



Universitat Autònoma de Barcelona

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

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

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



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Facultat de Medicina

Departament de Cirurgia

TESI DOCTORAL

**Capacidad pronóstica de la expresión de la mieloperoxidasa en los pacientes
con carcinomas escamosos de cabeza y cuello**

Autor:

Anna Sumarroca Trouboul

Directores:

Dr. Xavier León Vintró

Dr. Luis Vila Navarro

Dra. Mercedes Camacho Pérez de Madrid

Tutor:

Dr. Xavier León Vintró

Barcelona, 2018

INFORME DE LOS DIRECTORES DE TESIS

Barcelona, Septiembre de 2018

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

Certifican: Que la Tesis doctoral

“Capacidad pronóstica de la expresión de la mieloperoxidasa en los pacientes con carcinomas escamosos de cabeza y cuello”

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

Xavier León Vintró

Luis Vila Navarro

Mercedes Camacho Pérez de Madrid

Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre.

Marie Curie

Agradecimientos

Al Dr. Xavier León, per ser el meu referent, i per ensenyar-me que darrerre d'un gran professional ha d'haver-hi una gran persona.

A la Dra. Mercedes Camacho, Dr. Luis Vila, Dra. Sònia Alcolea, i tot l'equip de laboratori, per la seva contínua dedicació i per fer reals les idees que fan avançar la ciència.

A la Laura López, per totes les hores invertides en l'estudi anatomopatològic.

A tot l'equip d'Otorinolaringologia de l'Hospital de Sant Pau, per lliurar-se en cos (literalment) i ànima a aquesta tesi. M'heu transmès, entre moltes altres coses, les ganes de voler donar sempre el millor de mi mateixa.

Als nostres pacients; no hi ha dia que no aprenguem junts.

Al José Miguel, potser per la teva paciència infinita, potser per la teva inestimable ajuda, però sobretot per fer-me feliç.

Als meus pares i germà, per creure sempre en mi.

A tota la gent que m'ha entès, animat o ha contribuït, d'una manera o altra, en aquest projecte, gràcies.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	15
1.1	PAPEL DE LOS MACRÓFAGOS EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL	18
1.2	PAPEL DE LOS NEUTRÓFILOS EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL	24
1.3	CAPACIDAD DE LOS NEUTRÓFILOS DE PROMOVER LA DISEMINACIÓN.	30
1.4	TAN EN LOS CARCINOMAS ESCAMOSOS DE CABEZA Y CUELLO	33
1.5	CONCEPTO Y DESCRIPCIÓN DE LA MIELOPEROXIDASA	45
1.5.1	FORMACIÓN DE RADICALES LIBRES COMO EL H ₂ O ₂ :	46
1.5.1	PRODUCCIÓN DE CLORAMINAS	47
1.5.2	INDUCCIÓN DE DAÑO DEL ADN.	48
1.5.3	ACTIVACIÓN DE CARCINÓGENOS.	48
1.5.4	ROL EN LA PROGRESIÓN TUMORAL Y LA METÁSTASIS	49
1.6	ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS DE LA MPO EN ENFERMEDADES Y NEOPLASIAS DE DIFERENTES LOCALIZACIONES	49
1.6.1	CÁNCER DE MAMA	50
1.6.2	CÁNCER DE OVARIO	51
1.6.3	CÁNCER DE PULMÓN	51
1.6.4	CÁNCER DE CÉRVIX	52
1.6.5	CÁNCER DE PÁNCREAS	53
1.6.6	CÁNCER AERODIGESTIVO	52
2.	HIPÓTESIS	59
3	OBJETIVOS	63
3.1	OBJETIVO PRINCIPAL	63
3.2	OBJETIVOS SECUNDARIOS	63
4	MATERIAL Y MÉTODOS	67
4.1	ESTUDIO SOBRE LA EXPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL	67
4.2	INMUNOHISTOQUÍMICA	70
4.3	DETERMINACIÓN DE MPO LIBERADA POR LAS MUESTRAS TUMORALES DE CECC	75
4.4	ESTUDIOS DEL NIVEL SÉRICO DE MPO	75
4.5	ESTUDIOS IN VITRO	77
4.6	ESTUDIO ESTADÍSTICO	80
4.7	CONSIDERACIONES ÉTICAS Y FINANCIACIÓN	81
5	RESULTADOS	85
5.1	RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL DE MPO Y LA APARICIÓN DE METÁSTASIS A DISTANCIA	85
5.2	CORRELACIONES CON LA EXPRESIÓN DE OTROS GENES	105
5.2.1	METABOLISMO DE LAS PROSTAGLANDINAS.	106
5.2.2	VÍA DE LA IL-1.	108
5.2.3	CITOQUINAS, RECEPTORES DE CITOQUINAS Y GLICOPROTEÍNAS DE MEMBRANA RELACIONADAS CON LA ACTIVIDAD LEUCOCITARIA.	109

5.2.4	TGF-B Y MMP.	110
5.2.5	FACTORES DE HIPOXIA, FACTO DE TRANSCRIPCIÓN NUCLEAR NFκ-B, REGULADORES DE APOPTOSIS (BCXL), DE EXPRESIÓN ENDOTELIAL (VON WILLEBRAND FACTOR), O CON CAPACIDAD COMO CAPERONA (Hsp90).	111
5.2.6	SOD.	112
5.3	CORRELACIÓN CON RUPTURA CAPSULAR	113
5.4	INMUNOHISTOQUÍMICA	116
5.5	ESTUDIO DE SECRETOMAS	118
5.6	ESTUDIO DE MPO A NIVEL SÉRICO	124
5.7	ENSAYOS <i>IN VITRO</i> DE CIERRE DE HERIDA (<i>WOUND HEALING ASSAY</i>)	126
6	<u>DISCUSIÓN</u>	<u>131</u>
6.1	BIOMARCADORES DE LA METÁSTASIS A DISTANCIA EN LOS CECC	131
6.2	PRESENCIA Y SIGNIFICADO DEL INFILTRADO NEUTROFÍLICO EN LOS CECC.	143
6.2.1	PRESENCIA DE TAN-1 Y TAN-2 EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL	143
6.2.2	ACCIÓN DE TAN EN LA PROGRESIÓN TUMORAL Y LA METÁSTASIS A DISTANCIA	146
6.3	GENES INVOLUCRADOS CON TAN Y SU RELACIÓN CON LA METÁSTASIS	151
6.3.1	PROSTAGLANDINAS, TROMBOXANOS, PROSTACICLINA	151
6.3.2	GLICOPROTEÍNAS DE MEMBRANA: CD45	155
6.3.3	CITOQUINAS: MCP-1, RANTES	159
6.3.4	METALOPROTEÍNAS	161
6.3.5	FACTORES REGULADORES DE LA TRANSCRIPCIÓN: NF-κB	163
6.3.6	GENES RELACIONADOS CON EL ESTRÉS OXIDATIVO: SOD	165
6.4	ENZIMA MPO COMO BIOMARCADOR DE TAN Y FACTOR PRONÓSTICO DE LA METÁSTASIS A DISTANCIA EN LOS CECC	168
6.5	PERSPECTIVAS SOBRE LA UTILIDAD DE LA CUANTIFICACIÓN DE LA MPO EN LA PLANIFICACIÓN DE TRATAMIENTO DE CECC.	171
6.5.1	DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS ONCOLÓGICOS	171
6.5.2	ADAPTACIÓN DEL TRATAMIENTO QUIMIOTERÁPICO SEGÚN GRADO DE EXPRESIÓN DE MPO	175
6.6	ROL DE LA MPO EN LA INFECCIÓN Y CONSECUENCIAS DEL HPV	177
7	<u>LIMITACIONES</u>	<u>185</u>
8	<u>CONCLUSIONES</u>	<u>189</u>
9	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	<u>193</u>

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxiribonucleico

CAF: fibroblastos asociados al tumor

CART: árbol de clasificación y regresión

CEACAM1: antígeno carcinoembrionario-1

CECC: carcinoma escamoso de cabeza y cuello

CORTACTIN: *cortical actin binding protein*

COX: ciclooxigenasa

FADU: línea celular de carcinoma

GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos

H₂O₂: peróxido de hidrógeno / agua oxigenada

HGF: factor de crecimiento de hepatocitos

HIF: factor inducible de hipoxia

HOCl: ácido hipocloroso

HR: Hazard Ratio

IC: intervalo de confianza

IL: interlequina

LF: lactoferrina

MDA: melondialdehído

MEC: matriz extracelular

MIF: factor inhibidor de la migración de los macrófagos

MMP: metaloproteinasas

MPO: mieloperoxidasa

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NF-κB: factor nuclear kappa de células B activadas

NO: óxido nítrico

NK: célula *natural killer*

PGE: prostaglandina

PGIS: prostaciclina

PMN: polimorfonuclear

RNA: ácido ribonucleico

RNAm: ácido ribonucleico mensajero

ROS: especies reactivas del oxígeno

SOD: superóxido dismutasa

TAM: macrófagos asociados a tumor

TAN: neutrófilos asociados a tumor

TAX: tromboxano

TGF β : factor de crecimiento transformante beta

TIMP: inhibidor de la MMP

TNF: factor de necrosis tumoral

TSN: sobrenadante neutrofílico activado con tumores sólidos

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

VIH: virus de inmunodeficiencia humana

VPH: virus papiloma humano

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

Las características fenotípicas de las células tumorales fueron descritas el año 2000 por Hanahan y Weinberg¹: la existencia de señales de proliferación celular sostenidas, la evasión de los mecanismos de regulación de la proliferación celular, la inducción de angiogénesis, la adquisición de capacidad invasiva y metastatización, inmortalidad celular y replicación, la resistencia a la muerte celular programada.

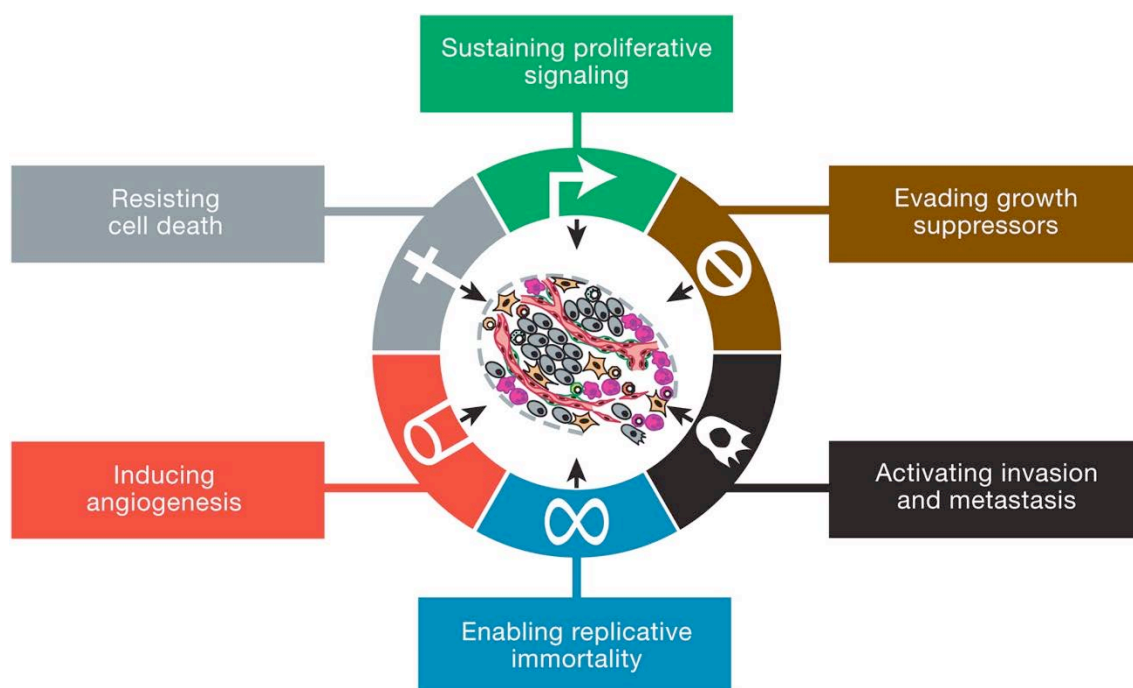


Fig 1. Cambios fenotípicos de las células tumorales propuestos por Hanahan y Weinberg¹.

El año 2011 añadieron cuatro nuevas capacidades de las células tumorales: la adquisición de inestabilidad genómica y capacidad mutagénica; la alteración de los mecanismos implicados en la regulación del metabolismo celular; la capacidad de éstas de evadir el ataque y destrucción por parte sistema inmunitario; y finalmente la promoción de un ambiente inflamatorio².

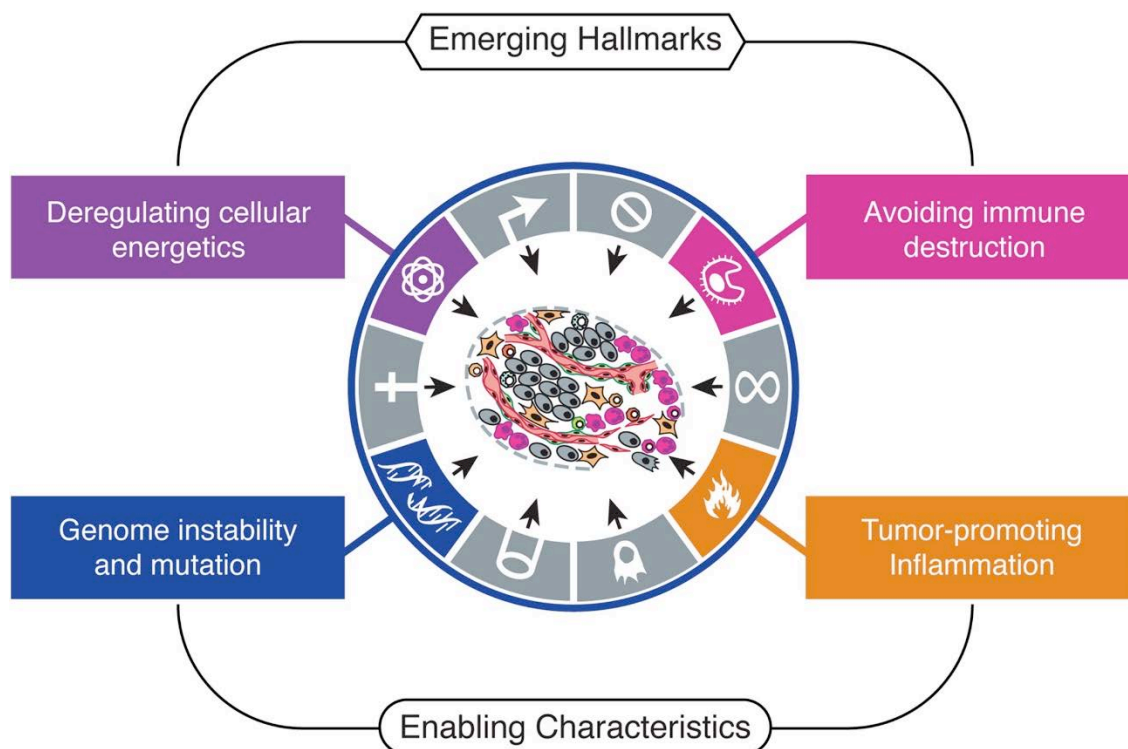


Fig 2. Cambios fenotípicos de las células tumorales añadidos en el 2011 por Hanahan y Weinberg².

Durante los últimos años se ha reconocido que para el desarrollo de las características que definen el comportamiento fenotípico de los tumores malignos, además de las propias células tumorales, juegan un papel fundamental las alteraciones que ocurren en el estroma adyacente y la interacción entre las células tumorales y las células del estroma.

El concepto que las células del estroma pueden promover el desarrollo de los tumores fue establecido por primera vez por Rudolph Virchow³ que hipotetizó, a partir de la observación de los leucocitos en el estroma de los tejidos neoplásicos, que los tumores se originan en localizaciones afectas de un proceso inflamatorio crónico. Posteriormente Paget⁴ estableció la hipótesis de la “semilla y el terreno”, de acuerdo con la cual las células tumorales cuentan con la capacidad de reprogramar su entorno creando un ambiente metabólicamente fértil que permita suplir sus elevados requerimientos metabólicos y energéticos. Sin embargo, no fue hasta 1982 cuando Bisell y cols⁵ desarrollaron el concepto actual que establece que el microambiente en el cual se desarrollan y proliferan las células tumorales cuenta con una importancia tan crítica en la evolución del tumor como las propias alteraciones genéticas que condicionan el comportamiento maligno del tumor.

En la actualidad se está realizando un gran esfuerzo en progresar en el conocimiento de los mecanismos a través de los cuales las células cancerosas utilizan los elementos del microambiente para favorecer los procesos que caracterizan el comportamiento del tumor^{6,7}. Existe un gran interés en estudiar las interacciones paracrinias existentes entre el tumor y elementos estructurales como fibroblastos y células endoteliales, las interacciones con los componentes del sistema inmune, los cambios metabólicos a nivel del ambiente tumoral, y el papel que juega cada uno de estos elementos en el proceso de carcinogénesis.

Se ha podido comprobar como en los carcinomas escamosos de cabeza y cuello (CECC) existe una evolución paralela entre determinados elementos celulares del microambiente tumoral y las propias células tumorales. Además, en cada uno de los compartimentos del tumor se producen una serie de interacciones específicas, de manera que debemos considerar al tumor como una estructura heterogénea, compleja y en continua evolución, en la que el comportamiento de las células cancerosas y las del microambiente variará en función del momento a lo largo del proceso de carcinogénesis, así como del compartimento del tumor que estemos analizando.

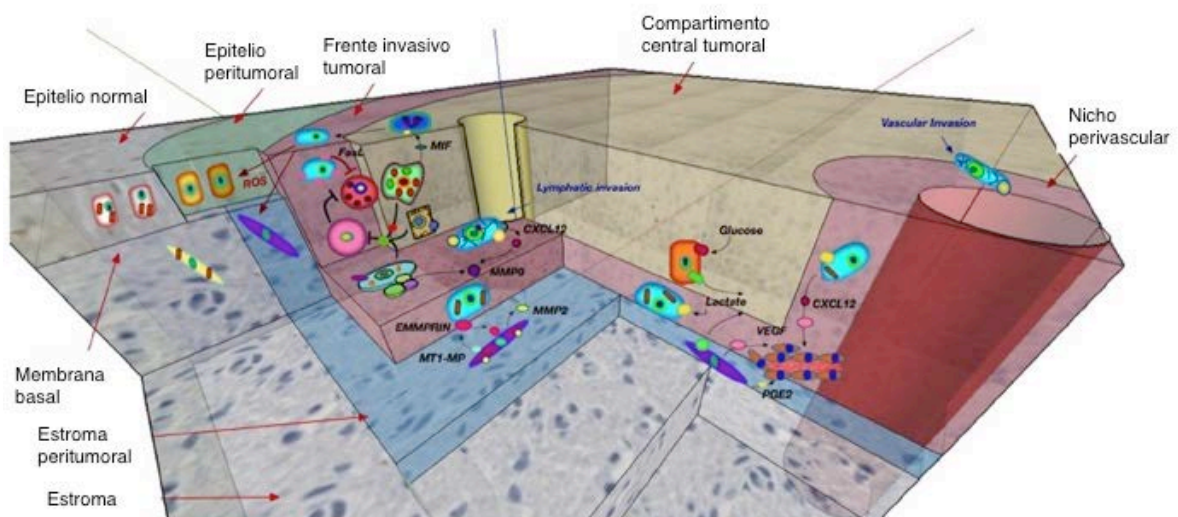


Fig 3. Distribución de los diferentes compartimentos tumorales y peritumorales⁷.

En el esquema anterior, extraído de Curry y cols⁷, se muestra como el margen de infiltración tumoral y el nicho perivascular son los compartimentos en los que se sitúan de forma habitual las células cancer *stem cells* y las células con un elevado índice de proliferación, en tanto que en el compartimento central aparecen células glicolíticas con un índice de proliferación más bajo. Junto a las células tumorales aparecen los fibroblastos activados por el tumor o miofibroblastos, así como toda una serie de elementos celulares relacionados con las respuestas inmune e inflamatoria, incluyendo varios subtipos linfocitarios, macrófagos y neutrófilos, entre otros.

1.1 PAPEL DE LOS MACRÓFAGOS EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL

Uno de los elementos celulares del microambiente tumoral más estudiado es el macrófago. A partir de los trabajos de Allavena y cols⁸, se ha podido comprobar como los tumores cuentan con la capacidad de modificar fenotípicamente a los macrófagos, induciendo la transformación a macrófagos activados por el tumor (macrófagos asociados a tumor o TAM) que se subdividen en macrófagos tipo 1 (M1) y macrófagos tipo 2 (M2). El interferón-gamma o lipoproteínas relacionadas con agentes infecciosos inducen una activación clásica o canónica de los macrófagos, que adquieren un fenotipo tipo 1 (M1), caracterizado por su elevada capacidad de presentación antigénica, elevada producción de interleuquina (IL) IL-12 y IL-23 y una inducción de la respuesta por parte de linfocitos T. Los TAM cuentan con una elevada actividad citotóxica frente al tumor a partir de la liberación de sustancias como óxido nítrico (NO), intermediarios reactivos de oxígeno, o de factor de necrosis tumoral (TNF). En consecuencia, los M1 son considerados habitualmente como efectores potentes frente a los agentes infecciosos y las células tumorales. En el extremo opuesto, los M2, cuentan con una escasa capacidad presentadora de antígeno, cuentan con una producción baja de IL-12 y elevada de IL-1, suprimen la respuesta inmune, y promueven la remodelación tisular y la

angiogénesis. En línea con estas funciones, los M2 aparecen como un elemento celular con capacidad de favorecer la progresión e invasión tumoral.

Las células tumorales, a partir de la producción de determinadas citoquinas como IL-10 o factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), cuentan con la capacidad de inducir la polarización de los macrófagos hacia M2, favoreciendo en consecuencia el proceso de carcinogénesis.

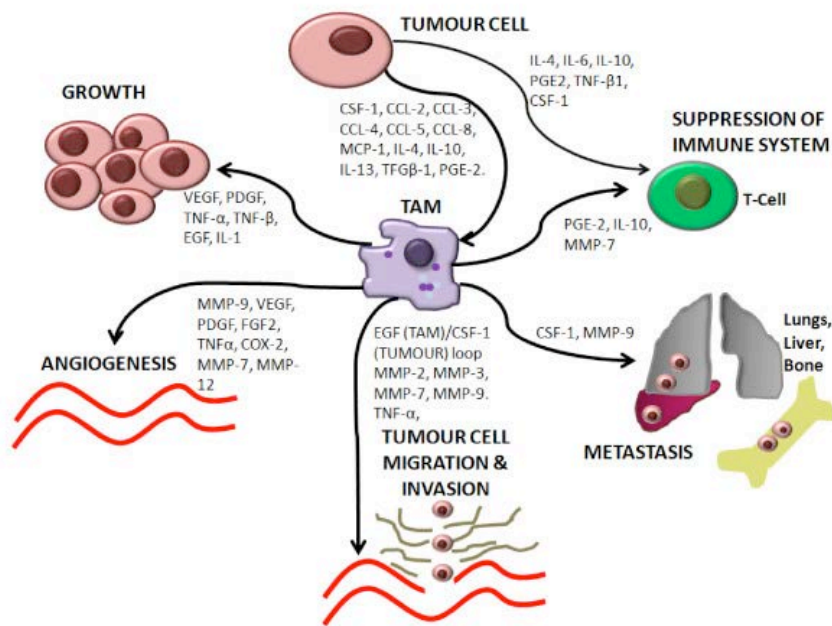


Fig 4. Multimodalidad de TAM como promotora de la progresión y diseminación tumoral⁸.

Los productos secretados por los TAM influyen en una gran cantidad de mecanismos relacionados con la progresión y el crecimiento tumoral. En concreto, a partir de la secreción de proteasas cuentan con la capacidad de contribuir a la remodelación de la matriz extracelular y promover la proliferación, invasión y diseminación del tumor, favorecer los mecanismos de angiogénesis y linfangiogénesis, y suprimir la respuesta inmunitaria^{9,10,11,12}.

Toda esta actividad relacionada con la presencia de TAM a nivel del microambiente tumoral cuenta también con un significado pronóstico. Diferentes estudios han encontrado una relación entre el grado de infiltración tumoral por TAM y un empeoramiento pronóstico¹³.

En estudios realizados en pacientes con CECC diferentes autores han encontrado una relación entre el nivel de infiltración pro TAM y el pronóstico de la enfermedad. Liu y cols¹⁴ estudiaron un grupo de 112 pacientes con carcinomas de cavidad oral en los que se determinó el nivel de infiltración por TAM a partir de un estudio inmunohistoquímico frente a CD68. Se apreció la existencia de una correlación significativa entre el grado de infiltración por TAM y la categoría de extensión local (P=0.004) o regional (P=0.004) del tumor. Un 49% de los tumores contaron con un grado de elevado de infiltración por TAM. De acuerdo con los resultados obtenidos, los pacientes con una infiltración elevada por TAM contaron con una supervivencia significativamente inferior (P=0.001)

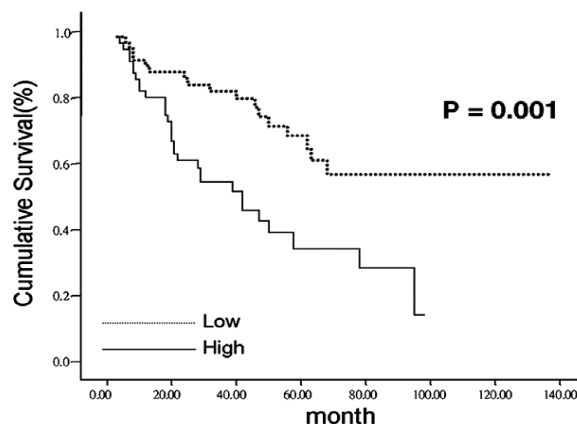


Fig 5. Supervivencia acumulada en función del grado de infiltración tumoral por TAM. Los pacientes con alta infiltración por TAM presentaron una supervivencia significativamente menor¹⁴.

Igualmente, en un estudio realizado en 84 pacientes con carcinomas de supraglotis, Lin y cols¹⁵ encontraron una relación significativa entre unos niveles elevados de infiltración por TAM (células CD68 positivas) y un empeoramiento pronóstico.

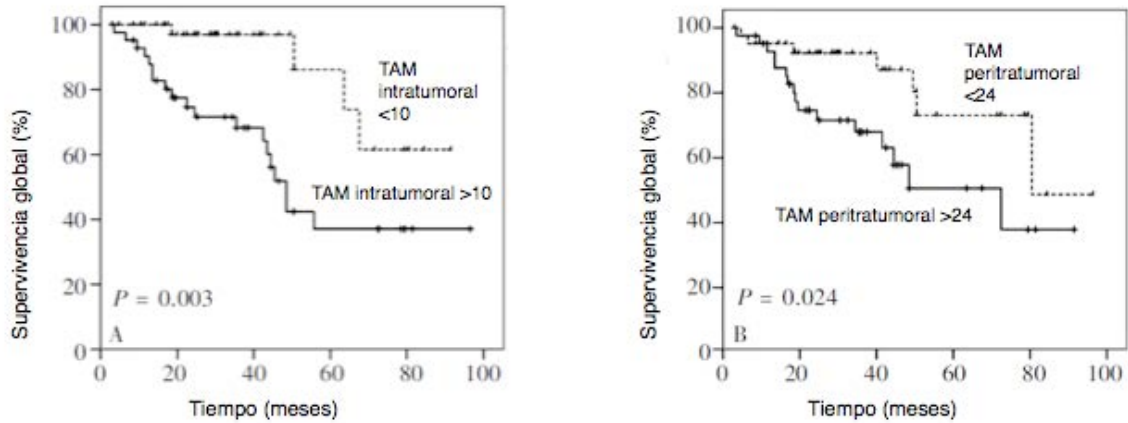


Fig 6. Supervivencia global en función del grado de infiltración tumoral por TAM (A), y del grado de infiltración peritumoral por TAM (B). Los pacientes con altas infiltraciones por TAM presentaron peor supervivencia¹⁵.

Fujii y cols¹⁶ evaluaron mediante inmunohistoquímica frente a CD163, un marcador específico de macrófagos tipo M2, el grado de infiltración en 108 pacientes con carcinomas de cavidad oral tratados de forma quirúrgica. Sus resultados, al igual que los de los autores anteriores, mostraron una relación significativa entre la supervivencia y el grado de infiltración por TAM.

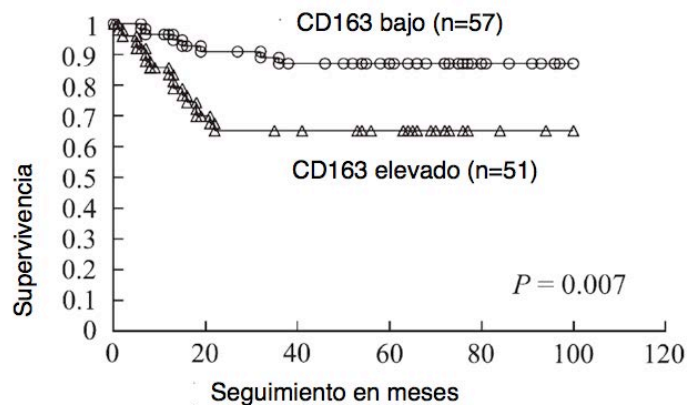


Fig 7. Supervivencia según grado de infiltración por TAM. Los pacientes con alta infiltración presentaron una supervivencia del 65% frente al 90% de los pacientes con baja infiltración¹⁶.

De acuerdo con los resultados de un estudio multivariante, el nivel de infiltración por TAM apareció como una variable relacionada de forma significativa con el pronóstico de la enfermedad (Hazard Ratio HR 2.636, Intervalo de Confianza IC 95%:1.021-6.803, P=0.045).

Matsuoka y cols¹⁷ analizaron 60 pacientes con carcinomas avanzados de cavidad oral tratados con quimiorradioterapia preoperatoria y cirugía, evaluando el grado de infiltración por fibroblastos asociados al tumor (*cancer associated fibroblast*, CAF) y por macrófagos M2 (inmunohistoquímica positiva frente a CD163). Encontraron una correlación significativa entre la la expresión de CAF y M2 ($P=0.001$), y que los pacientes con unos niveles de infiltración por M2 por encima de la mediana contaron con una disminución significativa en la supervivencia global ($P=0.003$) y la supervivencia libre de enfermedad ($P=0.007$).

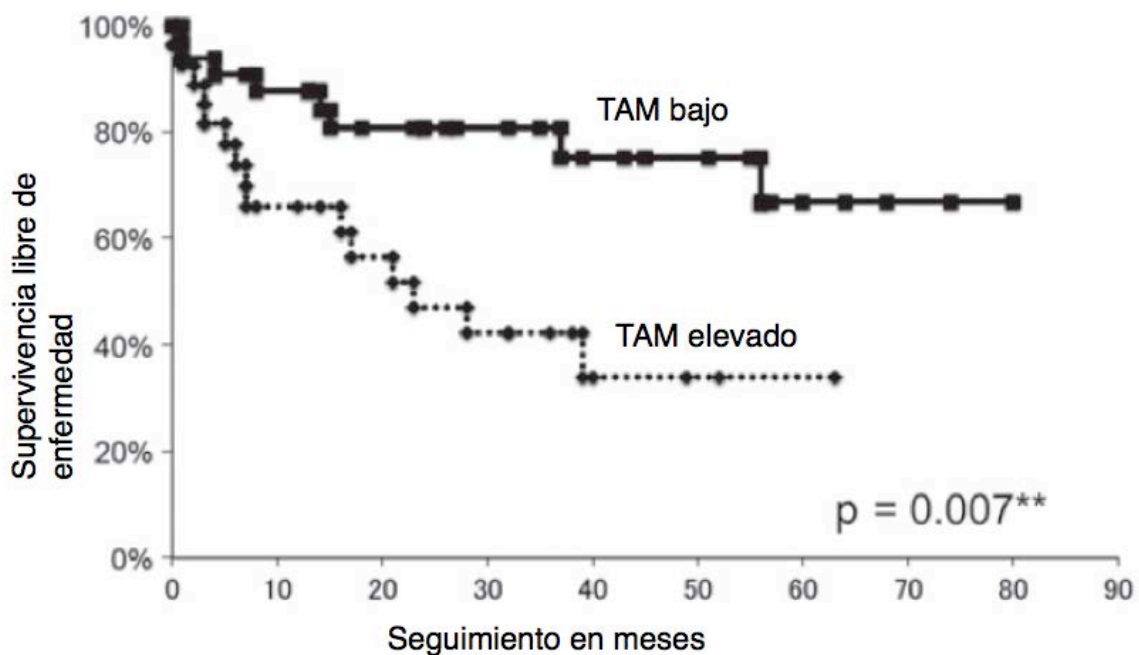


Fig 8. Supervivencia libre de enfermedad según el grado de infiltración por TAM, menor en los pacientes con TAM asociados al tumor¹⁷.

Weber y cols¹⁸ observaron como los pacientes con carcinomas de cavidad oral con afectación ganglionar en el momento del diagnóstico presentaban un nivel de infiltración por M2 significativamente superior a los N0. Igualmente, demostraron como la polarización hacia el fenotipo M2 de las piezas de resección era superior al existente en las muestras de biopsia inicial, e hipotetizaron que los mecanismos de cicatrización iniciados por el traumatismo que supone la biopsia podría ser el responsable de este fenómeno¹⁹. Finalmente, este grupo de autores analizaron la influencia de la infiltración por M2 mediante inmunohistoquímica en biopsias y piezas de resección de pacientes con carcinomas iniciales de cavidad oral (pT1-2)

tratados de forma exclusiva con cirugía²⁰. Por una parte, los autores pudieron confirmar que el infiltrado por M2 en las muestras de biopsia era inferior al existente en las piezas de resección quirúrgica, tal como aparece en la siguiente figura.

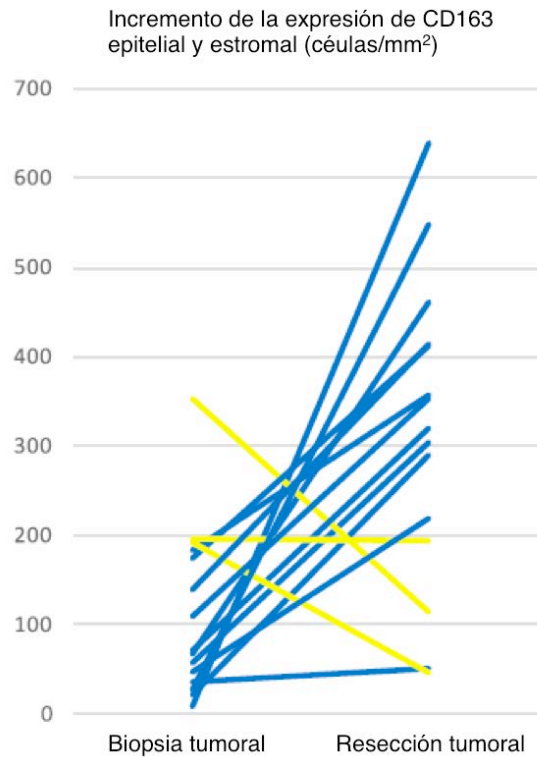


Fig 9. Incremento de la expresión de M2 en la pieza quirúrgica tumoral respecto a la biopsia previa del mismo tumor²⁰.

Por otra parte, encontraron que los pacientes con una buena evolución clínica presentaban unos niveles de infiltración por M2 significativamente inferiores a los pacientes que sufrieron una recidiva local o regional de la enfermedad.

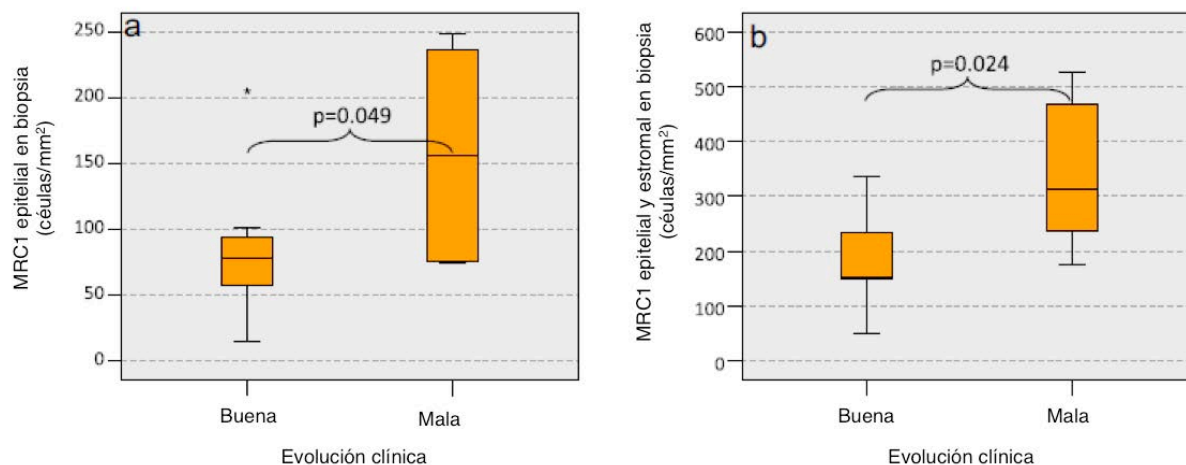


Fig 9. Grado de infiltración tumoral (a) y tumoral + estromal (b) según evolución clínica²⁰.

1.2 PAPEL DE LOS NEUTRÓFILOS EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL

Tal como hemos podido apreciar, son numerosos los estudios que señalan un papel activo de los macrófagos activados tipo M2 a nivel del tumor. Sin embargo, durante años no se ha considerado excesivamente relevante el papel de los neutrófilos a pesar de que se trata del subtipo de leucocitos más abundante a nivel periférico, y que se encuentran con frecuencia infiltrando los tumores sólidos. Inicialmente se consideró que la presencia de estos neutrófilos a nivel tumoral (*Tumor-associated neutrophils*, TAN) era puramente circunstancial, dado que era difícil creer que este tipo de células con un periodo de vida medio muy limitado pudieran ejercer un efecto biológico significativo en una enfermedad crónica y progresiva como es el cáncer.

Sin embargo, recientemente se ha podido comprobar como los TAN cuentan con un papel relevante en el desarrollo de la enfermedad neoplásica.

Este interés renovado por los neutrófilos viene del reconocimiento de que el proceso inflamatorio cuenta con un papel importante en el proceso de carcinogénesis²¹. Por una parte los neutrófilos cuentan con un papel como células efectoras del proceso antitumoral desarrollado a partir de mecanismos de respuesta inmunitaria. Las diferentes sustancias con capacidad antimicrobiana y citotóxica contenidas en los

gránulos de los neutrófilos pueden destruir las células tumorales, y las citoquinas y quimioquinas secretadas pueden reclutar otra serie de elementos celulares con capacidad antitumoral²².

Sin embargo, un número creciente de observaciones clínicas y de estudios de laboratorio han demostrado que la presencia de neutrófilos a nivel del tumor se correlaciona con un peor pronóstico. Dependiendo del fenotipo mostrado por los TAN, Fridlender y cols²³ clasificaron los TAN en N1 o N2. De manera similar a los macrófagos M1, los TAN N1 cuentan con un papel proinflamatorio y antitumoral. En contraste los M2 y los TAN N2 mostrarían una actividad procarcinogénica. En un estudio realizado por los autores en un modelo murino, el bloqueo del eje TGF- β comportó que los neutrófilos reclutados por el tumor contaran con una elevada actividad citotóxica contra las células tumorales y expresaran una mayor cantidad de citoquinas proinflamatorias (TAN N1), en tanto que la activación de los neutrófilos por TGF- β condujo a la aparición de un fenotipo “circular” y a la producción de citoquinas con capacidad de promover la angiogénesis, la adquisición de las células tumorales de un fenotipo metastásico y de la supresión de la respuesta inmune (TAN N2).

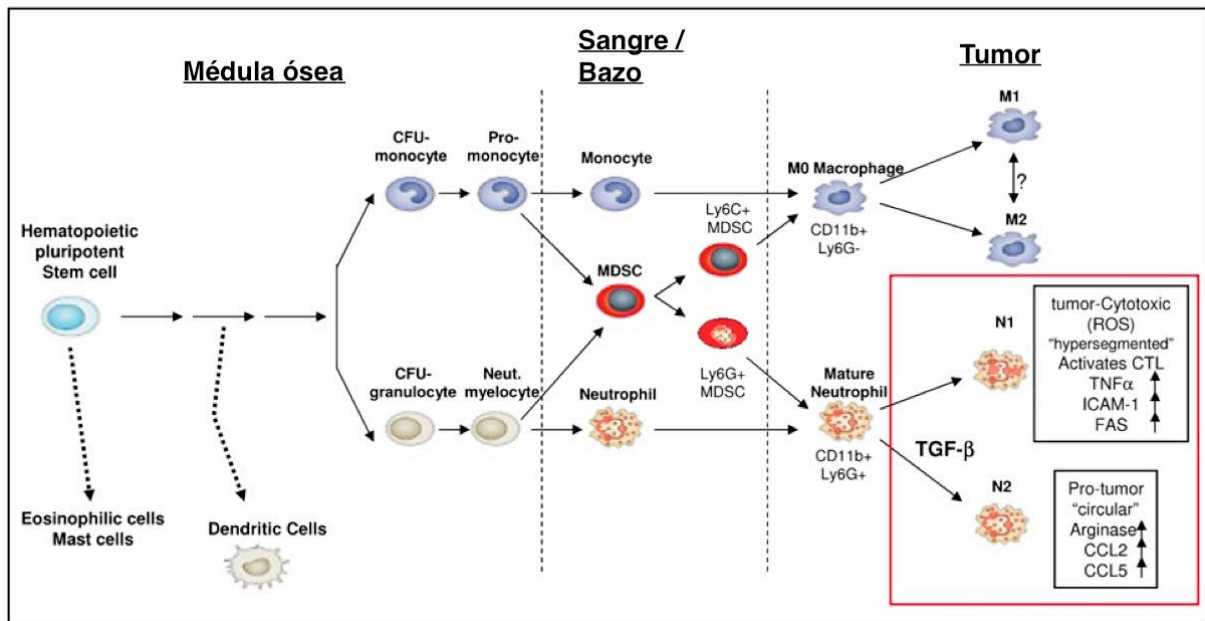


Fig 10. Rol de TGF- β en la diferenciación neutrofílica²³.

Reforzando el concepto de la existencia de dos tipos diferenciados de TAN se ha podido comprobar en dos modelos murinos de tumor pulmonar de Lewis y de mesotelioma cómo los neutrófilos que aparecen en la periferia del tumor en las fases iniciales del proceso de carcinogénesis tienen una mayor actividad citotóxica y producen unos niveles más elevados de TNF- α , NO y agua oxigenada (H₂O₂). En contraste, en los tumores establecidos estas funciones aparecen infrareguladas y los TAN penetran en el tumor y favorecen su progresión²⁴.

En estudios realizados en humanos existen evidencias que señalan que se mantiene este papel dual de los neutrófilos. En tumores iniciales los TAN cuentan con la capacidad de estimular la respuesta inmune por parte de los linfocitos T²⁵, pero en los tumores establecidos contarían con una capacidad inmunosupresora²⁶.

El proceso de reclutamiento de los neutrófilos a nivel de los focos inflamatorios es un proceso bien documentado guiado por una serie de mediadores quimiotácticos que se agrupan en cuatro grandes familias: 1- quimioquinas (primariamente ligandos CXCR1/2 para los neutrófilos); 2- lípidos como el leucotrieno B₄ o el factor activante de plaquetas; 3- anafilotoxinas del complemento (C5a y C3a); y 4- péptidos N-formilados. El quimiotáctico más potente para los neutrófilos es la IL-8 (IL-8/CXCL8), que promueve el reclutamiento de los neutrófilos a partir de la unión a los receptores CXCR1 y CXCR2. Vía los mismos receptores, los neutrófilos pueden responder a otras quimioquinas como GRO $\alpha/\beta/\gamma$ (CXCL1/2/3), ENA-78 (CXCL5), GCP-2 (CXCL6) y NAP-2 (CXCL7)²⁷. Los agentes quimiotácticos para los neutrófilos pueden ser potencialmente producidos por las propias células tumorales así como por las células del estroma, incluyendo otras células del infiltrado inflamatorio, y ser liberadas al torrente sanguíneo. En consecuencia, sería de esperar que unos niveles elevados de quimiotácticos a nivel sérico o tisular se correlacionasen con el grado de infiltración por TAN.

Los neutrófilos son células con una vida media muy corta. Los neutrófilos circulantes cuentan con una vida media inferior a las 24 horas. Sin embargo, esta vida media puede incrementarse de forma notable a partir de diversos mecanismos, incluyendo el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y determinadas interleuquinas que inhiben la vía proapoptótica Bax a través del eje

PI3K/Akt, o inhiben las caspasas 8 y 3 a través de la vía p38-MAPK. Wu y cols²⁸ han demostrado como los sobrenadantes de varias líneas celulares de tumor cuentan con la capacidad de disminuir de forma significativa la apoptosis espontánea de los neutrófilos.

Entre los factores secretados a nivel del microambiente tumoral que incrementan la vida media de los neutrófilos se han citado el TNF- α y GM-CSF dependiente de linfocitos T activados²⁹, la IL-8³⁰, S1P³¹, la vía TLR4/PI3K²⁸ o el factor inhibidor de la migración de macrófagos (*tumor derived macrophage migration inhibitory factor*, MIF)³², todos ellos expresados y secretados por las células tumorales. Finalmente, se ha podido comprobar cómo la hipoxia consigue inhibir in vitro la apoptosis de los neutrófilos de forma significativa³³ a partir de un mecanismo dependiente del factor inducible de hipoxia HIF-1³⁴. Dado que la mayoría de tumores sólidos cuentan con áreas de hipoxia, este mecanismo de supervivencia de los neutrófilos puede ser general y clínicamente relevante dentro del microambiente tumoral.

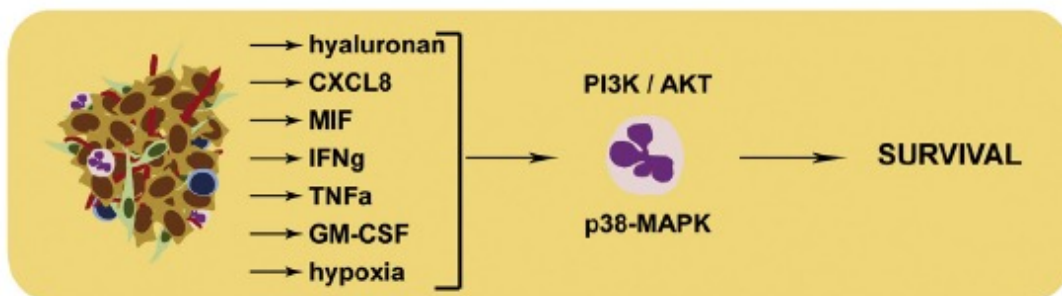


Fig 11. Factores secretados por el microambiente tumoral que activan las vías de supervivencia celular mediante TLR4/PI3K²⁸.

Trellakis y cols³⁵ estudiaron las características de los neutrófilos circulantes en pacientes con CECC y las compararon con las de sujetos control. Los neutrófilos de los pacientes con CECC mostraron una producción inducible de especies reactivas del oxígeno (ROS) significativamente inferior ($P=0.02$) y una reducción en la apoptosis espontánea ($P=0.008$). No aparecieron diferencias significativas en la liberación de citoquinas en condiciones de cultivo estándar, si bien las concentraciones séricas de citoquinas para los pacientes con CECC fueron

superiores. Además, un estudio de inmunotipado demostró que los pacientes con CECC contaban con un incremento de formas inmaduras de neutrófilos.

Los neutrófilos pueden favorecer el proceso de carcinogénesis a partir de una serie de moléculas que, en otro contexto, son utilizadas en la destrucción de microorganismos y la modulación de la inflamación.

Entre estas sustancias destaca la elastasa, cuya misión principal es la eliminación de microorganismos invasores, pero que cuenta con importantes efectos inductores de la inflamación. La elastasa es una serina-proteasa que cuenta con una gran variedad de sustratos, y que ha demostrado ejercer una acción protumoral tanto *in vivo* como *in vitro*³⁶. Se ha comprobado que la elastasa cuenta con la capacidad de inducir la proliferación de células tumorales en diferentes modelos de tumor, incluyendo el cáncer pulmonar³⁷, esofágico³⁸ o el de mama³⁹. Además, se ha demostrado que la elastasa incrementa la capacidad migratoria de líneas celulares de adenocarcinoma ductal pancreático⁴⁰ o de carcinoma esofágico³⁸. Otra peptidasa que cuenta con capacidad de modificar el comportamiento del tumor es la cathepsina G, que puede promover la angiogénesis y la migración de las células tumorales⁴¹.

La metaloproteinasa-9 (MMP-9) es una gelatinasa que favorece el proceso de angiogénesis a partir de la liberación proteolítica del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) existente en la matriz extracelular⁴². Existen evidencias de que la fuente principal de MMP-9 a nivel tumoral es el neutrófilo^{43,33}. La MMP-9 derivada de los neutrófilos es responsable en gran medida de la inducción de la angiogénesis a partir de la liberación del VEGF presente en la matriz extracelular.

Los neutrófilos son también unos productores de ROS, que pueden de forma indirecta promover el crecimiento tumoral. Los neutrófilos generan H₂O₂, que es convertida a ácido hipocloroso (HOCl) por acción de la mieloperoxidasa (MPO). El HOCl puede activar varias enzimas de degradación de la matriz extracelular, incluyendo MMP-2, MMP-7, MMP-8 y MMP-9, así como bloquear los inhibidores de las MMP (TIMP), potenciando en consecuencia la actividad proteolítica de las

MMP⁴⁵. Además las ROS pueden inducir genotoxicidad y contribuir de esta manera al estado de inestabilidad genética que caracteriza el proceso de carcinogénesis⁴⁶.

Otro mecanismo de acción protumoral de los neutrófilos depende de la capacidad inmunosupresora de la arginasa 1, presente en los gránulos citoplasmáticos. Esta actividad se ejerce a partir de la degradación de la arginina extracelular, un aminoácido esencial para la correcta activación de los linfocitos T⁴⁷. De hecho, la depleción experimental de TAN incrementa la cifra de linfocitos intratumorales y limita el crecimiento de los tumores²³.

Finalmente, los neutrófilos pueden producir citoquinas o factores de crecimiento como IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α , oncostatina o el *hepatocyte growth factor* (HGF), que incrementan el potencial de las células cancerosas⁴⁸.

La siguiente figura esquematiza algunas de las actividades protumorales inducidas por los TAN N2⁴⁹.

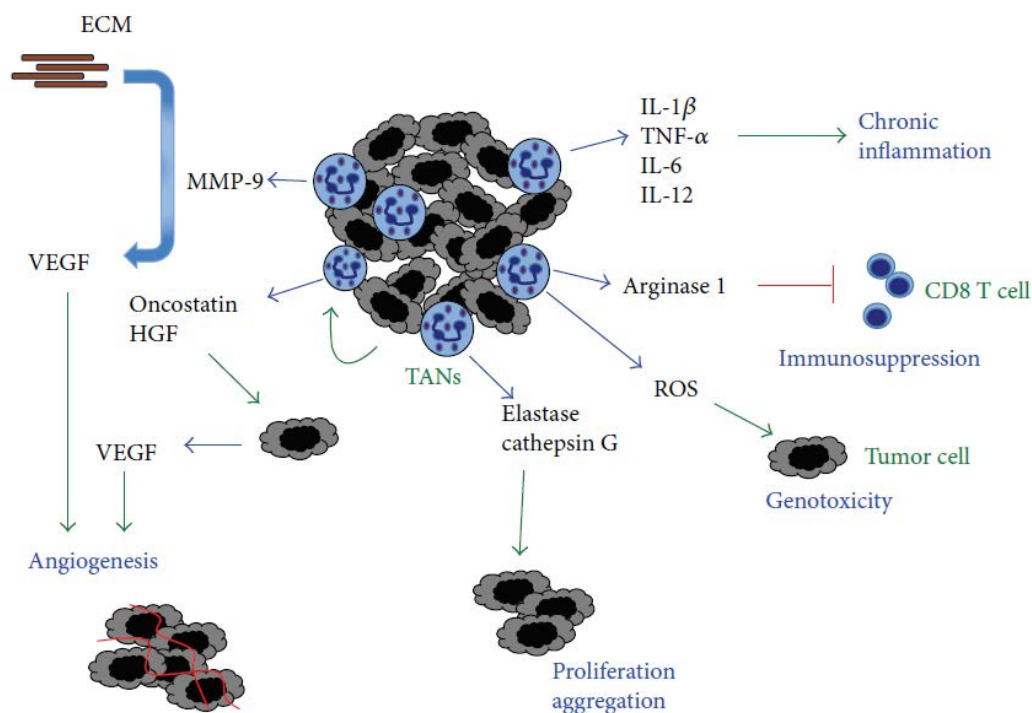


Fig 12. TAN N2 induce la angiogénesis, la proliferación y agregación celular, la genotoxicidad, la inmunosupresión y la inflamación crónica mediante diferentes moléculas efectoras⁴⁹.

1.3 CAPACIDAD DE LOS NEUTRÓFILOS DE PROMOVER LA DISEMINACIÓN.

La diseminación tumoral no es un proceso pasivo, si no que depende de la activación de una serie de pasos secuenciales, empezando por la desagregación de las células tumorales del tumor primario, seguido de su migración a través de la matriz extracelular (MEC) y la membrana basal, el paso a los conductos linfáticos y sanguíneos, su supervivencia en la circulación regional o sistémica, y finalmente la extravasación e implantación en ganglios regionales o en órganos parenquimatosos a distancia^{50,51}. Sólo una proporción de células tumorales con propiedades invasivas consigue sobrevivir hasta llegar a un órgano a distancia. Para conseguir superar las etapas mencionadas, se requieren adaptaciones moleculares selectivas que involucran la adhesión, proteólisis, angiogénesis y resistencia a la apoptosis⁵².

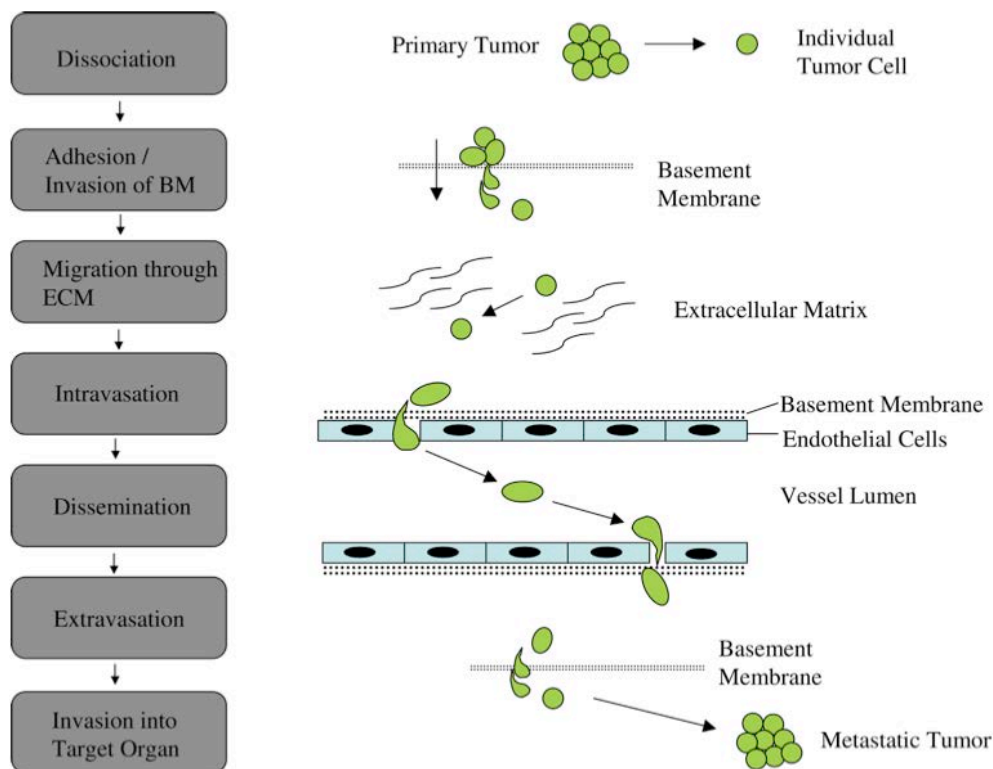


Fig 13. Funciones adaptadas progresivamente por el tumor para adquirir la capacidad de invasión metastática⁵².

Los TAN cuentan con la capacidad de influir en la capacidad migratoria de las células tumorales. Se ha podido demostrar en una serie de modelos de tumor, incluyendo carcinomas cutáneos⁵³, melanomas⁵⁴, adenocarcinomas⁵⁵, carcinomas de mama⁵⁶ y CECC⁵⁷ cómo la presencia de TAN promueve la aparición de metástasis. Estudios *in vitro* realizados en líneas celulares de carcinoma de mama⁵⁸ o de melanoma⁵⁹ han mostrado como los neutrófilos asisten a las células tumorales para transmigrar a través de una monocapa de células endoteliales, en tanto que las células tumorales aisladas no cuentan con esta capacidad de trans migración.

Los TAN ayudan a la capacidad invasiva a partir de varios mecanismos. Los TAN secretan enzimas como la elastasa y MMPs que degradan la membrana basal y promueven la invasión del tumor y la migración transendotelial⁶⁰. Una vez en el tracto circulatorio, pueden ayudar a la supervivencia de las células tumorales induciendo su agregación. Las células tumorales circulantes se adhieren directamente a los neutrófilos a partir de la interacción de las moléculas de adhesión ICAM-1 de las células tumorales y las $\beta 2$ integrinas de los neutrófilos⁶¹. Esta interacción promueve a su vez la extravasación de las células del tumor. Finalmente, la presencia a nivel de los órganos diana de células derivadas de la médula ósea como precursores de los neutrófilos facilitan la existencia de unos nichos premetastásicos donde se secretan una serie de factores de crecimiento que promueven la proliferación de las células tumorales a este nivel⁶².

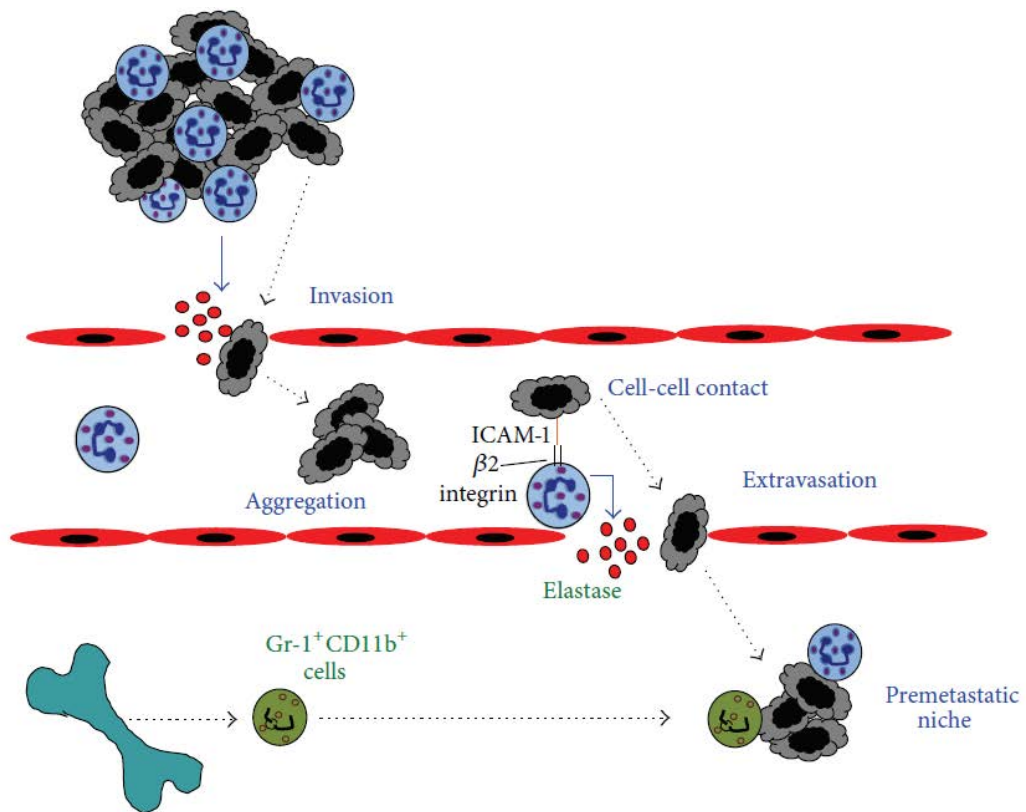


Fig 14. Interacción de las células tumorales con los neutrófilos, ICAM-1 y las $\beta 2$ integrinas para formar nichos tumorales premetastáticos⁶¹.

1.4 TAN EN LOS CARCINOMAS ESCAMOSOS DE CABEZA Y CUELLO

Numerosos estudios realizados en diferentes modelos de tumor han encontrado una asociación significativa entre el grado de infiltración por TAN y un deterioro en el control de la enfermedad y la supervivencia en pacientes con carcinomas renales⁶³, esofágicos⁶⁴, pulmonares⁶⁵, hepáticos⁶⁶, adenocarcinomas colorectales⁶⁷ o gástricos⁶⁸, o melanoma⁶⁹.

Los resultados de un metaanálisis realizado por Shen y cols⁷⁰ publicado en 2014 en el que se evaluaron 16 estudios realizados en tumores sólidos en los que se analizaba la relación entre la supervivencia y el grado de infiltración por TAN a nivel intratumoral, incluyendo tres estudios realizados en pacientes con CECC, demostró la existencia de una relación significativa entre un nivel de infiltración elevado por TAN y un deterioro en la supervivencia global, con un HR de 1.66 (IC 95%: 1.37-2.01). El grado de infiltración en otros compartimentos del tumor como a nivel estromal o peritumoral no se relacionó de forma significativa con la supervivencia. En otro subestudio en el que se consideró la supervivencia libre de enfermedad como la variable dependiente, los resultados fueron similares, con una HR de 1.68 (IC 95%: 1.36-2.07).

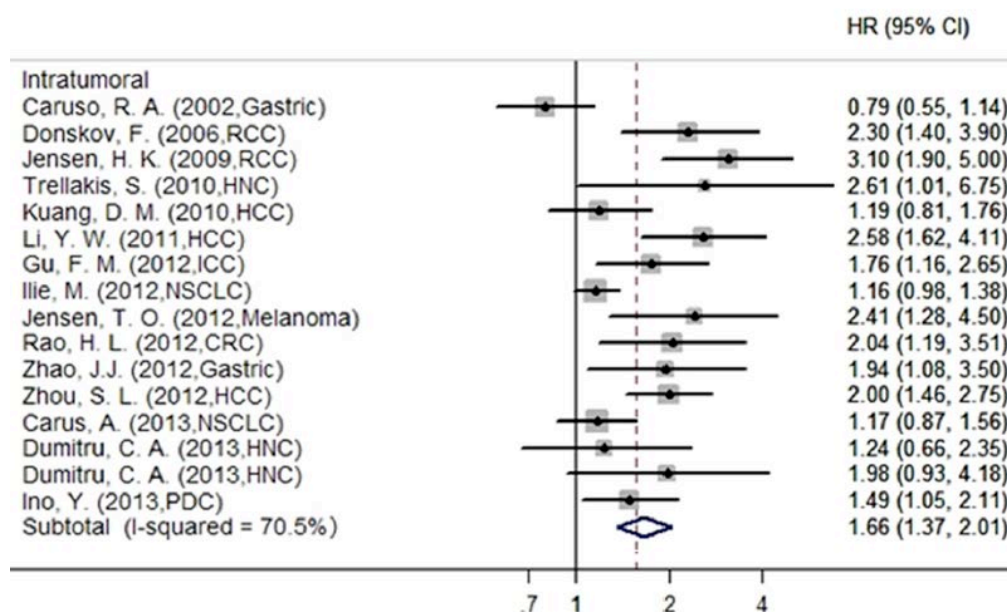


Fig 15. Metánalisis de la relación del grado de infiltración tumoral por TAN y la supervivencia⁷⁰.

Considerando la supervivencia específica, los resultados del análisis fueron igualmente significativos, con un HR de 3.36 (IC 95%: 2.08-5.42).

Al analizar de forma independiente los tres estudios realizados en pacientes con CECC, se pudo comprobar una relación significativa entre el grado de infiltración por TAN y la supervivencia global, con un HR de 1.69 (IC 95%: 1.10-2.60).

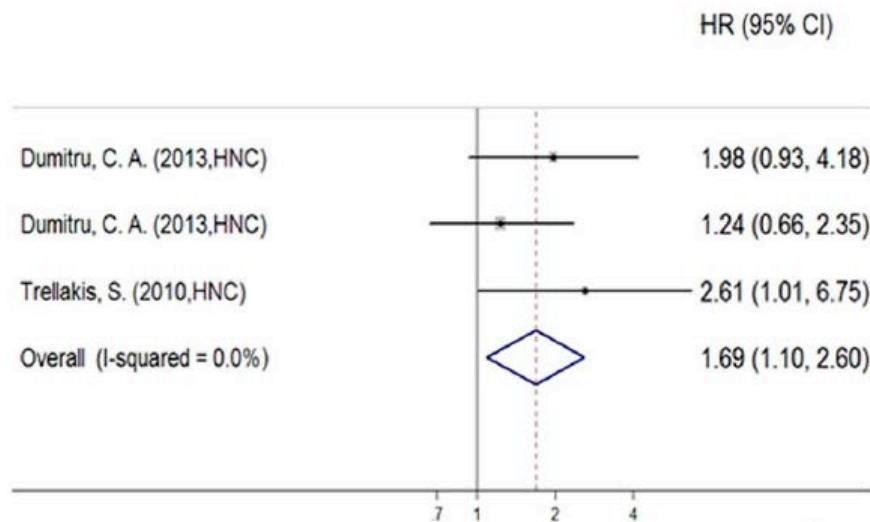


Fig 16. Superivencia global en relación al grado de infiltración por TAN en CECC⁷⁰.

Los primeros autores que estudiaron la relación entre la infiltración por TAN y el control de la enfermedad en pacientes con CECC fueron Trellakis y cols⁷¹, de la Universidad de Duisburg-Essen, Alemania. Los autores analizaron de forma prospectiva muestras de sangre periférica de 114 pacientes con CECC y 41 voluntarios sanos utilizados como controles, y de forma retrospectiva estudiaron las preparaciones histológicas de 99 pacientes con carcinomas de oro-hipofaringe tratados entre 1995-2001 (9% cirugía, 22% cirugía y (quimio)radioterapia, 69% (quimio)radioterapia).

Los resultados del estudio mostraron que el conteaje de leucocitos y de neutrófilos a nivel periférico fue significativamente superior para los pacientes con CECC que para los controles sanos ($P < 0.001$). Además, la cifra de neutrófilos se correlacionó con una mayor extensión local y regional. Además, las concentraciones séricas de

CXCL8 (IL-8), CCL4 (MIP-1 β), y CCL5 (RANTES) fueron superiores para los pacientes con CECC en relación con los controles.

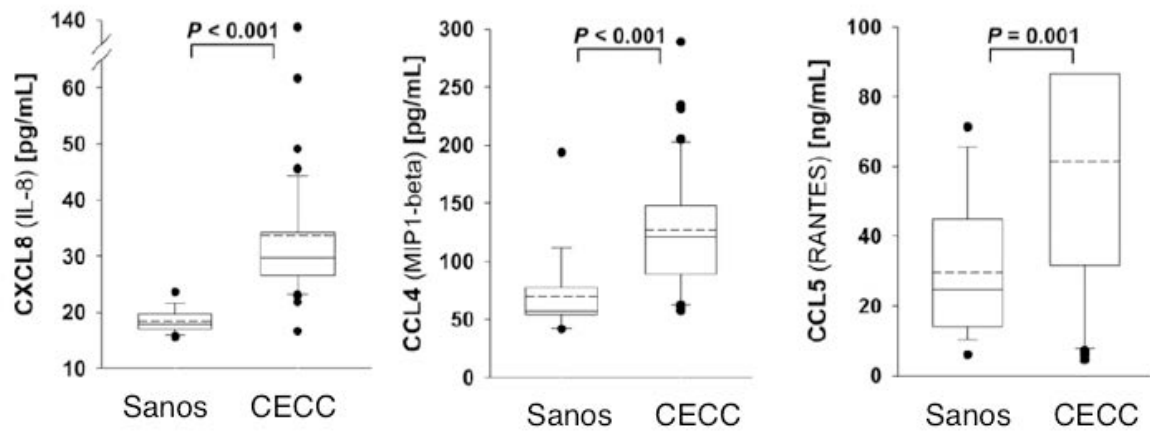


Fig 17. Comparación de la concentración sérica de CXCL8 (IL-8), CCL4 (MIP-1 β), y CCL5 (RANTES) en pacientes sanos respecto a la de pacientes afectados de CECC⁷¹.

La infiltración por TAN se evaluó a partir de la tinción inmunohistoquímica frente a CD66b o MPO. En un 93% de las muestras estudiadas se pudo apreciar una infiltración por neutrófilos en áreas de carcinoma o de estroma peritumoral. Se pudo observar como ocasionalmente células que morfológicamente tenían aspecto de neutrófilos no teñían para MPO.

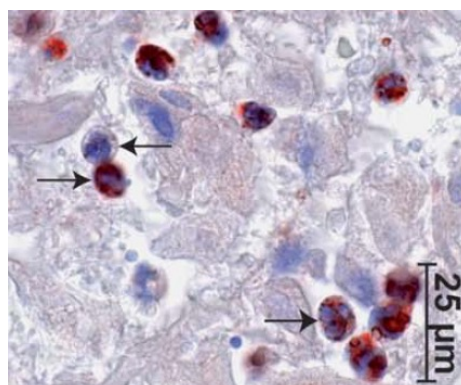


Fig 18. Infiltración tumoral por TAN, mediante tinción inmunohistoquímica de MPO (→). Algunos polimorfonucleares (PMN) no se teñieron por MPO (←). Aumento x630⁷¹.

Este resultado podría indicar que algunos de los TAN podrían haber degranulado.

Utilizando la tinción frente a CD66b se clasificó el grado de infiltración por TAN de los tumores como nulo (7%), débil (44%), moderado (30%) o elevado (19%).

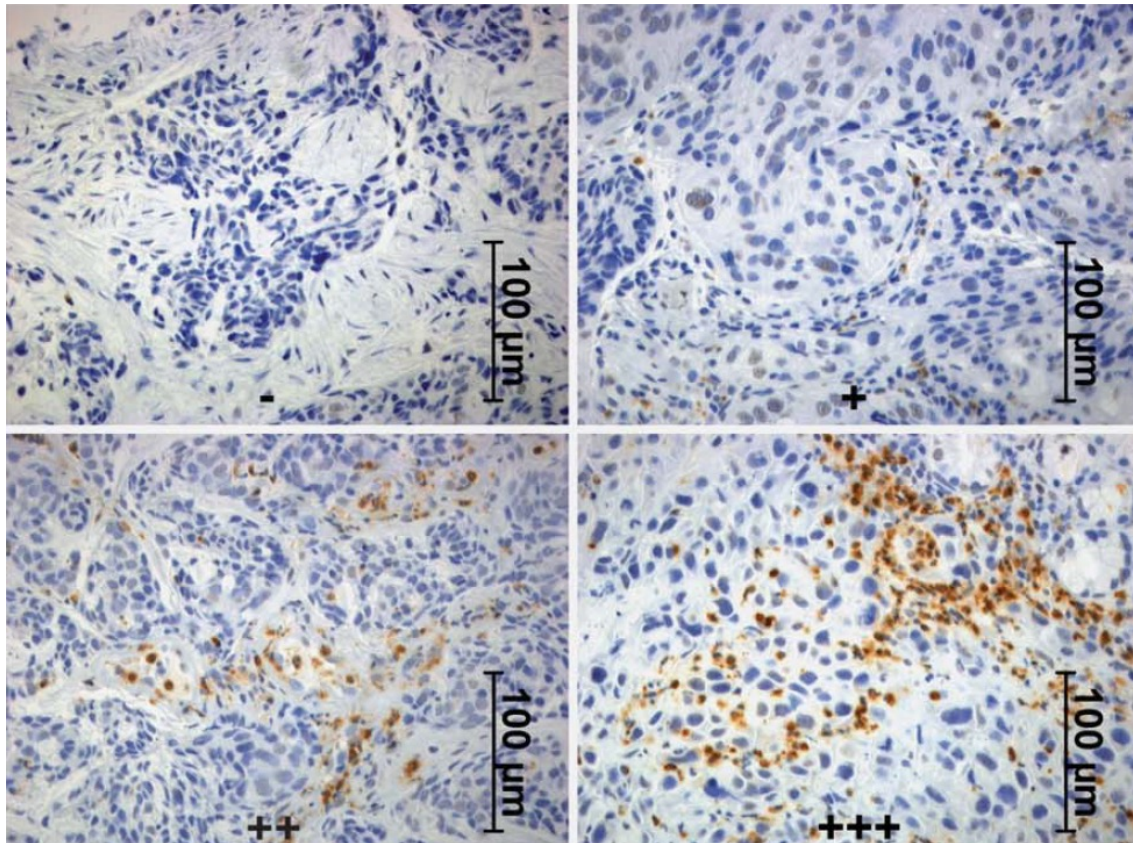


Fig 19. La infiltración observada de CECC por TAN. Los PMN CD66b-positivos fueron clasificados con la puntuación "-" para no, "+" para débil, "++" para moderado y "+++" para infiltración elevada⁷¹.

Los tumores T4 (n=52) contaron con un grado de infiltración superior que los tumores T1-3 (n=47) (P=0.005). No aparecieron diferencias significativas en la supervivencia en función del grado de infiltración por TAN al analizar la cohorte global de pacientes (n=99). Sin embargo, al analizar de forma exclusiva los pacientes con tumores avanzados (n=40) se pudo apreciar una relación entre el grado de infiltración por TAN y la supervivencia (P=0.045).

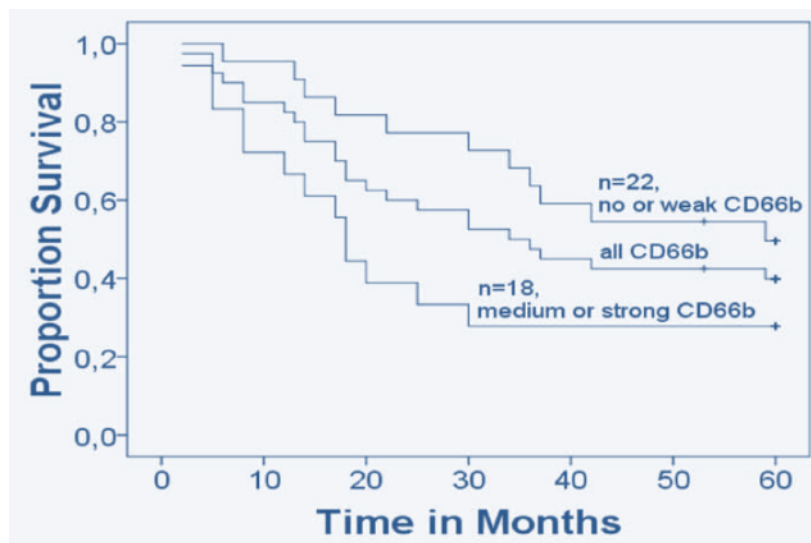


Fig 20. Un alto recuento de TAN infiltrante en el tumor se asoció con una menor supervivencia. Se analizó el efecto de la infiltración de células CD66b positivas sobre la supervivencia global en pacientes con HNSCC avanzado (estadio III o IV) y condiciones médicas homogéneas (n = 40). Las curvas de supervivencia a 5 años de Kaplan-Meier muestran una reducción significativa en la supervivencia global de los pacientes con infiltración media o fuerte de PMNs CD66b-positivos (P = 0.048, análisis multivariante de regresión de Cox)⁷¹.

De acuerdo con los resultados de un análisis multivariante, los pacientes con una infiltración por TAN moderada o elevada contaron con un riesgo de muerte 2.61 veces superior que los pacientes con una infiltración nula o leve (IC 95%: 1.01-6.77, P=0.048).

Los autores llevaron a cabo un estudio in vitro incubando neutrófilos de sangre periférica con sobrenadante de una línea celular de carcinoma de hipofaringe (Fadu). Pudieron comprobar cómo el condicionamiento con medio de Fadu incrementaba de forma significativa la capacidad de migración de los neutrófilos, y que este incremento dependía de la actividad de CXCL8 (IL-8). Además, los neutrófilos condicionados con medio de Fadu contaron con un incremento significativo de la vida media.

Posteriormente, el mismo grupo de autores analizó de forma específica en pacientes con tumores de oro-hipofaringe⁷² y laringe⁷³ la influencia de la infiltración tumoral por TAN. En un estudio realizado en pacientes con carcinomas de oro-hipofaringe, Dumitru y cols⁷² analizaron la relación entre el grado de infiltración por TAN y la

expresión de *cortical actin binding protein* (CORTACTIN) y el control de la enfermedad. La CORTACTIN es una proteína citoplasmática que promueve la alineación del citoesqueleto, y que está involucrada en consecuencia en los procesos de movilidad/migración, invasión y endocitosis. Los autores encontraron que los pacientes con unos niveles más elevados de expresión inmunohistoquímica de CORTACTIN en las células tumorales tuvieron una peor supervivencia global (P=0.028) Igualmente, los pacientes con unos niveles de infiltración por TAN medidos mediante inmunohistoquímica frente a CD66b tendieron también a contar con un peor pronóstico (P=0.054).

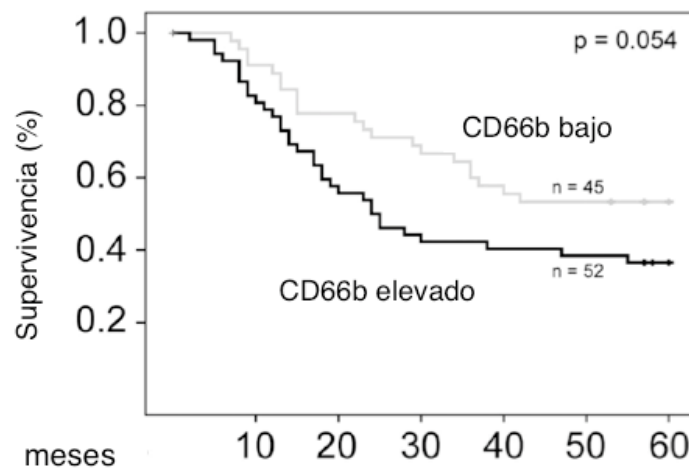


Fig 21. La alta infiltración neutrófila se asoció con una peor supervivencia en tumores de orofaringe. Se trazaron curvas de supervivencia a los 5 años de Kaplan-Meier para los pacientes con infiltración neutrófila baja versus alta y mediante análisis estadístico log-rank⁷².

Los paciente con unos niveles elevados de CORTACTIN e infiltración por TAN contaron con una mayor extensión local y regional de la enfermedad, y fueron los que tuvieron una peor supervivencia. Existió una correlación significativa entre el nivel de expresión de CORTACTIN activada y el grado de infiltración por TAN. De acuerdo con los resultados de un estudio multivariante la única variable que se relacionó de forma significativa con la supervivencia fue el nivel de expresión de CORTACTIN junto al grado de infiltración por TAN. El riesgo de mortalidad para los pacientes con niveles elevados de CORTACTIN y TAN fue 2.34 veces superior que para el resto de pacientes (IC 95%: 1.01-5.38, P=0.045).

A partir de estudios *in vitro* realizados con Fadu se pudo comprobar como en ausencia de CORTACTIN, silenciada en las células tumorales mediante siRNA, los neutrófilos no eran capaces de estimular la migración de las células tumorales.

En otro estudio realizado en 83 pacientes con carcinomas de laringe en el que se analizó el grado de infiltración por TAN mediante inmunohistoquímica (CD66b), Dumitru y cols⁷³ encontraron igualmente una relación significativa ($P=0.048$) entre el nivel de infiltración por TAN y la supervivencia.

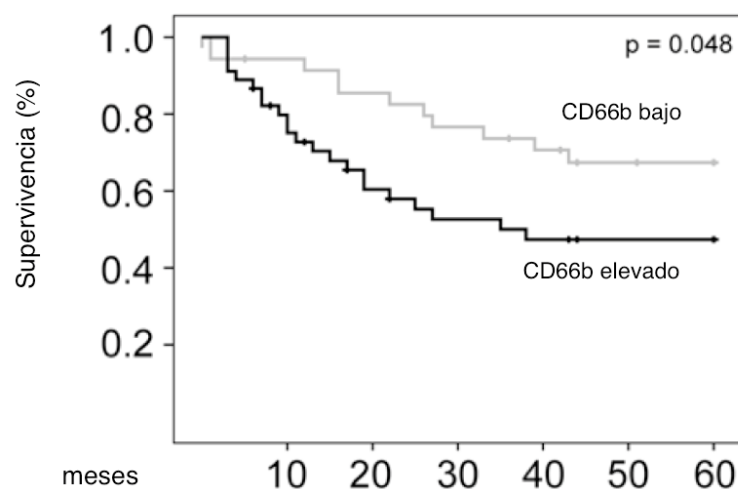


Fig 22. Curvas de supervivencia de 5 años de Kaplan-Meier en pacientes afectados de tumores de laringe según el nivel de infiltración por TAN. Una alta infiltración se relacionó con peor supervivencia⁷³.

A partir de estos estudios iniciales realizados por el grupo de la Universidad de Duisburg-Essen, otros autores han analizado la relación entre la infiltración por TAN y el control de la enfermedad en pacientes con CECC. Wang y cols⁷⁴ evaluaron el grado de infiltración por TAN en 74 pacientes con carcinomas de lengua tratados de forma quirúrgica a partir de un estudio inmunohistoquímico frente a CD15. Además, evaluaron la relación de la molécula de adhesión relacionada con el antígeno carcinoembrionario-1 (*carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 1*, CEACAM1) con la supervivencia y el grado de infiltración por TAN. El CEACAM1 cuenta con múltiples funciones, incluyendo la regulación de la proliferación celular, la inmunoregulación y la regulación de la capacidad de invasión tumoral^{75,76}. Se pudo comprobar que la presencia de neutrófilos era superior a nivel del tumor que

en los tejidos peritumorales ($P=0.038$), y como los TAN aparecían de forma preferente infiltrando las células tumorales o en el margen de infiltración del tumor. Utilizando el valor medio de infiltración como punto de corte, se pudo apreciar una asociación entre los niveles de expresión elevada de CD15 con la presencia de metástasis ganglionares ($P=0.01$). Los pacientes con CD15 elevado tuvieron un mayor porcentaje de recidivas ($P=0.024$) y una peor supervivencia específica ($P=0.020$).

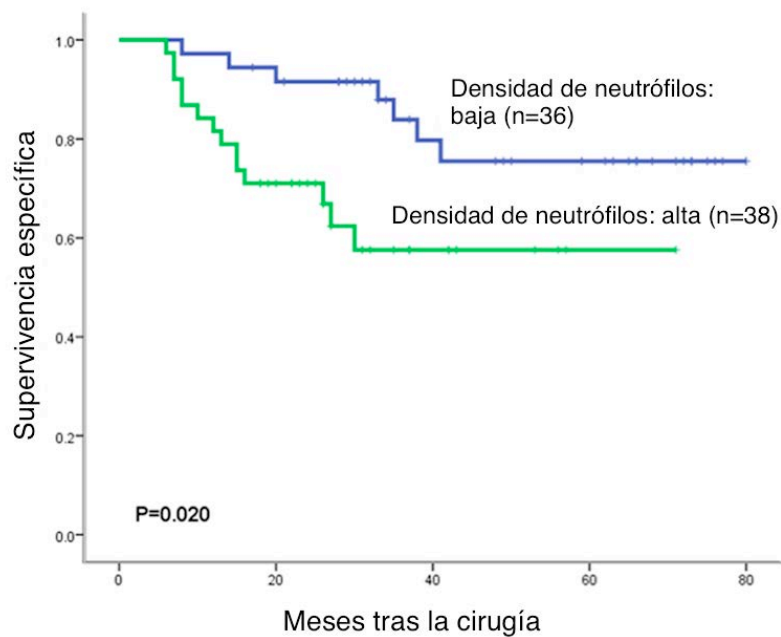


Fig 23. Curvas de supervivencia de pacientes afectados de carcinoma de lengua en relación a la infiltración neutrofílica (peor supervivencia a mayor infiltración)⁷⁴.

En un estudio multivariante la expresión elevada de CD15 (HR 0.325, IC 95%: 0.208-0.869, $P=0.019$) y la afectación ganglionar (HR 0.454, IC 95%: 0.315-0.924, $P=0.030$) fueron las variables relacionadas con la supervivencia específica.

CEACAM1 apareció expresado de forma preferente en el citoplasma de las células tumorales. Más allá de las células tumorales, la mayoría de las células CEACAM1 positivas fueron neutrófilos, y casi la totalidad de los neutrófilos expresaron de forma intensa CEACAM1.

Los autores utilizaron una línea celular con una baja expresión constitutiva de CEACAM1 (Cal-27) para demostrar que CEACM1 cuenta con un papel en la regulación del infiltrado por TAN. Tras la inducción de la expresión de CEACAM1 mediante la transfección de un vector se produjo un incremento en la expresión de IL-8 y CXCL6, con una potente actividad quimiotáctica para los neutrófilos, por parte de las células transfectadas.

Caldeira y cols⁷⁷ analizaron mediante inmunohistoquímica el grado de infiltración de TAN (CD66b) y de linfocitos T (CD3) en una cohorte de 28 pacientes con carcinomas de cavidad oral tratados mayoritariamente con cirugía ± radioterapia postoperatoria. Los autores encontraron un incremento significativo en la expresión de CD66b en la región intratumoral ($P=0.015$) y un incremento en la relación CD66b/CD3 en el frente de invasión ($P=0.034$) en los pacientes con tumores avanzados T3-4 en relación con los tumores iniciales T1-2. No aparecieron diferencias significativas en el control de la enfermedad en función de la expresión de CD66b o CD3.

Punt y cols⁷⁸ analizaron la expresión de diferentes subtipos de linfocitos T y de células no linfocíticas IL-17⁺ en pacientes con carcinomas de orofaringe. En un estudio previo realizado en CECC se pudo evidenciar como sólo el 6% de las células IL-17⁺ eran linfocitos T helper, en tanto que el 45% eran neutrófilos⁷⁹. Se estudiaron un total de 162 muestras mediante inmunofluorescencia, de las cuales 63 correspondieron a tumores del virus del papiloma humano (VPH)-positivos. El número de células no linfocíticas IL-17⁺ en los VPH-negativos fue significativamente superior a la de los pacientes con tumores VPH-positivos ($P<0.001$).

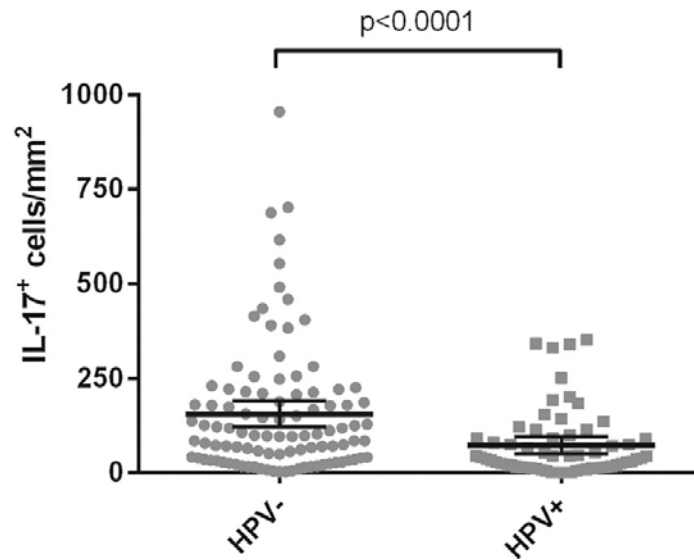


Fig 24. Concentración de células T tumorales infiltrantes y células IL-17+ en tumores con VPH positivo y VPH negativo⁷⁸.

Para los pacientes con un número de células IL-17+ por debajo de la mediana, se pudo observar una relación significativa entre el grado de infiltración por linfocitos T y la supervivencia libre de enfermedad.

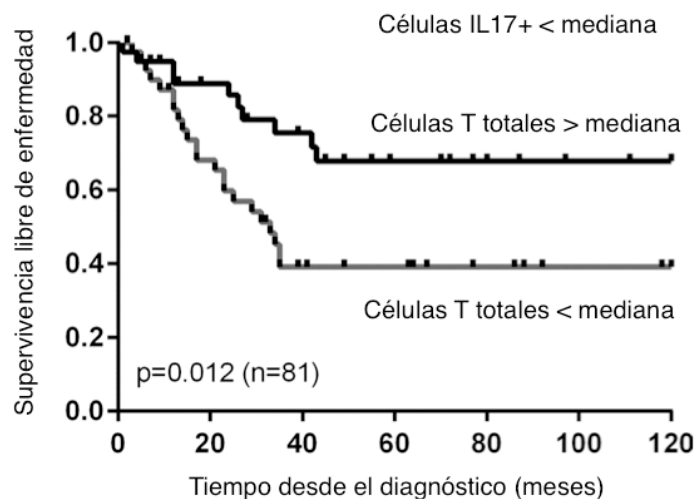


Fig 25. Curvas de supervivencia libres de enfermedad de Kaplan-Meier comparando pacientes con número bajo (por debajo de la mediana) de células IL-17+ en función del número de linfocitos T en el epitelio tumoral y el estroma combinados⁷⁸.

Por el contrario, no aparecieron diferencias significativas en la supervivencia en función de la infiltración linfocitaria para los pacientes con unas cifras de células IL-17⁺ por encima del valor de la mediana. Estos resultados llevaron a los autores a concluir que el efecto pronóstico positivo de la infiltración linfocitaria en los pacientes con carcinomas de orofaringe sólo aparecerían en presencia de un nivel de infiltración por células IL-17⁺ bajo, equivalente a un nivel bajo de infiltración por TAN. Los autores no analizaron el control de la enfermedad en función de la infiltración por células IL-17⁺.

De acuerdo con los resultados de un metaanálisis realizado por Punt y cols⁸⁰ en el que se analizaron los estudios que estudiaban la influencia del grado de infiltración por células IL-17⁺ en diferentes modelos tumorales, los pacientes con unos niveles de infiltración elevados contaron con una disminución significativa de la supervivencia libre de enfermedad.

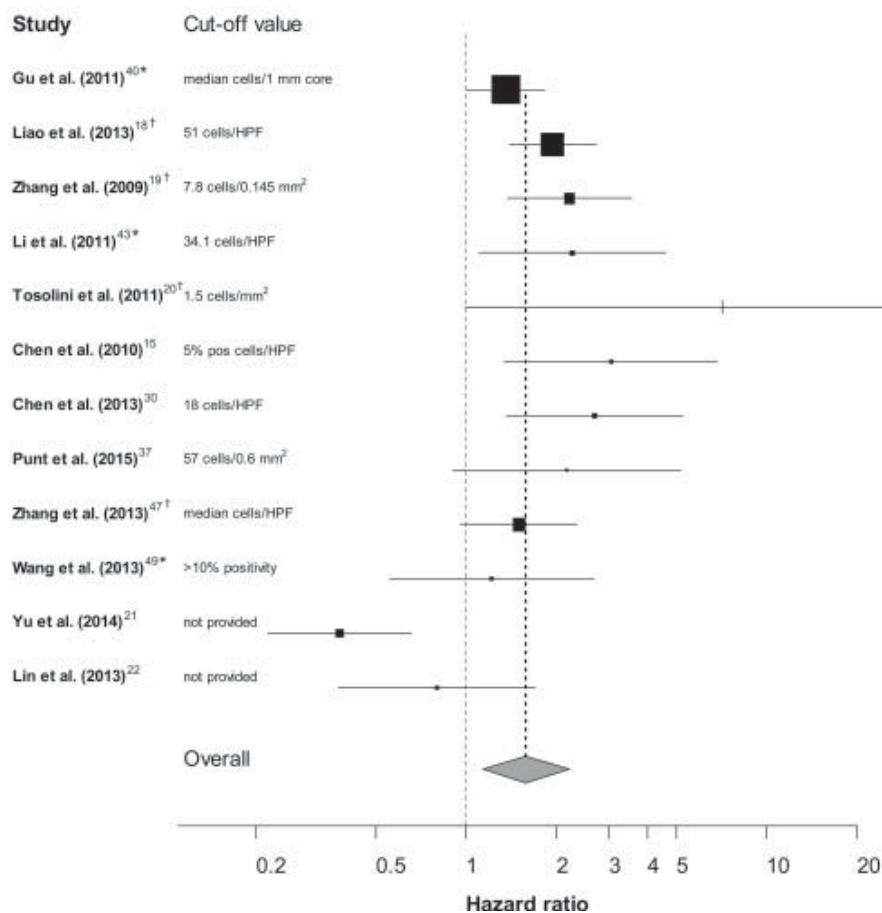


Fig 26. Metánalisis de supervivencia libre de enfermedad respecto al grado de infiltración por células IL17⁺⁸⁰.

En un modelo tumoral cercano al de los CECC, Wang y cols⁸¹ observaron cómo los pacientes con carcinomas escamosos de esófago con unos niveles de infiltración elevados de neutrófilos, evaluados mediante inmunohistoquímica frente a CD66b, tuvieron un mayor porcentaje de afectación ganglionar y una peor supervivencia específica.

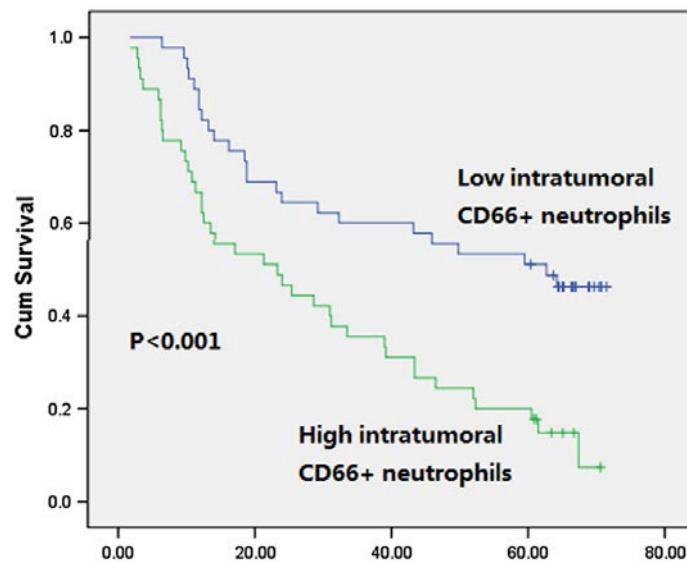


Fig 27. Supervivencia específica respecto al grado de infiltración de neutrófilos CD66b+ en carcinomas escamosos de esófago: una mayor infiltración se relacionó con una peor supervivencia⁸¹.

Otros autores han estudiado los mecanismos por los cuales la infiltración por TAN podría modificar el pronóstico en los pacientes con CECC. Glogauer y cols⁸² evaluaron el efecto de los neutrófilos sobre la capacidad invasiva de una línea celular de CECC (UMSCC47), y pudieron observar cómo el cocultivo de las células tumorales y los neutrófilos incrementa la capacidad de invasión de la línea celular, la formación de invopodia y la degradación de la matriz extracelular. Observaron un incremento en la cantidad de TNF- α y de IL-8 en el sobrenadante de los cocultivos en comparación a los cultivos aislados de UMSCC47 o de neutrófilos, y que la inhibición de TNF- α o IL-8 conducía a una disminución significativa de la capacidad de invasión por parte de las células tumorales.

1.5 CONCEPTO Y DESCRIPCIÓN DE LA MIELOPEROXIDASA

Agner⁸³ fue de los primeros en preparar la enzima lisosómica del grupo hemo MPO altamente purificada en los años 1940, y reportó su presencia en los neutrófilos en concentraciones nunca menores del 1-2% del peso seco de las células, aunque otros autores han descrito concentraciones mayores al 5%, y representa la proteína más abundante en los neutrófilos.

La síntesis de la MPO se inicia en el estadio de promielocito y termina en el inicio del estadio de mielocito⁸⁴. Los gránulos contenedores de MPO en el neutrófilo maduro son heterogéneos por densidad⁸⁵ y por morfología⁸⁶. Los monocitos de humanos también contienen granulocitos contenedores de MPO, pero en menor número que en los neutrófilos⁸⁷, y que se pierden al madurar en macrófagos.

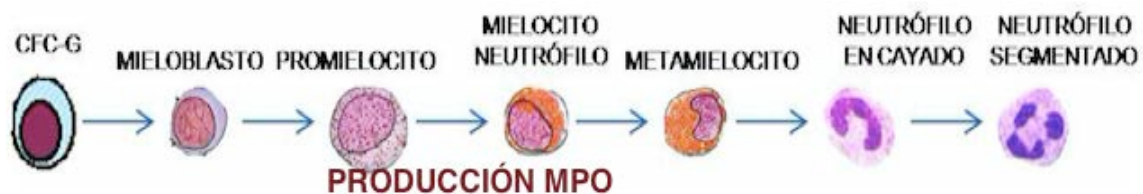


Fig 28. Etapas formativas del neutrófilo, y la producción de MPO en el estadio de promielocito y mielocito⁸⁴.

La MPO es producida por un solo gen, localizado en el segmento q12-24 del cromosoma 17⁸⁸. Se forma inicialmente una apoproMPO inactiva, que se activa y se convierte en proMPO con la incorporación de una hemoproteína. La MPO madura es constituida por dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas unidas por un puente disulfuro.

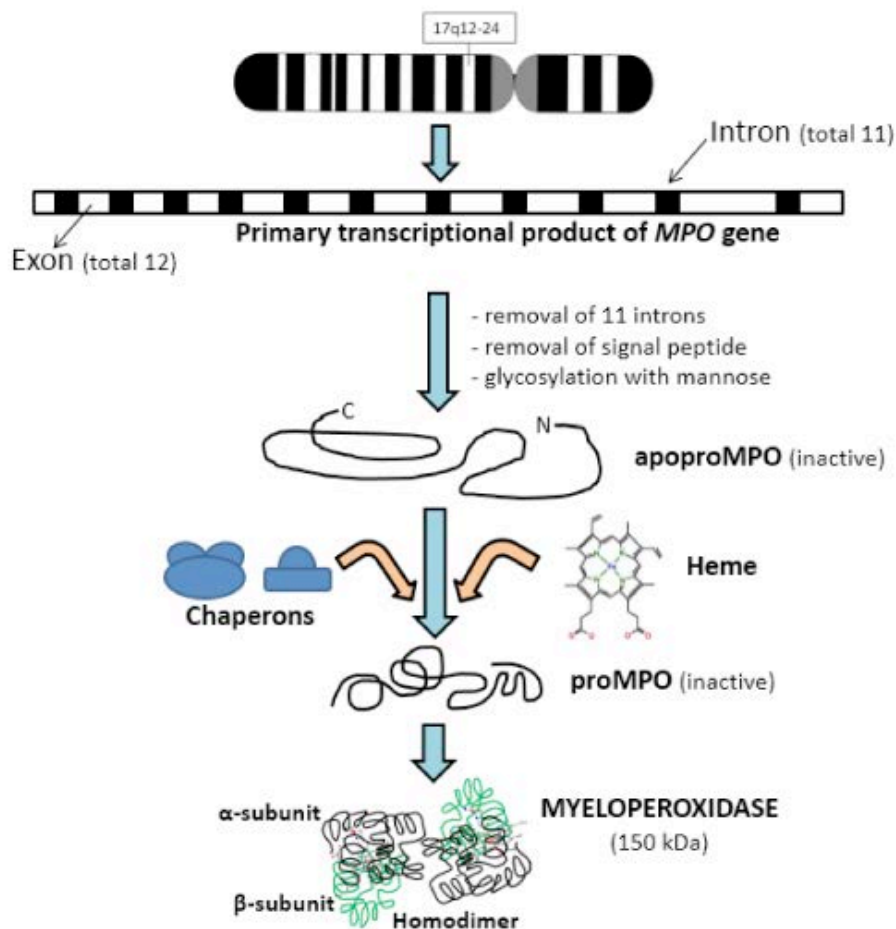


Fig 29. Formación de la MPO a partir del gen 17q12-24⁸⁹.

La MPO posee en el organismo diversas acciones:

1.5.1 Formación de radicales libres como el H₂O₂:

La nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en forma reducida (NADPH) es activada por la migración de los componentes citoplasmáticos, y oxigena el espacio extracelular en el momento de la fagocitosis formando H₂O₂. El neutrófilo es capaz

de generar, a partir del H_2O_2 , suficiente HOCl como para producir él mismo la muerte de un agente bacteriano. La MPO ejerce pues, en esos casos, de promotor de función antimicrobiana. Trellakis y cols³⁵ observaron una producción sensiblemente menor de radicales libres por los neutrófilos en los pacientes afectados de CECC.

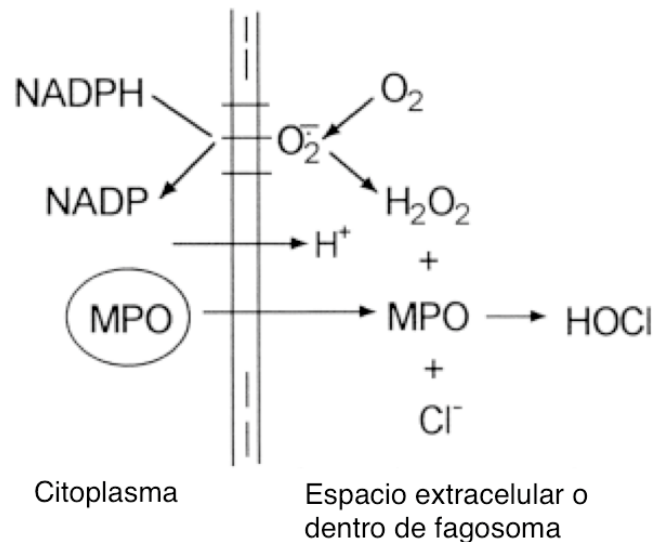


Fig 30. Producción de HOCl a partir de la MPO en la membrana celular⁸⁴.

1.5.2 Producción de cloraminas

En contacto con un exceso de H_2O_2 , la MPO cataliza este producto para formar HOCl . En casos de pH bajo, HOCl reacciona con el exceso de ácido clorídrico para formar las cloraminas. Estos productos son altamente reactivos, oxidan varios agentes, y permiten el ataque a los microorganismos, esencialmente mediante la pérdida del transporte intermembranoso microbiano y la supresión de la síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN) microbiano⁹⁰. La taurina, proteína de alta concentración en el neutrófilo, protege esta célula del HOCl presente en su citoplasma⁹¹.

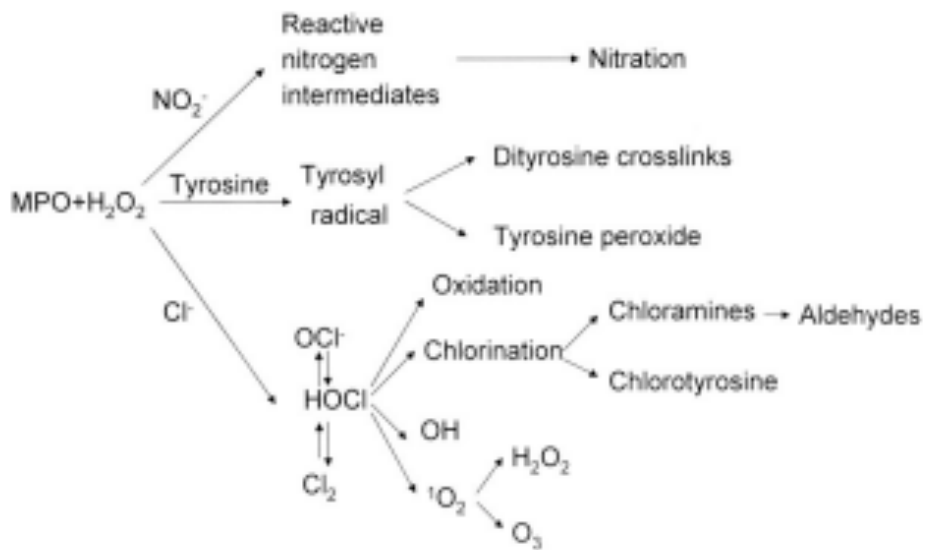


Fig 31. Producción de cloraminas y productos oxidativos a partir de la MPO⁸⁴.

1.5.3 Inducción de daño del ADN.

Las cloraminas, unidas al HOCl, tienen un conocido poder mutagénico. Inducen la disociación de la doble cadena de ADN al interrumpir los puentes hidrogenados⁹². Las dianas más sensibles a estas moléculas son las histonas, que al reaccionar con el HOCl promueven la producción de mayor cantidad de cloraminas.

La MPO también puede dañar de manera indirecta el ADN. Estudios han demostrado que neutrófilos activados pueden causar la peroxidación de lípidos, produciendo malondialdehído (MDA)⁹³. El MDA es capaz de interactuar con las bases nucleicas y producir mutaciones en éstas.

1.5.4 Activación de carcinógenos.

La exposición al tabaco, asbestos y otros químicos inducen el reclutamiento de neutrófilos y la inflamación pulmonar⁹⁴, o en nuestro caso la inflamación de las

mucosas del área de cabeza y cuello. Secundariamente, la MPO se encuentra en estas zonas expuestas, y puede ayudar a las modificaciones del microambiente local. En varios estudios la actividad de la MPO ha sido relacionada con el metabolismo carcinogénico de los hidrocarburos presentes en el tabaco fumado. Estos hidrocarburos han sido descritos como causantes de la mutación del gen de la proteína p53 observada en el cáncer de pulmón⁹⁵.

1.5.5 Rol en la progresión tumoral y la metástasis

Los neutrófilos, mediante el MPO y la formación de HOCl, son potentes inhibidores de la vía de reparación de nucleótidos⁹⁶. El HOCl es una molécula relativamente estable y que difunde bien hasta el núcleo celular. Esta función, tan útil en la acción antimicrobiana, a la vez puede tener un impacto procarcinogénico.

Por otra parte, los neutrófilos promueven un microambiente prooxidativo, como descrito anteriormente, remodelando la matriz extracelular, con la ayuda de la IL-8 y las MMP, lo que facilita la migración y extravasación de las células tumorales⁹⁷.

1.6 ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS DE LA MPO EN ENFERMEDADES Y NEOPLASIAS DE DIFERENTES LOCALIZACIONES

La actividad proinflamatoria de esta enzima en diferentes niveles produce consecuencias en diversos sistemas del cuerpo humano. Recientes estudios han descrito una expresión aberrante de MPO en los macrófagos maduros en casos de aterosclerosis⁹⁸, y de enfermedades neurodegenerativas^{99,100}. Esta expresión atípica puede provocar daño oxidativo en tejidos, promoviendo además de la aterosclerosis, la enfermedad de Alzheimer¹⁰⁰ y neoplasias de pulmón¹⁰¹, mama¹⁰², ovario¹⁰³, vejiga¹⁰⁴, o leucemia¹⁰⁵.

Se ha relacionado el polimorfismo de la región promotora -463G/A del gen de la MPO con estas distintas enfermedades. Este polimorfismo (rs2333227) está situado en la sublocalización 463 y codifica la transcripción de la superfamilia de los receptores nucleares y regula su expresión¹⁰¹. El alelo G promueve una actividad transcripcional más alta que el alelo A¹⁰⁶.

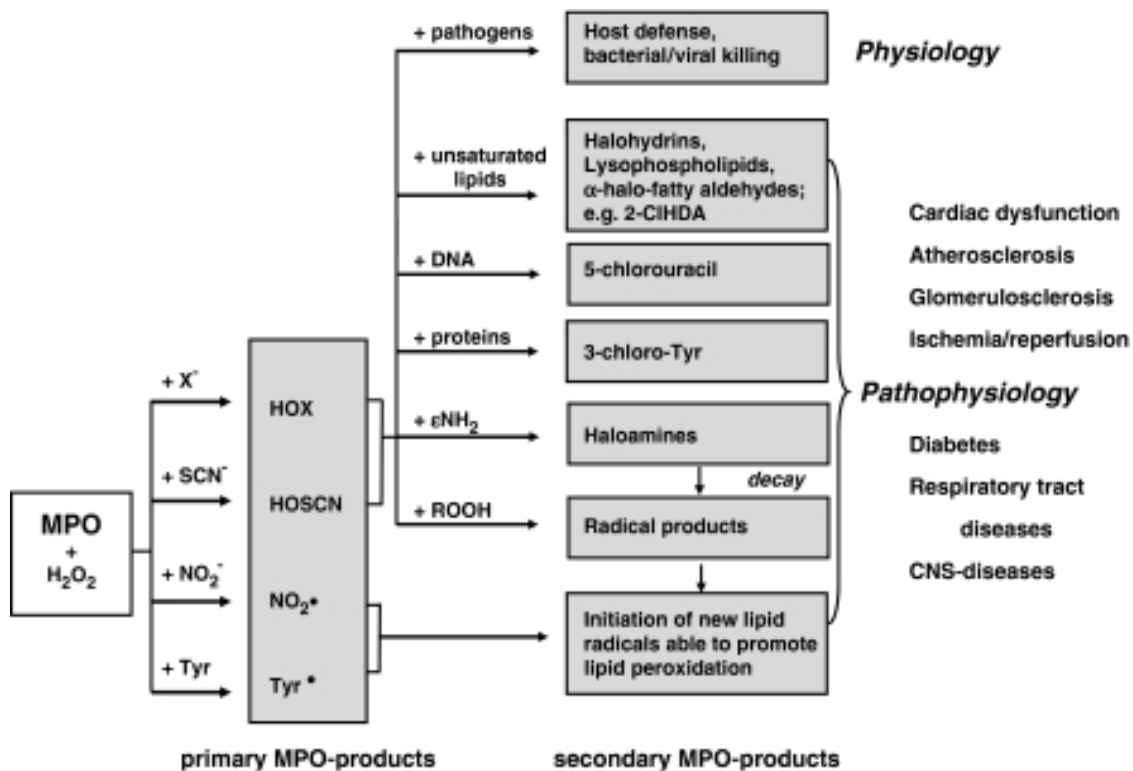


Fig 32. Consecuencias sistémicas del efecto aumentado de la MPO¹⁰⁷.

1.6.1 Cáncer de mama

Un reciente metaanálisis de estudios sobre el cáncer de mama, que incluyó 2975 casos y 3427 controles, asoció el genotipo A/A, el de menor expresión de MPO, con un riesgo menor de cáncer de mama en las mujeres pre-menopausicas¹⁰². Este resultado apoyaría la noción de microambiente oxidativo como favorecedor de la

transformación y desarrollo tumoral. Curiosamente, dos estudios han descrito una mayor supervivencia de los genotipos G/G en mujeres con cáncer de mama de estadio precoz tratadas con quimioterapia^{108,109}. El resultado sugiere que este genotipo podría provocar una mayor sensibilidad a la quimioterapia.

1.6.2 Cáncer de ovario

Castello¹⁰³ estudió la relación del polimorfismo de la MPO en 230 pacientes afectas de cáncer de ovario frente a 299 mujeres sanas control. El polimorfismo G/G se relacionó significativamente con un mayor riesgo de tumor inicial de ovario. No se relacionó ni con la afectación adenopática regional, ni con el tipo histológico tumoral. Se hipotetiza que estos resultados son debidos a que estadios más avanzados de cáncer de ovario dependen de mutaciones distintas, y son casi descritos como tumores diferentes, con un comportamiento no comparable al de los estadios precoces.

1.6.3 Cáncer de pulmón

El polimorfismo del alelo A ha sido descrito como factor protector del riesgo de cáncer de pulmón, al disminuir la activación de los componentes carcinogénicos del tabaco¹¹⁰. Estos resultados se han publicado sobre todo en la población asiática, y de manera más contradictoria en la población caucásica. Huang¹¹¹ realizó un metaanálisis donde se incluyó 25 estudios y se observó que el alelo A se asoció con un riesgo menor de cáncer de pulmón comparado al alelo G en la población en general, independientemente del grado de consumo de tabaco.

1.6.4 Cáncer de cérvix

La infección por el VPH es causa necesaria pero no suficiente para la progresión del cáncer de cérvix¹¹². La respuesta innata del sistema inmune juega el papel protector más importante frente al VPH, y en ese sentido, pese a que el H₂O₂ producido por la MPO y el ambiente inflamatorio promueve la estimulación y proliferación de las células malignas, en un paso previo los radicales libres facilitan la apoptosis de las células infectadas por el VPH. En este tipo de cáncer producido por el VPH, el genotipo G/G, que promueve una actividad transcripcional alta, podría ser contrariamente a los demás tumores un factor protector. Castelao¹¹³ comparó 110 pacientes afectas de cáncer cervical avanzado con 122 mujeres control y estudió el genotipo del MPO. El genotipo G/A se asoció significativamente a un mayor riesgo de cáncer cervical, y el genotipo G/G resultó ser un factor protector de la enfermedad. El genotipo A/A no mostró ninguna asociación significativa.

Tabla 1. Distribución de genotipos de MPO (rs2333227) en pacientes y controles y su asociación con el riesgo de cáncer cervical. Modelos genéticos: (GA) versus GG y AA; (AA) versus GA y GG; (GG) versus GA y AA¹¹³.

	Control N (%)	Pacientes N %	OR	IC 95%	P
(GA)	32 (26.2)	44	2.22	1.26-3.89	0.008
(AA)	10 (8.2)	5	0.59	0.19-1.78	0.499
(GG)	80 (65.6)	51	0.55	0.32-0.94	0.039

1.6.5 Cáncer de páncreas

Wheatley-Price¹¹⁴ et al estudiaron prospectivamente 122 pacientes afectados de adenocarcinoma de páncreas y 331 sujetos control. El genotipo G/G fue significativamente más frecuente en pacientes afectados de cáncer de páncreas que en los controles.

Tabla 2. Odds Ratios crudos y ajustados de los genotipos de MPO respecto al riesgo de desarrollo de cáncer pancreático¹¹⁴.

Variable	Crudo (122 casos y 331 controles)		Ajustado (122 casos y 202 controles)		Ajustado (122 casos y 312 controls)	
	OR [CI 95%]	P	OR [CI 95%]	P	OR [CI 95%]	P
AA vs GG	0.44 [0.2-1.1]	0.08	0.62 [0.2-1.8]	0.37	0.43 [0.2-1.1]	0.07
GA vs GG	0.60 [0.4-0.9]	0.03	0.56 [0.3-0.9]	0.02	0.59 [0.4-0.9]	0.03
A- vs GG	0.57 [0.4-0.9]	0.01	0.57 [0.4-0.9]	0.02	0.56 [0.4-0.9]	0.01

Además, los pacientes MPO G/G y homocigotos para el alelo del superóxido dismutasa (SOD)2 Ala16Val Val/Val mostraron un riesgo aditivo, de manera que podrían actuar de manera sinérgica en el microambiente tumoral.

Tabla 3. Odds Ratios crudos y ajustados del riesgo de cáncer de páncreas según la combinación de polimorfismos de MPO y SOD2¹¹⁴.

MPO	SOD2	Total N (%)		Crudo		Ajustado		Ajustado	
		Casos	Controles	OR [95 %]	P	OR [95 %]	P	OR [95%]	P
GG	Val/Val	19 (16)	26 (8)	3.17 [1.6-6.5]	0.002	4.31 [1.9-10]	0.001	3.33 [1.6-6.9]	0.001
A-	Val/Val	14 (11)	33 (10)	1.84 [0.9-3.9]	0.11	2.28 [1-5.3]	0.05	2.29 [1.1-4.9]	0.034
GG	Ala/-	60 (49)	141 (43)	1.85 [1.1-3.1]	0.02	1,89 [1.1-1.1]	0.01	1.99 [1.2-3.3]	0.009
A-	Ala/-	29 (24)	126 (39)	1 (referencia)		1 (referencia)		1 (referencia)	

Resultados similares han sido descritos en el cáncer de vejiga¹⁰⁵.

1.6.6 Cáncer aerodigestivo

En área de CECC, se han realizado pocos estudios. Cascorbi¹¹⁰ analizó 194 pacientes afectados de cáncer de pulmón, 215 afectados de cáncer de laringe, y 250 afectados de cáncer de faringe. Usó como control 270 sujetos sanos. Encontró que el alelo A disminuye el riesgo de cáncer de pulmón y de laringe, pero no el de faringe. Se podría debatir si el papel de la MPO respecto al VPH en la faringe juega también un rol protector como en el cérvix o si la MPO tienen un papel menos importante en estos tumores.

Tabla 4. Frecuencia de la mutación MPO G/A en pacientes afectados de cáncer de pulmón, laringe y faringe respecto a sus controles apareados¹¹⁰.

Genotipo MPO	Casos		Controles		Frec esperada freq genotipo %	OR	IC 95%	P
	%	IC 95%	%	IC 95%				
Cáncer de pulmón (N=196)								
GG	71.9	65.1-78.1	59.7	52.5-66.6	62.1	1		
GA	25	19.1-31.7	38.3	31.4-45.5	33.4	0.54	0.35-0.84	0.006
AA	3.1	1.1-6.5	2.0	0.6-5.1	4.5	1.25	0.34-4.52	0.5
GA+AA	28.1	21.9-34.9	40.3	33.4-47.5	37.9	0.58	0.38-0.88	0.011
Cáncer de laringe (N=245)								
GG	71.8	65.8-77.4	61.6	55.3-67.8	63.7	1		
GA	26.1	20.7-32.1	36.3	30.3-42.7	32.2	0.62	0.42-0.91	0.014
AA	2	0.7-4.7	2.0	0.7-4.7	4.1	0.86	0.24-3.02	0.81
GA+AA	28.2	22.6-34.2	38.4	32.3-44.8	36.3	0.63	0.43-0.92	0.017
Cáncer de faringe (N=255)								
GG	65.9	59.7-71.7	61.2	54.9-67.2	63.1	1		
GA	30.6	25-36.6	36.5	30.6-42.7	32.7	0.78	0.54-1.13	0.19
AA	3.5	1.6-6.6	2.4	0.9-5.1	4.2	1.39	0.49-4	0.54
GA+AA	34.1	28.3-40.3	38.9	32.8-45.1	36.9	0.82	0.57-1.17	0.27

A nivel de cavidad oral, Lai¹¹⁵ estudió 173 pacientes afectados de carcinoma escamoso de mucosa yugal y quantificó el nivel de expresión de MPO mediante inmunohistoquímica. Los pacientes con tumores que expresaron niveles elevados de MPO presentaron un riesgo 4 veces superior de segundas neoplasias (49% en mucosa yugal, 13% en lengua y 11% en labio) que los pacientes que con tumores de niveles bajos de MPO.

En nuestro conocimiento, hasta la actualidad no se ha descrito ningún estudio específico sobre la relación entre la MPO y el comportamiento del CECC.

HIPÓTESIS

2. HIPÓTESIS

La hipótesis del presente estudio es que existe una relación entre la expresión de mieloperoxidasa como marcador del infiltrado neutrofílico tumoral y el pronóstico en los pacientes con CECC .

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

El objetivo global del presente estudio determinar la existencia de una relación entre los niveles de expresión de MPO con la aparición de metástasis a distancia en los pacientes con CECC.

3.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Establecer una relación entre las variables clínicas (localización del tumor, extensión loco-regional, grado histológico, estatus VPH) y el grado de expresión transcripcional de MPO.
2. Valorar la capacidad pronóstica de la expresión transcripcional de MPO en relación a la aparición de metástasis a distancia.
3. Estudiar la correlación de la expresión transcripcional de MPO con la expresión de otros genes relacionados con las vías promotoras del proceso de diseminación.
4. Comparar los niveles de expresión inmunohistoquímica de MPO en función de la aparición de metástasis a distancia.
5. Determinar la concentración de MPO en secretoma tumoral y de MPO en suero con la aparición de metástasis a distancia
6. Estudiar el efecto del medio condicionante de los TAN sobre la capacidad de migración celular in vitro.

MATERIAL Y MÉTODOS

4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 ESTUDIO SOBRE LA EXPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL

4.1.1 Pacientes

Las biopsias utilizadas en las determinaciones de expresión transcripcional se obtuvieron de un total de 160 pacientes con un CECC confirmado histológicamente y tratado con intención radical en el Hospital de Sant Pau durante el periodo 2004-2010, y que contaron con un seguimiento mínimo de dos años. Para la totalidad de los pacientes se dispuso de una biopsia correspondiente a tejido tumoral. En 56 ocasiones se dispuso de forma adicional de una muestra de mucosa sana. La totalidad de pacientes fueron evaluados por el Comité Oncológico de Tumores de Cabeza y Cuello del Hospital de Sant Pau, que llevó a cabo una indicación terapéutica de acuerdo con los protocolos institucionales.

Los datos clínicos se obtuvieron de forma retrospectiva de la información incluida de forma prospectiva que recoge datos referentes a la epidemiología, características oncológicas, tratamiento y seguimiento de la totalidad de pacientes con un tumor maligno de cabeza y cuello diagnosticado y tratado en el Hospital de Sant Pau desde 1985¹¹⁶.

La siguiente tabla muestra la distribución de las características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio de expresión transcripcional.

Tabla 5. Características clínicas de los pacientes incluidos en nuestro estudio transcripcional.

Características	N° de pacientes (%)	
Edad	Mediana (rango) 62.5 años (38.1-86.1)	
Sexo	Hombre	144 (90%)
	Mujer	16 (10%)
Localización tumoral	Cav oral/Orofaringe	61 (38.1%)
	Laringe/Hipofaringe	99 (61.9%)
Extensión local	cT1-2	77 (48.1%)
	cT3-4	83 (51.9%)
Extensión regional	cN0	112 (70%)
	cN+	48 (30%)
Diferenciación tumoral	Alta	13 (8.1%)
	Moderada	129 (80.6%)
	Pobre	18 (11.3%)
Tratamiento	Cirugía ± radioterapia	42 (26.3%)
	(Quimio)-radioterapia	118 (73.8%)

El periodo medio de seguimiento de los pacientes fue de 4.5 años (desviación estándar de 2.7 años). Durante el periodo de seguimiento un total de 42 pacientes (26.3%) tuvieron una recidiva del tumor a nivel local, 24 (15.0%) una recidiva a nivel ganglionar, y 22 (13.7%) la aparición de metástasis a distancia.

4.1.2 Caracterización del estatus VPH para los pacientes con carcinomas de orofaringe.

Se dispuso de información relativa al estatus VPH para 37 de los pacientes con carcinomas de orofaringe incluidos en el estudio (80.4%).

La detección y genotipia del ADN del VPH fue determinada con el sistema SPF-10 PCR/DEIA/LiPA25. A las muestras positivas para el ADN del VPH también se les

realizó la inmunohistoquímica de la p16^{INK4a} según los estándares del fabricante (anticuerpo p16 BCAM 16,123 en la plataforma de autostainer y el sistema de visualización enVision Flex-linker - DAKO). Se definió un patrón difuso de más del 50% de las células tumorales con intensidad moderada o alta para definir la expresión proteica inmunopositiva p16. Se consideró la relación con el VPH cuando la muestra fue positiva para el ADN del VPH y para p16^{INK4a}. De los pacientes de los que se dispuso de una valoración del estatus VPH, fueron considerados como VPH-positivos 5 casos (13.5%).

4.1.3 Determinación de la expresión transcripcional.

Inmediatamente tras la obtención de las biopsias, una parte del tejido se estabilizó mediante inclusión en *RNA-later* (Quiagen GmbH, Hilden, Alemania) y se almacenó a -80°C hasta su procesamiento. Los tejidos fueron homogeneizados en 1 ml de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA). La extracción del ácido ribonucleico (RNA) se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Para las células en cultivo el RNA total se extrajo usando Ultraspec (BiotecxLaboratories, Inc., Houston, TX) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La transcripción inversa se realizó a partir de 1 µg de RNA con el kit *High-Capacity cDNA Archive Kit* con hexámeros aleatorios (AppliedBiosystems, Foster City, CA). La expresión de RNAm se estudió mediante PCR a tiempo real en un ABI Prism 7900HT utilizando ensayos prediseñados validados (*TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems*) y parámetros de amplificación universales. La expresión relativa de cada transcrito se expresó como el cociente de transcrito del gen / transcrito β-actina.

4.2 INMUNOHISTOQUÍMICA

Se llevó a cabo una determinación de la expresión inmunohistoquímica de MPO en una muestra de 26 pacientes con CECC en un diseño caso-control en función de la aparición de metástasis a distancia. Se consideraron como casos una cohorte de 13 pacientes que, en ausencia de una recidiva loco-regional de la enfermedad, sufrieron la aparición de una metástasis a distancia durante el periodo de seguimiento. Para cada uno de los pacientes considerados como caso se asignó un paciente control apareado en base a la localización del tumor primario, extensión loco-regional de la enfermedad, y tipo de tratamiento realizado (quirúrgico o radioterápico). La identificación de casos y controles se realizó a partir de los datos existentes en la base de datos oncológica¹¹⁶.

La siguiente tabla muestra las características de los pacientes incluidos en esta parte del estudio.

Tabla 6. Características tumorales de los pacientes incluidos en el estudio por inmunohistoquímica.

Características		Nº de pacientes (%)
Localización tumoral	Cav oral/Orofaringe	3 (23%)
	Laringe/Hipofaringe	10 (77%)
Extensión local	cT1-2	4 (30.7%)
	cT3-4	9 (69.3%)
Extensión regional	cN0	4 (30.7%)
	cN+	9 (69.3%)
Tratamiento	Cirugía ± radioterapia	10 (77%)
	(Quimio)-radioterapia	3 (23%)

Para cada uno de los pacientes se obtuvo el bloque de parafina correspondiente a la biopsia o la resección quirúrgica del archivo del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Sant Pau.

Secciones de 5- μm del bloque de tejido fueron desparafinizadas en xilol y rehidratadas usando concentraciones decrecientes de etanol (100%, 96%, 80%, 70% y 50%). Para la recuperación antigénica, las muestras se sumergieron en solución de recuperación diana, pH 9 (Dako, EE.UU.) y se esterilizaron en autoclave durante 10 minutos a 121°C. La peroxidasa tisular endógena se inactivó sumergiendo las muestras en una solución de H_2O_2 al 3% durante 10 minutos. El sistema de visualización FLEX y FLEX+ de EnVision™ se utilizó para la detección primaria de anticuerpos según los procedimientos estándar.

Para la cuantificación de la expresión de la MPO en las muestras de biopsia se utilizó el programa PannoramicViewer 1.15.4 (programa *freeware* desarrollado por 3DHistec) para la obtención de las imágenes, y el programa Image J 1.52.a (programa *freeware* obtenido en <http://imagej.nih.gov/ij>) para su cuantificación.

Debido a que el tamaño de las muestras de biopsia era heterogéneo, se procedió a la obtención de una imagen inicial que incluyese la totalidad de la superficie de la muestra, y se dividió en nueve porciones mediante la superposición de una cuadrícula, tal como aparece en la siguiente figura.

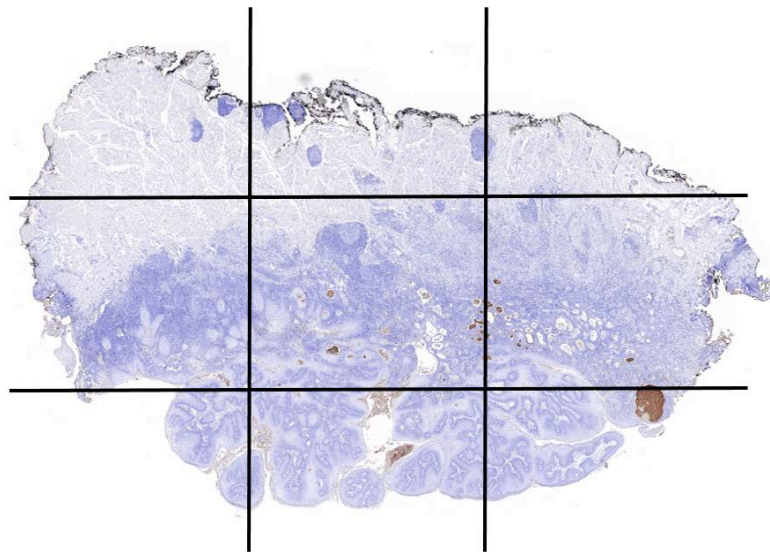


Fig 33. Ejemplo de sección de biopsia del estudio inmunohistoquímico.

Se obtuvo una imagen a un nivel de magnificación 20x para cada una de las secciones definidas por la cuadrícula dibujada sobre la muestra de biopsia, repitiendo la determinación en el cuadrante central, obteniéndose un total de 10 imágenes para cada una de las biopsias incluidas en el estudio.

Las siguientes figuras muestran ejemplos de las imágenes obtenidas con unos niveles de expresión elevados y reducidos de MPO.

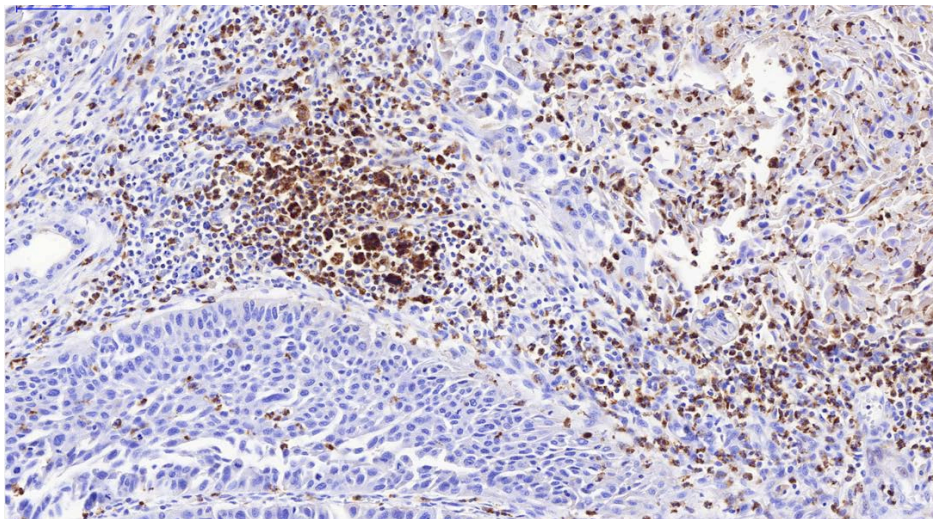


Fig 34. Ejemplo de sección de biopsia con alta expresión de MPO.

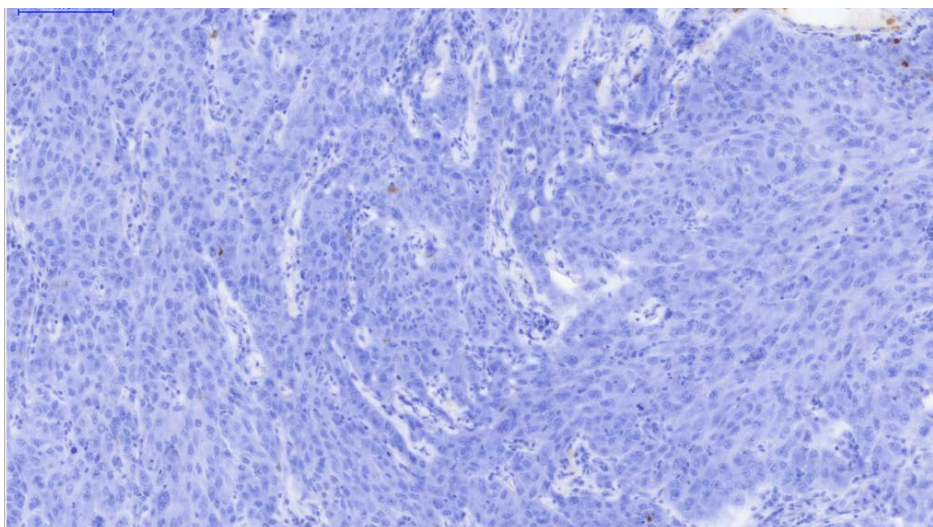


Fig 35. Ejemplo de sección de biopsia con baja expresión de MPO.

En la obtención de imágenes se evitaron áreas con ausencia de infiltrado tumoral o con presencia de necrosis.

A continuación se procedió a la cuantificación del área teñida por el anticuerpo. En primer lugar se obtuvieron las imágenes correspondientes con el programa Image J, y se procedió a aislar el área teñida con el anticuerpo. La siguiente figura muestra una imagen original y su descomposición cromática mediante el *Plugin Colour Deconvolution H&E DAB*.

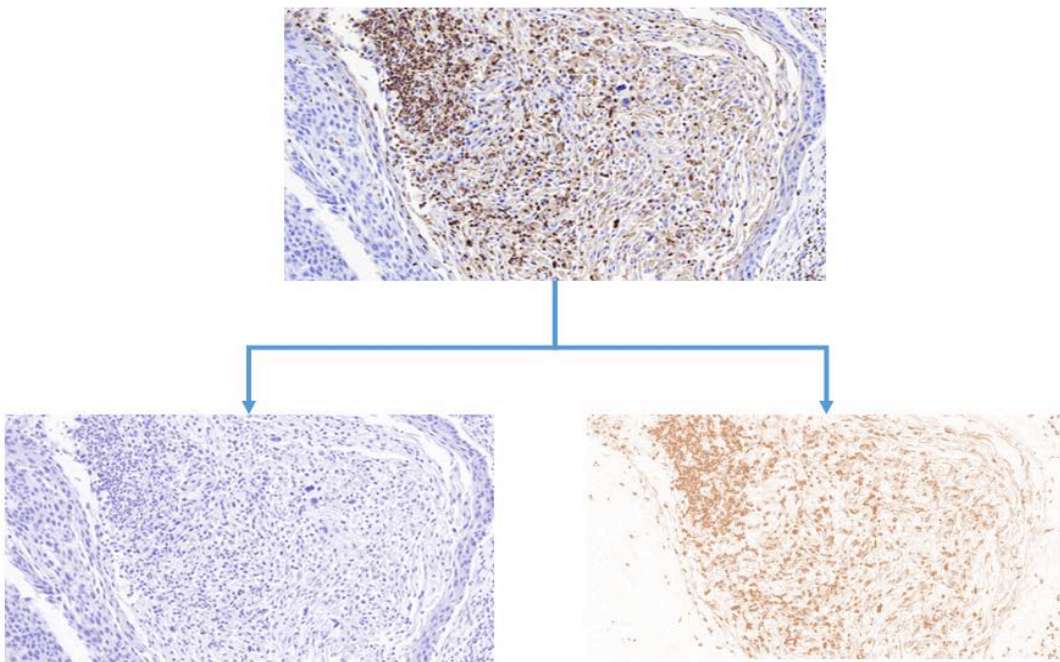


Fig 36. Ejemplo de descomposición cromática del área teñida por anticuerpo y el resto de componentes de la sección de biopsia.

Posteriormente se procedió a la transformación binaria de la imagen correspondiente a la expresión inmunohistoquímica.



Fig 37. Ejemplo de transformación binaria del área teñida por anticuerpo.

Finalmente, se calculó el porcentaje de superficie teñida en cada una de las imágenes. Se incluyeron los 10 valores correspondientes a cada una de las muestras evaluadas en una base de datos para su posterior análisis estadístico.

4.3 DETERMINACIÓN DE MPO LIBERADA POR LAS MUESTRAS TUMORALES DE CECC

Para esta parte del estudio se utilizaron biopsias de tejido tumoral de 37 de los pacientes incluidos en el estudio. Se obtuvieron fragmentos de tejido de 100-200 mg que se incubaron en 0.5 mL de DMEM (*Biological Industries*, Kibbutz Beit Haemek, Israel) sin suero durante 48 horas en la estufa de dióxido de carbono. El medio de cultivo se almacenó a -80°C hasta el análisis de MPO.

La siguiente tabla muestra las características de los pacientes incluidos en esta parte del estudio.

Tabla 7. Características tumorales de los pacientes del estudio cuantificador de MPO.

Características		Nº of pacientes (%)
Localización tumoral	Cav oral/Orofaringe	10 (27.0%)
	Laringe/hipofaringe	27 (73.0%)
Extensión local	cT1-2	15 (40.5%)
	cT3-4	22 (59.5%)
Extensión regional	cN0	23 (62.2%)
	cN+	14 (37.8%)
Tratamiento	Cirugía ± radioterapia	22 (59.5%)
	(Quimio)-radioterapia	15 (40.5%)

Los niveles de MPO se determinaron con ELISA utilizando el kit *Human Myeloperoxidase DuoSet Elisa* de R&D Systems siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.4 ESTUDIOS DEL NIVEL SÉRICO DE MPO

Se llevó a cabo un estudio del nivel sérico de MPO en función de la aparición de metástasis a distancia, utilizando muestras de una seroteca que incluye sueros de pacientes con CECC tratados en el Hospital de Sant Pau durante el periodo 1999-2010.

La sangre periférica se recogió en tubos *Serum Separator Tube*. Después de la extracción se dejó la sangre coagular durante 15-30 minutos a temperatura ambiente (18-22°C). Los tubos de sangre se centrifugaron a 1.600 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El suero, que corresponde a la parte superior del tubo centrifugado se recogió, evitando coger el gel, se alicuotó y almacenó a -80°C hasta su análisis.

Los niveles de MPO se determinaron con ELISA utilizando el kit *Human Myeloperoxidase Duoset Elisa* de R&D Systems siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se compararon los valores de séricos de MPO de 42 pacientes que sufrieron la aparición de metástasis a distancia en ausencia de recidiva loco-regional de la enfermedad con 38 pacientes apareados en función de la localización del tumor primario y de la categoría loco-regional de la enfermedad.

La siguiente tabla muestra la distribución en función de la localización y extensión local y regional de la enfermedad de los pacientes incluidos en el estudio.

Tabla 8. Características tumorales de los pacientes del estudio sérico.

		No rM	rM	P
Localización	Cav oral-orofaringe	11 (42.3%)	15 (57.7%)	0.519
	Laringe-hipofaringe	27 (50%)	27 (50%)	
Categoría T	T2	11 (45.8%)	13 (54.2%)	0.961
	T3	22 (48.9%)	23 (51.1%)	
	T4	5 (45.5%)	6 (54.5)	
Categoría N	N0	8 (57.1%)	6 (42.9%)	0.426
	N+	30 (45.5%)	36 (54.5%)	

4.5 ESTUDIOS IN VITRO

4.5.1 Purificación de PMN a partir de sangre total.

Las suspensiones de PMNs se obtuvieron de sangre periférica venosa anticoagulada con heparina obtenida de donantes voluntarios sanos.

Los tubos de sangre se centrifugaron a 950 r.p.m. durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante, y los botones celulares se repartieron en tubos de 50 ml (15 ml/tubo). A cada tubo se añadió 5 ml de dextrano al 6% y se enrasó hasta 50 ml con suero fisiológico. Los tubos se dejaron reposar durante 40 min para que sedimentasen los eritrocitos, retirándose regularmente la parte superior que se transfirió a un nuevo tubo.

La suspensión celular se centrifugó a 975 r.p.m. durante 10 min y las células se suspendieron en PBS. Los PMNs se aislaron mediante centrifugación en gradiente con Lymphoprep.

Para la realización de los experimentos se obtuvieron PMNs, se contaron y se suspendieron a la concentración de 0.5×10^6 células/ml en medio DMEM conteniendo el 1% de SBF y los agonistas:

- control
- TGF- β 5 ng/ml
- TNF- α 50 ng/ml
- LPS 10 μ g/ml

Los PMNs se incubaron en una placa de Petri a 37,8°C, 5% dióxido de carbono durante 24 horas. Tras la incubación, los cultivos se centrifugaron y los sobrenadantes se almacenaron alicuotados a -80°C hasta su utilización.

En paralelo se realizaron incubaciones de los agonistas en medio como controles negativos.

4.5.2 Líneas celulares de CECC

Para la realización de este ensayo se utilizó un panel de líneas celulares de CECC: SCC4, SCC9, SCC25, CAL27 y 74B. Las líneas utilizadas se cultivaron de acuerdo con las indicaciones del proveedor.

4.5.3 Ensayos *in vitro* de cicatrización o cierre de herida

El ensayo de la herida (*wound healing assay*) tiene como objetivo el estudio de la migración celular.

Se basa en la observación del comportamiento de una monocapa confluyente de células a las que previamente se le ha realizado una brecha o "herida". Las células del borde de la brecha se moverán hacia la abertura hasta establecer nuevos contactos célula-célula, cerrando así la "herida".

La técnica consiste en la creación de una "herida" o área libre de células en la monocapa celular, la captura de imágenes de manera periódica durante el experimento y el análisis de las imágenes.

Protocolo

- Se cultivaron las células en placas de 12 pocillos hasta que alcanzan 90% de confluencia, tras lo cual se cultivaron 24 horas en medio con el 1% de SBF.
- Transcurridas las 24 horas y sin retirar el medio se realizó la herida con una punta estéril de 200 μ L sobre la mitad del pozo en dirección vertical. Una vez realizada la herida, se eliminó el medio y las células se lavaron con PBS 1X para asegurar la eliminación de todas las células levantadas y/o muertas.
- Tras los lavados, se añadieron los medios de las distintas condiciones experimentales incubándose durante 48 horas.
- La migración de las células a través de la herida se monitorizó mediante un microscopio de contraste de fases y con una cámara digital acoplada al microscopio (*Nikon digital sight DS-U2*) se tomaron fotografías con un objetivo

4X a tiempo 0 (momento en el que se realizó la herida) y tras 8, 24, 32 y 48 horas de incubación.

- Para calcular la eficiencia del cierre de la herida en las distintas condiciones de cultivo se midió el área de la herida a los tiempos iniciales indicados en el párrafo anterior utilizando el programa imageJ.
- Dado que el ancho de la herida varía entre pocillos del mismo ensayo, los resultados se expresan como mm^2 invadidos en cada tiempo respecto al tiempo 0.

Las siguientes figuras muestran un ejemplo del ensayo de cierre de herida, con una determinación basal y la obtenida a las 48 h para una de las líneas celulares evaluadas (SCC25).

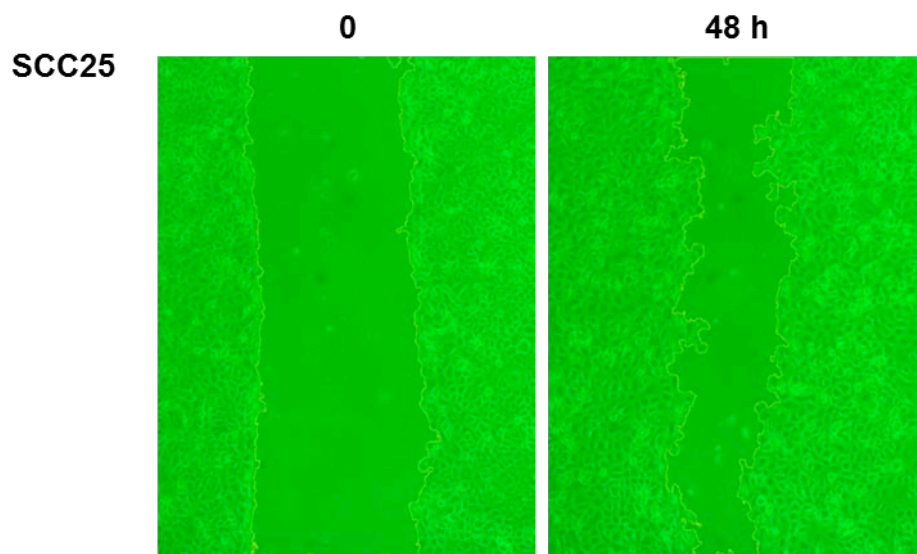


Fig 38. Ejemplo de ensayo de cierre de herida a las 0 horas y a las 48 h.

4.6 ESTUDIO ESTADÍSTICO

Para los datos numéricos con una distribución normal, la comparación entre dos categorías se llevó a cabo con el test t-Student. Cuando los datos no seguían una distribución normal, se utilizó el test no paramétrico U de Mann-Whitney (o el *Wilcoxon Rank Sum Test* en casos con medidas repetidas). En la comparación entre variables cuantitativas con más de tres categorías se llevó a cabo un análisis con el test de ANOVA.

Para determinar la asociación entre variables se utilizó el test de correlación de Pearson

Se utilizó el método de árbol de clasificación y regresión (CART) para la categorización de los valores continuos en función de una variable dependiente binaria. Mediante el análisis CART se dividieron los datos en segmentos homogéneos de acuerdo a la variable dependiente.

Los cálculos de supervivencia se llevaron a cabo usando el método actuarial de Kaplan-Meier. Las diferencias entre las tasas de supervivencia se compararon mediante el test log-rank. Los análisis multivariantes se efectuaron con el modelo de regresión de Cox.

Se consideró como significativo un valor de P menor de 0.05.

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS v. 17.0 (SPS, Chicago, IL).

4.7 CONSIDERACIONES ÉTICAS Y FINANCIACIÓN

Este estudio forma parte de un proyecto de investigación desarrollado con la ayuda de la FIS “Herramienta de predicción de respuesta a la radioterapia basada en la expresión de genes relacionados con la transición epitelial-mesenquimal en cáncer de cabeza y cuello” (PI14/01918), aprobado por el comité de ética de investigación clínica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y bajo los principios de la Declaración de Helsinki.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL DE MPO Y LA APARICIÓN DE METÁSTASIS A DISTANCIA

En primer lugar se procedió a la comparación de los niveles de expresión transcripcional de MPO para los 56 casos en los que se dispuso de muestras pareadas de tumor y de mucosa sana. No aparecieron diferencias significativas en la expresión de MPO entre el tejido tumoral y la mucosa sana (test de Wilcoxon, $P=0.383$). La siguiente figura muestra la distribución en la expresión de MPO en función del tipo de tejido evaluado.

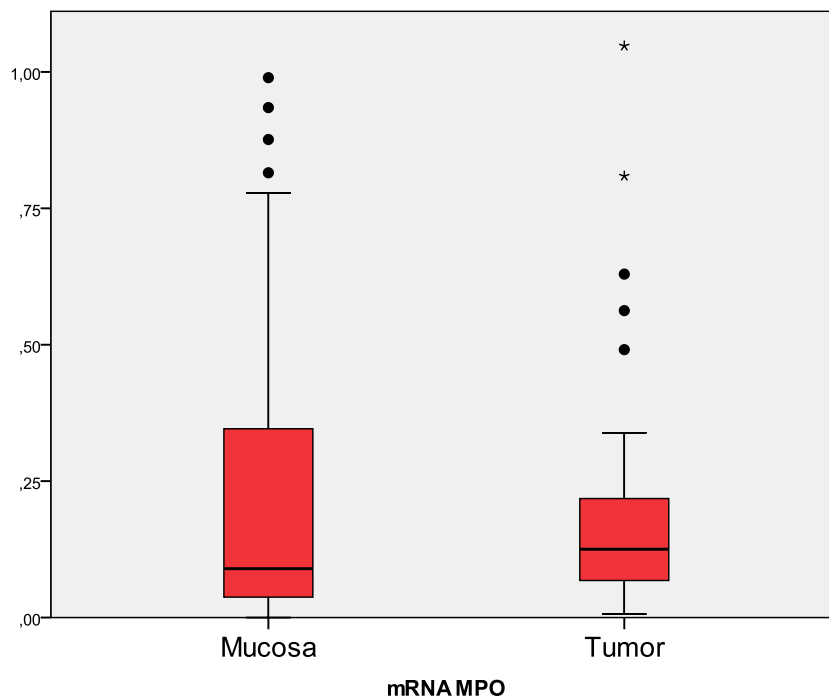


Fig 39. Box plot de la distribución en la expresión de MPO en función del tipo de tejido evaluado.

Se procedió a continuación a determinar la existencia de diferencias en los valores de expresión transcripcional de MPO en las muestras de tumor en función de las características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio: localización (cavidad

oral-orofaringe *versus* laringe-hipofaringe), categoría de extensión local (T1-2 *versus* T3-4), categoría de extensión regional (N0 *versus* N+) o grado histológico. Las siguientes figuras muestran la distribución en los valores de expresión de MPO en función de las características clínicas de los pacientes. No aparecieron diferencias significativas en los valores de expresión de MPO en función de la localización del tumor primario, la afectación ganglionar o el grado histológico ($P > 0.05$). Los tumores localmente avanzados (T3-4) contaron con unos niveles de expresión transcripcional de MPO superiores a los de los tumores iniciales (T1-2) ($P = 0.025$). Las siguientes figuras muestran la distribución en los valores de expresión de MPO en función de las características clínicas de los pacientes.

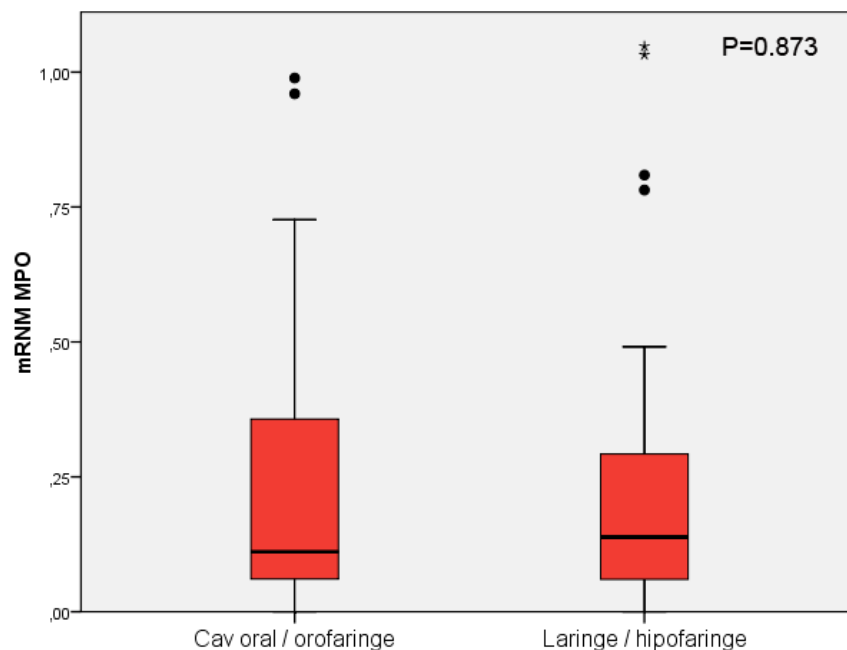


Fig 40. Box plot de la distribución en la expresión de MPO en función de la localización tumoral.

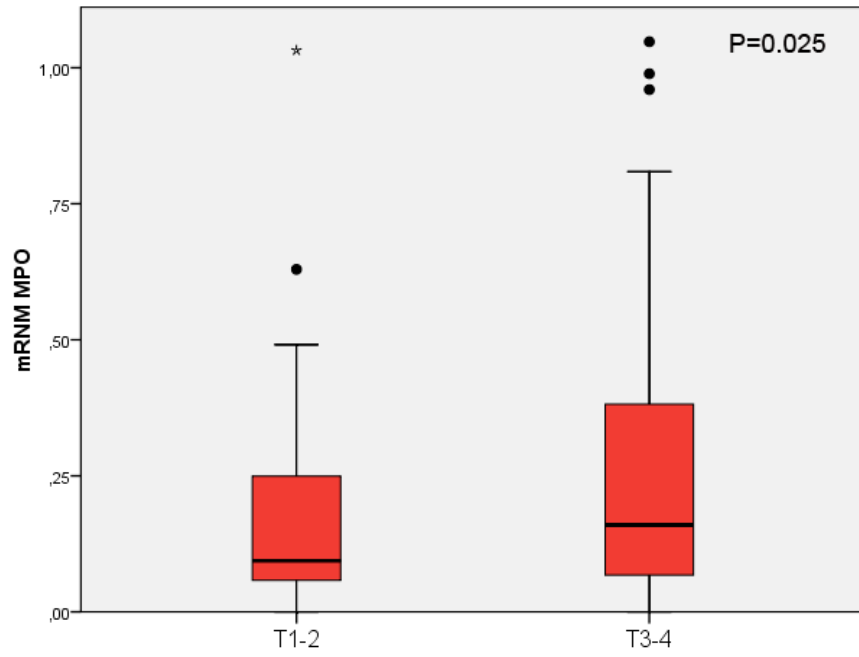


Fig 41. Box plot de la distribución en la expresión de MPO en función de la extensión local tumoral.

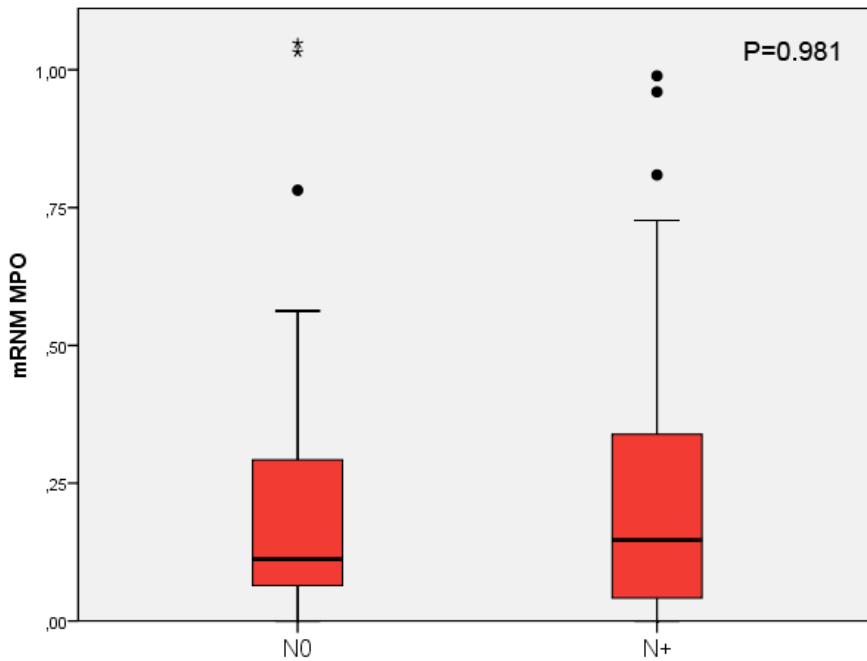


Fig 42. Box plot de la distribución en la expresión de MPO en función de la extensión regional tumoral.

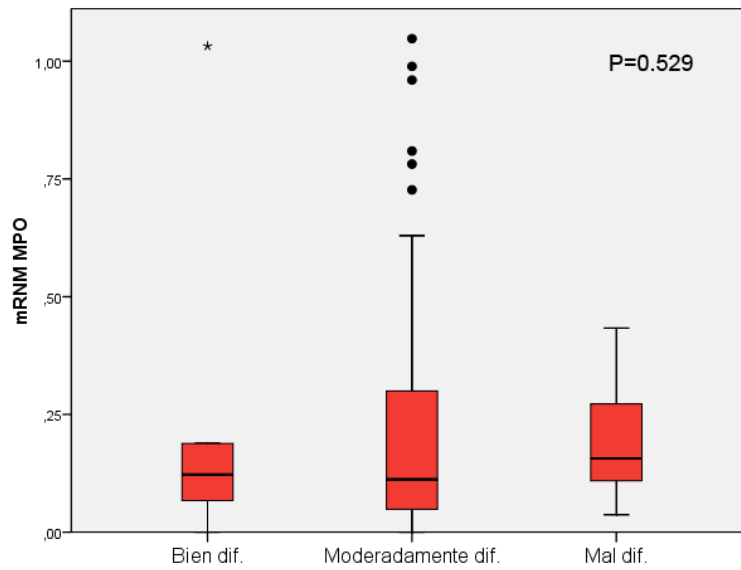


Fig 43. Box plot de la distribución en la expresión de MPO en función de la diferenciación histológica tumoral.

Se dispuso de información referente al estatus VPH de los tumores en 37 de los 46 pacientes con tumores localizados a nivel de la orofaringe. Sólo 5 de los tumores incluidos en el estudio (10.9%) fueron VPH-positivos (4 VPH-16 y 1 VPH-51). No aparecieron diferencias significativas en la distribución de los valores de expresión de MPO en función del estatus VPH (P=0.398).

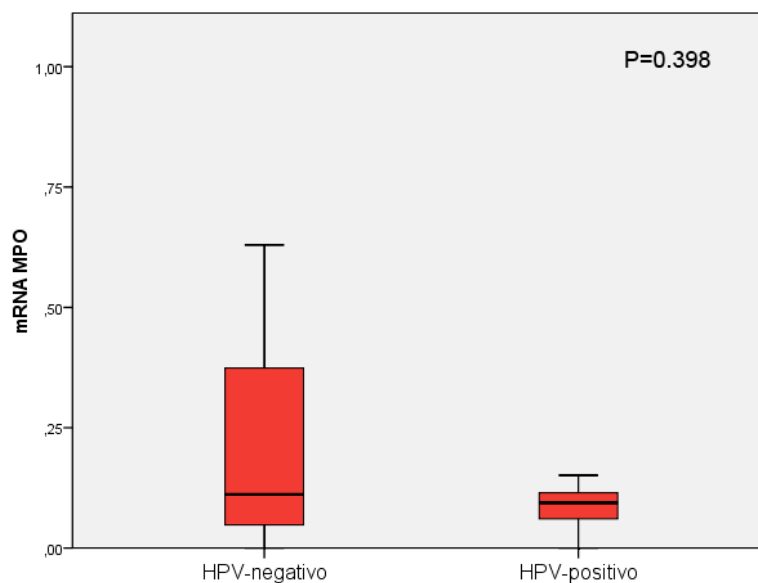


Fig 44. Box plot de la distribución en la expresión de MPO en función del estatus VPH.

Se analizó el nivel de expresión transcripcional de MPO en función de la aparición de metástasis a distancia. Los tumores de los pacientes que sufrieron la aparición de metástasis a distancia durante el periodo de seguimiento (n=22) contaron con unos niveles de expresión transcripcional de MPO significativamente superiores a los de los que no tuvieron metástasis (n=138) (P=0.001).

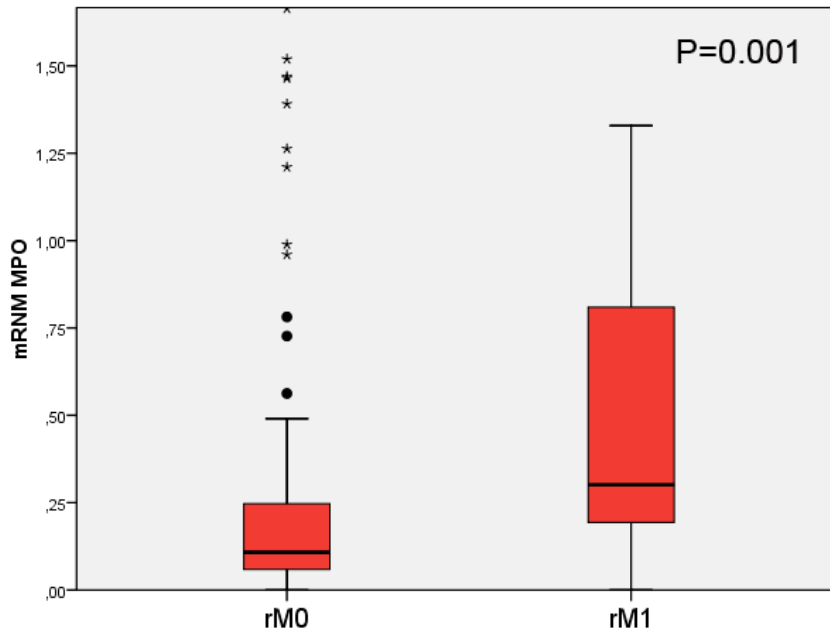


Fig 45. Box plot de la distribución en la expresión de MPO en función de la aparición de metástasis a distancia.

Considerando la aparición de metástasis a distancia como la variable dependiente, se clasificó a los pacientes mediante un análisis de partición recursiva en función del riesgo de aparición de metástasis a distancia.

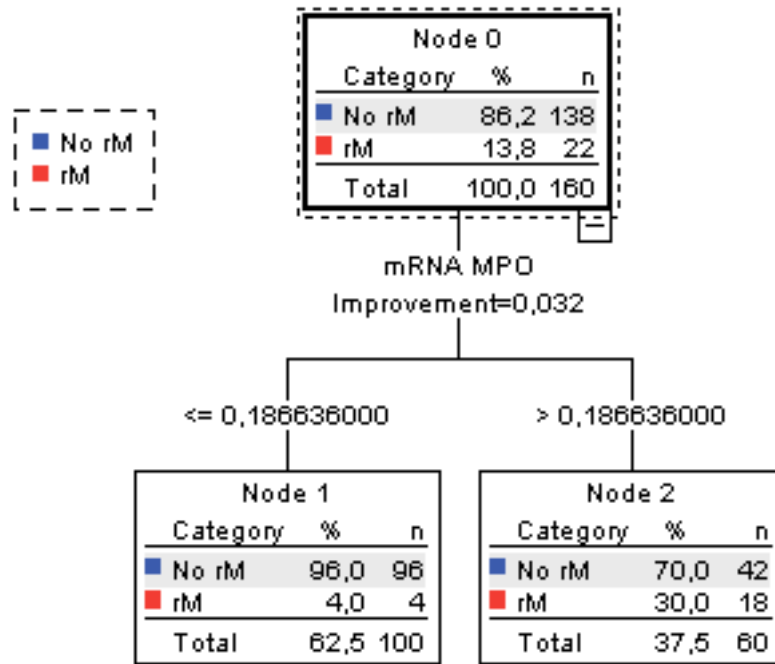


Fig 45. Análisis de partición recursiva en función del riesgo de aparición de metástasis a distancia.

Se obtuvieron dos categorías de pacientes: un grupo con unos valores de expresión transcripcional bajos (n=100, 62.5%) para los cuales la frecuencia de aparición de metástasis a distancia fue del 4%), y un grupo con unos niveles de expresión elevados (n=60, 37.5%) en los cuales la frecuencia de aparición de metástasis a distancia ascendió al 30%.

La siguiente figura muestra las curvas de supervivencia libre de metástasis a distancia a partir de la clasificación obtenida con el análisis de partición recursiva.

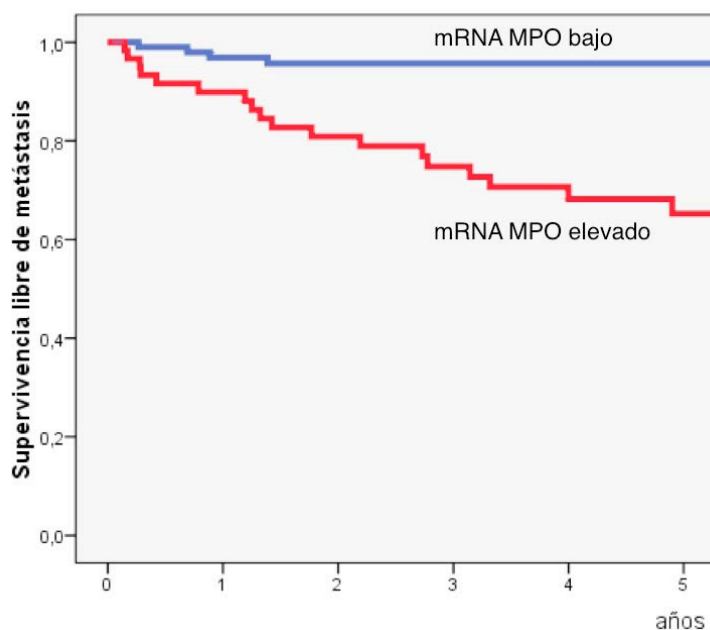


Fig 46. Supervivencia libre de metástasis a distancia en función de la expresión transcripcional de MPO.

Existieron diferencias significativas en la supervivencia libre de metástasis a distancia en función de la categoría de expresión de la MPO ($P > 0.0001$). La supervivencia libre de metástasis a los 5 años para los pacientes con unos niveles de expresión bajos de MPO fue del 95.7% (IC 95%: 91,6-99,8%), en tanto que para los pacientes con unos niveles de expresión elevados fue del 65.2% (IC 95%: 51,9-78,5%).

Se realizó un análisis multivariante considerando la aparición de metástasis a distancia como la variable dependiente y la localización del tumor primario, la categoría de extensión local y regional de la enfermedad, el grado histológico, el tipo de tratamiento realizado, y la categoría de expresión transcripcional de la MPO como las variables independientes.

Tabla 9. Análisis multivariante del riesgo de metástasis a distancia en función de diferentes características tumorales.

		HR	CI 95% HR	P
Localización	Cav oral/Orofaringe	1		0.774
	Laringe/Hipofaringe	0.87	0.34-2.18	
Extension local	cT1-2	1		0.782
	cT3-4	0.87	0.33-2.26	
Extension regional	cN0	1		0.315
	cN+	1.65	0.62-4.40	
Diferenciación tumoral	Alta	1		0.43
	Moderada	1.40	0.18-10.93	
	Pobre	2.00	0.19-20.31	
Tratamiento	Cirugía ± radioterapia	1		0.425
	(Quimio)-radioterapia	0.67	0.25-1.76	
MPO	Baja	1		0.0001
	Elevada	7.70	2.55-23.24	

La única variable que se relacionó de forma significativa con la aparición de metástasis a distancia fue la categoría de expresión de la MPO. Considerando como categoría de referencia a los pacientes con una expresión baja de MPO, los pacientes con una expresión elevada contaron con un riesgo 7.70 veces superior de presentar metástasis a distancia (IC95% HR: 2.55-23.24).

Dada la relación clínica existente entre la afectación regional y la aparición de metástasis a distancia, se procedió a analizar la relación entre la categoría de expresión de la MPO y el riesgo de aparición de metástasis en función del estatus de afectación regional en el momento del diagnóstico. Pudo comprobarse como la relación entre la expresión transcripcional de la MPO y el riesgo de aparición de metástasis a distancia se mantuvo tanto para los pacientes considerados inicialmente como cN0 ($P < 0.0001$), como para los pacientes cN+ ($P = 0.018$). Las

siguientes figuras muestran las curvas de supervivencia de libre de metástasis a distancia en función del estatus regional.

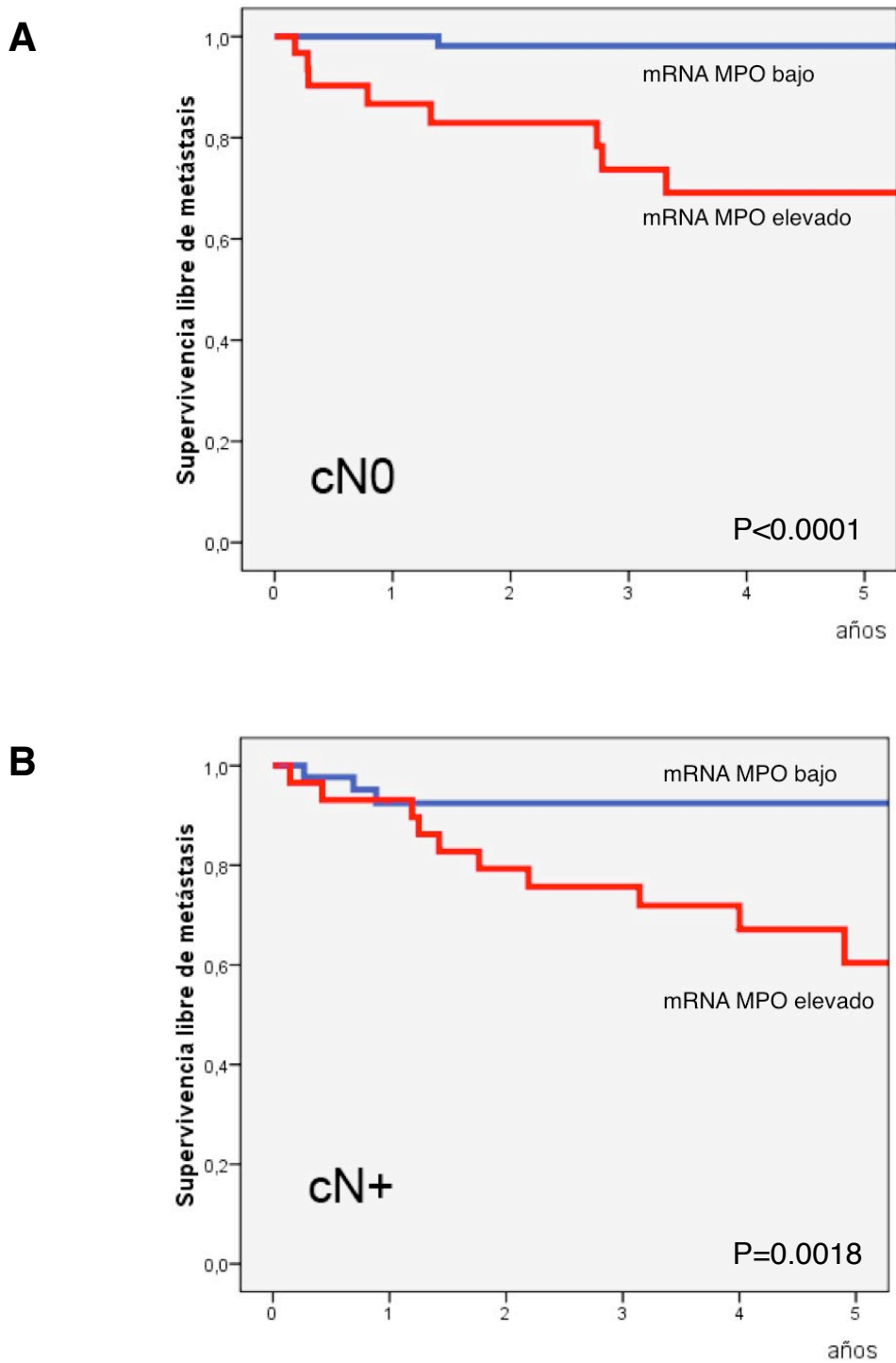


Fig 47. Curvas de supervivencia libre de metástasis a distancia en función de la expresión transcripcional de MPO en pacientes cN0 (A), y cN+ (B)

Además, se pudo comprobar como la capacidad pronóstica de la expresión de la MPO se mantuvo de forma independiente a la categoría de extensión local de la enfermedad. Tanto para los pacientes con tumores iniciales cT1-2 (n=77) como para los pacientes con tumores avanzados cT3-4 (n=83), la expresión elevada de MPO se relacionó con un incremento significativo en la incidencia de aparición de metástasis a distancia (P=0.017 y P<0.0001, respectivamente).

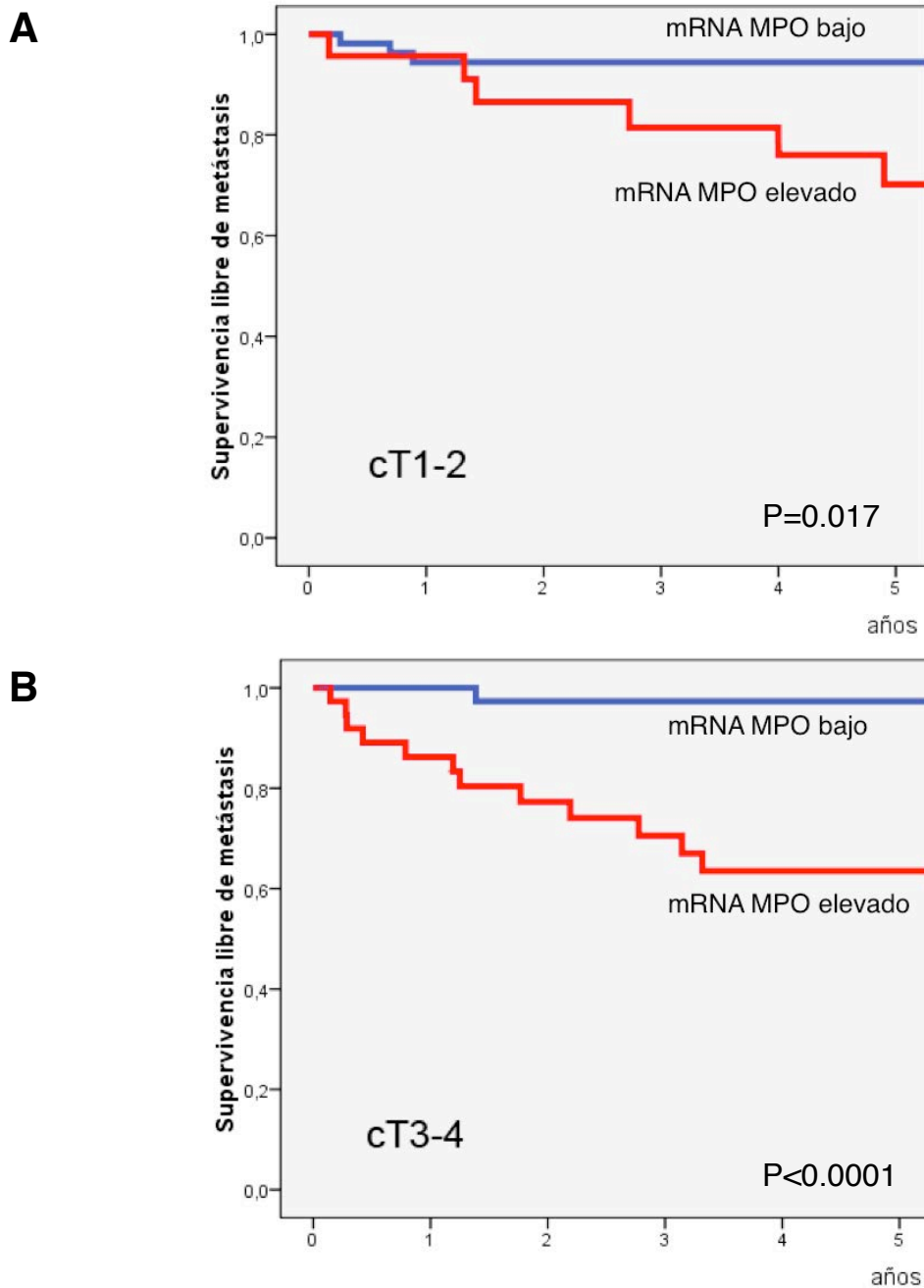


Fig 47. Curvas de supervivencia libre de metástasis a distancia en función de la expresión transcripcional de MPO en pacientes cT1-2 (A), y cT3-T4 (B)

Igualmente, la capacidad pronóstica de la expresión de MPO apareció de forma independiente a la localización del tumor primario. Tanto para los pacientes con tumores localizados en cavidad oral-orofaringe (n=61) como para los de laringe – hipofaringe (n=99) la expresión elevada de MPO se relacionó con un incremento en el riesgo de aparición de metástasis a distancia (P=0.013 y P>0.0001, respectivamente).

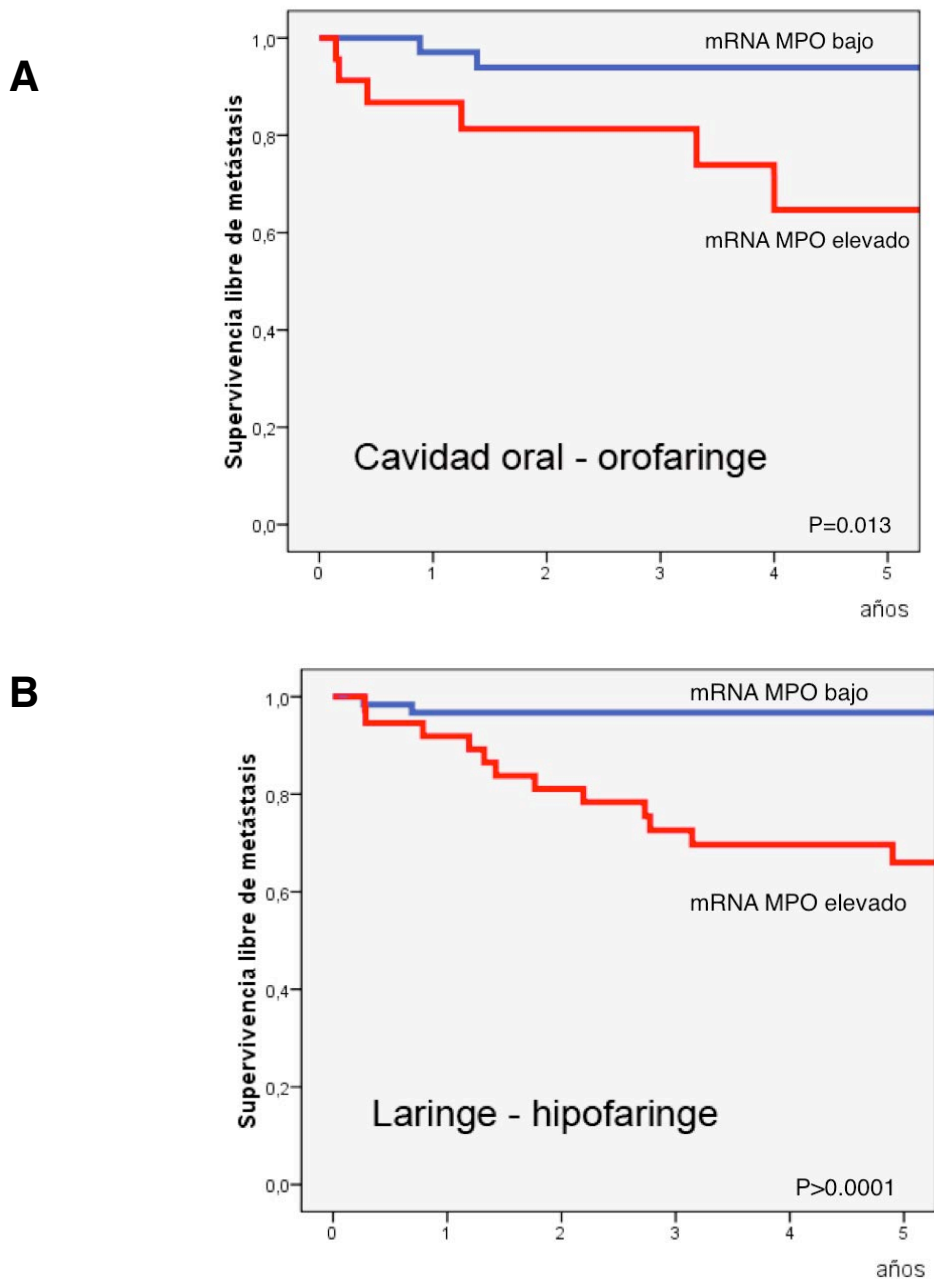


Fig 48. Curvas de supervivencia libre de metástasis a distancia en función de la expresión transcripcional de MPO en pacientes con tumores de cav oral-orofaringe (A) y tumores de laringe-hipofaringe (B)

Se mantuvo la capacidad pronóstica de la expresión de la MPO independientemente del tipo de tratamiento realizado. Las siguientes figuras muestran la supervivencia libre de metástasis a distancia para los pacientes tratados de forma quirúrgica (cirugía ± radioterapia, n=42) (P=0.005) o con radioterapia (radioterapia ± quimioterapia, n=118) (P<0.0001).

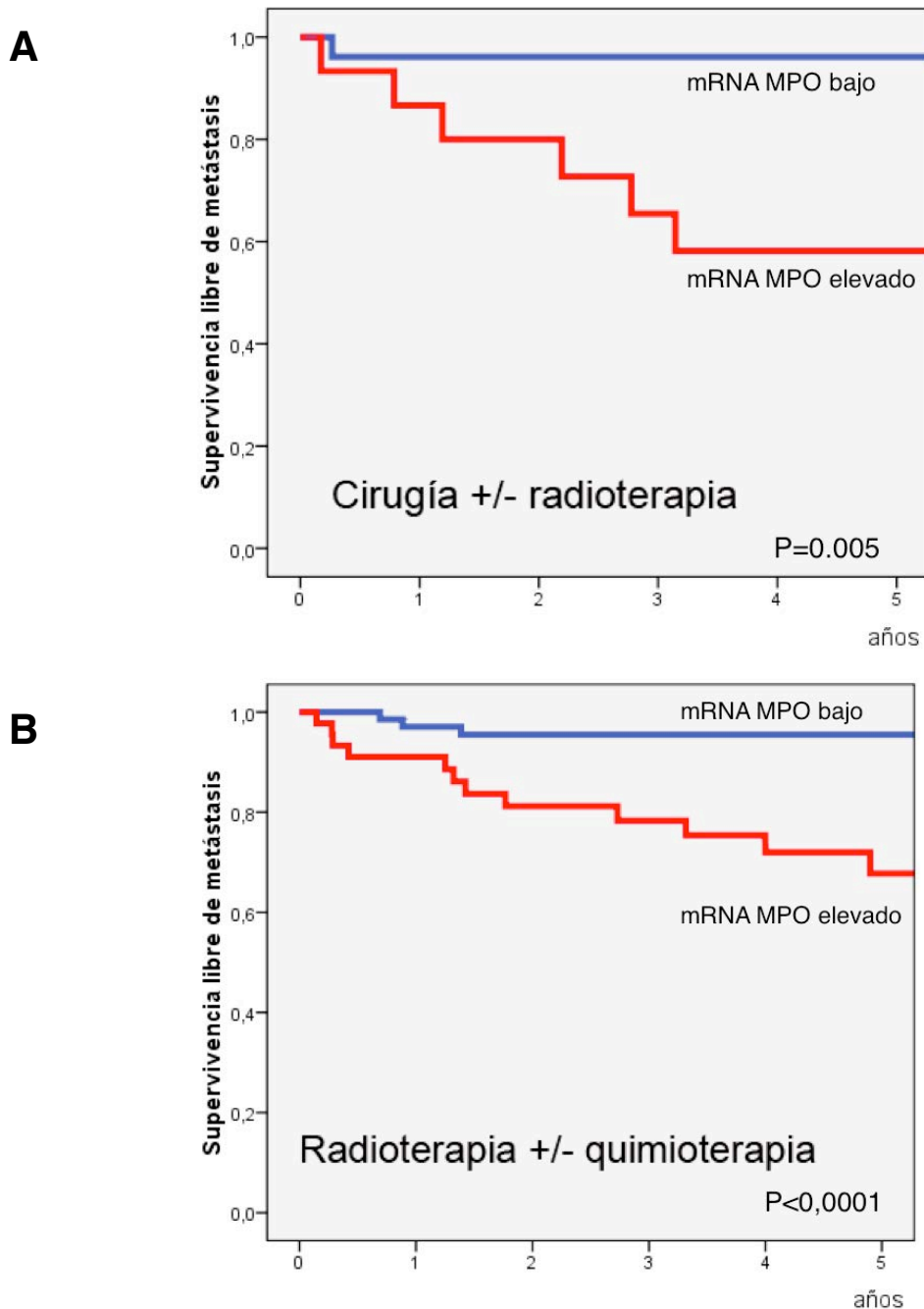


Fig 49. Curvas de supervivencia libre de metástasis a distancia en función de la expresión transcripcional de MPO en pacientes con tratamiento quirúrgico (A) y tratamiento conservador (B)

Otro de los factores que se ha asociado con la aparición de metástasis a distancia es el control loco-regional de la enfermedad. Al considerar de forma exclusiva los 105 pacientes en los cuales el tratamiento inicial consiguió un control loco-regional adecuado de la enfermedad, pudimos comprobar cómo la categoría de expresión de la MPO mantuvo su capacidad pronóstica en relación al riesgo de aparición de metástasis a distancia ($P=0.011$).

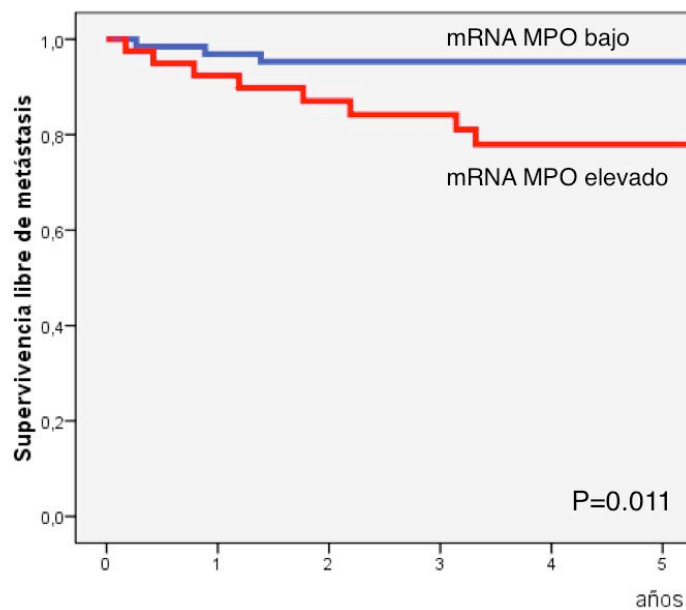


Fig 50. Curvas de supervivencia libre de metástasis a distancia en función de la expresión transcripcional de MPO en pacientes con control loco-regional post-tratamiento.

Igualmente, para los pacientes con una recidiva local y/o regional de la enfermedad ($n=55$), la expresión elevada de MPO se relacionó con una mayor frecuencia de aparición de metástasis a distancia ($P<0.0001$).

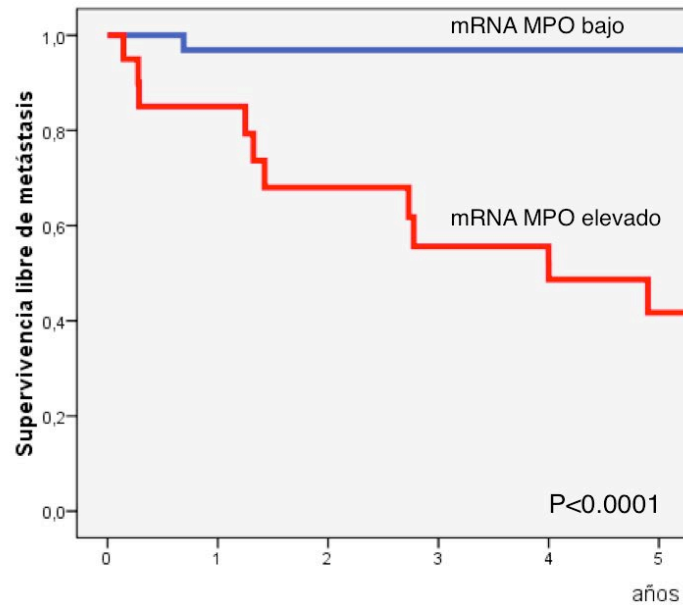


Fig 51. Curvas de supervivencia libre de metástasis a distancia en función de la expresión transcripcional de MPO en pacientes con recidiva loco-regional post-tratamiento.

Se definió un grupo de pacientes con alto riesgo de metástasis a distancia en base a variables clínicas y patológicas, incluyendo pacientes con tumores localmente avanzados (cT3-T4), con diseminación regional avanzada (cN2-N3), o con metástasis ganglionares cervicales con diseminación extracapsular. La supervivencia libre de metástasis a distancia a los 5 años para los pacientes con cualquiera de estos criterios de alto riesgo (n = 108) fue del 77,6% (IC del 95%: 68.2 a 87.0%), significativamente inferior a la supervivencia libre de metástasis para los pacientes sin ninguno de los criterios (n = 52), que fue del 93,8% (IC del 95%: 87.0 a 100%) (P = 0,024).

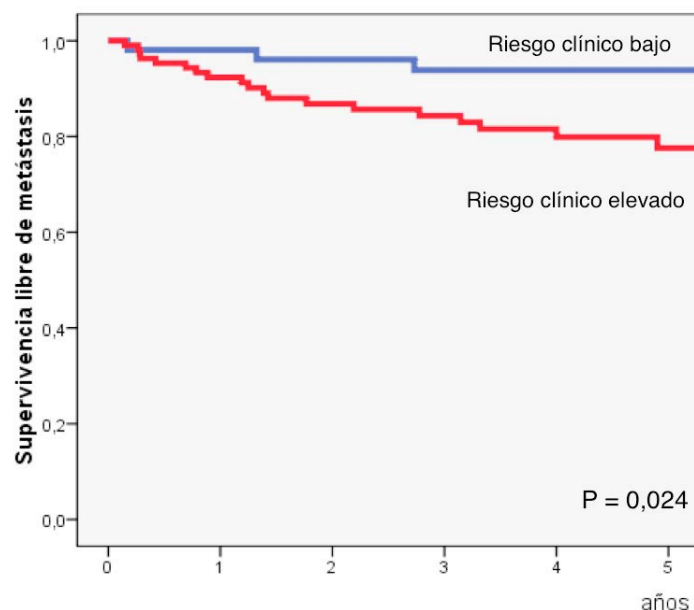


Fig 52. Curvas de supervivencia libre de metástasis a distancia en función del riesgo clínico-patológico.

Cuando sólo se analizaron los pacientes incluidos en el grupo de alto riesgo clínico y patológico, se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de aparición de metástasis a distancia según la expresión de MPO. La supervivencia libre de metástasis a distancia a los 5 años para los pacientes con alto riesgo clínico-patológico de metástasis y baja expresión de MPO (n = 66) fue del 93,3% (IC 95%: 86.9-99.7%), y para los pacientes con alto riesgo clínico-patológico de metástasis y alta expresión de MPO (n = 42) fue del 57,4% (IC 95%: 40.2-74.6%) (P = 0.0001). La siguiente figura muestra la supervivencia libre de metástasis a distancia a los 5 años según el riesgo clínico y patológico de metástasis y la categoría de expresión de la MPO en el grupo de pacientes de alto riesgo clínico y patológico.

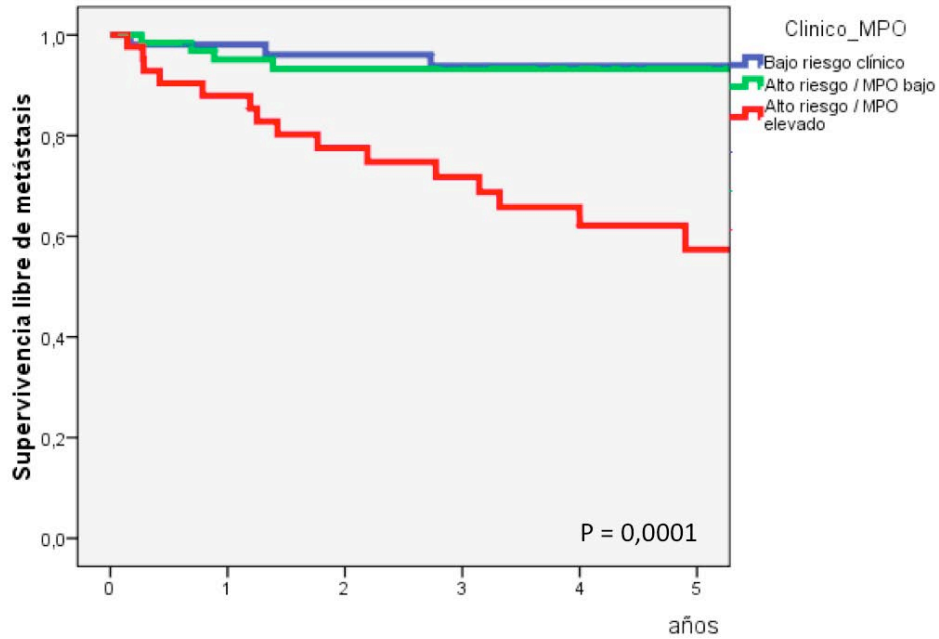
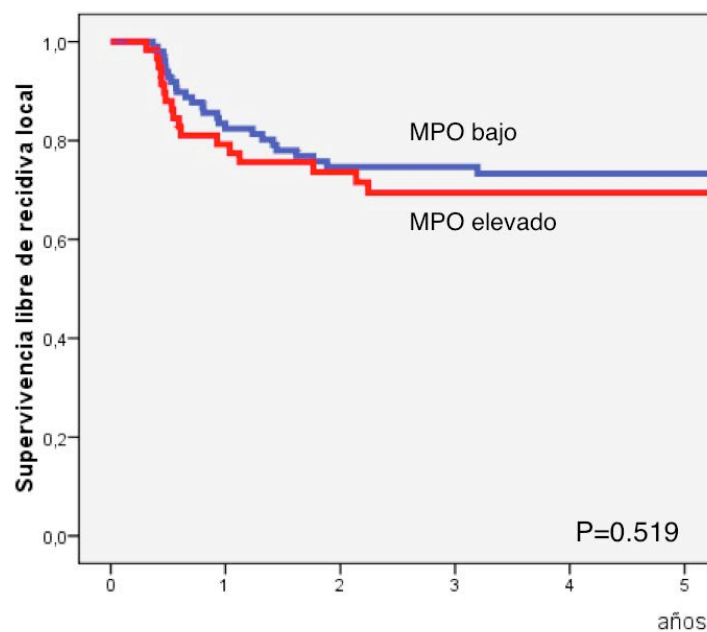


Fig 53. Curvas de supervivencia libre de metástasis a distancia en función del riesgo clínico-patológico asociado a la expresión transicional de MPO.

Al aplicar las categorías de clasificación de la expresión de MPO obtenidas al considerar la aparición de metástasis a distancia al control local y regional de la enfermedad, no aparecieron diferencias en la supervivencia libre de recidiva local o regional, tal como muestran las siguientes curvas de supervivencia (P=0.519 y P=0.221, respectivamente).

A



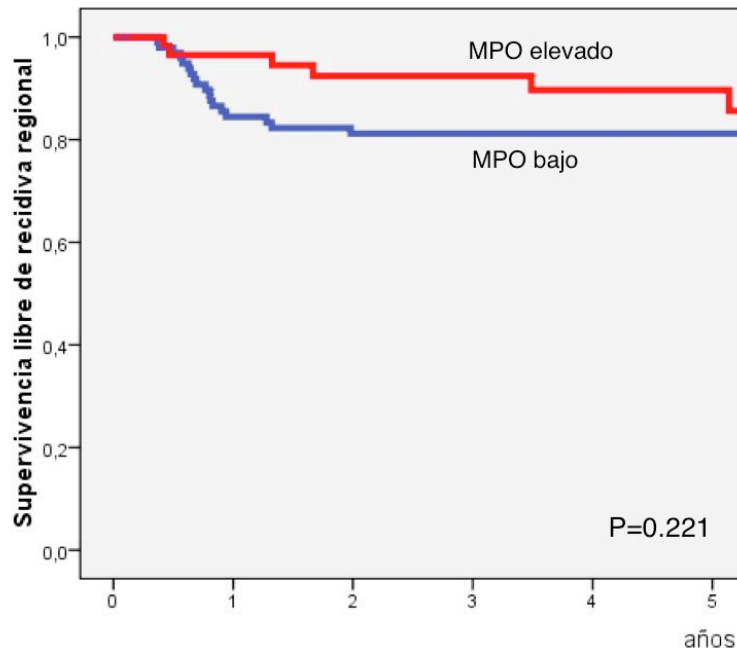
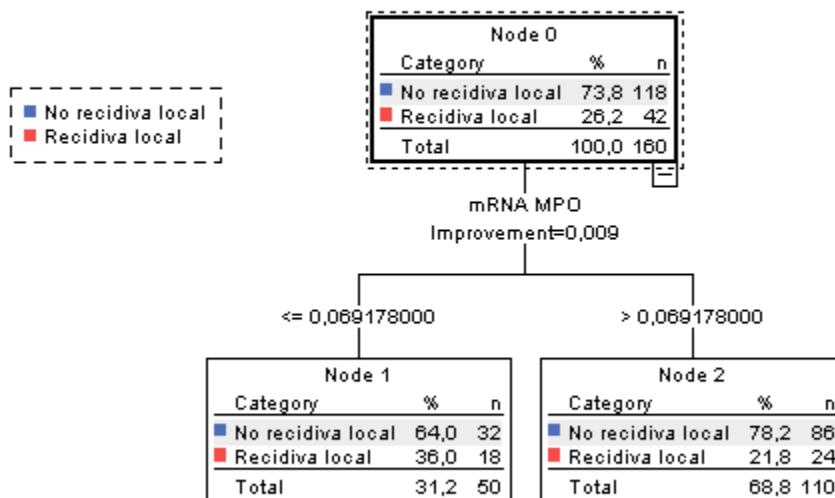
B

Fig 54. Curvas de supervivencia libre de recidiva local (A) y regional (B) en función de la expresión transcripcional de MPO categorizada en función de la aparición de metástasis a distancia.

Al realizar un análisis de partición recursiva considerando como variable dependiente la existencia de una recidiva local o regional de la enfermedad, se obtuvieron unos modelos de acuerdo con los cuales los pacientes con unos niveles de expresión más elevados de MPO contaron con un menor riesgo de recidiva local o regional.

A

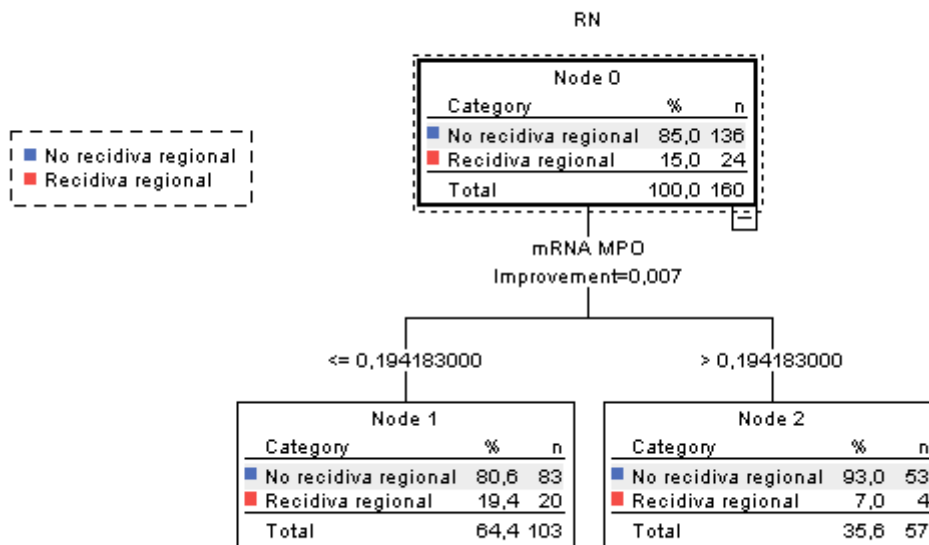
B

Fig 55. Efecto de la MPO en la recidiva local (A) o regional (B) según modelo de partición recursiva.

De acuerdo con la clasificación de los pacientes obtenida al considerar el control local como la variable dependiente, los pacientes con unos niveles elevados de MPO contaron con una tendencia a mostrar una menor incidencia de recidivas del tumor a nivel local, si bien la diferencia entre las curvas de supervivencia no alcanzó la significación estadística ($P=0.078$).

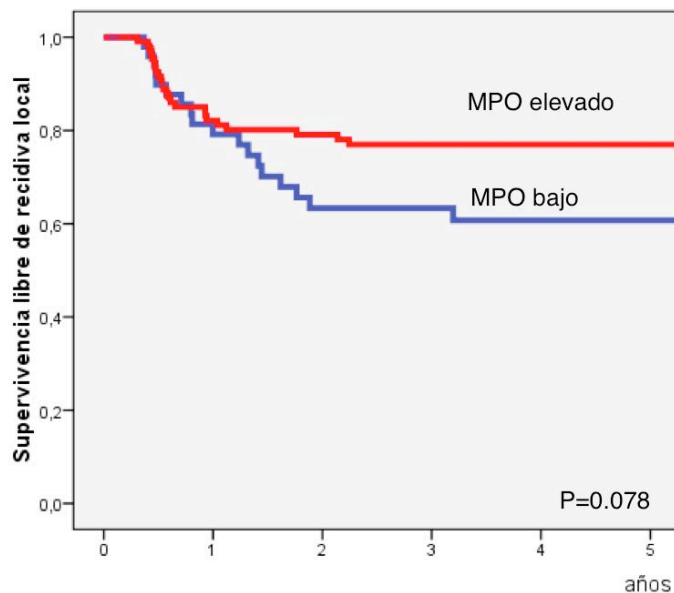


Fig 56. Curva de supervivencia libre de recidiva local en función de la expresión transcripcional de MPO categorizada en función del control local.

Igualmente, al considerar la supervivencia libre de recidiva regional clasificando a los pacientes en función de la expresión de MPO obtenida al considerar como variable dependiente el control regional de la enfermedad, los pacientes con unos niveles de expresión elevados de MPO contaron con un menor riesgo de aparición de recidivas de la enfermedad a nivel ganglionar ($P=0.047$).

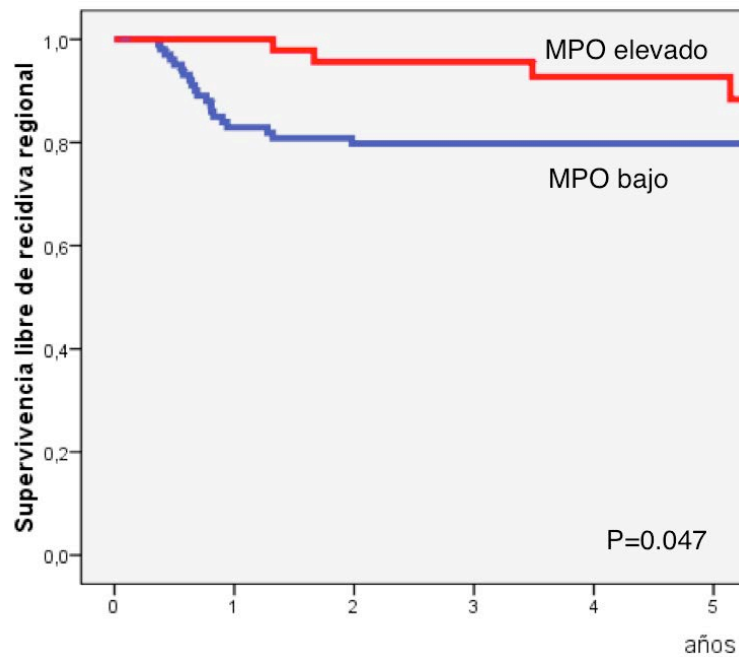


Fig 57. Curva de supervivencia libre de recidiva regional en función de la expresión transcripcional de MPO categorizada en función del control regional.

Utilizando la clasificación de la expresión de MPO obtenida al considerar como variable dependiente la aparición de metástasis a distancia, no aparecieron diferencias significativas en la supervivencia específica en función del grado de expresión de MPO ($P=0.227$), si bien el grupo de pacientes con unos niveles de expresión bajos contaron con una cierta ventaja pronóstica.

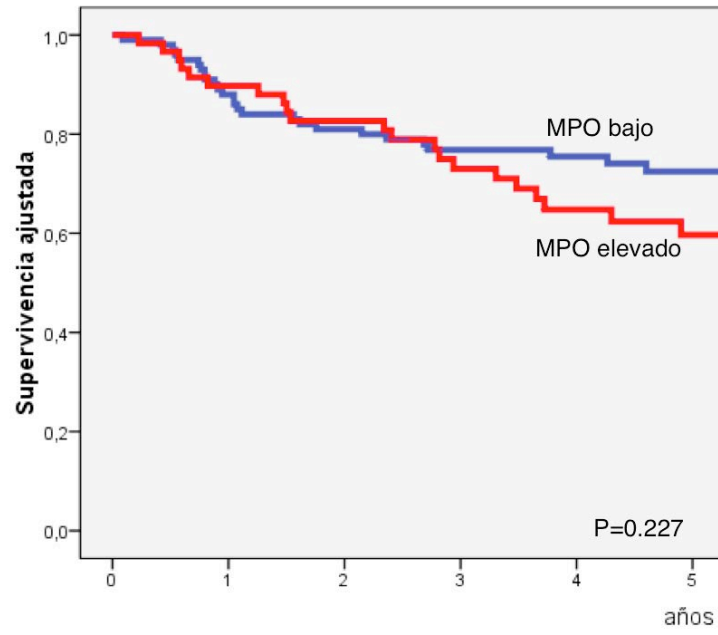


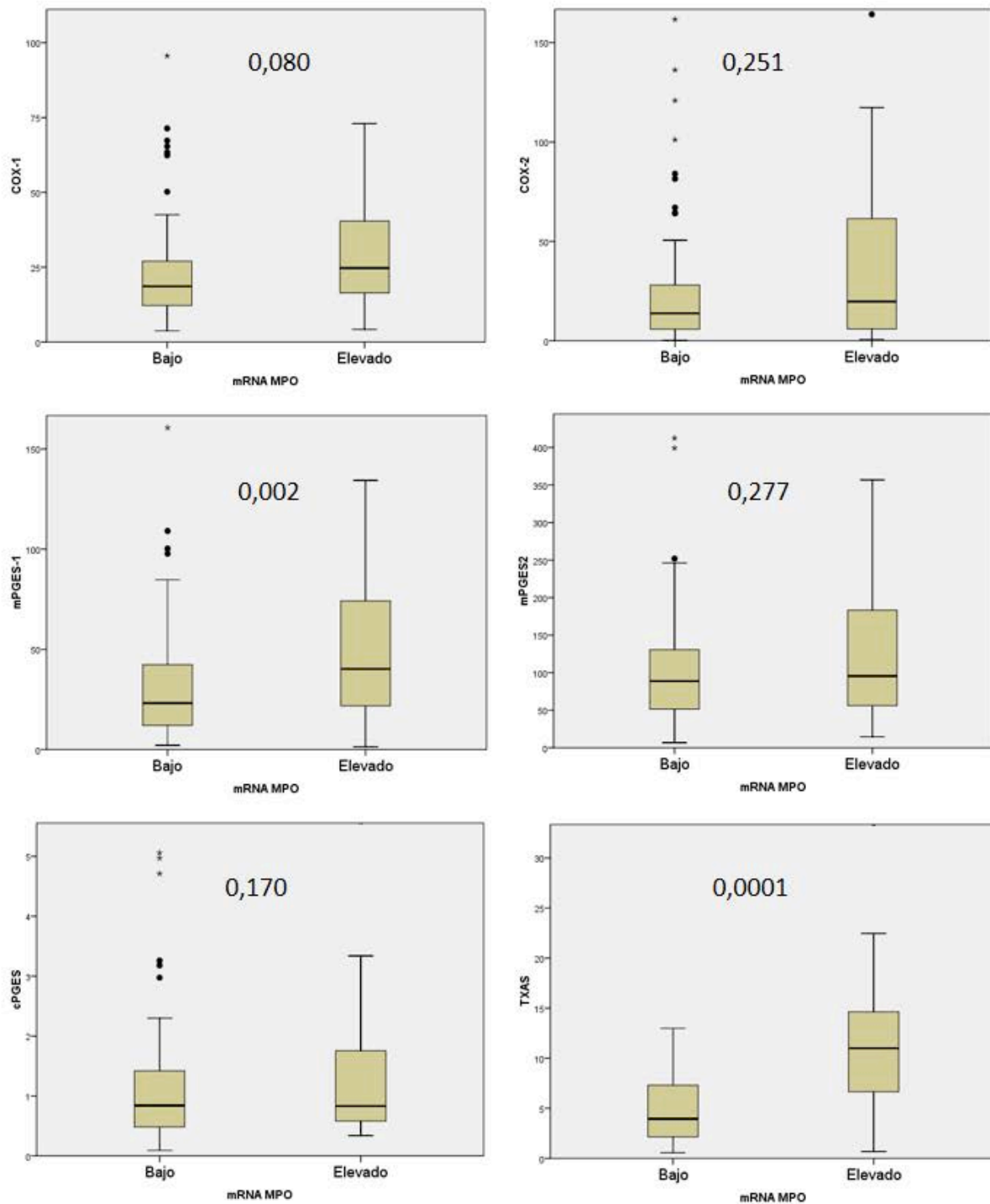
Fig 58. Curva de supervivencia específica en función de la expresión transcripcional de MPO.

5.2 CORRELACIONES CON LA EXPRESIÓN DE OTROS GENES

Con el objetivo de evaluar los mecanismos por los cuales la expresión transcripcional de MPO se relacionó con el incremento en el riesgo de aparición de metástasis a distancia, se llevó a cabo un análisis de la expresión transcripcional de genes relacionados con diferentes vías carcinogénicas. Se evaluaron genes relacionados con: 1.- el metabolismo de las prostaglandinas como las ciclooxigenasas (COX-1, COX-2), las sintetasas específicas de la PGE₂ (mPGES1, mPGES2, cPGES), y las sintetasas de tromboxano (TXA) y prostaciclina (PGIS), así como los receptores de las prostaglandinas (EP); 2.- la interleuquina-1 (IL1- α , IL1- β , el antagonista del receptor ILRA) y sus receptores (IL1-R1, IL1-R2 y IL1RaCP); 3.- citoquinas, (GRO, IL8, GCP-2, RANTES, MPC1, SDF1), receptores de citoquinas (CXCR4 y CXCR7) y glicoproteínas de membrana (CD45) relacionados con la actividad de los leucocitos; 4.- transforming growth factor- β (TGF- β), metaloproteínas (MMP-1, MMP-2, MMP-3 y MMP-9) y sus inhibidores (TIMP-1); 5.- factores de hipoxia (HIF-1 α , VEGF), factores de transcripción nuclear (p65 NF κ -B), reguladores de apoptosis (Bcl1), de expresión endotelial (von Willebrand Factor), o con capacidad como caperona (Heat Shock Protein-90); 6.- genes relacionados con el estrés oxidativo (Superóxido Dismustasas SOD1, SOD 2 y SOD3).

Las siguientes figuras muestran la distribución en los valores de expresión correspondientes a los genes analizados en función de la categoría de expresión de la MPO.

5.2.1 Metabolismo de las prostaglandinas



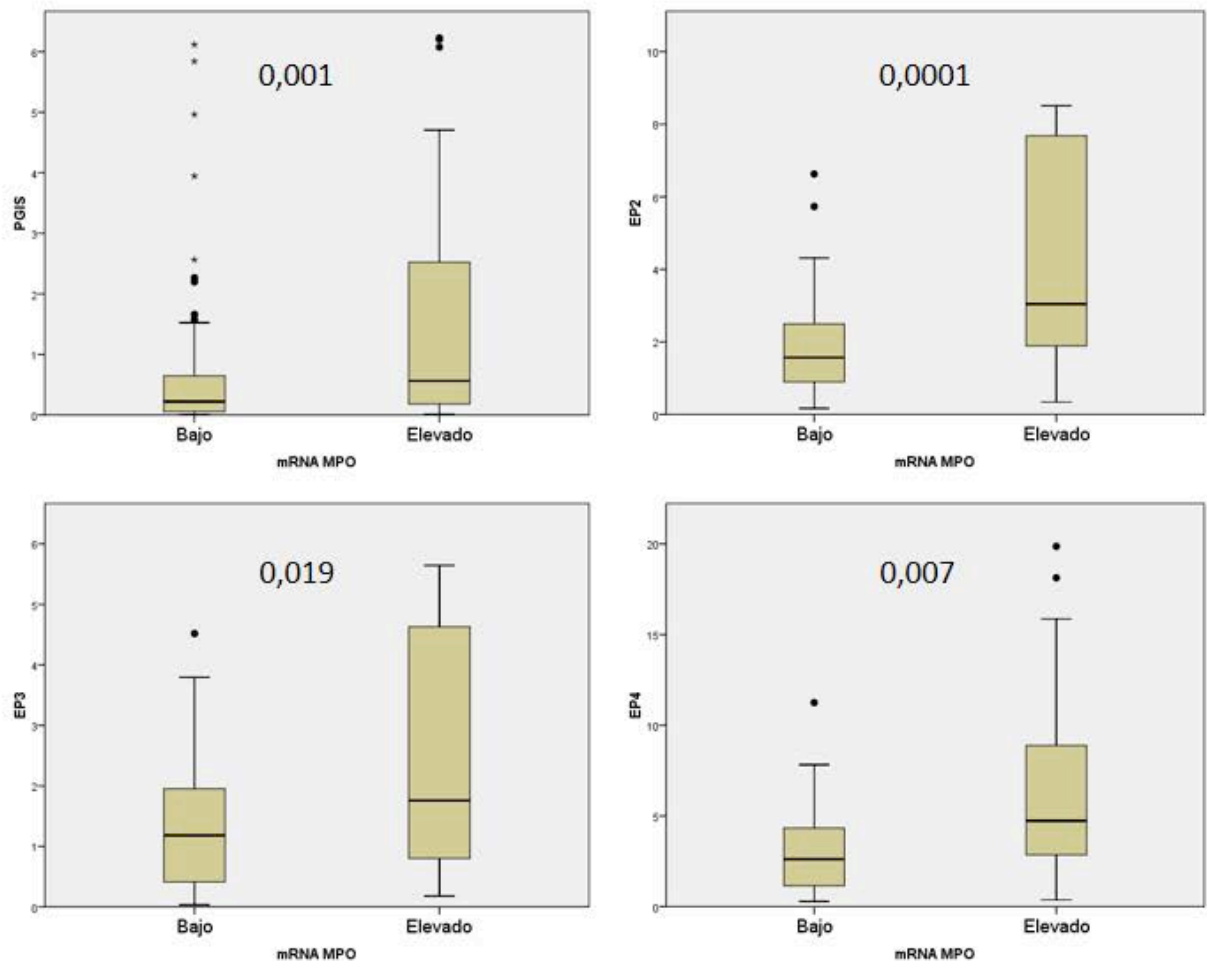


Fig 59. Box plots de la expresión transcripcional de MPO en relación a la expresión transcripcional de COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES2, cPGES, TXAS, PGIS, EP2, EP3, y EP4.

Existió una relación significativa entre el nivel de expresión de MPO y la expresión transcripcional de los genes relacionados con la síntesis de PGE₂ (mPGES-1), del TAX mediante TAX-sintetasa (TXAS), de la PGIS, así como de los receptores específicos (EP2, EP3 y EP4).

5.2.2 Vía de la IL-1

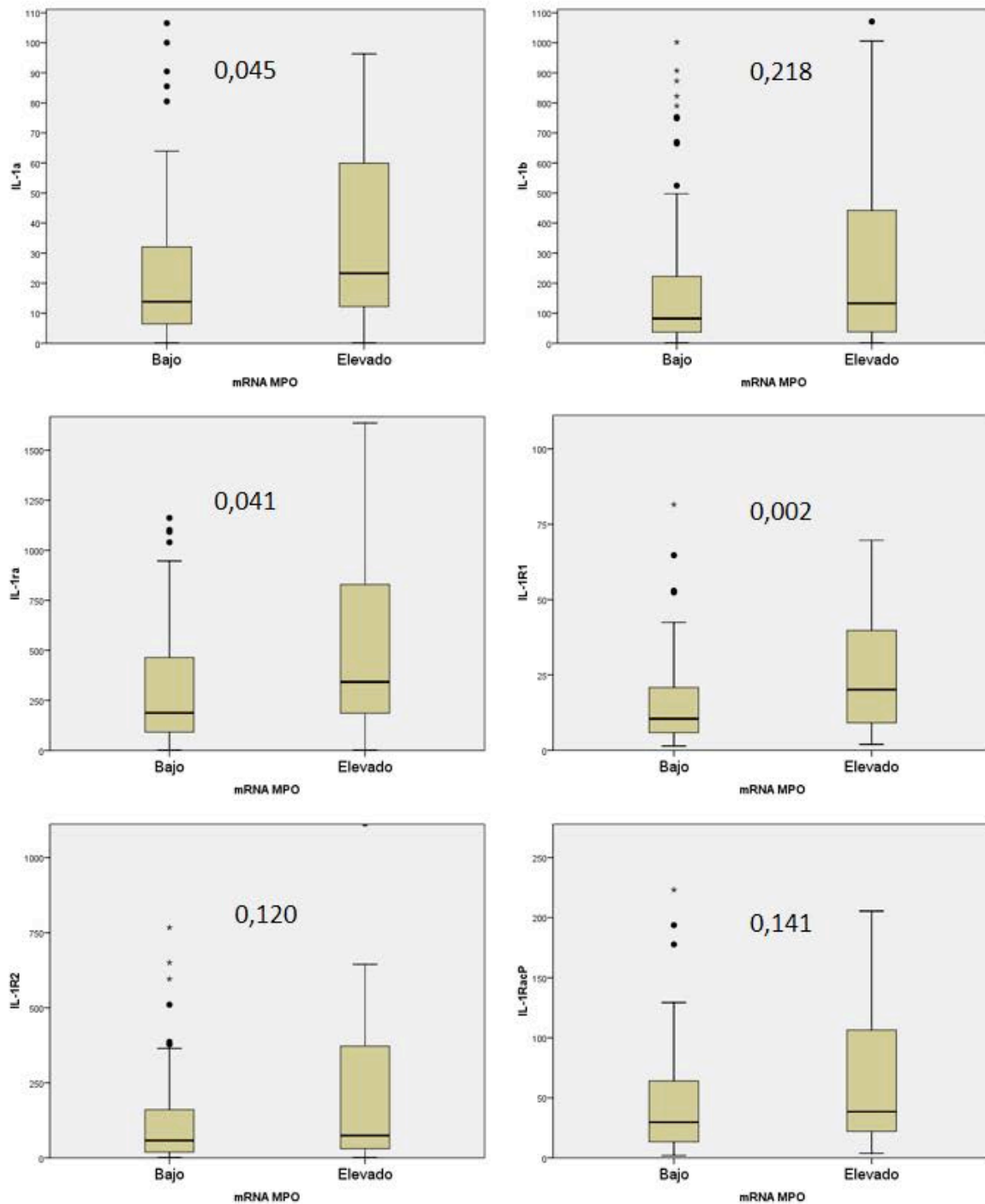


Fig 60. Box plots de la expresión transcripcional de MPO en relación a la expresión transcripcional de IL-1a, IL-1b, IL-1ra, IL-1R1, IL-1R2, IL-1RacP.

En general no se apreció una relación entre los genes de la vía de la IL-1 y la expresión de MPO, apareciendo sólo un cierto grado de correspondencia con la expresión del gen responsable del receptor IL-1R1.

5.2.3 Citoquinas, receptores de citoquinas y glicoproteínas de membrana relacionadas con la actividad leucocitaria

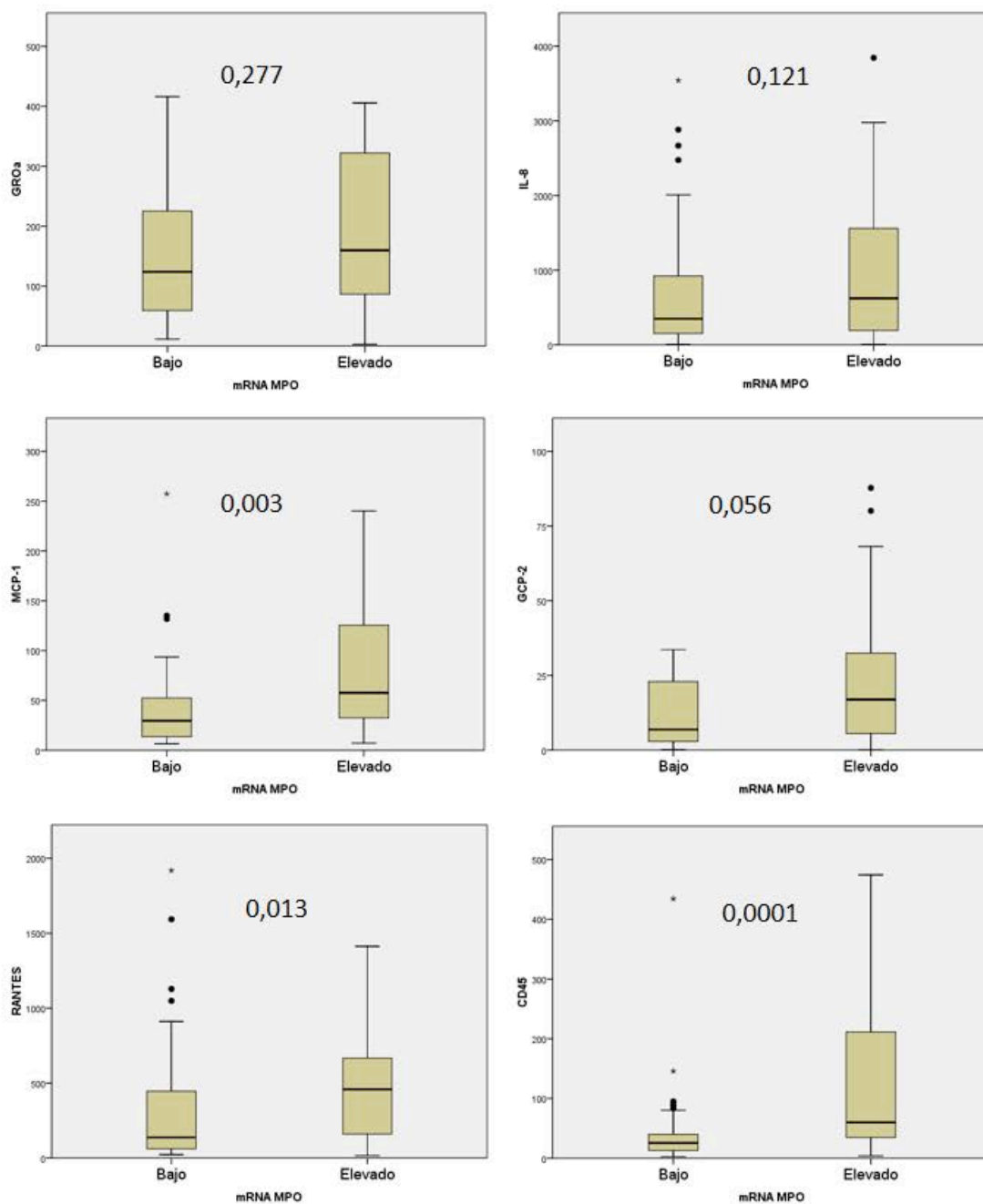


Fig 61. Box plots de la expresión transcripcional de MPO en relación a la expresión transcripcional de GROa, IL-6, MCP-1, GCP-2, RANTES, CD45.

Se apreció una relación entre la expresión de MPO y la del marcador panleucocitario CD45, y en menor medida con la expresión de MCP-1 y RANTES.

5.2.4 TGF- β y MMP

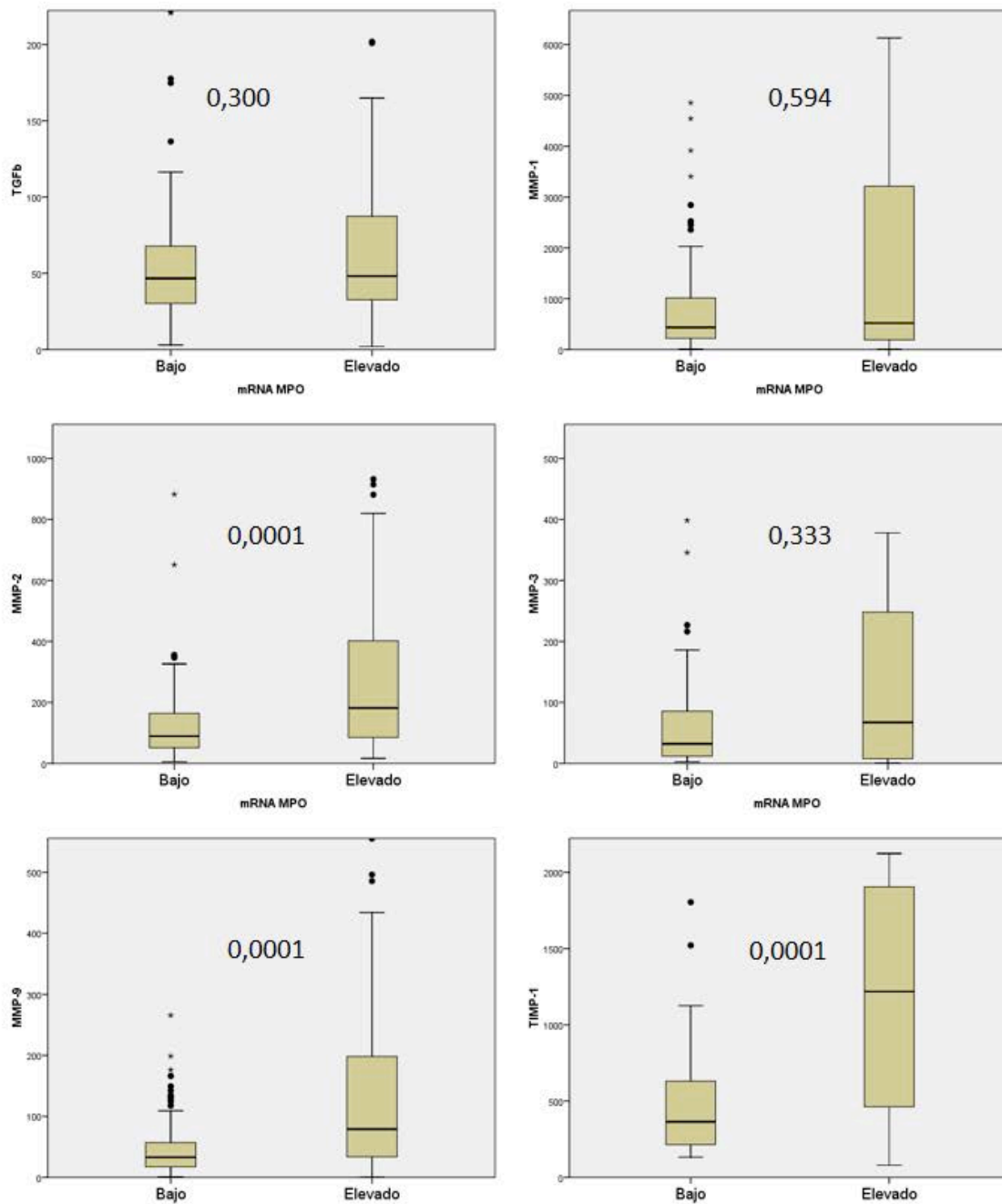
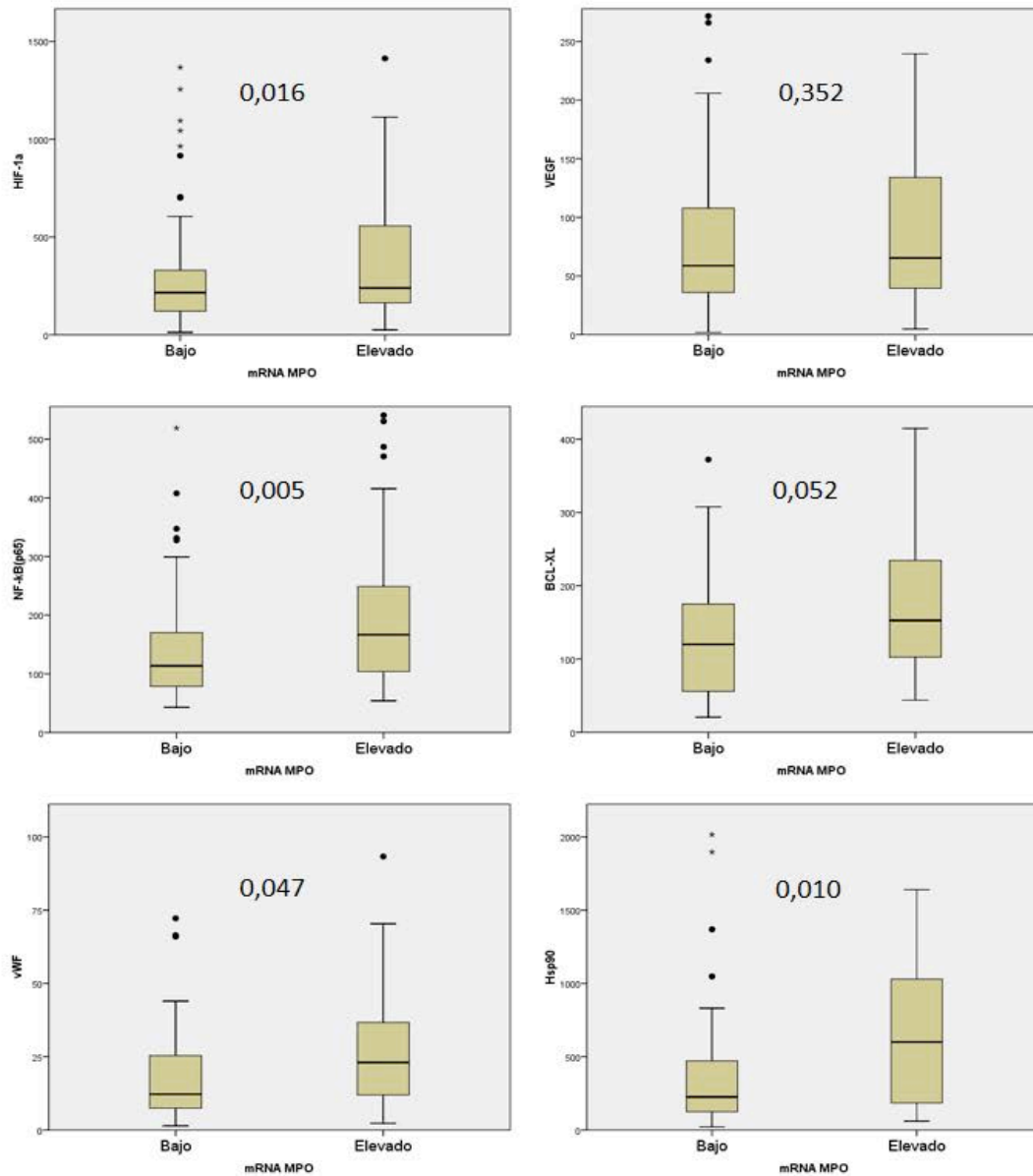


Fig 62. Box plots de la expresión transcripcional de MPO en relación a la expresión transcripcional de TGF β , MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-1.

Se pudo apreciar una relación intensa entre la expresión de MPO y las MMP 2 y 9, así como con el inhibidor de las metaloproteínas TIMP-1.

5.2.5 Factores de hipoxia, factor de transcripción nuclear NFκ-B, reguladores de apoptosis (Bcxl), de expresión endotelial (von Willebrand Factor), o con capacidad como caperona (Hsp90)



Fig

Fig 63. Box plots de la expresión transcripcional de MPO en relación a la expresión transcripcional de HIF-1 α , VEGF, NF- κ B, BCL-XL, vWF, Hsp90.

Apareció una relación intensa entre el nivel de expresión de MPO y la subunidad p65 del complejo NFκ-B, y de forma más marginal con HIF-1 α , el factor von Willebrand, y Hsp90.

5.2.6 SOD

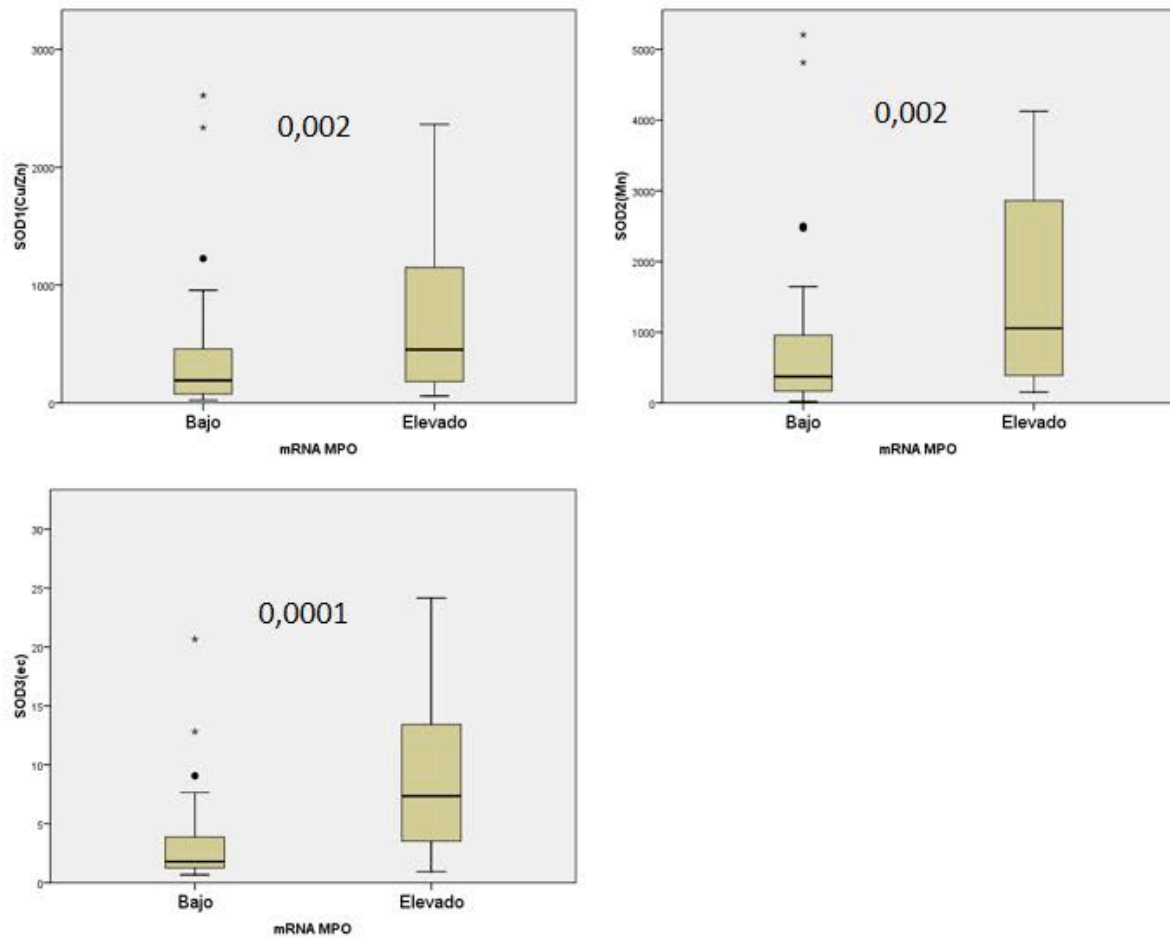


Fig 64. Box plots de la expresión transcripcional de MPO en relación a la expresión transcripcional de SOD1, SOD2, SOD3.

Finalmente, pudimos apreciar la existencia de una relación altamente significativa entre el nivel de expresión transcripcional de MPO y genes que codifican proteínas relacionadas con el estrés oxidativo como son SOD1, SOD2 y SOD3.

5.3 CORRELACIÓN CON RUPTURA CAPSULAR

Uno de los elementos relacionados con la aparición de metástasis a distancia en los pacientes con CECC es la presencia de adenopatías metastásicas con ruptura capsular en los vaciamentos cervicales. Se analizó la expresión transcripcional de MPO en 26 de los pacientes incluidos en el estudio en los cuales se había realizado un vaciamiento cervical con la presencia de metástasis ganglionares en el estudio patológico (pN+). En 11 ocasiones (42.3%) los pacientes presentaron adenopatías metastásicas con ruptura capsular.

Los pacientes con metástasis ganglionares con ruptura capsular mostraron una tendencia a contar con unos niveles de expresión transcripcional de MPO más elevados, si bien las diferencias no alcanzaron la significación estadística (test U Mann-Whitney $P=0.087$). La siguiente figura muestra la distribución en los valores de expresión de MPO en función de la presencia de adenopatías metastásicas con ruptura capsular.

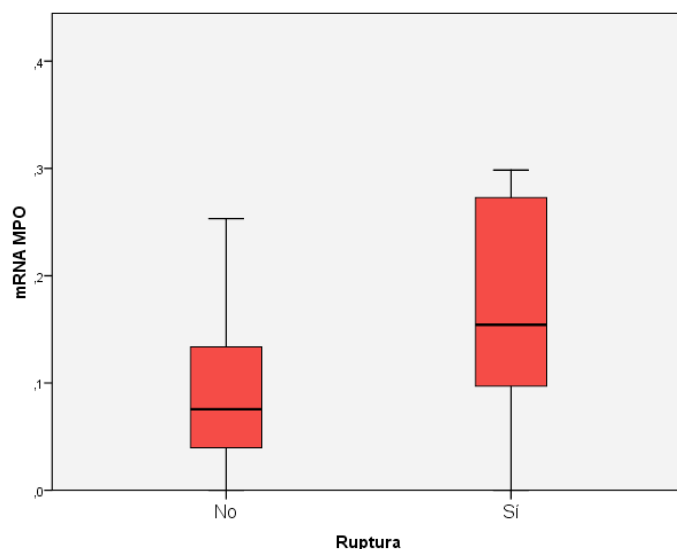


Fig 65. Expresión transcripcional de MPO en relación a la presencia de ruptura capsular en las adenopatías metastáticas.

Mediante un análisis de partición recursiva se clasificó a los pacientes en función del valor de expresión de MPO considerando como variable dependiente la presencia de adenopatías metastásicas con ruptura capsular.

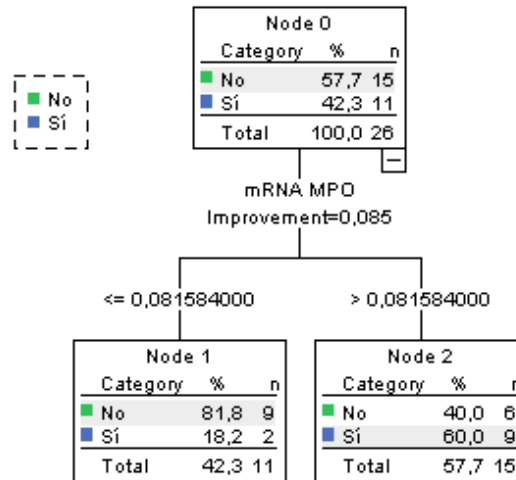


Fig 66. Clasificación de pacientes en función de MPO considerando la ruptura capsular como variable dependiente.

De acuerdo con los nodos terminales obtenidos, existieron diferencias significativas en la supervivencia libre de metástasis a distancia en función de los valores de expresión de MPO.

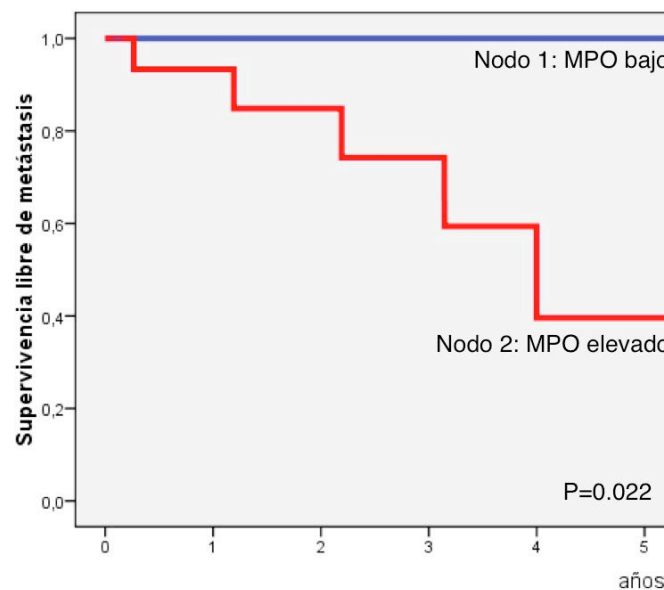


Fig 66. Supervivencia libre de metástasis a distancia en función de MPO.

Existieron diferencias significativas en la supervivencia libre de metástasis en función de la clasificación obtenida ($P=0.022$). Ninguno de los pacientes con unos niveles de expresión bajos de MPO presentó metástasis a distancia, en tanto que la supervivencia libre de metástasis a distancia a los 5 años para el grupo de pacientes con unos niveles de expresión elevados fue del 39.6%

5.4 INMUNOHISTOQUÍMICA

Se llevó a cabo la comparación en los valores de expresión inmunohistoquímica en una muestra de 26 pacientes, 13 de los cuales contaron con la presencia de aparición de metástasis a distancia durante el periodo de seguimiento, con controles apareados en función de la localización y extensión loco-regional de la enfermedad. Se analizaron un total de 10 campos por paciente, valorándose la tinción inmunohistoquímica con una metodología de estudio morfométrico con la intención de disminuir la subjetividad derivada de la valoración inmunohistoquímica convencional.

El siguiente box plot muestra la distribución de los valores de expresión inmunohistoquímica de MPO en función de la aparición de metástasis.

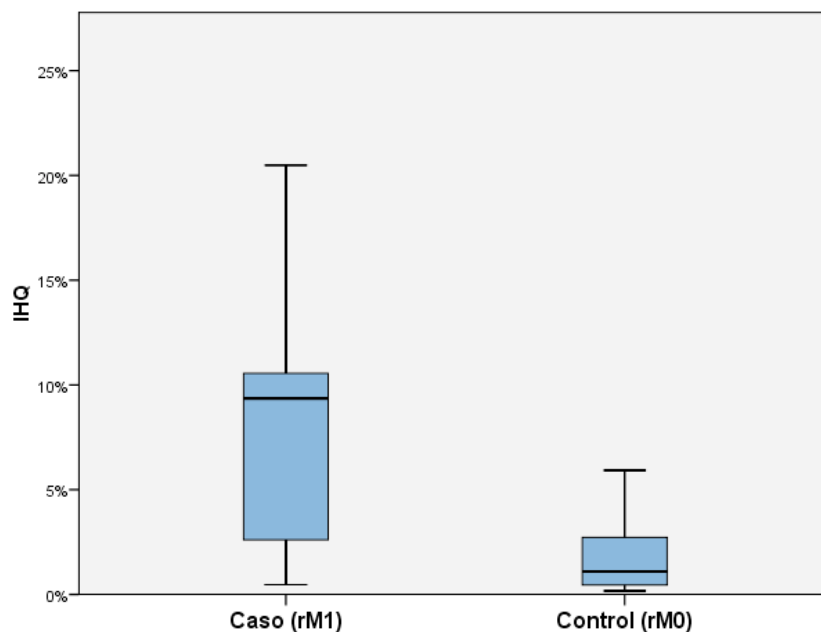


Fig 67. Expresión inmunohistoquímica de MPO en función de la aparición de metástasis a distancia.

De acuerdo con los resultados del estudio morfométrico, el porcentaje de área teñida en el caso de los pacientes que contaron con la aparición de metástasis a distancia fue del 8.03% (desviación estándar 6.02%), en tanto que para los pacientes que no contaron con la aparición de metástasis fue del 1.89% (desviación estándar 1.79%). Aparecieron diferencias significativas en el porcentaje de área teñida por el anticuerpo en función de la aparición de metástasis a distancia (Test U de Mann-Whitney, $P=0.002$).

5.5 ESTUDIO DE SECRETOMAS

En esta parte del estudio se evaluaron muestras de tumor un total de 37 pacientes, de los cuales 13 (35.1%) sufrieron la aparición de metástasis a distancia. Se evaluó la concentración de MPO y IL8 en el secretoma de las muestras de tumor.

La siguiente figura muestra la distribución en las concentraciones de MPO en función de la aparición de metástasis a distancia.

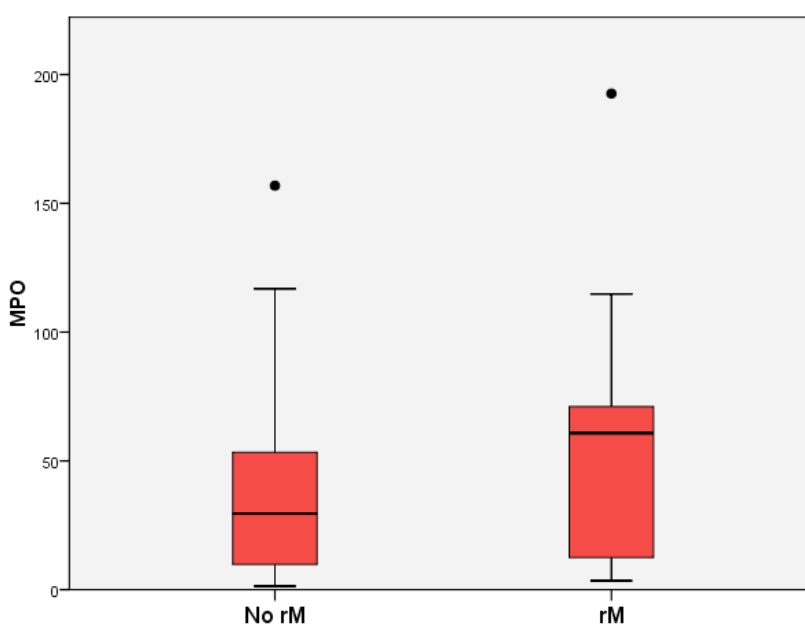


Fig 68. Concentración de MPO en secretomas en función de la aparición de metástasis a distancia.

No aparecieron diferencias significativas en la concentración de MPO en función de la aparición de metástasis (test U de Mann-Whitney $P=0.224$).

Utilizando la aparición de metástasis a distancia como variable dependiente, un análisis de partición recursiva clasificó a los pacientes en función del valor de la concentración de la MPO.

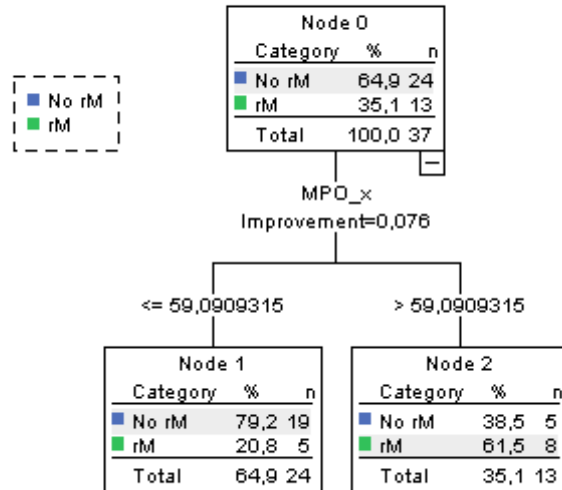


Fig 68. Clasificación de pacientes en función de la concentración de MPO, dependiendo de la aparición de metástasis a distancia.

Los pacientes con una concentración elevada de MPO contaron con una tendencia a presentar una supervivencia libre de metástasis inferior que la de los pacientes con una concentración reducida (P= 0.6).

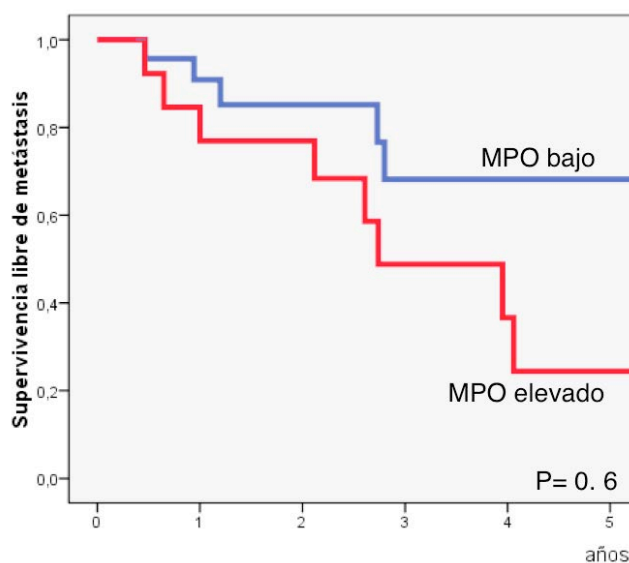


Fig 69. Supervivencia libre de metástasis en función de la concentración de MPO

Existió una correlación significativa entre las concentraciones de MPO y IL8 del secretoma (coeficiente r: 0.512, P=0.001).

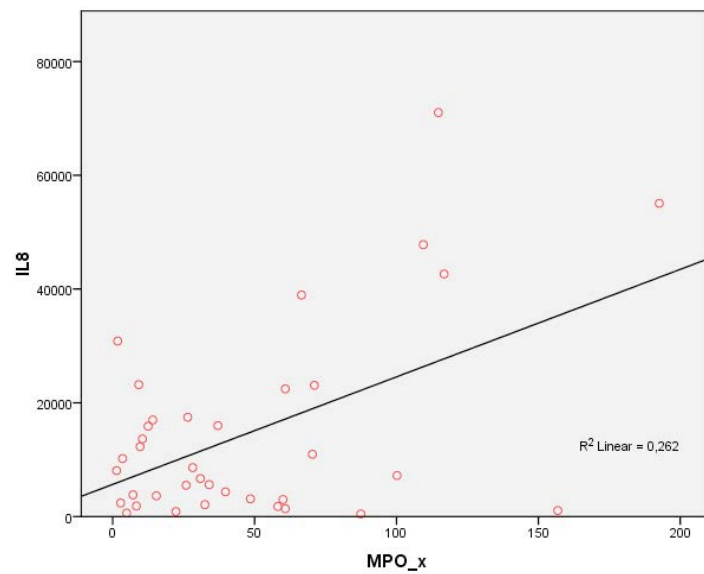


Fig 70. Correlación entre la concentración en secretomas de MPO y de IL8.

Los pacientes con metástasis a distancia tuvieron una concentración significativamente superior de IL8 en el secretoma (test U de Mann-Whitney P=0.026).

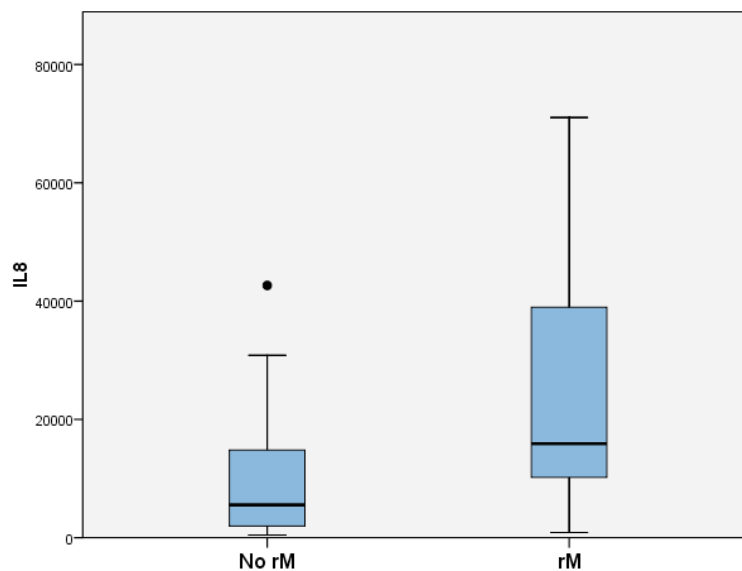


Fig 71. Concentración de IL8 en función de la aparición de metástasis a distancia.

El análisis de partición recursiva clasificó a los pacientes en función de la aparición de metástasis a distancia de acuerdo con los valores de la concentración de IL8.

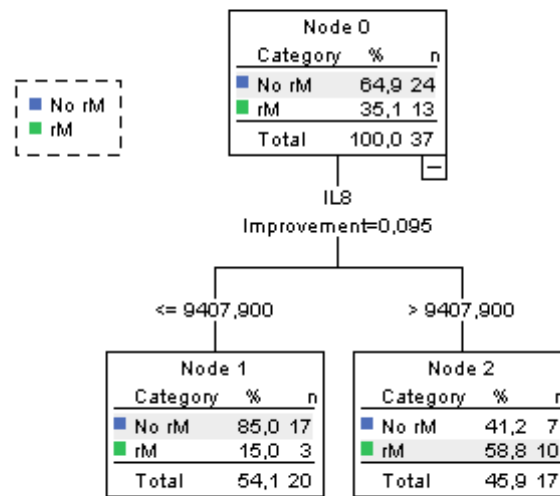


Fig 72. Clasificación de pacientes en función de la concentración de IL8, dependiendo de la aparición de metástasis a distancia.

Existieron diferencias significativas en la supervivencia libre de metástasis a distancia en función de la categoría de concentración de IL8 (P=0.041).

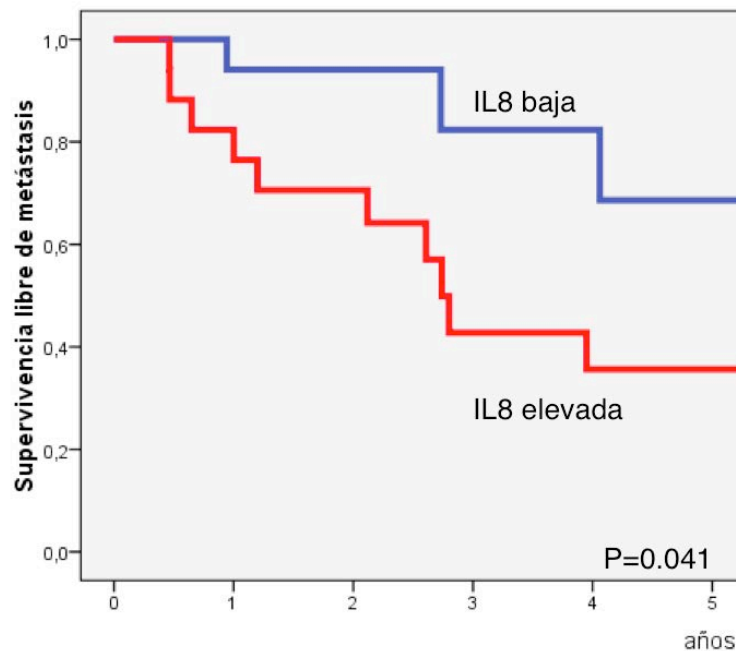


Fig 72. Supervivencia libre de metástasis a distancia en función de la concentración de IL8.

Se evaluó a continuación la correlación existente entre la concentración en el secretoma de MPO y de citoquinas de la familia de IL1. La siguiente tabla muestra los valores de correlación entre MPO y.

Tabla 10. Correlación entre la concentración de MPO y IL1- α , IL- β y IL-RA.

		MPO	IL1- α	IL1- β	IL1-R
MPO	Pearson	1	,451**	,243	,365
	Sig.		,007	,159	,114
IL1- α	Pearson	,451**	1	,574**	,343
	Sig.	,007		,000	,139
IL- β	Pearson	,243	,574**	1	-,031
	Sig.	,159	,000		,896
IL1-RA	Pearson	,365	,343	-,031	1
	Sig.	,114	,139	,896	

Sólo apareció una correlación significativa con las concentraciones de IL1- α . La siguiente figura muestra la correlación existente entre las concentraciones a nivel del secretoma de la MPO y la IL1- α .

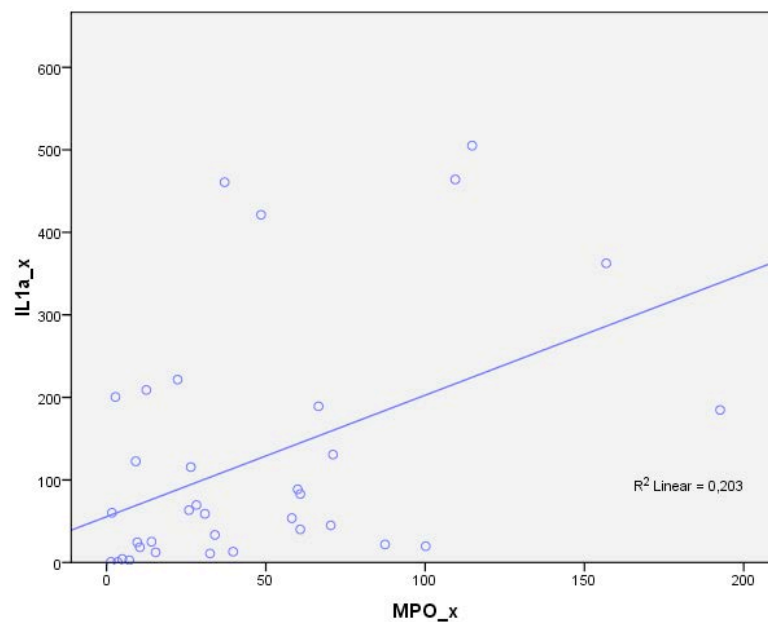


Fig 73. Correlación entre las concentraciones de MPO y de IL1- α .

El análisis de partición recursiva clasificó a los pacientes en función de las concentraciones de IL1- α considerando la aparición de metástasis a distancia como la variable dependiente.

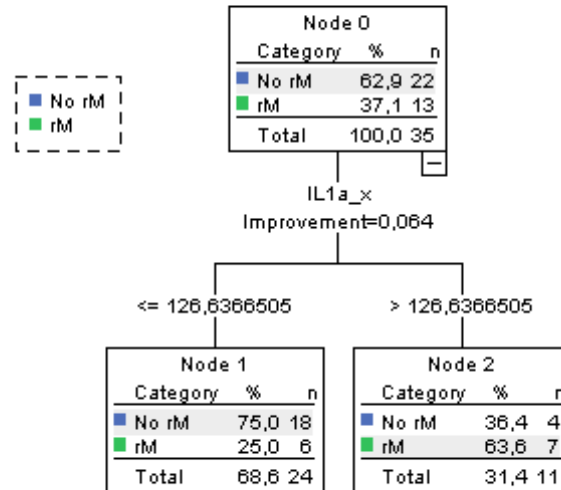


Fig 74. Clasificación de los pacientes según la concentración de IL1- α dependiente de la aparición de metástasis a distancia.

Aparecieron diferencias significativas en la supervivencia libre de metástasis a distancia en función de los valores de concentración de IL1- α (P=0.003)

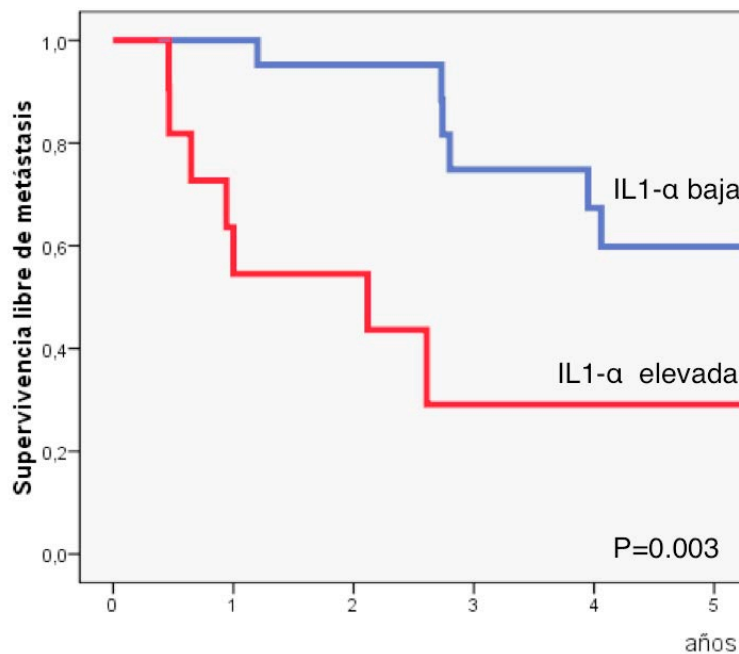


Fig 72. Supervivencia libre de metástasis a distancia en función de la concentración de IL1- α .

5.6 ESTUDIO DE MPO A NIVEL SÉRICO

Se realizó un estudio caso-control en el que se compararon los niveles séricos de MPO entre pacientes con CECC en función de la presencia de metástasis a distancia. Se compararon los valores de séricos de MPO de 42 pacientes que sufrieron la aparición de metástasis a distancia en ausencia de recidiva loco-regional de la enfermedad con 38 pacientes apareados en función de la localización y la extensión local y regional sin aparición de metástasis.

No existieron diferencias significativas en el valor sérico de MPO y la localización del tumor ($P=0.144$) o su extensión regional ($P=0.849$). Por el contrario, se observó una relación significativa entre la categoría de extensión local de la enfermedad y el nivel sérico de MPO (ANOVA. $P=0.045$), tal como puede apreciarse en la siguiente figura.

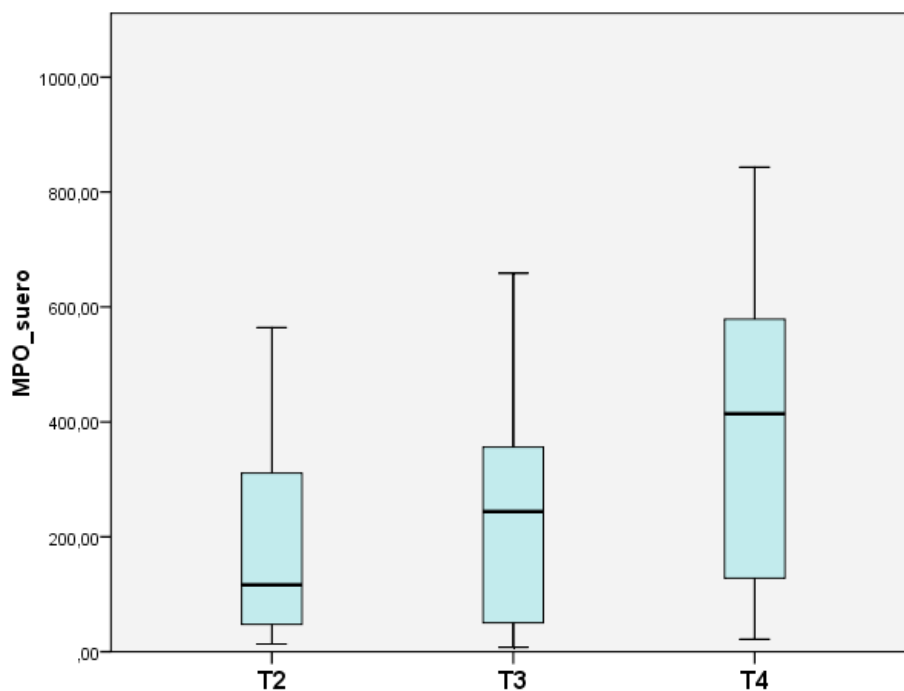


Fig 73. Concentraciones séricas de MPO en función de la extensión local tumoral.

No se encontró relación entre los niveles séricos de MPO y la aparición de metástasis a distancia ($P=0.183$), tal como puede apreciarse en la siguiente figura.

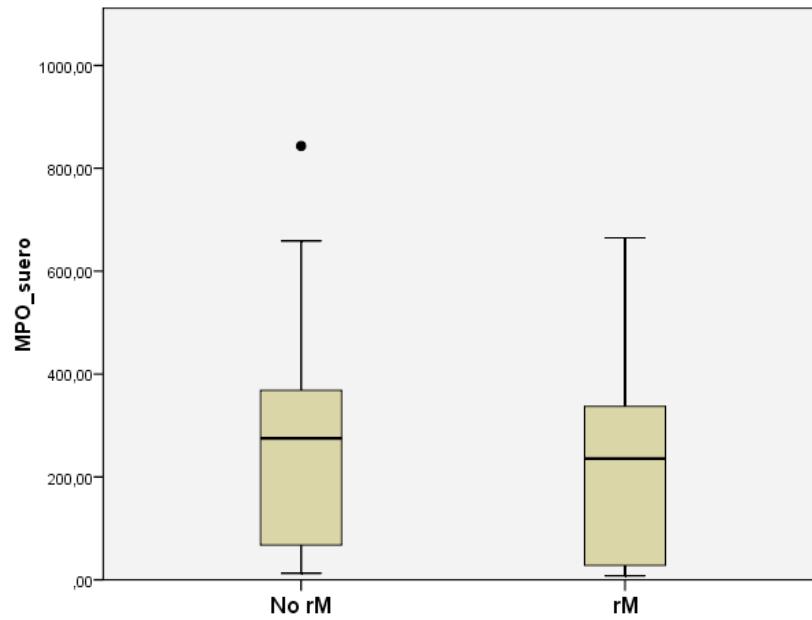


Fig 74. Concentraciones séricas de MPO en función de la aparición de metástasis a distancia.

5.7 ENSAYOS *IN VITRO* DE CIERRE DE HERIDA (*WOUND HEALING ASSAY*)

Se llevó a cabo una determinación de la capacidad de migración de una serie de líneas celulares de CECC incubadas con el medio condicionante de PMN control (no activados) o activados con TGF- β , TNF- α o LPS, comparando los resultados obtenidos con el agonista utilizado en la inducción como control negativo. La siguiente figura muestra los resultados obtenidos en tres de las líneas evaluadas tras la inducción con LPS a nivel basal y a las 48 horas.

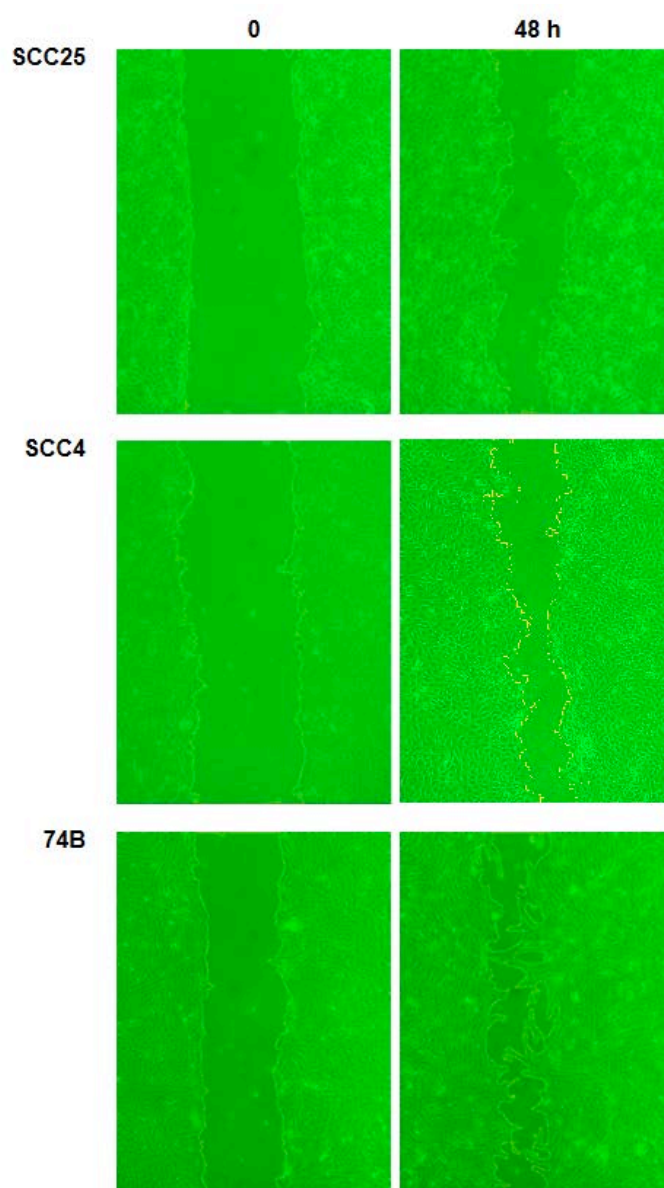


Fig 75. Resultados de cierre de herida en las líneas SCC25, SCC4 y 74B a las 0h y 48h tras la incubación con medio condicionante de PMN activados con LPS.

Se llevaron a cabo los experimentos por triplicado. Las siguientes figuras muestran la media de los valores en mm² invadidos respecto al tiempo 0 para cada una de las condiciones del estudio y cada una de las líneas analizadas.

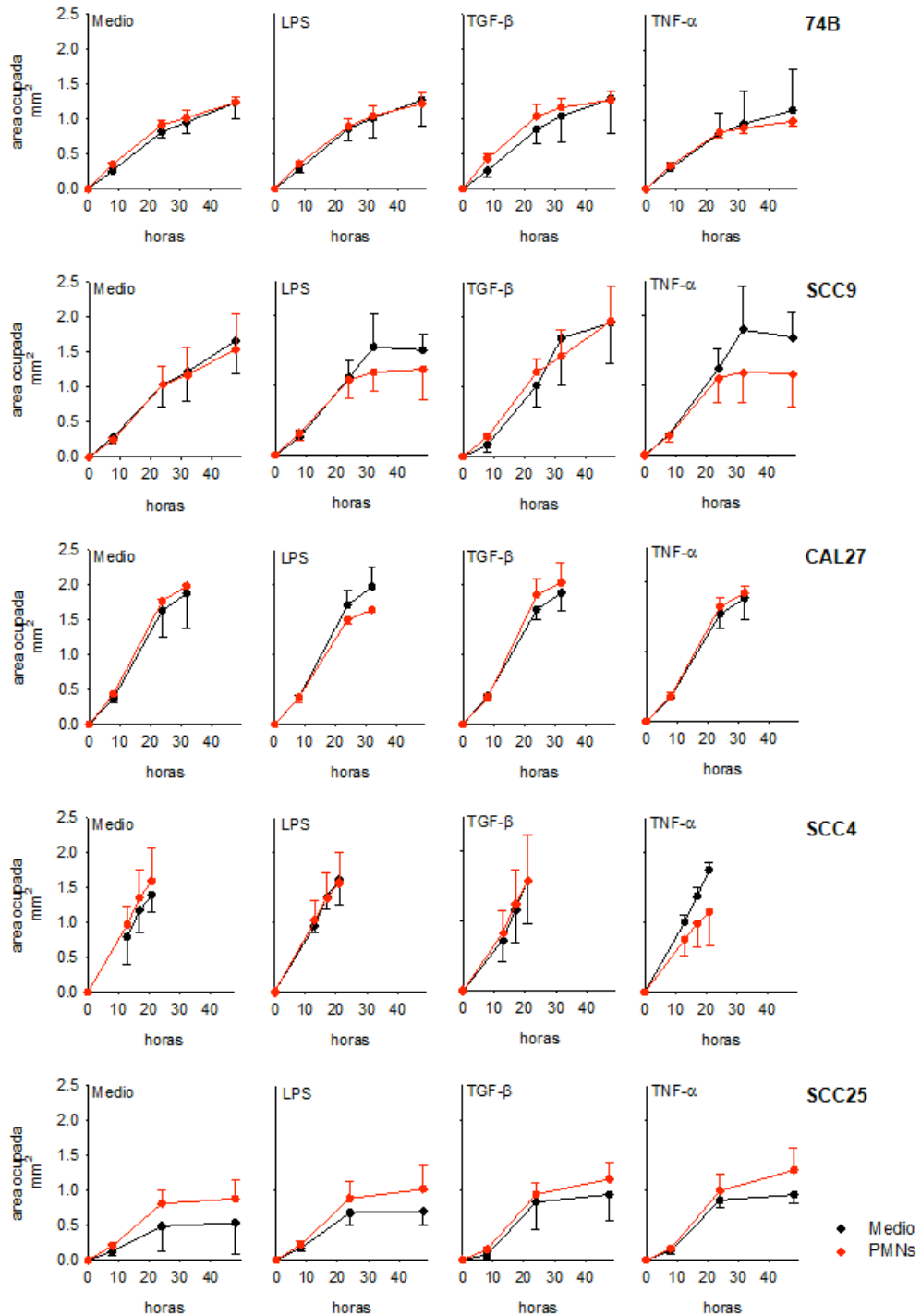


Fig 76. Resultados de cierre de herida (mm² invadidos) respecto al tiempo des de la hora 0, en las líneas celulares 74B, SCC9, CAL27, SCC4, SCC25, según si han sido incubadas en medio de PNM no activados, activados por LPS, por TGF-β, o bien por TNF-α.

No aparecieron diferencias significativas en la capacidad de migración de las líneas celulares tratadas con el medio condicionante de los PMN basales o activados con los diferentes agonistas en relación a la migración observada con la incubación utilizando únicamente el agonista correspondiente.

DISCUSIÓN

6 DISCUSIÓN

6.1 BIOMARCADORES DE LA METÁSTASIS A DISTANCIA EN LOS CECC

Hasta ahora el riesgo de aparición de metástasis a distancia se ha relacionado con variables clínicas y patológicas como son la localización del tumor primario, la extensión local y regional, o la presencia de ganglios metastásicos en el cuello con extensión extracapsular^{117,118,119,120}. A medida que se ha estudiado el comportamiento de las células tumorales, parece evidente que la función de las diferentes alteraciones moleculares e interacciones proteicas pueden favorecer la diseminación neoplásica.

La transición epitelial-mesenquimal es un fenómeno descrito tanto en el desarrollo embriológico como el tumoral, que implica la pérdida de la polaridad ápico-basal de la célula¹²¹. Ésta sufre cambios en el citoesqueleto y adquiere propiedades mesenquimales en vez de epiteliales: pérdida de adhesión celular, aumento en movilidad e invasión y resistencia a la apoptosis..., cambios favorecidos en un ambiente de hipoxia como el tumoral. Estas modificaciones del fenotipo celular han sido relacionadas con la aparición de metástasis a distancia en diferentes subtipos neoplásicos^{121,122,123}.

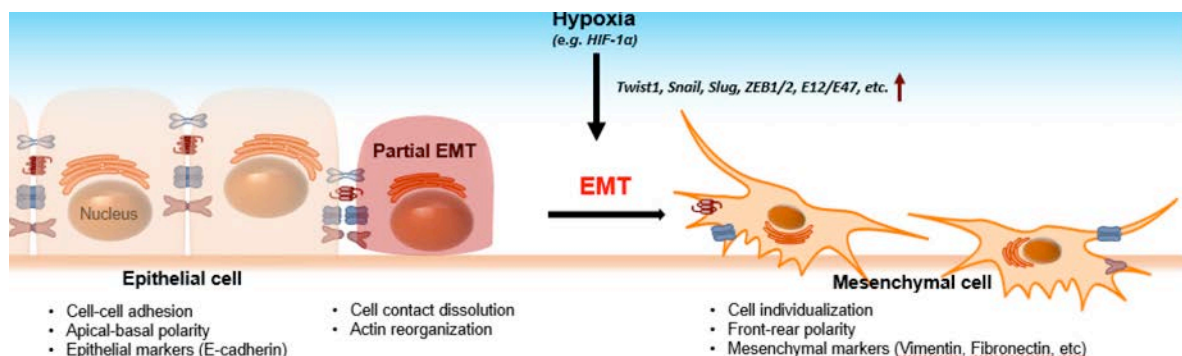


Fig 77. Cambios fenotípicos celulares causados por el fenómeno de transición epitelial-mesenquimal favorecido por la hipoxia¹²¹.

Varios autores han encontrado una relación significativa entre el riesgo de aparición de metástasis a distancia y la disminución de la regulación de la desmoplakina^{124, 125}, la citoqueratina-19¹²⁶ y la cadherina E^{127,128,129}, o con la sobreexpresión de la $\alpha\beta$ -cristalina^{23,122}, que provocan modificaciones en los patrones de expresión de vías relacionadas con el fenómeno de la transición epitelio-mesénquima. La posibilidad de profundizar en la relación entre la actividad de estas vías permitiría potencialmente ayudar a predecir por una parte el comportamiento tumoral, y además facilitar el desarrollo de nuevas dianas para los tratamientos oncológicos.

Un trabajo realizado en el Hospital de Sant Pau y que se enmarca en la investigación de biomarcadores con capacidad de clasificar los pacientes con CECC en función del riesgo de aparición de metástasis a distancia, evaluó la capacidad pronóstica de la IL-1¹³⁰. La IL-1 es una citoquina pleiotrópica que forma parte del microambiente tumoral con funciones determinantes en la inflamación, inmunidad y hematopoyesis. La IL-1 activa la expresión de moléculas de adhesión (VCAM-1 e ICAM-1) y promueve la formación de PGE₂, que a su vez induce la proliferación e inhibe la apoptosis de las células tumorales, y promueve la metástasis y la angiogénesis mediante la inducción de MMPs, VEGF y FGF^{122,130,131,132}. De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio¹³⁰, se encontró una relación significativa entre la expresión elevada de IL-1 α con una mayor adhesión de las células tumorales al endotelio y una mayor capacidad de transmigración. Se evaluó una cohorte de pacientes con CECC en función de la expresión transcripcional de IL-1 α . Los pacientes con unos niveles de expresión elevada de IL-1 α contaron con un riesgo superior de sufrir la aparición de metástasis a distancia. La supervivencia libre de metástasis a distancia a los 5 años para los pacientes con unos niveles elevados de IL-1 α fue del 70%, frente al 94.7% para los pacientes con unos niveles de expresión bajos, tal como aparece en la siguiente figura.

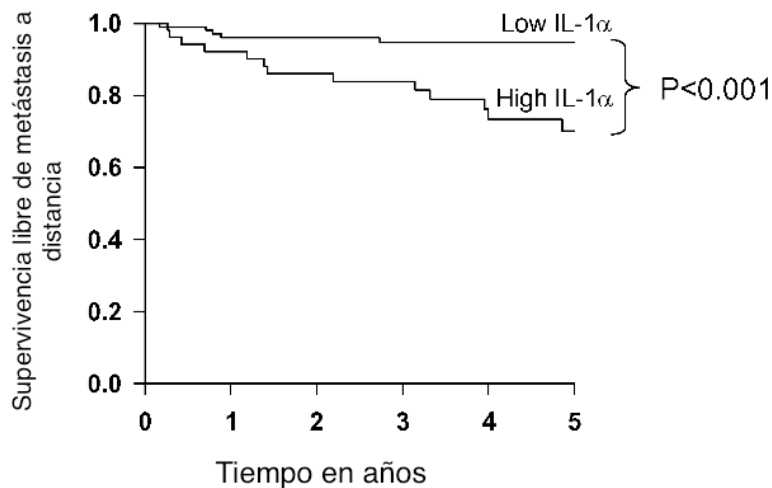


Fig 78. Supervivencia libre de metástasis a distancia en función del grado de expresión de IL-1 α en pacientes afectos de CECC¹³⁰.

La siguiente tabla resume los hallazgos realizados por diferentes autores en la capacidad de diferentes biomarcadores de pronosticar la aparición de metástasis a distancia en pacientes con CECC.

Tabla 11. Biomarcadores descritos como factores pronósticos de la aparición de metástasis a distancia en CECC^{122,125,129,130,133,134}.

Autor	Biomarcador	Relación con metástasis a distancia
León ¹³⁰	interleukina-1 α	↑IL-1 α → ↑M1
Rodrigo ¹²⁹	E-cadherina	↓E-cad → ↑M1
Nijkamp ¹³³	E-cadherina Vimentina	↓E-cad y ↑vimentina → ↑M1
Dong ¹²²	α β -cristalina	↑ α β -cristalina → ↑M1
Papagerakis ¹²⁵	Desmoplakina	↑Desmoplakina → ↑M1
Stangl ¹³⁴	Hsp70	↑Hsp70 → ↑M1

De acuerdo con los resultados del presente estudio, la expresión transcripcional de MPO así como su expresión inmunohistoquímica a nivel tumoral se relacionaría de forma significativa con el riesgo de aparición de metástasis a distancia. Los pacientes con una expresión transcripcional elevada de MPO contaron con una supervivencia libre de metástasis a distancia significativamente inferior a la de los pacientes con unos niveles de expresión transcripcional elevados, tal como aparece en la siguiente figura.

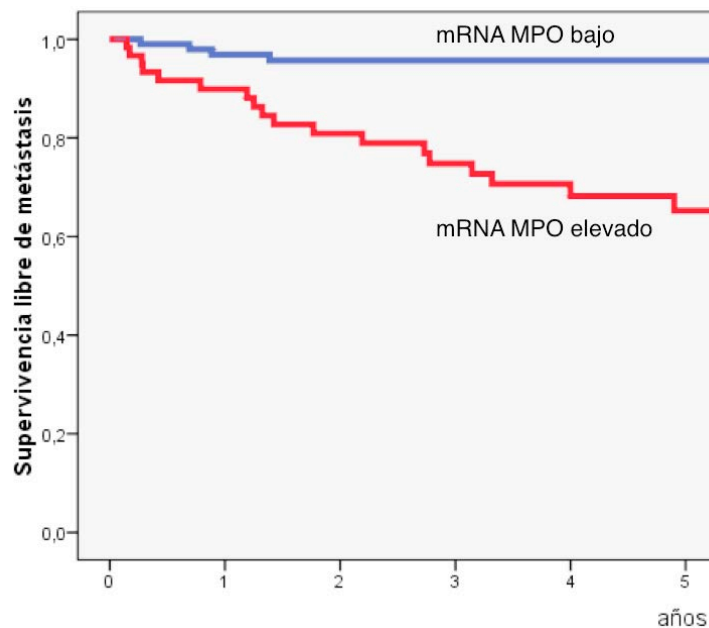


Fig 46 (repetida). Supervivencia libre de metástasis a distancia en función de la expresión transcripcional de MPO.

El hecho que la relación entre la expresión transcripcional de MPO y la aparición de metástasis a distancia apareciera de forma sistemática en los pacientes independientemente de la extensión local o regional del tumor, la localización del tumor, o del control a nivel loco-regional conseguido con el tratamiento, son un indicador de su robustez como biomarcador con capacidad pronóstica en la determinación del riesgo de aparición de metástasis.

Esta relación entre la expresión transcripcional de MPO y la aparición de metástasis a distancia se confirmó con un estudio en que se evaluó la relación entre la

expresión inmunohistoquímica de la MPO y la diseminación a distancia de la enfermedad. El porcentaje de área teñida para la MPO en las muestras de biopsia de pacientes que contaron con una diseminación a distancia de la enfermedad fue significativamente superior al correspondiente a muestras de pacientes con tumores de semejante localización y estadio y que no sufrieron la aparición de metástasis.

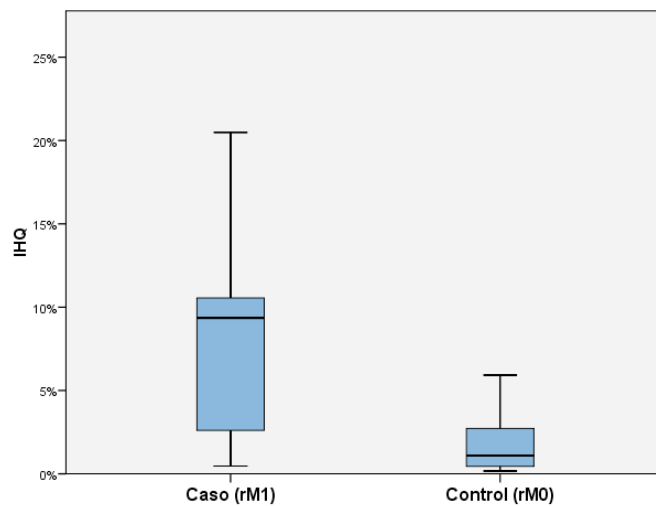


Fig 67 (repetida). Expresión inmunohistoquímica de MPO en función de la aparición de metástasis a distancia.

Igualmente, la concentración de MPO a nivel del secretoma contó con una tendencia a relacionarse con el riesgo de aparición de metástasis, pero sin que en esta ocasión, posiblemente debido a la limitación en el número de muestras estudiadas (n=37), las diferencias alcanzasen la significación estadística.

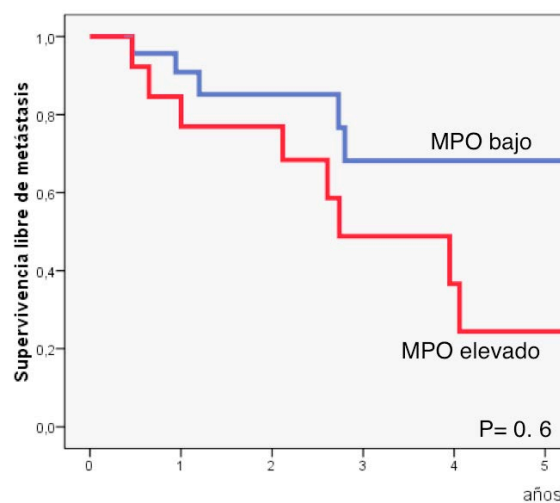


Fig 69 (repetida). Supervivencia libre de metástasis en función de la concentración de MPO

Al analizar el nivel de correlación existente entre los valores transcripcionales de MPO e IL-1 α pudimos apreciar que, si bien apareció una correlación positiva significativa, ésta era de baja intensidad (coeficiente de correlación de Pearson 0.202, P=0.021). La siguiente figura muestra la distribución de los valores de expresión de MPO en relación a los de IL-1 α tras llevar a cabo una transformación logarítmica de los valores de expresión.

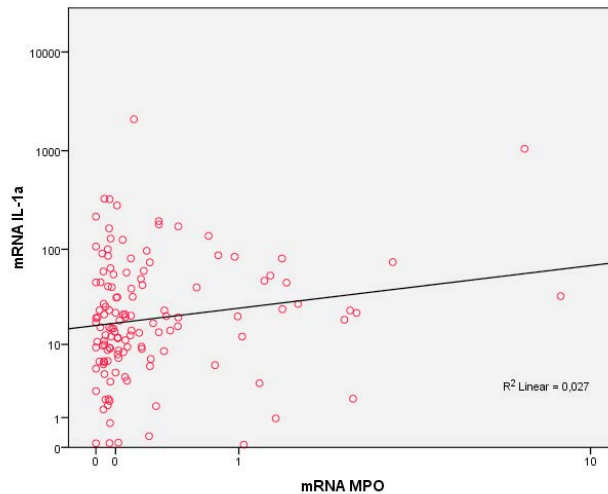


Fig 79. Correlación entre el grado de expresión transcripcional de MPO y de IL-1 α en nuestro estudio.

Se llevó a cabo un análisis de la supervivencia libre de metástasis considerando de forma conjunta los valores de expresión de MPO y de IL-1 α .

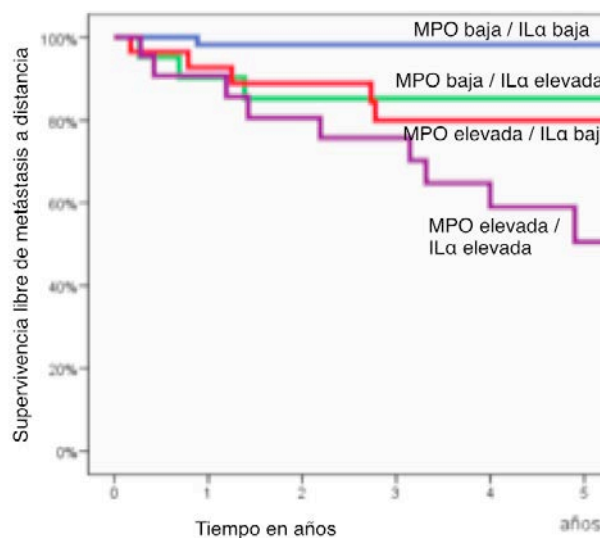


Fig 80. Supervivencia libre de metástasis en función de la combinación de expresión transcripcional de MPO y de IL-1 α en nuestro estudio.

Para los pacientes con unos niveles de expresión bajo de ambos genes (41.8%) la supervivencia libre de metástasis a los 5 años fue la más elevada (92.8%, IC 95%: 89.27-96.33%). Los pacientes con sólo uno de los valores transcripcionales elevados tuvieron una supervivencia libre de metástasis intermedia: para los pacientes con niveles de MPO baja e IL-1 α elevada (16.0%) fue del 85.2% (IC 95%: 69.7-100%), y para los pacientes con expresión elevada de MPO y baja de IL-1 α (21.4%) del 80.0% (IC 95%: 64.1-95.9%). Finalmente, los pacientes que contaron con unos niveles de expresión elevados tanto de MPO como de IL-1 α (16.8%) fueron los que tuvieron una supervivencia libre de metástasis más reducida (50.5%, IC 95%: 26,2-74,8%). Existieron diferencias significativas en la supervivencia libre de metástasis a distancia en función de la expresión conjunta de MPO e IL-1 α .

La conclusión de estos resultados es que no existe una coincidencia entre los mecanismos biológicos que justificarían el incremento en la incidencia de aparición de metástasis entre los pacientes con tumores con niveles elevados de expresión de MPO y de IL-1 α . La adición del valor pronóstico de cada uno de los biomarcadores tendría la capacidad de discriminar con una mayor exactitud el riesgo de aparición de metástasis a distancia en los pacientes con CECC.

Ha quedado fuera del presente estudio el poder evaluar la actividad directa de la MPO sobre el comportamiento de las células tumorales. Dado que el elemento celular que expresa de forma preferente la MPO son los neutrófilos, consideramos que la expresión de MPO aparecería como un marcador subrogado de la infiltración a nivel del microambiente tumoral por parte de los mismos. La siguiente figura muestra en una imagen con alta magnificación una zona en la que se puede comprobar como las células positivas para MPO se corresponden morfológicamente con neutrófilos PMN.

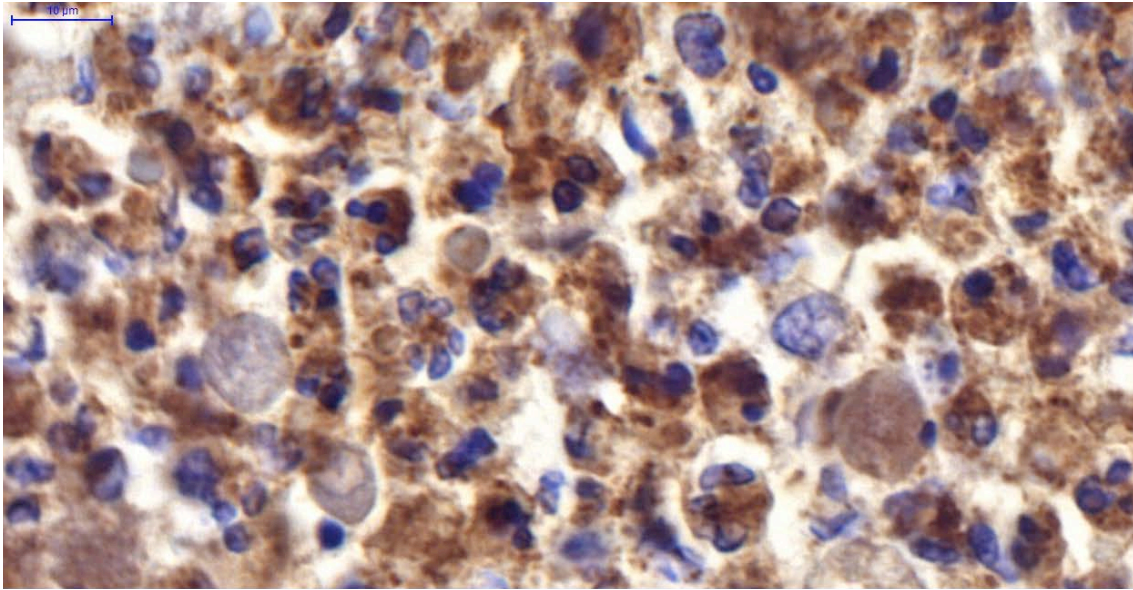


Fig 81. Muestra de tinción de PMN por marcador de MPO

Un elemento a considerar es que la mayoría de neutrófilos se posicionaron infiltrando el tejido conjuntivo que circunscribe estos nidos de células escamosas, tal como puede apreciarse en la siguiente figura.

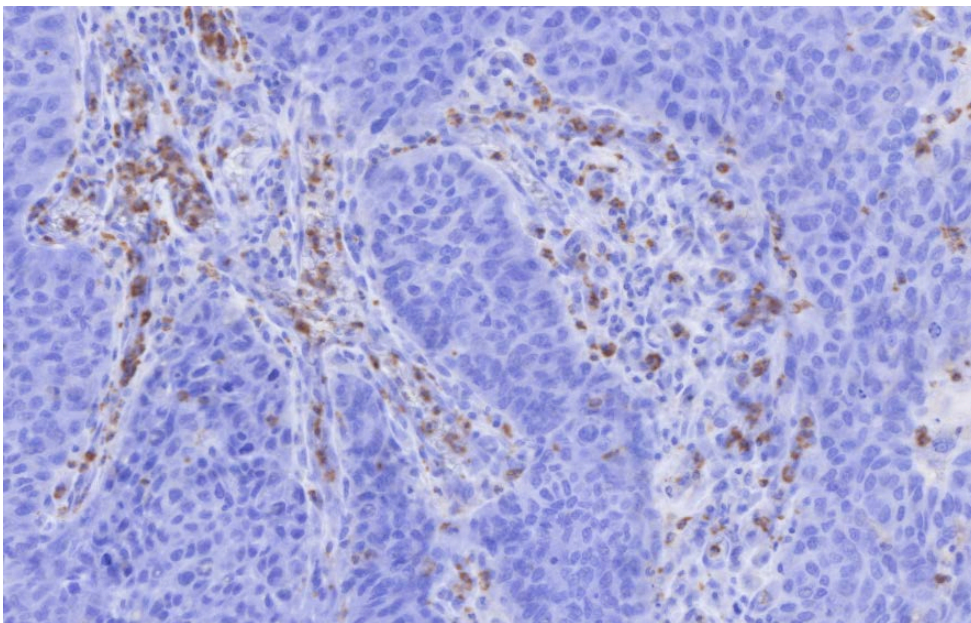


Fig 82. Organización neutrofílica en tejido conjuntivo en muestra de CECC.

Ocasionalmente se pudo observar la presencia elementos celulares MPO positivos de forma aislada infiltrando a nivel de los nidos celulares tumorales, tal como se muestra a continuación.

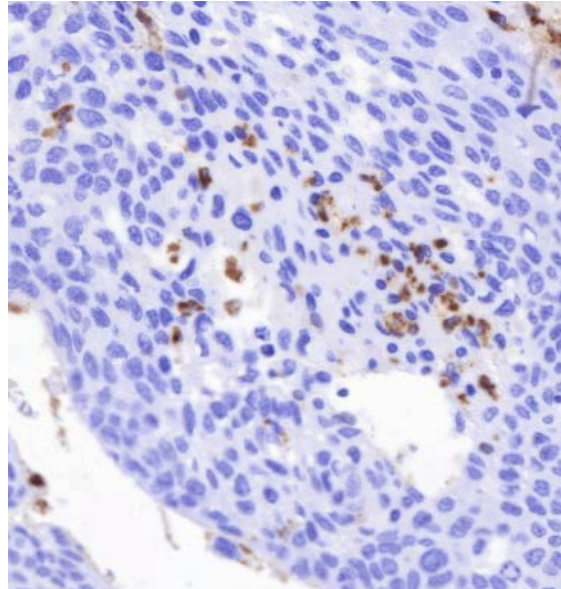


Fig 83. Ejemplo de presencia aislada de PMN MPO+ en nidos celulares de CECC.

Dada la complejidad de los patrones de infiltración neutrofílica, no pudimos diferenciar la expresión inmunohistoquímica en función de la localización de las células positivas, por lo que no podemos aportar información respecto a la existencia de diferencias en la actividad biológica de los neutrófilos en función de su localización dentro del microambiente tumoral.

Al considerar la relación entre la expresión transcripcional de MPO y en control a nivel local o regional de la enfermedad, se pudo apreciar una tendencia inversa de acuerdo con la cual los pacientes con unos niveles de expresión más elevados contaron con una tendencia a un mejor control local y regional de la enfermedad. Este hallazgo nos hace suponer que las vías mediante las cuales la infiltración local de neutrófilos se relaciona con la posibilidad de diseminación a distancia de la enfermedad no contarían con la capacidad de influir en el control loco-regional de la enfermedad. La discrepancia entre el nivel de expresión de la MPO y el control loco-regional (mejor en pacientes con niveles de expresión más elevados), y el control a

distancia de la enfermedad (mejor en pacientes con niveles de expresión bajos) justificaría la ausencia de relación significativa entre la expresión de MPO y la supervivencia específica.

Una de las variables clínico-patológicas que se ha asociado de forma más intensa con el riesgo de aparición de metástasis a distancia es la presencia de metástasis ganglionares con ruptura capsular en el análisis patológico de los vaciamientos cervicales. El nivel de expresión transcripcional de MPO se relacionó con la presencia de metástasis ganglionares con ruptura capsular en pacientes tratados con un vaciamiento cervical pN+. Al analizar mediante un análisis de partición recursiva la expresión de MPO en función de la presencia de adenopatías metastásicas con ruptura capsular se definieron dos grupos, con niveles de expresión bajo y baja probabilidad de ruptura (18.2%), y un grupo con expresión de MPO elevada y alta probabilidad de ruptura (60.0%). Al considerar el riesgo de diseminación a distancia en función de ambos grupos, pudimos apreciar unas diferencias significativas: los pacientes con una expresión elevada de MPO contaron con un riesgo sustancialmente superior de aparición de metástasis a distancia.

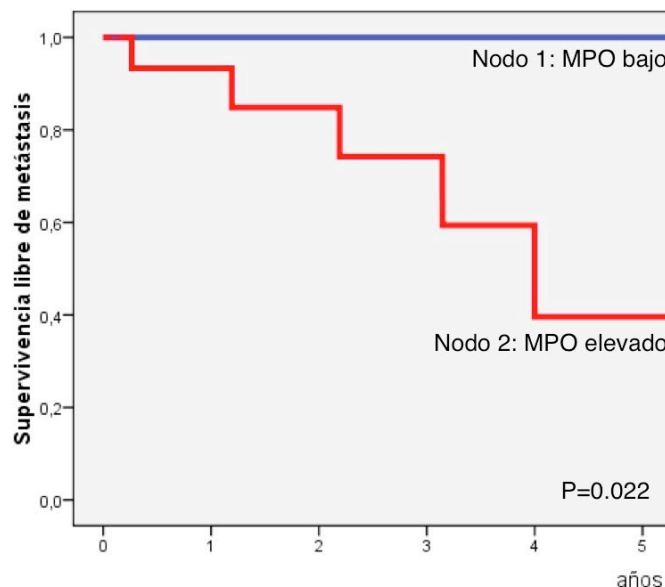


Fig 66 (repetida). Supervivencia libre de metástasis a distancia en función de MPO según el riesgo de ruptura capsular.

De nuevo, la existencia de una correlación entre el nivel de expresión de MPO a nivel del tumor local y la presencia de un elemento relacionado con la aparición de metástasis a distancia a nivel regional como es la presencia de adenopatías metastásicas con ruptura capsular nos hace suponer la existencia de una relación entre el grado de infiltración neutrofílica a nivel del tumor local y una mayor agresividad biológica del tumor.

Entre las variables clínicas que se han asociado de forma habitual al riesgo de aparición de metástasis a distancia se citan el estadio loco-regional avanzado de la enfermedad (T3-T4 y N2-N3), así como hallazgos patológicos como la presencia de adenopatías metastásicas con ruptura capsular. Al analizar de forma conjunta los factores de riesgo clínico y biológico se incrementó de forma notable la capacidad de discriminar a los pacientes con una mayor frecuencia de aparición de metástasis a distancia. Dentro del grupo de pacientes de alto riesgo clínico, la expresión de MPO discriminaba entre un grupo de riesgo bajo de diseminación, con una supervivencia libre de metástasis a los 5 años del 93.3%, y un grupo de alto riesgo con una supervivencia libre de metástasis del 57.4%. Para el grupo de bajo riesgo clínico, con una supervivencia libre de metástasis a los 5 años del 93.8%, la expresión de MPO no influyó en el porcentaje de aparición de metástasis a distancia. La principal interpretación de este resultado es que para que se produzca la aparición de metástasis a distancia se requiere una carga tumoral o volumen tumoral mínimo (relacionado con los factores de riesgo clínicos), y sólo en este grupo de pacientes potenciales candidatos clínicos a la diseminación, variables biológicas como el grado de infiltración neutrofílica, o la expresión de MPO considerada como un marcador subsidiario de la misma, contarían con una capacidad pronóstica.

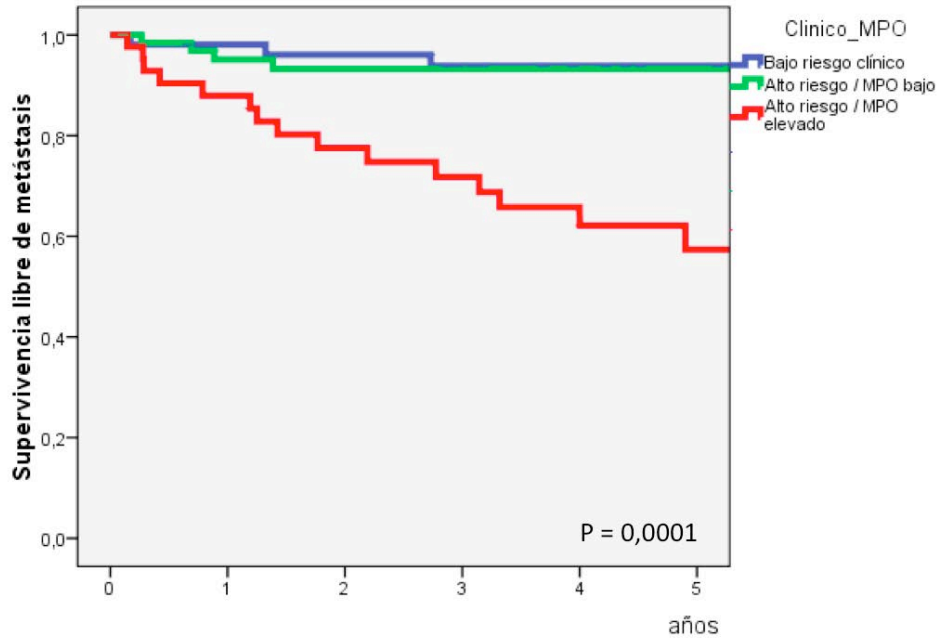


Fig 53 (repetida). Curvas de supervivencia libre de metástasis a distancia en función del riesgo clínico-patológico asociado a la expresión transicional de MPO.

6.2 PRESENCIA Y SIGNIFICADO DEL INFILTRADO NEUTROFÍLICO EN LOS CECC.

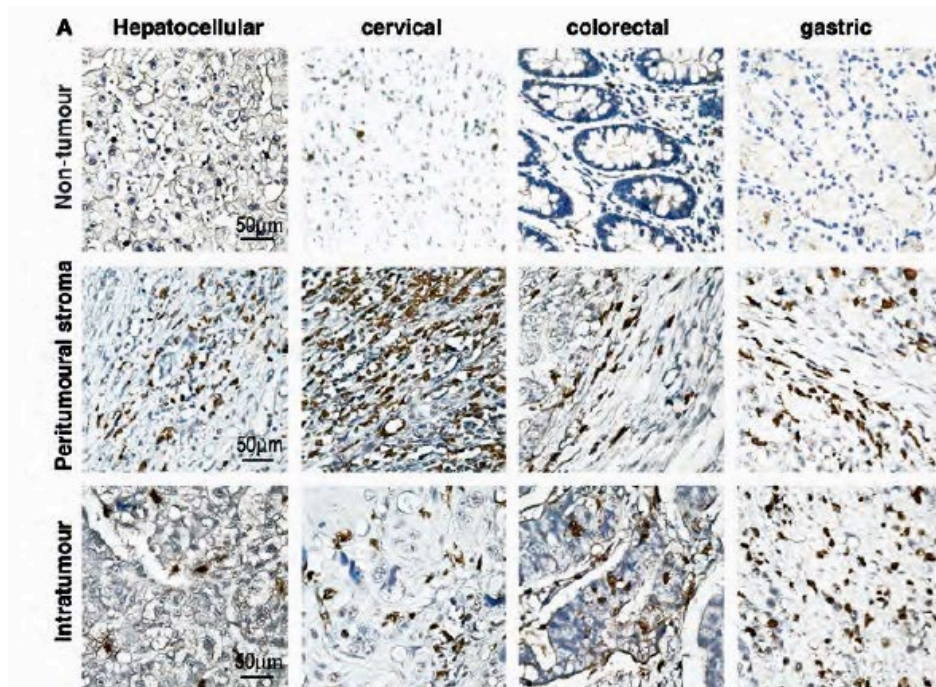
El microambiente tumoral consiste en una asociación de células con la capacidad inmune y no inmune, además de las propias células tumorales. Los neutrófilos TAN constituyen una parte significativa del infiltrado inflamatorio que aparece en una amplia variedad de tumores sólidos, incluyendo los CECC^{72, 73, 81}. El conjunto de estas células, pero también de las citoquinas y enzimas del estroma peritumoral, cuentan con un proceso evolutivo paralelo al de las células del núcleo tumoral. De la existencia de un ambiente inmunológico hostil al inicio del proceso de carcinogénesis, las modificaciones inducidas por los elementos celulares del tumor condicionan una metamorfosis hacia un ambiente proinflamatorio, mucho más tolerante con el proceso de carcinogénesis. Este cambio radical sustenta la viabilidad del crecimiento, progresión y diseminación tumoral.

6.2.1 Presencia de TAN-1 y TAN-2 en el microambiente tumoral

Al igual que con los macrófagos, para los cuales se han descrito dos fenotipos en el microambiente tumoral en función del contexto inmunitario, el M1 o fenotipo clásico con capacidad antitumoral y elevada capacidad antigénica, y el fenotipo M2 o alternativo con capacidad protumoral^{124,126}, Friendler y cols¹²⁷ han descrito dos fenotipos de TAN, el fenotipo antitumoral TAN-1 y el fenotipo protumoral TAN-2, con estados diferenciales de activación-diferenciación. Dentro del microambiente tumoral, TGF- β induce la transición hacia el fenotipo TAN-2¹²⁷, mientras que el interferon- β promueve el fenotipo TAN-1¹²⁸. La actividad de TAN-1 incluye un aumento de la expresión de citoquinas inmunoactivadoras y quimiocinas, e induce la capacidad directa de matar las células tumorales y de inhibir el crecimiento celular.

De manera opuesta, TAN-2 presenta un elevado nivel de expresión de CXCR4, VEGF, MMP-9 y arginasa que apoyan la angiogénesis, la adquisición de un fenotipo metastático, y la supresión de la respuesta inmune antitumoral²³. Por otra parte, se ha observado como la hipoxia consigue inhibir la apoptosis de los neutrófilos³³, y que éstos muestran una producción reducida de ROS en los CECC³⁵.

Wu y cols²⁸ cuantificaron la presencia de neutrófilos en tumores de pacientes no tratados de carcinoma hepatocelular (n=30), carcinoma cervical (n=30), carcinoma colorectal (n=30) y carcinoma gástrico (n=30). Realizaron el estudio inmunohistoquímico incubando las muestras tumorales con anticuerpos anti-CD15, específico de neutrófilos, y calcularon la densidad de células CD15+. En todos los tumores analizados los neutrófilos fueron más abundantes en el estroma peritumoral que en el núcleo tumoral, tal como sucede en nuestras muestras analizadas. En las muestras control no-tumorales, la cantidad de células CD15+ fue sensiblemente menor.



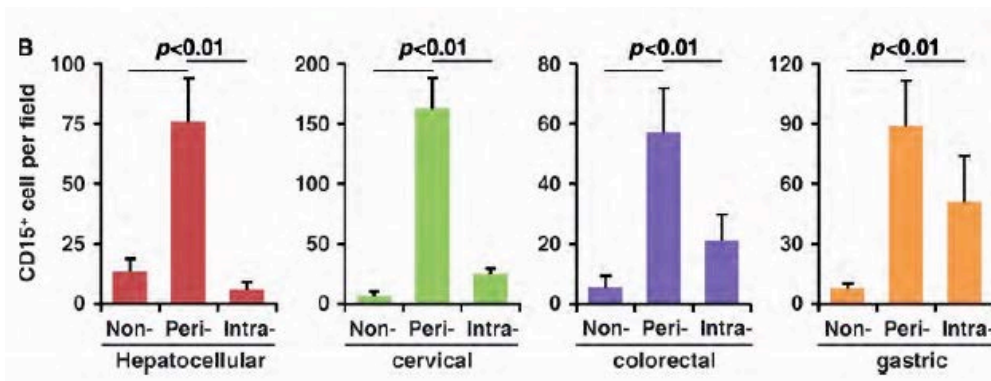


Fig 84. Infiltración de neutrófilos en tumores sólidos humanos. Tejidos fijados en parafina de los tejidos hepatocelulares, cervicales, colorrectales y carcinomas gástricos, teñidos con anticuerpo anti-CD15 (N = 30 para cada uno). Las fotomicrografías (A) y los análisis estadísticos (B) muestran el neutrófilo en las regiones no tumorales (non-), las zonas intratumorales (intra-) y el estroma peritumoral (peri-) ²⁸.

Mishalian y cols²⁴ analizaron la dinámica de ambos TAN-1 y TAN-2 a lo largo de la progresión tumoral en un modelo experimental. A pesar que no hubo diferencias en el número de TAN durante la progresión del tumor, los autores observaron que durante las primeras etapas del desarrollo del tumor los TAN se localizaron casi exclusivamente en la periferia del tumor, presentando una actividad citotóxica contra las células tumorales (TAN-1). Durante las últimas etapas del tumor la infiltración de neutrófilos fue encontrada repartida entre las células tumorales, con una actividad protumoral (TAN-2).

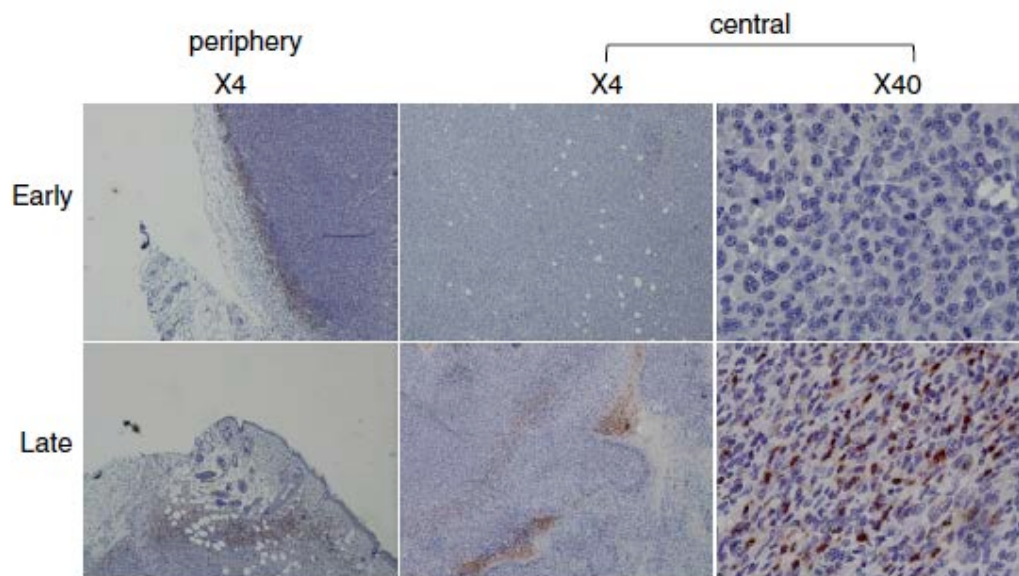


Fig 85. Distribución de la TAN dentro del tumor. Fotomicrografías representativas de secciones tumorales etiquetadas con anticuerpo anti-Ly6G (método inmunoperoxidasa) al principio (7 días: arriba) y al final (14 días: abajo) después de la inoculación de las células AB12. Periferia del tumor en el panel izquierdo y parte central del tumor en el panel central y derecho. La tinción se realizó en 3 ratones distintos de cada grupo, con resultados similares²⁴.

La inducción de la depleción de neutrófilos en las etapas tempranas del desarrollo del tumor no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento tumoral. En contraste, el agotamiento de los neutrófilos que comenzó durante las etapas tardías de desarrollo tumoral, acabó en una reducción significativa en el crecimiento del tumor, que se revirtió cuando terminó el agotamiento de los neutrófilos.

6.2.2 Acción de TAN en la progresión tumoral y la metástasis a distancia

La inflamación es un componente básico de los mecanismos de progresión tumoral, y su rol está siendo cada vez más reconocido en el campo de la investigación. Los neutrófilos son células de vida media corta, pero su ruta apoptótica parece estar abolida cuando forman parte del componente TAN-2³⁵. Es el estudio de Wu y cols²⁸ realizado con tumores de pacientes de carcinoma hepatocelular, cervical, colorectal

y carcinoma gástrico, se evaluó la vida media de neutrófilos cultivados 12 horas con sobrenadante de estos tumores sólidos (TSN). Los TSN presentaron una disminución significativa de su apoptosis respecto a los neutrófilos cultivados en sobrenadante de hepatocitos sanos o sin cultivar. Se observó además una mayor producción de TNF- α y IL-1 β mediante ELISA.

Se intentó identificar la vía responsable de la reducción de la apoptosis celular. Observaron por *immunoblotting* que, respecto los neutrófilos no cultivados o cultivados con hepatocitos sanos, los neutrófilos TSN expresaron un nivel sensiblemente mayor de Mcl-1, una proteína antiapoptótica de la familia Bcl-2 y presentaron una expresión atenuada de Bax, una proteína pro-apoptótica de la subfamilia Bax.

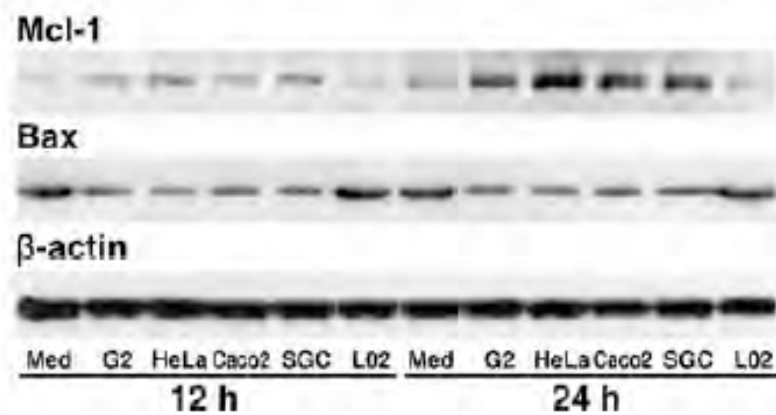


Fig 86. Inducción de neutrófilos de larga vida por TSN a partir de células de tumores sólidos. Los neutrófilos se dejaron sin tratar (Med) o pretratados con polimixina B (PMB, 10 μ g/ml) durante 15 min y luego cultivada en medio solo (Med) o incubado con 30% de sobrenadantes de HepG2 (G2), HeLa, Caco2, SGC-7901 (SGC), o L02 para los tiempos indicados. La expresión de Mcl-1 y Bax se determinó por *immunoblotting*²⁸.

Relacionaron también la vía PI3K/Akt y NF- κ B (complejo proteico que regula la transcripción del ADN) con la activación de los neutrófilos en el ambiente tumoral y su regulación apoptótica. Los TSN presentaron una mayor expresión de P-Akt que los neutrófilos no cultivados. La inhibición de PI3K/Akt con LY10 o LY30 disminuyó la activación de TNF- α y IL-1 β , y de Mcl-1.

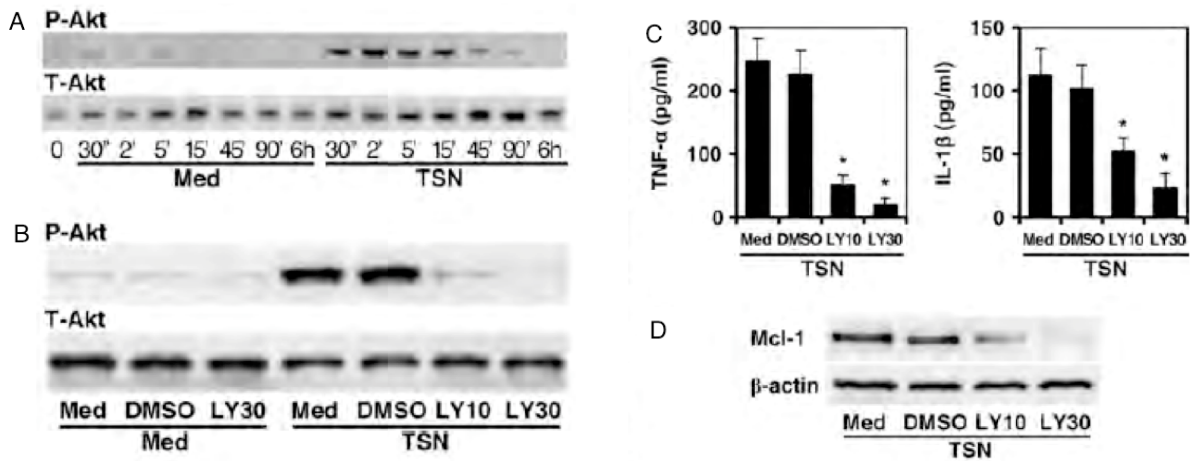


Fig 87. Papel esencial de la señalización PI3K/Akt en la activación de neutrófilos mediada por TSN. (A) Los neutrófilos fueron cultivados solo en medio (Med) o incubado con un 30% de TSN de células HepG2 durante los tiempos indicados. La distribución de la subunidad reguladora PI3K p85 a 15 min y fosforilación de Akt en los tiempos indicados fueron determinados por microscopía confocal e inmunoblotting, respectivamente. (B) Los neutrófilos se dejaron sin tratar (Med) o pretratados con el disolvente dimetilsulfóxido DMSO o DMSO disuelto en inhibidor de la vía PI3K/Akt LY [10 (LY10) o 30 (LY30) μ M] durante 15 min y luego se cultivaron en medio solo (Med) o se incubaron con un 30% de TSN de células HepG2 durante los tiempos indicados. Se muestra la fosforilación de Akt en 15 min (B), la producción de TNF- α e IL-1 β a las 12 h (C), y la expresión de Mcl-1 a las 24 h (D). Todos los datos mostrados son representativos de cuatro experimentos separados. * $p < 0.01$ indica una diferencia significativa con respecto a la exposición a TSN²⁸.

Al examinar el rol de la matriz extracelular del microambiente tumoral, el glicosaminoglicano hialurónico también presentó una capacidad activadora de los neutrófilos, elevó la producción de TNF- α y IL-1 β , y condujo un aumento de la expresión de Mcl-1.

La vía de la diseminación tumoral se ve facilitada con la abolición de la apoptosis de TAN-2. El equipo de Wu²⁸ realizó diversos cultivos para comparar la capacidad transmigratoria tumoral. Ni las células tumorales hepáticas tumorales (HepG2) normales, ni las HepG2 cultivadas con neutrófilos normales, o con neutrófilos de hígado sano (L-PMN) presentaron una actividad migratoria aumentada. Más interesante es el hecho que tampoco las HepG2 puestas en contacto con los productos de los TSN (H-PMN en el esquema) presentaron una actividad migratoria

incrementada. En cambio, el co-cultivo directo de HepG2 con TSN sí presentó una migración celular sensiblemente mayor a los demás cultivos.

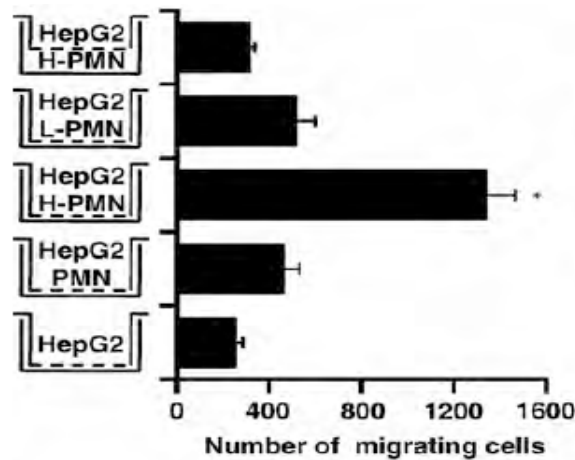


Fig 87. Los neutrófilos activados aumentaron la movilidad de las células cancerosas a través de un mecanismo dependiente del contacto. Ensayo en *transwell chamber* para la migración de células HepG2 en presencia o ausencia de diferentes neutrófilos tratados. Los neutrófilos se dejaron sin tratar (PMN) o incubados durante 12 h con con sobrenadantes de hígado sano (L-PMN) o HepG2 (H-PMN) y o lavados y cultivados con (5 : 1) células HepG2 según se indica. * $p < 0.01$ indica una diferencia significativa con respecto a HepG2 sin co-cultivo²⁸.

Se observó también la capacidad de activación neutrofílica y tumoral por la matriz extracelular tumoral por parte del glicosaminoglicano hialurónico. La inhibición de la ruta anti-apoptótica de los neutrófilos PI3K/Akt con LY10 o LY30 disminuyó consecuentemente la capacidad migratoria tumoral.

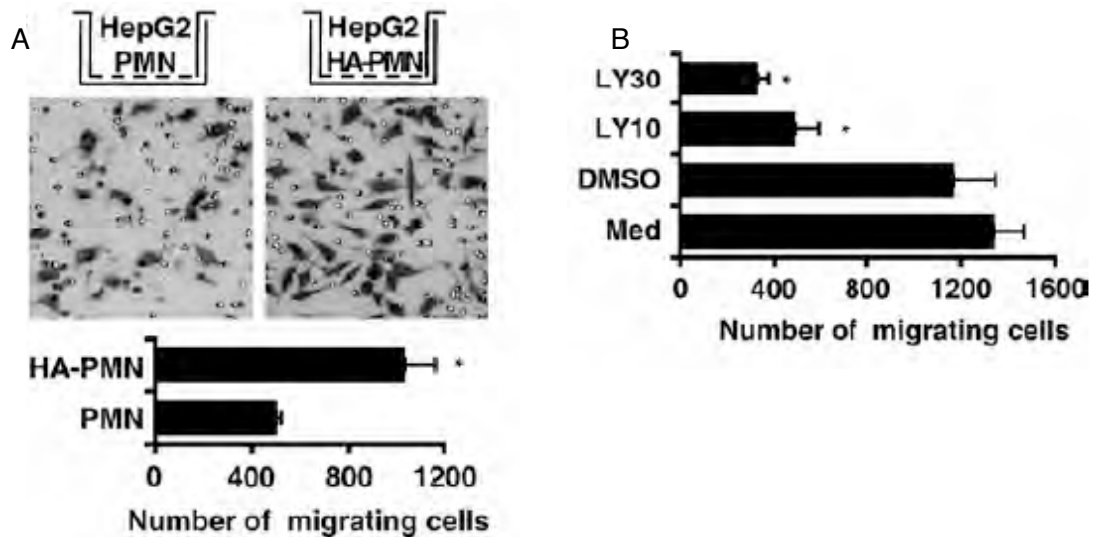


Fig 88. (A) Ensayo en *transwell chamber*: activación de la migración de células HepG2 en presencia del glicosaminoclicano hialurónico activador de los PMN. * $p < 0.01$ indica una diferencia significativa con respecto a HepG2 cultivado con neutrófilos no tratados

(B) Efecto de la inhibición de la señalización PI3K: Los neutrófilos se dejaron sin tratar o pretratados con el disolvente DMSO o LY 294002 disuelto en DMSO[10 (LY10) o 30 (LY30) μM] y, a continuación, se incubaron con las células HepG2 durante 12h. Se midió el número de células que transmigraban a través de las membranas, mucho menor en las células incubadas con neutrófilos tratados con inhibidor de PI3K. Los valores representan la media \pm SE de tres experimentos independientes. * $p < 0.01$ indica una diferencia significativa con respecto HepG2 co-cultivado con neutrófilos expuestos a TSN no tratados²⁸.

De estas observaciones se deduce la necesidad de la capacidad migratoria producida por TAN-2 pero también la necesidad de contacto directo entre las células tumorales y estos neutrófilos para activar la vía metastática. La metástasis a distancia dependería pues de un mecanismo contacto celular-dependiente.

En nuestro estudio, la capacidad de migración de células tratadas con PMN basales o activados por diferentes agonistas no se incrementó, probablemente al no basarse en esta norma contacto-dependiente.

6.3 GENES INVOLUCRADOS CON TAN Y SU RELACIÓN CON LA METÁSTASIS

Se han enumerado mecanismos asociados con el aumento del riesgo de propagación tumoral relacionado con la infiltración tumoral por TAN: el aumento de la capacidad de migración transendotelial de las células tumorales¹³⁵, la secreción local por TAN de proteasas como MMP-9¹³⁶, o la secreción local de citocinas con capacidad de promover la angiogénesis y el desprendimiento de células cancerosas como la oncostatina M¹³⁷.

Actualmente existen varios estudios que valoran la relación de estas proteínas con la metástasis ganglionar, pero son escasos los que analizan esta relación con la aparición de metástasis a distancia, probablemente debido a la menor frecuencia de la diseminación sistémica. En nuestro estudio se observó una relación significativa de la expresión transcripcional de MPO con diversos genes relacionados con vías carcinogénicas relacionadas con el proceso de diseminación.

6.3.1 Prostaglandinas, Tromboxanos, Prostaciclina

Los neutrófilos sintetizan mediadores de lípidos derivados del ácido araquidónico, como los leucotrienos dependientes de 5-lipoxigenasa y la prostaglandina y los tromboxanos, derivados de la ciclooxigenasa (COX)¹³⁸. La PGIS es sintetizada por las células endoteliales y los mastocitos, a partir de PGH₂ por acción de la enzima prostaciclina sintasa (CYP8). La PGIS, junto a las PGE y los TAX, forman parte de la superfamilia de los prostanoides, relacionados en el mecanismo pro-inflamatorio, de crecimiento tumoral y metastático¹³⁹. En nuestro estudio la MPO se relacionó con la síntesis de PGE₂ (mPGES-1), TAXS, (TAXS), PGIS, así como de los receptores específicos (EP2, EP3 y EP4), pero no con COX de manera significativa.

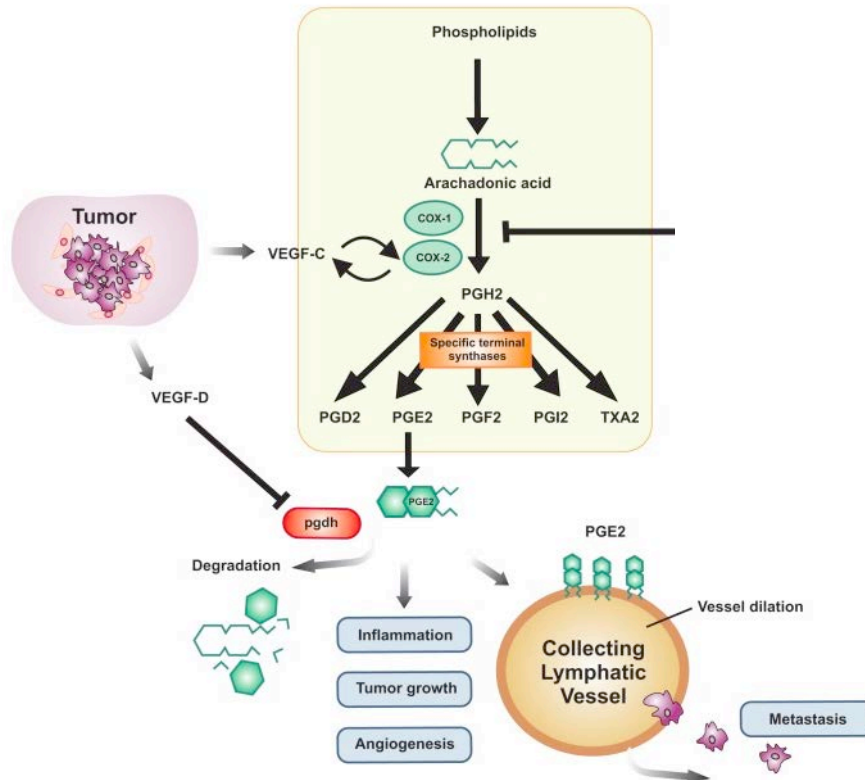


Fig 89. Efecto prometastático de PGE, TAX y COX¹³⁸.

El rol de las prostaglandinas y de COX está íntimamente ligado al de TAN-2. Hattar y cols¹³⁸ observaron una concentración de prostaglandinas PGE₂ significativamente mayor en sobrenadantes de co-cultivo de células de adenocarcinoma pulmonar y neutrófilos que en co-cultivos similares con inhibidores de la COX-2 o en cultivos de células tumorales o neutrófilos aislados. El aumento de la migración celular del adenocarcinoma pulmonar en contacto de TAN-2 fue bloqueado en los co-cultivos al añadirle inhibidores de la COX-2. Por otra parte, el tromboxano A2 ha demostrado inducir la proliferación celular de este tipo de tumores¹⁴⁰.

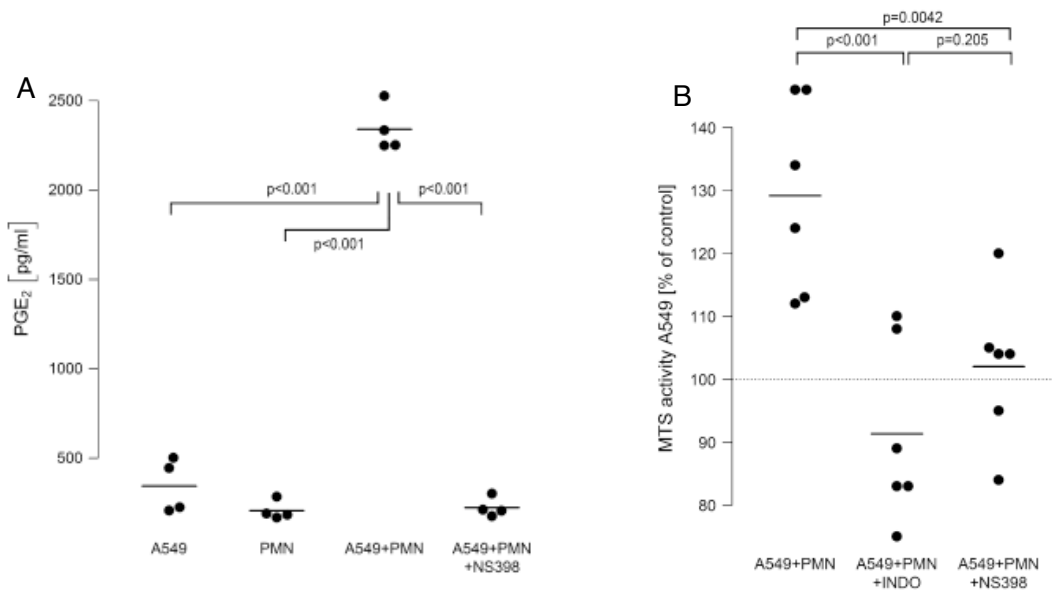


Fig 90. (A) Los neutrófilos (PMN, $7,5 \times 10^6$ ml) y células de adenocarcinoma pulmonar A549 fueron cultivados por separado y estimulados con LPS[$0,1 \mu\text{g/ml}$]. Co-cultivos se realizaron en ausencia (A549 + PMN) o en presencia (A549 + PMN + NS398) del inhibidor COX-2 NS398 ($10 \mu\text{M}$). Después de 6 h, se cosecharon los sobrenadantes celulares y se midió la síntesis de PGE₂. Las barras horizontales indican promedios de cuatro valores independientes experimentos, cada uno realizado en duplicados.

(B) Las células A549 fueron coincubadas con neutrófilos aislados ($7,5 \times 10^6$ ml) en ausencia (A549 + PMN) o presencia del inhibidor inespecífico de la COX indometacina ($100 \mu\text{M}$) (A549 + PMN + INDO) o del inhibidor selectivo de COX-2NS-398 ($10 \mu\text{M}$) (A549 + PMN + NS398), y se midió la movilidad celular. Las barras horizontales indican promedios de seis experimentos independientes, cada uno realizado en triplicados.

A nivel de los CECC, la COX-2 es más abundante en el tejido tumoral y se ha asociado a un grado de mayor neovascularización¹⁴¹. En un reciente estudio¹⁴² se ha observado una mayor expresión de COX-2 en los tejidos malignos que en los tejidos sanos, y significativamente más alta en los tejidos metastásicos. La invasión transendotelial de células tumorales inducida por el factor de crecimiento epidérmico EGF, diana del cetuximab, se reduce significativamente al bloquear el ARN de COX-2; sin embargo, el tratamiento simultáneo con inhibidores de COX-2 con PGE₂ (producto de la COX-2) y EGF restaura la capacidad invasiva. Además, la PGE₂ mejoró la invasión transendotelial y la invasión inducida por el EGF. Sin embargo, al inhibir EGF disminuyó la invasión transendotelial inducida por EGF, pero no por

PGE₂, lo que indica que el PGE₂ no produce sus efectos sobre la función celular sólo a través de la vía del EGF. El bloqueo de la fibronectina abolió la invasión celular inducida por PGE₂, lo que sugiere que la migración celular inducida por el EGF ocurre a través de la activación de PGE₂/COX-2 y de la vía de señalización de la fibronectina.

Las células tumorales pre-tratadas con PGE₂ también mostraron una mayor afinidad para las células endoteliales, esenciales para la metástasis. En un ensayo murino de metástasis *in vivo*, al inyectar células tumorales pretratadas con PGE₂ las metástasis pulmonares se incrementaron significativamente, salvo en los casos tratados con inhibidores de la fibronectina. Estos numerosos resultados indican que la expresión de la proteína COX-2 inducida por el EGF y de la fibronectina es esencial para la metástasis del CECC.

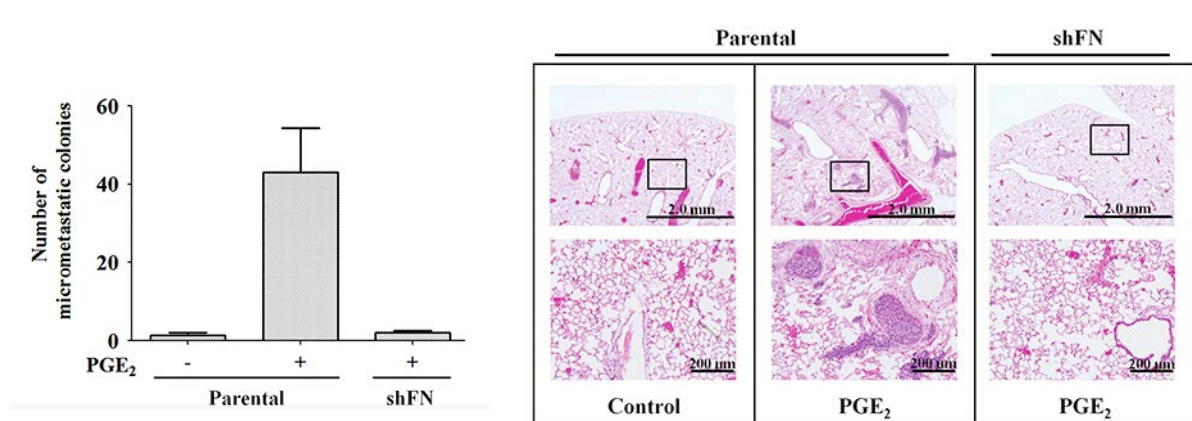


Fig 91. Las células de HONE1 y shFN (fibronectina bloqueada) (1×10^6) fueron tratadas con $10 \mu\text{M}$ PGE₂ y luego inyectadas en la vena de la cola de ratones SCID. Las flechas apuntan a nódulos metastásicos. Las colonias en los pulmones fueron cuantificadas a los 2 meses, y se presenta el promedio¹⁴².

Por otra parte, la cooperación en la señalización activada por COX-2 y EGF es necesaria para la expresión MMP-1, MMP-3 y MMP-9, metaloproteínas también relacionadas con la diseminación tumoral.

Actualmente esta vía prostanoide está siendo objeto de una importante investigación en el desarrollo de nuevos fármacos oncológicos^{140,141,142}.

6.3.2 Glicoproteínas de membrana: CD45

El CD45, también conocido como proteína tirosin-fosfatasa de receptor tipo C, es una molécula de membrana con dominios extra e intracelulares, reguladores del ciclo celular y del crecimiento y diferenciación celular, como receptor de citoquinas, y es ampliamente utilizado como marcador panleucocitario^{143,144}. En el espectro de tumores sólidos, se ha descrito sobretodo como marcador linfocítico peritumoral, y se ha relacionado una alta expresión de CD45 con una mayor supervivencia en cáncer pulmonar de célula pequeña¹⁴⁵ y en cáncer de colon¹⁴⁶. En CECC, se pudo demostrar su ubicación peritumoral¹⁴⁴ y su estrecha relación con el infiltrado linfocítico tumoral^{143,147}.

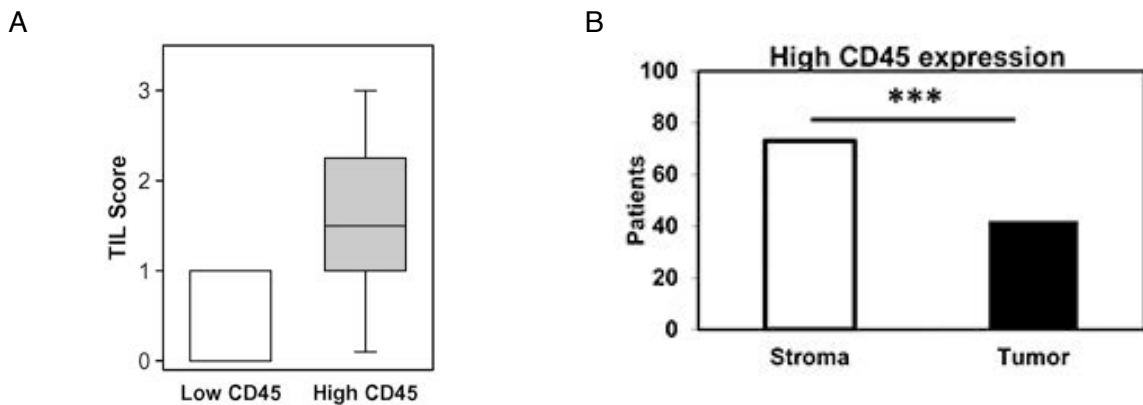


Fig 92. (A) Distribución de los linfocitos tumorales infiltrantes (LTI) puntuación de intensidad (0, ausencia; 1, leve; 2, moderada; 3, severa) según a la expresión transcripcional de CD45¹⁴³. (B) Expresión de CD45 mayor en el stroma que en el tumor¹⁴⁴.

Recientemente los pacientes que expresan un alto nivel de CD45 se han relacionado con un menor riesgo de recidiva local y una alta expresión de CD45 se ha relacionado también en los pacientes tratados con quimiorradioterapia con una mayor supervivencia libre de enfermedad a los 5 años¹⁴³. En pacientes afectados de carcinoma de oro e hipofaringe con metástasis regionales, un alto infiltrado linfocitario peritumoral de LT (CD8) y LB (CD20) determina una mayor supervivencia libre de enfermedad¹⁴⁷.

En nuestro estudio existió una relación significativa entre la expresión transcripcional de CD45, marcadora de infiltrado panleucocitario, y la MPO, marcador neutrofílico.

A partir de los resultados de un estudio previo realizado por nuestro grupo¹⁴³, pudimos determinar que una mayoría de los elementos celulares CD45 positivos presentes en el microambiente tumoral se correspondían con una infiltración linfocitaria. La siguiente figura muestra la distribución en una muestra histológica de CECC de los elementos celulares CD45+ en función de que se tratase de linfocitos T (CD3+), linfocitos B (CD20+), neutrófilos (MPO+) o macrófagos (CD68+).

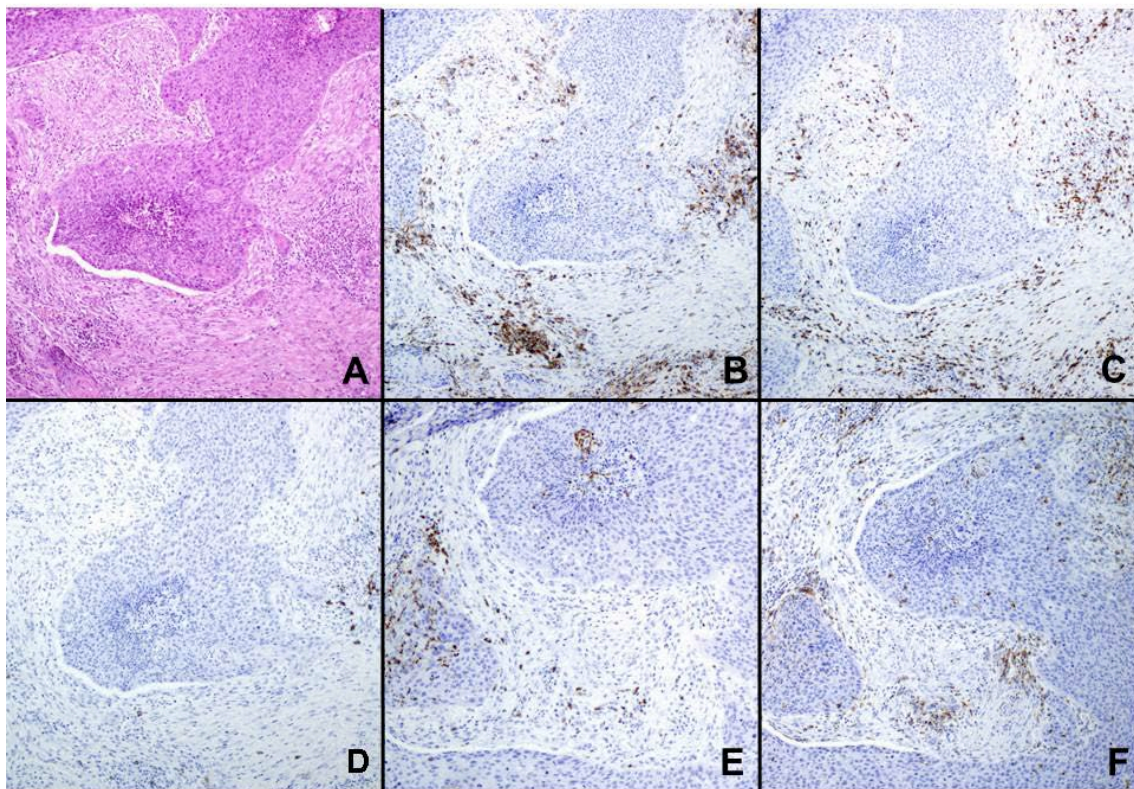


Fig 93. Muestra histológica marcada por CD45+ (B), linfocitos T (C), linfocitos B (D), neutrófilos (E) o macrófagos (F)¹⁴³.

La existencia de una relación entre los niveles de expresión de MPO y CD45 en nuestras muestras vendrían a indicar la existencia de una correlación entre el nivel de infiltración correspondiente a las diferentes líneas leucocitarias.

Höing y cols¹⁴⁴ describieron mediante microarrays en 110 carcinomas escamosos de laringe una relación significativa en el compartimento del estroma tumoral entre el CD45 con el marcador de neutrófilos, monocitos y macrófagos CD11b, con la MMP-9 estromal y la enzima COX-2 intratumoral.

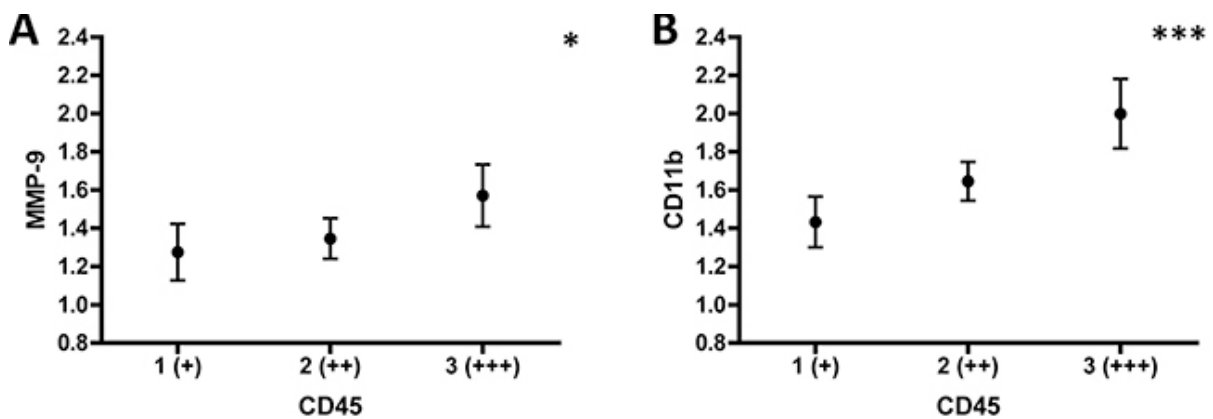


Fig 94. (A) Las medias de expresión del estroma MMP-9 se calcularon usando 1 (+), 2 (++) o 3 (+++) y se trazaron para cada categoría de expresión del estroma CD45. (B) Las medias de expresión del estroma CD11b se calcularon usando 1 (+), 2 (++) o 3 (+++) y se trazaron para cada categoría de expresión del estroma CD45. * indica $p < 0.05$, *** indica $p \leq 0.001$.¹⁴⁴

En sus muestras no encontraron relación entre el grado de expresión de CD45 con el del marcador linfocítico CD3, por lo que los resultados parecen estar provocados por el infiltrado neutrofílico y proinflamatorio. Los niveles elevados de CD45 estromal y CD11b tumoral se relacionaron con una mayor incidencia de metástasis ganglionar y una peor supervivencia, en cambio los niveles altos de CD3 se observaron sobretodo en pacientes sin metástasis regional.

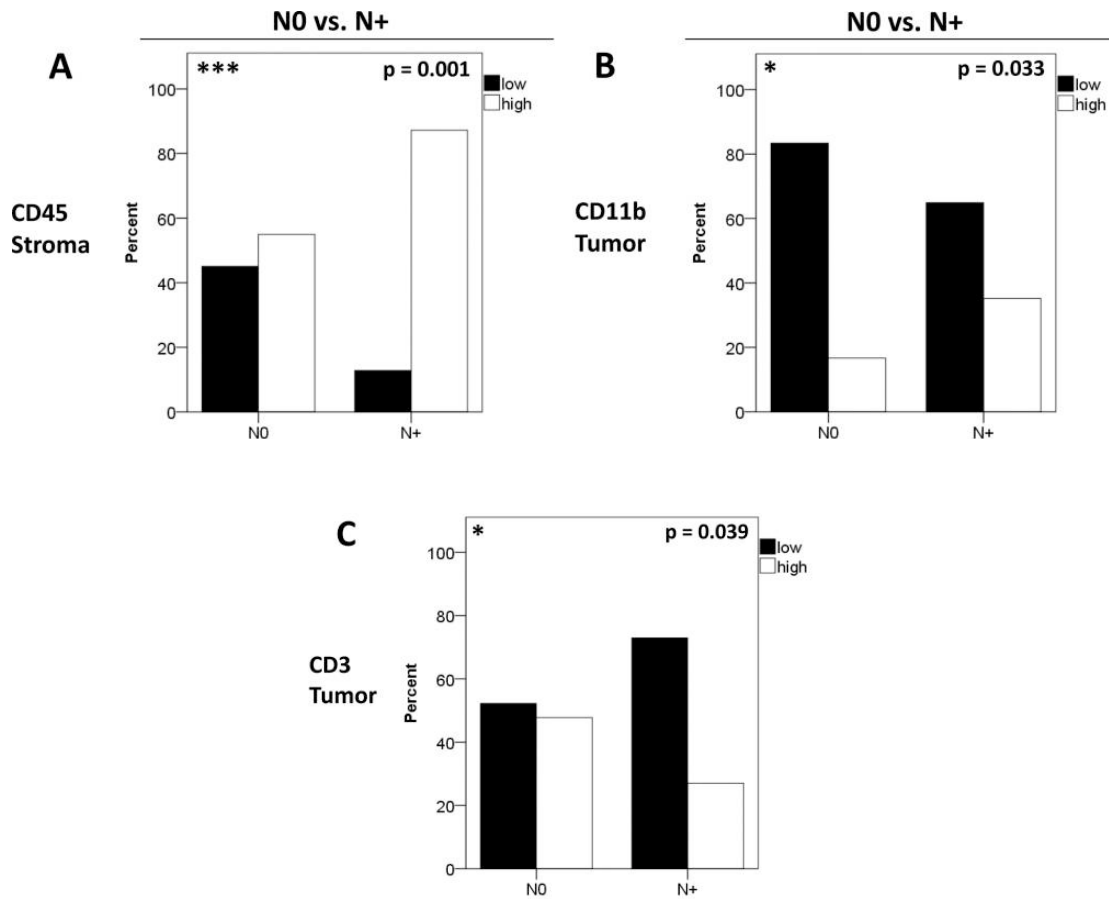


Fig 95. La distribución de la expresión estromal CD45 (A), tumoral CD11b (B), y tumoral CD3 (C) se muestra para N+ versus NO.¹⁴⁴

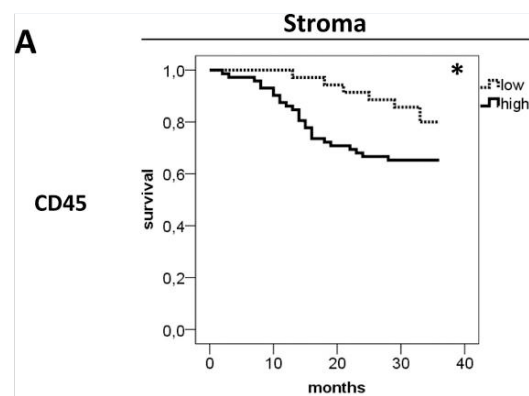


Fig 96. Supervivencia global: la alta expresión de CD45 en el estroma se asoció con una menor supervivencia ($p = 0,047$).¹⁴⁴

A nivel global del paciente, el patrón de infiltración leucocitaria difiere según si se analiza la localización del tumor primario o de las adenopatías metastáticas¹⁴⁷. A nivel local Höing y cols¹⁴⁴ destacaron la importancia de la localización de los marcadores tumorales. Sólo se relacionó significativamente con el grado de metástasis el CD45 estromal y otras moléculas a nivel intratumoral como el CD11b, CD3, o la COX-2, pero no el CD45 intratumoral, ni el CD11b y CD3 estromales. A nivel microscópico, estos hallazgos argumentan a favor de la complejidad de las relaciones microambiente-tumor, y no sólo la importancia de “cuánto” marcador expresa la totalidad del territorio cancerígeno, si no del “dónde” lo expresa.

6.3.3 Citoquinas: MCP-1, RANTES

De acuerdo con nuestros resultados, existió una relación significativa entre la expresión de MPO y la de CCL5 (RANTES) y MPC-1.

CCL5 o RANTES es una molécula quimiotáctica que juega un papel activo en el desarrollo tumoral al reclutar leucocitos en varios tipos tumorales. RANTES derivado de tumor mejora el crecimiento *in vivo* del carcinoma mamario murino a través de la regulación al alza de MMP-9, que favorece la angiogénesis y crecimiento tumoral¹⁴⁸. En CECC, las concentraciones séricas de RANTES son mayores⁷¹, se ha descrito una mayor expresión de mRNA de RANTES en el tejido tumoral, y se ha relacionado con la activación de MMP9 mediante NF-κB y con la capacidad migratoria tumoral^{149,150}.

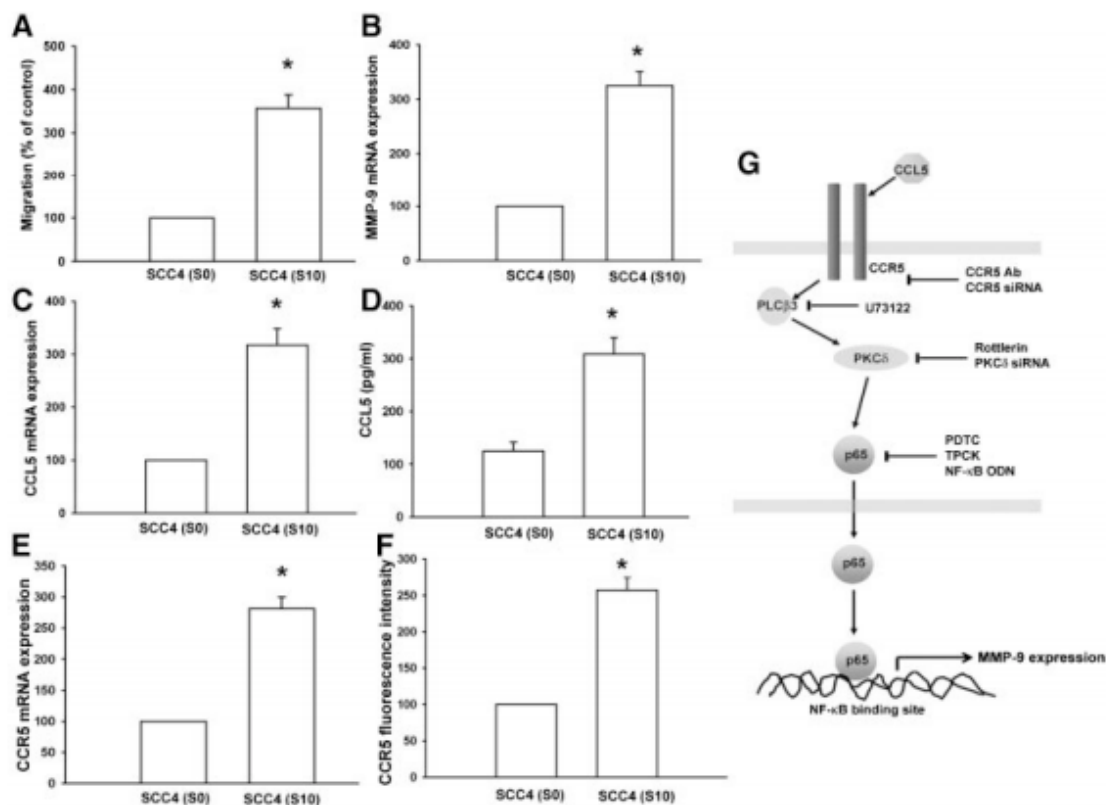


Fig 97. Aumento de la expresión de MMP-13, CCL5 y CCR5 en células propensas a la migración. Después de 10 rondas de selección de células SCC4 por cultivo celular S10, la sublínea propensa a la migración (S10) mostró más migración (A) que las células SCC4 originales (S0). S10 expresó más MMP-9 (B), CCL5 (C) y CCR5 [mRNA (E) y superficie celular (F)] que las células SCC4 originales (S0). $P < 0.05$ comparado con las células SCC4 (S0).

(G) Presentación esquemática de las vías de señalización que intervienen en la migración inducida por el CCL5 y el MMP-9 de las células cancerosas. El eje CCL5/CCR5 activa las vías PLCb3 y PKCd, lo que a su vez induce la activación NF-κB, que favorece MMP-9 y aumenta la migración de las células de cáncer de cavidad oral¹⁴⁹.

MCP-1, ligando de quimioquinas 2 o CCL2, es una molécula implicada en el reclutamiento de monocitos, y también marcadora de un ambiente inflamatorio del microambiente tumoral en CECC¹⁵¹. Una expresión elevada de MCP1 deriva en un elevado reclutamiento de monocitos y conversión en macrófagos, que secretan EGF y favorecen la degradación de la matriz extracelular¹⁵², y se ha relacionado con un mayor riesgo de invasión perineural y de metástasis ganglionares cervicales¹⁵³. La inhibición de MCP1 en modelos murinos se ha traducido en el bloqueo del crecimiento tumoral y el aumento de la supervivencia¹⁵¹.

En definitiva, tanto MCP-1 como RANTES juegan un rol importante en el infiltrado inflamatorio y el reclutamiento leucocitario peritumoral¹⁵⁴, y pese a no ser reclutadoras específicas de los neutrófilos, conviven en el mismo microambiente tumoral que MPO. Su relación con las demás proteínas como las MMP o NF- κ B las convierte en elementos clave en las diferentes encrucijadas de la cascada proinflamatoria y migratoria tumoral.

6.3.4 Metaloproteínas

Las MMP son enzimas proteolíticas dependientes de zinc o cobalto capaces de degradar diversos componentes de la matriz extracelular y la membrana basal. En los CECC se ha demostrado que su presencia es mayor a nivel del estroma peritumoral que en el propio tumor¹⁴⁴.

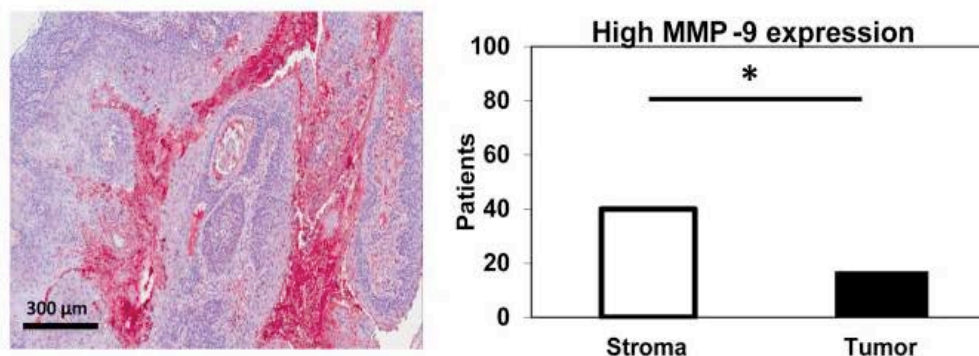


Fig 98. Expresión de MM-P mayor en el stroma que en el tumor¹⁴⁴.

Como se refirió anteriormente, mantienen múltiples relaciones con las diferentes proteínas del microambiente tumoral. La expresión y actividad aumentada de estas enzimas, en particular la MMP-1, MMP-2 y MMP-9 se ha visto relacionada con una mayor invasión, metástasis y peor pronóstico en CECC¹⁵⁵. De acuerdo con nuestros resultados, existió una relación significativa entre la expresión de MPO y la de las metaloproteínas 2 y 9, así como con la del inhibidor específico TIMP-1. En un estudio realizado por O-Charoenrat¹⁵⁶, se encontraron niveles significativamente

más elevados de MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-13 y TIMP-1 en muestras de CECC comparados a muestras de mucosa normal. Se demostró una correlación significativa entre los niveles de MMP-1, MMP-9 y TIMP-1 y el estadio T avanzado, y entre la expresión de MMP-9 y un patrón infiltrante de crecimiento. Clasificaron los pacientes en cuatro grupos según los valores de mRNA de MMP-2 y de MMP-9, y se observó una relación directa entre la existencia de afectación ganglionar y la expresión de MMP-2 y MMP-9 en las muestras de tumor. Todos los pacientes que expresaron un nivel elevado de mRNA de MMP-2 y de MMP-9 presentaron afectación ganglionar, si bien sólo la MMP-9 presentó por sí misma una relación estadísticamente significativa con la aparición de metástasis regional.

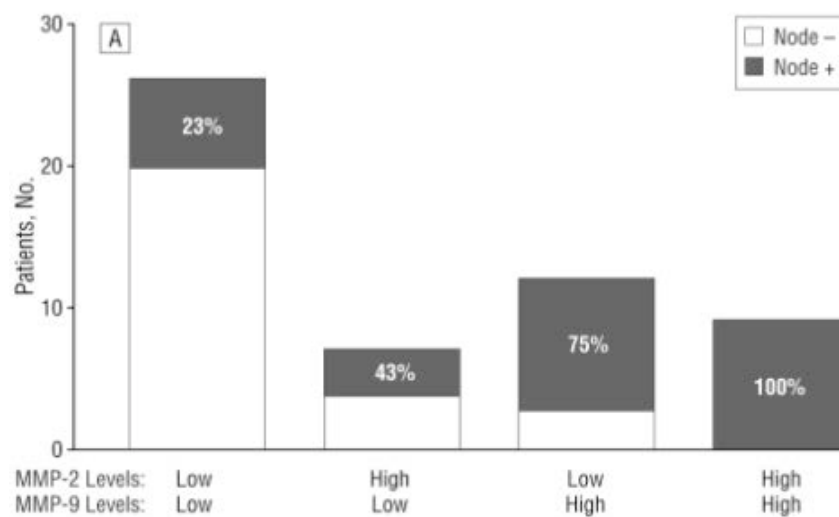


Fig 99. Niveles de MMP-2 y MMP-9 en relación a la aparición de metástasis regional en CECC¹⁵⁶.

6.3.5 Factores reguladores de la transcripción: NF-κB

El factor nuclear kappa de células B activadas (NF-κB) comprende una familia de cinco factores de transcripción que forman distintos complejos de proteínas, que se unen a secuencias de ADN de regiones promotoras de genes sensibles que regulan los procesos celulares. De acuerdo con nuestros resultados, existió una relación significativa entre los niveles de expresión transcripcional de MPO y los de NF-κB.

La vía NF-κB no sólo promueve la proliferación de células tumorales, suprime la apoptosis, y atrae la angiogénesis, sino que también induce la transición epitelial-mesenquimal, que facilita la metástasis a distancia¹⁵⁷. La supresión de la NF-κB en células mieloides o células tumorales suele conducir a la regresión tumoral. La vía NF-κB está relacionada con la supervivencia intrínseca de los neutrófilos peritumorales. En el estudio previamente descrito de Wu²⁸, la inhibición de NF-κB tratando los neutrófilos TAN2 con B10, un inhibidor de NF-κB, se tradujo en un aumento de la apoptosis celular.

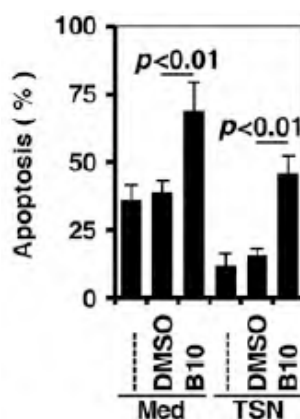


Fig 100. Porcentaje de apoptosis en células tumorales incubadas en medio simple (Med), o en medio de TSN, con disolvente (DMSO) o disolvente el con inhibidor de NF-κB (B10)²⁸.

Una posible ruta de NF-κB implicada en la diseminación metastática ganglionar en CECC ha sido recientemente descrita por Liu y cols¹⁵⁸, proponiendo una activación inicial por TNF-α, que iniciaría la vía del factor nuclear, lo que estabilizaría la proteína Slug, conocida por ser un factor de transcripción relacionado con la transición epitelial-mesenquimal. Niveles elevados de Slug provocan una inhibición de E-cadherina, molécula de adhesión cuya disminución ha sido relacionada con la metástasis a distancia en pacientes con CECC^{129,133}. Sólo los inhibidores de NF-κB lograron bloquear la estabilización de Slug por parte de TNF-α. Se observó un aumento de la transmigración celular en un ensayo *in vitro* de herida al tratar las células con TNF-α, y una relación significativa entre la expresión de la proteína Slug y la metástasis ganglionar tumoral, que derivó en una menor supervivencia global en los pacientes con alta expresión de esta proteína.

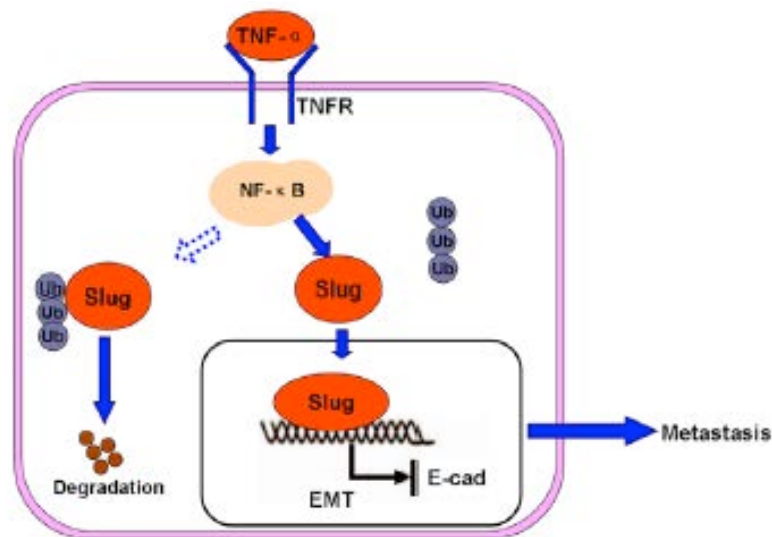


Fig 101. Modelo de estabilización de Slug mediante TNF-α¹⁵⁸.

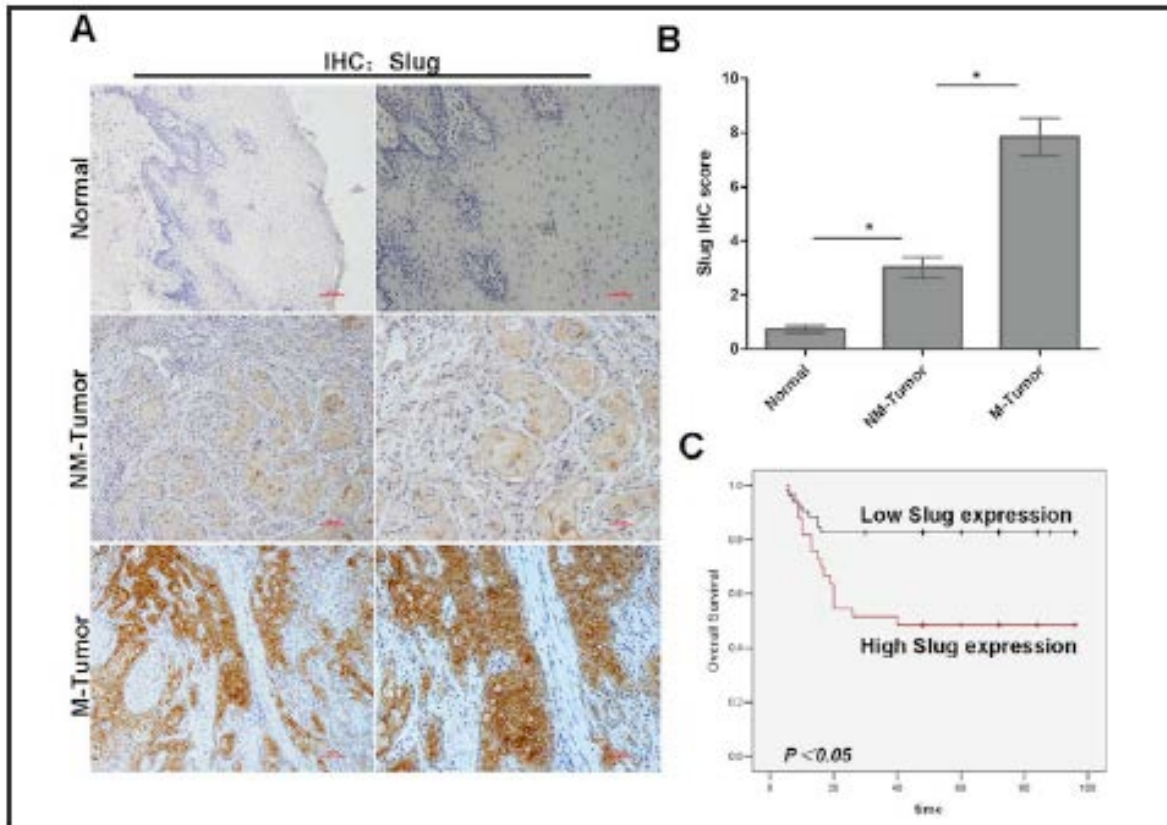


Fig 102. (A) El tejido normal y muestras de CECC N0 presentaron una baja expresión de Slug, al contrario que los N+. (B) IHC de expresión de Slug en condiciones normales y muestras CECC N0 y N+ ($P < 0.001$). (C) La alta expresión de Slug se correlacionó significativamente con una tasa de menor supervivencia ($P < 0,05$)¹⁵⁸.

He y cols¹⁵⁹ obtuvieron un incremento en la trans migración celular al cultivar células de hepatoma con neutrófilos cultivados en TSN, resultado que se atenuó al usar un inhibidor de NF- κ B.

6.3.6 Genes relacionados con el estrés oxidativo: SOD

Los TAN-2 activados liberan el anión superóxido (O_2^-) y ácido hipoclorídrico, por efecto de la MPO. En concentraciones bajas, estas sustancias pueden no ser citotóxicas sino genotóxicas, y por lo tanto promover la progresión tumoral. SOD es activado para intentar proteger las células humanas de los radicales libres convirtiendo los radicales superóxidos en H_2O_2 y oxígeno, y en consecuencia ha sido ampliamente usado como marcador del estrés oxidativo. Por tanto, su relación con la MPO parece ser constante, como en nuestro estudio. Existen tres familias de SOD, dependiendo del metal usado como cofactor. La familia SOD2, también llamada Mn-SOD, es la isoforma mitocondrial que contiene magnesio, y ha sido la que más se ha relacionado con fenómenos inflamatorios perineoplásicos¹⁶⁰. El polimorfismo que causa una alta expresión de MPO y el del SOD-2 se ha relacionado con un mayor riesgo de carcinoma escamoso de cavidad oral¹⁶⁰ y de adenocarcinoma de páncreas, de manera que el riesgo fue aditivo cuando ambos polimorfismos se presentaron a la vez¹¹⁴.

El nivel de expresión de SOD-2 es diferente según la localización del tumor, y es mayor a nivel tumoral respecto a tejido sano en tumores de laringe y de cavidad oral^{161,162}, pese a que parece que la expresión elevada aparece en etapas más tempranas de la carcinogénesis de la cavidad oral que la laríngea.

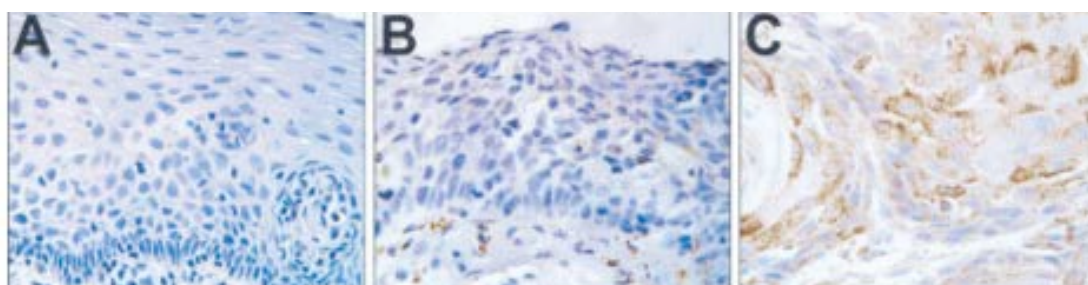


Fig 103. Expresión de SOD en epitelio sano (A), lesión displásica y carcinoma escamoso de laringe¹⁶².

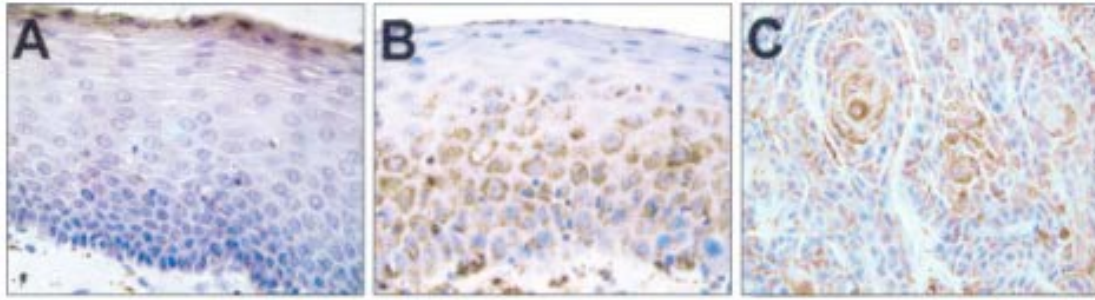


Fig 104. Expresión de SOD en epitelio sano (A), lesión displásica y carcinoma escamoso de cavidad oral¹⁶².

Su relación con la diseminación tumoral no está claramente definida, aunque en un estudio reciente en 88 pacientes afectados de CECC, la actividad de SOD plasmático fue relacionado con un mayor riesgo de metástasis adenopática regional¹⁶³.

Un elemento a destacar de nuestros resultados es el elevado nivel de correlación encontrado entre los niveles de expresión de MPO y los correspondientes a las diferentes SOD.

6.4 ENZIMA MPO COMO BIOMARCADOR DE TAN Y FACTOR PRONÓSTICO DE LA METÁSTASIS A DISTANCIA EN LOS CECC

Considerando la expresión de mRNA de la MPO como un marcador indirecto de la presencia de TAN en el microambiente tumoral, los resultados de nuestro estudio muestran una relación significativa entre la infiltración de TAN y la aparición de metástasis a distancia en pacientes con CECC. De acuerdo con los resultados de nuestro estudio multivariante, los pacientes con alta expresión de MPO tienen 7.7 veces más riesgo de desarrollar metástasis a distancia que los pacientes con una baja expresión de MPO. Esta asociación entre la expresión de MPO y las metástasis no está relacionada con el control del tumor a nivel loco-regional. Un estudio inmunohistoquímico validó el hallazgo de la relación entre la expresión transcripcional de MPO y la aparición de metástasis a distancia.

Estudios realizados en pacientes con carcinomas localizados en la cavidad oral⁸¹, orofaringe⁷², laringe⁷³ o CECC⁷¹ que evaluaron la presencia de TAN con inmunohistoquímica en muestras tumorales, han encontrado una relación entre la infiltración de neutrófilos y la supervivencia, pero no proporcionan una relación con la probabilidad de recurrencia loco-regional o a distancia. Hasta donde sabemos, nuestro estudio es el primero en asociar el grado de infiltración de TAN en el tumor, medido indirectamente evaluando la expresión de MPO, con el riesgo de metástasis a distancia en pacientes con CECC.

La presencia de TAN en el tumor se ha relacionado con un aumento de metástasis a distancia en pacientes con adenocarcinoma gástrico⁶⁸ y en modelos experimentales de carcinoma de mama^{137,164} y sarcoma¹⁶⁵.

En un modelo de CECC *in vitro*, Dumitru y cols⁵⁷ presentaron una asociación entre MIF, una citoquina liberada por el tumor que desencadena el reclutamiento de neutrófilos, y una promoción de la migración de las células tumorales a través de

factores liberados por los neutrófilos. Observó que la expresión tumoral del MIF se relacionaba con el grado de infiltración neutrófilica. La tinción del MIF y de CD66b como marcador de neutrófilos mostró una relación proporcional entre tres grupos distintos de intensidad de expresión de MIF y el grado de infiltración de células CD66b-positivas.

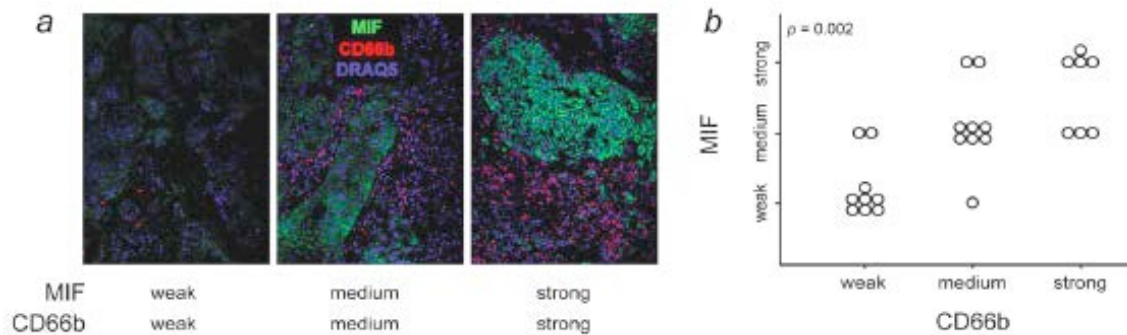


Fig 105. La expresión de MIF por el tumor es proporcional al grado de infiltración neutrófilica: Secciones congeladas de tejidos de HNC fueron teñidas doblemente contra MIF (verde) y CD66b (rojo). DRAQ5 (violeta) se utilizó para visualizar los núcleos. Se muestran ejemplos de tinciones "débiles", "medianas" y "fuertes" para MIF y CD66b. b) La intensidad de la expresión MIF por el tumor y el grado de infiltración de células CD66b-positivas se trazaron para cada paciente. $P < 0,05$ ⁵⁷.

En este estudio se estableció una relación significativa entre la intensidad de la expresión de MIF y el estadio de metástasis linfática regional o estadio N.

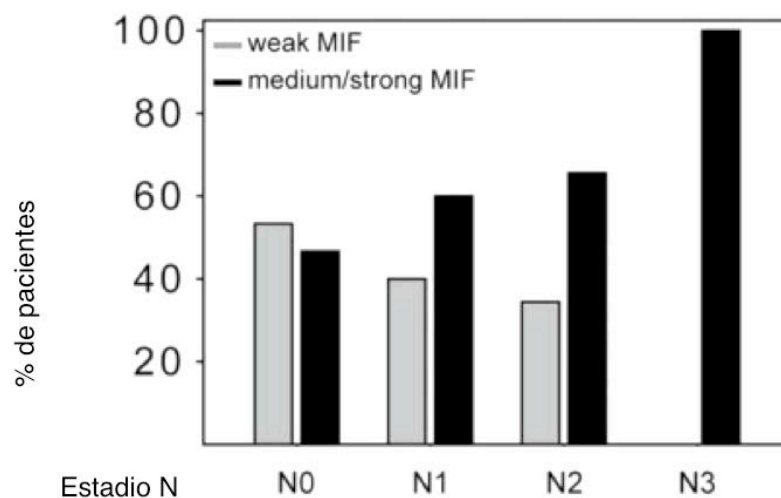


Fig 106. La expresión de MIF por el tumor está asociada con metástasis regional⁵⁷.

La afectación ganglionar cervical es uno de los factores pronósticos de supervivencia más importantes en los CECC. Dimitru dividió los pacientes en dos grupos según la intensidad de tinción MIF del tejido tumoral, observando una relación estadísticamente significativa ($p=0.013$) entre el nivel de expresión de MIF y la supervivencia global a los cinco años.

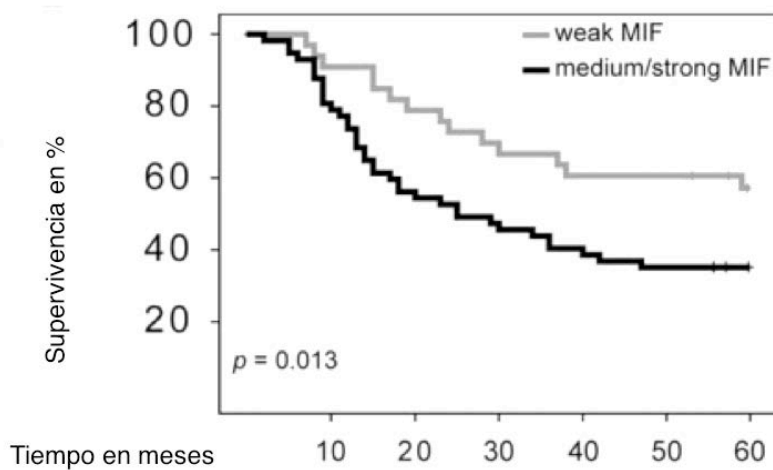


Fig 107. La expresión de MIF por el tumor está asociada con peor supervivencia global⁵⁷.

A nivel de cavidad oral, Lee y cols¹⁶⁶ observaron la presencia del enzima prooxidativa glutathion peroxidasa en el microambiente tumoral de carcinomas escamosos de cavidad oral. Encontraron una relación significativa entre niveles elevados de esta enzima y una mayor afectación ganglionar ($P<0,001$), una menor supervivencia libre de enfermedad (70% vs. 59%), y una menor supervivencia global (64% vs. 52%), $P=0,02$ y $P=0,01$ respectivamente.

6.5 PERSPECTIVAS SOBRE LA UTILIDAD DE LA CUANTIFICACIÓN DE LA MPO EN LA PLANIFICACIÓN DE TRATAMIENTO DE CECC.

Con los conocimientos actuales es inviable imaginar una progresión tumoral sin el rol fundamental de su microambiente. Hasta ahora el riesgo de aparición de metástasis a distancia se había relacionado con las variables clínicas y patológicas como la localización del tumor primario, la extensión local y regional, o la presencia de ganglios metastásicos en el cuello con extensión extracapsular^{117,118,119,120}. Pero, como se ha descrito anteriormente, varios autores han encontrado una relación significativa entre el riesgo de aparición de metástasis a distancia y la disminución de la regulación de la desmoplakina¹²⁴, la citoqueratina-19¹²⁶ o la cadherina E^{127,128}, o la sobreexpresión de la $\alpha\beta$ -cristalina²³. Estos hallazgos abren una nueva dimensión sobre el conocimiento oncológico, en la que no solo importa la “forma” del tumor, si no el “fondo”. Por una parte, estos nuevos actores de la progresión oncogénica pueden ser objetos de nuevos tratamientos diana. Por otra parte, la información sobre el funcionamiento y las características internas de cada proceso tumoral permite obtener un carnet de identidad propio de éste, y en un futuro, posiblemente proponer tratamientos personalizados a cada paciente.

6.5.1 Desarrollo de nuevos fármacos oncológicos

Están en fase de desarrollo o de aprobación por la federación americana de medicamentos como tratamientos oncológicos nuevos agentes biológicos relacionados con el infiltrado tumoral. La citoquina pro-inflamatoria IL-1 es una molécula relacionada directamente con el desarrollo de metástasis a distancia, pero también con enfermedades de índole inflamatoria, autoinmune o metabólica¹⁶⁷. El Anakinra, una versión recombinante del receptor antagonista de IL-1 (IL-1Ra) que se

une a los receptores sin transmitir la señal de activación y previene la unión de la IL-1 α o IL-1 β a su receptor, está siendo estudiado para pacientes con tumores de CECC metastásicos en quienes ha fallado la quimioterapia de primera línea o se han negado a recibir tratamiento adyuvante estándar¹⁶⁸.

Si nos centramos en la MPO, según nuestros resultados ésta enzima juega, a nivel oncológico de cabeza y cuello un rol como marcadora del infiltrado neutrofílico tumoral, pero sin contar con una capacidad directa de modificar vías relacionadas con la aparición de las metástasis a distancia. Sin embargo, la MPO también es responsable de múltiples efectos sistémicos inflamatorios neurológicos^{99,100}, reumatológicos o cardiovasculares⁹⁸, y actualmente se están dando los primeros pasos en la búsqueda de inhibidores eficaces y efectivos pero también seguros para el paciente.

El problema principal del desarrollo de inhibidores de la MPO consiste en el riesgo de afectar también la respuesta inmunológica innata del organismo, aunque probablemente las concentraciones de un medicamento necesarias para obtener un efecto antiinflamatorio o cardioprotector serían menores a las pudieran tener un efecto sobre el sistema inmune¹⁶⁹. Existen dos tipos de inhibidores: los inhibidores reversibles y los irreversibles. Debido a su estructura molecular, la MPO puede disociarse fácilmente de un inhibidor reversible, por lo que los inhibidores irreversibles, que provocan el “suicidio” de la enzima representan actualmente la principal línea de investigación¹⁷⁰. No existe gran variedad de inhibidores específicos en el mercado farmacéutico actual, debido a que los inhibidores más conocidos son reversibles, y que la concentración de varias moléculas efectivas *in vitro* es incompatible con un uso *in vivo*.

Bensalem y cols¹⁷¹ demostraron al estudiar la planta de medicina tradicional *Peganum harmala* que su efecto antiinflamatorio radica en la inhibición de la MPO. Su uso se centra en tratamientos tópicos debido a sus efectos secundarios sistémicos. Pese a esto, los alcaloides de la semilla son altamente lipofílicos, y al poder penetrar fácilmente la barrera hematoencefálica podrían ser en un futuro un factor protector de los tejidos del sistema nervioso central frente a los daños inducidos por la MPO (Alzheimer...).

Varios estudios han demostrado la inhibición de la MPO por parte de medicamentos comercializados como los antiinflamatorios no esteroideos¹⁷², los inhibidores de la recaptación de serotonina¹⁷³, o la dapsona¹⁷⁴.

Por otra parte, un grupo de sustancias derivadas del *3-alkyl-5-fluoroindole*, capaces de realizar una inhibición de la MPO con una baja concentración, han demostrado resultados en enfermedades crónicas inflamatorias (arteroesclerosis, enfermedad de Alzheimer, Parkinson...) ¹⁷⁵ y en el tratamiento del cáncer de próstata¹⁶⁹. También se ha descrito la *4-aminobenzoic acid hydrazide* como potente inhibidor de la MPO¹⁷⁶.

Recientemente, Liu y cols¹⁷⁷ presentaron el INV-315, una pequeña molécula inhibidora de la MPO que ha demostrado reducir la aterosclerosis y mejorar la función vascular mediante la atenuación de la inflamación, el estrés oxidativo y el aumento del flujo y eliminación del colesterol en modelos murinos. Obtuvieron una disminución significativa de placa de aterosclerosis en la aorta ($p < 0,05$).

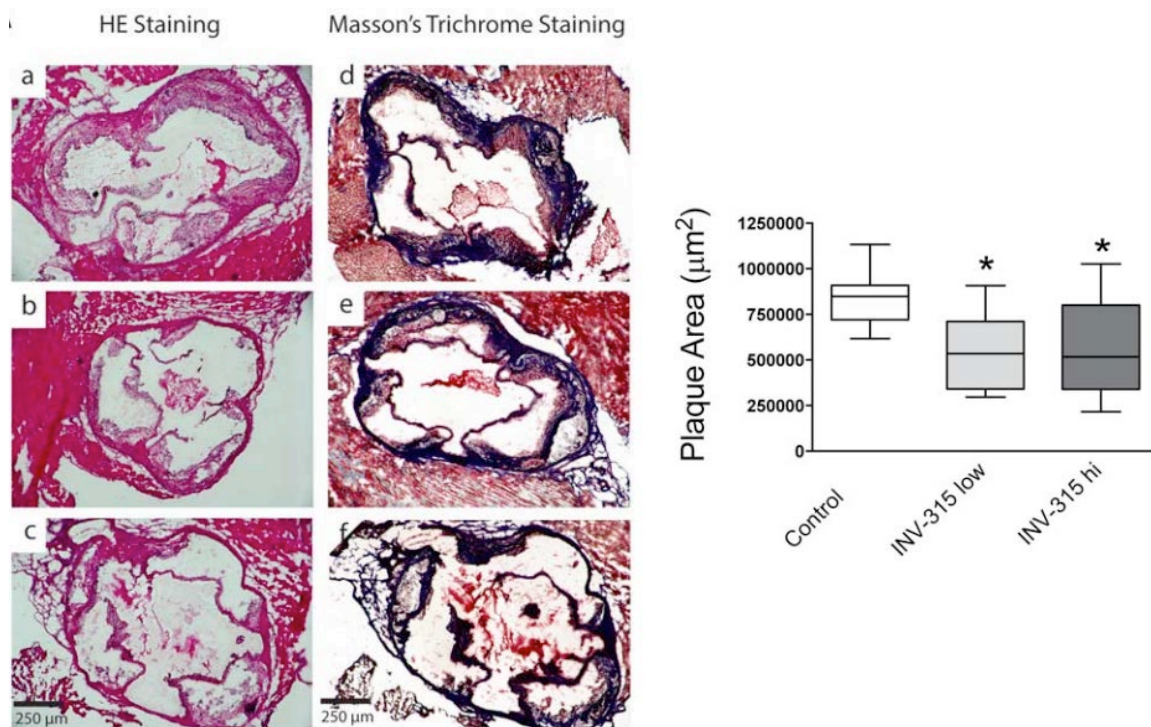


Fig 108. Imágenes del seno aórtico teñido con tinción de H&E y tinción de tricrómico de Masson a partir de ratones ApoE2/2 alimentados con HFD tratados con placebo (a y d) como control o dosis baja (b y e) o dosis alta (c y f) de INV315, y la cuantificación de área de placa absoluta $P < 0.05$.¹⁷⁷

A nivel celular obtuvieron una disminución del porcentaje de los monocitos inflamatorios CD11b+Ly6Glow/7/4^{hi} circulantes en sangre con el tratamiento intensivo. A nivel molecular, con las diferentes dosis de INV-315 no observaron diferencias en sangre de IFN- γ , IL-10, TNF- α , o de las quimiocinas CCL-2 (MCP-1), CCR-2, CCL-5 (RANTES), CCR-5. Sí apreciaron una reducción significativa de IL-6 circulante, molécula clave en la artritis reumatoide, el mieloma múltiple y la diseminación metastásica del cáncer de próstata^{178,179}. La IL-6 es la diana molecular del anticuerpo monoclonal humano Tocilizumab o el anticuerpo monoclonal quimérico humano-murino Siltuximab¹⁸⁰. El efecto del fármaco parece demostrarse específico para la MPO y no afectar las demás cascadas inflamatorias.

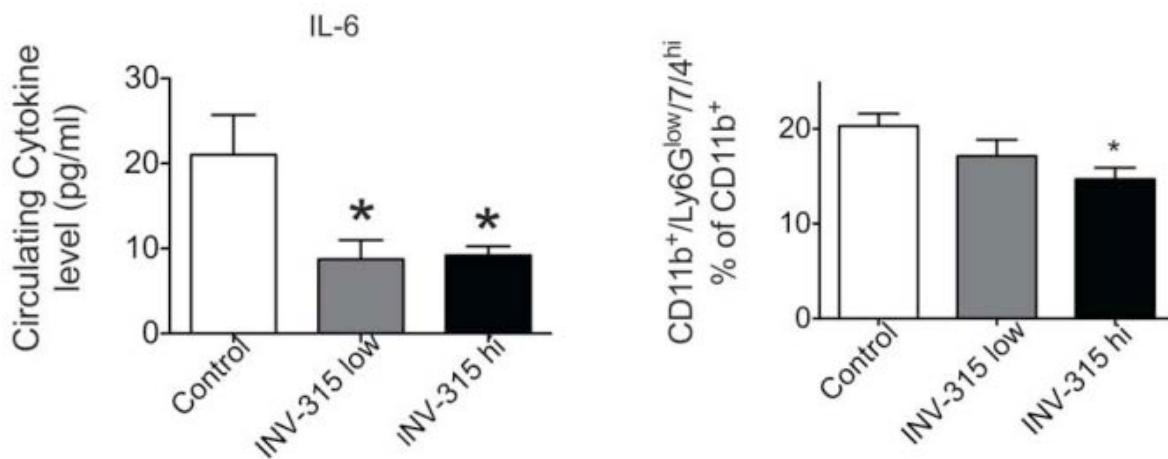


Fig 109. Concentración de IL-6 en respuesta a INV-315 en ratones ApoE2/2 y concentración de monocitos inflamatorios teñidos para CD11b+Ly6Glow/7/4^{hi} en respuesta a INV-315. *P<0.05 comparado con el grupo de control.¹⁷⁷

A nivel oncológico, los tratamientos basados en la topoisomerasa II han sido usados como anticancerígenos, pero se han asociado a la aparición de leucemias mieloides agudas secundarias¹⁸¹, por la conversión de este fármaco por parte de la MPO en etopósido y mitoxantrona, que acumulados inducen la ruptura de la doble cadena del ADN en los locis MLL y RUNX1 y su posterior transformación leucémica¹⁸². Se está investigando inhibidores específicos para la MPO con la finalidad de evitar este efecto secundario de los fármacos oncológicos basados en la topoisomerasa II.

Nuestros resultados no evidencian un efecto directo de la MPO en la aparición de metástasis a distancia en los CECC. Su papel parece definido como marcador del infiltrado neutrofílico, por lo que no parece que un inhibidor de la MPO tuviera un efecto protector frente la diseminación tumoral. Pese a esto, no se puede descartar que un fármaco anti-MPO pudiera ser beneficioso contra los efectos inflamatorios tumorales.

6.5.2 Adaptación del tratamiento quimioterápico según grado de expresión de MPO

Existen pruebas que la quimioterapia disminuye la tasa de metástasis a distancia en CECC¹⁸³. Dada la toxicidad asociada con el tratamiento con quimioterapia, la posibilidad de identificar a los pacientes con una mayor frecuencia de metástasis permitiría la posibilidad de proponer este tratamiento a pacientes de alto riesgo. Creemos que la combinación de la capacidad pronóstica de las características clínico-patológicas y moleculares del tumor podría ayudarnos a definir el grupo de pacientes con mayor riesgo de metástasis a distancia.

Según nuestros resultados, la frecuencia de metástasis a distancia en el grupo de pacientes clínico-patológicos de alto riesgo con baja expresión de MPO fue muy similar a la de los pacientes con factores clínico-patológicos de bajo riesgo, mientras que en el grupo de pacientes clínico-patológicos de alto riesgo con alta expresión de MPO la frecuencia de metástasis a distancia a los cinco años aumentó al 42%.

El hallazgo del bajo porcentaje de metástasis a distancia (7%) en el grupo de pacientes de alto riesgo clínico-patológico pero baja expresión de MPO abre la posibilidad de desescalar el tratamiento sistémico en este grupo de pacientes. Serían necesarios estudios de validación retrospectivos, así como estudios prospectivos para verificar si esta estrategia de combinar factores pronósticos clínicos y biológicos permite identificar el grupo de pacientes de alto riesgo que se

beneficiaría del uso de tratamientos sistémicos, ahorrando la toxicidad asociada a este tipo de terapias al resto de los pacientes.

Por otra parte, otros marcadores como el infiltrado linfocitario tumoral pretratamiento se han relacionado con una buena respuesta a la quimioterapia de inducción en CECC¹⁸⁴, aunque en nuestro conocimiento ningún estudio ha analizado el infiltrado neutrofílico con la respuesta al tratamiento en estos pacientes.

6.6 ROL DE LA MPO EN LA INFECCIÓN Y CONSECUENCIAS DEL HPV

La MPO juega un rol fundamental en la respuesta innata del organismo. Mediante la producción de radicales libres y cloraminas edifica la primera barrera de protección frente al ataque de organismos patógenos como los virus¹⁸⁵.

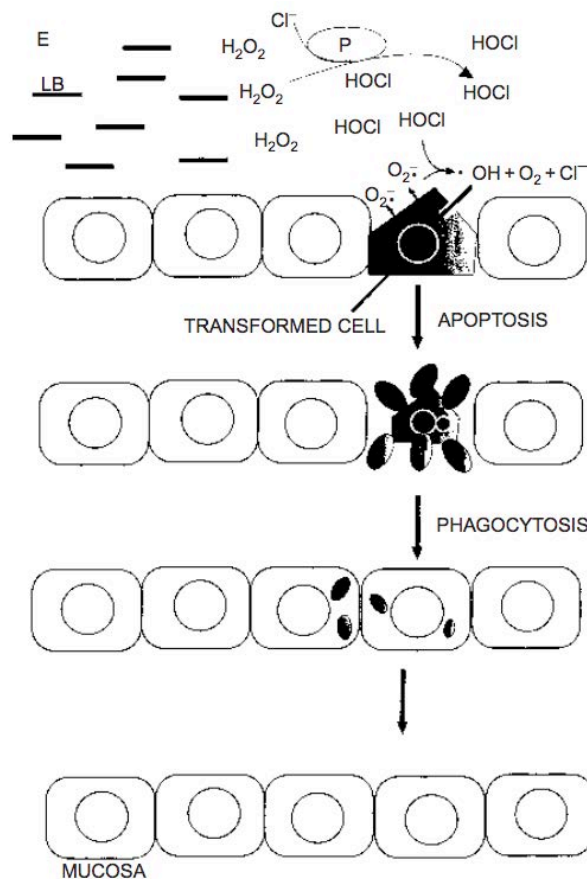


Fig 110. Esquematización de la inducción de apoptosis selectiva de las células transformadas por la interacción $HOCl$ /superóxido aniónico. Las células transformadas (negro) dentro de la mucosa se caracterizan por producción de aniones de superóxido extracelular y $NAD(P)H$ y son atacadas por $HOCl$ de los lactobacilos, que precipitará su apoptosis.¹⁸⁵

A nivel ginecológico, el papel protector a nivel de la mucosa vaginal ejercido por el H₂O₂ frente a infecciones víricas fue descrito ya hace años por Martin y cols¹⁸⁶. Se observó una relación entre la deficiencia de lactobacilos y la menor producción de radicales libres en mucosa y una predisposición a la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

Tabla 12. Relación entre el estatus de lactobacilos y la predisposición a VIH y gonorrea¹⁸⁶.

Modelo	Adquisición del VIH-1			Adquisición de la gonorrea		
	HR	IC 95%	P	HR	IC 95%	P
Ausencia de lactobacilos	1	-	-	1	-	-
Ausencia de lactobacilos	2	1,2-3,5	0,01	1,7	1,1-2,6	0,02
Lactobacilos no productores de H ₂ O ₂	1,7	0,6-4,7	0,3	1,2	0,6-2,7	0,6
Flora vaginal anormal	1,9	1,1-3,1	0,02	1,2	0,8-1,9	0,4

La infección cérvico-vaginal por VPH ha sido ampliamente reconocida como precursora de la neoplasia intraepitelial cervical, y la persistencia de la infección ha sido descrita como causa necesaria pero no suficiente. En esta primera etapa, la respuesta inmune del huésped juega un rol crucial y, efectivamente, se ha observado una actividad disminuida de la MPO en pacientes afectas de cáncer de cérvix^{113,187}.

Gardella y cols¹⁸⁸ evaluaron la respuesta del sistema inmunológico innato de la mucosa en 38 pacientes afectadas por la infección primaria por VPH, y analizaron la actividad de la lactoferrina (LF) y de la MPO. La lactoferrina es una glicoproteína fijadora de hierro importante del sistema inmunológico, presente en las secreciones mucosas y en las vesículas de los neutrófilos, e inductora de la regulación de las células NK, monocitos/macrófagos, y granulocitos de la respuesta primaria en procesos víricos^{189,190}. Este grupo de estudio comparó la presencia de estas dos proteínas entre 19 mujeres-caso con infección de VPH (“VPH-positivas”) y 19 mujeres-control sin infección de VPH (“VPH-negativas”).

Se midió la expresión de los receptores de LF y de MPO de las células polimorfonucleares y se clasificó en 4 categorías: MPO+/LF+ si expresaban los dos receptores, MPO-/LF+ si sólo presentaban receptores de LF, MPO+/LF- en caso de presencia exclusiva de receptores MPO, y MPO-/LF- en caso de ausencia o casi ausencia de ambos receptores. Si bien los niveles séricos de MPO y de LF fueron similares en ambos grupos, la mucosa de las pacientes HPV-positivas presentó una tendencia a tener menos receptores de MPO y de LF en superficie de los polimorfonucleares. Esta tendencia resultó significativa ($p < 0,05$) al comparar las categorías MPO-/LF- y MPO+/LF+ en mucosa según grupo caso y grupo control.

Tabla 13. Relación entre la producción de LF y MPO en sangre o mucosas e infección por VPH¹⁸⁸.

	Casos (N=19)		Controles (N=19)		P
	Porcentaje	Desv. estándar	Porcentaje	Desv. estándar	
PMN plasmáticos					
MPO-/LF-	36.21	16.87	36.93	10.54	NS
MPO+/LF-	3.57	4.03	2.09	0.84	NS
MPO-/LF+	0.15	0.08	0.25	0.24	NS
MPO+/LF+	60.09	12.53	60.73	16.55	NS
PMN cervicovaginales					
MPO-/LF-	35.56	21.02	18.81	21.38	<0,05
MPO+/LF-	11.17	7.69	13.46	10.21	NS
MPO-/LF+	4.81	5.03	2.4	3.31	NS
MPO+/LF+	48.44	24.82	65.3	23.35	<0,05

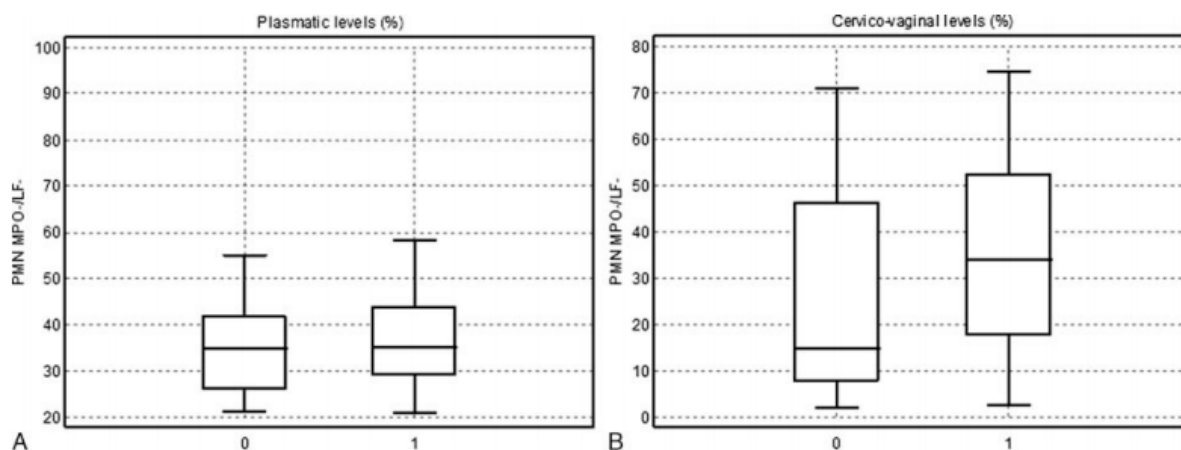


Fig 111. Niveles plasmáticos y cervicovaginales de MPO-/LF- PMN en mujeres con VPH negativo (0) y VPH positivo (1). (A) Niveles plasmáticos de neutrófilo. (B) Niveles cervicovaginales¹⁸⁸.

Estos procesos apoyarían los resultados de Castela¹¹³, en los que las mujeres afectas de cáncer de cérvix presentan una menor expresión de MPO.

Estos resultados no son actualmente extrapolables a los CECC originados por el VPH. A nivel de vía aérea, Cascorbi¹¹⁰ observó que una expresión elevada de MPO predisponía a un mayor riesgo de tumores de pulmón y laringe, originados por el daño en el ADN causado por tabaco y alcohol, pero no encontró esta relación entre el grado de expresión de MPO y los tumores de faringe. Si bien el virus pudiera presentar una historia oncológica parecida en localizaciones de cabeza y cuello como la orofaringe, la falta de estudios no permite afirmar con rotundidad que la MPO sea factor protector para la infección vírica inicial en estos subtipos de CECC. Por otra parte, la mayoría de estudios sobre la infección de VPH ginecológico se centran en procesos infecciosos previos al asentamiento pretumoral, y no presentan el seguimiento del cambio procarcinogénico del microambiente tumoral y de TAN-2 en los casos de infección efectiva del virus.

En nuestro estudio, sólo 5 de nuestros pacientes contaron con tumores VPH-positivos, con la consiguiente limitación de otros análisis específicos. No se encontró diferencia significativa en cuanto a expresión de MPO en relación a la presencia de HPV tumoral ni en relación a la localización del tumor.

La bimodalidad de la MPO parece evidente. Por una parte, en etapas iniciales una alta expresión de MPO defiende el organismo de la infección por VPH y puede frenar su ruta oncogénica, pero por otra parte tiene un rol más oncogénico en tumores dependientes de daños oxidativos en el ADN. Pese a su papel protector y apoptótico en la infección vírica, éste a menudo no es suficiente. El virus, primordialmente gracias a su proteína E6, logra inactivar p53 y la ruta apoptótica, e iniciar la progresión cancerosa¹⁸⁵.

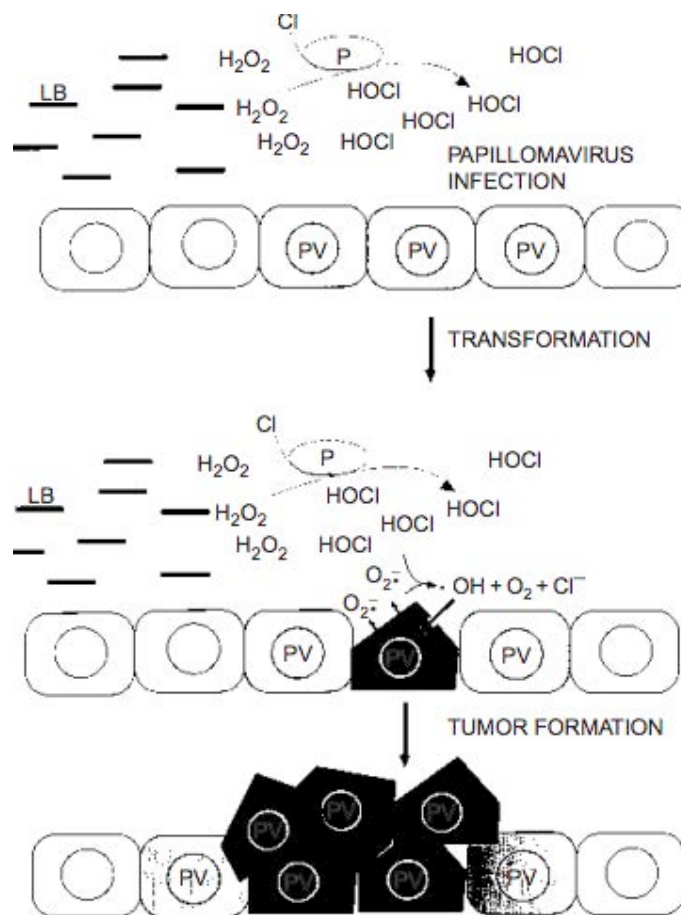


Fig 112. Las células que expresan el virus del papiloma son resistentes a la inducción intercelular de la apoptosis, un sistema que depende de la interacción HOCl/hidróxilo.¹⁸⁵

Independientemente del rol inicial de la MPO en la respuesta inmune, tanto si el tumor es VPH-positivo como no, una vez progresa el desarrollo oncogénico, la MPO como marcadora de TAN-2 y del microambiente tumoral, abanderará un proceso que, tanto en nuestro estudio como en gran parte de las publicaciones al respecto, favorecerá la progresión y la diseminación tumoral a distancia.

LIMITACIONES

7 LIMITACIONES

- La MPO no es un marcador exclusivo de los PMN, pese a que representa la proteína más abundante de los neutrófilos y ha sido ampliamente usado como marcador polimorfonuclear.
- El número limitado de pacientes con tumores VPH-positivos (n=5) limitaron la ampliación del estudio sobre la relación de la MPO como factor pronóstico en tumores VPH-positivos.
- El tratamiento oncológico recibido por los pacientes correspondientes a las muestras usadas para el estudio transcripcional y el de las muestras usadas para el estudio de secretomas difirió. El 26% de los pacientes del estudio transcripcional recibió tratamiento quirúrgico, frente al 59% de los pacientes del estudio de secretomas. Esta diferencia es debida en gran parte por la necesidad de mayor muestra tumoral para el estudio de secretomas, por lo que la muestra de la pieza quirúrgica resultó más útil que la muestra de biopsia simple.
- En el estudio *in vitro*, no se realizó la diferenciación entre las células TAN-1 y TAN-2. Tampoco se valoró el efecto directo de PMN activados en contacto con las células tumorales.

CONCLUSIONES

8 CONCLUSIONES

1. En el estudio de la expresión transcripcional de la MPO no aparecieron diferencias significativas en los niveles de expresión transcripcional de la MPO en función de la localización, afectación ganglionar, grado histológico ni estatus HPV. Los tumores T3-T4 presentaron unos niveles de MPO superiores a los tumores T1-T2.
2. La expresión transcripcional elevada de MPO se relacionó de forma significativa con un mayor riesgo aparición de metástasis a distancia, independientemente a la localización, extensión local y regional, diferenciación histológica tumoral y tratamiento realizado.
3. La expresión elevada de MPO en el tumor se correlacionó con la expresión de genes implicados en el proceso de diseminación como las PGE sintetasa mPEGS-1, TAX, PGIS, CD45, RANTES, MCP-1, MMP-2 y MMP-9, NFκ-B, y SOD.
4. Los tumores de pacientes que contaron con la aparición de metástasis a distancia presentaron un nivel de MPO por inmunohistoquímica significativamente mayor al de pacientes que no sufrieron la aparición de metástasis a distancia apareados en función de la localización tumoral y la extensión loco-regional.
5. No se relacionó la concentración de MPO en secretoma ni en suero con la aparición de metástasis a distancia.
6. Los medios condicionantes de los PMN activados no favorecieron la migración celular.

BIBLIOGRAFÍA

9 BIBLIOGRAFIA

- 1.- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100:57-70.
- 2.- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144:646-74.
- 3.- Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001;357:539–45.
- 4.- Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1889;133:571–73.
- 5.- Bissell MJ, Hall HG, Parry G. How does the extracellular matrix direct gene expression? *J Theor Biol* 1982;99:31–68.
- 6.- Allen M, Louise Jones J. Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. *J Pathol*. 2011;223:162-76.
- 7.- Curry JM, Sprandio J, Cognetti D, Luginbuhl A, Bar-ad V, Pribitkin E, et al. Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma. *Semin Oncol*. 2014;41:217-34.
- 8.- Allavena, P, Sica, A, Garlanda, C, and Mantovani, A. The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol. Rev*. 2008;222:155–61.
- 9.- Lin EY, Li JF, Gnatovskiy L, Deng Y, Zhu L, Grzesik DA, et al. Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer Res* 2006;66:11238–46.
- 10.- Wang R, Zhang J, Chen S, Lu M, Luo X, Yao S, et al. Tumor-associated macrophages provide a suitable microenvironment for non-small lung cancer invasion and progression. *Lung Cancer* 2011;74:188–96.

- 11.- Granata F, Frattini A, Loffredo S, Staiano RI, Petraroli A, Ribatti D, et al. Production of vascular endothelial growth factors from human lung macrophages induced by group IIA and group X secrete phospholipases A2. *J Immunol* 2010;184:5232–41.
- 12.- Sica A, Bronte V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J Clin Invest* 2007;117:1155–66.
- 13.- Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 2002;196: 254–65
- 14.- Liu SY, Chang LC, Pan LF, Hung YJ, Lee CH, Shieh YS. Clinicopathologic significance of tumor cell-lined vessel and microenvironment in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2008;44: 277–85
- 15.- Lin JY, Li XY, Tadashi N, Dong P. Clinical significance of tumor-associated macrophage infiltration in supraglottic laryngeal carcinoma. *Chin J Cancer*. 2011;30:280-6.
- 16.- Fujii N, Shomori K, Shiomi T, Nakabayashi M, Takeda C, Ryoke K, et al. Cancer-associated fibroblasts and CD163 positive macrophages in oral squamous cell carcinoma: their clinicopathological and prognostic significance. *J Oral Pathol Med*. 2012;41:444-51.
- 17.- Matsuoka Y, Yoshida R, Nakayama H, Nagata M, Hirose A, Tanaka T, et al. The tumour stromal features are associated with resistance to 5-FU-based chemoradiotherapy and a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. *APMIS*. 2015;123:205-14.
- 18.- Weber M, Büttner-Herold M, Hyckel P, Moebius P, Distel L, Ries J, et al. Small oral squamous cell carcinomas with nodal lymphogenic metastasis show increased infiltration of M2 polarized macrophages--an immunohistochemical analysis. *J Craniomaxillofac Surg*. 2014;42:1087-94.

- 19.- Wehrhan F, Büttner-Herold M, Hyckel P, Moebius P, Preidl R, Distel L, et al. Increased malignancy of oral squamous cell carcinomas (oscc) is associated with macrophage polarization in regional lymph nodes - an immunohistochemical study. *BMC Cancer*. 2014;14:522.
- 20.- Weber M, Iliopoulos C, Moebius P, Büttner-Herold M, Amann K, Ries J, et al. Prognostic significance of macrophage polarization in early stage oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*. 2016;52:75-84
- 21.- Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer related inflammation. *Nature*, 2008;454:436–44.
- 22.- Gregory AD, Houghton AM. Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy. *Cancer Research*. 2011;71:2411–6.
- 23.- Fridlender ZG, Albelda SM. Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis*. 2012;33:949-55.
- 24.- Mishalian I, Bayuh R, Levy L, Zolotarov L, Michaeli J, Fridlender ZG. Tumor-associated neutrophils (TAN) develop pro-tumorigenic properties during tumor progression. *Cancer Immunol Immunother* 2013;62:1745-56.
- 25.- Eruslanov EB, Bhojnagarwala PS, Quatromoni JG, Stephen TL, Ranganathan A, Deshpande C, et al. Tumor-associated neutrophils stimulate T cell responses in early-stage human lung cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 2014;124:5466–80.
- 26.- Wu P, Wu D, Ni C, Ye J, Chen W, Hu G et al. $\gamma\delta$ T17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer. *Immunity*, 2014;40:785–800.
- 27.- Lazennec G, Richmond A. Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. *Trends in Molecular Medicine* 2010;16:133–44.
- 28.- Wu Y, Zhao Q, Peng C, Sun L, Li XF, Kuang DM. Neutrophils promote motility of cancer cells via a hyaluronan-mediated TLR4/PI3K activation loop. *Journal of Pathology* 2011;225:438–47

- 29.- Pelletier M, Micheletti A, Cassatella MA. Modulation of human neutrophil survival and antigen expression by activated CD4+ and CD8+ T cells. *Journal of Leukocyte Biology* 2010;88:1163–70.
- 30.-Glynn PC, Henney E, Hall IP. The selective CXCR2 antagonist SB272844 blocks interleukin-8 and growth-related oncogene-alpha-mediated inhibition of spontaneous neutrophil apoptosis. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics* 2002;15:103–10.
- 31.- Chihab R, Porn-Ares MI, Alvarado-Kristensson M, Andersson T. Sphingosine 1-phosphate antagonizes human neutrophil apoptosis via p38 mitogenactivated protein kinase. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2003;60: 776–85
- 32.- Dumitru CA, Gholaman H, Trellakis S, Bruderek K, Dominas N, Gu X, et al. Tumor derived macrophage migration inhibitory factor modulates the biology of head and neck cancer cells via neutrophil activation. *International Journal of Cancer*. 2011;129:859–69.
- 33.-Hannah S, Mecklenburgh K, Rahman I, Bellingan GJ, Greening A, Haslett C, et al. Hypoxia prolongs neutrophil survival in vitro. *FEBS Letters*. 1995;372:233–7.
- 34.- Walmsley SR, Print C, Farahi N, Peyssonnaud C, Johnson RS, Cramer T, et al. Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1alpha-dependent NF-kappaB activity. *Journal of Experimental Medicine*. 2005;201:105–15.
- 35.- Trellakis S, Farjah H, Bruderek K, Dumitru CA, Hoffmann TK, Lang S, et al. Peripheral blood neutrophil granulocytes from patients with head and neck squamous cell carcinoma functionally differ from their counterparts in healthy donors. *International Journal of Immunopathology & Pharmacology* 2011;24:683–93.
- 36.- Sato T, Takahashi S, Mizumoto T, Harao M, Akizuki M, Takasugi Neutrophil elastase and cancer. *Surgical Oncology*. 2006;15:217–22.
- 37.- Houghton AM, Rzymkiewicz DM, Ji H, Gregory AD, Egea EE, Metz HE, et al., Neutrophil elastase mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth. *Nature Medicine*, 2010;16: 219–23.

- 38.- Wada Y, Yoshida K, Tsutani Y, Shigematsu H, Oeda M, Sanada Y, et al. Neutrophil elastase induces cell proliferation and migration by the release of TGF- α , PDGF and VEGF in esophageal cell lines. *Oncology Reports*, 2207;17:161–7.
- 39.- Nawa M, Osada S, Morimitsu K, Nonaka K, Futamura M, Kawaguchi Y, et al. Growth effect of neutrophil elastase on breast cancer: favorable action of sivelestat and application to anti-HER2 therapy. *Anticancer Research*. 2012;32,13–19.
- 40.- Gaida MM1, Steffen TG, Günther F, Tschaharganeh DF, Felix K, Bergmann F, et al. Polymorphonuclear neutrophils promote dyshesion of tumor cells and elastasemediated degradation of E-cadherin in pancreatic tumors. *European Journal of Immunology*. 2012; 42: 3369–80.
- 41.- Wilson TJ, Nannuru KC, Futakuchi M, Singh RK. Cathepsin G-mediated enhanced TGF- β signaling promotes angiogenesis via upregulation of VEGF and MCP-1. *Cancer Letters*, 2010;288:162–9.
- 42.- Hawinkels LJ, Zuidwijk K, Verspaget HW, de Jonge-Muller ES, van Duijn W, Ferreira V, et al. VEGF release by MMP-9 mediated heparan sulphate cleavage induces colorectal cancer angiogenesis. *European Journal of Cancer*. 2008;44: 1904–13.
- 43.- Deryugina EI, Zajac E, Juncker-Jensen A, Kupriyanova TA, Welter L, Quigley JP, Tissue-infiltrating neutrophils constitute the major in vivo source of angiogenesis-inducing MMP-9 in the tumor microenvironment. *Neoplasia*, 2014;16:771–88.
- 44.- Dumitru CA, Fechner MK, Hoffmann TK, Lang S, Brandau S. A novel p38-MAPK signaling axis modulates neutrophil biology in head and neck cancer. *Journal of Leukocyte Biology*. 2012;91:591–8.
- 45.- De Larco JE, Wuertz BRK, Furcht LT. The potential role of neutrophils in promoting the metastatic phenotype of tumors releasing interleukin-8. *Clinical Cancer Research*, 2004;10:4895–900.

- 46.- Knaapen AM, Güngör N, Schins RP, Borm PJ, Van Schooten FL. Neutrophils and respiratory tract DNA damage and mutagenesis: a review. *Mutagenesis*, 2006; 4: 225– 36.
- 47.- Dumitru CA, Moses K, Trellakis S, Lang S, Brandau S. Neutrophils and granulocyticmyeloid-derived suppressor cells: immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2012;61:1155–67.
- 48.- Tecchio C, Scapini P, Pizzolo G, Cassatella MA. On the cytokines produced by human neutrophils in tumors. *Seminars in Cancer Biology*, 2013;23:159–70, 2013.
49. Uribe-Querol E, Rosales C. Neutrophils in cancer: two sides of the same coin. *J Immunol Res*. 2015;2015:983698.
- 50.- Howell GM, Grandis JR. Molecular mediators of metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Head & neck*. 2005;27:710-7.
- 51.- Allen CT, Law JH, Dunn GP, Uppaluri R. Emerging insights into head and neck cancer metastasis. *Head & neck*. 2013;35:1669-78.
- 52.- Takes RP, Rinaldo A, Silver CE, Haigentz M, Jr., Woolgar JA, Triantafyllou A, et al. Distant metastases from head and neck squamous cell carcinoma. Part I. Basic aspects. *Oral oncology*. 2012;48:775-9.
- 53.- Loukinova E, Dong G, Enamorado-Ayalya I, Thomas GR, Chen Z, Schreiber H, et al. Growth regulated oncogene-alpha expression by murine squamous cell carcinoma promotes tumor growth, metastasis, leukocyte infiltration and angiogenesis by a host CXC receptor-2 dependent mechanism. *Oncogene*. 2000;19:3477–86.
- 54.- Schaidt H, Oka M, Bogenrieder T, Nesbit M, Satyamoorthy K, Berking C, et al. Differential response of primary and metastatic melanomas to neutrophils attracted by IL-8. *International Journal of Cancer*. 2003;103:335–43.

- 55.- Welch DR, Schissel DJ, Howrey RP, Aeed PA. Tumor elicited polymorphonuclear cells, in contrast to 'normal' circulating polymorphonuclear cells, stimulate invasive and metastatic potentials of rat mammary adenocarcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989;86: 5859–63.
- 56.- Strell C, Lang K, Niggemann B, Zaenker KS, Entschladen F. Neutrophil granulocytes promote the migratory activity of MDA-MB-468 human breast carcinoma cells via ICAM-1. *Experimental Cell Research*. 2010;316:138–48.
- 57.- Dumitru CA, Gholaman H, Trelakis S, Bruderek K, Dominas N, Gu X, et al. Tumor-derived macrophage migration inhibitory factor modulates the biology of head and neck cancer cells via neutrophil activation. *Int J Cancer* 2011;129:859-69.
- 58.- Wu QDI, Wang JH, Condron C, Bouchier-Hayes D, Redmond HP. Human neutrophils facilitate tumor cell transendothelial migration. *The American Journal of Physiology—Cell Physiology*. 2001;280:814–22.
- 59.- Dong C, Slattery MJ, Liang S, Peng HH. Melanoma cell extravasation under flow conditions is modulated by leukocytes and endogenously produced interleukin 8. *MCB Molecular and Cellular Biomechanics*. 2005;2:145–59.
- 60.- Sun Z, Yang P. Role of imbalance between neutrophil elastase and α 1-antitrypsin in cancer development and progression. *The Lancet Oncology*. 2004;5: 182–90.
- 61.- Huh SJ, Liang S, Sharma A, Dong C, Robertson GP. Transiently entrapped circulating tumor cells interact with neutrophils to facilitate lung metastasis development. *Cancer Research*, 2010;70:6071–82.
- 62.- Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*, 2005;438:820–7.

63.- Jensen HK, Donskov F, Marcussen N, Nordmark M, Lundbeck F, von der Maase H. Presence of intratumoral neutrophils is an independent prognostic factor in localized renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2009 ;27:4709–17.

64.- Hu P, Wang G, Shen M, Zhang P, Zhang J, Du J, et al. Intratumoral polymorphonuclear granulocyte is associated with poor prognosis in squamous esophageal cancer by promoting epithelial-mesenchymal transition. *Future Oncol.* 2015;11:771-83.

65.- Ilie M, Hofman V, Ortholan C, Bonnetaud C, Coelle C, Mouroux J, et al. Predictive clinical outcome of the intratumoral CD66b-positive neutrophil-to-CD8-positive T-cell ratio in patients with resectable nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2012;118:1726–37.

66.- Li YW, Qiu SJ, Fan J, Zhou J, Gao Q, Xiao YS, et al. Intratumoral neutrophils: a poor prognostic factor for hepatocellular carcinoma following resection. *Journal of Hepatology* 2011;54:497–505.

67.- Rao HL, Chen JW, Li M, Xiao YB, Fu J, Zeng YX, et al. Increased intratumoral neutrophil in colorectal carcinomas correlates closely with malignant phenotype and predicts patients' adverse prognosis. *PLoS One* 2012;7:e30806.

68.- Zhao JJ, Pan K, Wang W, Chen JG, Wu YH, Lv L, et al. The prognostic value of tumor-infiltrating neutrophils in gastric adenocarcinoma after resection. *PLoS One.* 2012;7:e33655.

69.- Jensen TO, Schmidt H, Moller HJ, Donskov F, Hoyer M, Sjoegren P, et al. Intratumoral neutrophils and plasmacytoid dendritic cells indicate poor prognosis and are associated with pSTAT3 expression in AJCC stage I/II melanoma. *Cancer* 2012;118:2476–85.

- 70.- Shen M, Hu P, Donskov F, Wang G, Liu Q, Du J. Tumor-associated neutrophils as a new prognostic factor in cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2014 Jun 6;9(6):e98259.
- 71.- Trellakis S, Bruderek K, Dumitru CA, Gholaman H, Gu X, Bankfalvi A, et al. Polymorphonuclear granulocytes in human head and neck cancer: enhanced inflammatory activity, modulation by cancer cells and expansion in advanced disease. *Int J Cancer* 2011;129:2183-93.
- 72.- Dumitru CA, Bankfalvi A, Gu X, Eberhardt WE, Zeidler R, Lang S, et al. Neutrophils activate tumoral CORTACTIN to enhance progression of oropharynx carcinoma. *Front Immunol*. 2013 Feb 18;4:33.
- 73.- Dumitru CA, Bankfalvi A, Gu X, Zeidler R, Brandau S, Lang S. AHNAK and inflammatory markers predict poor survival in laryngeal carcinoma. *PLoS One* 2013;8:e56420.
- 74.- Wang N, Feng Y, Wang Q, Liu S, Xiang L, Sun M, et al. Neutrophils infiltration in the tongue squamous cell carcinoma and its correlation with CEACAM1 expression on tumor cells. *PLoS One*. 2014 27;9(2):e89991.
- 75.- Ebrahimnejad A, Streichert T, Nollau P, Horst AK, Wagener C, Bamberger AM, et al. CEACAM1 enhances invasion and migration of melanocytic and melanoma cells. *Am J Pathol* 2004;165:1781–7.
- 76.- Ieda J, Yokoyama S, Tamura K, Takifuji K, Hotta T, Matsuda K, et al. Re-expression of CEACAM1 long cytoplasmic domain isoform is associated with invasion and migration of colorectal cancer. *Int J Cancer* 2011;129:1351–61.
- 77.- Caldeira PC, de Andrade Sousa A, de Aguiar MC. Differential infiltration of neutrophils in T1–T2 versus T3–T4 oral squamous cell carcinomas: a preliminary study. *BMC Res Notes*. 2015;8:569.
- 78.- Punt S, Dronkers EA, Welters MJ, Goedemans R, Koljenović S, Bloemena E, et al. A beneficial tumor microenvironment in oropharyngeal squamous cell carcinoma

is characterized by a high T cell and low IL-17(+) cell frequency. *Cancer Immunol Immunother.* 2016;65:393-403.

79.- Punt S, Fleuren GJ, Kritikou E, Lubberts E, Trimbos JB, Jordanova ES et al. Angels and demons: Th17 cells represent a beneficial response, while neutrophil IL-17 is associated with poor prognosis in squamous cervical cancer. *Oncoimmunology* 2015;4:e984539.

80.- Punt S, Langenhoff JM, Putter H, Fleuren GJ, Gorter A, Jordanova ES. The correlations between IL-17 vs. Th17 cells and cancer patient survival: a systematic review. *Oncoimmunology.* 2015;4:e984547.

81.- Wang J, Jia Y, Wang N, Zhang X, Tan B, Zhang G, et al. The clinical significance of tumor-infiltrating neutrophils and neutrophil-to-CD8+ lymphocyte ratio in patients with resectable esophageal squamous cell carcinoma. *J Transl Med* 2014;12:7.

82.- Glogauer JE, Sun CX, Bradley G, Magalhaes MA. Neutrophils Increase Oral Squamous Cell Carcinoma Invasion through an Invadopodia-Dependent Pathway. *Cancer Immunol Res.* 2015 Nov;3:1218-26.

83.- Agner, K. Verdoperoxidase. A ferment isolated from leucocytes. *Acta chem. Scand.* 1951;2:1-62.

84.- Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol.* 2005;77:598-625.

85.- Kinkade JM Jr, Pember SO, Barnes KC, Shapira R, Spitznagel JK, Martin LE. Differential distribution of distinct forms of myeloperoxidase in different azurophilic granule subpopulations from human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun.* 1983;114:296-303.

86.- Bainton DF, Ulliyot JL, Farquhar MG. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J Exp Med.* 1971;134:907-34.

- 87.- Nichols BA, Bainton DF. Differentiation of human monocytes in bone marrow and blood. Sequential formation of two granule populations. *Lab Invest.* 1973 Jul;29:27-40.
- 88.- Weil SC, Rosner GL, Reid MS, Chisholm RL, Farber NM, Spitznagel JK, et al. cDNA cloning of human myeloperoxidase: decrease in myeloperoxidase mRNA upon induction of HL-60 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:2057-61.
- 89.- Khan AA, Alsahli MA, Rahmani AH. Myeloperoxidase as an Active Disease Biomarker: Recent Biochemical and Pathological Perspectives. *Med Sci (Basel).* 2018;6:E33.
- 90.- Winterbourn CC. Biological reactivity and biomarkers of the neutrophil oxidant, hypochlorous acid. *Toxicology.* 2002;27;181-182:223-7.
- 91.- Domigan NM, Charlton TS, Duncan MW, Winterbourn CC, Kettle AJ. Chlorination of tyrosyl residues in peptides by myeloperoxidase and human neutrophils. *J Biol Chem.*1995;270:16542-8.
- 92.- Mika D, Guruvayoorappan C. Myeloperoxidase: the yin and yang in tumour progression. *J Exp Ther Oncol.* 2011;9:93-100.
- 93.- Benamira M, Johnson K, Chaudhary A, Bruner K, Tibbetts C, Marnett LJ. Induction of mutations by replication of malondialdehyde-modified M13 DNA in *Escherichia coli*: determination of the extent of DNA modification, genetic requirements for mutagenesis, and types of mutations induced. *Carcinogenesis.* 1995;16:93-9.
- 94.- Hunninghake GW, Crystal RG. Cigarette smoking and lung destruction. Accumulation of neutrophils in the lungs of cigarette smokers. *Am Rev Respir Dis.* 1983;128:833-8.
- 95.- Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP. Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science.* 1996;274:430-2.

- 96.- Güngör N, Godschalk RW, Pachen DM, Van Schooten FJ, Knaapen AM. Activated neutrophils inhibit nucleotide excision repair in human pulmonary epithelial cells: role of myeloperoxidase. *FASEB J.* 2007;2:2359-67.
- 97.- Vissers MC, Thomas C. Hypochlorous acid disrupts the adhesive properties of subendothelial matrix. *Free Radic Biol Med.* 1997;23:401-11.
- 98.- Castellani LW¹, Chang JJ, Wang X, Lusic AJ, Reynolds WF. Transgenic mice express human MPO -463G/A alleles at atherosclerotic lesions, developing hyperlipidemia and obesity in -463G males. *J Lipid Res.* 2006;47:1366-77. 2006 Apr 25.
- 99.- Maki RA, Tyurin VA, Lyon RC, Hamilton RL, DeKosky ST, Kagan VE. Aberrant expression of myeloperoxidase in astrocytes promotes phospholipid oxidation and memory deficits in a mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem;*284:3158-69.
- 100.- Green PS, Mendez AJ, Jacob JS, Crowley JR, Growdon W, Hyman BT, et al. Neuronal expression of myeloperoxidase is increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2004;90:724-33.
- 101.- Yuzhalin AE, Kutikhin AG. Common genetic variants in the myeloperoxidase and paraoxonase genes and the related cancer risk: a review. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2012;30:287-322.
- 102.- Pabalan N, Jarjanazi H, Sung L, Li H, Ozcelik H. Menopausal status modifies breast cancer risk associated with the myeloperoxidase (MPO) G463A polymorphism in Caucasian women: a meta-analysis. *PLoS One.* 2012;7(3):e32389.
- 103.- Castillo-Tong DC, Pils D, Heinze G, Braicu I, Sehouli J, Reinthaller A. Association of myeloperoxidase with ovarian cancer. *Tumour Biol.* 2014;35:141-8.
- 104.- Hung RJ, Boffetta P, Brennan P, Malaveille C, Gelatti U, Placidi D, et al. Genetic polymorphisms of MPO, COMT, MnSOD, NQO1, interactions with environmental exposures and bladder cancer risk. *Carcinogenesis.* 2004 Jun;25:973-8.

- 105.- Reynolds WF1, Chang E, Douer D, Ball ED, Kanda V. An allelic association implicates myeloperoxidase in the etiology of acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 1997;90:2730-7.
- 106.- He C, Tamimi RM, Hankinson SE, Hunter DJ, Han J. A prospective study of genetic polymorphism in MPO, antioxidant status, and breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;113:585-94.
- 107.- Malle E, Marsche G, Arnhold J, Davies MJ. Modification of low-density lipoprotein by myeloperoxidase-derived oxidants and reagent hypochlorous acid. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1761:392-415.
- 108.- Ambrosone CB, Ahn J, Singh KK, Rezaishiraz H, Furberg H, Sweeney C, et al. Polymorphisms in genes related to oxidative stress (MPO, MnSOD, CAT) and survival after treatment for breast cancer. *Cancer Res*. 2005;65:1105-11.
- 109.- Ambrosone CB, Barlow WE, Reynolds W, Livingston RB, Yeh IT, Choi JY, et al. Myeloperoxidase genotypes and enhanced efficacy of chemotherapy for early-stage breast cancer in SWOG-8897. *J Clin Oncol*. 2009;27:4973-9.
- 110.- Cascorbi I, Henning S, Brockmüller J, Gephart J, Meisel C, Müller JM, et al. Substantially reduced risk of cancer of the aerodigestive tract in subjects with variant--463A of the myeloperoxidase gene. *Cancer Res*. 2000;60:644-9.
- 111.- Huang C, Ma L, Li D. Association between myeloperoxidase G-463A polymorphism and lung cancer risk. *Tumour Biol*. 2014;35:475-81.
- 112.- Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2008;110:S4-7.
- 113.- Castelão C, da Silva AP, Matos A, Inácio Â, Bicho M, Medeiros R, et al. Association of myeloperoxidase polymorphism (G463A) with cervix cancer. *Mol Cell Biochem*. 2015;404:1-4.
- 114.- Wheatley-Price P, Asomaning K, Reid A, Zhai R, Su L, Zhou W, et al. Myeloperoxidase and superoxide dismutase polymorphisms are associated with an

increased risk of developing pancreatic adenocarcinoma. *Cancer*. 2008;112:1037-42.

115.- Lai WM, Chen CC, Lee JH, Chen CJ, Wang JS, Hou YY, et al. Second primary tumors and myeloperoxidase expression in buccal mucosal squamous cell carcinoma *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013;116:464-73.

116.- Leon X, Orus C, Quer M. Design, maintenance, and exploitation of an oncologic database for patients with malignant tumors of the head and neck. *Acta otorrinolaringologica espanola*. 2002;53:185-90.

117.- León X, Quer M, Orús C, del Prado Venegas M, López M. Distant metastases in head and neck cancer patients who achieved locoregional control. *Head Neck* 2000 Oct;22:680-6.

118.- Garavello W, Ciardo A, Spreafico R, Gaini RM. Risk factors for distant metastases in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;132:762-6.

119.- Li X, Di B, Shang Y, Zhou Y, Cheng J, He Z. Clinicopathologic risk factors for distant metastases from head and neck squamous cell carcinomas. *Eur J Surg Oncol* 2009;35:1348-53.

120.- de Juan J, García J, López M, Orús C, Esteller E, Quer M, et al. Inclusion of extracapsular spread in the pTNM classification system: a proposal for patients with head and neck carcinoma. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2013;139:483-8.

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

122.- Dong GW, Do NY, Lim SC. Relation between proinflammatory mediators and epithelial-mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. *Experimental and therapeutic medicine*. 2010;1:885-91.

123.- Lim JY, Lim YC, Kim SH, Kim JW, Jeong HM, Choi EC. Predictive factors of isolated distant metastasis after primary definitive surgery without systemic treatment for head and neck squamous cell carcinoma. *Oral oncology*. 2010;46:504-8.

- 124.- Biswas SK, Sica A, Lewis CE. Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms. *J Immunol* 2008;180:2011–17.
- 125.- Papagerakis S, Shabana AH, Pollock BH, Papagerakis P, Depondt J, Berdal A. Altered desmoplakin expression at transcriptional and protein levels provides prognostic information in human oropharyngeal cancer. *Human pathology*. 2009;40:1320-9.
- 126.- Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* 2006;66:605–12.
- 127.- Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell* 2009;16:183–194.
- 128.- Jablonska J, Leschner S, Westphal K, Lienenklaus S, Weiss S. Neutrophils responsive to endogenous IFN-beta regulate tumor angiogenesis and growth in a mouse tumor model. *J Clin Invest* 2010;120:1151–64.
- 129.- Rodrigo JP, Martinez P, Allonca E, Alonso-Duran L, Suarez C, Astudillo A, et al. Immunohistochemical markers of distant metastasis in laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinomas. *Clinical & experimental metastasis*. 2014;31:317-25.
- 130.- León X, Bothe C, García J, Parreño M, Alcolea S, Quer M, et al. Expression of IL-1 α correlates with distant metastasis in patients with head and neck squamous cell carcinoma *Oncotarget*. 2015;6:37398-409.
- 131.- Camacho M, Lopez-Belmonte J, Vila L. Rate of vasoconstrictor prostanoids released by endothelial cells depends on cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin I synthase activity. *Circulation research*. 1998;83:353-65.
- 132.- Greenhough A, Smartt HJ, Moore AE, Roberts HR, Williams AC, Paraskeva C, et al. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis*. 2009;30:377-86.

133.- Nijkamp MM, Span PN, Hoogsteen IJ, van der Kogel AJ, Kaanders JH, Bussink J. Expression of E-cadherin and vimentin correlates with metastasis formation in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2011;99:344-8.

134.- Stangl S , Tontcheva N , Sievert W, Shevtsov M. , Niu M. , Schmid TE, et al. Heat shock protein 70 and tumor-infiltrating NK cells as prognostic indicators for patients with squamous cell carcinoma of the head and neck after radiochemotherapy: A multicentre retrospective study of the German Cancer Consortium Radiation Oncology Group (DKTK-ROG). *Int. J. Cancer*, 2108;142: 1911-25.

135.- Wu QD, Wang JH, Condrón C, Bouchier-Hayes D, Redmond HP. Human neutrophils facilitate tumor cell transendothelial migration. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280:C814-22.

137.- Queen MM, Ryan RE, Holzer RG, Keller-Peck CR, Jorcyk CL. Breast cancer cells stimulate neutrophils to produce oncostatin M: potential implications for tumor progression. *Cancer Res* 2005;65:8896-904.

136.- Bekes EM, Schweighofer B, Kupriyanova TA, Zajac E, Ardi VC, Quigley JP, et al. Tumor-recruited neutrophils and neutrophil TIMP-free MMP-9 regulate coordinately the levels of tumor angiogenesis and efficiency of malignant cell intravasation. *Am J Pathol* 2011;179:1455-70.

138.- Hattar K, Franz K, Ludwig M, Sibelius U, Wilhelm J, Lohmeyer J, et al. Interactions between neutrophils and non-small cell lung cancer cells: enhancement of tumor proliferation and inflammatory mediator synthesis. *Cancer Immunol Immunother*. 2014;63:1297-306.

139.- Karnezis T, Shayan R, Fox S, Achen MG, Stacker SA. The connection between lymphangiogenic signalling and prostaglandin biology: a missing link in the metastatic pathway *Oncotarget*. 2012;3:893-906.

- 140.- Huang RY, Li SS, Guo HZ, Huang Y, Zhang X, Li MY, et al. Thromboxane A2 exerts promoting effects on cell proliferation through mediating cyclooxygenase-2 signal in lung adenocarcinoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2014;140:375-86.
- 141.- Santoro A, Bufo P, Russo G, Cagiano S, Papagerakis S, Bucci P, et al. Expression and clinical implication of cyclooxygenase-2 and e-cadherin in oral squamous cell carcinomas. *Cancer Biol Ther*. 2015;28:0. [Epub ahead of print]
- 142.- Hsu JY, Chang KY, Chen SH, Lee CT, Chang ST, Cheng HC, et al. Epidermal growth factor-induced cyclooxygenase-2 enhances head and neck squamous cell carcinoma metastasis through fibronectin up-regulation. *Oncotarget*. 2015;6:1723-39.
- 143.- Camacho M, Agüero A, Sumarroca A, López L, Pavón MÁ, Avilés-Jurado FX, et al. Prognostic value of CD45 transcriptional expression in head and neck cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2018;275:225-32.
- 144.- Höing B, Kanaan O, Altenhoff P, Petri R, Thangavelu K, Schlüter A, et al. Stromal versus tumoral inflammation differentially contribute to metastasis and poor survival in laryngeal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2018;9:8415-26.
- 145.- Wang W, Hodgkinson P, McLaren F, Mackean MJ, Williams L, Howie SEM, et al. Histologic assessment of tumor-associated CD45(+) cell numbers is an independent predictor of prognosis in small cell lung cancer. *Chest*. 2013;143:146-151.
- 146.- Chew A, Salama P, Robbshaw A, Klopčič B, Zeps N, Platell C, et al. SPARC, FOXP3, CD8 and CD45 correlation with disease recurrence and long-term disease-free survival in colorectal cancer. *PLoS One*. 2011;6:e22047.
- 147.- Pretscher D, Distel LV, Grabenbauer GG, Wittlinger M, Buettner M, Niedobitek G. Distribution of immune cells in head and neck cancer: CD8+ T-cells and CD20+ B-cells in metastatic lymph nodes are associated with favourable outcome in patients with oro- and hypopharyngeal carcinoma. *BMC Cancer*. 2009;9:292.

- 148.- Adler EP, Lemken CA, Katchen NS, Kurt RA. A dual role for tumor-derived chemokine RANTES (CCL5). *Immunol Lett.* 2003;90:187-94.
- 149.- Chuang JY, Yang WH, Chen HT, Huang CY, Tan TW, Lin YT, et al. CCL5/CCR5 axis promotes the motility of human oral cancer cells. *J Cell Physiol.* 2009;220:418-26.
- 150.- Chuang HC, Huang CC, Chien CY, Chuang JH. Toll-like receptor 3-mediated tumor invasion in head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2012;48:226-32.
- 151.- Sun W, Li WJ, Wei FQ, Wong TS, Lei WB, Zhu XL, et al. Blockade of MCP-1/CCR4 signaling-induced recruitment of activated regulatory cells evokes an antitumor immune response in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2016;7:37714-27.
- 152.- Gao L, Wang FQ, Li HM, Yang JG, Ren JG, He KF, et al. CCL2/EGF positive feedback loop between cancer cells and macrophages promotes cell migration and invasion in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2016;7:87037-51.
- 153.- He S, He S, Chen CH, Deborde S, Bakst RL, Chernichenko N, et al. The chemokine (CCL2-CCR2) signaling axis mediates perineural invasion. *Mol Cancer Res.* 2015;13:380-90.
- 154.- Buettner M, Meyer B, Schreck S, Niedobitek G. Expression of RANTES and MCP-1 in epithelial cells is regulated via LMP1 and CD40. *Int J Cancer.* 2007;121:2703-10.
- 155.- Kawata R, Shimada T, Maruyama S, Hisa Y, Takenaka H, Murakami Y. Enhanced production of matrix metalloproteinase-2 in human head and neck carcinomas is correlated with lymph node metastasis. *Acta Otolaryngol.* 2002;122:101-6.
- 156.- O-Charoenrat P, Rhys-Evans PH, Eccles SA. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2001 Jul;127(7):813-20.

- 157.- Yifeng Xia, Shen Shen, and Inder M. Verma. NF- κ B, an active player in human cancers. *Cancer Immunol Res.* 2014;2:823–30.
- 158.- Liu S, Shi L, Wang Y, Ye D, Ju H, Ma H, et al. Stabilization of Slug by NF- κ B is Essential for TNF- α -Induced Migration and Epithelial-Mesenchymal Transition in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells. *Cell Physiol Biochem.* 2018;47:567-78.
- 159.- Min He, Anping Peng, Xian-Zhang Huang, Dai-Chao Shi, Jun-Cheng Wang, Qiyi Zhao, et al. Peritumoral stromal neutrophils are essential for c-Met-elicited metastasis in human hepatocellular carcinoma. *Oncoimmunology.* 2016;5: e1219828
- 160.- Liu Y, Zha L, Li B, Zhang L, Yu T, Li L. Correlation between superoxide dismutase 1 and 2 polymorphisms and susceptibility to oral squamous cell carcinoma. *Exp Ther Med.* 2014;7:171-8.
- 161.- Inci E, Civelek S, Seven A, Inci F, Korkut N, Burçax G. Laryngeal cancer: in relation to oxidative stress. *J Exp Med.* 2003;200:17-23.
- 162.- Piyathilake CJ, Bell WC, Oelschlager DK, Heimbürger DC, Grizzle WE. The pattern of expression of Mn and Cu-Zn superoxide dismutase varies among squamous cell cancers of the lung, larynx, and oral cavity. *Head Neck.* 2002;24:859-67.
- 163.- Salzman R, Kanková K, Pácal L, Tomandl J, Horáková Z, Kostrica R. Increased activity of superoxide dismutase in advanced stages of head and neck squamous cell carcinoma with locoregional metastases. *Neoplasma.* 2007;54:321-5.
- 164.- Coffelt SB, Kersten K, Doornebal CW, Weiden J, Vrijland K, Hau CS, et al. IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature.* 2015;522:345-8.
- 165.- Remedi MM, Donadio AC, Chiabrando GA. Polymorphonuclear cells stimulate the migration and metastatic potential of rat sarcoma cells. *Int J Exp Pathol* 200;90:44-51.

- 166.- Lee JR, Roh JL, Lee SM, Park Y, Cho KJ, Choi SH, et al. Overexpression of glutathione peroxidase 1 predicts poor prognosis in oral squamous cell carcinoma J Cancer Res Clin Oncol. 2017;143:2257-65.
- 167.- Dinarello CA, van der Meer JW. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans. Seminars in immunology. 2013;25:469-84.
- 168.- Bar D, Apte RN, Voronov E, Dinarello CA, Cohen S. A continuous delivery system of IL-1 receptor antagonist reduces angiogenesis and inhibits tumor development. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2004;18:161-3.
- 169.- Lazarević-Pasti T1, Leskovac A, Vasić V. Myeloperoxidase Inhibitors as Potential Drugs. Curr Drug Metab. 2015;16:168-90.
- 170.- Soubhye J, Aldib I, Delporte C, Prévost M, Dufrasne F, Antwerpen PV. Myeloperoxidase as a Target for the Treatment of Inflammatory Syndromes: Mechanisms and Structure Activity Relationships of Inhibitors. Curr Med Chem. 2016;23:3975-4008.
- 171.- Bensalem S, Soubhye J, Aldib I, Bournine L, Nguyen AT, Vanhaeverbeek M, et al. Inhibition of myeloperoxidase activity by the alkaloids of Peganum harmala L. (Zygophyllaceae). J Ethnopharmacol. 2014;154:361-9.
- 172.- Van Zyl A, Lubbe S, Potgieter A, Van Zyl J. The influence of non-steroidal anti-inflammatory and antithyroid agents on myeloperoxidase-catalysed activities of human leucocytes. S Afr Med J. 1979 Jun 23;55:1082-7.
- 173.- Soubhye J, Aldib I, Prévost M, Elfving B, Gelbcke M, Podrecca M, et al. Hybrid molecules inhibiting myeloperoxidase activity and serotonin reuptake: a possible new approach of major depressive disorders with inflammatory syndrome. J Pharm Pharmacol. 2014;66:1122-32.
- 174.- Bozeman PM1, Learn DB, Thomas EL. Inhibition of the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase by dapsone. Biochem Pharmacol. 1992;44:553-63.

- 175.- Soubhye J, Prévost M, Van Antwerpen P, Zouaoui Boudjeltia K, Rousseau A, Furtmüller PG, et al. Structure-based design, synthesis, and pharmacological evaluation of 3-(aminoalkyl)-5-fluoroindoles as myeloperoxidase inhibitors. *J Med Chem.* 2010;53:8747-59.
- 176.- Kettle AJ, Gedye CA, Winterbourn CC. Mechanism of inactivation of myeloperoxidase by 4-aminobenzoic acid hydrazide. *Biochem J.* 1997;321:503-8.
- 177.- Liu C, Desikan R, Ying Z, Gushchina L, Kampfrath T, DeJuliis J, et al. Effects of a novel pharmacologic inhibitor of myeloperoxidase in a mouse atherosclerosis model. *PLoS One.* 2012;7:e50767.
- 178.- Santer FR, Malinowska K, Culig Z, Cavarretta IT. Interleukin-6 trans-signalling differentially regulates proliferation, migration, adhesion and maspin expression in human prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer.* 2010;17:241-53.
- 179.- Gu L, Talati P, Vogiatzi P, Romero-Weaver AL, Abdulghani J, Liao Z, et al. Pharmacologic suppression of JAK1/2 by JAK1/2 inhibitor AZD1480 potently inhibits IL-6-induced experimental prostate cancer metastases formation. *Mol Cancer Ther.* 2014;13:1246-58.
- 180.- Culig Z, Pühr M. Interleukin-6: a multifunctional targetable cytokine in human prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;360:52-8.
181. Cowell IG, Austin CA. Mechanism of generation of therapy related leukemia in response to anti-topoisomerase II agents. *Int J Environ Res Public Health* 2012;9:2075–91
182. Atwal M, Lishman EL, Austin CA, Cowell IG. Myeloperoxidase Enhances Etoposide and Mitoxantrone-Mediated DNA Damage: A Target for Myeloprotection in Cancer Chemotherapy. *Mol Pharmacol.* 2017; 91:49–57.
- 183.- Ma J, Liu Y, Huang XL, Zhang ZY, Myers JN, Neskey DM, et al. Induction chemotherapy decreases the rate of distant metastasis in patients with head and neck squamous cell carcinoma but does not improve survival or locoregional control: a meta-analysis. *Oral Oncol* 2012;48:1076-84.

184. Karpathiou G, Giroult JB, Forest F, Fournel P, Monaya A, Froudarakis M, et al. Clinical and Histologic Predictive Factors of Response to Induction Chemotherapy in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Am J Clin Pathol.*2016;146:546-53.
- 185.- Bauer G. Lactobacilli-mediated control of vaginal cancer through specific reactive oxygen species interaction. *Med Hypotheses* 2001;57:252–7.
- 186.- Martin HL, Richardson BA, Nyange PM, Lavreys L, Hillier SL, Chohan B, et al. Vaginal lactobacilli, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition. *J Infect Dis* 1999;180:1863–8.
- 187.- Song M, Santanam N. Increased myeloperoxidase and lipid peroxide-modified protein in gynecological malignancies. *Antioxid Redox Signal* 2001;3:1139–46
- 188.- Gardella B, Iacobone AD, Musacchi V, Calvino IG, De Amici M, Torre C, et al. The Mucosal Innate Immune Response in Primary Human Papillomavirus Infection: A Pilot Study. *J Low Genit Tract Dis.* 2016;20:338-42
- 189.- Bellamy WR, Wakabayashi H, Takase M, Kawase K, Shimamura S, Tomita M. Role of cell-binding in the antibacterial mechanism of lactoferricin B. *J Appl Bacteriol* 1993;75: 478–84.
- 190.- Mistry N, Drobni P, Näslund J, Sunkari VG, Jenssen H, Evander M. The anti-papillomavirus activity of human and bovine lactoferricin. *Antiviral Res* 2007;75:258–65

Autor de la acuarela de la cubierta: A. Leidinger