-κB) en función del grado histológico del tumor.

1.3.- Relación entre los valores de expresión del p65 (NF-κB) y los correspondientes a otros genes implicados en sus vías de señalización en las muestras de tumor.

Se llevó a cabo un análisis de los niveles de correlación existentes en las muestras de tumor entre la expresión del p65 (NF-κB) y los valores correspondientes a otros genes implicados en las vías metabólicas relacionadas con la actividad del p65 (NF-κB).



A) Coeficientes de correlación entre la expresión del p65 (NF-κB) y los niveles correspondientes a genes implicados en el metabolismo de la PGE₂.

		NFκB	COX-1	COX-2	mPGES-1	mPGES-2	cPGES	EP-2	EP-3	EP-4	PGDH-15
NFκB	Pearson Correlation	1	,595**	,165	,552**	,886**	,470**	,685**	,525**	,882**	,405**
	Sig. (2-tailed)		,000	,155	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000
COX-1	Pearson Correlation	,595**	1	,389**	,693**	,426**	,218	,398**	,329**	,373**	,381**
	Sig. (2-tailed)	,000		,001	,000	,000	,059	,000	,004	,001	,001
COX-2	Pearson Correlation	,165	,389**	1	,417**	,154	,206	,307**	,254*	,104	,302**
	Sig. (2-tailed)	,155	,001		,000	,185	,075	,007	,027	,372	,008
mPGES-1	Pearson Correlation	,552**	,693**	,417**	1	,534**	,520**	,723**	,551**	,402**	,556**
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000		,000	,000	,000	,000	,000	,000
mPGES-2	Pearson Correlation	,886**	,426**	,154	,534**	1	,757**	,953**	,763**	,923**	,561**
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,185	,000		,000	,000	,000	,000	,000
cPGES	Pearson Correlation	,470**	,218	,206	,520**	,757**	1	,875**	,971**	,576**	,838**
	Sig. (2-tailed)	,000	,059	,075	,000	,000		,000	,000	,000	,000
EP-2	Pearson Correlation	,685**	,398**	,307**	,723**	,953**	,875**	1	,891**	,771**	,827**
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,007	,000	,000	,000		,000	,000	,000
EP-3	Pearson Correlation	,525**	,329**	,254*	,551**	,763**	,971**	,891**	1	,604**	,882**
	Sig. (2-tailed)	,000	,004	,027	,000	,000	,000	,000		,000	,000
EP-4	Pearson Correlation	,882**	,373**	,104	,402**	,923**	,576**	,771**	,604**	1	,379**
	Sig. (2-tailed)	,000	,001	,372	,000	,000	,000	,000	,000		,001
PGDH-15	Pearson Correlation	,405**	,381**	,302**	,556**	,561**	,838**	,827**	,882**	,379**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	,001	,008	,000	,000	,000	,000	,000	,001	

Tabla 22. Coeficientes de correlación entre la expresión del p65 (NF-κB) y los niveles de genes implicados en el metabolismo de la PGE₂.

B) Coeficientes de correlación entre la expresión del p65 (NF-κB) y los niveles correspondientes a genes implicados en el metabolismo de las metaloproteinasas (MMP).

		NFκB	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-9	MMP-10	MMP-13	TIMP-1
NFκB	Pearson	1	,685**	,891**	,549**	,753**	,510**	,387**	,730**
	Sig. (2-tailed)		,000	,000	,000	,000	,000	,001	,000
MMP-1	Pearson	,685**	1	,707**	,911**	,423**	,526**	,339**	,608**
	Sig. (2-tailed)	,000		,000	,000	,000	,000	,003	,000
MMP-2	Pearson	,891**	,707**	1	,543**	,718**	,313**	,325**	,656**
	Sig. (2-tailed)	,000	,000		,000	,000	,006	,004	,000
MMP-3	Pearson	,549**	,911**	,543**	1	,295**	,401**	,255*	,497**
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000		,010	,000	,026	,000
MMP-9	Pearson	,753**	,423**	,718**	,295**	1	,343**	,250*	,519**
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,010		,002	,029	,000
MMP-10	Pearson	,510**	,526**	,313**	,401**	,343**	1	,727**	,746**
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,006	,000	,002		,000	,000
MMP-13	Pearson	,387**	,339**	,325**	,255*	,250*	,727**	1	,617**
	Sig. (2-tailed)	,001	,003	,004	,026	,029	,000		,000
TIMP-1	Pearson	,730**	,608**	,656**	,497**	,519**	,746**	,617**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	

Tabla 23. Coeficientes de correlación entre la expresión del p65 (NF-κB) y los niveles correspondientes a genes implicados en el metabolismo de las metaloproteinasas (MMP).



C) Coeficientes de correlación entre la expresión del p65 (NF- κ B) y los niveles correspondientes a genes implicados en el metabolismo de quimioquinas o sus receptores.

		NFkB	IL_1a_T	IL_1b_T	IL_1ra_T	IL_1R1_T	IL_1R2_T	IL_1RAcP_T
NFkB	Pearson Correlation	1	,225	,280*	,365**	,618**	,303*	,641**
	Sig. (2-tailed)		,068	,022	,003	,000	,013	,000
IL_1a_T	Pearson Correlation	,225	1	,929**	,767**	,595**	,916**	,754**
	Sig. (2-tailed)	,068		,000	,000	,000	,000	,000
IL_1b_T	Pearson Correlation	,280*	,929**	1	,723**	,633**	,900**	,752**
	Sig. (2-tailed)	,022	,000		,000	,000	,000	,000
IL_1ra_T	Pearson Correlation	,365**	,767**	,723**	1	,708**	,822**	,772**
	Sig. (2-tailed)	,003	,000	,000		,000	,000	,000
IL_1R1_T	Pearson Correlation	,618**	,595**	,633**	,708**	1	,660**	,901**
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000		,000	,000
IL_1R2_T	Pearson Correlation	,303*	,916**	,900**	,822**	,660**	1	,829**
	Sig. (2-tailed)	,013	,000	,000	,000	,000		,000
IL_1RAcP_T	Pearson Correlation	,641**	,754**	,752**	,772**	,901**	,829**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000	,000	,000	
	N	67	67	67	66	67	67	67

Tabla 24. Coeficientes de correlación entre la expresión del p65 (NF- κ B) y los niveles correspondientes a genes implicados en el metabolismo de quimioquinas o sus receptores.

D) Coeficientes de correlación entre la expresión del p65 (NF-κB) y los niveles correspondientes a genes implicados en el metabolismo de quimioquinas o sus receptores.

		NFκB	sdf-1	cxcr-4	cxcr-7	IL-8	RANTES	GCP-2	MCP-1	GRO-1α	NAP-2
NFκB	Pearson Correlation	1	,795**	,515**	,416**	,312**	,461**	,232*	,351**	,336**	,438**
	Sig. (2-tailed)		,000	,000	,000	,006	,000	,045	,002	,003	,000
sdf-1	Pearson Correlation	,795**	1	,401**	,319**	,512**	,372**	,101	,306**	,348**	,407**
	Sig. (2-tailed)	,000		,000	,005	,000	,001	,387	,007	,002	,000
cxcr-4	Pearson Correlation	,515**	,401**	1	,368**	,333**	,314**	,179	,507**	,271*	,474**
	Sig. (2-tailed)	,000	,000		,001	,003	,006	,123	,000	,018	,000
cxcr-7	Pearson Correlation	,416**	,319**	,368**	1	,252*	,562**	,285*	,793**	,442**	,738**
	Sig. (2-tailed)	,000	,005	,001		,028	,000	,013	,000	,000	,000
IL-8	Pearson Correlation	,312**	,512**	,333**	,252*	1	,182	,440**	,366**	,637**	,226
	Sig. (2-tailed)	,006	,000	,003	,028		,116	,000	,001	,000	,050
RANTES	Pearson Correlation	,461**	,372**	,314**	,562**	,182	1	,133	,442**	,239*	,471**
	Sig. (2-tailed)	,000	,001	,006	,000	,116		,255	,000	,038	,000
GCP-2	Pearson Correlation	,232*	,101	,179	,285*	,440**	,133	1	,370**	,736**	,112
	Sig. (2-tailed)	,045	,387	,123	,013	,000	,255		,001	,000	,339
MCP-1	Pearson Correlation	,351**	,306**	,507**	,793**	,366**	,442**	,370**	1	,601**	,907**
	Sig. (2-tailed)	,002	,007	,000	,000	,001	,000	,001		,000	,000
GRO-1α	Pearson Correlation	,336**	,348**	,271*	,442**	,637**	,239*	,736**	,601**	1	,352**
	Sig. (2-tailed)	,003	,002	,018	,000	,000	,038	,000	,000		,002
NAP-2	Pearson Correlation	,438**	,407**	,474**	,738**	,226	,471**	,112	,907**	,352**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000	,050	,000	,339	,000	,002	

Tabla 25. Coeficientes de correlación entre la expresión del p65 (NF-κB) y los niveles correspondientes a genes implicados en el metabolismo de quimioquinas o sus receptores.

E) Coeficientes de correlación entre la expresión del p65 (NF-κB) y los niveles correspondientes a genes de factores de crecimiento y de transcripción relacionados con la angiogénesis.

		NF-κB	VGEF	HIF-1α
NFκB	Pearson Correlation	1	,622**	,710**
	Sig. (2-tailed)		,000	,000
VGEF	Pearson Correlation	,622**	1	,773**
	Sig. (2-tailed)	,000		,000
HIF-1α	Pearson Correlation	,710**	,773**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	

Tabla 26. Coeficientes de correlación entre la expresión del p65 (NF-κB) y los niveles correspondientes a genes de factores de crecimiento y de transcripción relacionados con la angiogénesis.

La siguiente tabla (Tabla 27) enumera aquellos genes que alcanzaron unos niveles de correlación muy elevada (valor del coeficiente de correlación de Pearson entre 0.8 y 1) con el p65 (NF-κB).

GEN	Coeficiente de correlación
MMP-2	0.891
mPGES-2	0.886
EP-4	0.882

Tabla 27. Genes con una correlación muy elevada con el p65 (NF-κB).

Los genes que mantuvieron unos coeficientes de correlación elevada (valor del coeficiente de correlación de Pearson entre 0.6 y 0.8) se muestran en la siguiente tabla (Tabla 28).

GEN	Coefficiente de correlación
Sdf-1	0.795
MMP-9	0.753
TIMP-1	0.730
HIF-1 α	0.710
EP-2	0.685
MMP-1	0.685
IL-1RAcp	0.641
VEGF	0.622
IL-1R1	0.618

Tabla 28. Genes con un coeficiente de correlación elevado con el p65 (NF- κ B).

Finalmente, la siguiente tabla (Tabla 29) muestra los genes que mantuvieron unos niveles de correlación moderada (valor del coeficiente de correlación de Pearson entre 0.4 y 0.6) con el p65 (NF- κ B).

GEN	Coefficiente de correlación
COX-1	0.595
mPGES-1	0.552
MMP-3	0.549
EP-3	0.525
CXCR-4	0.515
MMP-10	0.510
cPGES	0.470
RANTES	0.461
NAP-2	0.438
CXCR-7	0.416
PGDH-15	0.405

Tabla 29. Genes con un coeficiente de correlación moderado con el p65 (NF- κ B).

2.- ESTUDIO DE LA CAPACIDAD PRONÓSTICA DE LA EXPRESIÓN DEL NF- κ B EN RELACIÓN AL CONTROL LOCAL DE LA ENFERMEDAD EN PACIENTES TRATADOS CON RADIOTERAPIA O QUIMIO-RADIOTERAPIA.

Hasta el momento del cierre del estudio, un total de 26 pacientes (33.8%) habían sufrido una recidiva local de la enfermedad. La siguiente figura (Fig 65) muestra la supervivencia libre de recidiva local para los pacientes incluidos en el estudio.

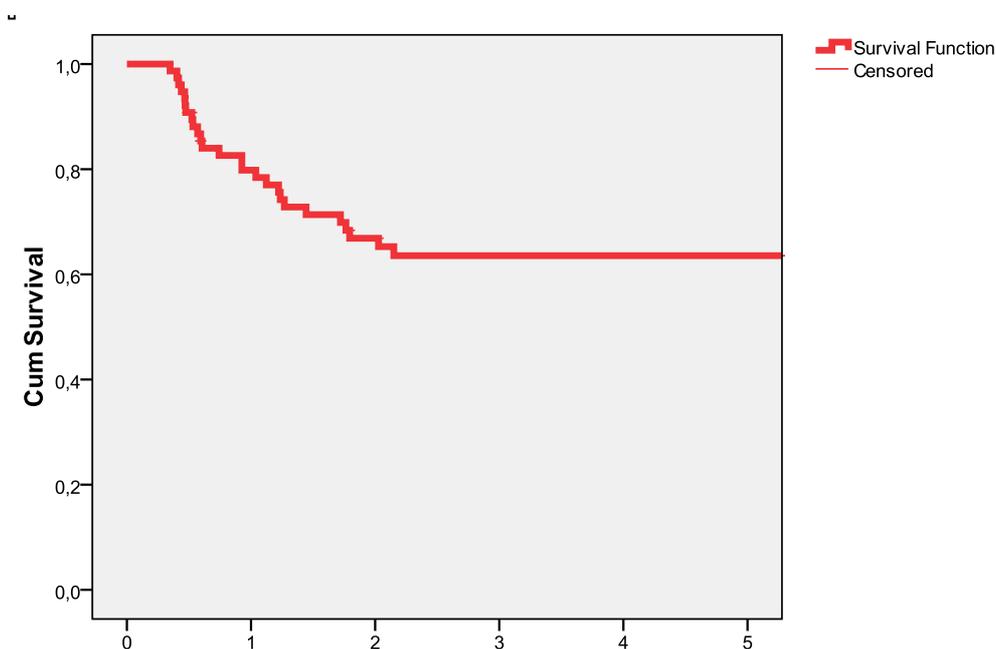


Figura 65. Supervivencia libre de recidiva local.

La supervivencia actuarial libre de recidiva local a los 5 años fue del 63.6% (IC 95%: 52.3-74.9%).

Se procedió a evaluar la expresión de cada uno de los genes del complejo NF- κ B. La siguiente tabla (Tabla 30) muestra la correlación entre los valores de expresión de cada uno de estos genes.

	p65	p50	p52	RelB	c-Rel
p65	1	r=0.923 P=9.1x10 ⁻³⁸	r=0.711 P=7.4x10 ⁻¹²	r=0.138 P=0.62	r=0.574 P=3.1x10 ⁻⁷
p50		1	r=0.971 P=1.2x10 ⁻⁴²	r=0.204 P=0.095	r=0.928 P=5.5x10 ⁻³⁰
p52			1	r=0.233 P=0.056	r=0.907 P=1.5x10 ⁻²⁶
RelB				1	r=0.295 P=0.015
c-Rel					1

Tabla 30. Correlación entre los valores de expresión de los genes: p65, p50, p52, RelB y c-Rel.

La expresión de la p65 se correlacionó de forma muy intensa con la correspondiente a la p50, y de forma significativa pero menos importante con la expresión de p52 y c-Rel. Por el contrario, no existió una correlación significativa entre los niveles de expresión de p65 y RelB.

En el caso de Rel-B, el gen que codifica la proteína que contiene el dominio regulador de transcripción en el dímero activado a través de la vía alternativa, no se apreció una correlación significativa con ninguno del resto de genes del complejo NF-κB.

Finalmente, el gen c-Rel mantuvo unos niveles de correlación muy elevados con los genes que codifican las proteínas de la clase I (p50 y p52).

Se evaluó a continuación la relación entre los niveles de expresión de los genes que codifican proteínas con dominio activo (clase II) y el control local de la enfermedad tras el tratamiento con radioterapia o quimio-radioterapia.

No existieron diferencias significativas entre el valor de expresión de los genes Rel-B y c-Rel y el control local de la enfermedad (P=0.573 y P=0.144,

respectivamente). Por el contrario, sí que aparecieron diferencias significativas en los valores de expresión del p65 en función de la existencia de un fracaso del tratamiento a nivel local (test U de Mann-Whitney, $P=0.037$). La siguiente figura (Fig 66) muestra la distribución de los valores de expresión del p65 en función del control local de la enfermedad.

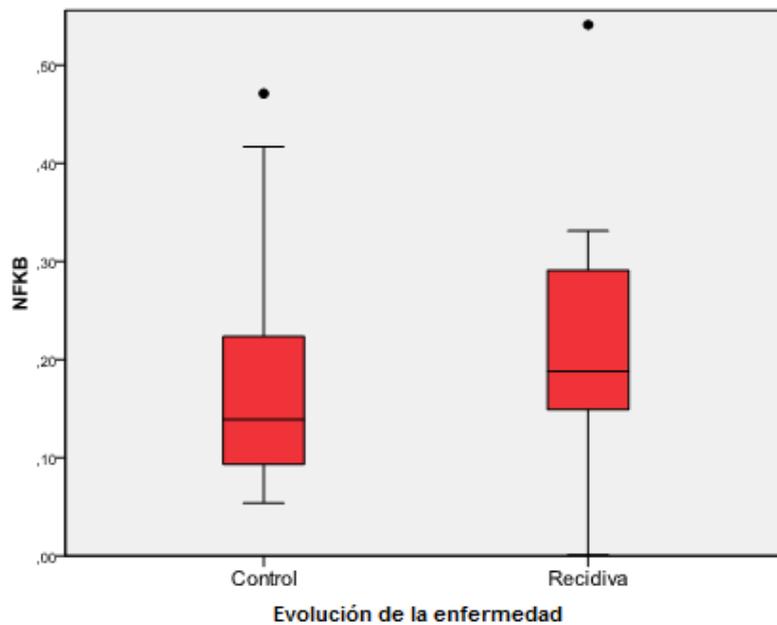


Figura 66. Expresión del p65 en función del control o la recidiva de la enfermedad.

Para evaluar si existía una relación lineal entre el nivel de expresión del p65 (NF- κ B) y el control local de la enfermedad, se procedió a realizar un estudio mediante una técnica de regresión lineal, considerando como variable dependiente la recidiva local de la enfermedad y como variable independiente el nivel de expresión del p65 (NF- κ B). Los resultados del estudio de regresión mostraron la existencia de una relación significativa del p65 (NF- κ B) con las recidivas del tumor a nivel local ($P=0.046$) (Tabla 30).

Estudio de regresión		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Step 1 ^a	NFκB	3,996	2,001	3,986	1	0,046	54,362
	Constant	-1,459	0,466	9,806	1	0,002	,232

Tabla 31. Estudio de regresión lineal entre la expresión del NF- κ B y el control local de la enfermedad.

Se clasificaron los pacientes incluidos en el estudio de acuerdo con el cuartil del valor del p65 (NF- κ B). La siguiente figura (Fig 67) muestra las curvas de supervivencia libre de recidiva local de la enfermedad en función del cuartil del valor del p65 (NF- κ B).

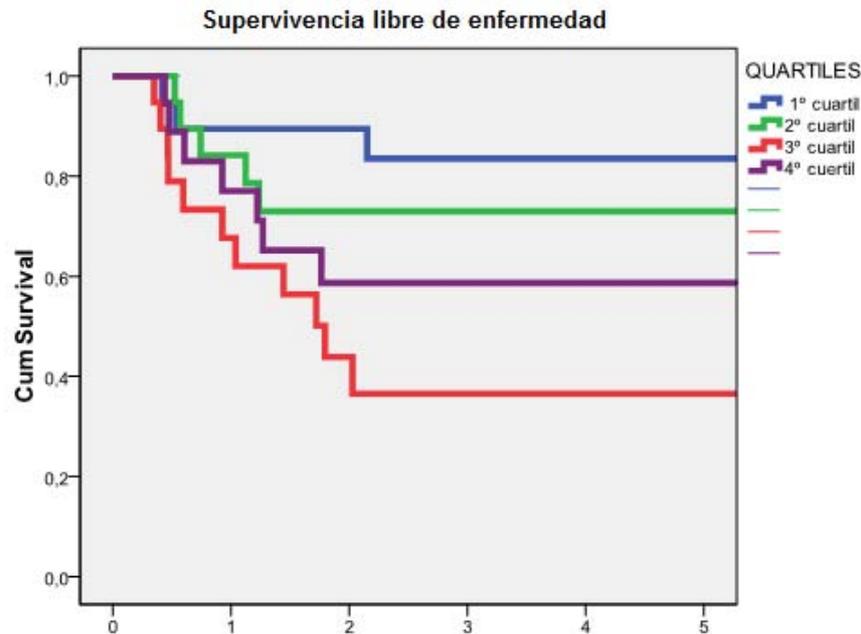


Figura 67. Supervivencia libre de enfermedad en función del cuartil del valor del NF- κ B.

Existieron diferencias significativas en la supervivencia actuarial libre de recidiva local de la enfermedad en función de la clasificación cuartil (test log rank, $P=0.023$), si bien no se mantuvo una secuencia ordenada en la supervivencia en función del valor del p65 (NF- κ B), con una supervivencia libre de recidiva local inferior para los pacientes incluidos en el 3º cuartil respecto a los de 4º cuartil.

Se procedió a continuación a encontrar el punto de corte con máxima capacidad de discriminar el control local de la enfermedad en función del grado de expresión del p65(NF- κ B). Para ello se hizo uso de la técnica de *classification and regression trees*, un método de partición recursiva (RPA) que permite la segregación de variables continuas en función de un resultado definido (Fig 68).

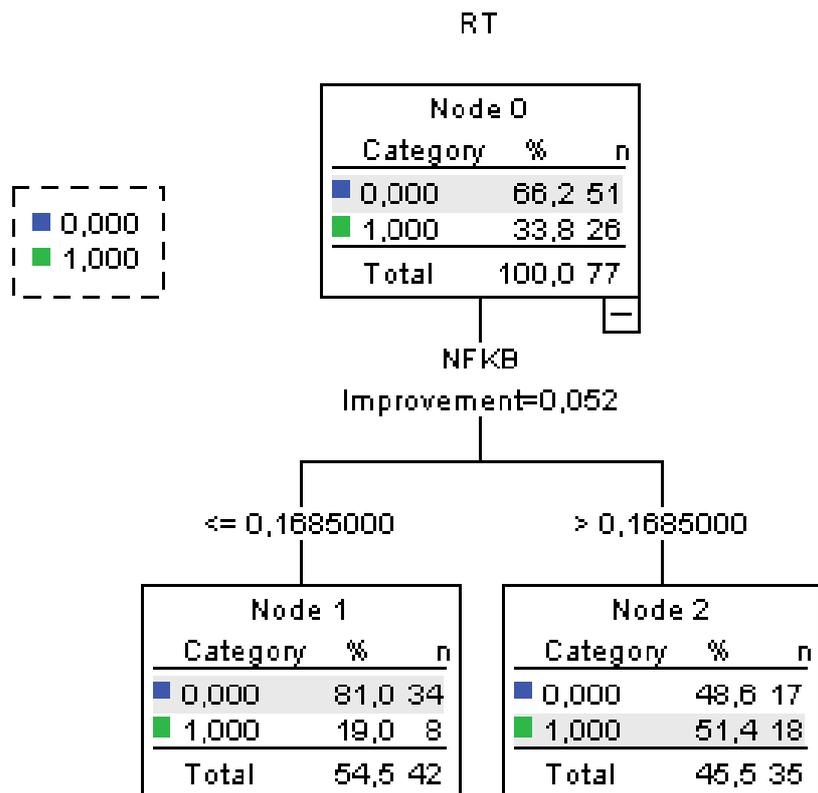


Figura 68. Punto de corte con máxima capacidad de discriminar el control local de la enfermedad en función del grado de expresión del p65 (NF-κB).

Se definieron así dos grupos de pacientes a partir de un punto de corte establecido en un nivel de expresión del p65 (NF-κB) de 0.1685 formado por dos grupos de pacientes con unos niveles por debajo (n=42) o por encima (n=35) del punto de corte.

El porcentaje de pacientes con niveles por debajo del punto de corte que habían sufrido una recidiva local de la enfermedad fue del 19%, en tanto que el correspondiente a los pacientes con niveles de expresión más elevados alcanzó el 51.4%. Existieron diferencias significativas en el porcentaje de pacientes que sufrieron una recidiva local del tumor en función del grado de expresión del p65 (NF-κB) (Chi square test, P=0.003).

La figura 69 muestra las curvas de supervivencia libre de recidiva local de la enfermedad en función de la clasificación obtenida mediante la técnica RPA.

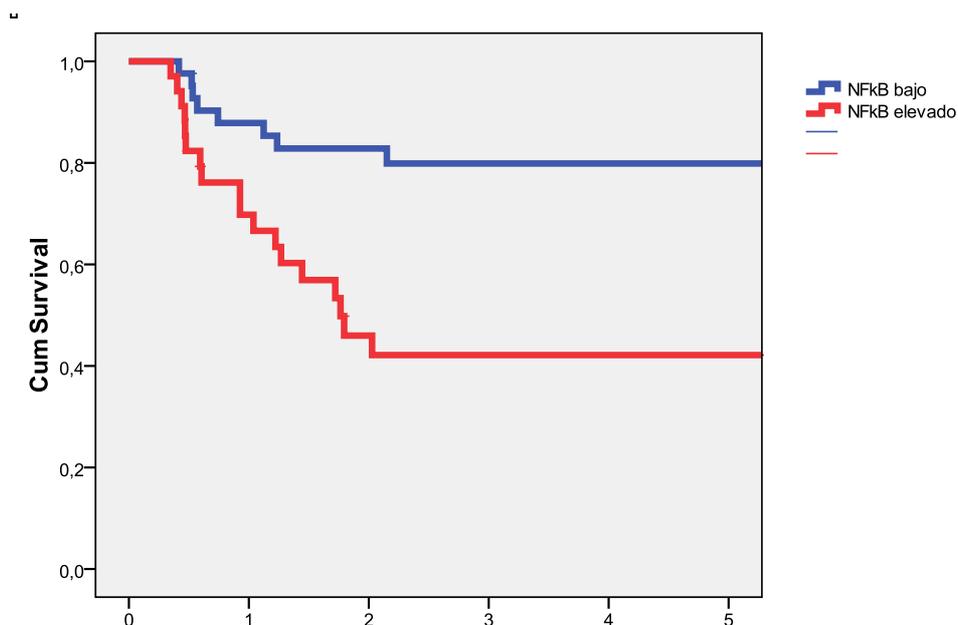


Figura 69. Supervivencia libre de recidiva local de la enfermedad en función del grado de expresión del p65 (NF-κB).

Existieron diferencias significativas en función de la clasificación de los pacientes de acuerdo a los niveles de expresión del p65 (NF-κB) (log rank test, $P=0.001$). La supervivencia actuarial libre de recidiva local de la enfermedad para los pacientes con unos niveles de expresión bajos del NF-κB fue del 79.9% (IC 95%: 67.4-92.4%), en tanto que para los pacientes que contaron con unos niveles de expresión elevados descendió al 42.1% (IC 95%: 29.3-59.9%). La tabla 32 muestra los valores de supervivencia libre de enfermedad local a los 5 años obtenidas mediante un análisis univariante de acuerdo con las diferentes categorías correspondientes a las variables consideradas: extensión local (T), extensión regional (N), localización, tratamiento y expresión del p65 (NF-κB).

SUPERVIVENCIA LIBRE de ENFERMEDAD LOCAL		Sup. 5 años	IC 95%	p
T	1-2	66.0%	1.96*7.0	0.399
	3-4	59.3%	1.96*10.1	
N	0	64.6%	1.96*6.8	0.527
	+	62.7%	1.96*10.6	
Localización	Cav oral-orofarínge	68.5%	1.96*8.8	0.392
	Larínge-hipofarínge	60.1%	1.96*7.6	
Tratamiento	Radioterapia	64.0%	1.96*7.1	0.6823
	Quimio-radioterapia	63.3%	1.96*9.9	
NF-κB	Bajo	79.9%	1.96*6.4	0.001
	Elevado	42.1%	1.96*9.1	

Tabla 32. Supervivencia libre de enfermedad local en función de diferentes variables: extensión local (T), extensión regional (N), localización, tratamiento y expresión del p65 (NF-κB).

Se procedió a analizar de la existencia de diferencias en la capacidad de discriminación del resultado del tratamiento a nivel local del NF-κB en función de la categoría de extensión local de la enfermedad.

La figura 70 muestra las curvas de supervivencia libre de recidiva local correspondientes a los pacientes con tumores incipientes (T1-T2).

Supervivencia libre de enfermedad para los tumores incipientes (T1-T2)

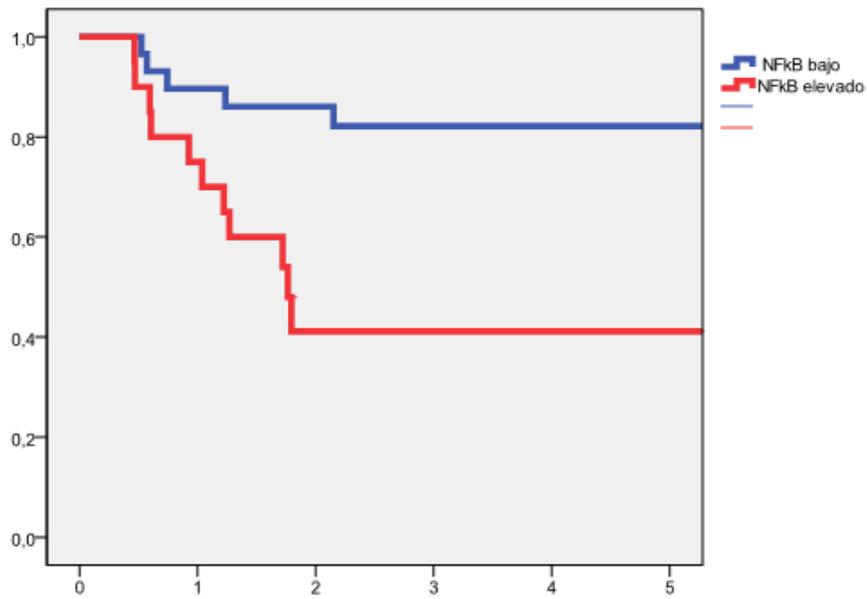


Figura 70. Supervivencia libre de recidiva local de la enfermedad para los tumores incipientes (T1-T2).

Igualmente, se muestran las curvas de supervivencia libre de fracaso local para los pacientes con tumores localmente avanzados (T3-T4) (Fig 71).

Supervivencia libre de enfermedad para los tumores avanzados (T3-T4)

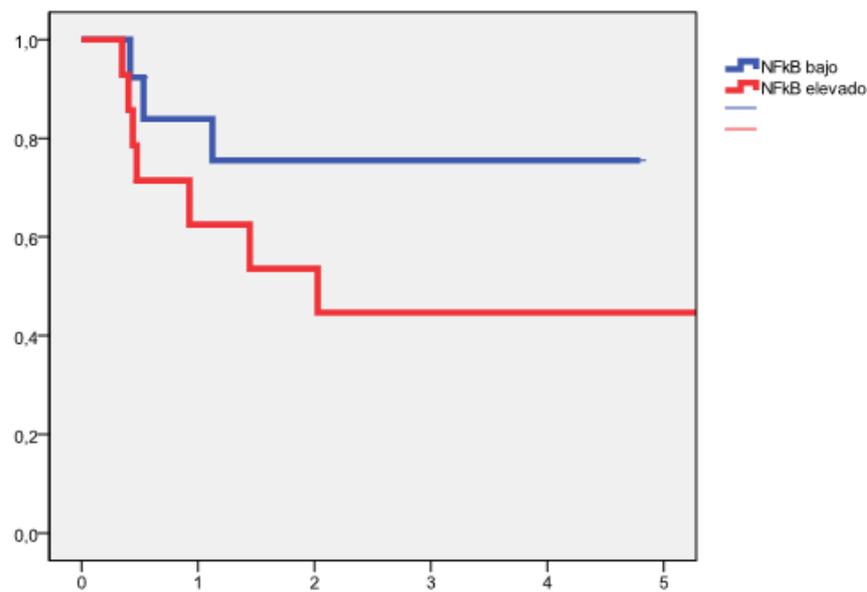


Figura 71. Supervivencia libre de recidiva local de la enfermedad para los tumores avanzados (T3-T4).

En la tabla 33 aparecen los valores correspondientes a la supervivencia a los 5 años libre de recidiva local en función del nivel de expresión del p65 (NF-κB)

para cada una de las categorías establecidas de extensión local de la enfermedad.

SUPERVIVENCIA a los 5 años LIBRE de RECIDIVA LOCAL		Sup. 5 años	IC 95%	p
T1-T2	NF-κB bajo (n=29)	82.2%	1.96*7.3	0.004
	NF-κB bajo (n=20)	41.1%	1.96*11.8	
T3-T4	NF-κB bajo (n=13)	75.5%	1.96*12.3	0.146
	NF-κB bajo (n=15)	44.6%	1.96*14.4	

Tabla 33. Supervivencia libre de enfermedad local en función de la categoría de extensión local.

Se mantuvieron las tendencias en referencia a la capacidad de discriminación del NF-κB independientemente de la extensión local del tumor en el momento del diagnóstico.

Se analizó de igual forma la capacidad de discriminación del NF-κB en función de la localización primaria del tumor. La siguiente tabla (Tabla 34) muestra los valores de supervivencia a los 5 años libre de recidiva local en función del nivel de expresión del NF-κB para las diferentes categorías de localización del tumor.

SUPERVIVENCIA a los 5 años LIBRE de RECIDIVA LOCAL		Sup. 5 años	IC 95%	p
Cavidad oral-orofaringe	NF-κB bajo (n=16)	80.4%	1.96*10.2	0.229
	NF-κB bajo (n=17)	53.5%	1.96*14.3	
Laringe-hipofaringe	NF-κB bajo (n=26)	79.7%	1.96*8.2	0.001
	NF-κB bajo (n=18)	32.4%	1.96*11.3	

Tabla 34. Supervivencia libre de enfermedad local en función de la localización del tumor primario.

Igualmente se mantuvo la tendencia en la capacidad de discriminación, si bien para los pacientes con tumores localizados en cavidad oral-orofaringe no fue

tan marcada como la correspondiente a los pacientes con tumores localizados en la laringe-hipofaringe.

Las siguientes figuras (Fig 72 y 73) muestran las curvas de supervivencia libre de recidiva local de la enfermedad en función del valor de expresión del NF- κ B y la localización primaria del tumor.

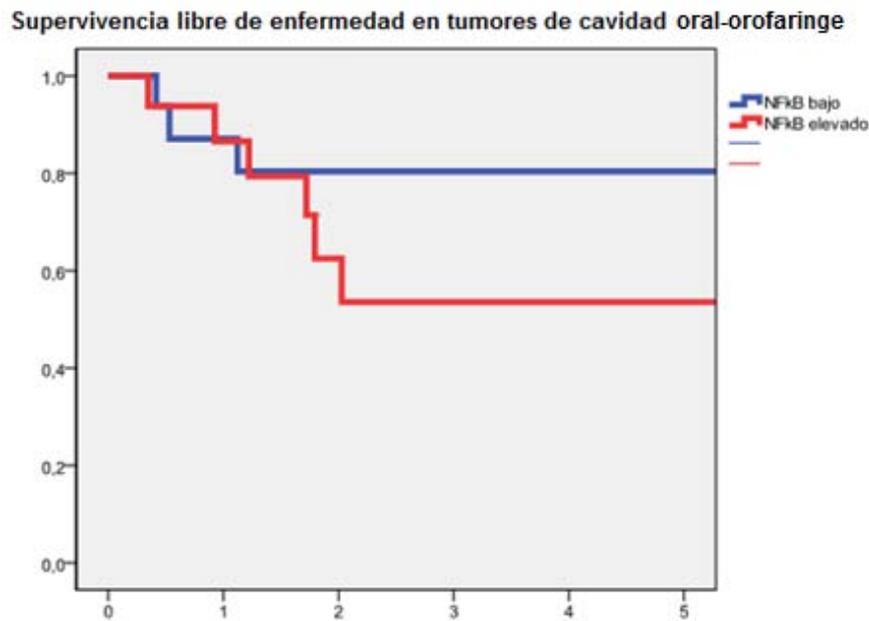


Figura 72. Supervivencia libre de recidiva local de la enfermedad para los tumores de localización en cavidad oral-orofaringe.

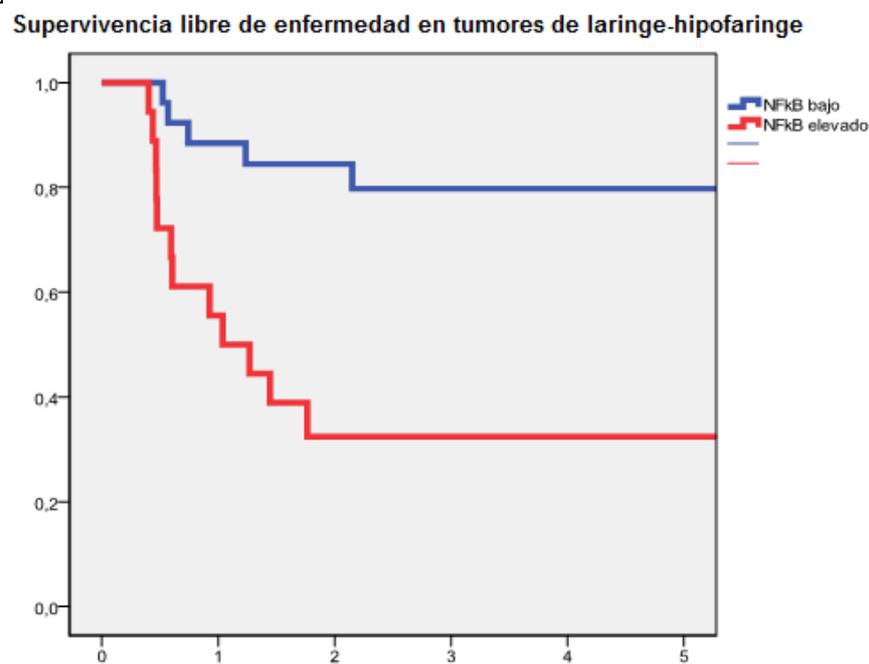


Figura 73. Supervivencia libre de recidiva local de la enfermedad para los tumores localizados en laringe-hipofaringe.

Finalmente, se evaluó la existencia de diferencias en la capacidad de discriminación del p65 (NF-κB) en función del tratamiento con radioterapia o quimio-radioterapia.

La siguiente tabla (Tabla 35) muestra los valores correspondientes a la supervivencia a los 5 años libre de recidiva local del tumor en función del tipo de tratamiento utilizado.

SUPERVIVENCIA a los 5 años LIBRE de RECIDIVA LOCAL		Sup. 5 años	IC 95%	p
Radioterapia	NF-κB bajo (n=29)	81.1%	1.96*7.7	0.005
	NF-κB bajo (n=22)	41.6%	1.96*11.0	
Quimio-radioterapia	NF-κB bajo (n=13)	76.9%	1.96*11.7	0.126
	NF-κB bajo (n=13)	44.5%	1.96*16.7	

Tabla 35. Supervivencia libre de enfermedad local en función del tipo de tratamiento realizado.

En general se mantuvo el patrón de discriminación asociado al nivel de expresión del p65 (NF-κB), si bien dado el número limitado de pacientes tratados con quimio-radioterapia, las diferencias en supervivencia en este caso no alcanzaron la significación estadística. Las siguientes figuras (74 y 75) muestran las curvas de supervivencia libre de enfermedad local en función del nivel de expresión del p65 (NF-κB) para cada uno de los tratamientos utilizados.

Supervivencia libre de enfermedad para los tumores tratados con radioterapia

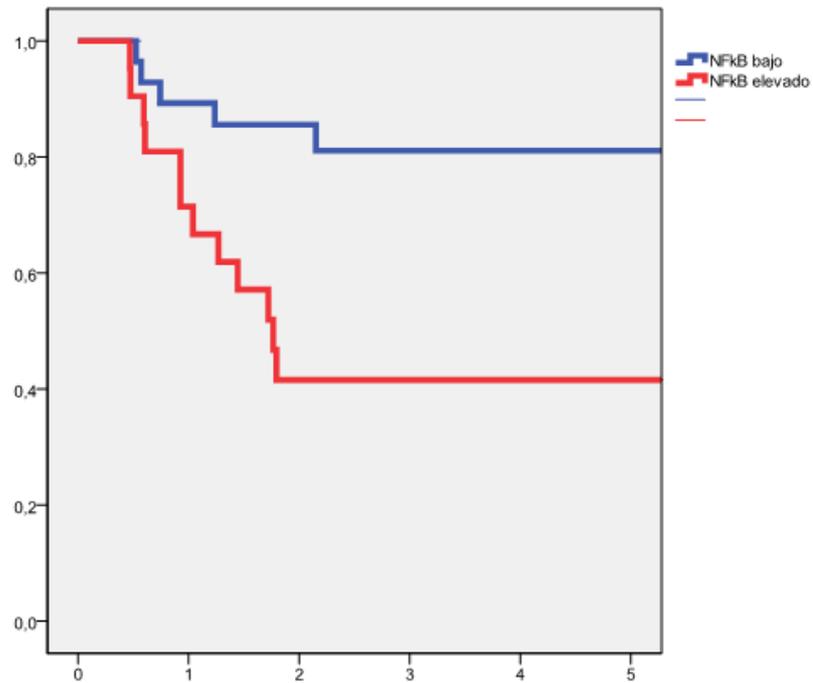


Figura 74. Supervivencia libre de recidiva local de la enfermedad para los tumores tratados con radioterapia.

Supervivencia libre de enfermedad para los tumores tratados con quimio-radioterapia

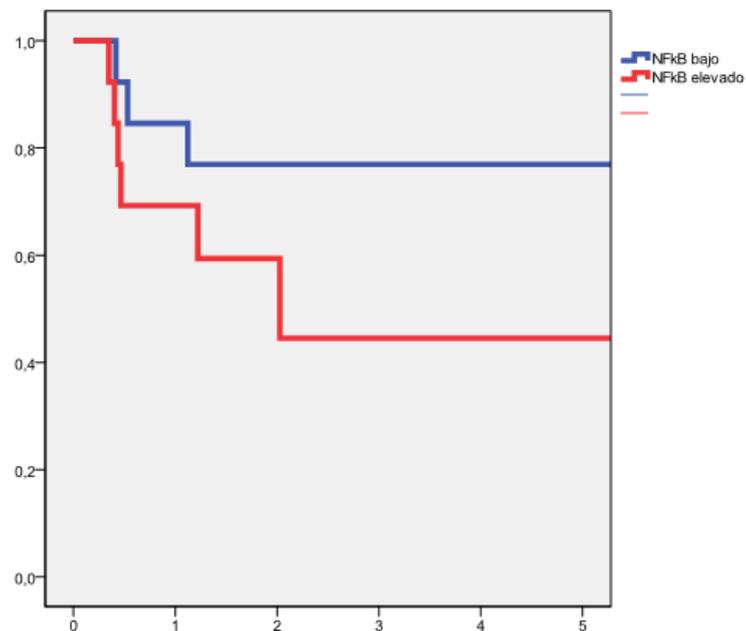


Figura 75. Supervivencia libre de recidiva local de la enfermedad para los tumores tratados con quimio-radioterapia.

No existieron diferencias significativas en el control regional o a distancia de la enfermedad en función del nivel de expresión del p65 (NF-κB). Las siguientes figuras (76 y 77) muestran las curvas de supervivencia libre de recidiva

ganglionar y metástasis para los pacientes incluidos en el estudio en función de la categoría de expresión del p65 (NF- κ B) definido a partir de la técnica RPA.

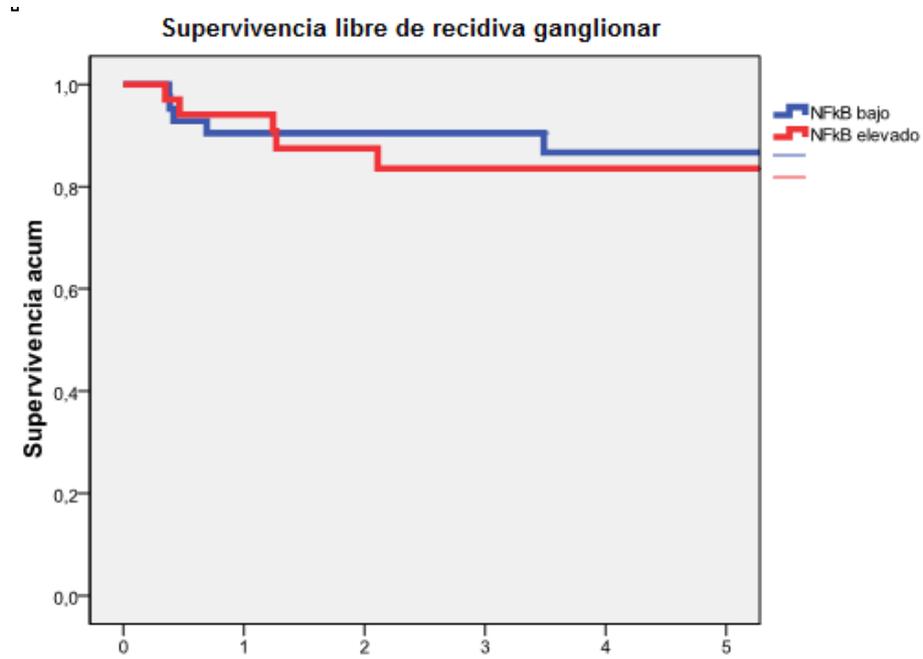


Figura 76. Supervivencia libre de recidiva ganglionar en función de la expresión del p65 (NF- κ B).

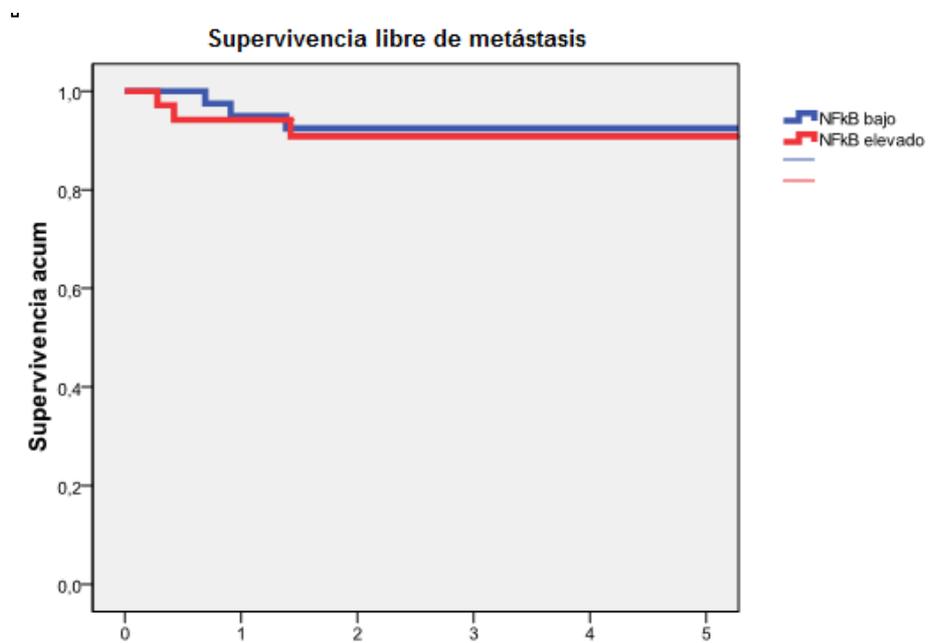


Figura 77. Supervivencia libre de metástasis en función de la expresión del p65 (NF- κ B).

Para evaluar la capacidad de la expresión del p65 (NF-κB) como un factor pronóstico independiente del control local de la enfermedad tras la administración de un tratamiento con radioterapia o quimio-radioterapia, se llevó a cabo un estudio multivariante en el que se incluyó como variable independiente la supervivencia libre de recidiva local y como variables dependientes las categorías de extensión local (T1.2 vs T3-4) y regional (N0 vs N+), la localización de tumor (cavidad oral-orofaringe vs laringe-hipofaringe), el tipo de tratamiento realizado (radioterapia vs quimio-radioterapia), y la expresión del p65 (NF-κB) de acuerdo con la categorización obtenida a partir del estudio RPA.

La siguiente tabla (Tabla 36) muestra los resultados correspondientes al estudio multivariante obtenidos con una regresión de Cox.

		RR	IC 95% RR	p
T	1-2	1	0.628-3.495	0.369
	3-4	1.482		
N	0	1	0.628-3.495	0.148
	+	2.680		
Localización	Cav oral-orofaringe	1	1.081-8.877	0.035
	Laringe-hipofaringe	3.098		
Tratamiento	Radioterapia	1	0.262-3.557	0.958
	Quimio-radioterapia	0.965		
NF-κB	Bajo	1	1.920-10.989	0.001
	Elevado	4.594		

Tabla 36. Análisis multivariante obtenido con una regresión de Cox.

De acuerdo con los resultados obtenidos del modelo multivariante, la variable que se relacionó de forma más significativa con la supervivencia libre de recidiva local de la enfermedad fue el nivel de expresión del p65 (NF-κB). Considerando como categoría de referencia a los pacientes con unos niveles de expresión bajos, los pacientes con unos niveles de expresión elevados del

p65 (NF-κB) contaron con un riesgo 4.6 veces superior de sufrir una recidiva local del tumor (IC 95%: 1.9-11.0).

La otra variable que se relacionó de forma significativa con el control local de la enfermedad fue la localización primaria del tumor. En relación a los pacientes con tumores localizados en la cavidad oral-orofaringe, los pacientes con tumores de localización laríngea-hipofaríngea contaron con un riesgo 3.1 veces superior de sufrir una recidiva a nivel local del tumor.

Como una medida indirecta de la actividad transcripcional correspondiente a la vía NF-κB, se llevó a cabo una determinación de los niveles de expresión correspondientes a una serie de genes que se encuentran regulados por el NF-κB. En esta determinación se incluyeron genes implicados en la progresión del ciclo celular (Ciclina D1), en los mecanismos de angiogénesis (VEGF), invasión tisular (MMP-2) y regulación de la apoptosis (Bcl-XL).

La siguiente tabla (Tabla 37) muestra los valores de correlación existentes entre los niveles de expresión de estos genes y la expresión del p65 (NF-κB).

	p65	Ciclina D1	Bcl-XL	MMP-2	VEGF
p65	1	r=0.644 P=3.1x10 ⁻⁹	r=0.676 P=2.6x10 ⁻¹⁰	r=0.557 P=4.6x10 ⁻⁷	r=0.683 P=1.9x10 ⁻¹¹
Ciclina D1		1	r=0.942 P=6.8x10 ⁻³³	r=0.801 P=2.5x10 ⁻¹⁶	r=0.921 P=8.3x10 ⁻²⁹
Bcl-XL			1	r=0.883 P=2.6x10 ⁻²³	r=0.965 P=6.5x10 ⁻⁴⁰
MMP-2				1	r=0.776 P=1.8x10 ⁻¹⁶
VEGF					1

Tabla 37. Correlación entre los niveles de expresión del p65 (NF-κB) y los genes: Ciclina D1, Bcl-XL, MMP-2 y VEGF.



Existió una correlación altamente significativa entre la expresión del p65 (NF- κ B) y la totalidad de genes estudiados.

VII. Discusión

1.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL NF-κB EN LOS CARCINOMAS DE CABEZA Y CUELLO.

1.1. Relación entre los niveles de expresión del NF-κB en el tumor y la mucosa sana.

Un primer punto a considerar en el momento de analizar los resultados obtenidos en nuestro estudio es que las determinaciones llevadas a cabo consistieron en evaluar la actividad transcripcional de uno de los genes responsables de codificar las proteínas que componen el complejo NF-κB, en concreto la proteína p65. La p65 forma parte del dímero p65:p50, activado a través de la vía clásica o canónica, que es vía activa en el contexto de la carcinogénesis, y es el elemento del dímero que cuenta con el dominio biológicamente activo TAD. Es por ello que consideramos adecuado el análisis de la expresión de este gen para evaluar la expresión del NF-κB a nivel transcripcional.

Una de las limitaciones de los estudios que cuantifican el nivel de expresión genética mediante técnicas de RT-PCR es que el resultado no es equivalente al nivel de expresión biológico de la proteína correspondiente. Modificaciones epigenéticas de la actividad post-transcripcional y la interacción con otros elementos reguladores pueden modificar la actividad biológica de la proteína analizada.

En nuestro caso, el mecanismo de la vía NF-κB es especialmente complejo, ya que la proteína p65 requiere para ejercer su actividad biológica una dimerización con una proteína (p105) que precisa una activación metabólica (p50), y aún así el dímero resultante queda cautivo en el citoplasma debido a su interacción con otro elemento inhibidor (IκB), que a su vez requiere una degradación específica dependiente de la actuación de una IKK.

Una mayoría de los estudios que han analizado la trascendencia clínica de la expresión del NF-κB en los carcinomas de cabeza y cuello han utilizado una valoración de su actividad a nivel de la expresión de la proteína mediante técnicas de inmunohistoquímica. Aun así, la valoración inmunohistoquímica no traduce de forma apropiada el nivel de actividad biológica del complejo, dado

que evalúa tanto la forma inactiva presente en el citoplasma como la forma biológicamente activa translocada al núcleo celular.

Huang y cols⁹³ analizaron la actividad del complejo NF- κ B tanto a nivel de expresión del gen mediante RT-PCR como de proteína mediante inmunohistoquímica en una cohorte de 21 pacientes con carcinomas de laringe, encontrando una correlación elevada entre ambas (coeficiente de correlación $r_s=0.875$, $P<0.01$).

Un hallazgo interesante en nuestros resultados fue la ausencia de diferencias significativas en los niveles de expresión del NF- κ B a nivel de mRNA entre las mucosas normales y el tejido tumoral (Fig 78).

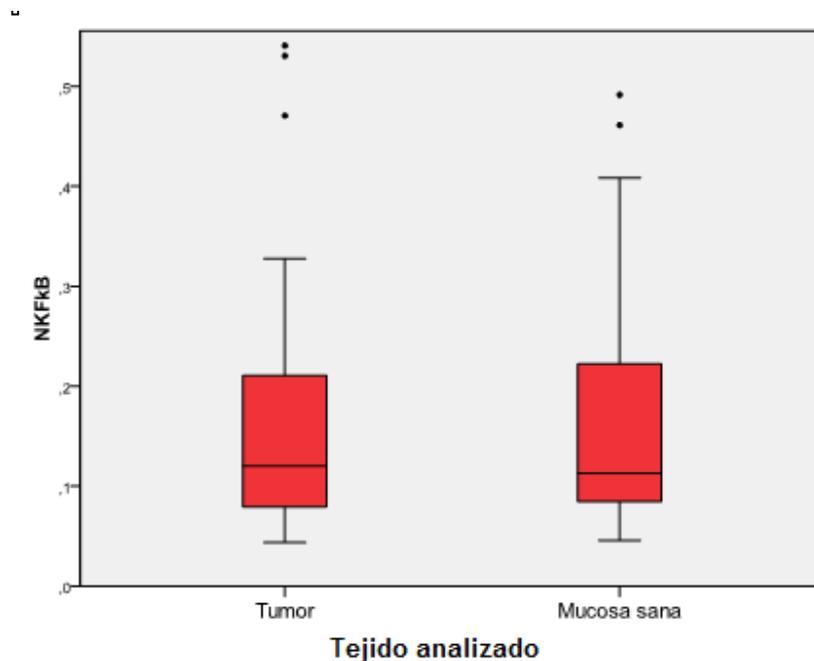


Figura 78. Niveles de expresión del NF- κ B en mucosa normal y tejido tumoral.

En nuestro conocimiento no existen en estudios que hayan comparado la expresión del NF- κ B a nivel de la transcripción del gen entre tejido normal y tumoral en pacientes con carcinomas de cabeza y cuello. Sin embargo, sí que existen estudios que han comparado la actividad del NF- κ B mediante inmunohistoquímica en pacientes con carcinomas de orofaringe⁸³ y cavidad oral⁹⁷. Los resultados obtenidos en dichos estudios señalaron la presencia de actividad inmunohistoquímica de la p65 limitada a la capa basal del epitelio normal⁸³, con ausencia de tinción nuclear⁹⁷, y un incremento significativo de



inmunorreactividad en las muestras de tumor respecto a las correspondientes a mucosa sana.

Es difícil la interpretación de estos hallazgos. Podrían suponer que en los casos de carcinoma la expresión final del gen se encuentra incrementada respecto a la correspondiente a la mucosa normal a partir de mecanismos de regulación post-translacional. Para dilucidar esta cuestión sería preciso un estudio que evaluara en una serie amplia de muestras de tumor y de mucosa normal la relación existente entre los niveles de expresión del gen mediante PCR y la correspondiente a la actividad de la proteína.

1.2. Relación entre los niveles de expresión del NF- κ B en el tumor y variables clínicas.

No existieron diferencias significativas en cuanto a los niveles de expresión del NF- κ B en relación a diferentes variables clínicas analizadas (localización primaria del tumor, categoría de extensión local o regional, estadiaje tumoral y el antecedente en los consumos de tabaco y alcohol por parte de los pacientes). Tan sólo se apreció una tendencia según la cual los pacientes con carcinomas localizados en cavidad oral y orofaringe contaron con una propensión a expresar unos niveles más elevados del NF- κ B respecto a aquellos con tumores localizados en la laringe-hipofaringe. En concreto, no aparecieron diferencias en los niveles de expresión del NF- κ B en función de la presencia de metástasis ganglionares en el momento del diagnóstico.

A partir de un estudio inmunohistoquímico, Yan y cols⁶³ sí que encontraron una relación entre la actividad del complejo NF- κ B y la afectación ganglionar. Los autores evaluaron la tinción nuclear de la p65 en muestras de biopsia de 30 pacientes con carcinomas de cabeza y cuello sin afectación ganglionar (Tn), comparándola con la correspondiente a 30 pacientes con afectación ganglionar estudiada a nivel del tumor (Tm) y de la adenopatía metastásica (Lm). Existieron diferencias significativas en el porcentaje de tinción nuclear en función del status ganglionar de la enfermedad (P=0.001) (Fig 79).

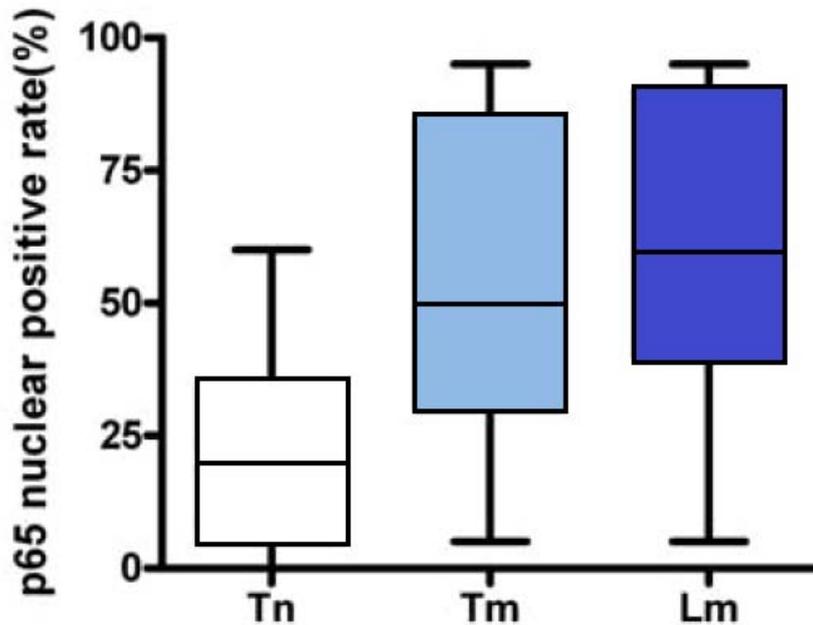


Figura 79. Detección inmunohistoquímica del NF-κB p65 en carcinomas escamosos de cabeza y cuello.

Se realizó un estudio inmunohistoquímico de la p65 en muestras de tumores primarios con afectación ganglionar (Tm), muestras de los ganglios con afectación metastásica de esos mismos pacientes (Lm) y muestras de tumores primarios sin afectación ganglionar (Tn). Se representa el porcentaje de positividad nuclear para la p65, encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p=0,01$) (tomado de Yan y cols⁶³).

Por otro lado, en un estudio realizado en 78 pacientes con carcinomas de laringe, Huang y cols⁹³ no encontraron relación entre el nivel de inmunorreactividad del NF-κB y la edad, el sexo, el grado de diferenciación histológica o el estadio de los pacientes, en tanto que sí que se produjo una tendencia significativa a la positividad para los pacientes con tumores localmente más avanzados y con presencia de metástasis ganglionares.

En un estudio inmunohistoquímico en el que se analizaron muestras de 107 pacientes con carcinomas de cavidad oral, Sawhney y cols⁴⁶ encontraron una correlación significativa entre la expresión del NF-κB y el grado histológico y la categoría de extensión local de la enfermedad.

Por el contrario, en un estudio inmunohistoquímico realizado por Nariai y cols⁹⁴ en el que se analizaron un total de 50 pacientes con carcinomas de cavidad oral, no existió relación entre la expresión del NF-κB y variables clínicas como la categoría de extensión local del tumor, el estadio o el grado de diferenciación tumoral.

1.3. Relación entre los niveles de expresión del NF-κB en el tumor y los niveles de expresión de genes relacionados con la actividad del complejo NF-κB.

Del análisis de correlaciones, pudo observarse que la expresión de la p65 se encontraba relacionada con la expresión de genes que se han relacionado con la actividad del complejo NF-κB.

A) Metabolismo de la Prostaglandina E₂ (PGE₂).

Sawhney y cols⁴⁶ estudiaron la actividad inmunohistoquímica del complejo NF-κB (p65) y COX-2 en una muestra de 107 carcinomas de cavidad oral y 78 lesiones pre-cancerosas apreciando la existencia de un elevado grado de correlación entre ambas proteínas. Las lesiones premalignas que mostraban una actividad elevada NF-κB también mostraban una sobreexpresión de la COX-2 (OR=12.6, IC 95%: 4.1-39.0, P=0.001), al igual que las muestras de carcinoma escamoso (OR=4.0, IC 95%: 1.8-9.6, P=0.001).

De nuestros resultados destaca el hecho de que la expresión del gen del NF-κB (p65) mantiene unos niveles de correlación elevados con la expresión correspondiente a la mayoría de los genes implicados en la vía de la PGE₂, con la excepción del cPHES y del COX-2.

Resulta llamativa la ausencia de correlación entre la expresión del NF-κB y de la COX-2 cuando hay evidencias (tal como se señaló en la Introducción) de que existe una relación significativa entre las actividad del NF-κB y de la COX-2 evaluada mediante técnicas de inmunohistoquímica en los pacientes con carcinomas escamosos de cabeza y cuello^{46,8}. Este hallazgo también ha sido descrito en otros modelos tumorales como en el carcinoma de colon⁹⁹.

Por el contrario, la expresión del NF-κB se correlacionó de forma significativa con la expresión de enzimas situados más distalmente en la vía de síntesis de la PGE₂ como son las mPGES-1 y mPGES-2.

En nuestro conocimiento, no existen estudios en la literatura que hayan evaluado la relación existente entre la actividad NF-κB y la expresión de las sintetasas específicas de la PGE₂. En un estudio in vitro realizado con células amnióticas, Ackerman y cols¹⁰⁰ demostraron como el NF-κB aparecía como un elemento clave en la regulación de la mPGES-1 tanto a nivel de la expresión



del gen como del enzima responsable de la síntesis de la PGE₂. De acuerdo con los autores, la acción coordinada del NF-κB sobre la vía COX-2 / mPGES-1 sería un elemento regulador de la síntesis de PGE₂.

A partir de nuestros resultados, no encontramos diferencias significativas en los niveles de expresión del NF-κB entre el tejido tumoral y la mucosa sana, en tanto que la expresión del gen que codifica COX-2 aparecía significativamente más activo en la mucosa tumoral⁴⁵. Esta discrepancia supondría la existencia de diferencias en el comportamiento de ambos genes en relación a los mecanismos de carcinogénesis.

Una posible explicación sería que en los carcinomas de cabeza y cuello la actividad del NF-κB indujera la síntesis de la PGE₂ actuando sobre las sintetasas específicas a partir de los metabolitos obtenidos de la actividad COX-2, que aparecería inducida en estos tumores mediante un mecanismo independiente.

B) Metaloproteinasas (MMPs).

Recientemente, se ha publicado el estudio que, hasta el momento, ha evaluado de forma más exhaustiva los niveles de expresión de una batería amplia de MMPs. Stokes y cols¹⁰¹ estudiaron un total de 42 pacientes con carcinomas escamosos de cabeza y cuello, analizando tanto la expresión genética mediante RT-PCR como la de proteína mediante western blot. Para cada paciente se analizaron muestras del tejido adyacente al tumor (*adjacent*), del margen de infiltración tumoral (*margin*) y del centro no necrótico del tumor (*center*), y se compararon con muestras de mucosa normal obtenida de 13 pacientes no oncológicos (*normal*). La figura 80 muestra los niveles de expresión encontrados en las diferentes muestras analizadas para dos de las MMPs estudiadas (MMP-1 y MMP-2).

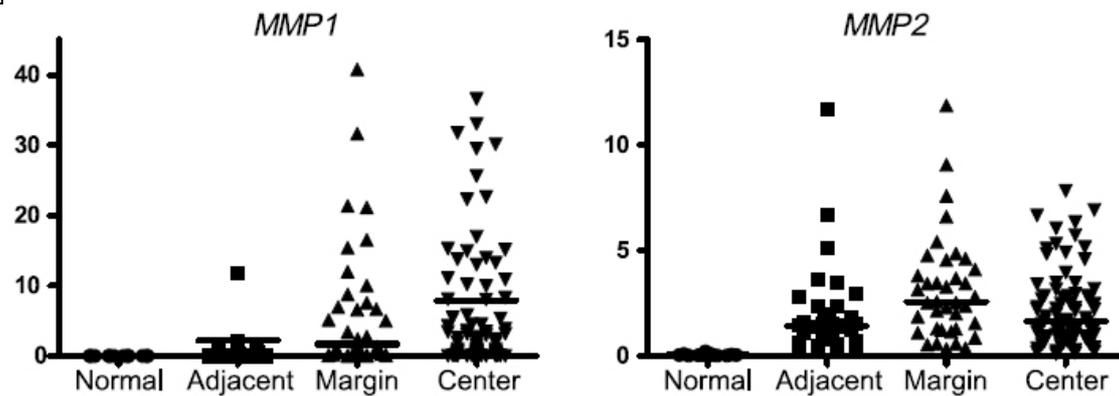


Figura 80. Niveles de expresión para las metaloproteinasas MMP-1 y MMP-2. Ambas MMP presentaron una expresión elevada en el centro y márgenes tumorales con respecto a mucosa normal y tejido adyacente al tumor (tomado de Stokes y cols¹⁰¹).

La expresión de la mayoría de las MMPs en el tejido normal fue baja o indetectable, con la excepción de la MMP2, MMP-14 y MMP-28. La MMP-8, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-24 y MMP-25 no se detectaron en la mucosa normal pero aparecieron ampliamente expresadas en los tejidos tumorales. La mayoría de las MMPs se expresaban en el tumor, tanto en el centro tumoral como en los márgenes de infiltración, en general con unos niveles incrementados en relación a la mucosa normal. Una mayoría de MMPs aparecieron también expresadas en los tejidos adyacentes al tumor, aunque para algunas de ellas los niveles de expresión fueron inferiores a los correspondientes al tejido tumoral. No se apreció expresión en ninguno de los tejidos analizados para la MMP-20, -21 y -26.

Igualmente, se apreció un incremento en la expresión de las TIMPs en los tejidos tumorales y peritumorales en relación a la mucosa sana, siendo especialmente destacable la diferencia en el caso del TIMP-2, que no se expresaba en la mucosa normal.

El análisis de la cantidad de proteína presente en las diferentes muestras analizadas mediante el western blot se llevó a cabo para un grupo de MMPs (-2, -3, -9 y -14), pudiendo comprobarse que los niveles encontrados se mantenían en concordancia con los hallazgos correspondientes al mRNA, con unas cantidades de proteína incrementadas en el centro del tumor y el margen de infiltración en relación a los tejidos adyacentes.

Existen evidencias obtenidas de diferentes modelos tumorales que señalan que la capacidad de diseminación y de promoción de la angiogénesis derivada de la



actividad de las MMPs está regulada por la expresión del NF- κ B^{102,103}. En una línea celular de carcinoma pulmonar, Shishidia y cols¹⁰⁴ demostraron como el bloqueo de la actividad del NF- κ B comportaba una disminución en la producción de MMP-9 medida mediante western-blot, y como la inducción de la producción de la MMP era consecuencia de la activación del NF- κ B.

En un estudio inmunohistoquímico desarrollado en pacientes con carcinomas de nasofaringe, Hu y cols⁹⁸ señalaron la existencia de una correlación significativa entre el NF- κ B (p65) y las MMP-3 y -9, relacionándose además los niveles de expresión con la categoría de afectación regional.

Bindhu y cols⁹⁷ evaluaron el nivel de expresión correspondiente al NF- κ B (p50 y p65) en una población de pacientes con carcinomas de cavidad oral (67), lesiones preneoplásicas en forma de leucoplasia hiperplásica (n=25) y leucoplasia con displasia (n=25), y muestras de mucosa normal (n=20) mediante inmunohistoquímica, correlacionándolo con la expresión correspondiente de gelatinasas (MMP-2 y MMP-9). La p50 contó con una localización tanto citoplasmática como nuclear en los cuatro tipos de histología, si bien la inmuorreactividad nuclear media y el grado de expresión citoplasmática se incrementaba de forma significativa a medida que progresaba el nivel de lesión histológica. La tinción citoplasmática de la p65 se comportó de forma similar a la p50, con presencia en los cuatro tipos histológicos y un incremento en la expresión en función del grado de la lesión. En el caso de la tinción nuclear, la p65 se mostró absolutamente ausente en la mucosa sana. Las leucoplasias y los carcinomas contaron con expresión nuclear de la p65, si bien los carcinomas tuvieron un nivel de positividad nuclear significativamente superior ($P < 0.001$) (Tabla 36).

Histología	Citoplasmático		Nuclear	
	media (desviación estándar)		positividad nuclear	
	p50	p65	p50	p65
Normal (n=20)	1.8 (0.8)	0.6 (0.5)	7.0%	0.0%
Hiperplasia (n=25)	1.8 (0.8)	1.0 (0.6)	23.4%	3.6%
Displasia (n=25)	2.0 (0.8)	1.8 (0.7)	41.6%	20.0%
Carcinoma (n=67)	2.6 (0.5)	2.0 (0.8)	72.1%	42.9%

Tabla 38. Expresión citoplasmática y positividad nuclear de p50 y p65.

La p50 presentó presencia citoplasmática en los cuatro tipos de histología, con una positividad nuclear mayor a mayor grado de lesión. La p65 se comportó de igual forma, con una diferencia significativamente superior en la positividad nuclear ($p < 0.001$) (tomado de Bindhu y cols⁹⁷).

La activación del NF- κ B durante la progresión histológica fue confirmada mediante técnicas de electroforesis. Se detecta que el 63% de los carcinomas analizados mostraron una banda correspondiente al NF- κ B, sin que dicha banda apareciera en ninguna de las muestras de las mucosas normales. Además, los casos de leucoplasia cuentan con una banda correspondiente al NF- κ B con una presencia moderada.

Los resultados del estudio realizado por Bindhu y cols⁹⁷ mostraron una correlación positiva entre el patrón de expresión de las gelatinasas, el grado histológico de progresión del tumor, y el incremento en la translocación nuclear o activación del NF- κ B.

De acuerdo con los resultados de nuestro estudio, existió una correlación elevada entre los niveles de expresión correspondiente a la mayoría de las MMPs evaluadas y la del NF κ B. Las MMPs que alcanzaron los niveles de correlación más elevados fueron las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 (Fig 81), confirmando la asociación en la actividad y expresión de dichas proteasas con la correspondiente al NF- κ B⁹⁷.

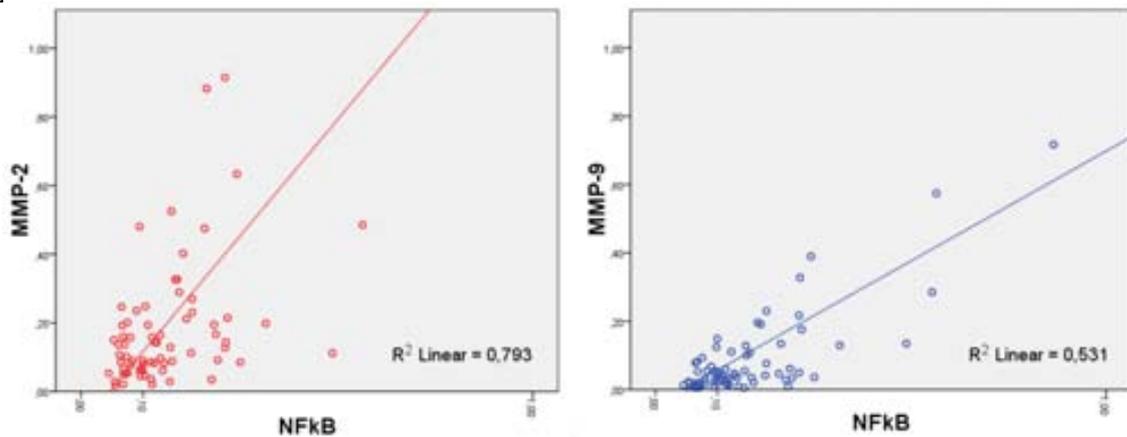


Figura 81. Correlación entre las MMP-2 y MMP-9 y el p50 (NF-κB) en nuestro estudio.

C) Quimioquinas y sus receptores.

Tal como señalamos en la introducción, existen una serie de citoquinas como la IL-1 y el TNF-α que, actuando sobre sus receptores específicos, cuentan con la capacidad de activar el NF-κB a través de la vía canónica.

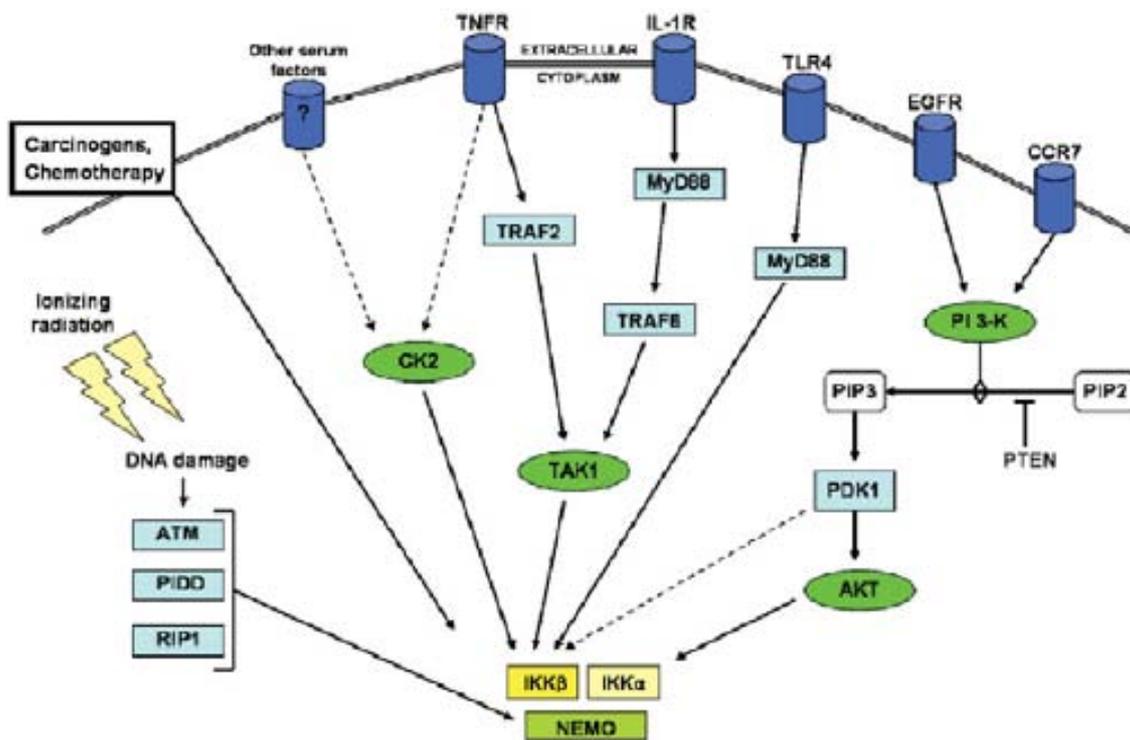


Figura 82. Modelo propuesto de activación del NF-κB en el carcinoma escamoso de cabeza y cuello.

Se ha visto como la IL-1 modula la actividad transcripcional del NF-κB en las células del carcinoma escamoso de cabeza y cuello promoviendo la

proliferación y la supervivencia celular¹¹. La siguiente figura (Fig 83) muestra los resultados de un experimento en el que se evaluaron líneas celulares de carcinoma escamoso de cabeza y cuello transfectadas con un vector que expresaba formas activas (IL-1) o inactiva (icIL-1RA) de IL-1, pudiendo comprobarse una reducción significativa ($P < 0.05$) en la actividad del NF- κ B en función de la actividad IL-1.

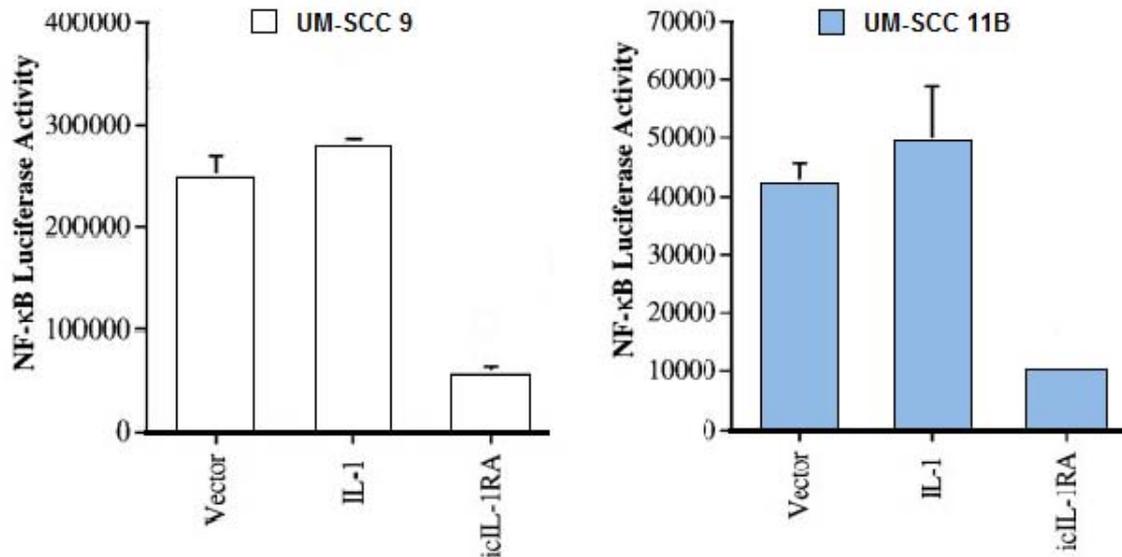


Figura 83. Efecto de la transfección de un vector que expresa formas activas (IL-1) o inactivas (icIL-1RA) de IL-1 en dos líneas celulares de carcinoma escamoso de cabeza y cuello (IM-SCC 9 y UM-SCC 11B).

Se observa una reducción estadísticamente significativa en la actividad del NF- κ B en función de la actividad de la IL-1 (tomado de Wolf y cols¹¹).

No existen, en nuestro conocimiento, estudios que hayan correlacionado la actividad a nivel transcripcional correspondiente a los genes que codifican los complejos NF- κ B e IL-1. Uno de los datos que resultaron sorprendentes en relación al estudio de correlaciones entre los niveles de expresión de la p65 y las diferentes citoquinas estudiadas fue la ausencia de correlación entre p65 y los diferentes elementos de la vía de la IL-1 evaluados. Una posible justificación sería que la relación existente entre la actividad IL-1 y la del NF- κ B no se ejerciera a nivel de la transcripción del gen p65, sino a través de alguno de los elementos que regulan el complejo NF- κ B.

La IL-8 es una quimioquina producida por los macrófagos, las células epiteliales y endoteliales, y cuenta con la capacidad de tratarse de uno de los



mayores mediadores relacionados con la respuesta inflamatoria. Tiene una función de quimiotaxis, por lo que es conocida como el factor quimiotáctico de los neutrófilos. También actúa como un potente factor promotor de la angiogénesis. La CCL5 o RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted) es una citoquina con capacidad quimiotáctica frente a los linfocitos T, eosinófilos y basófilos, contando con un papel de reclutamiento de leucocitos en relación con los procesos de inflamación. La GCP-2 (Granulocyte Chemotactic Peptide-2) es igualmente una quimioquina estructuralmente relacionada con la IL-8, y que cuenta igualmente con una capacidad quimiotáctica frente a los neutrófilos. La MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1), actualmente CCL2, es la quimioquina más importantes para el reclutamiento de monocitos. El GRO-1 α (Growth Regulated Oncogene-1 α), designado en la actualidad como CXCL1, se encuentra expresado por los macrófagos, neutrófilos y células epiteliales, y cuenta con una actividad quimiotáctica frente a los neutrófilos. Finalmente, el NAP-2 (Neutrophil-Activating Protein-2), denominada de acuerdo con la nueva nomenclatura CXCL7, muestra algunas de las actividades de la IL-8, si bien su capacidad de quimiotaxis de los neutrófilos se encuentra mucho más reducida.

Sólo aparecieron unos niveles de correlación moderados entre los niveles de expresión del NF- κ B y los correspondientes al RANTES y NAP-2, en tanto que con el resto de quimioquinas los valores de los coeficientes de correlación se mantuvieron más discretos. En conjunto podemos concluir que, a nivel de la expresión genética, no existió una relación significativa entre los niveles de expresión del NF- κ B y los de los genes que codifican las quimioquinas responsables de la quimiotaxis de los leucocitos.

Por el contrario, sí que apareció una relación significativa entre los niveles de expresión correspondientes al NF- κ B y los de otro elemento de la familia de las quimioquinas como es el SDF-1 α (Stromal cell-Derived Fator-1 α). El SDF-1 α , conocido en el nomenclatura actual como CXCL12, es una quimioquina que cuenta con una capacidad quimiotáctica para los linfocitos, pero que además se ha visto implicada en los mecanismos de carcinogénesis a partir de la promoción de la proliferación celular, la inhibición de la apoptosis, la inducción

de angiogenesis, la promoción de la extensión local y a distancia del tumor, y la supresión de la respuesta inmune (revisado en Kryczek y cols¹⁰⁵)

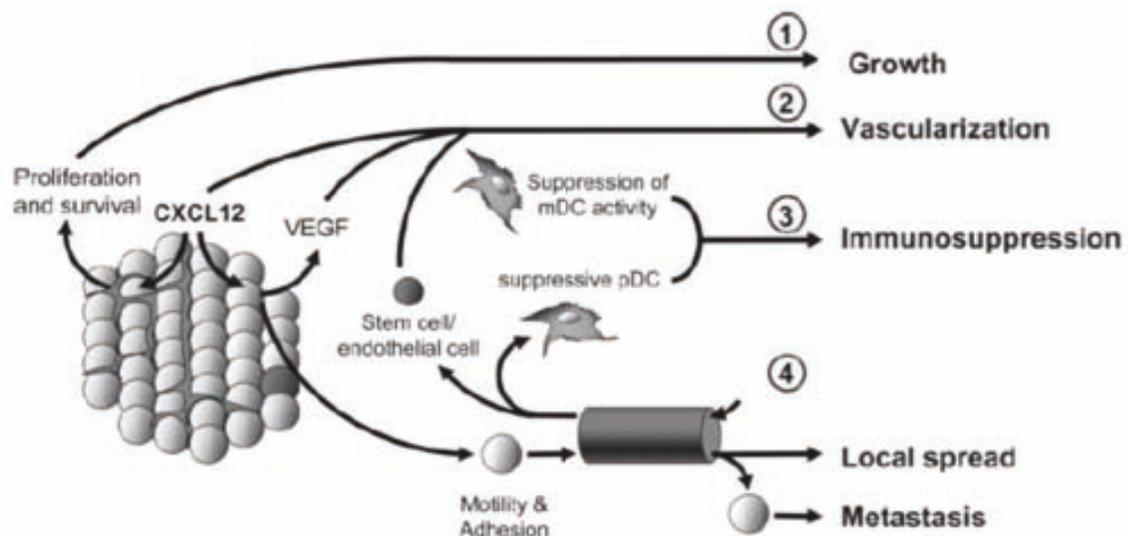


Figura 84. Mecanismo de actuación del SDF-1 α / CXCL12.

Se pensaba que el SDF-1 α contaba con un receptor específico, el CXCR4, si bien en la actualidad se ha identificado un segundo receptor, el CXCR7.

Existen evidencias que señalan que la activación del eje SDF-1 α /CXCR4 se encuentra relacionada con la diseminación ganglionar en los pacientes con carcinomas escamosos de cabeza y cuello^{106,107,108}. En un estudio experimental desarrollado en líneas celulares de carcinoma escamoso de cavidad oral, Rehman y cols¹⁰⁹ demostraron que la capacidad invasiva y de diseminación derivada de la acción del eje SDF-1 α /CXCR4 se ejercía a partir de la capacidad con que cuenta la activación de dicho eje en promover la actividad del NF- κ B.

El SDF-1 α induce la fosforilación y degradación del I κ B, permitiendo la liberación y la consiguiente translocación al núcleo de la subunidad p65 del complejo NF- κ B, suponiendo en definitiva un mecanismo de activación de la vía canónica del complejo. Este mecanismo de activación del NF- κ B a partir de la actividad del eje SDF-1 α /CXCR4 ha sido descrito en otros modelos de tumor como en el carcinoma de pulmón¹¹⁰ o el de mama¹¹¹.

De acuerdo con los resultados obtenidos en nuestro estudio, existió una correlación muy elevada entre los niveles de expresión correspondientes al NF- κ B y el SDF-1 α , alcanzándose un valor en el coeficiente de correlación

$r=0.795$. Igualmente, apareció una correlación entre los niveles de expresión del NF- κ B y los receptores CXCR-4 y CXCR-7, si bien en este caso los valores del coeficiente fueron más discretos ($r=0.515$ y $r=0.416$ respectivamente).

La siguiente gráfica muestra la correspondencia entre los niveles de expresión del NF- κ B y del SDF-1 α (Fig 85).

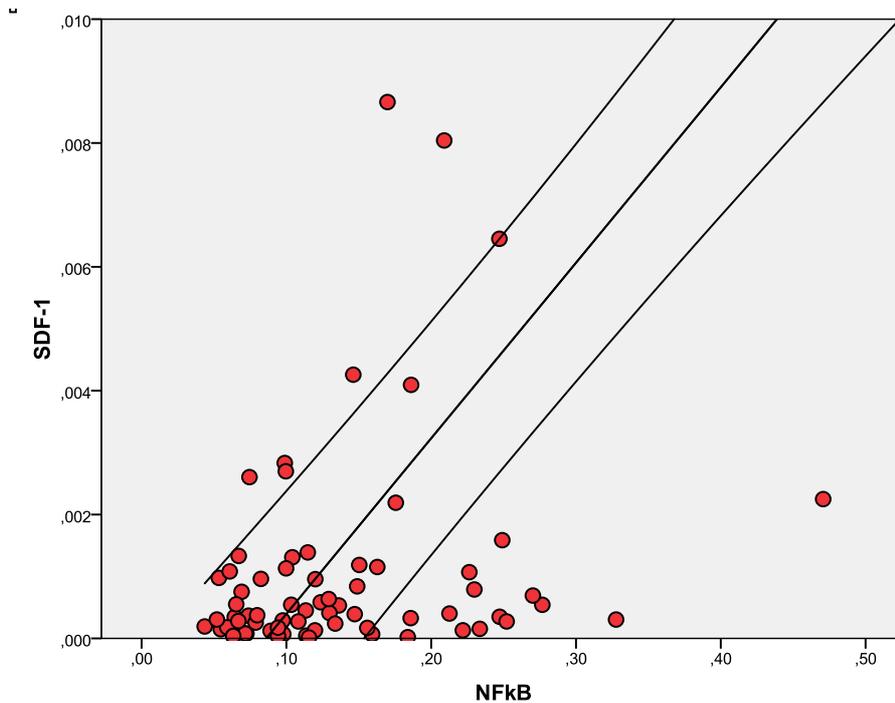


Figura 85. Correspondencia entre niveles de expresión del NF- κ B y del SDF-1.

No existen en la literatura estudios que hayan correlacionado los niveles de expresión del NF- κ B y del SDF-1 α . Los resultados obtenidos son compatibles con la conexión encontrada por diversos autores, de acuerdo con la cual la actividad del eje SDF-1 α /CXCR4 aparecería como uno de los promotores de la activación del NF- κ B a través de la vía clásica o canónica.

D) Factores de transcripción o de crecimiento relacionados con al angiogénesis.

Finalmente se evaluó la relación entre los niveles de expresión del NF- κ B y el HIF-1 α , un factor de transcripción que regula el proceso de angiogénesis, y el

VEGF, que es el factor de crecimiento más importante en relación con dicho proceso.

A diferencia de lo que sucedió con la mayoría de las citoquinas estudiadas, encontramos una relación significativa entre los niveles de expresión del p65 (NF- κ B) y los correspondientes a los genes encargados de la codificación del HIF y el VEGF. La siguiente figura (Fig 86) representa las correlaciones existentes entre los valores de expresión del p65 (NF- κ B) y los correspondientes al VEGF y HIF-1 α .

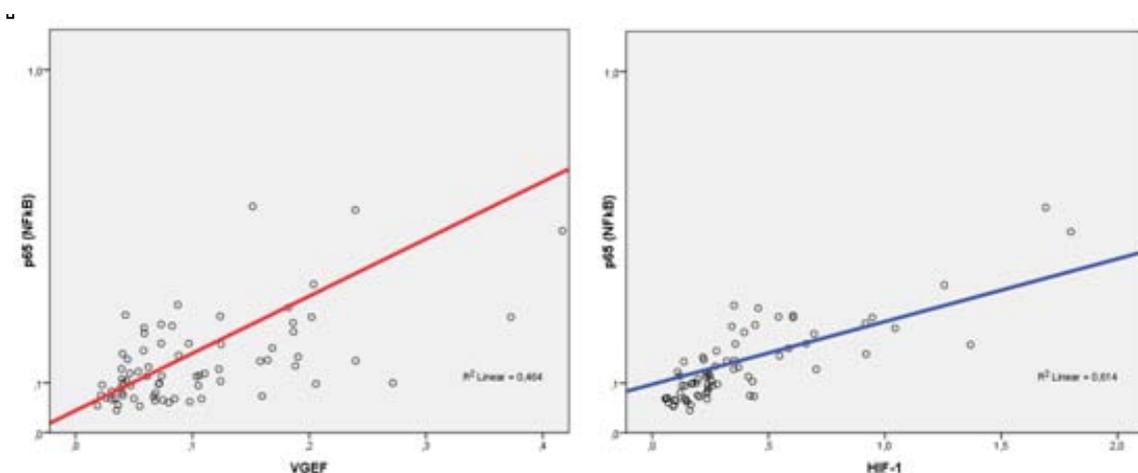


Figura 86. Correlación entre los valores de expresión de la p65 (NF- κ B) y el VEGF y HIF-1 α .

2. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD PRONÓSTICA DE LA EXPRESIÓN DEL NF- κ B EN RELACIÓN AL CONTROL LOCAL DE LA ENFERMEDAD EN PACIENTES TRATADOS CON RADIOTERAPIA O QUIMIO-RADIOTERAPIA.

La principal conclusión de nuestro estudio consistió en comprobar como el nivel de expresión del gen p65, componente fundamental en la actividad del complejo NF- κ B, apareció como un elemento con capacidad pronóstica en relación a la respuesta obtenida a nivel local en pacientes con carcinoma escamoso de cabeza y cuello tratados con radioterapia o quimio-radioterapia.

La figura 87 muestra las curvas de supervivencia actuarial libres de recidiva local de la enfermedad en función del nivel de expresión del p65 (NF- κ B).

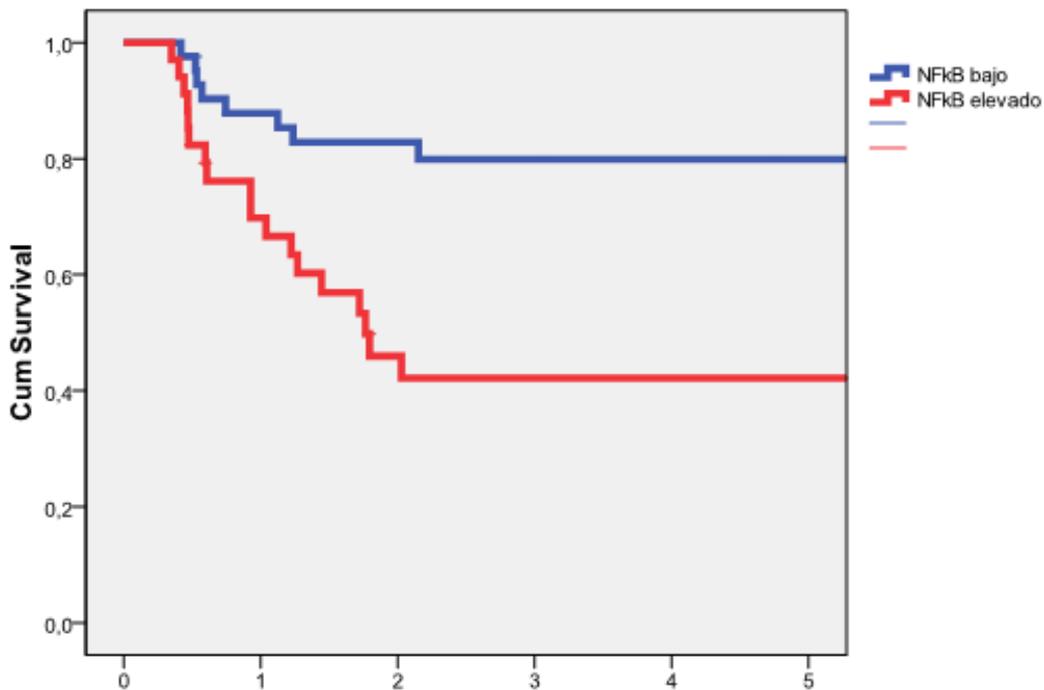


Figura 87. Supervivencia libre de enfermedad en función de la expresión del NF-κB.

La supervivencia a los 5 años libre de recidiva local del tumor para los pacientes con unos niveles de expresión bajos del NF-κB fue del 79.9% (IC 95%: 67.4-92.4%), en tanto que para el grupo de pacientes que contó con unos niveles de expresión elevados dicha supervivencia disminuyó al 42.1% (IC 95%:24.3-59.91%). Existieron diferencias significativas en relación a la capacidad de control local de la enfermedad por parte de la radioterapia o la quimio-radioterapia en función del nivel de expresión del NF-κB (P=0.001).

De acuerdo con los resultados obtenidos en un estudio multivariante, el nivel de expresión del gen p65 fue el factor pronóstico relacionado de forma más significativa con el control local de la enfermedad. En relación a los pacientes con unos niveles de expresión bajos del NF-κB, los pacientes con unos niveles de expresión elevados contaron con un riesgo 4.6 veces superior de sufrir la aparición de una recidiva del tumor a nivel local después de completado el tratamiento con radioterapia o quimio-radioterapia (IC 95%: 1.9-11.0, P=0.001). Ni la categoría de extensión local o regional del tumor, ni el tipo de tratamiento (radioterapia versus quimio-radioterapia) fueron variables que se relacionasen de forma significativa con el control de la enfermedad a nivel local. Tan sólo la localización primaria del tumor se relacionó de forma significativa con el



resultado a nivel local. Los pacientes con tumores localizados a nivel de la cavidad oral-orofaringe tuvieron con una tendencia a contar con un mejor control local de la enfermedad que los pacientes con tumores localizados en la laringe-hipofaringe.

En esta parte del estudio se llevó a cabo una determinación de los valores de expresión de la totalidad de los componentes de complejo NF- κ B. Pudo observarse un elevado grado de correlación entre la expresión de los genes responsables de la codificación de la p65 y la p50, ambos componentes del dímero funcional activado a través de la vía clásica. Por otro lado, pudo observarse como, de las proteínas del complejo con capacidad de regular la expresión a nivel nuclear de los genes diana, el valor de expresión de la p65 fue el único que se relacionó de forma significativa con el control local de la enfermedad tras el tratamiento con radioterapia o quimio-radioterapia.

Nuestros hallazgos son compatibles con los obtenidos por otros autores que han analizado la expresión del NF- κ B a partir de estudios inmunohistoquímicos de la proteína p65.

En un estudio desarrollado en 45 pacientes con carcinomas de orofaringe Zhang y cols⁸³ encontraron una relación significativa entre el grado de inmunorreactividad frente al NF- κ B (p65) y la supervivencia libre de enfermedad. Los pacientes con niveles más elevados de expresión (3+, n=9) contaron con una supervivencia significativamente inferior a la del resto de los pacientes (Fig 88).

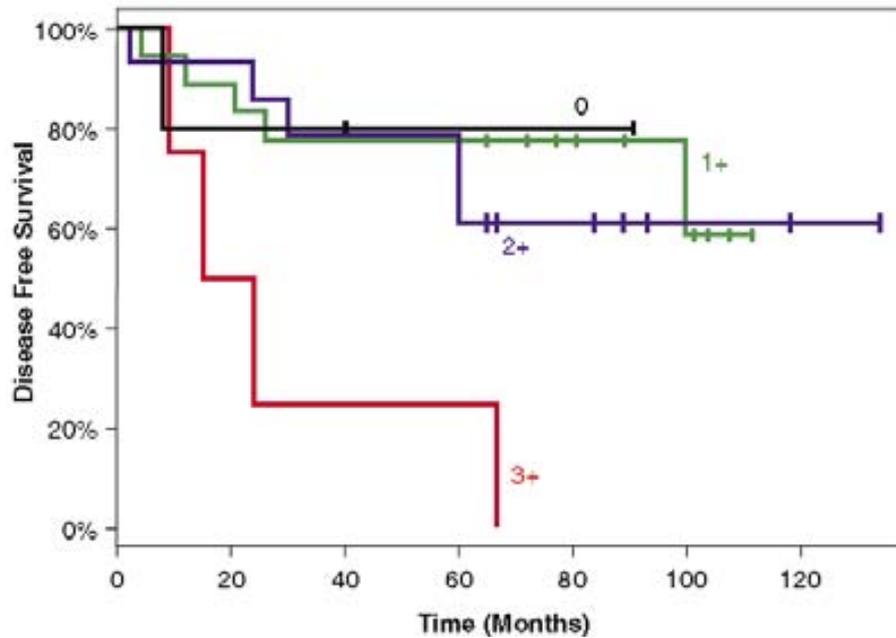


Figura 88. Supervivencia libre de enfermedad estratificada por los valores del NF- κ B en tejidos con carcinoma escamoso de amígdala. Se observa una supervivencia menor en los pacientes con niveles de NF- κ B más elevados ($p=0,047$) (tomado de Zhang y cols⁸³).

Una limitación de este estudio es que los autores no especificaron en el manuscrito el tipo de tratamiento realizado ni el control conseguido a nivel local con el mismo.

Por su parte, Huang y cols⁹³ demostraron la relación entre la expresión del NF- κ B y el pronóstico de la enfermedad en un estudio realizado en pacientes con carcinomas de laringe tratados de forma quirúrgica. Evaluaron la inmunorreactividad frente al NF- κ B (p65) en un grupo de 78 pacientes, encontrando positividad a nivel citoplasmático o nuclear en un 60.3% de las muestras (47/78). Los niveles de positividad encontrados fueron clasificados como leves (1-25% células positivas) en 10 ocasiones (12.8%), como moderados (25-75% células positivas) en 25 ocasiones (32.1%), y como intensos (>75% células positivas) en 12 ocasiones (15.4%).

Los autores encontraron una relación significativa entre la positividad frente al NF- κ B y la supervivencia, contando los pacientes que mostraron actividad NF- κ B con peor pronóstico (Fig 89).

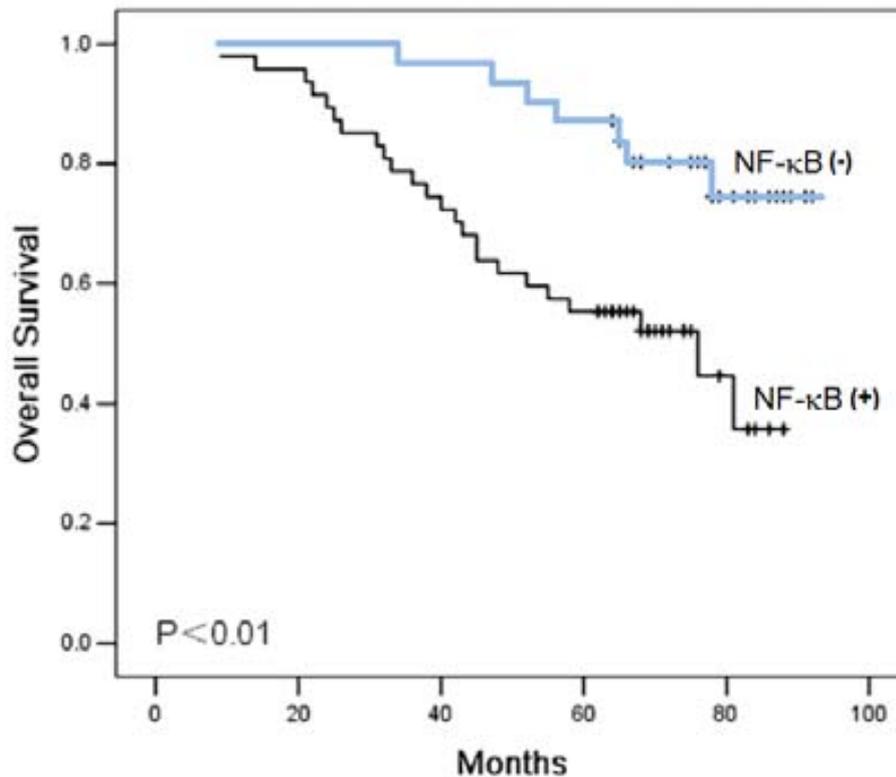


Figura 89. Supervivencia libre de enfermedad estratificada por la expresión del NF-κB en pacientes con carcinoma escamoso de laringe. Se observó una supervivencia significativamente menor para los pacientes con NF-κB positivo ($p=0.01$) (tomado de Huang y cols⁹³).

La positividad frente al NF-κB no se relacionó de forma significativa con variables como la edad o el sexo de los pacientes, la sub-localización del tumor, su diferenciación histológica, o el estadiaje tumoral. Por el contrario, existió una tendencia significativa para los pacientes con tumores localmente avanzados (T3-T4) o con presencia de metástasis ganglionares (N+) a contar con un mayor porcentaje de inmunopositividad. Los resultados de un análisis univariante mostraron que tanto la extensión local y regional del tumor como la positividad para el NF-κB fueron variables relacionadas con la supervivencia. Estas tres variables mantuvieron su capacidad pronóstica independiente en un análisis multivariante (Tabla 39).

		HR	IC 95%	P
Caterogía T	T1-T2	1	1.287-9.540	0.014
	T3-T4	3.503		
Categoria N	N0	1	1.893-13.786	<0.01
	N+	5.108		
NF-κB	-	1	1.128-7.007	0.027
	+	2.812		

Tabla 39. Análisis multivariante (regresión de Cox) de la supervivencia libre de enfermedad en 71 pacientes con carcinoma escamoso de laringe.

Tanto la extensión local y regional tumoral, como la expresión del NF-κB se relacionaron de forma significativa con la supervivencia (tomado de Huang y cols⁹³).

A diferencia de los resultados obtenidos en nuestro estudio, tanto la categoría de extensión local como regional contaron con una mayor capacidad pronóstica en relación a la obtenida por el NF-κB. Es posible que este hecho sea consecuencia del tratamiento realizado por los pacientes. Si el papel del NF-κB es discriminar la sensibilidad al tratamiento con radioterapia, la evaluación de su nivel de actividad en un grupo de pacientes sometidos a tratamiento quirúrgico comportaría una disminución en su capacidad pronóstica respecto a otras variables, tal como sucede en este estudio.

Por su parte, Yoshida y cols⁹² realizaron un estudio con la finalidad de evaluar el significado de la expresión del NF-κB (p65) como marcador de resistencia a la radioterapia en pacientes con carcinomas de la laringe en estadio inicial (T1-T2N0). Se analizaron un total de 35 pacientes con recidiva a nivel local del tumor y 70 pacientes que consiguieron el control local de la enfermedad. La determinación de la expresión del NF-κB se llevó a cabo a partir de un estudio inmunohistoquímico realizado sobre las biopsias del tumor previas al tratamiento, evaluando la intensidad en la tinción citoplasmática y/o nuclear. De forma paralela se realizó un estudio de la expresión del bcl-2 y del EGFR.

La expresión del NF-κB fue predominantemente citoplasmática, con una presencia ocasional a nivel nuclear (Fig 90).

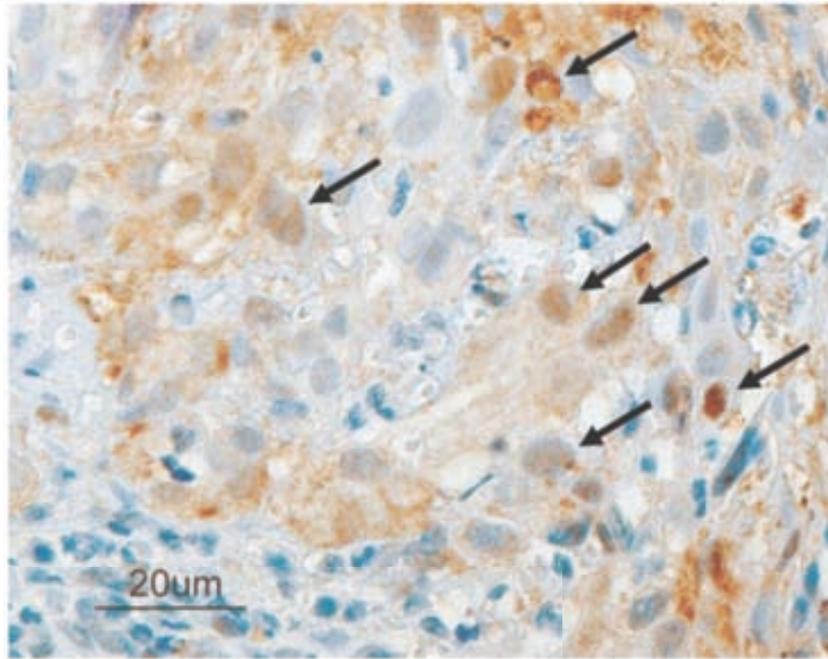


Figura 90. Tinción para el NF- κ B en un paciente varón de 52 años con carcinoma escamoso glótico T2.

Se observó una predominancia citoplasmática con una presencia ocasional nuclear (tomado de Yoshida y cols⁹²).

No aparecieron casos en los que la tinción fuese exclusivamente nuclear, sin expresión citoplasmática. Se consideraron como positivas aquellas muestras en las que al menos un 10% de las células tumorales mostraron una tinción de moderada a intensa.

De acuerdo con los resultados obtenidos, un 77% de los pacientes del grupo radorresistente fueron positivos frente al NF- κ B, frente a un 50% en el grupo de pacientes que se curaron con el tratamiento con radioterapia ($P=0.01$). Ni la expresión del bcl-2 ni la del EGFR se correlacionaron con la eficacia de la radioterapia en conseguir el control de la enfermedad.

La figura 91 muestra las curvas de supervivencia libres de recidiva local de la enfermedad en función de la positividad frente al NF- κ B.

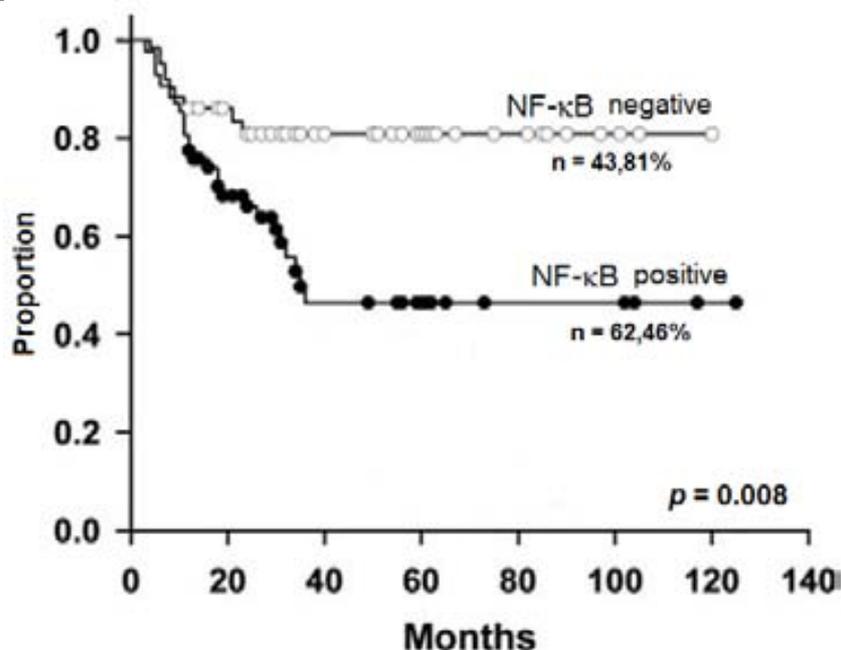


Figura 91. Supervivencia libre de recidiva local estratificada por la positividad para el NF-κB pacientes con carcinoma escamoso de laringe.

Se demuestra una supervivencia mayor en paciente con NF-κB negativo ($p=0.008$) (tomado de Yoshida y cols⁹²).

La supervivencia a los 5 años libre de enfermedad local para el grupo de pacientes NF-κB positivos fue del 46%, frente a un 81% en el grupo de pacientes NF-κB negativos ($P=0.008$).

En un análisis univariante tanto la expresión del NF-κB como la categoría de extensión local del tumor (T) se relacionaron de forma significativa con el control de la enfermedad. Al realizar un estudio multivariante, la categoría T perdió capacidad pronóstica, en tanto que la expresión del NF-κB mantuvo su significación (HR 0.43, IC 95%: 0.18-0.99, $P=0.04$).

En 29 de los pacientes recidivados fue posible determinar la expresión del NF-κB en la recidiva local del tumor. Un 90% de los tumores mostraron positividad frente al NF-κB, frente al 60% de positividad existente en las biopsias previas al tratamiento ($P=0.004$), aumentando además la intensidad en la tinción en una mayoría de las ocasiones.

Finalmente, en un trabajo de reciente publicación Nariai y cols⁹⁴ analizaron los resultados obtenidos en una cohorte de 50 pacientes con carcinomas de cavidad oral tratados con quimioterapia y/o radioterapia en función de la inmunopositividad frente al NF-κB (p65). Un total de 26 pacientes (52%)

mostraron positividad frente al NF- κ B. La positividad fue citoplasmática y nuclear en 11 ocasiones, sólo citoplasmática en 13 y sólo nuclear en 2. Existieron diferencias significativas en la supervivencia en función de la positividad frente al NF- κ B ($P=0.0018$) (Fig 92).

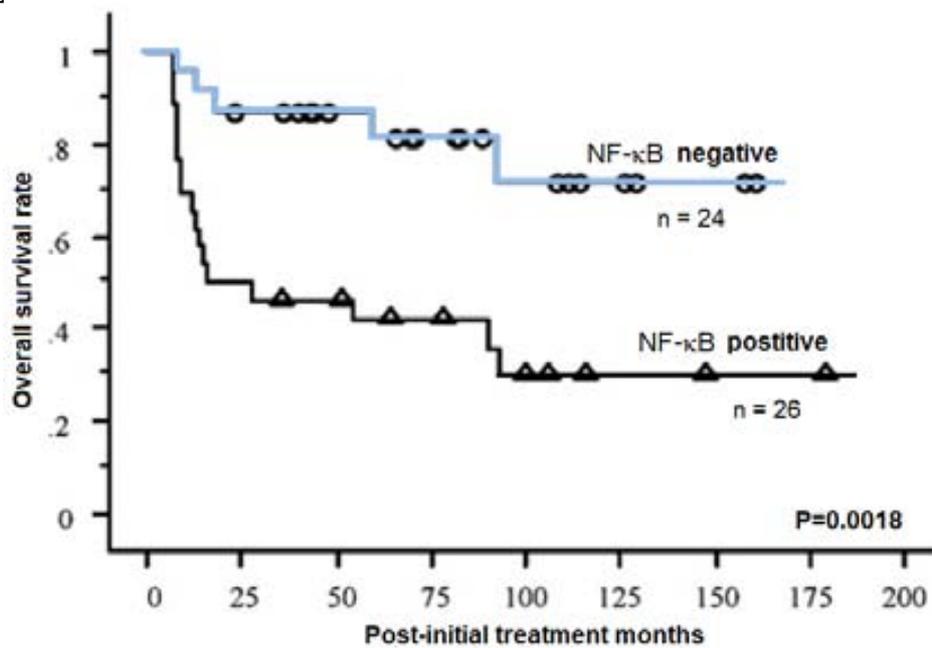


Figura 92. Supervivencia libre de recidiva local en pacientes con carcinoma de cavidad oral estratificados por la positividad para el NF- κ B. Se observó una supervivencia significativamente superior en pacientes con NF- κ B negativo ($p=0.0018$) (tomado de Nariai y cols⁹⁴).

Los autores señalaron la ausencia de diferencias significativas en supervivencia entre los 13 pacientes que contaron con positividad nuclear y los 13 pacientes en los que la positividad apareció de forma exclusiva a nivel citoplasmático.

En el mismo estudio los autores evaluaron la trascendencia pronóstica de las proteínas FAP-1 y p53. FAP-1 (Fas-associated phosphatase-1) es una tirosinofosfatasa citoplasmática que se une al dominio intracelular del receptor Fas, que es un miembro de la familia de receptores del TNF, responsables de una de las vías de inducción de la apoptosis. FAP-1 induce una inhibición de la apoptosis inducida por Fas, actuando en consecuencia como un elemento que mejora la capacidad de supervivencia celular. Se ha establecido la posibilidad de que el NF- κ B cuente con la capacidad de modular la expresión de FAP-1, si bien los autores no encontraron correlación entre la expresión de ambas



proteínas. En el estudio, la positividad frente a FAP-1, que apareció en un 52% de los pacientes, se relacionó con la supervivencia ($P=0.0409$), si bien de manera menos significativa que en el caso de NF- κ B. No existieron diferencias significativas en la supervivencia en relación a la p53, que apareció positiva en un 46% de los pacientes.

En un análisis multivariante, tanto NF- κ B (HR: 0.207, IC 95%: 0.049-0.869) como FAP-1 (HR:0.317, IC 95%:0.108-0.931) se relacionaron de forma significativa con la supervivencia de los pacientes.

A diferencia de los resultados que relacionan la actividad NF- κ B con la supervivencia o el control local obtenido con la administración de tratamientos basados en la radioterapia, Sawhney y cols⁴⁶ no encontraron relación entre la expresión del NF- κ B, estudiada mediante una determinación inmunohistoquímica de la actividad de la p65, y la supervivencia libre de enfermedad en una cohorte de 107 paciente con carcinomas de cavidad oral tratados quirúrgicamente. Esta ausencia de capacidad pronóstica pensamos que sería consecuencia del tipo de tratamiento realizado en los pacientes incluidos en el estudio. En caso de tratarse de un marcador de radiosensibilidad, el NF- κ B no tendría capacidad pronóstica discriminativa en el grupo de pacientes tratados con cirugía.

Considerados en conjunto, la totalidad de trabajos que han evaluado la capacidad pronóstica del NF- κ B en carcinomas de cabeza y cuello mediante técnicas de inmunohistoquímica en pacientes tratados con radioterapia han llegado a una conclusión similar: la actividad del NF- κ B guarda una relación significativa con el pronóstico de la enfermedad, sugiriendo que el nivel de expresión del NF- κ B podría ser considerado como un marcador de radiosensibilidad.

En otros tumores se ha demostrado igualmente la existencia de una relación entre el nivel de expresión del NF- κ B y la resistencia al tratamiento. En un modelo tumoral que guarda una cierta relación con el de cabeza y cuello como es el carcinoma de esófago, Izzo y cols¹¹² valoraron la asociación del nivel de actividad del NF- κ B con el pronóstico. Los autores estudiaron un total de 43

pacientes con carcinomas o adenocarcinomas del esófago torácico tratados con quimioterapia de inducción, seguida de quimio-radioterapia preoperatoria y cirugía. Un total de 14 pacientes (33%) no mostraron evidencia de restos tumorales viables en la pieza de resección (ypT0). Se realizó una determinación del nivel de expresión del NF-κB a partir de un estudio inmunohistoquímico en el que sólo se consideró como positiva la tinción nuclear de la p65. Se dispuso de información referente a la expresión preoperatoria de la p65 en 37 pacientes. El 7% (1/14) de los pacientes ypT0 contaron con positividad nuclear frente a la p65, frente a un 39% (9/23) de los pacientes que contaron con restos tumorales en el estudio de la pieza de esofagectomía (P=0.05). Un 53% de los pacientes con una p65 negativa en la biopsia inicial (7/13) pasaron a ser positivos en el tumor tras quimio-radioterapia. Considerando el status del NF-κB tanto antes como después del tratamiento, sólo el 7% de pacientes (1/14) ypN0 contaron con negatividad frente al NF-κB, frente a un 72% (21/29) de los ypN+.

Existieron diferencias al límite de la significación estadística en la supervivencia en función del status de actividad NF-κB pre-tratamiento (Fig 93).

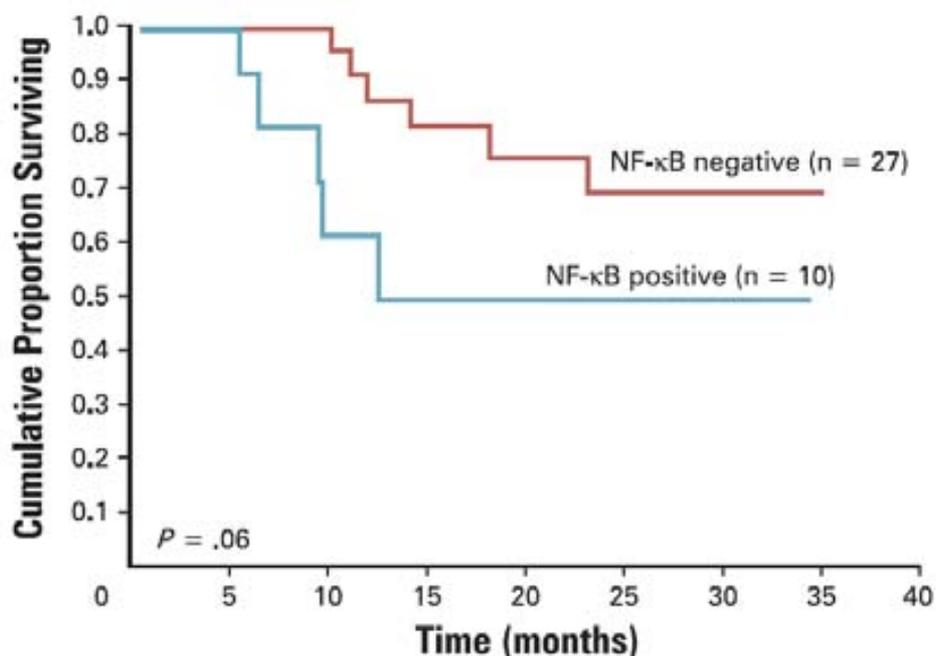


Figura 93. Supervivencia estratificada por la positividad para el NF-κB pre-tratamiento pacientes con carcinoma de esófago tratados con quimioterapia de inducción, seguida de quimio-radioterapia preoperatoria y cirugía.

Se demostró una supervivencia superior en paciente con NF-κB negativo (p=0.06) (tomado de Izzo y cols¹¹²).

Si se considera el status global de actividad del NF- κ B, incluyendo tanto la positividad pre-tratamiento como la correspondiente al estudio histológico de la pieza de resección, existieron diferencias altamente significativas en la supervivencia entre los pacientes NF- κ B negativos (n=22) y los positivos (n=21) como aparece en la siguiente figura (Fig 94).

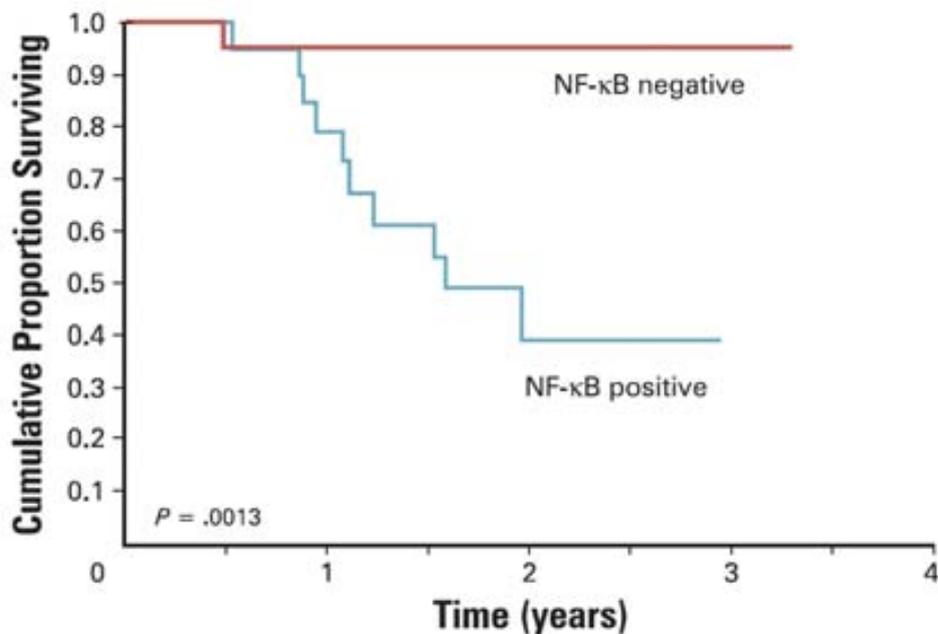


Figura 94. Supervivencia estratificada por la positividad global para el NF- κ B (teniendo en cuenta tanto positividad pre-tratamiento como en la pieza de resección) en pacientes con carcinoma de esófago tratados con quimioterapia de inducción, seguida de quimio-radioterapia preoperatoria y cirugía.

Se observó una supervivencia significativamente superior en pacientes con NF- κ B ($p=0.0013$) (tomado de Izzo y cols¹¹²).

Los autores destacaron el hallazgo de que los especímenes quirúrgicos en los que persistía una menor carga tumoral fueron los que contaban con un nivel de actividad del NF- κ B significativamente superior. La interpretación que hicieron de dicho hallazgo fue que sólo la presencia de un número limitado de células positivas frente al NF- κ B era suficiente para inducir la resistencia al tratamiento. Las principales conclusiones fueron que el NF- κ B activado se asocia con un peor pronóstico de la enfermedad, y que el tratamiento adyuvante con quimioterapia y quimio-radioterapia puede inducir la activación del NF- κ B, haciéndolo aún más relevante como un elemento diana desde un punto de vista terapéutico.

Existen evidencias obtenidas en estudios de radiobiología que demuestran el papel jugado por la expresión del NF- κ B en relación a la respuesta al tratamiento con radioterapia, y que justificarían en consecuencia nuestros hallazgos y el de los autores que han encontrado una relación entre el control de la enfermedad con el tratamiento con radioterapia y la expresión del NF- κ B. Didelot y cols¹¹³ realizaron un estudio con dos líneas celulares de carcinoma de cabeza y cuello. En ambas líneas celulares, el tratamiento con dexametasona o TNF α provocaba respectivamente una disminución y un incremento de la actividad del NF- κ B, que se veía reflejado en una inducción o inhibición paralela de la apoptosis respectivamente. El tratamiento con dexametasona a dosis bajas producía una disminución de la radiorresistencia, en tanto que las células tratadas con el TNF α , que tuvieron un incremento en la actividad del NF- κ B, contaron con un incremento de la radiorresistencia. La figura 95 muestra las modificaciones resultantes en el porcentaje de apoptosis respecto al nivel basal de apoptosis resultante de la modulación de la actividad NF- κ B mediante el tratamiento con dexametasona o TNF α .

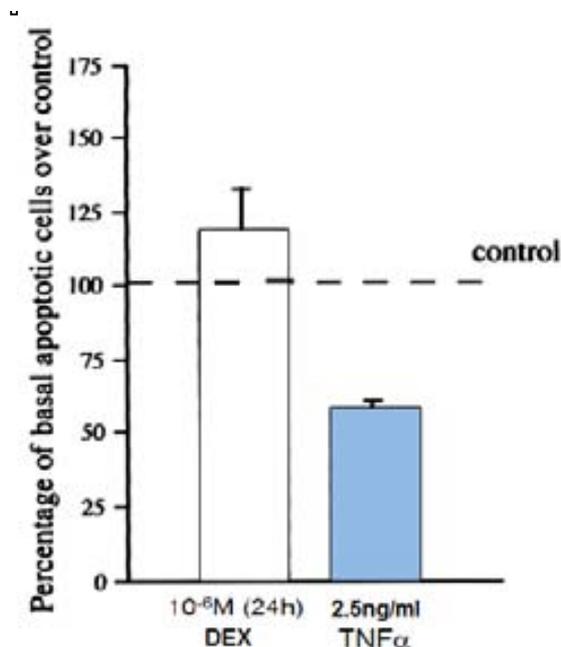


Figura 95. Efecto sobre la apoptosis del pre-tratamiento con dexametasona (DEX) o TNF α de la línea celular KB3 de carcinoma de cabeza y cuello.

Tomando como referencia el porcentaje de apoptosis de células no tratadas, se detecta que el tratamiento con DEX provoca un incremento de la apoptosis celular, mientras que el TNF α causa una disminución de la misma (tomado de Didelot y cols¹¹³).

Por su parte, Kato y cols¹¹⁴ realizaron un estudio con 3 líneas celulares de carcinoma escamoso evaluando su sensibilidad a la radioterapia y a un tratamiento con cisplatino. No existió una correspondencia en el orden de sensibilidad a ambos tratamientos. Los autores encontraron una correlación entre la activación constitutiva del NF- κ B y la radiorresistencia. La inhibición de la actividad NF- κ B a partir de la transfección de I κ B α modificado no degradable condujo a una radiosensibilización respecto a la población de células parenterales (Fig 96).

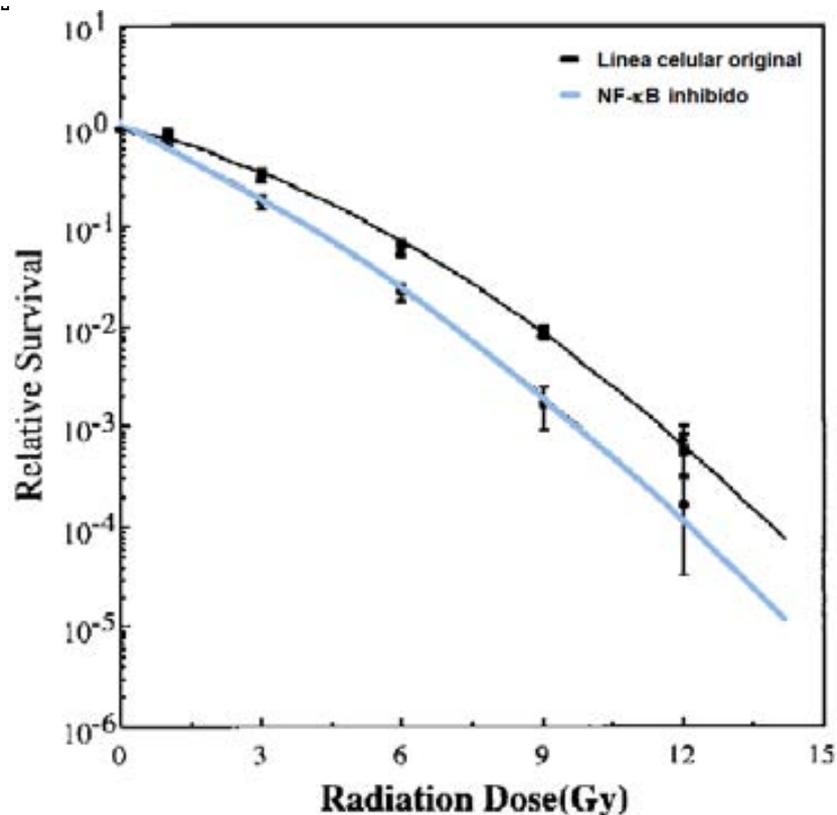


Figura 96. Sensibilidad a la radioterapia de la línea celular UM-SCC 9 a la que se le ha inhibido la actividad del NF- κ B a partir de la transfección de I κ B α modificado no degradable.

La inhibición del NF- κ B causó una mayor sensibilidad a la radioterapia con respecto a la población celular original (tomado de Kato y cols¹¹⁴).

Por el contrario, la inhibición del NF- κ B no modificó la sensibilidad al tratamiento con cisplatino.

Kim y cols¹¹⁵ realizaron otro estudio de radiobiología experimental con células de carcinoma escamoso (SCC-65) a las cuales se atenuaba la función del NF- κ B a partir de la transfección con un vector que codificaba p65 mutado,

obteniéndose líneas celulares clonadas alteradas (líneas celulares d6 y d12). El estudio de la función de las proteínas relacionadas con el complejo NF- κ B demostró que la cantidad de proteína p65 funcionante en las líneas mutadas se redujo aproximadamente un 50% respecto a la de las células parenterales SCC-65. Los autores encontraron que la sensibilidad a la radioterapia de las células clonadas fue superior al de las células parenterales, reflejado en la supervivencia celular (Fig 97).

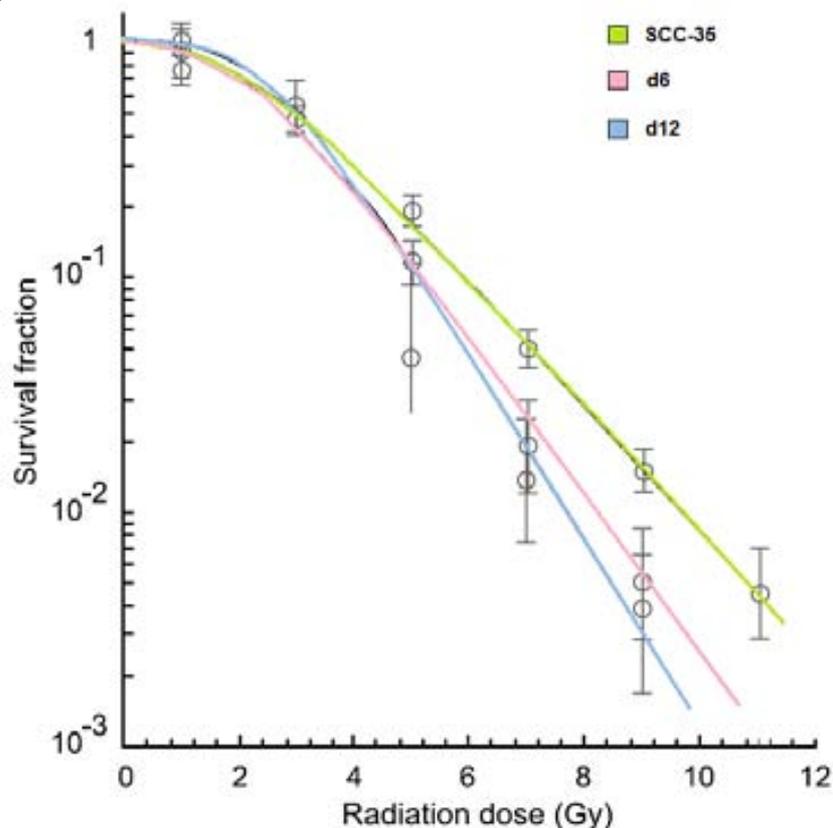


Figura 97. Efecto de la modificación de la actividad de p65 sobre la radiosensibilidad.

Se tomó una línea celular de carcinoma de cabeza y cuello (SCC-36) a la que se le atenuó la actividad del NF- κ B a través de la transfección de un vector con que codifica p65 mutado (línea celular d6 y d12). Las tres líneas celulares fueron tratadas con radioterapia. Las dos líneas celulares mutadas presentaron una mayor radiosensibilidad que la población celular original (tomado de Kim y cols¹⁵).

En un estudio experimental in vivo con líneas celulares de carcinoma de cavidad oral inyectadas en ratones atímicos, Tamatani y cols²² evidenciaron como la adición de cefarantina, un alcaloide con capacidad de disminuir la actividad NF- κ B, contaba con la capacidad de potenciar la acción terapéutica

de la radioterapia. La figura 98 muestra los resultados correspondientes al volumen tumoral obtenidos en los especímenes control, tratados sólo con cefarantina o sólo con radioterapia, y en caso del tratamiento conjunto de cefarantina y radioterapia.

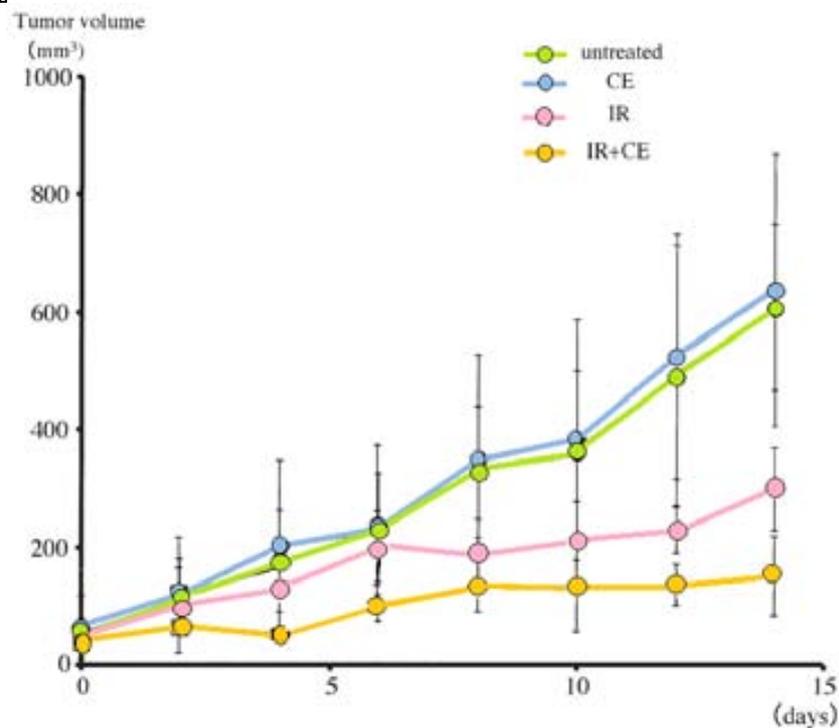


Figura 98. Efecto de la cefarantina en la respuesta a la radioterapia en células B88 de carcinoma de cavidad oral.

Las células fueron inoculadas en ratones atímicos. Cuando los tumores alcanzan un volumen determinado fueron tratados con cefarantina (CE), radioterapia (IR) y la combinación de ambos (IR+CE). Se comprobó como la adición de la cefarantina el tratamiento con radioterapia consiguió una mayor reducción tumoral comparada con los no tratados, tratados sólo con radioterapia o sólo con cefarantina ($P=0,05$) (tomado de Tamatani y cols²²).

Pudo evidenciarse como el tratamiento con cefarantina y radioterapia consiguió una reducción significativa del crecimiento tumoral ($P<0.05$).

Una de las principales limitaciones en nuestro estudio es que la cuantificación de la expresión del NF- κ B sólo se llevó a cabo a nivel de los niveles de transcripción de los genes del complejo mediante RT-PCR. La actividad biológica real del NF- κ B corresponde tan sólo a la forma activada de la proteína que ha alcanzado la translocación nuclear, proceso complejo que depende de la existencia de diferentes vías de activación. En consecuencia, dada la



existencia de múltiples mecanismos de regulación a lo largo de la vía, el nivel de expresión del gen no es equivalente necesariamente al nivel de actividad biológica del NF- κ B. Existen, sin embargo, estudios que han analizado el nivel de correlación existente entre la expresión del gen mediante técnicas de RT-PCR y la actividad de la proteína evaluada a partir de inmunohistoquímica, encontrándose unos niveles de correspondencia muy elevados⁹³.

Como medida indirecta de la actividad del NF- κ B, se planteó la determinación de los niveles de expresión de una serie de genes que se sabe que se encuentran regulados por la actividad del NF- κ B. Se determinó el nivel de actividad de la ciclina D1, uno de los genes implicados en la regulación del ciclo celular; de la MMP-2, cuya actividad se ha visto asociada a la capacidad de invasión tumoral a partir de la actividad colagenasa; el VEGF, implicado en los mecanismos de angiogénesis; y de la Bcl-XL, un gen que codifica una de las proteínas reguladoras de los mecanismos de apoptosis. Cabe destacar la existencia de una relación significativa entre los niveles de expresión de la p65 y los correspondientes a la totalidad de esta batería de genes. Estos datos confirman los hallazgos obtenidos por otros autores en el sentido de la existencia de una correlación significativa entre la expresión del gen p65 y la actividad reguladora ejercida por el complejo NF- κ B.

Una segunda limitación del estudio viene dada por su carácter retrospectivo. No existen en la literatura estudios que hayan evaluado de forma prospectiva la capacidad pronóstica del NF- κ B. Dados los resultados obtenidos por diferentes autores y los correspondientes al presente estudio en relación a la capacidad del NF- κ B de discriminar la respuesta al tratamiento con radioterapia, creemos justificada la realización de estudios de naturaleza prospectiva que evalúen el posible papel del nivel de actividad del NF- κ B como factor pronóstico en los pacientes con carcinoma de cabeza y cuello, así como su aptitud como marcador de radiosensibilidad.

La trascendencia de nuestros hallazgos reside en que, si bien la actividad de diferentes vías metabólicas o la expresión de determinadas proteínas se ha visto relacionada con el pronóstico y la supervivencia en pacientes con carcinomas escamosos de cabeza y cuello, no existen marcadores pronósticos



moleculares con capacidad discriminadora validada en relación a los resultados obtenidos con un tratamiento específico como es la radioterapia. La importancia de encontrar marcadores biológicos de radiosensibilidad reside en la posibilidad de modular el tipo de tratamiento en función de las características específicas del tumor, lo que comportaría sin duda una mejora en las posibilidades de control de la enfermedad.

Existen estudios que han evaluado la capacidad como factor pronóstico de respuesta a la radioterapia de marcadores moleculares como el EGFR, la actividad telomerasa, la expresión de la ciclina D1, la COX-2, la galectina-1, o los mecanismos de reparación del ADN (revisado en Silva y cols¹¹⁶ y Almadori y cols¹¹⁷). Sin embargo, los resultados obtenidos hasta el momento, en ocasiones contradictorios, no han sido lo suficientemente consistentes como para considerar alguna de estas moléculas con entidad para poder ser aplicadas de forma sistemática en la práctica clínica.

Recientemente, Wildeman y cols¹¹⁸ publicaron los resultados de un estudio caso-control en el que analizaban la capacidad pronóstica de un panel de 13 marcadores moleculares en relación a la consecución del control local tras la administración de un tratamiento con radioterapia en pacientes con carcinoma de la laringe. Los autores realizaron un estudio inmunohistoquímico en 26 pacientes con carcinomas recidivados y 33 pacientes en los que la radioterapia consiguió el control de la enfermedad. Ninguna de las agrupaciones de marcadores ni un análisis por agrupación jerárquica identificó de forma significativa el riesgo de recidiva. De los marcadores evaluados, la expresión de la COX-2 y de la anhidrasa carbónica-9 (CA9) fueron los que se asociaron de forma más intensa a la posibilidad de controlar con radioterapia la enfermedad. Los resultados de este estudio señalan la dificultad de encontrar marcadores consistentes con capacidad de discriminar los pacientes candidatos a un determinado tipo de tratamiento.

VIII. Conclusiones



1.- En pacientes con carcinomas escamosos de cabeza y cuello tratados con radioterapia o quimio-radioterapia, existió una relación altamente significativa entre los niveles de expresión transcripcional del NF- κ B y el control local de la enfermedad. Para el grupo de pacientes con unos niveles de expresión bajos de NF- κ B, la supervivencia actuarial libre de recidiva local de la enfermedad fue del 79.9%, disminuyendo al 42.1% para los pacientes con unos niveles de expresión elevados. Los resultados de un análisis multivariante mostraron que, en relación con los pacientes que contaron con unos niveles de expresión bajos del NF- κ B, los pacientes con unos niveles de expresión elevados contaron con un riesgo de fracaso local 4.5 veces superior.

2.- En los pacientes con carcinomas de cabeza y cuello, no se apreciaron diferencias significativas en los niveles de expresión del NF- κ B entre las muestras de tumor y las obtenidas en áreas de mucosa sana.

3.- No aparecieron diferencias significativas entre los valores de expresión del NF- κ B y variables clínicas como la localización primaria del tumor, la categoría de extensión local o regional, el antecedente en el consumo de tóxicos, o el grado histológico del tumor.

4.- Los niveles de expresión del NF- κ B se correlacionaron de forma elevada o muy elevada con los correspondientes a genes relacionados con mecanismos de invasión tisular como las MMP-1, -2 y -9 y el TIMP-1, con genes relacionados con el metabolismo de las prostaglandinas como la mPGES-2, con genes relacionados con la síntesis de citoquinas como IL-1RAc ρ , IL-1R1 y Sdf-1, y con genes relacionados con los mecanismos promotores de angiogénesis como HIF-1 α y VEGF.

5.- En los carcinomas de cabeza y cuello, existió una elevada correlación entre los niveles de expresión de los genes del complejo NF- κ B que son activados a través de la vía canónica (p65/p50), en tanto que los genes activados a través de la vía alternativa no se correlacionaron.

IX. Bibliografía

- 1.- Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 1986;47:921-928.
- 2.- Tamatani T, Azuma M, Aota K, Yamashita T, Bando T, Sato M. Enhanced I kappa B kinase activity is responsible for the augmented activity of NF-kappa B in human head and neck carcinoma cells. *Cancer Letters* 2001;171:165-172.
- 3.- Lluís JM, Buricchi F, Chiarugi P, Morales A, Fernandez-Checa JC. Dual role of mitochondrial reactive oxygen species in hypoxia signaling: activation of nuclear factor-kappa B via c-SRC and oxidant-dependent cell death. *Cancer Res* 2007;67:7368-7377.
- 4.- Gilmore TD. Multiple mutations contribute to the oncogenicity of the retroviral oncoprotein v-Rel. *Oncogene* 1999;18:6925-6937.
- 5.- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
- 6.- Allen CT, Ricker JL, Chen Z, Van Waes C. Role of activated nuclear factor-kappa B in the pathogenesis and therapy of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 2007;29:959-971.
- 7.- Loercher A, Lee TL, Ricker JL, Howard A, Geoghegan J, Chen Z, Sitcheran R, Chuang EY, Michell JB, Baldwin AS Jr, Van Waes C. Nuclear factor-kappa B is an important modulator of the altered gene expression profile and malignant phenotype in squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2004;64:6511-6523.
- 8.- Kourelis K, Sotiropoulou-Bonikou G, Vondoros G, Repanti M, Varakis I, Goumas P. Coordinated upregulation of COX-2 and NF-kappa B is a steady feature of laryngeal carcinogenesis. *ORL* 2007;69:181-189.
- 9.- Ondrey FG, Dong G, Sunwoo J, Chen Z, Wolf JS, Crowl-Bancroft CV, Mukaida N, Van Waes C. Constitutive activation of transcription factors NF-(kappa)B, AP-1, and NF-IL6 in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines that express pro-inflammatory and pro-angiogenic cytokines. *Mol Carcinog* 1999;26:119-129.
- 10.- Aggarwal BB. Nuclear factor-kappa B: the enemy within. *Cancer Cell* 2004;6:203-208.
- 11.- Wolf JS, Chen Z, Dong G, Sunwoo JB, Bancroft CC, Capo DE, Yeh NT, Mukaida N, Van Waes C. IL (interleukin)-1 alpha promotes nuclear factor-kappa B and AP-1-induced IL-8 expression, cell survival, and proliferation in head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 2001;7:1812-1820.

- 12.- Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2003;3:745-756.
- 13.- Jackson-Bernitsas DG, Ichikawa H, Takada Y, Myers JN, Lin XL, Darnay BG, Chaturvedi MM, Agarwal BB. Evidence that TNF-TNFR1-TRADD-TRAF2-RIP-TAK1-IKK pathway mediates constitutive NF-kappaB activation and proliferation in human head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* 2007;26:1385-1397.
- 14.- Grandis JR, Tweardy DJ. TGF-alpha and EGFR in head and neck cancer. *J Cell Biochem Suppl* 1993;17F:188-191.
- 15.- Bancroft CC, Chen Z, Yeh J, Sunwoo JB, Yeh NT, Jackson S, Jackson C, Van Waes C. Effects of pharmacologic antagonists of epidermal growth factor receptor, PI3K and MEK signal kinases on NF-kappaB and AP-1 activation and IL-8 and VEGF expression in human head and neck squamous cell carcinoma lines. *Int J Cancer* 2002;99:538-548.
- 16.- Wang J, Zhang X, Thomas SM, Grandis JR, Wells A, Chen ZG, Ferris RL. Chemokine receptor 7 activates phosphoinositide-3 kinase-mediated invasive and prosurvival pathways in head and neck cancer cells independent of EGFR. *Oncogene* 2005;24:5897-5904.
- 17.- Yu M, Yeh J, Van Waes C. Protein kinase casein kinase 2 mediates inhibitor-kappaB activation by serum factor(s) in head and neck squamous carcinoma cells. *Cancer Res* 2006;66:6722-6731.
- 18.- Cohen J, Chen Z, Lu SL, Yang XP, Arun P, Ehsanian R, Brown MS, Lu H, Diallo O, Wang WJ, Van Waes C. Attenuated transforming growth factor beta signaling promotes nuclear factor-kappaB activation in head and neck cancer. *Cancer Res* 2009;69:3415-3424.
- 19.- Anto RJ, Mukhopadhyay A, Shishodia S, Gairola CG, Aggarwal BB. Cigarette smoke condensate activates nuclear transcription factor-kappaB through phosphorylation and degradation of I kappa B(alpha): correlation with induction of cyclooxygenase-2. *Carcinogenesis* 2002;23:1511-1518.
- 20.- Rohrer J, Wuertz BR, Ondrey F. Cigarette smoke condensate induces nuclear factor kappa-b activity and proangiogenic growth factors in aerodigestive cells. *Laryngoscope* 2010;120:1609-1613.
- 21.- Bradburn JE, Pei P, Kresty LA, Lang JC, Yates AJ, McCormick AP, Mallery SR. The effects of reactive species on the tumorigenic phenotype of

human head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cells. *Anticancer Res* 2007;27:3819-3828.

22.- Tamatani T, Azuma M, Motegi M, Takamaru N, Kamashima Y, Bando T. Cepharantin-enhanced radiosensitivity through the inhibition of radiation-induced nuclear factor-kappaB activity in human oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Oncol* 2007;31:761-768.

23.- Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY, Pestell RG, Baldwin AS Jr. NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol* 1999;19:5785-5799.

24.- Hinz M, Krappmann D, Eichten A, Heder A, Scheidereit C, Strauss M. NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol Cell Biol* 1999;19:2690-2698.

25.- Ruan H, Masuda M, Ito A, Umezawa K, Nakashima T, Yasumatsu R, Yamamoto T, Weinstein IB, Komune S. Effects of a novel NF-kappaB inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ), on growth, apoptosis, gene expression, and chemosensitivity in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Head Neck* 2006;28:158-165.

26.- Van Waes C, Changg AA, Lebowitz PF, Druzgal CH, Elsayed YA, Sunwoo JB, Rudy SF, Morris JC, Mitchell JB, Camphausen K, Gius D, Adams J, Sausville EA, Conley BA. Inhibition of nuclear factor-kappaB and target genes during combined therapy with proteasome inhibitor bortezomib and reirradiation in patients with recurrent head-and-neck squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;63:4100-4112.

27.- Karin M, Lin A. NF-kappaB the crossroads of life and death. *Nature Immunol* 2002;3:221-227.

28.- Duffey DC, Crowl-Bancroft CV, Chen Z, Ondrey FG, Nejad-Sattari M, Dong G, Van Waes C. Inhibition of transcription factor nuclear factor-kappaB by a mutant inhibitor-kappaBalpha attenuates resistance of human head and neck squamous cell carcinoma to TNF-alpha caspase-mediated cell death. *Br J Cancer* 2000;83:1367-1374.

29.- Duffey DC, Chen Z, Dong G, Ondrey FG, Wolf JS, Brown K, Siebenlist U, Van Waes C. Expression of a dominant-negative mutant inhibitor-kappaBalpha of nuclear factor-kappaB in human head and neck squamous cell carcinoma



inhibits survival, proinflammatory cytokine expression, and tumor growth in vivo. *Cancer Res* 1999;59:3468-3474.

30.- Loercher A, Lee TI, Ricker JL, Howard A, Geoghegan J, Chen Z, Sunwoo JB, Sitcheran R, Chuang EY, Mitchell JB, Baldwin AS Jr, Van Waes C. Nuclear factor-kappaB is an important modulator of the altered gene expression profile and malignant phenotype in squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2004;64:6511-6523.

31.- Sriuranpong V, Park JI, Amornphimoltham P, Patel V, Nelkin BD, Gutkind JS. Epidermal growth factor receptor-independent constitutive activation of STAT3 in head and neck squamous cell carcinoma is mediated by the autocrine/paracrine stimulation of the interleukin 6/gp130 cytokine system. *Cancer Res* 2003;63:2948-2956.

32.- Tergaonkar V, Pando M, Vafa O, Wahl G, Verma I. p53 stabilization is decreased upon NF-kappaB activation: a role for N-kappaB in acquisition of resistance to chemotherapy. *Cancer Cell* 2002;1:493-503.

33.- Weisz L, Damalas A, Lontos M, Karakaidos P, Fontemaggi G, Maor-Aloni R, Kalis M, Leyrero M, Strano S, Gorgoulis VG, Rotter V, Blandino G, Oren M. Mutant p53 enhances nuclear factor kappaB activation by tumor necrosis factor alpha in cancer cells. *Cancer Res* 2007;67:2396-2401.

34.- Lee TL, Eh J, Friedman J, Yan B, Yang X, Yeh NT, Van Waes C, Chen Z. A signal network involving coactivated NF-kappaB and STAT3 and altered p53 modulates BAX/BCL-WL expression and promotes cell survival of head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2008;122:1987-1998.

35.- Camacho M, León X, Fernández-Figueras MT, Quer M, Vila L. Prostaglandin E(2) pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2008;30:1175-1181.

36.- Jung TTK, Berlinger NT, Juhn SK. Prostaglandins in squamous cell carcinoma of the head and neck: a preliminary study. *Laryngoscope* 1985;95:307-12.

37.- Chan G, Boyle JO, Yang EK, Zhang F, Sacks PG, Shah JP, Edelstein D, Soslow RA, Koki AT, Woerner BM, Masferrer JL, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* 1999; 59:991-994.

- 38.- Sudbø J, Ristimäki A, Sondresen JE, Kildal W, Boysen M, Koppang HS, Reith A, Risberg B, Nesland JM, Bryne M. Cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in high-risk premalignant oral lesions. *Oral Oncol* 2003;39:497-505.
- 39.- Shibata M, Kodani I, Osaki M, Araki K, Adachi H, Ryoike K, Ito H. Cyclooxygenase-1 and -2 expression in human oral mucosa, dysplasias and squamous cell carcinomas and their pathological significance. *Oral Oncol* 2005;41:304-312.
- 40.- Pai R, Soreghan B, Szabo IL, Pavelka M, Baatar D, Tarnawski AS. Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. *Nat Med* 2002;8:289-293.
- 41.- Liu CH, Chang SH, Narko K, Trifan OC, Wu MT, Smith E, Haudenschild C, Lane TF, Hla T. Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J Biol Chem* 2001;276:18563-18569.
- 42.- Gallo O, Franchi A, Magnelli L, Sardi I, Vannacci A, Boddi V, Chiarugi V, Masini E. Cyclooxygenase-2 pathway correlates with VEGF expression in head and neck cancer. Implications for tumor angiogenesis and metastasis. *Neoplasia* 2001;3:53-61.
- 43.- Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol* 2002;23:144-150.
- 44.- Dohadwala M, Batra RK, Luo J, Lin Y, Krysan K, Pold M, Sharma S, Dubinett SM. Autocrine/paracrine prostaglandin E2 production by non-small cell lung cancer cells regulates matrix metalloproteinase-2 and CD44 in cyclooxygenase-2-dependent invasion. *J Biol Chem* 2002;277:50828-50833.
- 45.- Camacho M, León X, Fernández-Figueras MT, Quer M, Vila L. Prostaglandin E(2) pathway in head and neck squamous cell carcinoma.. *Head Neck* 2008; 30:1175-1181.
- 46.- Sawhney M, Rohatgi N, Kaur J, Shishodia S, Sethi G, Gupta SD, Deo SV, Shukla NK, Aggarwal BB, Ralhan R. Expression of NF-kappaB parallels COX-2 expression in oral precancer and cancer: association with smokeless tobacco. *Int J Cancer* 2007;10:2545-2556.
- 47.- Raju U, Ariga H, Dittmann K, Nakata E, Ang KK, Milas L. Inhibition of DNA repair as a mechanism of enhanced radioresponse of head and neck carcinoma

cells by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 2005;63:520-528.

48.- Chang AA, Van Waes. Nuclear factor-kappaB as a common target and activator of oncogenes in head and neck squamous cell carcinoma. *Adv Otorhinolaryngol* 2005;62:92-102.

49.- Dinarello CA. Why not treat human cancer with interleukin-1 blockade?. *Cancer Metastasis Rev* 2010;29:317–329.

50.- Casós K, Siguero L, Fernández-Figueras MT, León X, Sardá MP, Vila L, Camacho M. Tumor cells induce COX-2 and mPGES-1 expression in microvascular endothelial cells mainly by means of IL-1 receptor activation. *Microvasc Res* 2011;81:261-268.

51.- Lewis A M, Varghese S, Xu H, et al. 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.

52.- Niu J, Li Z, Peng B, Chiao PJ. Identification of an autoregulatory feedback pathway involving interleukin-1alpha in induction of constitutive NF-kappaB activation in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem* 2004;279:16452-16462.

53.- Streicher KL, Willmarth NE, Garcia J, Boerner JL, Dewey TG, Ethier SP. Activation of a nuclear factor kappaB/interleukin-1 positive feedback loop by amphiregulin in human breast cancer cells. *Mol Cancer Res* 2007;5:847-862.

54.- Rankin EB, Giaccia AJ. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ* 2008;15:678-685.

55.- Görlach A, Bonello S. the cross talk between NF-κB and HIF-1: further evidence for a significant liaison. *Biochem J* 2008;412:e17-e19.

56.- van Uden P, Kenneth NS, Rocha S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1α by NF-κB. *Biochem J* 2008;412:477-484.

57.- Yu HG, Zhong X, Yang YN, Luo HS, Yu JP, Meier JJ, Schrader H, Bastian A, Schmidt WE, Schitz F. Increased expression of nuclear factor-κB/RelA is correlated with tumor angiogenesis in human colorectal cancer. *IntJ Colorectal Dis* 2004;19:18-22.

58.- Nam SY, Ko YS, Yoon J, Kim YH, Choi YJ, Park JW, Chang MS, Kim WH, Lee BL. A hypoxia-dependent upregulation of hypoxia-inducible factor-1 by

nuclear factor- κ B promotes gastric tumor growth and angiogenesis. *Br J Cancer* 2011;104:166-174.

59.- Boonkitticharoen V, Kulapaditharom B, Leopairut J, Kraiphibul P, Larbcharoensub N, Cheewaruangroj W, Chintrakarn C, Pochanukul L. Vascular endothelial growth factor a and proliferation marker in prediction of lymph node metastasis in oral and pharyngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2008;134:1305-1311.

60.- Huang S, Robinson JB, Dequzman A, Bucana CD, Fidler IJ. Blockade of nuclear factor-kappaB signaling inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human ovarian cancer cell by suppressing expression of vascular endothelial growth factor and interleukin 8. *Cancer Res* 2000;60:5334-5339.

61.- Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 1962; 48:1014-1022.

62.- Hohberger L, Wuertz BR, Xie H, Griffin T, Ondrey F . TNF-alpha drives matrix metalloproteinase-9 in squamous oral carcinogenesis. *Laryngoscope* 2008; 118:1395-1399.

63.- Yan M, Xu Q, Zhang P, Zhou XJ, Zhang ZY, Chen WT. Correlation of NF-kappaB signal pathway with tumor metastasis of human head and neck squamous cell carcinoma. *BMC* 2010, 10:437.

64.- Brown M, Cohen J, Arun P, Chen Z, Van Waes C. NF-kappaB in carcinoma therapy and prevention. *Expert Opin Ther Targets* 2008;12:1109-1122.

65.- Lun M, Zhang PL, Pellitteri PK, Law A, Kennedy TL, Brown RE. Nuclear factor-kappaB pathway as a therapeutic target in head and neck squamous cell carcinoma: pharmaceutical and molecular validation in human cell lines using Velcade and siRNA/NF-kappaB.. *Ann Clin Lab Sci* 2005;35:251-258.

66.- Sunwoo JB, Chen Z, Dong G, Yeh N, Crowl Bancroft C, Sausville E, Adams J, Elliott P, Van Waes C. Novel proteasome inhibitor PS-341 inhibits activation of nuclear factor-kappaB, cell survival, tumor growth, and angiogenesis in squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7:1419-1428.

67.- Allen C, Saigal K, Nottingham L, Arun P, Chen Z, Van Waes C. Bortezomib-induced apoptosis with limited clinical response is accompanied by inhibition of canonical but not alternative nuclear factor-kappaB subunits in head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:4175-4185.

- 68.- Chung CH, Aulino J, Muldowney NJ, Hatakeyama H, Baumann J, Burkey B, Netterville J, Sinard R, Yarbrough WG, Cmelak AJ, Slebos RJ, Shyr Y, Parker J, Gilbert J, Murphy BA. Nuclear factor-kappaB pathway and response in a phase II trial of bortezomib and docetaxel in patients with recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Oncol* 2010;21:864-870.
- 69.- Chen Z, Ricker JL, Malhotra PS, Nottingham L, Bagain L, Lee TL, Yeh NT, Van Waes C. Differential bortezomib sensitivity in head and neck cancer lines corresponds to proteasoma, nuclear factor-kappaB and activator protein-1 related mechanisms. *Mol Cancer Ther* 2008;7:1949-1960.
- 70.- Landesman-Bollag E, Song DG, Romieu-Mourez R, Sussman DJ, Cardiff RD, Sonenshein GE, Seldin DC. Protein kinase CK2: signaling and tumorigenesis in the mammary gland. *Mol Cell Biochem* 2001;227:153-165.
- 71.- Hessenauer A, Montenarh M, Götiz C. Inhibition of CK α activity provokes different responses in hormone-sensitive and hormone-refractory prostate cancer cells. *Int J Oncol* 2003;22:1263-1270.
- 72.- Ahmad KA, Wang G, Slaton J, Unger G, Ahmed K. Targeting CK2 for cancer therapy. *Anti-cancer Drugs* 2005;16:1037-1043.
- 73.- Matsumoto N, Ariga A, To-e S, Nakamura H, Agata N, Hirano S, Inoue J, Umezawa K. Synthesis of NF-kappaB activation inhibitors derived from epoxyquinomicin C. *Bioorg Med Chem Lett* 2000;10:865-869.
- 74.- Skvortsov S, Skyortsova I, Stasyk T, Schiefermeier N, Neher A, Gunkel AR, Bonn GK, Huber LA, Lukas P, Pleiman CM, Zwierzina H. Antitumor activity of CTFB, a novel anticancer agent, is associated with the down-regulation of nuclear factor-kappaB expression and proteasome activation in head and neck squamous carcinoma cell lines. *Mol Cancer Ther* 2007;6:1898-1908.
- 75.- Aggarwal S, Takada Y, Singh S, Myers JN, Aggarwal BB. Inhibition of growth and survival of human head and neck squamous cell carcinoma cells by curcumin via modulation of nuclear factor-kappaB signaling. *Int J Cancer* 2004;111:679-692.
- 76.- LoTempio MM, Veena MS, Steele HL, Ramamurthy B, Ramalingam TS, Cohen AN, Chakrabarti R, Srivatsan ES, Wang MB. Curcumin suppresses growth of head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005;11:6994-7002.

- 77.- Wang D, Veena MS, Stevenson K, Tang C, Ho B, Suh JD, Duarte VM, Faull KF, Mehta K, Srivatsan ES, Wang MB. Liposome-encapsulated curcumin suppresses growth of head and neck squamous cell carcinoma in vitro and in xenografts through the inhibition of nuclear factor kappaB by AKT-independent pathway. *Clin Cancer Res* 2008;14:6228-6236.
- 78.- Chen GG, Liang NC, Lee JF, Chan UP, Wang SH, Leung BC, Leung KL. Over-expression of Bcl-2 against Pteris semipinnata L- induced apoptosis of human colon cancer cells via a NF-kappa B-related pathway. *Apoptosis* 2004;9:619-27.
- 79.- Vlantis AC, Lo CS, Chen GG, Ci Liang N, Lui VW, Wu K, Deng YF, Gong X, Lu Y, Tong MC, van Hasselt CA. Induction of laryngeal cancer cell death by Ent-11-hydroxy-15-oxo-kaur-16-en-19-oic acid. *Head and Neck* 2010;32:1506-18.
- 80.- Saleem M, Afag F, Adhami VM, Murkhtar H. Lupeol modulates NF-kappaB and PI3K/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice. *Oncogene* 2004;23:5203-5214.
- 81.- Saleem M, Kweon MH, Yun JM, Adhami VM, Khan N, Syed DN, Mukhtar H. A novel dietary triterpene Lupeol induces fas-mediated apoptotic death of androgen-sensitive prostate cancer cells and inhibits tumor growth in a xenograft model. *Cancer Res* 2005;65:11203-11213.
- 82.- Lee TK, Poon RT, wo JY, Ma S, guan WY, Myers JN, Altevogt P, Yuen AP. Lupeol suppresses cisplatin-induced nuclear factor-kappaB activation in head and neck squamous cell carcinoma and inhibits local invasion and nodal metastasis in an orthotopic nude mouse model. *Cancer Res* 2007;67:8800-8809.
- 83.- Zhang PL, Pellitteri PK, Law A, Gilroy PA, Wood GC, Kennedy TL, Blasick TM, Lun M, Schuerch C3rd, Brown Re. Overexpression of phosphorylated nuclear factor-kappaB in tonsillar squamous cell carcinoma and high-grade dysplasia is associated with poor prognosis. *Mod Pathol* 2005;18:924-932.
- 84.- Lee TL, Yang XP, Yan B, Friedman J, Duggal P, Bagain L, Dong G, Yen NT, Wang J, Zhou J, Elkahloun A, Van Waes C, Chen Z. A novel nuclear factor-kappaB gene signature is differentially expressed in head and neck squamous cell carcinomas in association with TP53 status. *Clin Cancer Res* 2007;13:5680-5691.

- 85.- Bradford CR, Zhu S, Wolf GT, Poore J, Fisher SG, Beals T, McClatchey KD, Carey TE. Overexpression of p53 predicts organ preservation using induction chemotherapy and radiation in patients with advanced laryngeal cancer. Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Study Group. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;113:408-412.
- 86.- Bradford CR, Zhu S, Ogawa H, Ogawa T, Ubell M, Narayan A, Johnson G, Fisher SG, Carey TE. P53 mutation correlates with cisplatin sensitivity in head and neck squamous cell carcinoma lines. *Head Neck* 2003;25:654-661.
- 87.- Chung CH, Parker JS, Ely K, Carter J, Yi Y, Murphy BA, Ang KK, El-Naggar AK, Zanation AM, Cmelak AJ, Levy S, Slebos RJ, Yarbrough WG. Gene expression profiles identify epithelial-to-mesenchymal transition and activation of nuclear factor-kappaB signaling as characteristics of a high-risk head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2006;66:8210-8218.
- 88.- Bancroft CC, Chen Z, Dong G, Sunwoo JB, Yeh N, Park C, Van Waes C. 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. *Clin Cancer Res* 2001;17:435-442.
- 89.- Druzgal CH, Chen Z, Yeh NT, Thomas GR, Ondrey FG, Duffey DC, Vilela RJ, Ende K, McCullagh L, Rudy SF, Muir C, Herscher LL, Morris JC, Albert PS, Van Waes C. A pilot study of longitudinal serum cytokine and angiogenesis factor levels as markers of therapeutic response and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2005;27:771-784.
- 90.- Gokhale AS, Haddad RI, Cavacini LA, Wirth L, Weeks L, Hallar M, Faucher J, Posner MR. Serum concentrations of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell cancer of the head and neck. *Oral Oncol* 2005;41:70-76.
- 91.- Allen C, Duffys S, Teknos T, Islam M, Chen Z, Albert PS, Wolf G, Van Waes C. Nuclear factor-kappaB-related serum factors as longitudinal biomarkers of response and survival in advanced oropharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007;13:3182-3190.
- 92.- Yoshida K, Sasaki R, Nishimura H, Okamoto Y, Suzuki Y, Kawabe T, Saito M, Otsuki N, Hayashi Y, Soejima T, Nibu K, Sugimura K. Nuclear factor-kappaB expression as a novel marker of radioresistance in early-stage laryngeal cancer. *Head Neck* 2010; 32:646-665.

- 93.- Huang C, Huang K, Wang C, Jianq ZD, Li XX, Wang HP, Chen HY. Overexpression of mitogen-activated protein kinase kinase 4 and nuclear factor-kappaB in laryngeal squamous cell carcinoma: a potential indicator for poor prognosis. *Oncol Reports* 2009;22:89-95.
- 94.- Nariai Y, Mishima K, Yoshimura Y, Sekine J. FAP-1 and NFκB expressions in oral squamous cell carcinoma as potential markers for chemo-radio sensitivity and prognosis. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2011;40:419-426.
- 95.- León X, Orús C, Quer M. Diseño, mantenimiento y explotación de una base de datos oncológica en pacientes con tumores malignos de cabeza y cuello. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2002;53:185-190.
- 96.- TNM Classification of malignant tumours, 6th Edition (UICC). Sobin LH, Wittekind C, editores. Wiley-Blackwell, 2002.
- 97.- Bindhu OS, Ramadas K, Sebastian P, Pillai MR. High expression levels of nuclear kappa B and gelatinases in the tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2006; 28:916-925.
- 98.- Hu X, Tang J, Pan J, Wu G. Study of the expression of nuclear factor-kappa B, matrix metalloproteinase-3, -9 on nasopharyngeal carcinoma and their clinical significance. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 2010;24:678-682.
- 99.- Yu LL, Yu HG, Yu JP, Luo HS. Nuclear factor-kappa B regulates cyclooxygenase-2 expression and cell proliferation in human colorectal carcinoma tissue.. *Exp Oncol* 2004;26:40-47.
- 100.- Ackerman WE, Summerfield TL, Vandre DD, Robinson JM, Kniss DA. Nuclear factor-kappa B regulates inducible prostaglandin E synthase expression in human amnion mesenchymal cells. *Biol Reproduct* 2008;78:68-76.
- 101.- Stokes A, Joutsa J, Ala-Aho R, Pitchers M, Pennington CJ, Martin C, Premachandra DJ, Okada Y, Peltonen J, Grénman R, James HA, Edwards DR, Kähäri VM. Expression profiles and clinical correlations of degradome components in the tumor microenvironment of head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2010; 16:2022-2035.
- 102.- Andela VB, Schwarz EM, Puzas JE, O'Keefe RJ, Rosier RN. Tumor metastasis and the reciprocal regulation of prometastatic and antimetastatic factors by nuclear factor kappaB. *Cancer Res* 2000; 60:6557-6562.

- 103.- Kong D, Li Y, Wang Z, Banerjee S, Sarkar FH. Inhibition of angiogenesis and invasion by 3,3'-diindolylmethane is mediated by the nuclear factor-kappaB downstream target genes MMP-9 and uPA that regulated bioavailability of vascular endothelial growth factor in prostate cancer. *Cancer Res* 2007; 67:3310-3319.
- 104.- Shishir S, Potdar P, Gairola CG, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates cigarette smoke-induced NF-kappaB activation through inhibition of IkappaBalpha kinase in human lung epithelial cells: correlation with suppression of COX-2, MMP-9 and cyclin D1. *Carcinogenesis* 2003;24:1269-1279.
- 105.- Kryczek I, Wei S, Keller E, Liu R, Zou W. Stroma-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis.. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;292:C987-C995.
- 106.- Ishikawa T, Nakashiro K, Hara S, Klosek SK, Li C, Shintani S, Hamakawa H. CXCR4 expression is associated with lymph-node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2006;28:61-66.
- 107.- Oliveira-Neto HH, Silva ET, Leles CR, Mendonça EF, Alencar Rde C, Silva TA, Batista AC. Involvement of CXCL12 and CXCR4 in lymph node metastases and development of oral squamous cell carcinomas. *Tumor Biol* 2008;29:262-271.
- 108.- Tan CT, Chu CY, Lu YC, Chang CC, Lin BR, Wu HH, Liu HL, Cha ST, Prakash E, Ko JY, Kuo ML CXCL12/CXCR4 promotes laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinoma metastasis through MMP-13-dependent invasion via the ERK1/2/AP-1 pathway. *Carcinogenesis* 2008;29:1519-1527.
- 109.- Rehman AO, Wang CY. SDF-1alpha promotes invasion of head and neck squamous cell carcinoma by activating NF-kappaB. *J Biol Chem* 2008;283:19888-19894.
- 110.- Huang YC, Hsiao YC, Chen YJ, Wei YY, Lai TH, Tang CH. Stromal cell-derived factor-1 enhances motility and integrin up-regulation through CXCR4, ERK and NF-kappaB-dependent pathway in human lung cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2007 15;74:1702-1712.

- 111.- Maroni P, Bendinelli P, Matteucci E, Desiderio MA. HGF induces CXCR4 and CXCL12-mediated tumor invasion through Ets1 and NF-kappaB. *Carcinogenesis* 2007;28:267-279.
- 114.- Kato T, Duffey DC, Ondrey FG, Dong G, Chen Z, Cook JA, Mitchell JB, Van Waes C. Cisplatin and radiation sensitivity in human head and neck squamous carcinomas are independently modulated by glutathione and transcription factor NF-kappaB. *Head Neck* 2000;22:748-759.
- 112.- Izzo JG, Malhotra U, Wu TT, Ensor J, Luthra R, Lee JH, Swisher SG, Liao Z, Chao KS, Hittleman WN, Aggarwal BB, Ajani JA. Association of activated transcription factor nuclear factor kappaB with chemoradiation resistance and poor outcome in esophageal. *J Clin Oncol* 2006;24:748-754.
- 113.- Didelot C, Barberi-Heyob M, Bianchi A, Becuwe P, Mirjolet JF, Dauca M, Merlin JL. Constitutive NF-kappaB activity influences basal apoptosis and radiosensitivity of head-and-neck carcinoma cell lines. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 2001;51:1354-1360.
- 115.- Kim KM, Zhang Y, Kim BY, Jeong SJ, Lee SA, Kim GD, Dritschilo A, Jung M. The p65 subunit of nuclear factor-kappaB is a molecular target for radiation sensitization of human squamous carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 2004;3:693-698.
- 116.- Silva P, Homer JJ, Slevin NJ, Musgrove BT, Sloan P, Price P, West CM. Clinical and biological factors affecting response to radiotherapy in patients with head and neck cancer: a review. *Clin Otolaryngol* 2007;32:337-345.
- 117.- Almadori G, Bussu F, Paludetti G. Should there be more molecular staging of head and neck cancer to improve the choice of treatments and thereby improve survival? *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2008;16:117-126.
- 118.- Wildeman MA, Gibcus JH, Hauptmann M, Begg AC, van Velthuisen ML, Hoebbers FJ, Mastik MF, Schuurin E, van der Wal JE, van den Brekel MW. Radiotherapy in laryngeal carcinoma: can a panel of 13 markers predict response? *Laryngoscope* 2009;119:316-322.

X. Anexo

Overexpression of the nuclear factor-kappa B (p65) in association with local failure in patients with head and neck carcinoma undergoing radiotherapy or chemoradiotherapy

Aina Quintana, MD,¹ Francesc X Avilés, MD, PhD,² Ximena Terra, PhD,² Sonia Alcolea,⁴ Mercedes Camacho, PhD,⁴ Miquel Quer, MD, PhD,¹ Luis Vila, PhD,⁴ Xavier León, MD, PhD¹

¹Otorhinolaryngology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN, MCINN, ISCIII), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, ²Otorhinolaryngology Department, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain, ³Grup d'estudi de malalties metabòliques associades a insulín resistència (SEMIMAR), Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain, ⁴Laboratory of Angiology, Vascular Biology and Inflammation, Institute of Biomedical Research (8 Sant Pau), Barcelona, Spain.

Accepted 20 December 2011

Published online 00 Month 2012 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/hed.22979

ABSTRACT: *Background:* The aim of this study was to evaluate nuclear factor kappa B (NFκB) expression as a biologic marker to predict local control in patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) treated with radiotherapy or chemoradiotherapy.

Methods: The mRNA expression levels of the NFκB family genes were determined with real-time–polymerase chain reaction in 77 patients with HNSCC treated with radiotherapy or chemoradiotherapy.

Results: The mRNA NFκB (p65) expression in pretreatment tumors was significantly related to local control ($p = .03$). The 5-year local recurrence free survival rate in patients with low level NFκB (p65)

expression ($n = 42$) was 79.9%, and in patients with a high level of expression it was 42.1% ($p = .001$). In a multivariate analysis, the mRNA NFκB (p65) expression level was the only variable related to local control of the tumor.

Conclusion: Expression of the NFκB (p65) gene may be a radiosensitivity marker for patients with a HNSCC. © 2012 Wiley Periodicals, Inc. *Head Neck* 00: 000–000, 2012

KEY WORDS: nuclear factor kappa B, p65, head and neck squamous cell carcinoma, radiosensitivity, real-time–polymerase chain reaction

Head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) are the sixth most common cancer worldwide in terms of incidence.¹ Treatment includes the use of radiotherapy or chemoradiotherapy, surgery, or a combination of these procedures. At the present time we do not dispose of prognostic factors that can efficiently predict response to a certain therapy. A biologic marker able to determine candidates to radiotherapy or chemoradiotherapy would be of great help when choosing treatment.

Inflammation, a normal physiological response to injury or infection, activates several proinflammatory genes and release of proinflammatory cytokines, chemokines, adhesion molecules, and reactive oxygen species. The inflammatory link to carcinogenesis is supported by the fact that the nuclear factor-kappa B (NFκB) signaling pathway is deregulated in a variety of human cancers.² NFκB was first identified as a regulator of the immunoglobulin light-chain genes in lymphocytes B by the Nobel Prize laureate David Baltimore in 1986.³ NFκB is a transcription factor known to modulate the expression of genes involved in inflammation, immunity,

proliferation, and apoptosis. NFκB is not a single protein but a group of closely related proteins that are assembled through dimerization of 5 subunits: RelA(p65), p50(NF-κB1), p52(NF-κB2), c-Rel, and RelB. Each dimer is bound in the cytoplasm by an inhibitor-κB (IκB), which prevents its nuclear translocation. Cell stimulation transiently activates the IκB kinase (IKK) complex, which is composed of 2 catalytic subunits (IKKα and IKKβ) and a regulatory subunit (IKKγ). Activated IKK phosphorylates IκB proteins, resulting in their proteosomal degradation and subsequent translocation of NFκB dimers to the nucleus.

The p65/p50 is the most commonly detected NFκB heterodimer. It is activated through a canonical pathway and is responsible for most NFκB transcriptional activity. There is an alternative pathway that applies to RelB/p52 heterodimers, and this is required for lymphoid organ development and adaptive B-cell-mediated immunity (reviewed in Karin et al.⁴).

There is evidence suggesting that the NFκB signaling pathway plays a critical role in the activation of oncogenes involved in proliferation and cell survival, regulation of angiogenesis, invasion and metastasis, and resistance to treatment with radiotherapy and chemotherapy in patients with HNSCC (reviewed in Allen et al.⁵).

On the basis of immunohistochemical studies, several authors have found a significant relationship between the expression of NFκB (p65) and disease control in patients with HNSCC.^{6–9} There are no studies evaluating the

*Corresponding author: X. León, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, S. Antonio M^o Claret 167, 08025-Barcelona, Spain. E-mail: xleon@sanpau.cat

The last two authors contributed equally to this work.

Grant Support: Supported by a grant from the Instituto de Salud Carlos III (PI5 08-0837).

TABLE 1. Characteristics of the patients included in the study.

Characteristics	No. of patients (%)
Age (Median [range])	65.5 years (38.2–86.1)
Sex	
Male	67 (87%)
Female	10 (13%)
Tumor location	
Oral cavity–oropharynx	33 (43%)
Larynx–hypopharynx	44 (57%)
T category	
T1–2	49 (64%)
T3–4	28 (36%)
N category	
N0	54 (70%)
N+	23 (30%)
Stage	
I–II	37 (48%)
III–IV	40 (52%)
Tumor differentiation	
Good	9 (12%)
Moderate	62 (80%)
Poor	6 (8%)
Treatment	
Radiotherapy	51 (66%)
Chemoradiotherapy	26 (34%)
Radiation schedule	
Once daily	56 (73%)
Twice daily	21 (27%)

prognostic capacity of the transcriptional activity of the NF- κ B genes in patients with HNSCC.

The aim of our study was to evaluate the expression of the NF- κ B genes by real-time-polymerase chain reaction by use of pretreatment biopsy specimens and to investigate whether NF- κ B expression can predict local control in a group of patients with HNSCC treated with radiotherapy or chemoradiotherapy.

MATERIALS AND METHODS

Patients

We carried out a retrospective study with biopsy specimens from 77 consecutive patients with pathologically confirmed, untreated squamous cell carcinomas located in the oral cavity (n = 7), oropharynx (n = 26), hypopharynx (n = 6), or larynx (n = 38) and treated at our center with radiotherapy or chemoradiotherapy between 2004 and 2008. The biopsy specimens were taken from the primary site of the tumor. A sample aliquot was used for the pathologic diagnosis of the malignancy, and another aliquot was immediately stabilized by inclusion in RNAlater. Table 1 shows the characteristics of the patients included in the study.

All of our patients were evaluated by the institution's cancer committee, and the decision to treat with radiotherapy or chemoradiotherapy was based on the center's guidelines. In general, all patients with stage I–II tumors, and some patients with stage III tumors—depending on the location of the primary tumor—received radiotherapy. Patients with advanced tumors (stages III–IV) were

treated with chemoradiotherapy. All patients were treated with external-beam radiotherapy. Radiotherapy was administered in total doses of 65–74 Gy to the primary site, 50 Gy to the neck in all patients with N0 nodes except those with T1N0 glottic carcinomas, and 70 Gy to the neck in patients with clinical metastatic neck nodes (N+). Treatment was administered by continuous-course radiotherapy 5 days a week, 2 Gy per session in normofractionated treatments, and 1.2 Gy twice daily in hyperfractionated treatments. Chemoradiotherapy consisted of radiotherapy at the same doses plus 3 cycles of cisplatin at a dose of 100 mg/m² on day 1 every 3 weeks. Eleven patients (14%) with a neck dissection were treated between 6 and 10 weeks after completing radiotherapy or chemoradiotherapy.

Routine follow-up consisted of an evaluation of symptoms and locoregional examinations at 2-month intervals during the first year, 3-month intervals in the second year, and 4-month intervals between the third and fifth years. The median follow-up of the patients included in the study was 4.4 years (range 0.7–7.9 years). The HSCSP Ethics Committee approved the study, and all patients provided informed consent.

Analysis of mRNA

Tissue specimens were immediately stabilized by inclusion in RNAlater (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) after biopsy and stored at –80°C until processing. Total RNA was extracted with Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) following the manufacturer's instructions. The cDNA was prepared by reverse transcribing 1 μ g RNA with High-Capacity cDNA Archive kit with random hexamers (Applied Biosystems, Foster City, CA). The mRNA expression of RelA(p65), p50(NF- κ B1), p52(NF- κ B2), RelB, c-Rel, cyclin D1, VEGF, MMP-2, Bcl-XL, and β -actin was studied by real-time-polymerase chain reaction in an ABI Prism 7000 by use of predesigned validated assays (TaqMan Gene Expression Assays; Applied Biosystems: Hs01042010_m1 RELA, Hs00765730_m1 NFKB1, Hs00174517_m1 NFKB2, Hs01547735_m1 RELB, Hs00231279_m1 REL, Hs00465553_m1 CCND1, Hs00173626_m1 VEGF, Hs00234422_m1 MMP2, Hs00236329_m1 BCL2L1, Hs99999903_m1 Actin beta) and universal thermal cycling parameters. Relative expression was expressed as gene/ β -actin ratios. Laboratory technicians performing mRNA expression assays were blinded to the results of clinical evaluations.

Statistics

The bivariate Pearson correlation test was used in the correlation studies. Tumor mRNA NF- κ B levels in function of the location of the primary tumor (oral cavity–oropharynx vs larynx–hypopharynx), the local (T1–2 vs T3–4) and regional (N0 versus N+) extension of the tumor, the histologic grade, and the local, regional, and distant control achieved with treatment were compared by use of the Student *t* test or a 1-way analysis of variance test. The continuous value of the mRNA expression level of NF- κ B (p65) was categorized according to the local control of the disease with the classification and regression tree (CRT) method. CRT analysis splits the data into

TABLE 2. Correlation between the relative mRNA levels of the genes of the NFκB family.

	p65	p50	p52	RelB	c-Rel
p65	1	r = 0.923 ρ = 9.1 × 10 ⁻³⁸	r = 0.711 ρ = 7.4 × 10 ⁻¹²	r = 0.138 ρ = .62	r = 0.574 ρ = 3.1 × 10 ⁻⁷
p50		1	r = 0.971 ρ = 1.2 × 10 ⁻⁴²	r = 0.204 ρ = .035	r = 0.928 ρ = 5.5 × 10 ⁻³⁰
p52			1	r = 0.233 ρ = .056	r = 0.907 ρ = 1.5 × 10 ⁻²⁶
RelB				1	r = 0.235 ρ = .015
c-Rel					1

segments that are as homogeneous as possible with respect to the dependent variable. The actuarial local recurrence-free survival and the adjusted survival in function of the category of NFκB (p65) expression was calculated by use of the Kaplan-Meier method. Differences in survival were compared by use of the log-rank test. Multivariate analysis was made with a Cox regression analysis considering the local recurrence free-survival as the dependent variable, and location of the tumor (oral cavity–oropharynx vs larynx-hypopharynx), local extension (T1–2 vs T3–4), type of treatment (radiotherapy vs chemoradiotherapy), and category of NFκB (p65) expression (low- vs high-level expression) as the independent variables. All statistical analysis was performed with the SPSS software v. 17.0 (SPSS, Chicago, IL).

TABLE 3. Comparison of the mRNA NFκB (p65) values according to clinical variables and control of the disease after treatment.

	Mean	SD	p Value
Clinical variables			
Tumor location			.586
Oral cavity oropharynx	0.200	0.149	
Larynx hypopharynx	0.183	0.120	
T category			.742
T1–2	0.187	0.139	
T3–4	0.197	0.122	
N category			.615
N0	0.185	0.107	
N+	0.202	0.181	
Stage			.577
I–II	0.182	0.110	
III–IV	0.199	0.151	
Tumor differentiation			.766
Good	0.185	0.171	
Moderate	0.188	0.127	
Poor	0.201	0.140	
Control of the disease			
Local control			.030
Yes (n = 51)	0.167	0.098	
No (n = 26)	0.236	0.175	
Regional control			.601
Yes (n = 67)	0.194	0.139	
No (n = 10)	0.170	0.078	
Distant control			.761
Yes (n = 71)	0.192	0.137	
No (n = 6)	0.175	0.060	

RESULTS

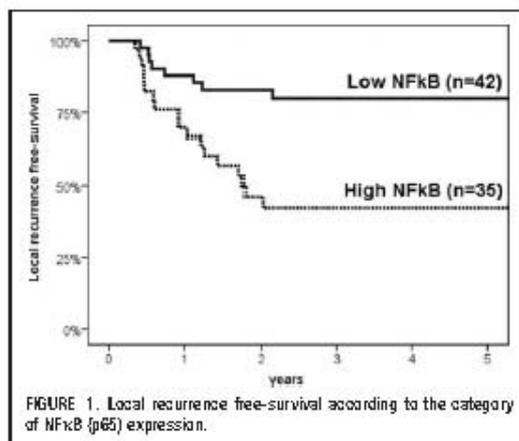
At study end, 26 patients (33.8%) had a local failure of the tumor, and 5 of these had concomitant failure at regional level. Five patients had a regional failure only.

Table 2 shows the correlation between mRNA values of the genes of the NFκB family. There was a very high correlation between expression of p65 and p50, and a high correlation between p65 and p52 y c-Rel, whereas there was no correlation between p65 and RelB.

CRT analysis showed that p65 was the gene of the NFκB family most significantly related with local control of the disease. Table 3 shows the mean and standard deviation of mRNA NFκB (p65) values in function of clinical variables and the local, regional, and distant control achieved with radiotherapy or chemoradiotherapy. There were no significant differences in mRNA expression of NFκB (p65) according to the location of the primary tumor, the category of the local or regional extension of the tumor, or the histological grade. On the contrary, there were significant differences in the values of the NFκB (p65) expression in function of local control of the disease. Patients with local failure after radiotherapy or chemoradiotherapy had a higher value of mRNA NFκB (p65) than patients in whom local control was achieved (p = .030).

After categorization of NFκB (p65) expression in function of the local control of the disease by use of the CRT method, 2 groups of patients were defined, one with a low expression level of NFκB (p65) (n = 42) and the other with had a high expression level (n = 35). The frequency of local failure in the group of patients with a low expression level of NFκB (p65) was 19.0%, whereas in the group of patients with a high expression of NFκB (p65) it was 51.4% (p = .003). There were no significant differences in the frequency of regional failure (p = .77) or distant metastases (p = .816) according to the category of expression of NFκB (p65).

Figure 1 shows the local recurrence free-survival curves according to the category of NFκB (p65) expression. The 5-year local recurrence free-survival rate for patients with low level NFκB (p65) expression was 79.9% (CI 95%: 67.4%–92.4%), and it was 42.1% (CI 95%: 24.3–59.9%) for patients with a high level of expression. There were significant differences in the local recurrence free-survival after treatment with radiotherapy or chemoradiotherapy according to the NFκB (p65) expression level (p = .001).



T4 Table 4 shows the 5-year local recurrence free-survival values in function of the location of the primary tumor, the local extension of the tumor, and the type of treatment according to the category of NFKB (p65) expression. The local recurrence free-survival rate was higher in the category of patients with low-level expression of NFKB (p65), reaching statistical significance for patients with early-stage tumors (T1–T2), tumors located at the larynx-hypopharynx, and patients treated with radiotherapy.

The adjusted survival rate of patients with low NFKB (p65) expression level was 81.6% (CI 95%: 67.3%–95.9%), and for patients with a high level of expression it was 64.3% (CI 95%: 42.6%–86.0%). Differences in adjusted survival did not reach the statistical significance ($p = .173$).

T5 Table 5 shows the results of a multivariate study considering the local recurrence free-survival as the dependent variable. According to the results of the multivariate model, only the NFKB (p65) category expression was significantly related to the local control of the disease. Considering patients with a low level expression of NFKB (p65) as the reference category, patients with a high level of expression had a 4.4 higher risk of local failure of the tumor after treatment with radiotherapy or chemoradiotherapy (IC 95%: 1.8–10.5, $p = .001$).

TABLE 4. Five-year local recurrence free-survival in function of clinical variables according to the category of NFKB (p65) expression.

	NFKB low	NFKB high	p Value
Local extension			
T1-2	82.2%	41.1%	.004
T3-4	75.5%	44.6%	.146
Location			
Oral cavity–oropharynx	80.4%	53.5%	.223
Larynx-hypopharynx	73.7%	32.4%	.001
Treatment			
Radiotherapy	81.1%	41.6%	.005
Chemoradiotherapy	76.3%	44.5%	.146

TABLE 5. Results of the multivariate analysis.

	HR	CI 95% HR	p Value
Local extension		0.52-3.01	.610
T1-2	1		
T3-4	1.25		
Location		0.93-6.86	.068
Oral cavity–oropharynx	1		
Larynx-hypopharynx	2.53		
Treatment		0.62-4.96	.283
Radiotherapy	1		
Chemoradiotherapy	1.75		
NFKB		1.80-10.52	.001
Low	1		
High	4.36		

To corroborate the transcriptional activity of p65, we determined the expression of some prominent NFKB target genes involved in cell cycle progression (cyclin D1), angiogenesis (VEGF), tissue invasion (MMP-2), and regulation of apoptosis (Bcl-XL). Table 6 shows the correlation between NFKB (p65) and these genes. There was a high correlation between NFKB (p65) and all the genes assessed.

DISCUSSION

In this study we found that the overexpression of NFKB (p65) gene was related to a significant decrease in the local control of the disease in patients with HNSCC treated with radiotherapy or chemoradiotherapy. In vitro evidence shows that NFKB is implicated in the cellular response to radiotherapy in HNSCC.^{10,13} Besides this experimental evidence, several studies in patients with HNSCC have shown a relationship between NFKB activity and prognosis in patients with oral cavity,⁶ oropharyngeal⁷ and laryngeal⁸ squamous cell carcinoma.

Yoshida et al⁹ evaluated the prognostic capacity of the NFKB as a marker of radioresistance in patients with early-stage (T1–T2N0) laryngeal squamous cell carcinoma treated with radiotherapy. They found a significant relationship between immunohistochemical NFKB expression and local tumor recurrence ($p = .01$). The 5-year local control in NFKB positive patients was 46%, significantly worse than the 81% local control in patients with negative immunoreactivity ($p = .008$). In a univariate analysis NFKB expression as tumor location and T category were significantly related to local tumor control. In a multivariate analysis, only the NFKB expression maintained the prognostic significance (HR 0.43, $p = .04$).

All authors who analyzed the relation between NFKB activity and local control or survival in patients with HNSCC reached the conclusion that tumors with higher NFKB expression had a worse prognosis. To date, all these studies have evaluated the NFKB activity using immunohistochemical techniques. To our knowledge there are no studies analyzing the prognostic capacity of NFKB expression with mRNA levels.

Our results showed that there is a significant relationship between steady-state p65 mRNA levels and local control of the disease in patients with HNSCC treated

TABLE 6. Correlation between the relative mRNA levels of the NF κ B (p65) and genes implicated in HNSCC carcinogenesis that are regulated by NF κ B.

	p65	Cyclin D1	Bcl-XL	MMP-2	VEGF
p65	1	$r = 0.644$ $\rho = 3.1 \times 10^{-9}$	$r = 0.676$ $\rho = 2.6 \times 10^{-10}$	$r = 0.557$ $\rho = 4.6 \times 10^{-7}$	$r = 0.683$ $\rho = 1.3 \times 10^{-11}$
Cyclin D1		1	$r = 0.942$ $\rho = 6.8 \times 10^{-33}$	$r = 0.801$ $\rho = 2.5 \times 10^{-16}$	$r = 0.921$ $\rho = 8.3 \times 10^{-28}$
Bcl-XL			1	$r = 0.883$ $\rho = 2.6 \times 10^{-23}$	$r = 0.965$ $\rho = 6.5 \times 10^{-40}$
MMP 2				1	$r = 0.776$ $\rho = 1.8 \times 10^{-16}$
VEGF					1

with radiotherapy or chemoradiotherapy. Furthermore, the results of the multivariate analysis showed that the category of NF κ B (p65) expression was the only variable significantly related with the local control of the disease.

There was a very high correlation between p65 and p50, the other component of the heterodimer activated by the canonical pathway. There was also a high correlation between expression of p65, p52, and c-Rel genes. There was no correlation with RelB. The gene expression most significantly related with local control of the disease was p65. We also observed p50, p52, and c-Rel had some prognostic capacity, but they did not enhance the efficiency of p65 (data not shown).

In agreement with other authors who evaluated NF κ B expression by immunohistochemistry,^{6,7} we did not find significant differences in mRNA expression level according to clinical variables such as the local and regional extension of the tumor, the location or the histological grade. On the contrary, Huang et al⁸ found a significant tendency to NF κ B positivity in patients with a locally advanced tumor ($p < .01$) and in patients with lymph node metastases ($p < .01$). Yan et al¹⁴ also found that nuclear NF κ B positive immunoreactivity was significantly higher in patients with HNSCC with lymph node involvement ($p < .001$).

One of the limitations of our study is that the active nuclear form of the NF κ B protein was not determined. Given the complexity of the NF κ B pathway and the existence of post-transcriptional regulatory mechanisms, mRNA levels do not necessarily have to be equivalent to the biological activity of the protein. Huang et al⁸ evaluated whether NF κ B expression in terms of mRNA paralleled NF κ B activity evaluated by immunohistochemistry in a sample of 21 laryngeal carcinomas. They found a high correlation between both determinations (Spearman correlation index 0.752, $p < .01$).

As an indirect measure of the activity of the NF κ B complex, we determined the expression of a group of genes that are regulated by NF κ B in HNSCC. We found a highly significant correlation between the expression of p65 and genes related with cell cycle progression (cyclin D1), regulation of apoptosis (Bcl-XL), angiogenesis (VEGF), and tissue invasiveness (MMP-2).

Besides its value as a predictive factor of response to radiotherapy or chemoradiotherapy, the NF κ B pathway could be an attractive therapeutic target for patients with HNSCC. Bortezomib is a small molecule

that selectively blocks the catalytic activity of the proteasome complex, inhibiting the NF κ B activation. In a pilot study in patients with recurrent HNSCC treated with bortezomib and reirradiation, van Waas et al¹⁵ provided evidence of the biologic activity of this proteasome inhibitor. After infusion with bortezomib the authors found a significant reduction in nuclear NF κ B positivity in the tumor, an increase in markers of apoptosis, and a decrease in the expression of several genes involved in cell cycle progression, inhibition of apoptosis and angiogenesis.

Given the relation between the NF κ B activity and the capacity of radiotherapy or chemoradiotherapy to achieve local control of the disease in patients with HNSCC, an attractive therapeutic approach would be to block the NF κ B pathway concomitantly with radiotherapy in patients who show an up-regulation of NF κ B activity.

CONCLUSION

This study showed a significant relation between the expression of NF κ B (p65) in terms of mRNA and local control after radiotherapy or chemoradiotherapy in patients with a HNSCC. Overexpression of NF κ B (p65) was related with a significant reduction in local control. The 5-year local recurrence-free survival rate in the group of patients with a low level expression of NF κ B (p65) was significantly higher than in patients with a high level of expression. According to our results we consider that expression of the NF κ B (p65) gene may be a radiosensitivity marker for patients with HNSCC.

REFERENCES

- Kamangar F, Daves GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol* 2006;24:2137-2150.
- Karin M. Nuclear factor κ B in cancer development and progression. *Nature* 2006;441:431-436.
- Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986;46:705-716.
- Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2002;2:301-310.
- Allen CT, Ricker JL, Chen Z, van Waas C. Role of activated nuclear factor κ B in the pathogenesis and therapy of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 2007;29:959-971.
- Narai Y, Mithima K, Yoshimura Y, Schine J. FAP-1 and NF κ B expressions in oral squamous cell carcinoma as potential markers for chemoradio sensitivity and prognosis. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2011;40:419-426.
- Zhang PL, Pellizzeri PK, Law A, et al. Overexpression of phosphorylated nuclear factor kappa B in tonsillar squamous cell carcinoma and high

- grade dysplasia is associated with poor prognosis. *Mod Pathol* 2005;18: 924-932.
- Huang C, Huang K, Wang C, et al. Overexpression of mitogen activated protein kinase 4 and nuclear factor κ B in laryngeal squamous cell carcinoma: a potential indicator for poor prognosis. *Otolaryngol* 2009;22:89-95.
 - Yoshida K, Suzuki R, Nishimura H, et al. Nuclear factor κ B expression as a novel marker of radioresistance in early stage laryngeal cancer. *Head Neck* 2010;32:646-655.
 - Dédetot C, Barberi Heyob M, Bianchi A, et al. Constitutive NF κ B activity influences basal apoptosis and radiosensitivity of head and neck carcinoma cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;51:1354-1360.
 - Kato T, Duffey De, Ordrey FG, et al. Chrysin and radiation sensitivity in human head and neck squamous carcinomas are independently modulated by glutathione and transcription factor NF κ B. *Head Neck* 2000;22: 748-759.
 - Kim KM, Zhang Y, Kim BY, et al. The p65 subunit of nuclear factor κ B is a molecular target for radiation sensitization of human squamous carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 2004;3:693-698.
 - Tamafuji T, Azuma M, Motegi K, Takamizu N, Kawashima Y, Bando T. Cefprozil enhanced radiosensitivity through the inhibition of radiation induced nuclear factor κ B activity in human oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Oncol* 2007;31:761-768.
 - Yan M, Xu Q, Zhang P, Zhou XJ, Zhang ZY, Chen WT. Correlation of NF κ B signal pathway with tumor metastasis of human head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* .2010;10:437.
 - Van Waas C, Chang AA, Lebowitz PF, et al. Inhibition of nuclear factor κ B and target genes during combined therapy with proteasome inhibitor bortezomib and reirradiation in patients with recurrent head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Radiation Oncol Biol Phys* 2005;63: 1400-1412.

