

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA.
FACULTAD DE MEDICINA.
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA.

LA EXPRESIÓN DE LAS METALOPROTEINASAS EN CARCINOMAS DE CABEZA Y CUELLO.

Iñaki Zarrionandia Andraca.

Barcelona, 2011.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA.
FACULTAD DE MEDICINA.
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA.

LA EXPRESIÓN DE LAS METALOPROTEINASAS EN CARCINOMAS DE CABEZA Y CUELLO.

Tesis para la obtención del grado de Doctor

Directores: Dr. León i Vintró.
Dr. Luis Vila Navarro.
Dr^a. Mercedes Camacho Pérez de Madrid.

Autor: Iñaki Zarraonandia Andraca.

Agradecimientos

Esta tesis doctoral es producto del trabajo de un gran equipo de profesionales que día a día dedican mente, cuerpo y alma a esta hermosa y difícil tarea de ampliar los límites del conocimiento de la Oncología.

Me gustaría aprovechar de expresar mi eterno agradecimiento de forma dirigida, a todos aquellos que han hecho posible que éste trabajo se haya materializado:

-Al Dr. David Virós porque además de ser un gran compañero y pilar durante todo mi periodo de formación como especialista, ésta tesis doctoral es cosecha de su valioso y dedicado trabajo de investigación realizado como Becado (2009-2010) en el Laboratorio de Mediadores de la Inflamación del Hospital de Sant Pau, en conjunto con nuestro Servicio de ORL.

-Al Dr. Xavier León porque además de ser admirable como persona y profesional, ha sido quien con su enorme capacidad e inagotable dedicación, me ha acompañado en cada paso de la realización de éste trabajo.

-Al Dr. Luis Vila y Dra. Mercedes Camacho, por aceptar co-dirigir éste trabajo y mostrarse siempre activos durante su proceso de realización. Aprovecho de agradecer a todos los profesionales del Laboratorio de Mediadores de la Inflamación que de alguna u otra forma han permitido que éste trabajo llegue a su fin.

-Al Dr. Quer por su apoyo a lo largo de mi proceso de formación como especialista y su valiosa ayuda en el proceso de corrección del trabajo.

-A mi señora Francisca porque además de ser mí bastión en ésta vida, sin su apoyo, paciencia, sacrificio, fuerza y cariño, tanto para mí como para nuestros hijos, no hubiera sido posible el poder disfrutar éste periodo de formación como especialista y encontrar el valioso tiempo para poder trabajar en ésta tesis doctoral.

-A mis hijos Amanda y Manuel, por ser fuentes inmensurables de amor y de energía, regalos que facilitan el enfrentar el día a día y que obras como ésta lleguen a término.

Antes de acabar me gustaría reflexionar acerca de la sumatoria de fuerzas, esfuerzos y decisiones, que han permitido que llegue primero a ser médico, y segundo a ser otorrinolaringólogo. En éste recorrido quiero aprovechar de agradecer:

- A mis padres, Gonzalo y Carmen Gloria, por estar siempre junto a mí en todo momento y regalarme una educación privilegiada. A mis hermanos, Anton, Aintzane e Izaskun, por vuestra unidad en los buenos y malos momentos de la vida.

-A mis queridos suegros, Gunther y Sandra, por el apoyo, la comprensión y el incentivo en todo momento.

-A mis amigos, especialmente a Ignacio Tamés que ha sido como tener otro hermano.

-A mis Profesores de la Universidad de los Andes, porque además de apuntar siempre hacia la excelencia académica, me impregnaron del significado de “paciente”.

-Al Dr.Hector Fantuzzi, por ser mí mentor y constante apoyo en ésta apasionante especialidad.

-A los Adjuntos, Residentes, Enfermeras y Secretaria del Servicio de Otorrinolaringología del Hospital de Sant Pau, por vuestro apoyo, amistad, paciencia e invaluable conocimientos, que han permitido que éste proceso de formación llegue a buen término.

- Y finalmente, y no por eso menos importante, a los miles de pacientes que he tenido la oportunidad de interactuar, por ser ellos la fuente y motor del querer saber más.

Muchas gracias a todos!!

INDICE

I.-INTRODUCCIÓN.....	11
1.- LA MATRIZ EXTRACELULAR.....	14
2.- MECANISMOS DE INVASIÓN Y METÁSTASIS.....	17
3.- PAPEL DE LAS PROTEASAS EN EL DESARROLLO DE LOS TUMORES.....	20
4.- METALOPROTEINASAS (MMPs).....	23
6.- MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS MMPs.....	40
7.- REGULACIÓN DE LAS MMPs EN LOS TUMORES.....	46
8.- PAPEL FUNCIONAL DE LAS MMPs EN EL CÁNCER.....	51
9.- EXPRESIÓN DE MMPs EN LOS CARCINOMAS DE CABEZA Y CUELLO.....	59
10.- PAPEL DE LAS MMPs EN LA AFECTACIÓN REGIONAL EN LOS PACIENTES CON CARCINOMAS DE CABEZA Y CUELLO.....	76
11.- TRASCENDENCIA CLÍNICA DE LA EXPRESIÓN DE LAS MMPs EN LOS CARCINOMAS DE CABEZA Y CUELLO.....	99
12.- PAPEL DE LAS MMPs COMO FACTOR PREDICTOR DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO.....	112
13.- PAPEL DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE LAS MMPs.....	114
14.- PAPEL DE LOS POLIMORFISMOS DE LAS MMPs EN LA SUSCEPTIBILIDAD AL DESARROLLO DE LOS CARCINOMAS DE CABEZA Y CUELLO.....	122
15.- PAPEL DE LAS MMPs COMO DIANAS TERAPÉUTICAS.....	128
II.-JUSTIFICACIÓN.....	134
III.-HIPÓTESIS.....	138
IV.-OBJETIVOS.....	142
V.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	146
1.- CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO.....	148
2.- MANIPULACIÓN DE LAS MUESTRAS DE BIOPSIA Y DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE LOS DIFERENTES GENES EVALUADOS.....	160
3.- TÉCNICAS ESTADÍSTICAS.....	171
V.-RESULTADOS.....	174
1.- VALORES DE EXPRESIÓN CORRESPONDIENTES A LAS MMPs ESTUDIADAS.....	176
2.- COMPARACIÓN EN LA EXPRESIÓN ENTRE TEJIDO TUMORAL Y MUCOSA SANA.....	181
3.- CORRELACIÓN ENTRE LAS MMPs Y EL TIMP-1.....	186
4.- SIGNIFICADO CLÍNICO DE LAS MMPs. AFECTACIÓN GANGLIONAR.....	190
5.- RELACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LAS MMPs CON LAS VARIABLES CLÍNICAS.....	192
6.- CAPACIDAD PRONÓSTICA DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE MMPs Y TIMP-1.	195
7.- CAPACIDAD PRONÓSTICA DE LA MMP-9.....	200
8.- CAPACIDAD PRONÓSTICA DEL TIMP-1.....	207
9.- EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PRONÓSTICA CORRESPONDIENTE A LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LAS MMPs AGRUPADAS EN FUNCIÓN DE SU CATEGORÍA FUNCIONAL.....	213
10.- EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PRONÓSTICA CORRESPONDIENTE A LA VALORACIÓN CONJUNTA DE LOS NIVELES DE MMPs Y TIMP-1.....	215

11.- RELACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LAS MMPs Y EL TIMP-1 CON LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON QUIMIOTERAPIA DE INDUCCIÓN.	224
12.- RELACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LAS MMPs CON LOS DE OTROS GENES QUE PARTICIPAN EN LOS PROCESOS DE CARCINOGENESIS EN LOS PACIENTES CON CARCINOMAS DE CABEZA Y CUELLO.....	226
VI.-DISCUSIÓN.....	238
1.- EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LAS MMPs ENTRE EL TUMOR Y LA MUCOSA SANA.	240
2.- CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LAS DIFERENTES MMPs.	244
3.- RELACIÓN DE LAS MMPs CON LA AFECTACIÓN GANGLIONAR.	247
4.- RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS MMPs Y EL TIMP-1 CON VARIABLES CLÍNICAS.	251
5.- RELACIÓN DE LAS MMPs CON EL CONTROL ONCOLÓGICO.	252
6.- RELACIÓN DE LA MMP-9 CON EL CONTROL DE LA ENFERMEDAD.	257
7.- RELACIÓN DEL TIMP-1 CON EL CONTROL DE LA ENFERMEDAD.	263
8.- EVALUACIÓN CONJUNTA DE LOS NIVELES DE MMPs Y TIMP.	268
9.- RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE LAS MMPs Y EL TIMP-1 Y LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON QUIMIOTERAPIA DE INDUCCIÓN.	271
10.- RELACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LAS MMPs CON LOS DE OTROS GENES QUE PARTICIPAN EN LOS PROCESOS DE CARCINOGENESIS EN LOS PACIENTES CON CARCINOMAS ESCAMOSOS DE CABEZA Y CUELLO.....	272
VII.-CONCLUSIONES.....	294
VIII.-BIBLIOGRAFÍA.....	300

I.-INTRODUCCIÓN.

La capacidad de invasión local, de afectación regional y afectación a distancia del carcinoma escamoso de cabeza y cuello depende en gran medida de la posibilidad de progresión a través de la membrana basal, epitelio a partir del cual se origina, y a través de la matriz extracelular subyacente. En este sentido, las metaloproteinasas (MMPs) juegan un papel instrumental en la adquisición de la capacidad invasiva por parte del tumor.

Para que las células tumorales adquieran la capacidad de invasión y metástasis deben: 1.- desarrollar movilidad, 2.- modificar los patrones habituales de adhesión celular, y 3.- tener la capacidad de remodelar la matriz extracelular.

Desde los años 80 se reconoce que las MMPs cuentan con la capacidad de degradar componentes de la matriz extracelular, facilitando la invasión local del tumor y la posible diseminación metastásica².

1.- LA MATRIZ EXTRACELULAR.

La matriz extracelular es una entidad estructuralmente compleja que proporciona soporte a las células. Desde el punto de vista de su composición, cuenta con tres grandes clases de biomoléculas (Figura 1):

- proteínas estructurales: colágeno y elastina
- proteínas especializadas: laminina, fibronectina
- proteoglicanos.

Considerada inicialmente como un elemento de soporte pasivo, hoy en día se reconoce su papel como un componente mayor en la regulación de la actividad celular. Las moléculas que componen la matriz extracelular participan en el desarrollo apropiado de los tejidos y su mantenimiento, jugando un papel fundamental en los procesos de cicatrización y oncogénesis. Los cambios en la composición de la matriz extracelular contribuyen al proceso carcinogénico, la proliferación celular y al desarrollo de tumores. Los cambios en los componentes de la matriz y los resultantes en los receptores celulares específicos, conocidos como integrinas, juegan un papel esencial en la transformación del epitelio escamoso hacia carcinoma.

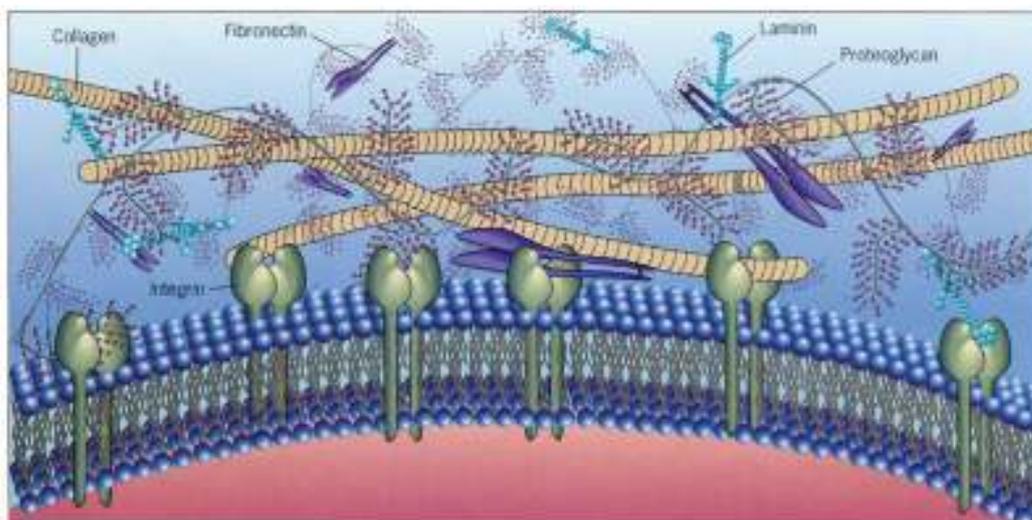


Figura 1: Componentes de la matriz extracelular.

Las **integrinas** son una familia de receptores celulares de superficie que median las interacciones entre la célula y la matriz extracelular, anclando el citoesqueleto al ambiente extracelular. Cada integrina está compuesta por una subunidad α y una β . Las vías de señalización intracelular mediadas por integrinas controlan el crecimiento celular, la diferenciación, la apoptosis, los cambios en el citoesqueleto, la migración celular y la capacidad de invasión³.

El **colágeno** es la proteína más abundante a nivel de la matriz extracelular. Los colágenos son sintetizados de forma predominante por los fibroblastos, si bien las células epiteliales también cuentan con la capacidad de sintetizar este tipo de proteínas. El colágeno es secretado en el espacio extracelular en forma de un precursor (procolágeno), que es sometido a la acción de unas proteasas específicas, y a partir de aquí se produce la polimerización de las moléculas para dar lugar a la formación de las fibrillas de colágeno.

Existen al menos 30 genes que codifican proteínas que, combinadas entre sí, dan lugar a más de 20 variedades de fibrillas de colágeno. Las diferentes moléculas de colágeno pueden ser divididas en diversas familias en función de los tipos de estructura a los cuales dan lugar:

- fibrilares de cadena larga: I, II, III, V, XI
- fibrilares de cadena corta: VIII, X
- asociados a fibrillas: IX, XII, XIV
- de membrana basal: IV
- otros: VI, VII, XIII

Los tipos I, II y III son los más abundantes y forman fibrillas de estructura similar. El tipo IV forma un retículo bidimensional y es el componente principal de las membranas basales.

La **elastina**, en contraste con el colágeno, da elasticidad a los tejidos. La elastina es sintetizada por los fibroblastos y las células de musculatura lisa.

Las **fibronectinas** son proteínas que conectan las células con las fibras colágenas presentes en la matriz extracelular, permitiendo a las células el desplazamiento a través de dicha matriz. Las fibronectinas se unen al colágeno y a las integrinas presentes en la superficie celular, permitiendo la reorganización del citoesqueleto y facilitando el movimiento de las células.

Las **lamininas** son glicoproteínas que se encuentran a nivel de la membrana basal formando unas redes con las fibras de colágeno tipo IV, participando además en los procesos de adhesión celular.

Finalmente, los **proteoglicanos** son polímeros de carbohidratos que se encuentran habitualmente asociados a proteínas presentes en la matriz extracelular. Cuentan con una carga negativa neta que atrae de forma activa iones de sodio cargados positivamente, que a su vez por un proceso de osmosis reclutan moléculas de agua, manteniendo hidratados tanto la matriz extracelular como las células residentes. Además pueden jugar un cierto papel al atrapar y almacenar factores de crecimiento a nivel de la matriz extracelular.

2.- MECANISMOS DE INVASIÓN Y METÁSTASIS.

La infiltración tumoral y la metastatización son unos procesos dinámicos que comportan interacción entre las células tumorales y el tejido no tumoral subyacente. Esta serie de fenómenos resultan de la existencia de alteraciones en los mecanismos de adhesión de las células entre si y de éstas con el substrato, la adquisición por parte de las células tumorales de la capacidad de migración, y la existencia de procesos de proteólisis y degradación de la membrana basal y la matriz extracelular.

La Figura 2 esquematiza los pasos secuenciales correspondientes a la adquisición por parte de las células tumorales de la capacidad de invasión y metástasis.

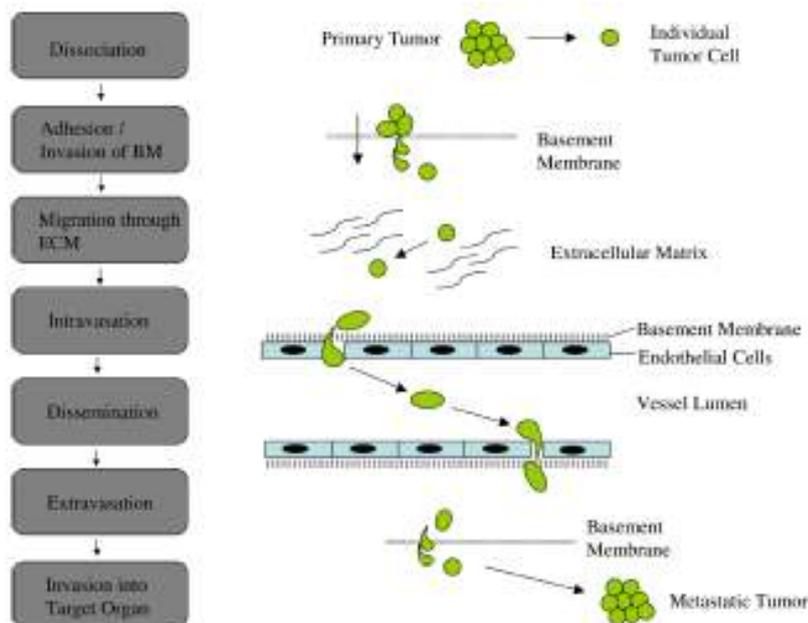


Figura 2¹: Pasos secuenciales de la cascada metastásica.

El proceso de metástasis se inicia con un único desprendimiento del tumor primario. La progresión a metástasis requiere que células tumorales individuales se adhieran o invadan a través de la membrana basal, migren a través de la matriz extracelular y luego entren en los vasos sanguíneos o linfáticos, donde pueden diseminarse a distancia.

El proceso se inicia con la progresión de las células tumorales a través de la membrana basal del epitelio a partir del cual se originó el carcinoma, compuesta principalmente por colágeno tipo IV, laminina y el proteoglicano heparán sulfato. A continuación las células deben iniciar una migración y proliferación celular en la matriz extracelular subyacente. Los fenómenos de metastatización comprenden la progresión del tumor a través de la matriz extracelular hasta alcanzar las estructuras vasculares y linfáticas, la intravasación de las células tumorales y su diseminación, y finalmente la extravasación y proliferación en los órganos diana correspondientes.

Toda esta serie de acontecimientos depende de la activación de un gran número de vías metabólicas que regulan cada uno de los acontecimientos necesarios para la consecución de los fenómenos de invasión y metástasis. La Figura 3 ejemplifica la complejidad de los mecanismos implicados¹.

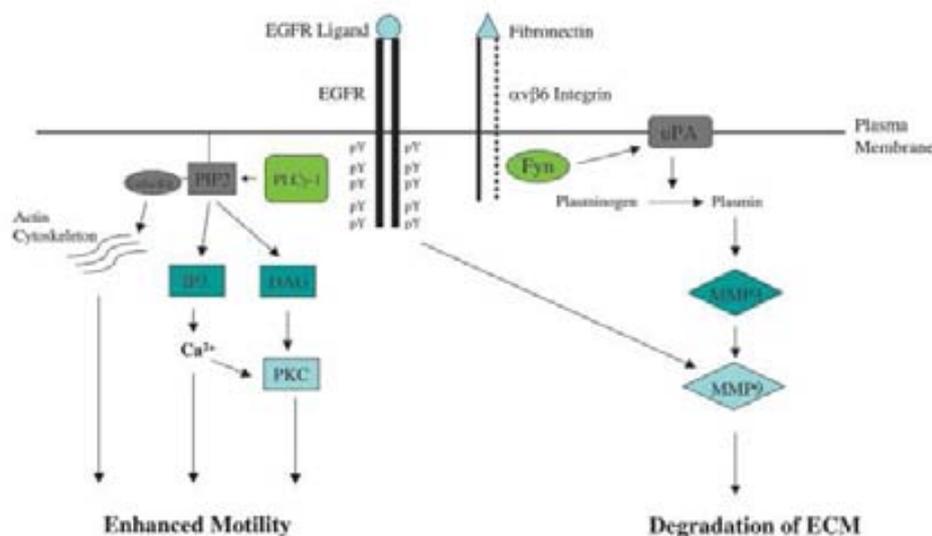


Figura 3¹: Elementos de transducción de señales importantes para la invasión y metástasis de carcinomas escamosos de cabeza y cuello(CECC).

La unión del ligando de EGFR induce la autofosforilación en cinco sitios de la tirosina intracelular, fosforilando la PLC γ -1. La PLC γ -1 hidroliza el PIP2 en DAG e IP3, que libera gelsolina, una proteína que modifica los filamentos de actina. La liberación de IP3 aumenta el calcio intracelular. El calcio intracelular y el DAG activan la PKC. Todas, la gelsolina, el calcio y la PKC sirven para aumentar la motilidad a través de la adhesión y las alteraciones del citoesqueleto de actina. Los componentes de la matriz extracelular (MEC) como la fibronectina, el complejo integrina *avhh6* y *Fyn* activada, activan la vía de degradación de la matriz: el uPA, la MMP-3 y la MMP-9. El uPA convierte el plasminógeno en plasmina, que posteriormente activa a la MMP-3, que luego activa a la MMP-9. La activación del EGFR también aumenta la activación de las MMPs, particularmente la MMP-9. La mayor activación de MMPs mejora la degradación proteolítica de los componentes de la matriz y por ende, facilita la invasión y metástasis de las células tumorales de los CECC.

PIP2, fosfatidilinositol (4,5) bifosfonato; PLC γ -1, fosfolipasas C gamma 1; IP3, inositol-trifosfato; DAG, diacilglicerol; PKC, protein kinasa C; EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico; pY, fosfotirosina; uPA, activador del plasminógeno de urokinasa.

La activación del receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR) de la célula tumoral por parte de sus ligandos específicos comporta la activación de diferentes vías moleculares que facilitan la movilización celular. Por otra parte, la interacción de integrinas y fibronectina activa vías metabólicas que favorecen la degradación de la matriz extracelular a partir de la acción de las metaloproteinasas (MMPs). Además, ambas vías metabólicas interactúan, de manera que la activación de EGFR ejerce un efecto sobre la actividad de las MMPs.

Del esquema anterior se deduce la importancia de determinadas moléculas con actividad proteasa, como son las MMPs, en los mecanismos que facilitan la progresión tumoral de los tumores malignos en general y de los carcinomas escamosos de cabeza y cuello en particular.

3.- PAPEL DE LAS PROTEASAS EN EL DESARROLLO DE LOS TUMORES.

Las proteasas son moléculas que juegan un papel fundamental en múltiples procesos biológicos y que se asocian con una gran variedad de situaciones patológicas, entre ellas el cáncer. Las proteasas actúan como enzimas con una capacidad altamente selectiva de degradar substratos específicos, con influencia en el comportamiento y la supervivencia celular.

El degradoma humano- conjunto completo de proteasas producidos por las células humanas- consiste en al menos 569 proteasas y homólogos de las proteasas distribuidos en cinco clases: MMP (n=194), proteasas relacionadas con la serina (n=176), cisteína (n=150), treonina (n=28) y el ácido aspártico (n=21). La Figura 4 muestra los componentes del degradoma humano.

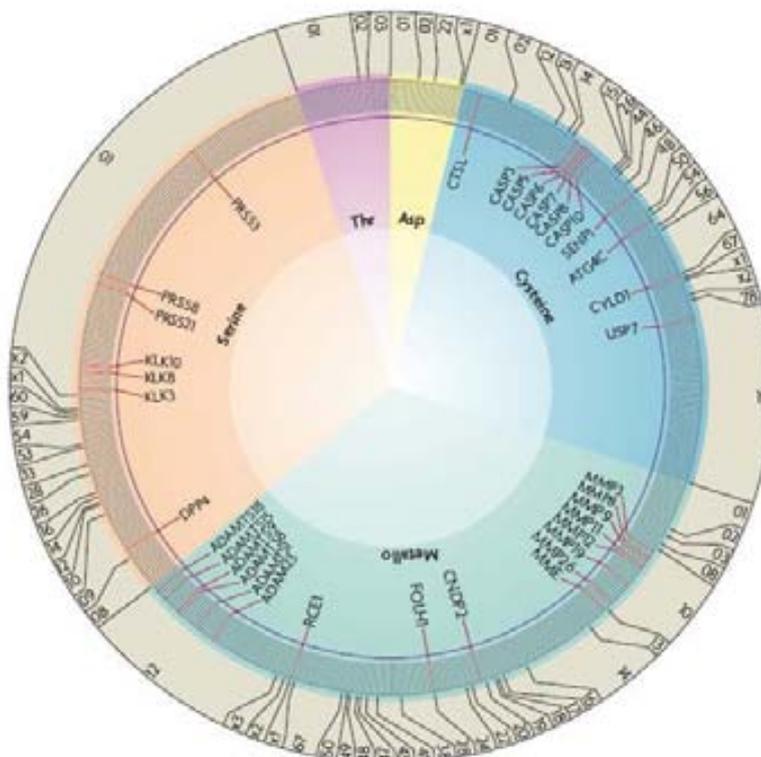


Figura 4: Componentes del degradoma humano.

En 1946 Fisher propuso que la actividad proteolítica asociada al tumor podría ser responsable de la degradación de la matriz extracelular y de la subsiguiente invasión del tejido normal subyacente⁴. A partir de 1970 empezaron a identificarse específicamente diferentes proteasas, unas pertenecientes a la familia de las MMPs y otras asociadas a serina y cisteína, la mayoría con actividad promotora de la aparición de metástasis.

En el metabolismo de las células tumorales, las proteasas participan y regulan procesos que incluyen la proliferación, adhesión, migración, diferenciación, angiogénesis, envejecimiento, autofagia, apoptosis y evasión del sistema inmune.

Las proteasas se pueden clasificar en intracelulares y extracelulares. La actividad de las proteasas intracelulares se asocia en general con la retirada o metabolización de sustancias dañadas o no deseables a nivel celular. La organización de estas enzimas intracelulares en cascadas proteolíticas actúa como un mecanismo de protección. De hecho, existen ejemplos en los que la existencia de mutaciones provoca la pérdida de su función, induciendo o favoreciendo los fenómenos de carcinogénesis, actuando como supresores de tumores en un sentido clásico.

Las proteasas intracelulares se han dividido en tres clases de acuerdo a su acción: i.-Serín-proteasas, como las Catepsinas (A, G, y R), Uroquinasas, treonin-proteasas; ii.- Cisteín-proteasas, como las Catepsinas (B, B2, C, H, I, J, K, L, M, N, O, P, S, T, y X), las Caspasas y las Calpaínas (I y II); iii.- Aspartato-proteasas, como las Catepsinas (D y E). Las Caspasas, juegan un papel fundamental en la muerte celular programada o apoptosis.

Por el contrario, las proteasas extracelulares suelen encontrarse relacionadas con mecanismos que facilitan la carcinogénesis, encontrándose habitualmente sobreexpresadas en los tumores, con frecuencia como consecuencia de una activación de las vías de transcripción. De todas formas, hoy en día se conoce que no todas estas proteasas extracelulares juegan un papel favorecedor del tumor, contando algunas de ellas con un efecto antitumoral⁵. Entre las proteasas extracelulares y pericelulares se encuentran las MMPs, desintegrinas, neprilisin, catepsinas, calicreínas, prostasinas y la dipeptil peptidasa 4.

4.- METALOPROTEINASAS (MMPs)

El primer miembro de la familia de las MMPs descubierto fue una colagenasa intersticial, descrita por Gross y Lapiere⁶ en 1962 en experimentos designados a explicar cómo la cola de los renacuajos, rica en colágeno, era reabsorbida durante el proceso de la metamorfosis.

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

4.1.- Características químicas y función.

Las MMPs son miembros de una familia de proteínas dependientes del zinc (Zn^{2+}). Hasta el momento se han identificado más de 25 formas. La estructura básica de las MMPs contiene los siguientes dominios: un péptido de señal, que dirige a la MMP en el retículo endoplasmático durante su síntesis; un propéptido que mantiene la latencia de la enzima hasta que es eliminado; la unidad catalítica, que contiene la zona de unión relacionada con el Zn^{2+} y que es la que ejerce la actividad enzimática; y finalmente un dominio hemopexina, que es el que determina la especificidad del sustrato y que cuenta con una pequeña zona de bisagra que le permite presentar el sustrato al core activo del dominio catalítico (Figura 5).

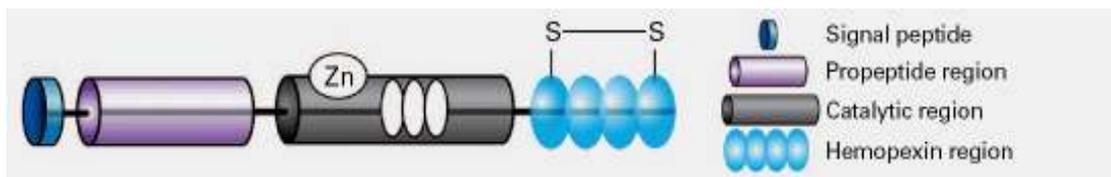


Figura 5: Componentes estructurales básicos de las MMPs.

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

4.2.- Clasificación de las MMPs.

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

Un dato a tener en cuenta en el momento de evaluar de forma conjunta las MMPs es que los sufijos 4, 5 y 6 han sido abandonados, de manera que no existen MMPs con dicha numeración.

La Tabla 1 enumera las MMPs descritas hasta el momento.

MMP-1	colagenasa 1
MMP-2	gelatinasa A
MMP-3	estromelisina 1
MMP-7	matrilisina 1
MMP-8	colagenasa 2
MMP-9	gelatinasa B
MMP-10	estromelisina 2
MMP-11	estromelisina 3
MMP-12	Metaloelastasa
MMP-13	colagenasa 3
MMP-14	MT1-MMP
MMP-15	MT2-MMP
MMP-16	MT3-MMP
MMP-17	MT4-MMP
MMP-18	colagenasa 4
MMP-19	estromelisina 4
MMP-20	Enamelisina
MMP-21	XMMP (Xenopus)
MMP-22	CMMP (Chicken)
MMP-23	cisteína MMP
MMP-24	MT5-MMP
MMP-25	MT6-MMP
MMP-26	matrilisina 2
MMP-27	CA
MMP-28	CA-MMP epilisina

Tabla 1: Tipos de MMPs descritas en vertebrados junto con su denominación común.

Existen diferentes formas de clasificar las MMPs:

4.2.1.- Clasificación evolutiva.

Desde un punto de vista evolutivo y a partir de métodos bioinformáticos que comparan las secuencias primarias de las MMPs, se han sugerido los siguientes grupos de MMP.

- MMP-19.
- MMP-11, -14, -15, -16 y -17.
- MMP-2 y -9.
- todas las demás MMPs.

4.2.2.- Clasificación funcional.

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

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

Las colagenasas son capaces de degradar las fibras colágenas, siendo las únicas enzimas en los mamíferos que cuentan con dicha capacidad. Tradicionalmente las colagenasas han agrupado las MMPs 1, 8, 13, y 18.

Adicionalmente, la MMP-14 ha mostrado capacidad de degradación del colágeno.

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

Las estromelisininas muestran una amplia capacidad para adherirse a diversas proteínas de la matriz extracelular, pero no cuentan con actividad sobre las fibras colágenas. Los tres miembros canónicos de este grupo son las MMP-3, MMP-10 y MMP-11.

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

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

Cada vez queda más claro que estas agrupaciones son artificiales, ya que existen MMPs que no encajan en alguno de estos grupos tradicionales. Así, se ha descrito la enamelisina o MMP 20, que es una MMP con actividad específica a nivel dentario y que se expresa durante las fases iniciales del desarrollo dental; o las MMP- 19, -21, -22, -23a, -23b, -27 y -28 que no se adscriben a ninguno de los grupos citados.

4.2.3.- Clasificación según la localización de su lugar de acción.

Otro método de clasificación de las MMPs se refiere a la localización de su lugar de acción. Desde este punto de vista, las MMPs pueden ser clasificadas en MMPs de membrana, que incluyen de forma exclusiva al grupo de MMPs transmembrana, y MMPs secretadas, que incluye al resto de MMPs.

4.2.4- Clasificación según su estructura.

Por último, existe otro método de clasificación que agrupa las diferentes MMPs en función de su estructura. De acuerdo con esta clasificación, las MMPs se dividen en:

- MMPs arquetípicas: incluye MMPs con una estructura estándar, agrupando las colagenasas (MMP-1, -8, -13 y -18), las estromelinas (MMP-3 y -10) y otras MMPs como la metaloelastasa (MMP-12), enamelinina (MMP-20) y las MMP-19 y MMP-27
- Matrilisinas: formadas por los dominios mínimos requeridos para la secreción, latencia y actividad catalítica, agrupando a la MMP-7 y MMP-26.
- Gelatinasas: contienen unos módulos suplementarios de fibronectina tipo II en la unidad catalítica que mejoran la capacidad para la degradación de colágeno y gelatina. Incluyen a las MMP-2 y MMP-9.
- MMP activable-convertasa: incluyen en el propéptido una inserción sobre la que actúa una proteasa furina-like. Las MMPs pertenecientes a este grupo pueden ser segregadas o quedar ancladas a nivel de la membrana celular. Entre las segregadas pertenecientes a este grupo se encuentran la estromelinina MMP-11, la epilisinina (MMP-28) y la MMP-21. Entre las asociadas a membrana se agrupan la MMP-14, MMP-15,

MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25. La MMP-23 A y B, que también se incluyen en este grupo, se caracterizan por la presencia de un dominio similar a una inmunoglobulina en la región C-terminal.

La Figura 6 esquematiza la distribución de las diferentes MMPs clasificadas en función de su estructura.

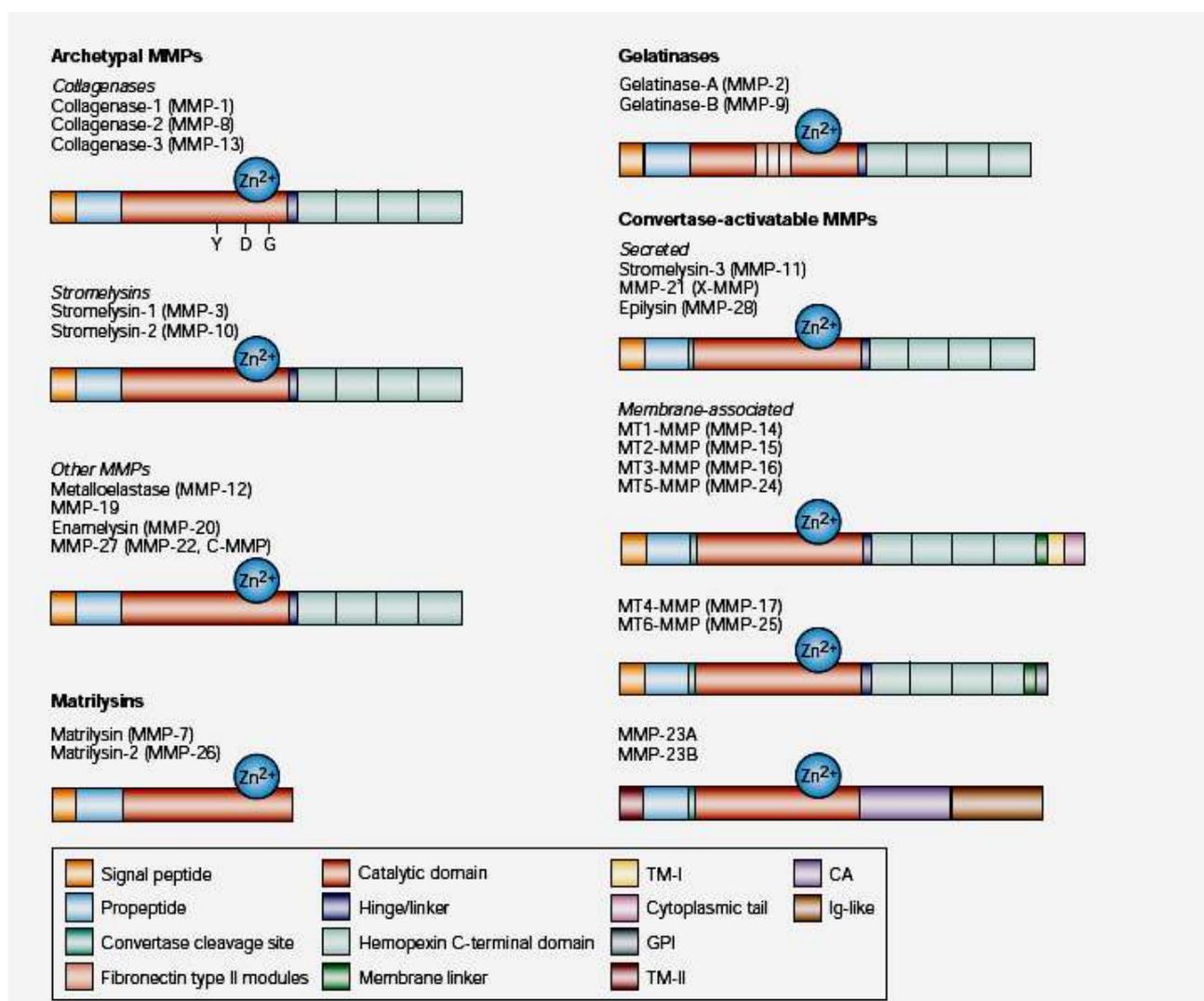


Figura 6: Clasificación de las MMPs en función de su estructura. *TM-I*, dominio transmembrana tipo I y tipo II; *GPI*, glicosil-fosfatidil-inositol; *CA*, formación de cisteína.

A continuación se detallan algunas de las características más relevantes de las MMPs que se han identificado de forma más habitual en los pacientes con carcinomas escamosos de cabeza y cuello.

5.1.- MMP1.

Conocida como colagenasa intersticial, se encuentra relacionada con procesos de degradación fisiológica de la matriz extracelular en el desarrollo embrionario o la remodelación tisular. Participa en la degradación de las fibras de colágeno tipos I, II, III, V, VII y VIII, y de la gelatina. El gen responsable de su codificación forma parte de un grupo de genes para las MMPs localizados en el cromosoma 11q22.3.

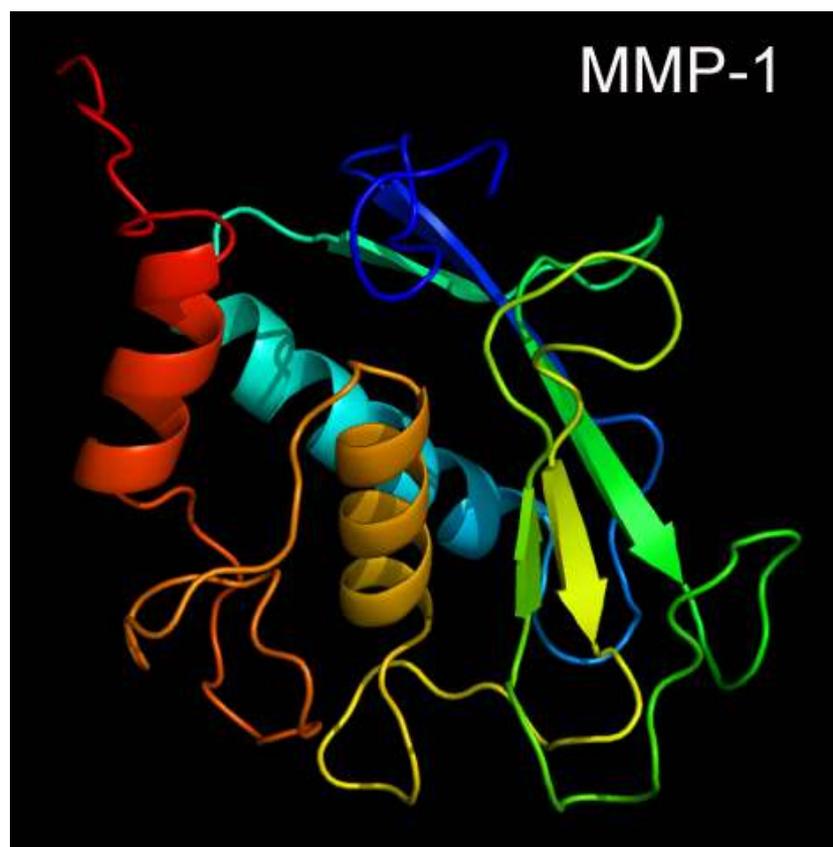


Figura 7: Estructura de la MMP-1 en 3D. Diagrama de cintas.

5.2.- MMP2.

Conocida como gelatinasa A o gelatinasa 72-kDa, ejerce su actividad proteolítica sobre las fibras de colágeno tipo IV, que es el componente estructural más importante de las membranas basales. Además, cuenta como sustrato a las fibras de colágeno V, VII y X, gelatina, laminina, elastina y fibronectina. Fisiológicamente, la MMP-2 participa en el desarrollo embrionario, la angiogénesis, la ovulación, la involución mamaria y la cicatrización. La MMP-2 se encuentra también involucrada en la formación osteoblástica de hueso y/o la inhibición de la reabsorción osteoclástica. Su actividad queda regulada por la acción de las trombospondinas. El gen responsable de la codificación de esta proteína se encuentra ubicado en el cromosoma 16q13-q21.

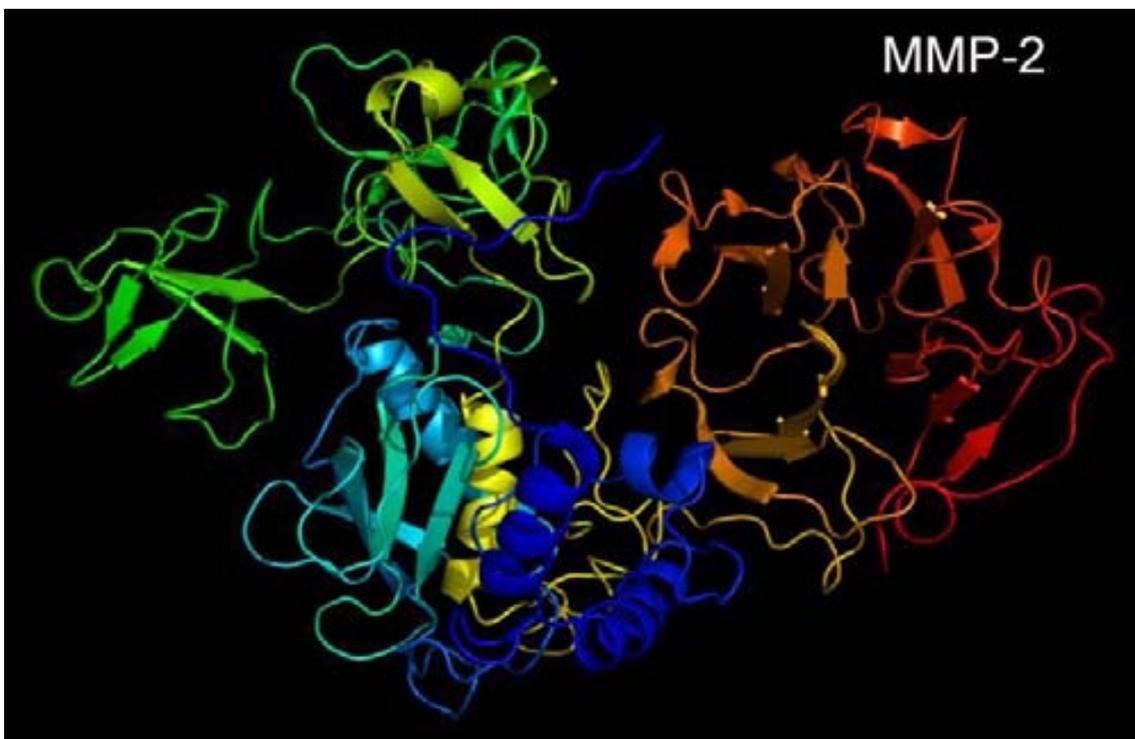


Figura 8: Estructura de la MMP-2 en 3D. Diagrama de cintas.

5.3.- MMP-3.

Conocida como estromelina 1, actúa metabólicamente sobre las fibras de colágeno II, IV, IX, X y XI, así como sobre la gelatina, elastina, fibronectina, proteoglicanos del cartílago y pro-MMP-1. La MMP-3 se encuentra implicada en los mecanismos de cicatrización, participando en la progresión de los fenómenos de aterosclerosis. El gen que codifica la proteína se localiza en el cromosoma 11q22.3.

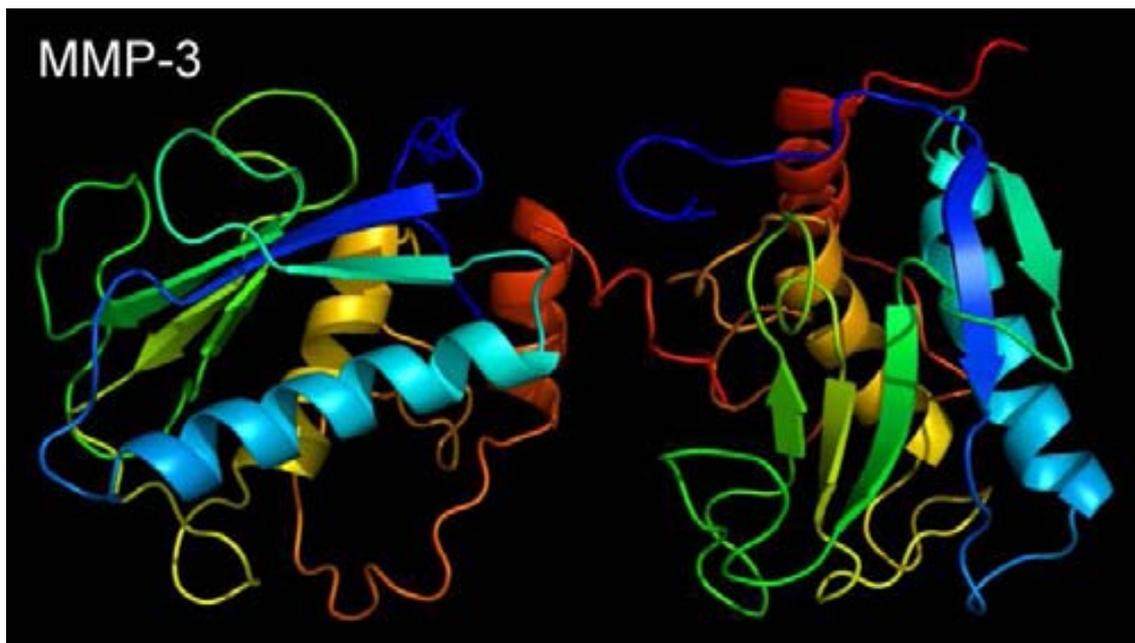


Figura 9: Estructura de la MMP-3 en 3D. Diagrama de cintas.

5.4.- MMP-7.

Conocida también como matrilisina, su función es llevar a cabo la degradación del colágeno tipo IV, gelatina, proteoglicanos, fibronectina, elastina y caseína. Se diferencia de la mayoría de los miembros de la familia de las MMPs en el hecho de que le falta el dominio C-terminal que aparece conservado en el resto de las MMPs. En condiciones fisiológicas participa en la cicatrización. En estudios en ratones se ha implicado en la regulación de la actividad de las defensinas presentes en la mucosa intestinal. El gen que lo codifica forma parte del grupo de genes responsables de las MMPs situado en el cromosoma 11q22.3.

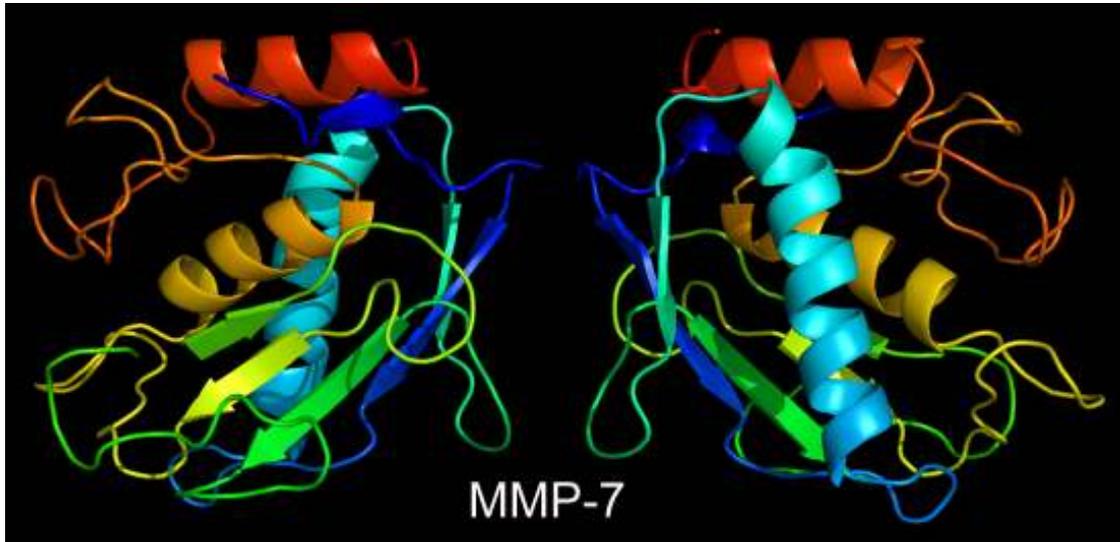


Figura 10: Estructura de la MMP-7 en 3D. Diagrama de cintas.

5.5- MMP-8.

También denominada colagenasa 2 o colagenasa de los neutrófilos. Cuenta como sustrato con las fibras de colágeno tipos I, II, III y V. La MMP-8 se almacena en gránulos citoplasmáticos de neutrófilos, activándose mediante una escisión autolítica del precursor. El gen responsable de la codificación de la MMP-8 se sitúa en el cromosoma 11q22.3.

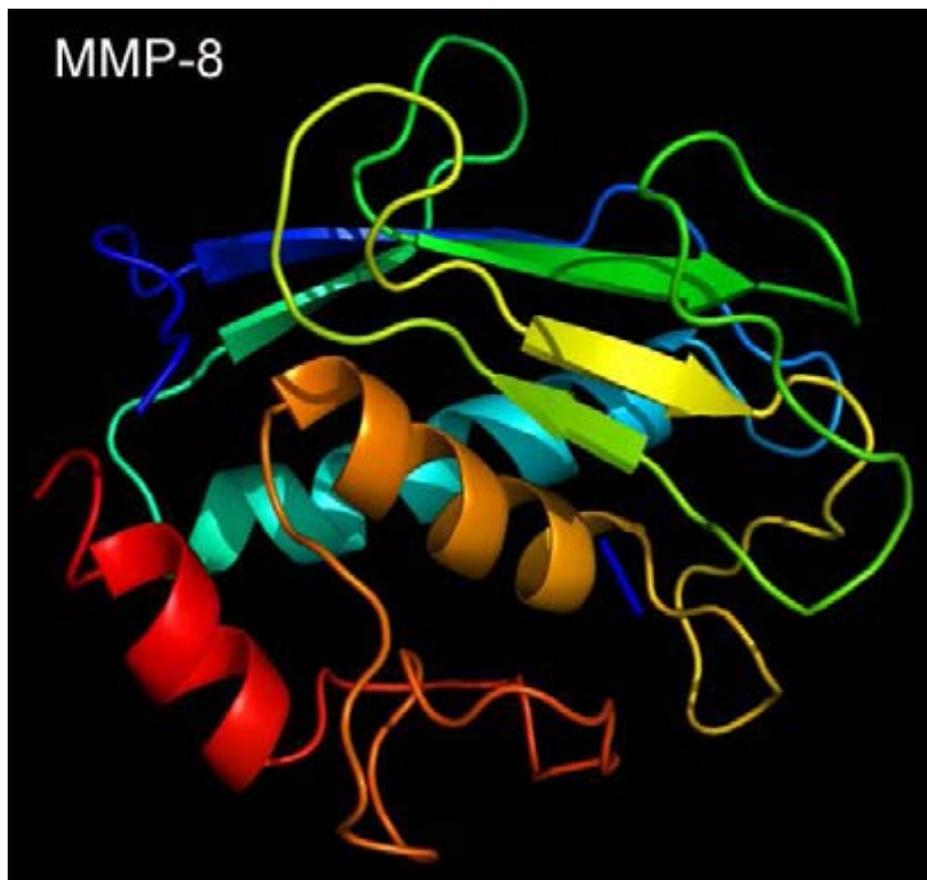


Figura 11: Estructura de la MMP-8 en 3D. Diagrama de cintas.

5.6- MMP-9.

La gelatinasa B o gelatinasa de 92-kDa, cuenta con una estructura muy similar a la de la MMP-2, con el que comparte substratos. La MMP-9 participa de la degradación de las fibras de colágeno tipo IV, V, XI y XIV, la gelatina, elastina, fibrilina, laminina y decorina. También cuenta con la acción activadora de factores de crecimiento, como el pro-TGF β o el pro-TNF α . Fisiológicamente y en coordinación con otras MMPs, participa en la remodelación tisular. Al igual que la MMP-2 está involucrada en la formación osteoblástica de hueso y/o la inhibición de la reabsorción osteoclástica. Estudios en modelos animales sugieren una relación de la MMP-9 con la movilización inducida por IL-8 de células progenitoras hematopoyéticas. Al igual que sucedía con la MMP-2, su actividad queda regulada por la acción de las trombospondinas. El gen responsable de la codificación de la MMP-9 se localiza en el cromosoma 20q11.2-q13.1.

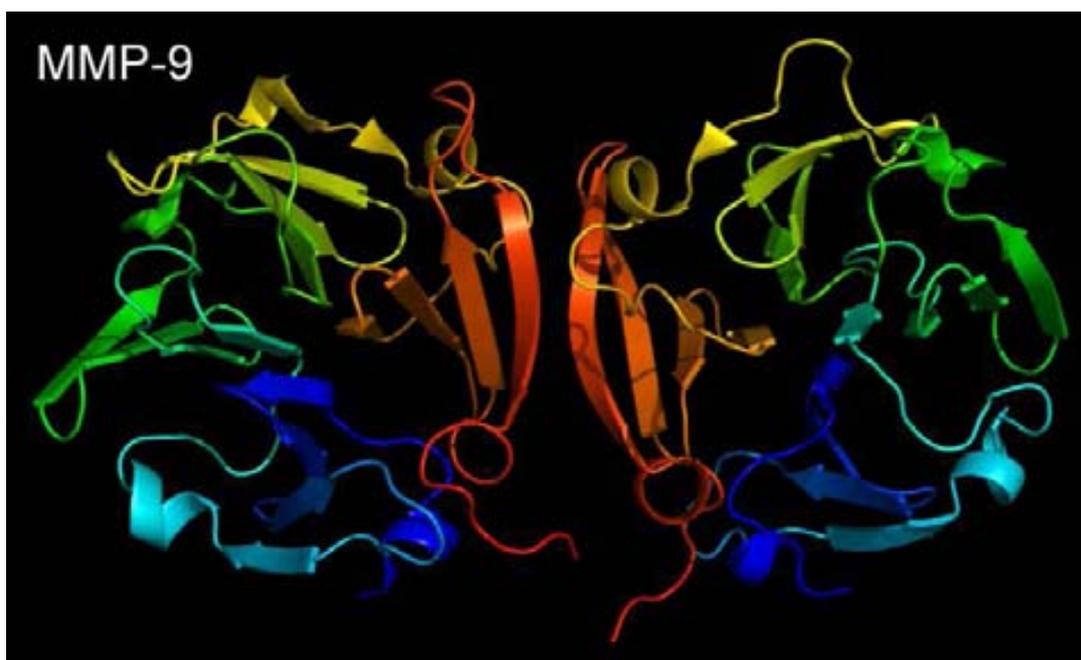


Figura 12: Estructura de la MMP-9 en 3D. Diagrama de cintas.

5.7.- MMP-10.

La MMP-10 o estromelisin 2 cuenta con la función de degradar las fibras de colágeno tipo IV, la laminina, gelatina y fibronectina. El gen responsable se localiza en el cromosoma 11q22.3.

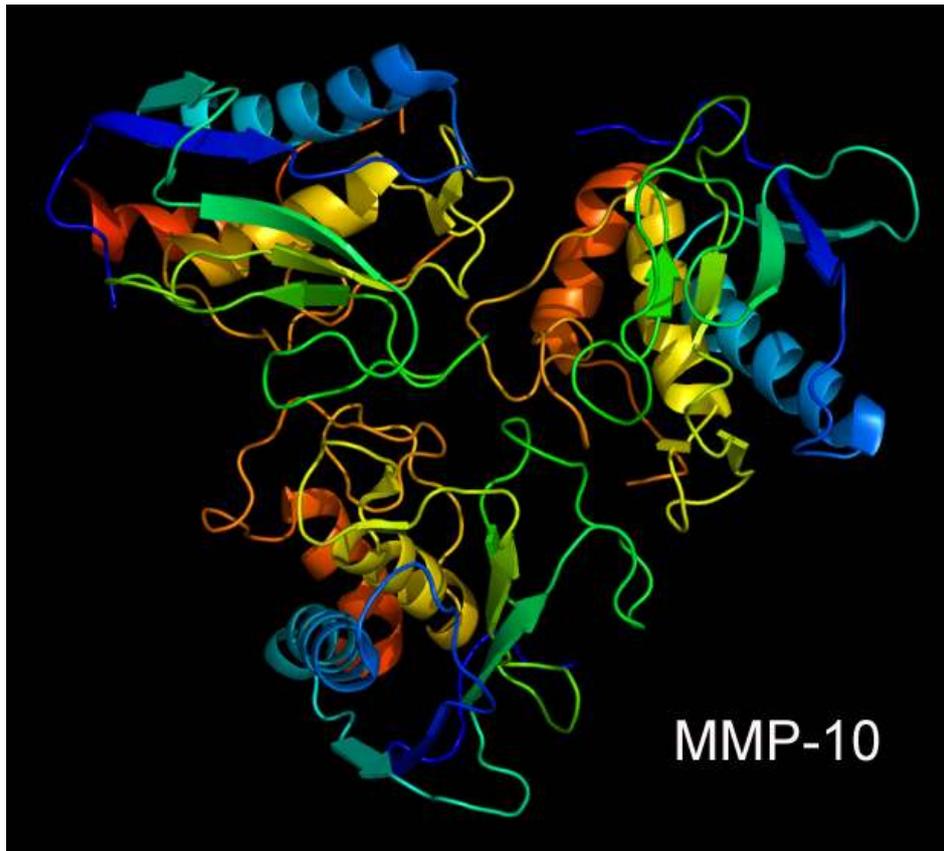


Figura 13: Estructura de la MMP-10 en 3D. Diagrama de cintas.

5.8- MMP-11.

Conocida como estromelisina 3, la MMP-11 actúa degradando la laminina. A diferencia de otras MMPs que se activan a nivel extracelular, la MMP-11 es activada intracelularmente por acción de la furina, una endoproteasa contenida en la vía secretora. A nivel tumoral se considera que favorece la supervivencia de las células cancerígenas a partir de la disminución de la apoptosis. Además, esta MMP participa en la regulación de los procesos de degradación a partir de la metabolización de la α_1 -antitripsina, un inhibidor de las proteasas. El gen responsable se localiza en el cromosoma 22q11.23.

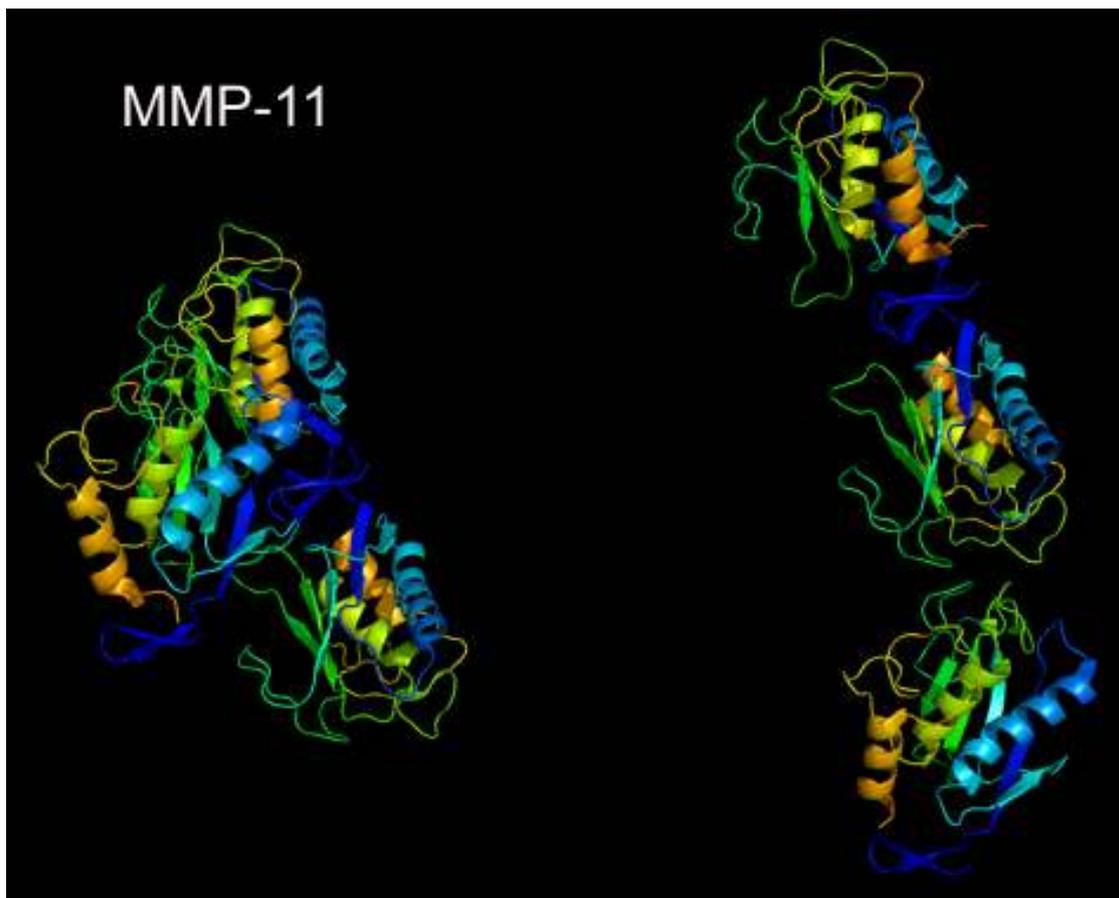


Figura 14: Estructura de la MMP-11 en 3D. Diagrama de cintas.

5.9.- MMP-13.

La MMP-13 o colagenasa 3 participa de la degradación de las fibras de colágeno tipo I, II, III, IV, V, IX, X y XI, si bien cuenta con una especial afinidad para la degradación del colágeno tipo II. Además actúa sobre la laminina, fibronectina y gelatina. En condiciones fisiológicas está implicada en el recambio del cartílago articular, de manera que se ha visto involucrada en la fisiopatología de la osteoartritis. El gen responsable se codifica en el cromosoma 11q22.3.

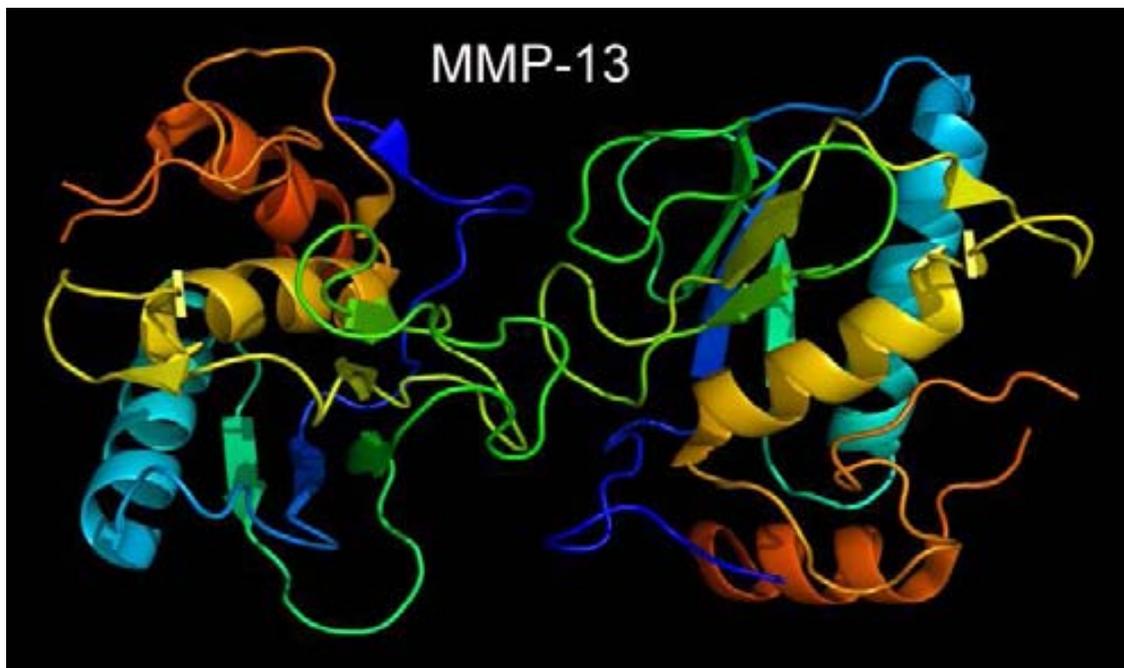


Figura 15: Estructura de la MMP-13 en 3D. Diagrama de cintas.

5.10.- MMP-14.

Finalmente, la MMP-14 o MT1-MMP, es un miembro de la sub-familia de MMPs ancladas a membrana. Cada uno de los miembros de esta sub-familia cuenta con un dominio transmembrana, lo que comporta que la expresión de esta proteína se produce a nivel de la superficie de la membrana celular, no siendo por tanto secretada. La MMP-14 actúa sobre las fibras de colágeno I, II y III, así como sobre la gelatina, fibronectina y laminina. Además, la MMP-14 participa de la activación de otras MMPs como la proMMP-2 y la proMMP-13. La localización del gen responsable aparece en el cromosoma 14q11-q12.

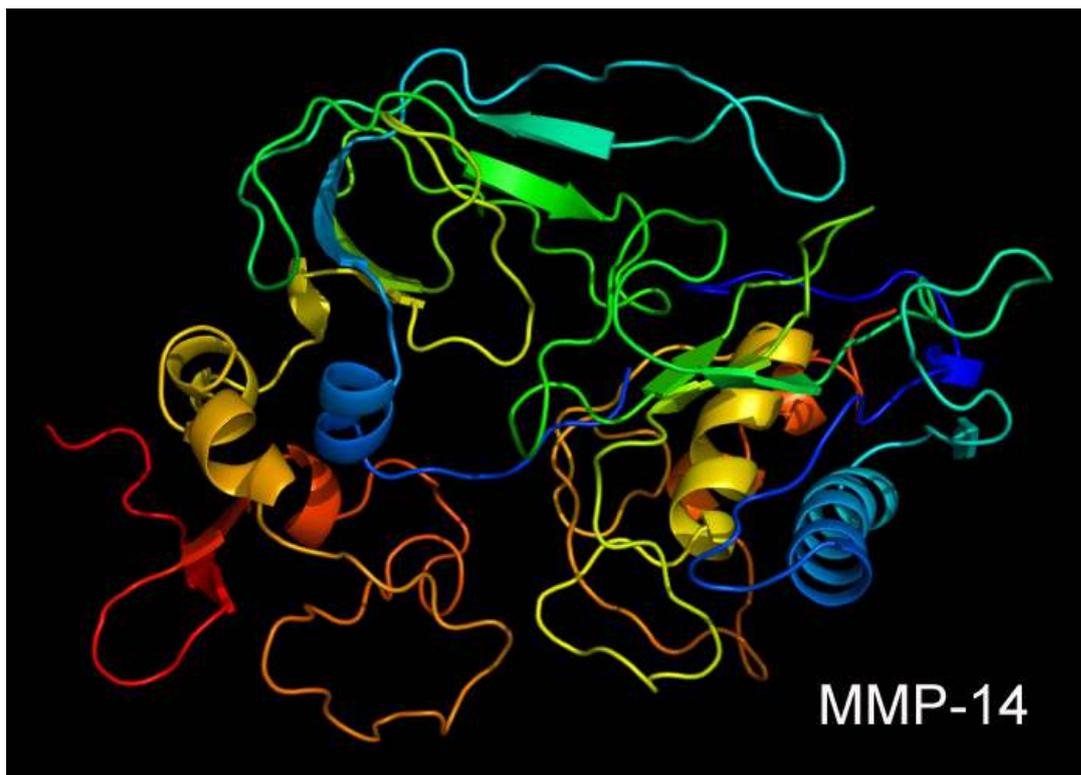


Figura 16: Estructura de la MMP-14 en 3D. Diagrama de cintas.

6.- MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS MMPs.

La actividad catalítica de las MMPs queda regulada a tres niveles: 1.- a nivel transcripcional; 2.- a partir de la activación de las proenzimas; y 3.- mediante moléculas inhibitoras. Existen mecanismos adicionales que incluyen la estabilidad del ARNm, la eficacia transcripcional, la secreción de las enzimas, la autólisis, etc. La finalidad de estos mecanismos es asegurar que la actividad de las MMPs se circunscriba sólo en aquellas localizaciones y situaciones en que la actividad proteolítica es necesaria. Sin embargo, los tumores malignos desarrollan estrategias para circunvalar estos mecanismos de regulación, generando una actividad proteolítica incontrolada que acompaña al desarrollo tumoral y a su diseminación.

6.1.- Control de la transcripción.

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

i.- Señales de activación transcripcional:

La mayoría de MMPs no se expresan en condiciones basales, pero su transcripción puede ser inducida por varias señales, que incluyen citoquinas, factores de crecimiento y productos derivados de la actividad de oncogenes. Además, otras situaciones como alteraciones en la forma celular o estrés mecánico, pueden inducir también la transcripción de los genes MMP. Dos de los factores que han sido estudiados más ampliamente son la interleucina-1 β ,

que estimula la expresión de las MMPs, y el TGF- β (*transforming growth factor- β*), que en muchos tipos celulares inhibe su expresión.

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

ii.- Señales de transcripción y factores nucleares:

Son diversas las vías a través de las cuales los activadores transcripcionales actúan sobre los genes MMP, incluyendo las vías MAPK, ERK1 y ERK2 (que estimulan o inhiben la expresión de MMPs en función del tipo celular), la oncoproteína AP1, la familia de proteínas ETS o el factor nuclear κ B (NF κ B). Los mecanismos que regulan estas vías de transcripción tendrán pues consecuencias sobre la actividad proteolítica final a nivel celular.

En un estudio in vitro realizado a partir de una línea celular de epitelio escamoso, Hohberger y cols⁷ han descrito un modelo de microinvasión dependiente de la activación de la MMP-9. De acuerdo con el modelo, la presencia de células inflamatorias liberaría a nivel local TNF- α (tumor necrosis factor) que conduciría a un incremento de la actividad del NF κ B, que a su vez induciría la transcripción de la MMP-9 favoreciendo los fenómenos de degradación de la membrana basal, lo que permitiría la invasión del estroma subyacente (Figura 17).

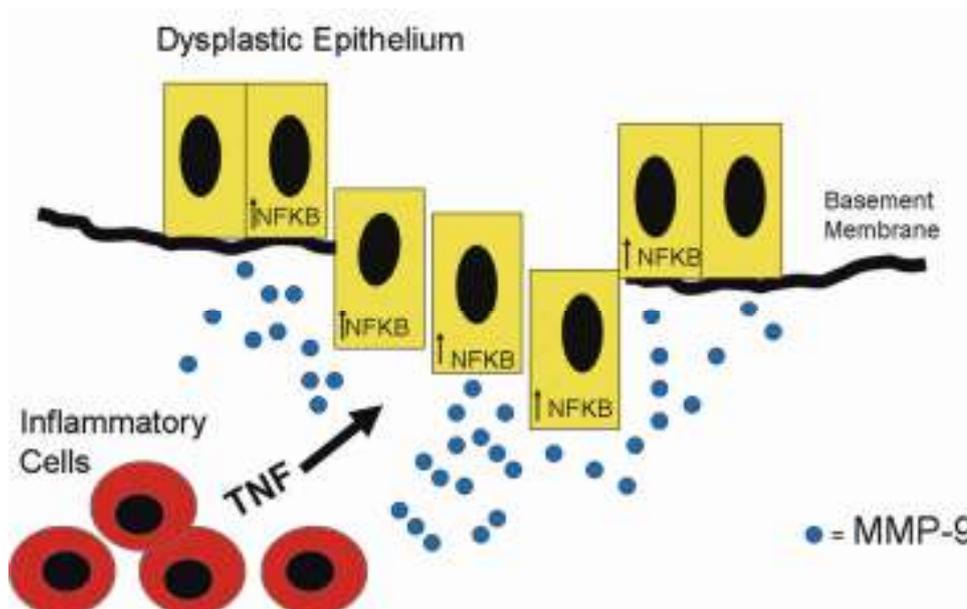


Figura 177: Modelo de microinvasión del carcinoma oral mediado por TNF/NFκB.

iii.- Polimorfismos:

Otro mecanismo a través del cual existe variabilidad en la expresión de las MMPs deriva de la existencia de polimorfismos en un único nucleótido en los genes promotores de las MMPs que modifican la actividad transcripcional. Determinados alelos específicos de las MMP-1 y MMP-3 se han asociado con una sensibilidad incrementada a determinados tipos de tumores.

6.2.- Activación.

Las MMPs, como muchas proteasas, se sintetizan en forma de zimógenos inactivos. El dominio propéptido enmascara la zona catalítica de la enzima. El lugar de unión entre el propéptido y la región activa de la enzima actúa como elemento diana de determinadas proteasas tales como la plasmina, la quimasa y la triptasa. Tras la acción inicial de estas proteasas, cambia la conformación espacial del propéptido y quedan expuestos lugares adicionales sobre los que

actúan otras enzimas activantes, como la MMP-3, o se produce un fenómeno de autoactivación.

El otro mecanismo de activación de las MMPs, especialmente de la MMP-2, incluye la actividad de una MMP asociada a la membrana. La activación de la MMP-14 ocurre a nivel intracelular a partir de una proteasa furina-like o en la superficie celular de forma similar al proceso descrito previamente. La MMP-14 activada se une al TIMP-2, que puede entonces unirse a la pro-MMP-2. Una molécula adicional de MMP-14 puede entonces activar la MMP-2. La activación de la MMP-13 cuenta con un mecanismo similar, requiriendo en este caso de la participación de la MMP-15.

6.3.- Inhibición.

La actividad MMP puede ser bloqueada por inhibidores genéricos, como es el caso de la α 2-macroglobulina, que se encuentra presente en el plasma y fluidos tisulares, y por inhibidores más específicos como los inhibidores específicos de las MMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases* o TIMPs). En humanos han sido identificados 4 TIMPs, que son secretados extracelularmente y pueden aparecer anclados a nivel de estructuras presentes en el espacio extracelular.

Los genes responsables de la codificación de los TIMP-1 a -4 se localizan en los cromosomas Xp11.3-p11.23, 17q25, 22q12.3 y 3p25 respectivamente. La expresión de los TIMP-1 y TIMP-3 es inducible, mientras que la de TIMP-2 es mayoritariamente constitutiva. La expresión de TIMP-4 se encuentra altamente regulada y restringida a una serie de tejidos.

La principal función biológica conocida de los TIMPs es el actuar como inhibidores de las MMPs. Casi todas las MMPs pueden ser inhibidas por los 4

TIMPs, si bien se han descrito diferencias en la afinidad entre algunos de ellos. Olson y cols⁸ llevaron a cabo un estudio de la afinidad entre los TIMP-1 y -2 con las MMP-2 y -9, en sus fase latente (proMMP) y activa, demostrando que el TIMP-1 contaba con afinidad por ambas MMPs activas y sólo por el precursor proMMP-9; mientras que el TIMP-2 también contaba con afinidad por ambas MMPs activas, pero sólo por el precursor proMMP-2. El TIMP-1 no interactuó con la proMMP-2 y el TIMP-2 no interactuó con la proMMP-9. Un grupo aparte lo forman las MMPs asociadas a la membrana, que parecen poco influenciadas por la acción del TIMP-1.

Los TIMPs se unen de forma no covalente a las MMPs formando complejos 1:1. El balance neto entre proteasas e inhibidores es el que determina la actividad proteolítica, de manera que la disminución en los niveles de TIMP se ha correlacionado con la progresión tumoral. Además, los TIMPs pueden interactuar con los precursores de las MMPs, tal como ha sido descrito anteriormente.

Además de los TIMPs, recientemente se han descrito varias proteínas que contarían con actividad inhibidora de las MMPs, algunas de ellas con dominios similares a los correspondientes a los TIMPs. Entre estas moléculas destacan la RECK (*reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs*), que es un inhibidor de las MMPs de membrana y actúa como un regulador de la integridad de la matriz extracelular y de la angiogénesis; el *TFPI2* (*tissue-factor pathway-inhibitor-2*), un inhibidor de proteinasa que actúa como inhibidor de MMPs; o el PCPE (*procollagen C-terminal proteinase enhancer*) que libera un fragmento C-terminal que es similar al dominio inhibidor de las TIMPs.

La Figura 18, extraída de la revisión de Overall y López-Ortín⁹ ilustra la complejidad inherente a la regulación de expresión y actividad de las MMPs.

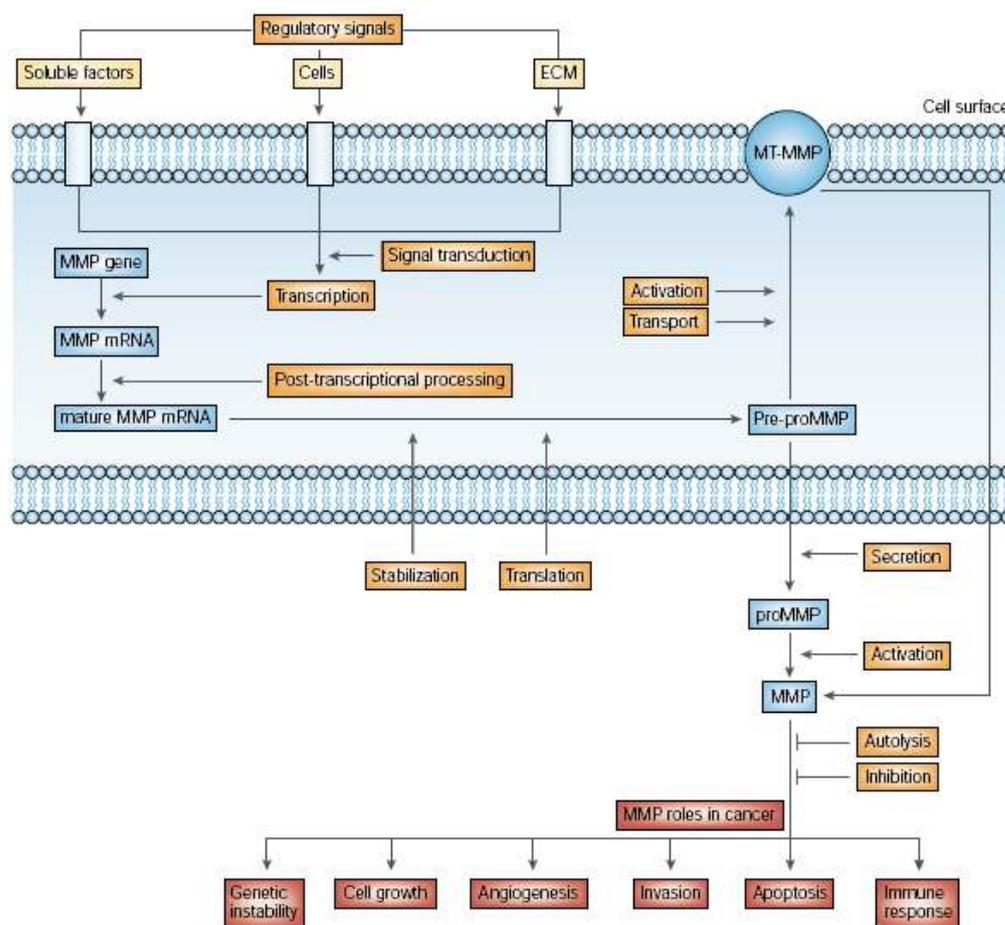


Figura 18: Niveles de regulación de la expresión y actividad de las MMPs. Existen diversas señales reguladoras, como factores solubles, interacciones célula-MEC o célula-célula, con receptores en la superficie celular, que dan inicio a una cascada de eventos, llegando a la generación de una MMP funcional. Éstas pueden estar localizadas en la superficie celular (MT-MMP), o ser secretadas al medio extracelular (proMMP). Las proMMPs se activan mediante otro tipo de eventos. Estas MMPs activadas participan en un gran número de procesos que promueven la carcinogénesis (cajas rojas), incluyendo la inestabilidad genética, crecimiento celular, angiogénesis e invasión. También interfieren en la inducción de apoptosis y la respuesta antitumoral del huésped. La autólisis o inhibidores de las MMPs pueden interferir con la inducción de estos efectos celulares. Los niveles de regulación de MMPs que pudieran ser dianas terapéuticas se muestran en cajas naranjas, incluyendo la promoción de inestabilidad genética, transducción de la señal, inducción de transcripción, proceso post.transcripcional, activación, transporte y secreción de MMPs. MEC: Matriz Extracelular.

7.- REGULACIÓN DE LAS MMPs EN LOS TUMORES.

A diferencia de los oncogenes clásicos, las MMPs no se encuentran sobreexpresadas a partir de amplificaciones o mutaciones activantes. La expresión incrementada de las MMPs en los tumores deriva de cambios transcripcionales más que de alteraciones genéticas.

Además, las células tumorales no son la única fuente de MMPs en los tumores. Mientras algunas de las MMPs, como la MMP-7, son sintetizadas por parte de las células del tumor, otras como las MMP-2 y -9, son sintetizadas de forma mayoritaria por las células del estroma. Las células tumorales pueden estimular a las células del estroma tumoral a sintetizar MMPs a través de un mecanismo de regulación paracrina a partir de la secreción de interleuquinas, interferón y factores de crecimiento.

El EMMPRIN (*extracellular matrix metalloprotease inducer*), también conocido como CD 147, es un inductor de la fabricación de MMP-1, -2, -3 y -14 que se encuentra sobreexpresado en tumores. En un estudio inmunohistoquímico realizado en 35 pacientes con carcinoma de supraglotis, Rosenthal y cols¹⁰ encontraron que todos los tumores mostraban áreas de expresión de las EMMPRIN, con un 37% de pacientes con unos niveles elevados. Los autores desarrollaron un estudio experimental in vivo en que demostraron que el crecimiento celular se veía favorecido por las MMPs desarrolladas por los fibroblastos estimulados por el EMMPRIN de forma paracrina. En un modelo en ratones atímicos, la transfección con un vector vírico que codificaba EMMPRIN a la línea celular CAL57, que cuenta con un bajo nivel de expresión endógena de dicho gen, no supuso un incremento en la proliferación celular, indicando que las células tumorales no eran mayoritariamente responsables de la síntesis

de MMPs inducida por EMMPRIN. Por el contrario, al incluir fibroblastos en el modelo, sí que aparecieron diferencias significativas en el proceso de proliferación tumoral entre la línea celular nativa con expresión baja de EMMPRIN (Cal57), y la línea celular transfectada con el gen EMMPRIN activo (Cal57E), tal como se muestra en la Figura 19.

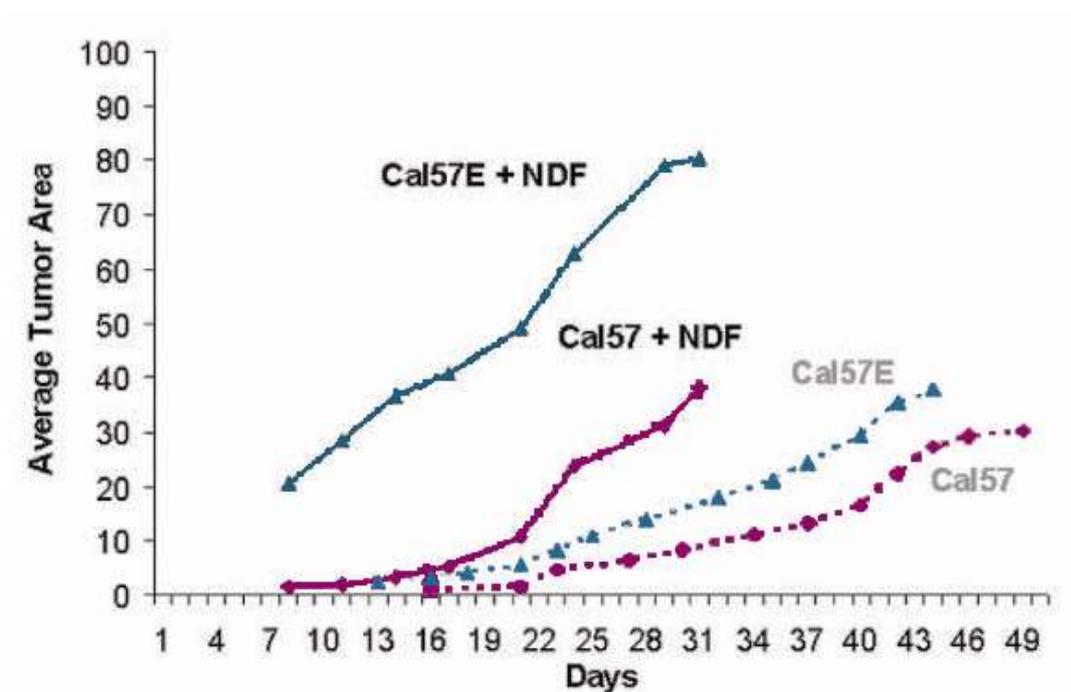


Figura 19¹⁰: Las células que expresan EMMPRIN inyectadas con fibroblastos dérmicos normales (NDFs), promueven tumorogénesis. Las células CAL 57E (gen EMMPRIN activo) inyectadas con NDFs, muestran un aumento tanto del área, como de la rapidez de la formación tumoral. Las células CAL o CAL 57E (2.5×10^5) se co-inyectaron con NDFs (5×10^5) en un grupo de ratones con inmunodepresión severa ($n=10$ tumores para cada grupo experimental, $P=.0038$, Test Wilcoxon).

En un estudio de características similares, Cao y cols¹¹ encontraron positividad a nivel de la membrana de las células tumorales para el EMMPRIN en toda la extensión del tumor en ocho casos de carcinoma escamoso de lengua analizados. Una línea celular correspondiente a un carcinoma de cavidad oral altamente invasivo mostró un elevado nivel de expresión de EMMPRIN a nivel transcripcional, contando con una positividad intensa en el estudio

inmunohistoquímico, en tanto que la expresión de MMP-1 fue prácticamente inexistente. Por el contrario, una línea desarrollada a partir de fibroblastos peritumorales contó con la producción de MMP-1, sin que dichos fibroblastos expresasen EMMPRIN. Un cultivo combinado de ambas líneas celulares condujo a un incremento marcado en la producción de MMP-1 por parte de los fibroblastos.

Además, existen evidencias que señalan que las MMPs secretadas por las células del estroma pueden ser reclutadas por las células tumorales. Por ejemplo, en los carcinomas de mama la expresión del ARNm de MMP-2 corresponde a las células del estroma tumoral, en tanto que la proteína aparece en la membrana celular tanto de las células del estroma como de las células tumorales¹². En un intento de identificar las células con capacidad de expresar los genes responsables de la codificación de las MMPs, Imanishi y cols¹³ desarrollaron un estudio de hibridación in situ en 10 muestras de carcinoma que histológicamente se comprobaron positivas frente a MMP-2 y MMP-14. Se pudo evidenciar que la señal del ARNm correspondiente a ambas MMPs se expresaba de forma consistente tanto a nivel de las células tumorales como en células del estroma, como fibroblastos y células endoteliales, especialmente en áreas en la periferia de los nidos de tumor.

En un estudio en que se evaluaba la expresión de enzimas proteolíticas por parte de los fibroblastos asociados al tumor aislados mediante microdissección láser en 4 pacientes con carcinomas de orofaringe, Rosenthal y cols¹⁴ encontraron que, en relación a los fibroblastos de mucosa sana, los fibroblastos asociados a tumor contaron con un incremento significativo en la expresión de la MMP-14, en tanto que no aparecieron diferencias significativas en relación al

resto de MMPs o TIMPs. La cuantificación de la producción de proteína mediante una técnica de Western blot confirmó la sobreexpresión de la MMP-14 en los fibroblastos asociados al tumor en relación a los fibroblastos normales.

Otro mecanismo a través del cual se regula la actividad MMP a nivel tumoral es a partir del porcentaje de proteína activada. Patel y cols¹⁵ evaluaron el patrón de activación correspondiente a las MMP-2 y MMP-9 mediante zimografía en gelatina. Compararon muestras de tumor con mucosa normal adyacente en un grupo de 60 pacientes con carcinomas de cavidad oral. De acuerdo con sus resultados, tanto las formas latente o inactiva, la forma activa, y la cantidad total de ambas proteínas se encontraron significativamente aumentadas en el tejido tumoral en relación al tejido sano ($P < 0.02$), con un porcentaje de activación superior en el tumor, tal como se muestra en la Figura 20.

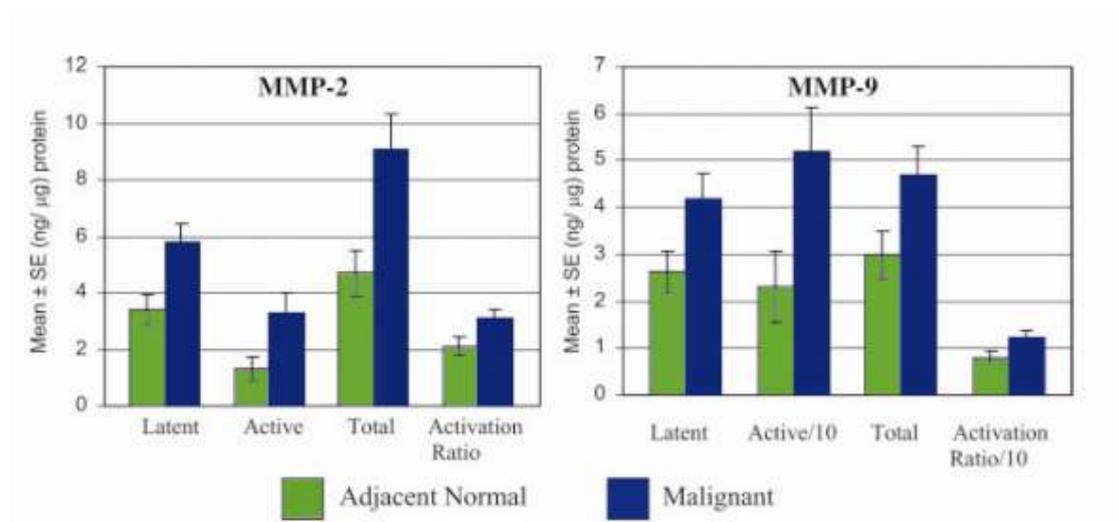


Figura 20¹⁵: Niveles de MMP-2 y MMP-9, latente, activa, total y en proporción de activación, en tejidos adyacentes normales y malignizados.

Estos resultados condicionaron que la actividad gelatinolítica correspondiente a la MMP-2 y MMP-9 en el tejido tumoral fue más prominente que la encontrada en la mucosa normal.

Además, pudieron constatar cómo en las muestras de tumor de pacientes N+, el porcentaje de activación de la MMP-2 era superior al de los pacientes N0 ($P=0.005$)(Figura 21).

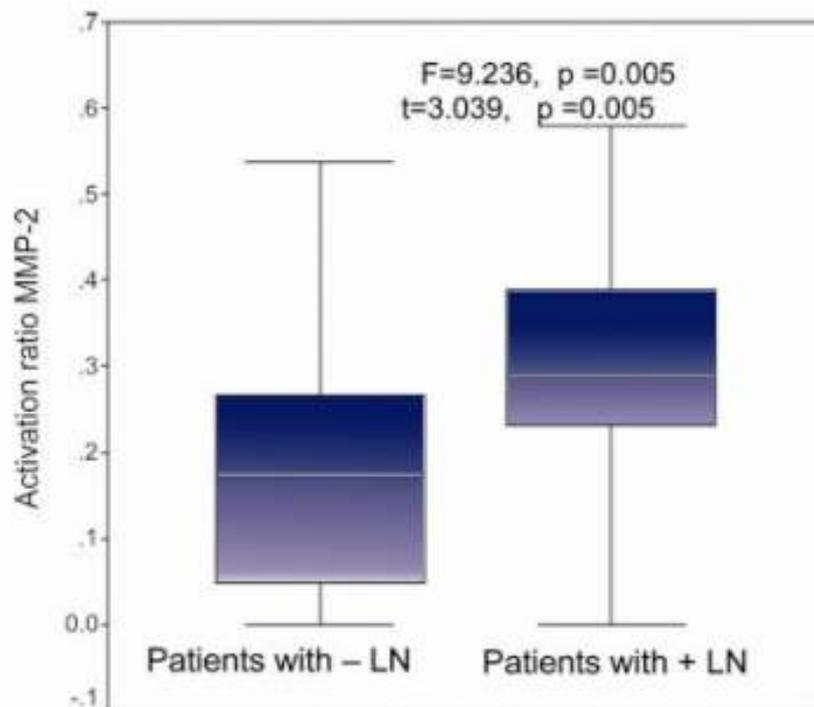


Figura 21¹⁵: Razón de activación de la MMP-2 en tejido tumoral, en pacientes con(LN+) y sin(LN-) metástasis ganglionar.

8.- PAPEL FUNCIONAL DE LAS MMPs EN EL CÁNCER.

Existen seis alteraciones fundamentales en la fisiología celular que subyacen en la progresión de las células cancerosas: mantenimiento autónomo de señales de proliferación celular, ausencia de respuesta a señales inhibitorias de proliferación, replicación infinita, promoción de la angiogénesis, capacidad de invasión tisular y metástasis¹⁶. Originariamente las MMPs se consideraron importantes casi exclusivamente como sustancias que favorecían la invasión y la diseminación metastásica. Sin embargo, se ha visto que las MMPs están involucradas en varias etapas correspondientes al proceso de carcinogénesis.

8.1.- Proteólisis de la matriz extracelular.

Las células tumorales sobreexpresan proteasas y/o inducen la expresión de dichas enzimas por células vecinas del estroma con la finalidad de degradar la membrana basal e invadir los tejidos subyacentes. Varias MMPs se han visto implicadas en la degradación de la matriz extracelular necesaria para conseguir el crecimiento tumoral y la angiogénesis. Esta actividad proteolítica es necesaria también para invadir los elementos vasculares (intravasación), así como para extravasarse en tejidos u órganos a distancia del tumor dando lugar a la aparición de metástasis.

8.2.- Modulación de la adhesión celular y migración.

Los productos resultantes de la degradación de la matriz extracelular muestran actividad biológica y pueden desencadenar una gran variedad de señales a nivel celular. Por ejemplo, la escisión del colágeno IV y de la laminina-5 genera

una serie de péptidos que pueden inducir la migración de las células tumorales. Entre los substratos de las MMPs se incluyen además moléculas que no forman parte de la matriz extracelular, como precursores de factores de crecimiento o moléculas de adhesión. La cadherina-E es escindida de la superficie celular a partir de la acción de la MMP-3 y MMP-7, con la consiguiente liberación de cadherina-E soluble y la interrupción de las uniones intercelulares, lo que lleva a una interrupción de la adhesión celular y favorece los fenómenos de migración.

En un estudio experimental, Sun y cols¹⁷ evidenciaron como el silenciamiento de la expresión del gen MMP-2 con un ARN de interferencia transfectado mediante un lentivirus redujo la capacidad invasiva de una línea celular perteneciente a un carcinoma de laringe. En un ensayo de invasión a través de una matriz de gel, las células con el gen MMP-2 silenciado contaron con una reducción significativa de su capacidad invasiva, tal como muestra en la Figura 22.

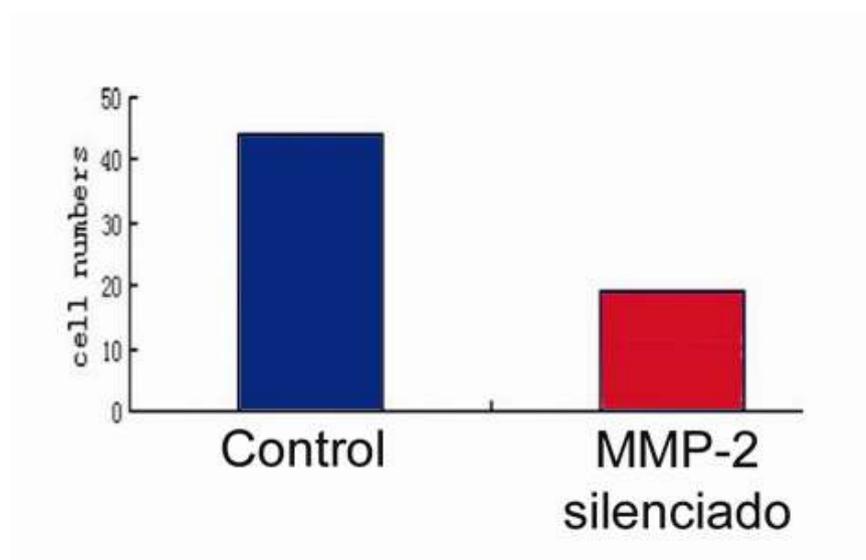


Figura 22¹⁷: Numero de células invadidas en la cámara de Boyden cubierta con Matrigel. Grupo control. Grupo tratado con MMP2-RNAi lentivirus (MMP2-silenciado). Se muestra el resultado representativo de tres especímenes independientes.

En un estudio similar desarrollado por los mismos autores en que se llevó a cabo un silenciamiento de la MMP-9, los resultados obtenidos fueron similares, con una disminución de la capacidad invasiva de las células tumorales a las que se suprimió la capacidad de expresión de la MMP-9 ¹⁸.

En el desarrollo de su capacidad de migración e invasión, las células tumorales desarrollan unas estructuras denominadas podosomas o invapodia, que son unas protusiones celulares de la membrana ricas en actina y que representan el frente de actividad migratoria de la célula (Figura 23).



Figura 23: Podosomas de una célula aislada.

La regulación en la formación de los podosomas depende de una proteína, la cortactina, que aparece sobreexpresada en las lesiones tumorales. La amplificación del gen de la cortactina se ha asociado a un peor pronóstico en los pacientes con carcinomas de cabeza y cuello¹⁹. La capacidad de

degradación de la matriz extracelular que permite el desarrollo de los podosomas es atribuida de forma mayoritaria a la acción de las MMPs.

La cortactina regula la secreción de las MMPs asociada a los podosomas (MMP-2, -9 y -14), en tanto que la presencia de dichas MMPs cuentan a su vez con la capacidad de inducir la formación de podosomas, apareciendo un bucle de retroalimentación positiva entre la actividad de los podosomas y las MMPs que favorece la capacidad invasiva de las células²⁰.

8.3.- Modulación de la transición epitelial-mesenquimal.

Las MMPs se han visto también implicadas en el mecanismo de transición epitelial-mesenquimal, proceso a partir del cual la célula tumoral adquiere la capacidad de migración, lo que conlleva la invasión de los tejidos adyacentes y la posibilidad de metastatización a distancia²¹. Los mecanismos propuestos a través de los cuales las MMPs actuarían en este tipo de transición son la activación de factores de crecimiento y la escisión de las moléculas de adhesión.

8.4.- Procesamiento de citoquinas y sus receptores.

Las reacciones inflamatorias son un componente importante en los tumores. Por otra parte, el sistema inmune es capaz de reconocer y atacar a las células cancerosas, pero éstas desarrollan vías que les permiten escapar de la vigilancia del sistema inmune. Los mecanismos de inflamación e inmunidad están regulados por citoquinas y quimioquinas, algunas de las cuales son sustratos de la actividad de las MMPs. Por ejemplo, la MMP-7 es requerida

para la liberación del TNF- α , una citoquina proangiogénica, a partir de su forma unida a la membrana²².

8.5.- Regulación de la proliferación celular.

Algunos miembros de la familia de las MMPs regulan la proliferación celular a partir de la modulación de la biodisponibilidad de los factores de crecimiento o de sus receptores. Por ejemplo, la disponibilidad del IGF (*insulin-like growth factor*) está regulada por las IGFBP (*IGF binding proteins*). Las MMP-1, -2 y -3 escinden la IGFBP-3²³, en tanto que la IGFBP-1 es sustrato de la MMP-11²⁴, de manera que la acción de estas MMPs permite la liberación de los factores de crecimiento.

Igualmente, las MMPs actúan sobre la vía del EGF (*epidermal growth factor*) a partir de la liberación de ligandos específicos que actúan sobre su receptor, tales como el HB-EGF (*heparin-binding EGF*), la betacelulina, o la epiregulina²⁵. La consecuencia de la disponibilidad de metabolitos que estimulan de forma específica el receptor del EGF es una de las vías que promueve la proliferación celular continua en el tumor.

En los estudios desarrollados por el grupo de Sun y cols^{17,18} consistentes en la evaluación del comportamiento de una población de células tumorales procedentes de un carcinoma de laringe, pudo comprobarse como el silenciamiento de los genes MMP-2 y MMP-9 condujeron a una reducción significativa en la capacidad de proliferación tumoral y en la supervivencia celular. La Figura 24 muestra la curva de supervivencia celular correspondiente a las células tumorales no manipuladas (control) y aquellas en las que se realizó un silenciamiento del gen MMP-2.

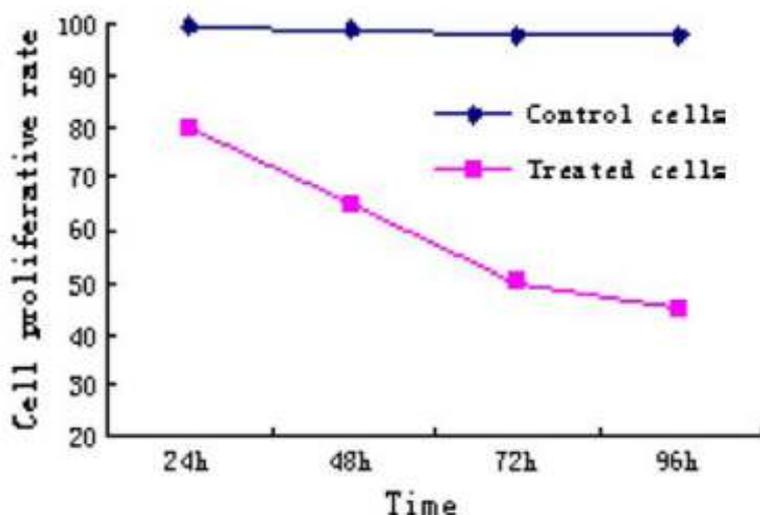


Figura 24: Curva de tasa de supervivencia celular. Tasa de supervivencia de células Hep-2 en tiempos distintos tras la transfección de MMP-2 ARNi lentivirus.

8.6.- Regulación de la apoptosis.

Las MMPs cuentan con actividad tanto pro-apoptótica como anti-apoptótica. Por ejemplo, la MMP-3 induce apoptosis cuando aparece sobreexpresada en las células epiteliales del epitelio mamario, posiblemente como consecuencia de la degradación de la laminina²⁶. Por el contrario, la MMP-11 ejerce un efecto anti-apoptótico a partir de la liberación del IGF, que actúa como un factor de supervivencia²⁴.

8.7.- Regulación de la angiogénesis.

La angiogénesis consiste en la formación de nuevos vasos a partir de vasos preexistentes. Las MMPs juegan un papel complejo y en ocasiones contradictorio en la regulación de la angiogénesis a nivel del tumor. La remodelación de la matriz extracelular, un acontecimiento necesario durante el proceso de la angiogénesis se realiza mayoritariamente a partir de la actividad de las MMPs. Determinadas MMPs, como la MMP-2 y la MMP-9, inducen directamente la angiogénesis^{27,28}. Además, sustancias inductoras de

angiogénesis como el VEGF (*vascular endothelial growth factor*), inducen la producción de MMPs por parte de las células endoteliales²⁹.

La actividad de las MMPs producen también péptidos que son inhibidores de la angiogénesis^{30,31}. La escisión del plasminógeno por las MMPs -2, -3, -7 y -9 genera angiostatina, en tanto que las MMPs -3, -9, -12, -13 y -20 están relacionadas con la producción de endostatina a partir de la escisión del colágeno tipo XVIII. Tanto la angiostatina como la endostatina reducen la proliferación endotelial.

Todos estos hallazgos señalan que la actividad de las MMPs es crítica no sólo para la iniciación de los procesos de angiogénesis, sino también para su regulación.

8.8.- Participación en la actividad de las “stem cells”.

La hipótesis de las células madre (stem cells) postula que sólo un pequeño porcentaje de células que conservan la capacidad fenotípica atribuida a las células madre es la responsable de la proliferación tumoral. Existen marcadores moleculares específicos de estas células madre, tal como la expresión de la CD44, una glicoproteína de membrana implicada en las interacciones celulares. Recientemente, Sterz y cols³² han desarrollado un estudio en pacientes con carcinomas de cabeza y cuello. Mediante técnicas de doble marcaje con inmunohistoquímica, evidenciaron que las células positivas para la CD44 y MMP-9, aparecían de forma preferente en el frente de invasión tumoral, a nivel de la transición con el estroma peritumoral, y que las células positivas para la CD44 también lo fueron para la MMP-9. La Figura 25 muestra una de las muestras analizadas por los autores, donde puede observarse la

positividad frente a la MMP-9 (en rojo), el CD44 (en verde), y la imagen correspondiente a la fusión de ambas inmunohistoquímicas (en amarillo), que denota la colocalización de las células positivas a MMP-9 y CD44.

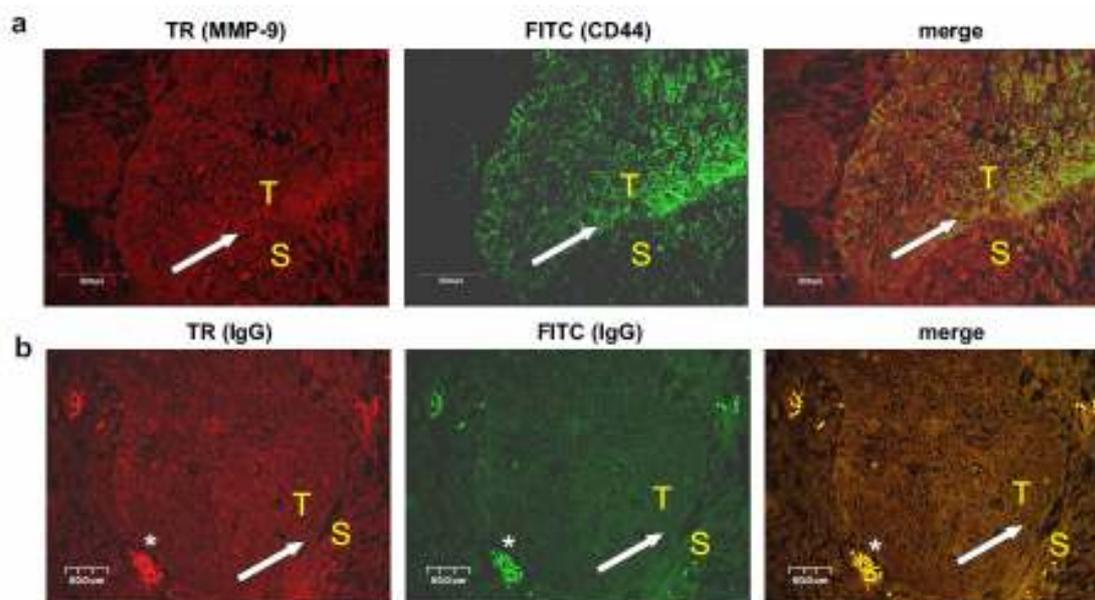


Figura 25³²: Co-localización de CD 44 y MMP-9 en carcinoma escamoso de cabeza y cuello (CECC). (a) Inmunofluorescencia con doble marcaje de muestras fijadas con formalina, embebidas en parafina muestran la co-localización de MMP-9 (rojo, TR) y CD 44 (verde, FITC) en la misma célula (flecha) tumoral (T) y en el borde estromal (S). (b) Controles negativos usando IgG en vez de anticuerpo primario no muestra tinción específica de células tumorales en el T y borde S (flechas). *Autofluorescencia de los eritrocitos.

Un estudio de la expresión de proteína realizado con la técnica de Western blot en 17 carcinomas de cabeza y cuello, verificó una elevada correlación entre la presencia de CD44 y MMP-9 en las muestras analizadas ($r=0.6501$, $P=0.0047$). Además, se evidenció una relación significativa entre la actividad gelatinolítica y la expresión de MMP-9. A partir de estos hallazgos, los autores proponen un modelo de carcinogénesis según el cual la proliferación tumoral dependería de la actividad de las células madre tumorales que contarían, entre otras, con la capacidad de expresar la MMP-9, que sería uno de los elementos que favorecería la invasión celular a partir de la degradación de las estructuras de la matriz extracelular.

9.- EXPRESIÓN DE MMPs EN LOS CARCINOMAS DE CABEZA Y CUELLO.

Son numerosos los estudios que han evaluado a nivel transcripcional y de expresión de proteína los diferentes tipos de MMPs y sus inhibidores específicos en pacientes con carcinomas escamosos de cabeza y cuello.

Binduh y cols³³ estudiaron la progresión en la expresión de las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) en el proceso de carcinogénesis en pacientes con carcinomas de cavidad oral. Evaluaron mediante inmunohistoquímica pacientes con diferentes grados de displasia y con carcinomas de cavidad oral, y compararon los resultados con los obtenidos a partir de muestras de mucosa sana. La Figura 26 muestra el patrón de expresión correspondiente a la mucosa sana, un caso de leucoplasia sin displasia, y un carcinoma escamoso, pudiendo apreciarse un incremento en la expresión en función del grado histológico.

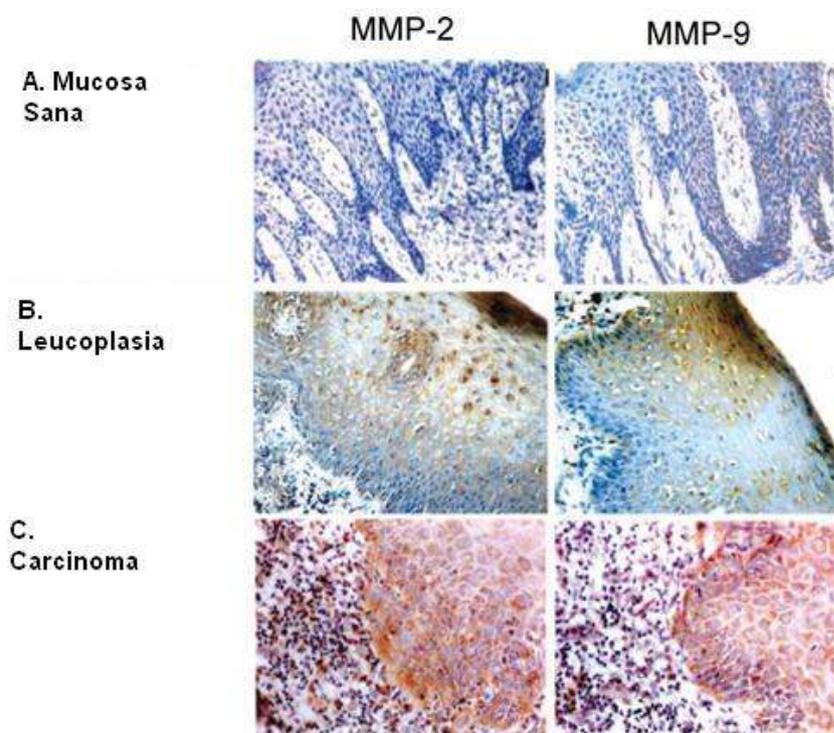


Figura 26: Inmunolocalización de la MMP -2 y MMP-9. (A)Mucosa oral normal. (B)Leucoplasia. (C) Carcinoma escamoso. Se puede observar el aumento progresivo histológico, con una intensidad elevada en el frente tumoral invasivo.

Ambas MMPs contaron con una expresión citoplasmática tanto a nivel de las células epiteliales correspondientes al tumor o la mucosa sana o displásica (E), como de las células del estroma (S). La Tabla 2 muestra los valores medios de inmunorreactividad en función del grado de lesión, y puede apreciarse la existencia de un incremento en la intensidad de la expresión para ambas MMPs con la progresión de la histología.

Histología (n°pctes)	MMP-2 E/S	MMP-9 E/S
Normal (n=20)	1.2/1.2	1.2/1.2
Leucoplasia hiperplásica (n=25)	1.8/1.5	2.0/1.6
Leucoplasia displásica (n=25)	2.2/1.8	2.2/2.0
CCE invasivo (n=154)	2.3/1.9	2.7/2.1

Tabla 2³³: Valores medios de la inmunointensidad de la MMP-2 y MMP-9 en la progresión histológica. E: Células epiteliales; S: Células del estroma. CCE: Carcinoma de células escamosas.

Este incremento en la expresión de MMPs observado con inmunohistoquímica se vio reflejado también en la actividad gelatinolítica correspondiente. Ninguna de las muestras de mucosa normal analizadas mediante zimografía mostró actividad gelatinolítica, en tanto que se produjo un incremento en dicha actividad a medida que progresaba el grado histológico de las lesiones, tal como muestran los resultados de la Tabla 3.

Histología (n°pctes)	Intensidad media de bandas gelatinolíticas (SEM)		
	MMP-9 Total	MMP-2 Inactiva	MMP-2 Activa
Normal (n=20)	0.00 (±0.00)	0.00 (±0.00)	0.00 (±0.00)
Leucoplasia hiperplásica (n=25)	35.3(±9.0)	54.3(±6.8)	6.0(±2.4)
Leucoplasia displásica (n=25)	36.0(±9.6)	60.8(±9.9)	22.5(±7.7)
CCE invasivo (n=67)	106.4(±4.6)	85.4(±3.7)	81.3(±3.9)

Tabla 3³³: Evaluación de la actividad de MMP-2 y MMP-9 mediante zimografía.
SEM: Error estándar de la media.

Los resultados de un estudio in vitro realizado por Tsai y cols³⁴ en el que se comparó la actividad gelatinolítica mediante zimografía entre dos cultivos de queratinocitos (OMK-1 y -2) y dos líneas celulares de carcinoma escamoso (KB y OC2), mostró un incremento significativo de la actividad proteolítica asociada a las MMP-2 y MMP-9, tal como puede verse en la Figura 27.

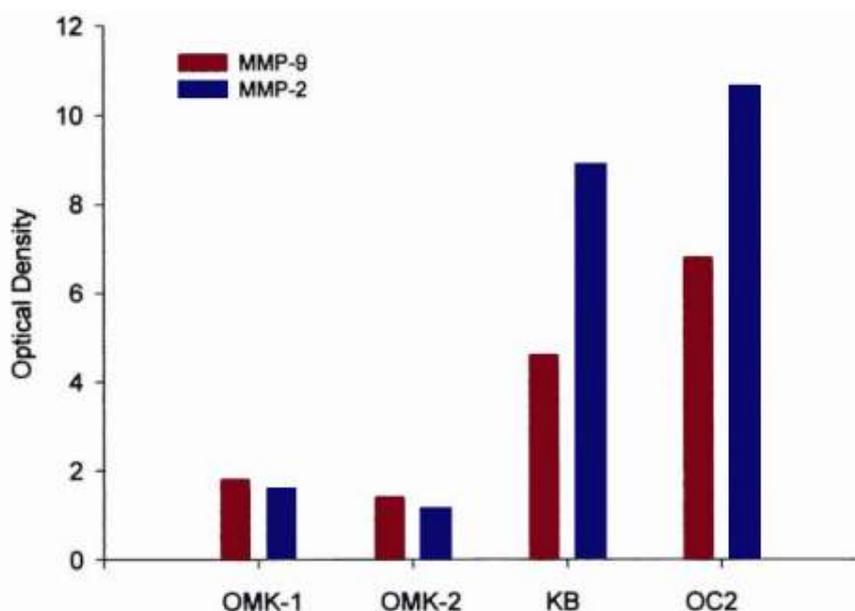


Figura 27³⁴: (A). Zimografía en gelatina de MMPs secretadas por células epiteliales orales. La actividad gelatinolítica y posición según peso molecular de la MMP-2 y MMP-9 están indicados. (B). Los valores de densidad óptica de la MMP-2 y MMP-9 fueron calculados a través de la actividad gelatinolítica mediante el uso del densitómetro AlphaImager 2000.

En un estudio inmunohistoquímico realizado en una muestra amplia de pacientes con lesiones de cavidad oral incluyendo carcinomas (n=220), lesiones precancerosas (n=90) y muestras de mucosa sana (n=81), Arora y cols³⁵ encontraron positividad frente a la MMP-11 en un 67% de los tumores, un 53% de las lesiones preneoplásicas, y un 22% de las muestras de mucosa normal. En el caso del tumor, la positividad correspondió de forma preferente a los fibroblastos del estroma que rodeaban las islas de tumor, especialmente en los frentes de infiltración tumoral. El factor que se relacionó de forma significativa con la progresión desde mucosa normal hacia lesiones preneoplásicas fue la interacción entre Ets-1, un factor de transcripción inducido en las células endoteliales por factores pro-angiogénicos como el VEGF (vascular endothelial growth factor), y la MMP-11. Igualmente, el factor relacionado de forma más intensa con la progresión desde lesión preneoplásica hasta tumor fue la interacción entre la MMP-11 y el VEGF.

A partir de sus resultados, los autores propusieron un modelo de progresión de la carcinogénesis dependiente de la actividad de la MMP-11 (estromelisinina 3, ST-3), el Ets-1 y el VEGF, tal como se muestra en la Figura 28.

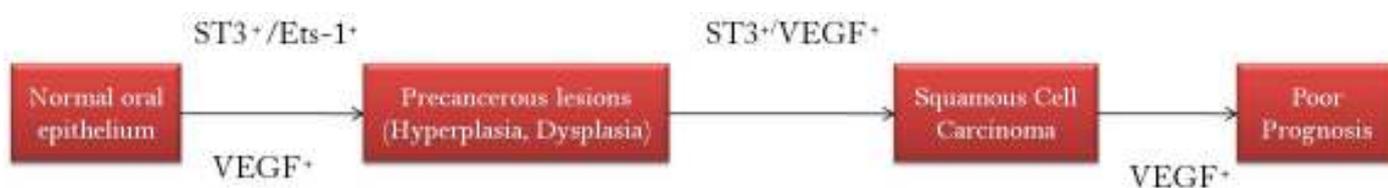


Figura 28³⁵: Asociación de alteraciones en relación a la expresión de estromelisinina-3(ST-3), VEGF y proteínas Ets-1 de los distintos estadios del desarrollo y progresión del carcinoma oral en un modelo de progresión multi-paso para carcinoma de cabeza y cuello propuesto por Califano y cols.

Birkedal –Hansen y cols³⁶ efectuaron un estudio en 20 pacientes con carcinoma de cabeza y cuello mediante RT-PCR, comparando el nivel de expresión de genes que codifican MMPs e inhibidores específicos en el tumor con el de mucosa sana adyacente. La Tabla 4 muestra la media en los niveles de expresión normalizados del tumor y del tejido sano para los diferentes genes estudiados.

Gen	Mucosa Tumor n=7	Mucosa Adyacente n=7	P-value
MMP-3	1.04±0.49	0.38±0.47	0.07
MMP-7	0.86±0.29	0.73±0.69	0.67
MMP-10	0.89±0.48	0.17±0.29	0.02*
MMP-11	1.10±0.39	0.92±0.46	0.37
MMP-14	1.33±0.58	0.53±0.67	0.04*
TIMP-1	1.52±0.10	1.50±0.06	0.77
TIMP-2	1.31±0.23	1.12±0.40	0.11
TIMP-3	0.74±0.38	0.27±0.37	0.05*

Tabla 4: Media ± SD de la expresión de genes de MMP-3, -7, -10, -11, -14 y TIMP-1, -2, -3 en mucosa tumoral y mucosa adyacente aparentemente normal. *n=numero de muestras; significación estadística, $P < 0.05$.

Los resultados obtenidos mostraron un incremento significativo o casi significativo en la expresión de las MMP-3, -10 y -14 en los tumores en relación a la mucosa sana, así como del TIMP-3.

En un estudio de diseño similar pero limitado a sólo 8 pacientes con carcinomas de laringe o faringe, Magary y cols³⁷ encontraron un incremento preferente en la expresión de la MMP-1 y MMP-9 en los tumores en relación a la mucosa sana, en tanto que no aparecieron diferencias significativas el analizar la MMP-2 o el TIMP-1.

Imanishi y cols¹³ desarrollaron un estudio en que compararon la expresión de MMP-2 y MMP-14 en 42 especímenes de carcinoma de cabeza y cuello, con 18 mucosas normales mediante RT-PCR. De acuerdo con sus resultados, el ARNm de MMP-2 fue detectado a diferentes niveles en un 71.4% de los tumores, mientras que las mucosas control mostraron sólo señales débiles en un 38.9%. La expresión relativa de los niveles de MMP-2 fue significativamente superior que la correspondiente a las mucosas sanas ($P=0.0122$). Los resultados obtenidos con la MMP-14 fueron similares: la MMP-14 apareció expresada en el 59.5% de los tumores y sólo en un 16.7% de las mucosas sanas, además con unos niveles de expresión más bajos que en los tumores ($P=0.0045$).

En un estudio inmunohistoquímico de la expresión de la MMP-9 realizado por Ruokolainen y cols³⁸ sobre una muestra de 74 pacientes con carcinomas de cabeza y cuello, un 82% de los tumores (61/74) mostraron positividad. En los casos positivos, la proteína inmunorreactiva apareció de forma prominente en las células cancerosas, y parecía localizarse a nivel citoplasmático de una forma difusa, tal como se muestra en la Figura 29.

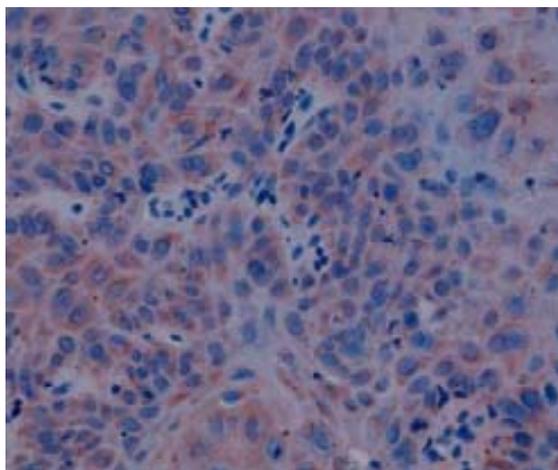


Figura 29³⁸: Inmunotinción citoplasmática de la MMP-9 en CECC. La inmunotinción se realizó mediante el uso de anticuerpo monoclonal anti-MMP9. Se observa una muestra tumoral con extensa inmunotinción para MMP-9.

Se consideró una positividad extensa (>50% células positivas) en el 39% de ocasiones (29/74), moderada (25-50% de células positivas) en el 15% (11/74) y débil (<25% células positivas) en el 28% de las ocasiones (21/74).

Con posterioridad, Ruokolainen y cols³⁹ desarrollaron un estudio de características similares en el que se analizaron la MMP-2 y TIMP-2. De acuerdo con sus resultados, el porcentaje de positividad correspondiente a la MMP-2 fue del 89% (67% extensa o moderada, 22% débil), y la del TIMP-2 fue de un 66% (14% extensa, 21% moderada, y 30% débil). En ambas ocasiones la tinción apareció localizada a nivel citoplasmático y limitada a las células tumorales.

Finalmente, los mismo autores⁴⁰ evaluaron la actividad inmunohistoquímica del TIMP-1 en una serie de 63 pacientes con carcinomas de cabeza y cuello, encontrando positividad de la proteína en un 81% de los pacientes (intensa en 35%, moderada en 24% y leve en 22%). La positividad apareció en todos los casos en forma de tinción citoplasmática difusa a nivel exclusivamente de las células tumorales.

Por su parte, de Vicente y cols^{41,42} en dos estudios publicados de forma consecutiva, evaluaron la expresión de la MMP-2, -7, -9 y -14 en pacientes con carcinomas de cavidad oral. Se analizaron mediante inmunohistoquímica un total de 68 pacientes. La positividad frente a la MMP-2 apareció en un 28% de ocasiones, de forma preferente en los nidos celulares del frente de infiltración del tumor. No aparecieron diferencias significativas en la expresión de la MMP-2 en relación a las características clínicas del tumor, salvo la edad. Llamó la atención que la positividad frente a la MMP-2 fue significativamente superior para los pacientes menores de 60 años (40%), que para los mayores de dicha

edad (17%) ($P=0.041$). En el caso de la MMP-7, la positividad alcanzó al 58.3% de pacientes, localizándose en el citoplasma de las células tumorales. La MMP-9 apareció positiva en un 17.6% de ocasiones, con tinción tanto de las células tumorales como del estroma circundante. Finalmente, la MMP-14 fue positiva en un 65.2% de los especímenes, tiñendo de nuevo las células tumorales y del estroma. En este caso, la tinción incluyó tanto el citoplasma celular como de forma específica y marcada la membrana celular, tal como aparece en la Figura 30.

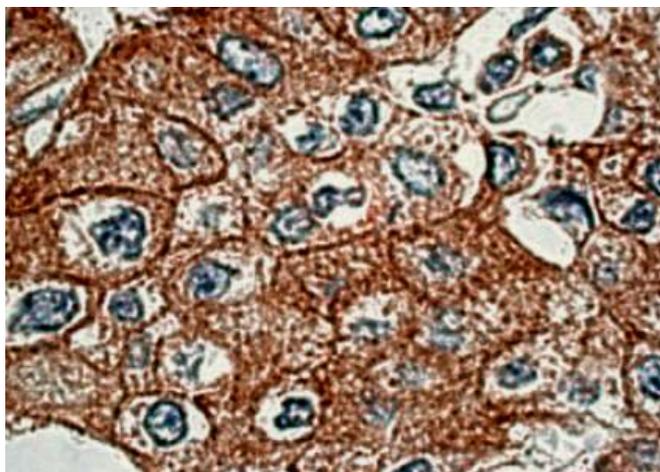


Figura 30⁴²: Inmunotinción de MT1-MMP (MMP-14) en carcinoma escamoso de cavidad oral. La inmunotinción está localizada en el citoplasma y también en las membranas celulares de las células en los nidos de carcinoma.

Kosunen y cols⁴³ encontraron positividad frente a la MMP-9 en la totalidad de ocasiones en un estudio inmunohistoquímico realizado en 124 pacientes con carcinomas de cavidad oral. La positividad fue considerada como intensa en el 17% de los casos, moderada en el 63% y leve en el 20%. La tinción apareció como positiva en el citoplasma de las células del tumor así como a nivel de las células endoteliales, inflamatorias y fibroblastos peritumorales.

Zhang y cols⁴⁴ evaluaron las MMPs -14, -15 y -16 mediante RT-PCR e inmunohistoquímica a un total de 85 pacientes con carcinomas de supraglotis.

De acuerdo con los resultados de la RT-PCR, el porcentaje de pacientes con una expresión de los genes MMP-14, -15 y -16 a nivel del tumor fue del 82.4%, 52.9% y 48.2% respectivamente. En el estudio inmunohistoquímico los porcentajes de expresión de la proteína correspondiente fueron del 81.2%, 49.9% y 45.9%. El índice de positividad de los tejidos adyacentes al tumor para las diferentes MMPs fue nulo o prácticamente nulo.

Luukkaa y cols⁴⁵ llevaron a cabo un estudio inmunohistoquímico en 81 pacientes con carcinomas de cabeza y cuello evaluando la expresión de la MMP-13, encontrando positividad en un 73% de ocasiones.

Utilizando técnicas de morfometría automática, Saussez y cols⁴⁶ analizaron las inmunohistoquímicas obtenidas de 73 pacientes con carcinomas de hipofaringe y 45 con carcinomas de laringe, evaluando el porcentaje de tejido teñido y la intensidad de la tinción, comparándolo con el obtenido de una muestra de mucosa sana de sujetos control y de tejido correspondiente a la mucosa de edema de Reinke. Los resultados obtenidos mostraron un incremento significativo en los niveles de expresión de la MMP-9 en el tumor en relación a la mucosa sana, si bien en el caso de la laringe el tipo de tejido que alcanzó un nivel de expresión más elevado fue el de las muestras de laringitis crónica obtenidas de pacientes con edema de Reinke, tal como puede apreciarse en la Figura 31, que corresponden al porcentaje de tejido positivo.

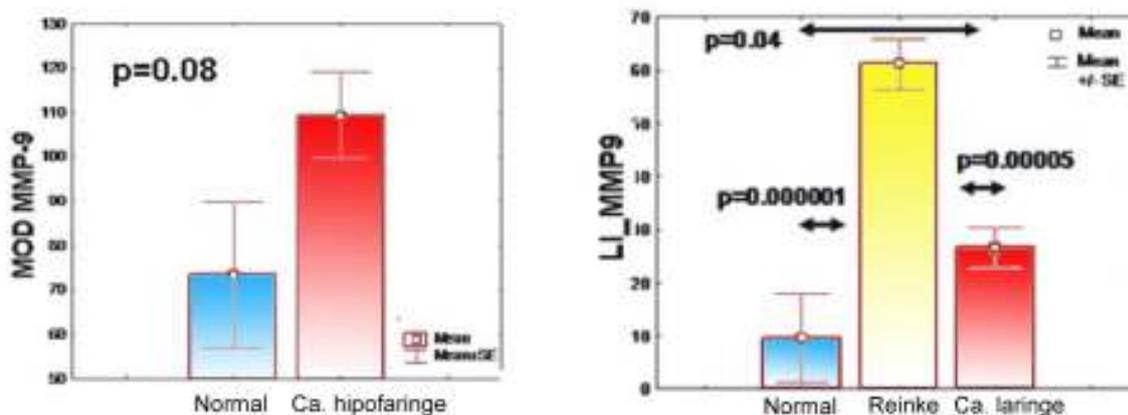


Figura 31⁴⁶: Determinación cuantitativa (por microscopía computarizada asistida) de la intensidad de la tinción inmunohistoquímica dependiente de MMP-9 (MOD); y el porcentaje de del área tisular MMP-9 inmunopositiva (LI) en una serie de 10 casos de epitelio libre de tumor, 25 casos de lesiones benignas de los pliegues vocales, y 45 casos de carcinomas laríngeos.

Recientemente se ha publicado el estudio que, hasta el momento, ha evaluado de forma más exhaustiva los niveles de expresión de una batería amplia de MMPs. Stokes y cols⁴⁷ estudiaron un total de 42 pacientes con carcinomas escamosos de cabeza y cuello, analizando tanto la expresión genética mediante RT-PCR como la de proteína mediante Western blot. Para cada paciente se analizaron muestras del tejido adyacente al tumor (*adjacent*), del margen de infiltración tumoral (*margin*) y del centro no necrótico del tumor (*center*), y se compararon con muestras de mucosa normal obtenida de 13 pacientes no oncológicos (*normal*).

En la Figura 32 se muestran los resultados correspondientes a los niveles de expresión obtenidos mediante técnicas de RT-PCR en las diferentes muestras analizadas en todo el panel de determinaciones correspondientes a MMPs y TIMPs.

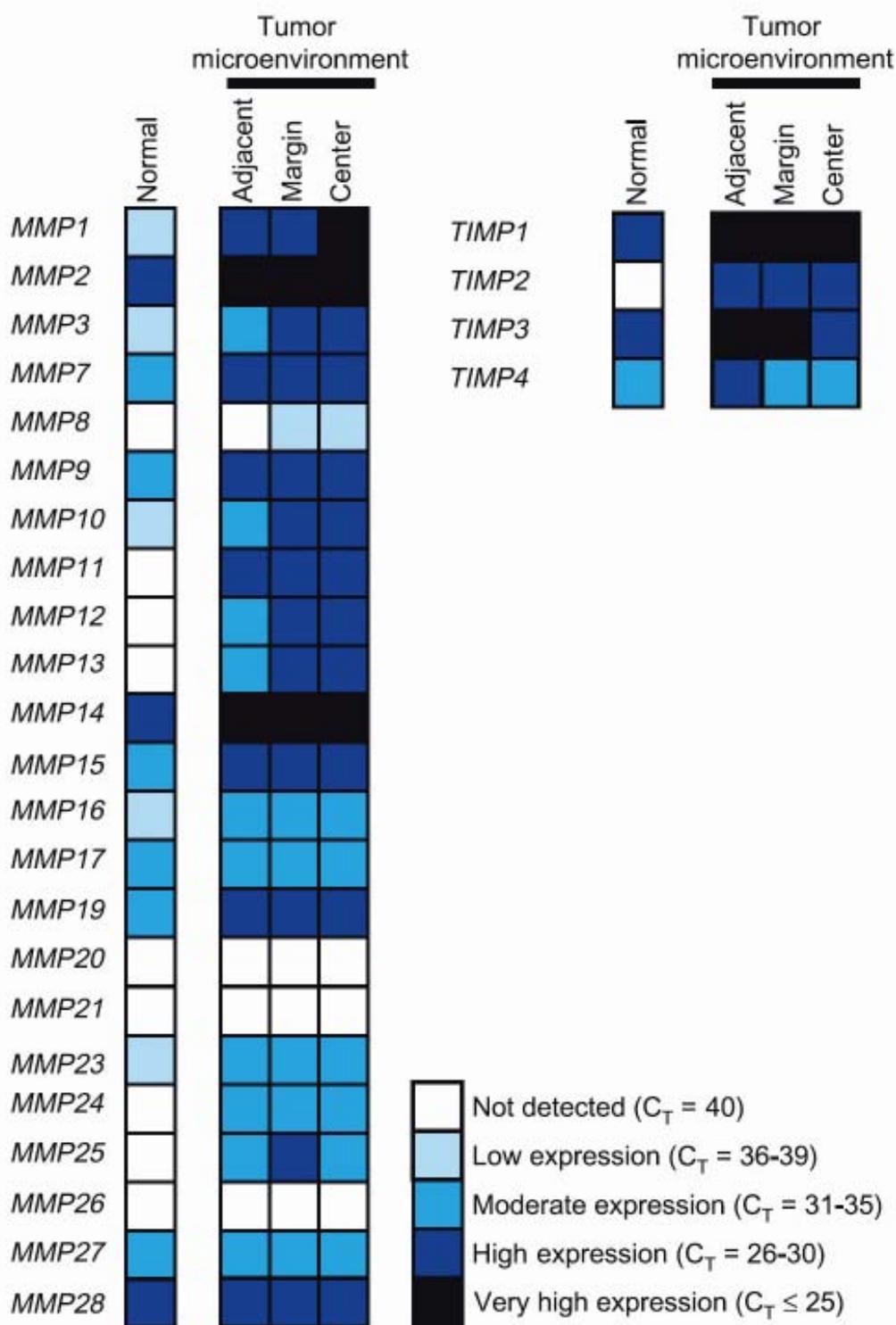


Figura 32⁴⁷: Representación de un mapa de calor del promedio de los valores del umbral de ciclos (C_T =cycle threshold) para cada gen, con el fin de comparar el nivel de expresión de los distintos genes.

Se determinó mediante RT-PCR en tiempo real, la expresión de los componentes del degradoma en distintos ARN extraídos de distintos compartimientos tisulares de carcinoma escamoso de cabeza y cuello (CECC) ($n=83$) y tejido de mucosa normal ($n=13$). Los cuadrados coloreados están ordenados en relación a los valores medios del umbral de ciclos (C_T) para cada gen.

La Figura 33 muestra los niveles de expresión encontrados en las diferentes muestras analizadas para dos de las MMPs estudiadas (MMP-1 y MMP-2).

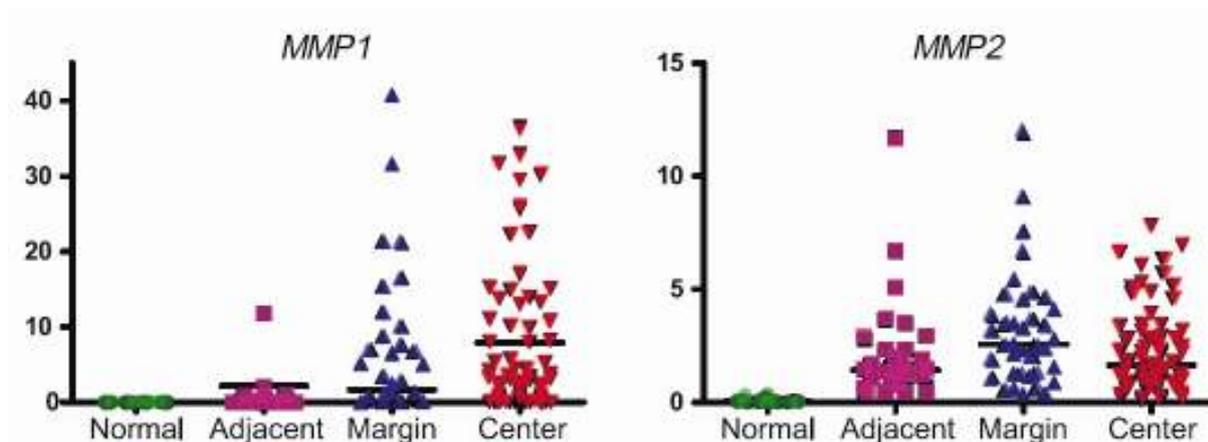


Figura 33⁴⁷: Scatter plots de los genes MMP-1 y MMP-2 en los distintos especímenes, comparándolo con los distintos compartimientos (tejido normal, adyacente, marginal y central del carcinoma).

La expresión de la mayoría de las MMPs en el tejido normal fue baja o indetectable, con la excepción de la MMP-2, MMP-14 y MMP-28. La MMP-8, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-24 y MMP-25 no se detectaron en la mucosa normal pero aparecieron ampliamente expresadas en los tejidos tumorales. La mayoría de las MMPs se expresaban en el tumor, tanto en el centro tumoral como en los márgenes de infiltración, en general con unos niveles incrementados en relación a la mucosa normal. Una mayoría de MMPs aparecieron también expresadas en los tejidos adyacentes al tumor, aunque para algunas de ellas los niveles de expresión fueron inferiores a los correspondientes al tejido tumoral. No se apreció expresión en ninguno de los tejidos analizados para la MMP-20, -21 y -26.

Igualmente, se apreció un incremento en la expresión de los TIMPs en los tejidos tumorales y peritumorales en relación a la mucosa sana, siendo

especialmente destacable la diferencia en el caso del TIMP-2, que no se expresaba en la mucosa normal.

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

Finalmente, los autores desarrollaron un estudio de caracterización de los niveles de expresión de MMPs mediante RT-PCR en un panel de 34 líneas celulares de carcinoma de cabeza y cuello (HNSCC), comparándolas con 8 líneas de queratinocitos normales (NHEK) (Figura 34).

Los datos obtenidos mostraron que la mayoría de las MMPs se expresaban de forma más elevada en las líneas celulares de carcinoma que en las de queratinocitos, con escasas excepciones, que se correspondieron con la MMP -27. Las MMPs en las que el incremento en los niveles correspondientes a las líneas tumorales fue superior fueron la MMP-2, -7, -10, -11, -13, -14, -16, -17, -23, -24, y -25. Los TIMPs aparecieron expresados tanto en las células tumorales como en los queratinocitos, siendo el TIMP-4 y especialmente el TIMP-2 los que mostraron un incremento significativo de expresión en las líneas de carcinoma.

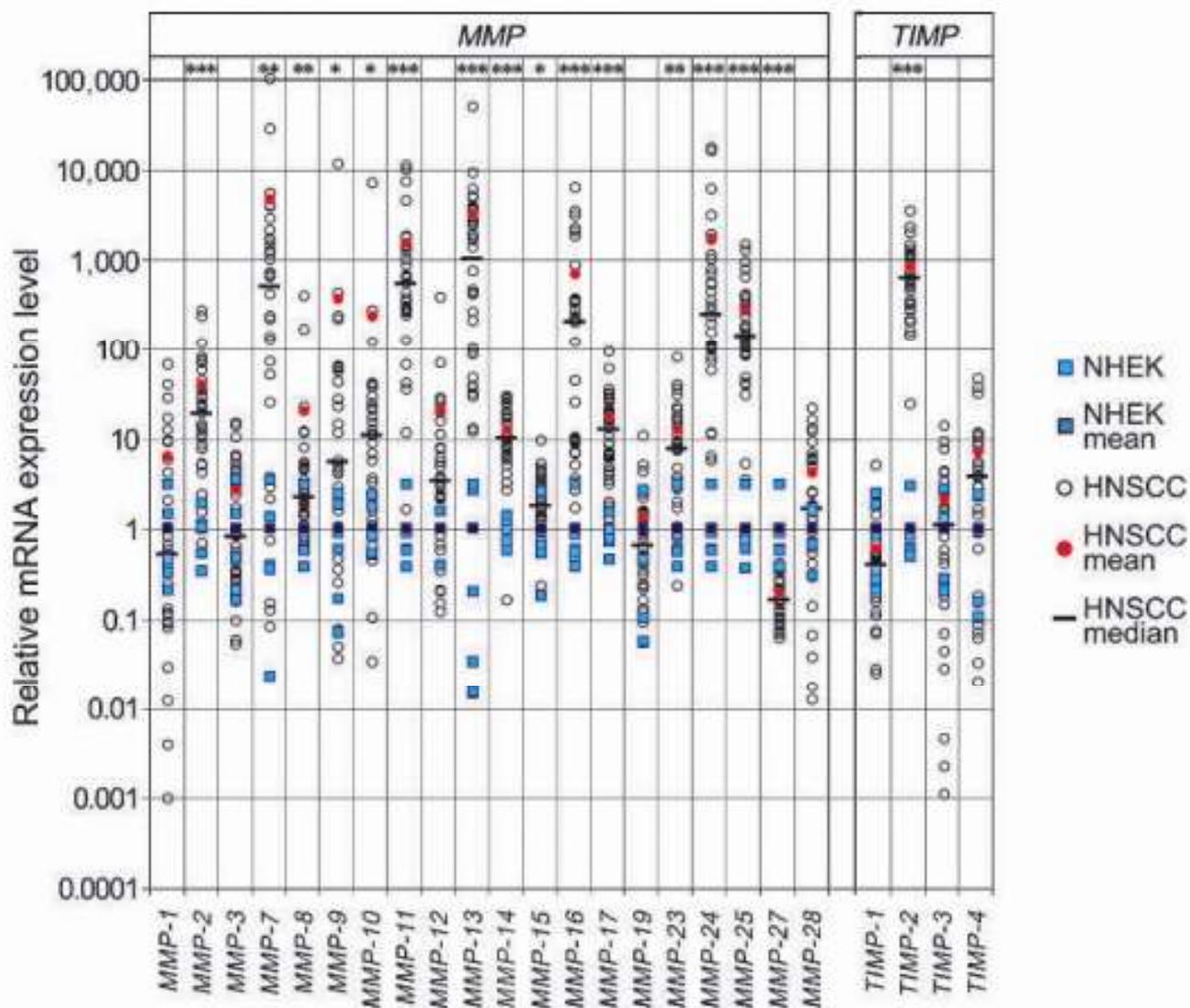


Figura 34⁴⁷: Expresión de los componentes del degradoma (MMPs y TIMPs) de líneas celulares de CECC(n=34) determinados mediante RT-PCR en tiempo real, normalizados a ARNr 18S en cada muestra, y comparada con los niveles de NHEKs (normal human epidermal keratinocytes) (1.00). La comparación estadística en las líneas celulares de CECC con las NHEKs se realizó con el test de Wilcoxon. Se muestran los valores de P de 0.01 a 0.05(*), 0.001 a 0.005(**), y <0.001(***)

En general, los autores encontraron escasas diferencias en el perfil de expresión de las diferentes MMPs en función de la localización, el grado histológico o la extensión del tumor.

Las Tabla 5 y Tabla 6 de las siguientes páginas resumen los resultados en cuanto a positividad en la expresión de las diferentes MMPs y TIMPs en pacientes con carcinomas escamosos de cabeza y cuello de acuerdo con los resultados comunicados por los diferentes autores.

Tabla 5: Resumen de la expresión de las diferentes MMPs según distintos autores. CO: cavidad oral; Orof: orofaringe; H&N: cabeza y cuello; L: laringe.

Autor	Año	nº	estudio	MMP1	MMP2	MMP3	MMP7	MMP8	MMP9	MMP10	MMP11	MMP13	MMP14	MMP15	MMP16	Localización
Kusukawa ⁴⁸	1993	46	IHQ		67.4%											CO
Charous ⁴⁹	1997	29	HIS		67.0%											H&N
Kurahara ⁵⁰	1999	96	IHQ		80.2%				83.3%							CO
Ikebe ⁵¹	1999	57	IHQ		70.8%											CO
Hong ⁵²	2000	44	IHQ		34.1%				52.3%							CO
Imanishi ¹³	2000	70	IHQ		70.8%								69.2%			H&N
Imanishi ¹³	2000	42	PCR		71.4%								59.5%			H&N
Riedel ⁵³	2000	52	IHQ						52.0%							H&N
Katayama ⁵⁴	2004	53	IHQ		86.8%				58.5%							CO
de Vicente ⁴¹	2005	68	IHQ		28.0%				17.6%							CO
Kosunen ⁴³	2007	124	IHQ						100%							CO
Zhang ⁴⁴	2009	85	PCR										82.4%	52.9%	48.2%	L (supragl.)
Ruokolainen ³⁹	2006	72	IHQ		89.0%											H&N
Liu ⁵⁵	2005	72	IHQ		50.0%				73.9%							L
Yüce ⁵⁶	2010	60	IHQ						70.0%							L (supragl.)
Germani ⁵⁷	2009	20	IHQ										35%			CO
Görögh ⁵⁸	2006	47	PCR	36.1%	53.2%				85.1%	19.1%						L
Kawano ⁵⁹	2006	39	IHQ										68.4%			CO
Xie ⁶⁰	2004	32	IHQ	37.5%	62.5%		59.4%		62.5%	25.0%						L (supragl.)
Xie ⁶⁰	2004	32	PCR	43.8%	75.0%		65.6%	15.6%	75.0%	34.4%						L (supragl.)
Hong ⁵²	2000	44	IHQ		54.5%				52.3%							CO
Luukka ⁴⁵	2006	81	IHQ									72.8%				H&N
de Vicente ⁴²	2007	69	IHQ				78.3%						65.2%			CO
Agra ⁶¹	2008	111	IHQ		77.3%				85.0%							CO, Orof.
Ruokolainen ³⁸	2004	74	IHQ						82.0%							H&N
Yoshizaki ⁶²	1997	27	IHQ										88.8%			H&N
Yoshizaki ⁶³	2001	51	IHQ		39.2%								35.3%			CO

Autor	Año	nº	estudio	MMP1	MMP2	MMP3	MMP7	MMP8	MMP9	MMP10	MMP11	MMP13	MMP14	MMP15	MMP16	Localización
Ondruschka ⁶⁴	2002	106	IHQ		68.0%				59.0%							H&N
Culhaci ⁶⁵	2004	78	IHQ									56.4%				H&N
Arora ³⁵	2005	220	IHQ								67.3%					CO
Chuang ⁶⁶	2008	24	IHQ				37.5%									CO

Tabla 6: Resumen de la expresión de los TIMPs según distintos autores. CO: cavidad oral; Orof: orofaringe; H&N: cabeza y cuello; L: laringe.

Autor	Año	nº	Estudio	TIMP-1	TIMP-2	Localización
Ruokolainen ⁴⁰	2005	68	IHQ	81.0%		H&N
Ruokolainen ³⁹	2006	72	IHQ		66.0%	H&N
Görögh ⁵⁸	2006	47	PCR	68.1%	23.1%	L
Yoshizaki ⁶³	2001	51	IHQ		43.1%	CO
Culhaci ⁶⁵	2004	78	IHQ	53.8%		H&N

10.- PAPEL DE LAS MMPs EN LA AFECTACIÓN REGIONAL EN LOS PACIENTES CON CARCINOMAS DE CABEZA Y CUELLO.

Las MMPs juegan un papel esencial en los mecanismos de degradación de la matriz extracelular e igualmente tienen la capacidad de promover la pérdida de adhesión celular, la angiogénesis y la migración celular. Todos estos fenómenos intervienen en la promoción de la diseminación regional y a distancia de la enfermedad.

Desde el estudio desarrollado por Kusakawa y cols⁴⁸ en 1993 en el que evaluaba a partir de un estudio inmunohistoquímico la relación entre la expresión de MMP-2 y la presencia de metástasis ganglionares en un grupo de 46 pacientes con carcinomas de la cavidad oral, distintos autores han estudiado la asociación entre la expresión de las MMPs y la afectación regional.

En 2005 Wiegand y cols⁶⁷ llevaron a cabo un metaanálisis en que se evaluaron los resultados publicados hasta el momento que analizaban la importancia en la actividad de las MMPs en la aparición de metástasis ganglionares. Se analizaron un total de 14 estudios que incluían un total de 710 pacientes con carcinomas de cabeza y cuello en los cuales se utilizaron técnicas de inmunohistoquímica para evaluar la expresión de diferentes MMPs.

La Tabla 7 muestra el número de pacientes y la MMP estudiada en cada estudio de los incluidos en el metaanálisis.

Estudio	N° de pacientes	MMP estudiada
Franchi y cols., 2002 ⁷⁶	43	MMP-9
Hong y cols., 2000 ⁵²	44	MMP-2, -9
Imanishi y cols., 2000 ¹³	70	MMP-2, -14
Krecicki y cols., 2001 ⁷⁵	50	MMP-2
Kuruhara y cols., 1999 ⁵⁰	96	MMP-1, -3, -9, -14
Kusukawa y cols., 1993 ⁴⁸	46	MMP-2
Kusukawa y cols., 1995 ⁷²	65	MMP-3
Repassy y cols., 1998 ⁷⁴	15	MMP-2
Riedel y cols., 2000 ⁵³	52	MMP-9
Sawatsubashi y cols., 1998 ⁷³	83	MMP-1
Yoshizaki y cols., 1997 ⁶²	27	MMP-14
Yoshizaki y cols., 2001 ⁶³	51	MMP-2, -14

Tabla 7⁶⁷: Estudios citados en la revisión de Wiegand y cols presentados en orden alfabético, destacando el número de pacientes y la MMP estudiada.

i.- MMP-1 (colagenasa 1).

Se evaluaron 2 estudios, incluyendo 179 pacientes, de los cuales 124 (69.2%) aparecieron como positivos en el estudio inmunohistoquímico frente a la MMP-1.

La Figura 35 muestra los resultados correspondientes al análisis de estos estudios. De acuerdo con los resultados, no aparecieron diferencias significativas en el riesgo de aparición de metástasis ganglionares en función de la actividad MMP-1 (OR 1.66, IC 95%: 0.05-52.68).

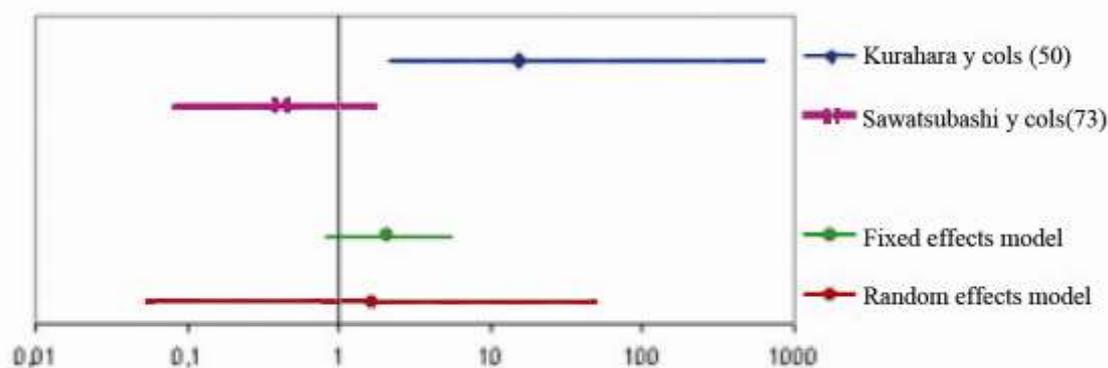


Figura 35 ⁶⁷: Forest plot (odds ratio, IC 95%) con los resultados de los estudios que analizan la MMP-1 en relación al estado ganglionar, incluyendo la odds ratio común calculada de acuerdo a los modelos de efectos fijos (*fixed effects model*), cuya única fuente de variabilidad que se asume son las variaciones que coinciden dentro de los estudios; y el modelo de efectos al azar (*random effects model*), que permite calcular una odds ratio resumida en casos de estudios heterogéneos.

ii.- MMP-2 (gelatinasa A).

Se incluyeron 7 estudios con 367 pacientes. El forest plot del metaanálisis indica discrepancia en los resultados obtenidos por los diferentes autores, con un resultado final atendiendo a la valoración conjunta de los estudios que mostraba una relación significativa de la expresión de la MMP-2 con la presencia de adenopatías metastásicas (OR 3.96, IC 95%:2.16-7.28%) (Figura 36).

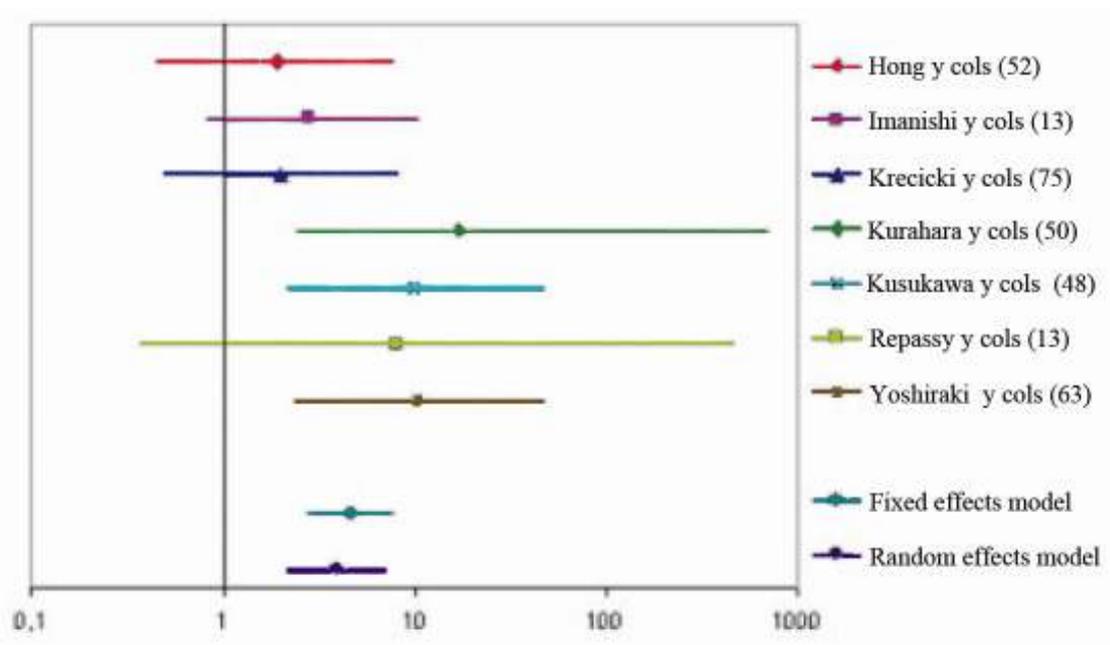


Figura 36⁶⁷: Forest plot (odds ratio, IC 95%) con los resultados de los estudios que analizan la MMP-2 en relación al estado ganglionar, incluyendo la odds ratio común calculada de acuerdo a ambos modelos.

iii.- MMP-3 (estromelina 1).

Se evaluaron 3 estudios incluyendo 226 pacientes, con la particularidad de que es este caso se analizaron sólo pacientes con carcinomas localizados a nivel de la cavidad oral y zonas adyacentes. Los resultados obtenidos mostraron una relación significativa entre la expresión de MMP-3 y el riesgo de metástasis ganglionares (OR: 5.09, IC 95%: 3.70-6.98%) (Figura 37).

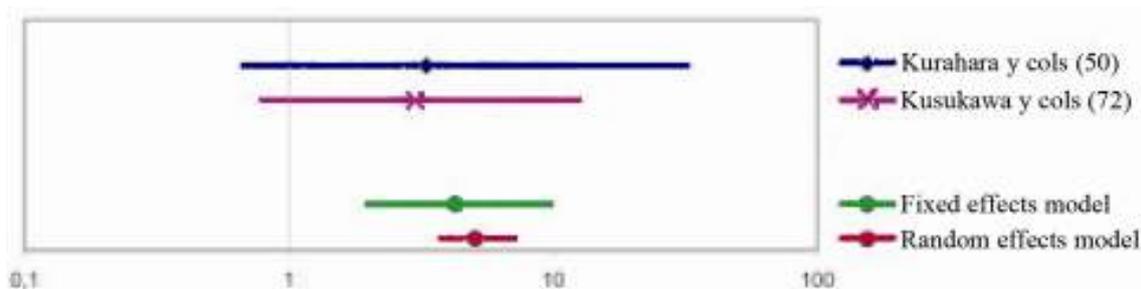


Figura 37⁶⁷: Forest plot (odds ratio, IC 95%) con los resultados de los estudios que analizan la MMP-3 en relación al estado ganglionar, incluyendo la odds ratio común calculada de acuerdo a ambos modelos.

iv.- MMP-9 (gelatinasa B).

De los 238 pacientes incluidos en el estudio, un 63% mostraron positividad frente a la MMP-9. El resultado del metaanálisis demostró la existencia de una relación significativa entre la expresión de la MMP-9 y las metástasis ganglionares (OR: 2.29, IC 95%: 1.09-4.48%) (Figura 38).

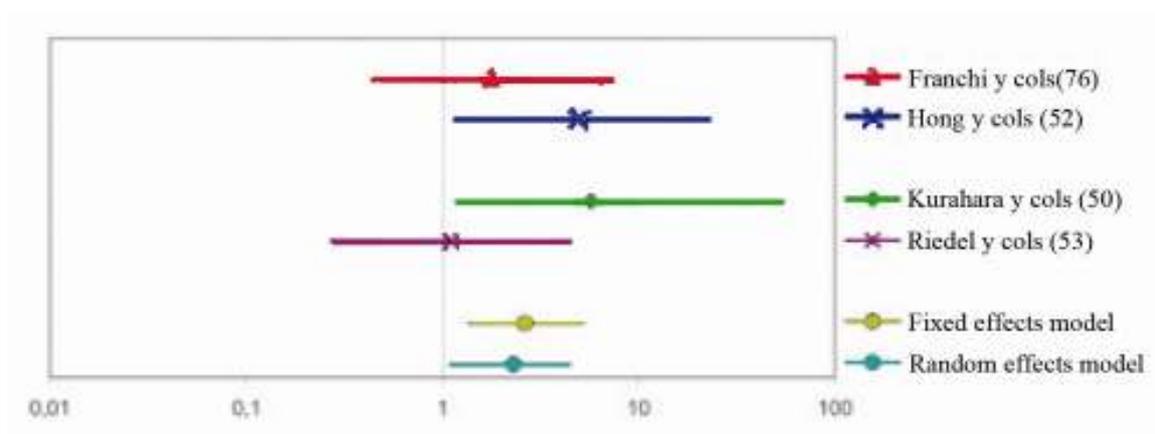


Figura 38⁶⁷: Forest plot (odds ratio, IC 95%) con los resultados de los estudios que analizan la MMP-9 en relación al estado ganglionar, incluyendo la odds ratio común calculada de acuerdo a ambos modelos.

v.- MMP-14.

Finalmente, el metaanálisis evaluó 4 estudios que reclutaron un total de 198 pacientes, de los cuales un 65.1% resultaron positivos frente a la MMP-14.

De nuevo se mostró la existencia de una relación significativa entre la expresión de la MMP-14 y la afectación ganglionar (OR: 4.70, IC 95%: 2.17-10.83%) (Figura 39).

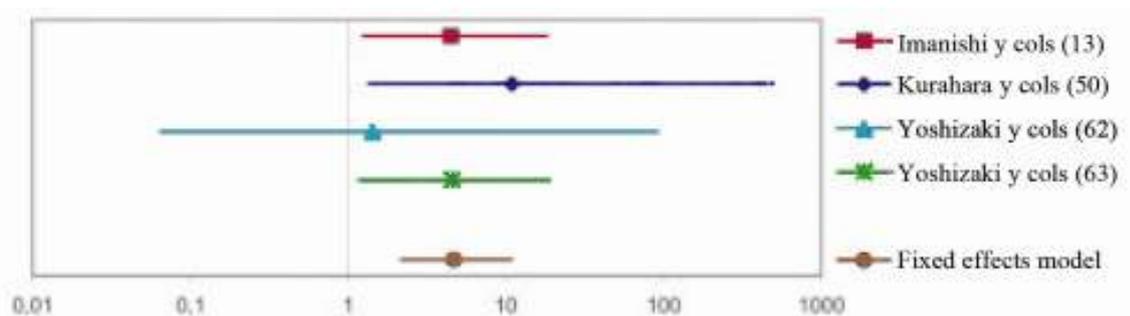


Figura 39⁶⁷: Forest plot (odds ratio, IC 95%) con los resultados de los estudios que analizan la MMP-14 en relación al estado ganglionar, incluyendo la odds ratio común calculada de acuerdo a ambos modelos.

Analizados en conjunto, parece existir una tendencia significativa en la asociación entre la actividad de las MMPs, valoradas mediante técnicas de inmunohistoquímica, y la presencia de adenopatías metastásicas a nivel cervical en los pacientes con carcinomas de cabeza y cuello, si bien los resultados correspondientes a los estudios individuales mostraron una marcada heterogeneidad. De acuerdo con los autores del metaanálisis, una primera necesidad sería la estandarización de las técnicas de inmunohistoquímica y de los protocolos de evaluación, de cara a conseguir resultados sólidos que clarifiquen el papel real jugado por las MMPs en relación a la afectación ganglionar.

De los estudios incluidos en el metaanálisis, destaca el realizado por Kurahara y cols⁵⁰ por ser el que agrupó a un mayor número de pacientes y en el que se analizaron un mayor número de MMPs. Se analizaron un total de 96 pacientes con carcinomas de cavidad oral, 38 de los cuales (39.6%) contaron con la presencia de metástasis a nivel ganglionar. Se llevó a cabo una determinación inmunohistoquímica de la expresión de la MMP-1, -2, -3, -9, -14, y del TIMP-1 y TIMP-2. La expresión de MMP-1, -2, -14 y TIMP-2 correspondió de forma mayoritaria a las células tumorales, en tanto que para MMP-3, -9 y TIMP-1 de

forma preferente a las células del estroma. En general, los autores encontraron una relación significativa entre el nivel de expresión de las MMPs estudiadas y la existencia de afectación ganglionar. La Tabla 8 resume los hallazgos encontrados por los autores.

Grado de tinción	Numero de casos		P value(χ^2)
	N -	N +	
MMP-1			
0	17*	1	P < 0.0001 (18.772)
1+	25	11	
2+	13	22	
3+	3	4	
MMP-2			
0	18	1	P < 0.05 (14.443)
1+	18	5	
2+	11	14	
3+	10	18	
MMP-3			
0	9	2	P < 0.05 (10.807)
1+	24	7	
2+	16	16	
3+	9	13	
MMP-9			
0	14	2	P < 0.0001 (28.851)
1+	26	3	
2+	8	13	
3+	10	20	
Total	58	38	

Tabla 8⁵⁰: Relación entre la expresión de MMPs en biopsias de especímenes con carcinoma escamoso de cavidad oral y la afectación ganglionar. N-/+: sin/con afectación ganglionar.

Igualmente, apareció una relación significativa entre el nivel de expresión correspondiente a la MMP de membrana MMP-14 ($P=0.005$) y el TIMP-1 ($P=0.01$) y la afectación ganglionar, en tanto que no se apareció tal relación entre el TIMP-2 y la presencia de metástasis ganglionares.

La agrupación de los niveles de positividad en 5 categorías, correspondiendo la categoría 1 a un nivel de expresión muy bajo del conjunto de MMPs y la categoría 5 a un nivel de expresión elevado de todas ellas, mostró la existencia de una relación significativa entre la categoría de expresión y el porcentaje de pacientes con afectación ganglionar. La Tabla 9 muestra la relación existente entre la categoría de actividad de MMPs y la afectación ganglionar.

Grupos MMPs según grado de tinción	Numero de casos		P value(χ^2)
	N -	N +	
Grupo 1	20	3	P < 0.0001 (34.627)
Grupo 2	13	1	
Grupo 3	11	5	
Grupo 4	10	11	
Grupo 5	3	19	

Tabla 9⁵⁰: Relación entre los grupos con tinción de MMPs en biopsias de especímenes con carcinoma escamoso de cavidad oral y la afectación ganglionar. N-/+: sin/con afectación ganglionar.

Hong y cols⁶⁸ llevaron a cabo una determinación de la actividad gelatinolítica desarrollada por las MMP-2 y -9 a partir de un estudio de zimografía en gelatina realizado en 4 muestras de mucosa y 11 pacientes con carcinomas de cavidad oral, 6 de los cuales contaron con la presencia de metástasis a nivel regional. Sus resultados mostraron que la actividad gelatinolítica desarrollada por la MMP-2 en las muestras de tumor fue 3.64 veces superior que la

correspondiente a la mucosa sana, y la dependiente de la MMP-9 fue 2.81 veces superior, existiendo diferencias significativas en la actividad proteolítica asociada al tumor respecto a la mucosa sana. No aparecieron diferencias significativas en la actividad gelatinolítica asociada a la MMP-2 entre los tumores en función de la afectación ganglionar, en tanto que los pacientes con tumores metastásicos contaron con un incremento moderado de la actividad proteolítica asociada a la MMP-9.

Xie y cols⁶⁰ estudiaron 32 pacientes con carcinomas de supraglotis con la finalidad de determinar la presencia de metástasis ganglionares a partir del análisis de la actividad MMP. Se evaluaron tanto la expresión de los genes mediante técnicas de RT-PCR, como la proteica mediante inmunohistoquímica de una batería de MMPs que incluyó la MMP-1, -2, -7, -8, -9 y -10. Los porcentajes de positividad encontrados a partir del estudio inmunohistoquímico fueron del 38%, 63%, 59%, 63% y 25% para las MMP-1, -2, -7, -9 y -10. Por su parte, los porcentajes de positividad en el estudio mediante PCR fueron del 44%, 78%, 66%, 16%, 75% y 34% para las MMP-1, -2, -7, -8, -9 y -10 respectivamente.

Los autores encontraron una relación significativa entre la expresión de la MMP-2, la MMP-7 y la MMP-9 y la existencia de metástasis ganglionares, tanto en el estudio inmunohistoquímico como en la determinación de la expresión de los genes correspondientes mediante técnicas de PCR. Durante el proceso metastásico, además de penetrar la membrana basal correspondiente a la pared del vaso linfático, las células tumorales necesitan progresar a través de la pared de dichos vasos. Las MMP-2 y MMP-9 participan de la degradación de la membrana basal del vaso linfático, mientras que la MMP-7 cuenta con la

capacidad de degradar de forma efectiva la elastina, que es el componente principal de la pared del vaso.

A partir de sus resultados, elaboraron unos modelos mediante los cuales se calculaba la probabilidad de afectación ganglionar en función de la positividad en la actividad MMP. La siguiente fórmula corresponde al modelo elaborado a en función de la positividad estudiada mediante técnicas de PCR.

$$p = \frac{e^{2.7425A+3.2630B+3.4799C-5.7356}}{1 + e^{2.7425A+3.2630B+3.4799C-5.7356}}$$

Formula 1⁶⁰: Modelo basado en una regresión logística multivariante con el objetivo de predecir, según el nivel de expresión de ARNm de MMPs, la posibilidad de metástasis o micrometástasis ganglionar cervical en carcinomas de supraglotis. Niveles de expresión de MMPs mediante RC-PCR. A:MMP-2; B:MMP-7; C:MMP-9.

El valor predictivo global correspondiente a este modelo fue del 84%, en tanto que el que se obtuvo con el modelo basado en las determinaciones inmunohistoquímicas alcanzó el 88%. Cabe destacar que la aplicación de estos modelos matemáticos hubiera conseguido determinar la presencia de metástasis ganglionares ocultas en 6 de los 7 pacientes N0/pN+.

Katayama y cols⁵⁴ realizaron un estudio en 53 pacientes con carcinomas de cavidad oral en estadios iniciales (T1-2N0) tratados preferentemente de forma quirúrgica, evaluando mediante técnicas de inmunohistoquímica las actividades correspondientes a las MMP-2, MMP-9, MMP-14 y TIMP-2. Las diferentes proteínas se expresaron de forma preferente en la superficie y el citoplasma de las células tumorales, apareciendo también teñidas de forma ocasional algunas células endoteliales y fibroblastos del estroma. No aparecieron diferencias significativas en cuanto al control local de la enfermedad en función de la

expresión de las MMPs o el TIMP-2. Los pacientes que desarrollaron una recidiva regional (n=20, 37.7%) contaron con unos valores de expresión de las MMP-9 y el TIMP-2 significativamente superiores, en tanto que no aparecieron diferencias significativas para la MMP-1 y la MMP-14. La Figura 40 muestra los valores de expresión correspondientes a los pacientes incluidos en el estudio en función de la presencia de recidiva a nivel regional.

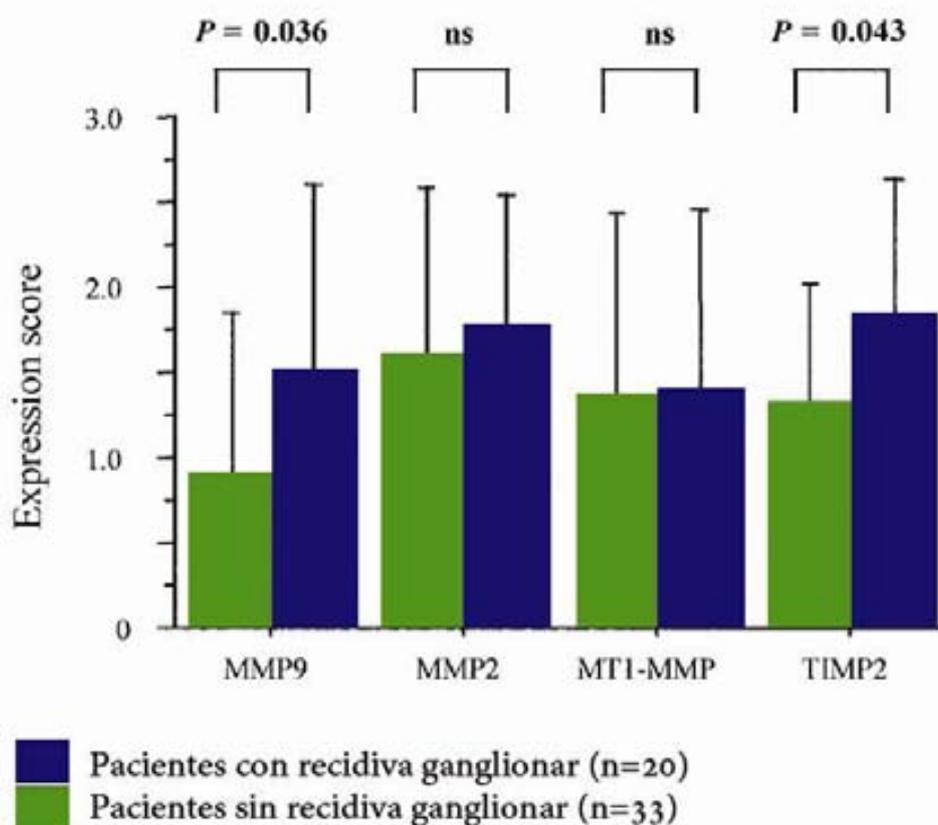


Figura 40⁵⁴: Valores de expresión de MMP-1, MMP-2, MT1-MMP(MMP-14), y TIMP-2 entre pacientes con recidiva ganglionar o a distancia ($n = 20$; 1.750 ± 0.786 , 1.500 ± 1.100 , 1.450 ± 0.999 , y 1.800 ± 0.834 , respectivamente) y pacientes sin recidiva ganglionar ($n = 33$; 1.586 ± 1.018 , 0.862 ± 0.935 , 1.345 ± 1.078 , y 1.314 ± 0.733 , respectivamente). Los resultados se presentan como media + SD. Se aplicó el test U Mann-Whitney para determinar la P.

La Figura 41 muestra las curvas de supervivencia libres de recidiva regional y a distancia en función de los valores de expresión de las MMP-9 y el TIMP-2.

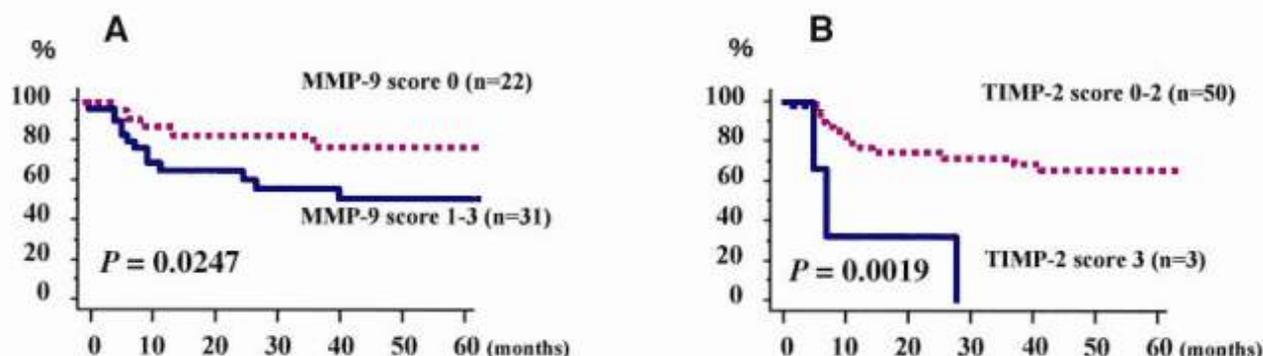


Figura 41⁵⁴: Curvas de control regional y a distancia en función de los valores de MMP-9 y el TIMP-2. (A) El control regional y distancia tiende a ser peor en pacientes con expresión de MMP-9 elevados (valor 1-3), que los sin expresión de MMP-9 (valor 0; $P = 0.0247$); (B) y tiende a ser peor en pacientes con TIMP-2 con valor 3, que los valores 0-2 ($P = 0.0019$). Se utilizó el método de Kaplan-Meier y el test log-rank para comparar.

Existieron diferencias significativas en la supervivencia libre de recidiva en función de la expresión inmunohistoquímica de ambas proteínas, si bien debe tenerse en cuenta que el número de pacientes incluidos en el grupo de mal pronóstico correspondiente al valor de expresión elevado del TIMP-2 fue muy reducido.

En general, se ha asociado el TIMP-2 con un efecto supresor de la capacidad de diseminación tumoral a partir de su efecto inhibitor de la MMP-2, por lo que llama la atención que su sobre-expresión se asocie con el efecto contrario.

En un estudio previo realizado por Yoshizaki y cols⁶³ se encontró igualmente una relación significativa entre la expresión del TIMP-2 y la presencia de adenopatías metastásicas.

Kawano y cols⁵⁹ desarrollaron un estudio inmunohistoquímico en el que se valoró la presencia de la laminina-5, un componente de la membrana basal cuya expresión se ha relacionado con el pronóstico y el control local en pacientes con carcinomas de cavidad oral⁶⁹, y de MMP-14, una de las enzimas encargadas de su degradación, con la presencia de adenopatías metastásicas en pacientes con tumores iniciales (T1-T2) de la cavidad oral. La totalidad de los 57 pacientes estudiados mostraron la presencia de laminina-5 en el estudio histológico, en 26 ocasiones (45.6%) con un patrón focal o discontinuo, y en 31 casos (54.4%) con una afectación difusa amplia. En cuanto a la MMP-14, 18 pacientes (31.6%) fueron considerados positivos.

En relación a la afectación regional se definieron tres grupos de pacientes: grupo 1 (n=14) lamimina-5 focal / MMP-14 (-), con un riesgo bajo de afectación regional (14.3%); grupo 2 (n=16) lamimina-5 focal / MMP-14 (+) o lamimina-5 difuso / MMP-14 (-), con un riesgo intermedio (31.3%); y grupo 3 (n=27) lamimina-5 difuso / MMP-14 (+), con un riesgo elevado (55.6%) de aparición de metástasis a nivel ganglionar. Los resultados de un estudio multivariante mostraron que el grosor tumoral y el status laminina-5 / MMP-14 se relacionaron de forma significativa con la afectación regional. Para los pacientes N0, la determinación de la actividad laminina-5 / MMP-14 se correlacionó con la presencia de metástasis ganglionares ocultas. La incidencia de metástasis ocultas para los 17 pacientes N0 incluidos en los grupos 1 y 2 fue del 5.8%, ascendiendo al 44.4% en el grupo de 18 pacientes N0 incluidos en el grupo 3. La conclusión de los autores fue que la determinación inmunohistoquímica de laminina-5 / MMP-14 se correlacionó con la presencia de adenopatías metastásicas en los pacientes con tumores localmente

incipientes de cavidad oral, pudiendo ser utilizada para diferenciar a los pacientes N0 candidatos a un tratamiento electivo sobre las áreas ganglionares.

En un estudio de diseño similar, Germani y cols⁵⁷ evaluaron la relación entre la expresión de MMP-14 mediante técnicas de inmunohistoquímica y la presencia de metástasis ganglionares en un grupo de pacientes con carcinomas de cavidad oral N0 tratados quirúrgicamente. El porcentaje de positividad frente a la MMP-14 correspondiente a los pacientes N0/pN+ fue del 67% (4/6), frente al 21% (3/14) correspondiente a los pacientes N0/pN0. El estudio estadístico mostró una tendencia hacia la positividad frente a la MMP-14 para los pacientes con metástasis ganglionares ocultas ($P=0.12$), sin que la potencia del estudio permitiese alcanzar una significación estadística. En el mismo estudio se evaluaron otros marcadores moleculares relacionados con la migración como el receptor de superficie CD44, con la adhesividad intercelular como la cadherina-E, y con la adhesión entre la célula y la matriz extracelular como la FAK (*focal adhesion kinase*). No existió correlación entre la expresión de ninguna de estas moléculas y la presencia de metástasis ganglionares ocultas. Por su parte, de Amorim y cols⁷⁰ tampoco encontraron una relación significativa entre la expresión de las matrilisinas (MMP-7 y MMP-26) y la presencia de metástasis ganglionares en un estudio inmunohistoquímico realizado en 24 pacientes con carcinomas de cavidad oral.

En dos estudios realizados en pacientes con carcinomas de cavidad oral en que se evaluó la expresión de una serie de MMPs mediante inmunohistoquímica, de Vicente y cols^{41,42} encontraron una relación con la afectación regional sólo con la expresión de la MMP-7. La MMP-2, MMP-9 y

MMP-14 no se relacionaron de forma significativa con la presencia de adenopatías metastásicas. El porcentaje de positividad frente a MMP-7 para los pacientes N+ fue del 92.0% (23/25), en tanto que para los pacientes N0 fue del 70.4% (31/44) ($P=0.03$). De acuerdo con un estudio multivariante, la expresión de la MMP-7 fue la única variable que apareció como un factor de riesgo independiente asociada a la aparición de metástasis ganglionares.

Görögh y cols⁵⁸ llevaron a cabo un estudio muy completo del papel biológico jugado por las MMPs en relación con la afectación ganglionar en pacientes con carcinomas de laringe. Los autores analizaron mediante técnicas de RT-PCR un grupo de 47 pacientes con carcinomas laríngeos, evaluando la expresión de MMP-1, -2, -9, y -10, así como de los inhibidores específicos TIMP-1 y TIMP-2. El porcentaje de positividad difirió notablemente en función de la MMP evaluada. Así, la expresión frente a la MMP-1 fue positiva en un 36.1%, la MMP-2 en 53.2%, la MMP-9 en un 85.1%, y la MMP-10 tan sólo en un 19.1%. El porcentaje de positividad en la expresión del TIMP-1 fue del 68.1% y del TIMP-2 del 23.1%.

De acuerdo con sus resultados, no apareció una relación significativa entre la expresión de las MMPs -1, -9 y -10 y la afectación ganglionar. Por el contrario, la expresión de la MMP-2 se relacionó de forma significativa con la presencia de adenopatías metastásicas. De los 24 pacientes N+, un 70.8% mostró positividad frente a la MMP-2, frente a un 34.8% correspondiente a los 23 pacientes N0 ($P=0.013$). Por otro lado, apareció una relación inversa significativa entre la expresión de los TIMP-1 y TIMP-2, con la presencia de metástasis ganglionares. Para los pacientes N+ el porcentaje de positividad para el TIMP-1 y TIMP-2 fue del 50% y 4.1% respectivamente, frente al 86.9%

y 43.4% correspondiente a los pacientes N0 ($P= 0.003$ y $P=0.002$). Los autores llevaron además un estudio inmunohistoquímico en una muestra de cinco de los pacientes, encontrando que la actividad MMP aparecía preferentemente en las células tumorales, en tanto que las células del estroma no mostraron actividad MMP, tal como se muestra en la Figura 42, correspondiente a una tinción inmunohistoquímica frente a la MMP-2.

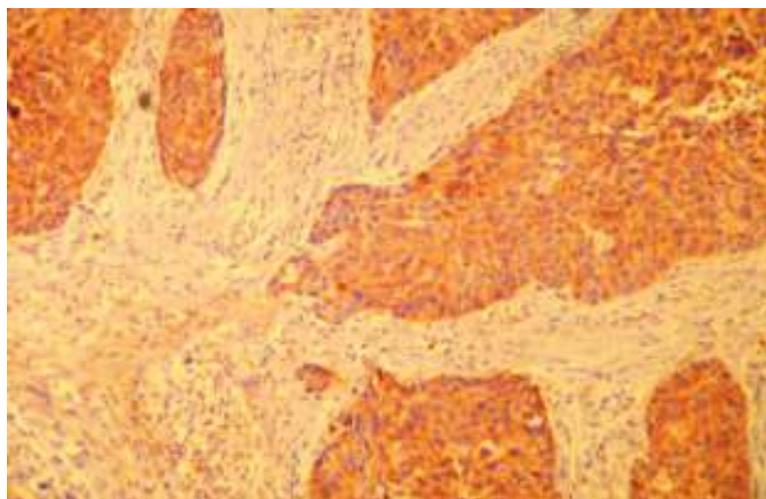


Figura 42⁵⁸: Carcinoma de laringe: Tinción para MMP-2. La MMP-2 es producida de forma predominante por células malignas y sólo se encuentran rastros en el estroma del tumor.

Los autores complementaron el estudio mediante una evaluación de la actividad MMP en una batería de 11 líneas celulares correspondientes a carcinomas escamosos de cabeza y cuello. Los resultados obtenidos fueron compatibles con los hallazgos clínicos. Ninguna de las líneas celulares expresó MMP-10, y 10 de las líneas expresaron MMP-9. Tan sólo una línea celular correspondiente a un carcinoma de orofaringe no expresó ninguna de las MMPs evaluadas.

Finalmente, se llevó a cabo un estudio que evaluaba la capacidad de degradación in vitro de dichas líneas mediante una técnica de zimografía en

gelatina. Se evidenció que un incremento a nivel transcripcional de los TIMPs conducía a una disminución entre dos y seis veces de la actividad enzimática correspondiente a las MMP-2 y MMP-9.

En un estudio que combinaba igualmente técnicas de inmunohistoquímica con la evaluación de la expresión de los genes mediante RT-PCT, Imanishi y cols¹³ encontraron que la MMP-14, pero no la MMP-2, se encontraba relacionada con la presencia de metástasis a nivel ganglionar. La Figura 43 muestra la distribución de los valores de ARNm correspondientes a la expresión de la MMP-14 (MT1-MMP) y la MMP-2 en un grupo de 42 pacientes con carcinomas de cabeza y cuello, 20 de los cuales contaron con la presencia de adenopatías metastásicas.

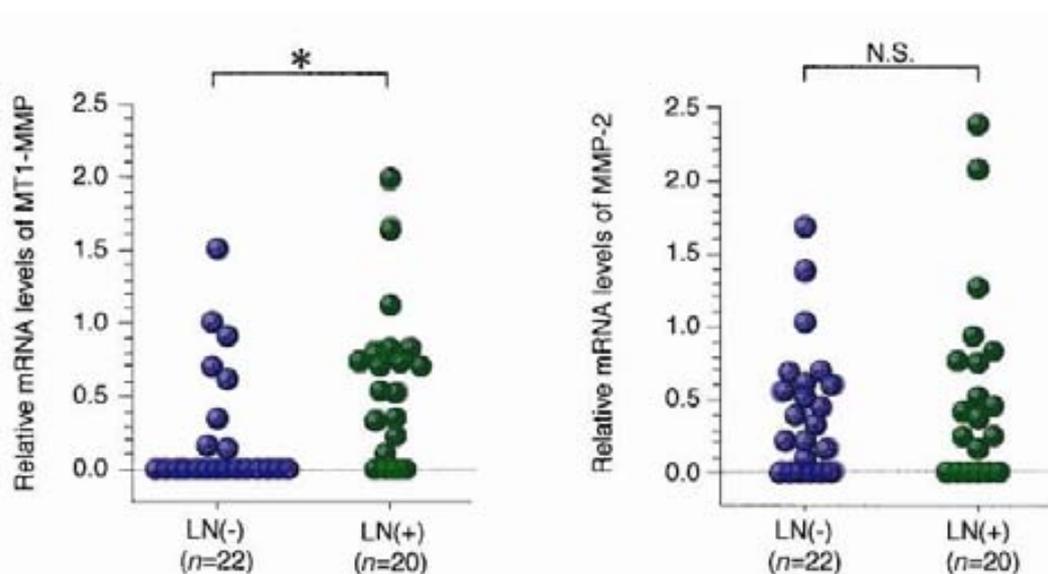


Figura 43¹³: Distribución de los niveles de ARNm de la MT1-MMP y MMP-2 en carcinoma de cabeza y cuello con [LN(+)] o sin [LN(-)] metástasis ganglionar. * $P < .01$; NS: no significativo.

Existieron diferencias significativas en los niveles de expresión de la MMP-14 (MT1-MMP) en función de la existencia de metástasis ganglionares ($P=0.01$).

Los resultados del estudio inmunohistoquímico fueron comparables. Los pacientes con metástasis ganglionares contaron con un mayor índice de

positividad frente a la MMP-14 que los pacientes N0, en tanto que no aparecieron diferencias significativas en relación con la MMP-2. De acuerdo con los resultados de un estudio multivariante, sólo la positividad frente a la MMP-14 apareció como un factor significativo asociado a la presencia de metástasis ganglionares, en tanto que ni la categoría de extensión local T, ni el grado histológico, ni la expresión de la MMP-2 se asociaron con la afectación regional. En relación a los pacientes MMP-14 negativos, los pacientes MMP-14 positivos contaron con un riesgo 6.2 veces superior de contar con metástasis ganglionares (IC 95%: 1.2-33.9, P=0.033).

Otros autores que han analizado la relación entre la expresión de los genes responsables de la codificación de las MMPs y la presencia de adenopatías metastásicas fueron O-charoenrat y cols⁷¹, que evaluaron mediante técnicas de RT-PCR un grupo de 54 pacientes consecutivos con carcinomas de cabeza y cuello. Los autores encontraron una correlación significativa intensa entre los niveles de expresión de la MMP-9 (P<0.001) y la afectación ganglionar, mientras que MMP-2, MMP-7 y MMP-11 mantuvieron unos niveles de asociación más moderados (P=0.4, 0.3 y 0.49 respectivamente).

La Figura 44 muestra la correlación existente entre los niveles de expresión alta o baja de forma conjunta de los genes MMP-2 y MMP-9 y la presencia de adenopatías metastásicas.

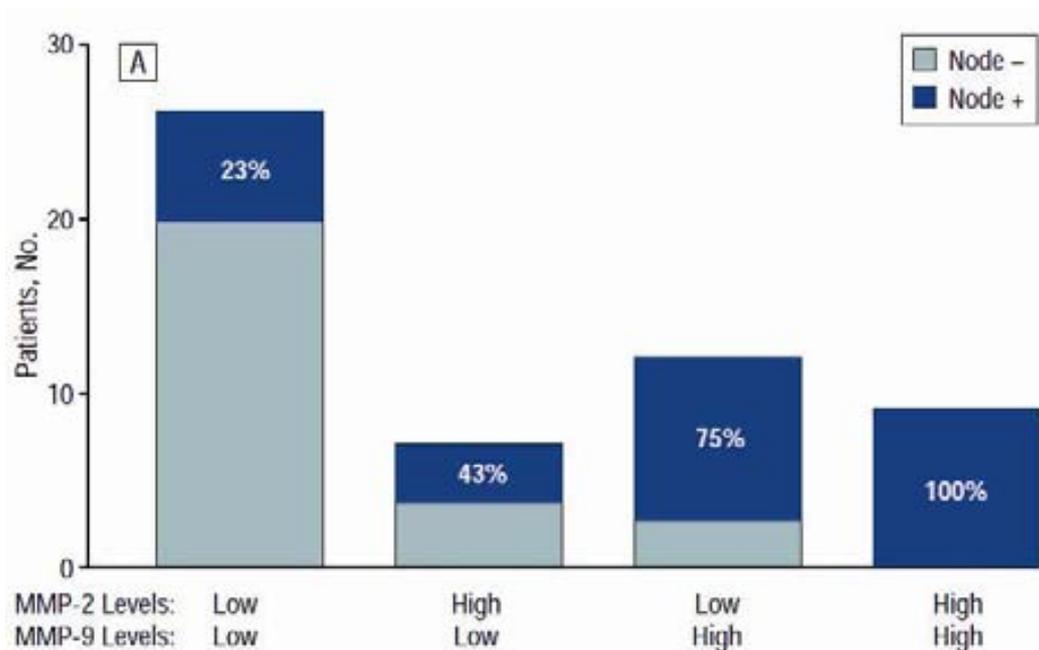


Figura 44⁷¹: Correlación entre la expresión de MMP-2 y MMP-9 con (Node +) o sin [Node -] la presencia de metástasis ganglionar en tejidos con carcinoma de cabeza y cuello primarios. Los valores de corte obtenidos de las medias de ARNm determinados por RT-PCR, se usaron para separar los tumores primarios de carcinoma en grupos de alta y baja expresión.

Para Zhang y cols⁴⁴, que estudiaron mediante técnicas de RT-PCR e inmunohistoquímica la expresión de diferentes MMPs, existió una relación entre la expresión de la MMP-14 y la existencia de afectación ganglionar en pacientes con carcinoma de supraglotis. El porcentaje de MMP-14 positivos en los pacientes N+ fue del 90.9% (40/44), en tanto que para los N0 disminuyó al 73.2% (30/41) ($P < 0.05$). Por el contrario, no aparecieron diferencias significativas en relación a la presencia de metástasis ganglionares al analizar la MMP-15 o la MMP-16.

La CD44 es una glicoproteína transmembrana relacionada con las interacciones de las células entre sí, y de éstas con la matriz extracelular. Proporciona un lugar de anclaje en la superficie celular a la MMP-9, mediando de forma indirecta las funciones de dicha enzima. En un estudio reciente, Yüce y cols⁵⁶ han evaluado de forma conjunta la actividad de la CD44 y la MMP-9

mediante técnicas de inmunohistoquímica en un grupo de 30 pacientes con carcinomas de supraglotis pN+, comparándolos con un grupo pareado de 30 pacientes pN0. No aparecieron diferencias significativas en la expresión de ambas proteínas en función del estadio o el grado de diferenciación del tumor. Los autores señalaron un cierto grado de concordancia en el grado de expresión de la CD44 y la MMP-9 (valor κ : 0.57). El porcentaje de sobreexpresión del CD44 correspondiente a los pacientes pN+ fue del 63%, frente a un 33% en los pN0. Por su parte, el porcentaje de sobreexpresión para la MMP-9 en los pacientes pN+ fue del 87%, frente a un 60% para los pN0. Los autores encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la expresión de ambas proteínas en relación a la presencia de adenopatías metastásicas en los vaciamientos cervicales.

Sin embargo, tal como quedó de manifiesto en el metaanálisis realizado por Wiegand y cols⁶⁷, no todos los autores coinciden en la relevancia de las MMPs como factor de riesgo de afectación ganglionar en los pacientes con carcinomas escamosos de cabeza y cuello. Ruokolainen y cols³⁸ no encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de la MMP-9 en función de la presencia de adenopatías metastásicas en un estudio inmunohistoquímico realizado en 74 pacientes con carcinomas de cabeza y cuello. Igualmente, en un estudio de características similares realizado en 138 pacientes con carcinomas de cavidad oral, Kosunen y cols⁴³ no encontraron relación entre la MMP-9 y la afectación ganglionar.

En dos estudios diferentes, Ruokolainen y cols, no encontraron una relación significativa entre la expresión del TIMP-1⁴⁰ o la MMP-2 y el TIMP-2³⁹, medidos mediante técnicas de inmunohistoquímica a nivel del tumor y niveles

séricos circulantes, con la afectación ganglionar en pacientes con carcinomas de cabeza y cuello,

Por su parte, Liu y cols⁵⁵ tampoco encontraron una relación significativa entre los niveles de expresión de la MMP-2 y -9 y la presencia de afectación ganglionar en un grupo de 72 pacientes con carcinomas de la laringe.

La Tabla 10 resume los hallazgos encontrados por los diferentes autores respecto a la relación existente entre la expresión de MMPs y TIMPs y la presencia de metástasis ganglionares.

Tabla 10: Revisión de la correlación entre la expresión de MMPs/TIMPs y la presencia de metástasis ganglionar.

* Valoración mediante PCR; # pacientes N0; Valoración de rN o pN+: & relación inversa.

Autor	año	n	N0/N+	MMP											TIMP		
				1	2	3	7	8	9	10	14	15	16	26	1	2	
Kusukawa ⁴⁸	1993	46	20/26		+												
Kusukawa ⁷²	1995	65	38/27			+											
Yoshizaki ⁶²	1997	51	29/22		+							+					
Sawatsubashi ⁷³	1998	83	72/11	-													
Repassy ⁷⁴	1998	15	11/4		-												
Kurahara ⁵⁰	1999	96	58/38	+	+	-			+			+				+	-
Hong ⁵²	2000	44	25/19		-				+								
Imanishi ^{13*}	2000	65	33/32		-							+					
Riedel ⁵³	2000	52	14/38						-								
O-charoenrat ^{71*}	2001	54	27/27		-		-		+								
Krecicki ⁷⁵	2001	50	35/15		-												
Franchi ⁷⁶	2002	43	26/17						-								
Xie ^{60*}	2004	32	20/12	-	+		+	-	+								-
Katayama ⁵⁴	2004	53 [#]	53/0	-					+			-					+
Ruokolainen ³⁸	2004	74	42/32						-								
Ruokolainen ⁴⁰	2005	68	36/32													-	
Liu ⁵⁵	2005	72	63/9		-				-								
Ruokolainen ³⁹	2006	72	42/30		-												-
Kawano ⁵⁹	2006	57	35/22									+					
Görögh ^{58*}	2006	47	23/24	-	+				-	-						+	+
Kosunen ⁴³	2007	138	107/31		-												
Germani ⁵⁷	2009	20 [#]	20/0									-					
Zhang ^{44*}	2009	85	41/44									+	-	-			
De Amorim ⁷⁰	2010	24	12/12				-								-		

Yüce ⁵⁶	2010	60	30/30							+							
--------------------	------	----	-------	--	--	--	--	--	--	---	--	--	--	--	--	--	--

11.- TRASCENDENCIA CLÍNICA DE LA EXPRESIÓN DE LAS MMPs EN LOS CARCINOMAS DE CABEZA Y CUELLO.

Existen múltiples evidencias obtenidas a partir de estudios histológicos y de biología molecular que relacionan la actividad de las MMPs con el control final de la enfermedad. Sin embargo, tal como hemos visto al evaluar la asociación entre la expresión de las MMPs y la afectación ganglionar, no existe unanimidad en los resultados obtenidos por los diferentes autores.

Los niveles de expresión de las MMPs podrían ser responsables del comportamiento clínico de los tumores de cabeza y cuello. A este respecto, existen estudios que han encontrado relación entre el patrón de expresión de MMPs y el comportamiento fenotípico y la agresividad tumoral. El carcinoma verrucoso es una variante del carcinoma escamoso que se caracteriza por penetrar en el tejido conectivo subepitelial “empujando” la membrana basal, así como por carecer de la posibilidad de metastatizar a nivel ganglionar. Impola y cols⁷⁷ encontraron que el patrón de expresión de MMPs podría contribuir a justificar las diferencias en el comportamiento de los carcinomas verrucosos en relación a los carcinomas escamosos convencionales. De forma característica, en comparación con los carcinomas escamosos convencionales, los carcinomas verrucosos no contaron con expresión de la MMP-3, -7, -9, -12 y -13. De acuerdo con los autores, el patrón de expresión de MMPs se correlacionaría con el comportamiento histopatológico de los carcinomas.

Yoshizaki y cols⁶³ evaluaron la expresión de la MMP-2, MMP-14 y TIMP-2 mediante inmunohistoquímica en 51 pacientes con carcinomas de cavidad oral tratados quirúrgicamente. Los autores encontraron una relación altamente significativa entre los niveles de expresión de las tres proteínas y la aparición de recidivas del tumor tanto a nivel local, regional y a distancia. La Figura 45 muestra las curvas de supervivencia libre de enfermedad correspondiente a los pacientes incluidos en el estudio en función del status inmunohistoquímico para la MMP-2, MMP-14 y TIMP-2.

De acuerdo con los resultados de un estudio multivariante, el status histológico del TIMP-2 fue la única variable que se relacionó de forma significativa con la supervivencia. En relación a los pacientes TIMP-2 negativos, los pacientes TIMP-2 positivos contaron con un riesgo 2.67 veces superior de fallecer como consecuencia de la evolución de la enfermedad (IC 95%: 1.02-7.00, P=0.0447).

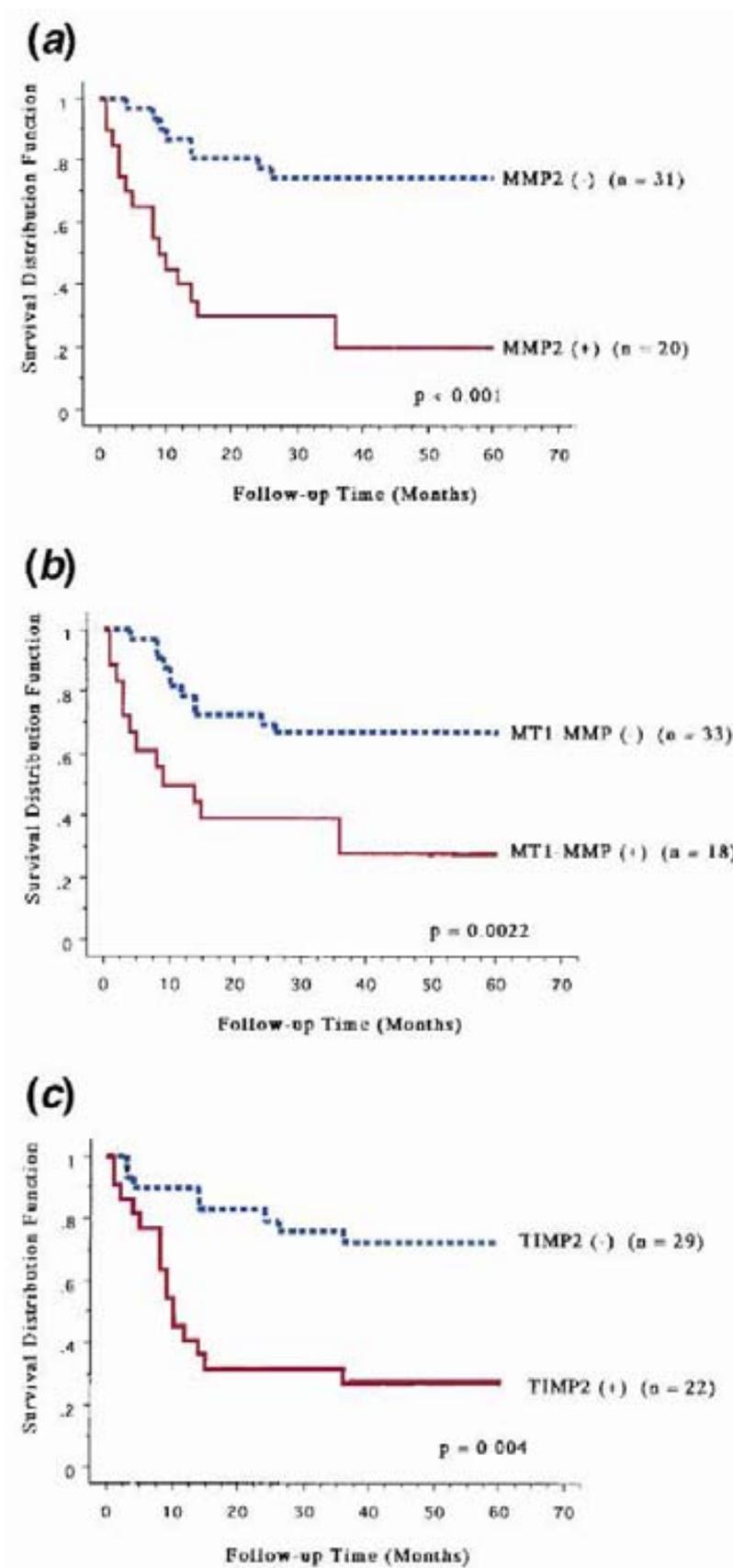


Figura 45⁶³: Curva de supervivencia libre de enfermedad de Kaplan Meier de 51 pacientes con carcinoma escamoso de lengua en función de MMP-2(a), MT1-MMP(b), y TIMP-2(c). Análisis estadístico, test log-rank.

En un grupo de 74 pacientes con tumores avanzados de cabeza y cuello, Ondruschka y cols⁶⁴ encontraron una relación significativa entre la presencia de niveles elevados de MMP-2 estudiados mediante inmunohistoquímica y el pronóstico, tal como muestra la Figura 46.

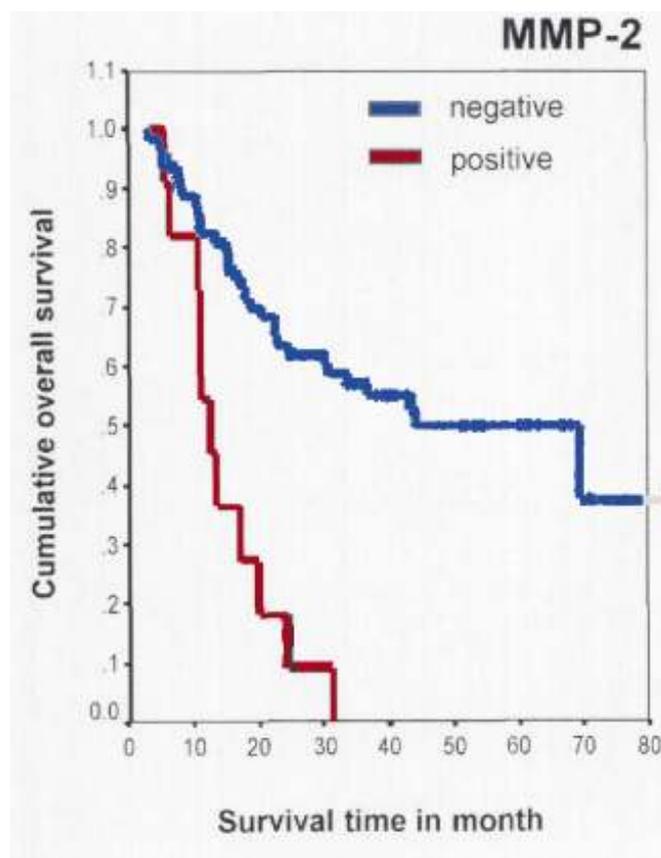


Figura 46⁶⁴: Curvas de supervivencia de todas las localizaciones tumorales en función de la expresión MMP-2 en el sitio de invasión del carcinoma (n=74).

Ruokolainen y cols⁴⁰ llevaron a cabo un estudio en que se evaluó el pronóstico de un grupo de 68 pacientes con carcinomas de cabeza y cuello tratados mayoritariamente con cirugía en función de la expresión del TIMP-1. La supervivencia ajustada a los 5 años para los pacientes TIMP-1 negativos (n=13) fue del 75%, disminuyendo al 47% para el grupo de pacientes TIMP-1 positivos (n=55) (P=0.075). La Figura 47 muestra las curvas de supervivencia en función de la expresión del TIMP-1.

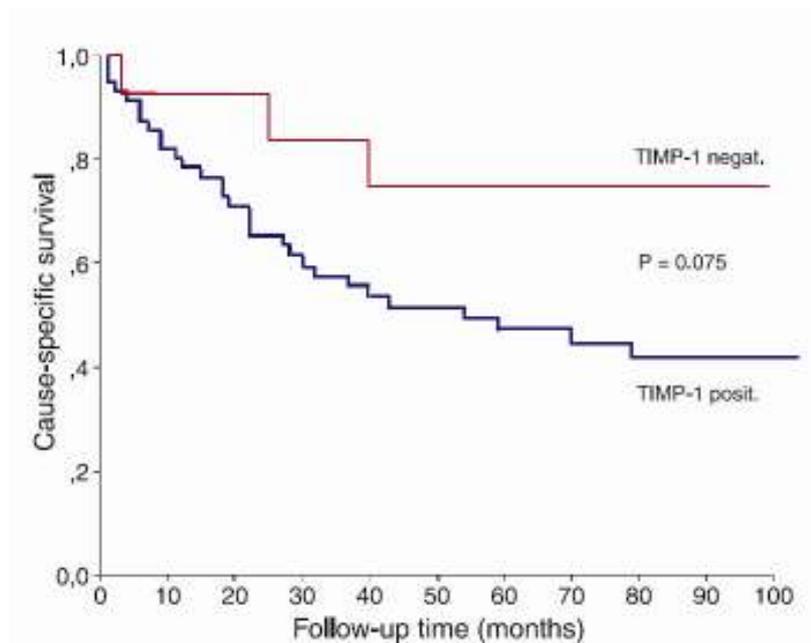


Figura 47⁴⁰: Efecto de la proteína inmunorreactiva TIMP-1 en la curva de supervivencia en carcinomas de cabeza y cuello. Casos negativos (-), n=13; positividad débil (+), n=15; positividad moderada (++), n=16; positividad extensa y fuerte (+++), n=24.

En otro estudio desarrollado por Ruokolainen y cols³⁹ en el que se evaluaron 74 pacientes con carcinomas de cabeza y cuello tratados mayoritariamente con cirugía, tanto la expresión de MMP-2 como de TIMP-2 se correlacionaron con la aparición de metástasis a nivel cervical y a distancia y con la supervivencia ajustada. La Figura 48 muestra las curvas de supervivencia correspondientes a los pacientes incluidos en el estudio en función de los niveles de expresión de ambas proteínas.

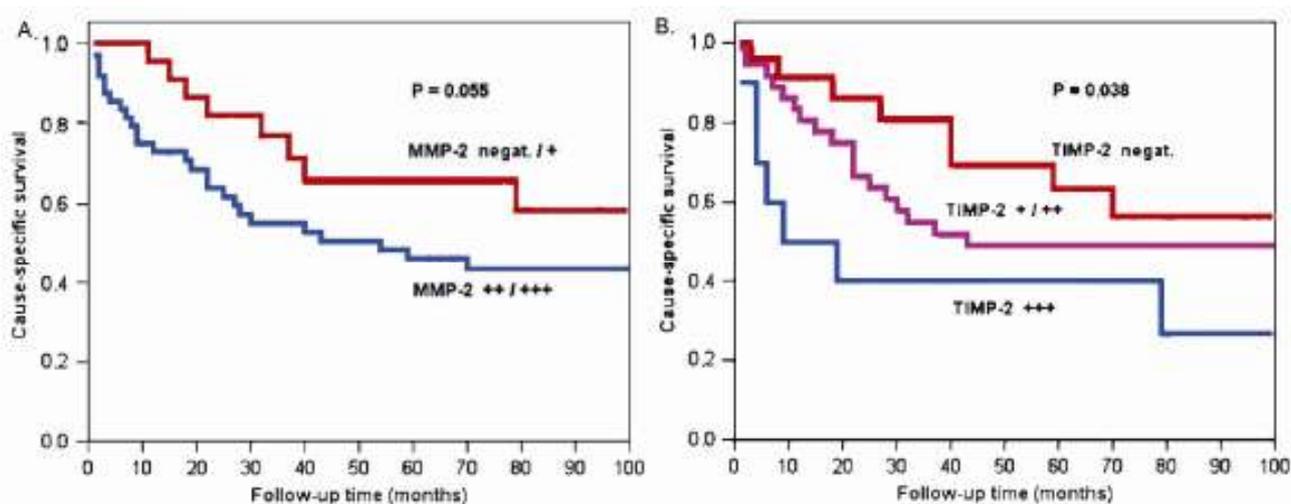


Figura 48³⁹: Análisis de supervivencia de pacientes con carcinoma de cabeza y cuello en función de la expresión de MMP-2 (A) y TIMP-2(B) en el tejido tumoral.

Finalmente, el mismo grupo de autores³⁸ desarrollaron un estudio en que evaluaban la relación entre la expresión de MMP-9 y el resultado oncológico en un grupo de 74 pacientes con carcinomas de cabeza y cuello tratados de forma preferente con cirugía ± radioterapia (82.4%). Un 82% de los pacientes mostraron diferentes grados de positividad frente a la MMP-9 en el estudio inmunohistoquímico. No se encontró relación significativa entre la positividad frente a la MMP-9 y la extensión local o regional de la enfermedad, el grado histológico del tumor, o su localización. Existieron diferencias significativas en

la supervivencia ajustada en función del status de expresión de la MMP-9, tal como se muestra en la Figura 49 (P=0.013).

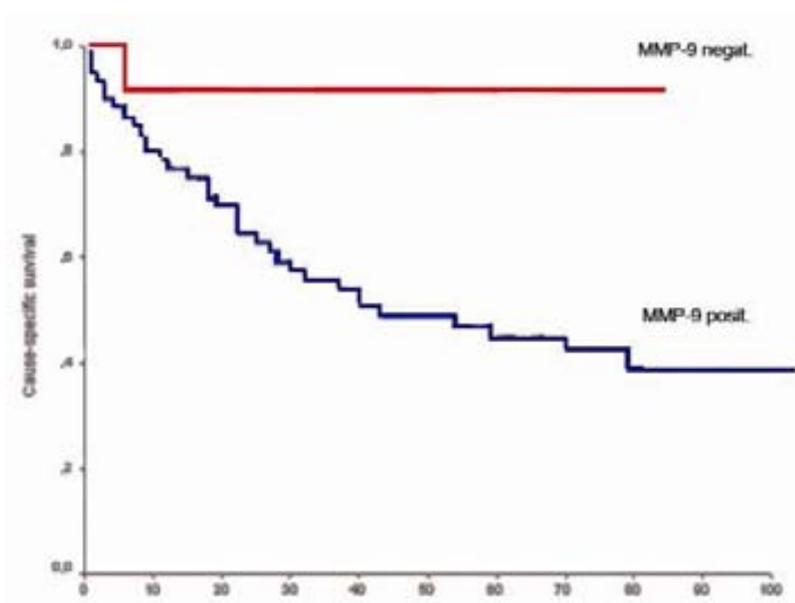


Figura 49³⁸: Efecto de la expresión de la MMP-9 sobre la supervivencia.

La supervivencia ajustada a los 5 años para los pacientes MMP-9 negativos fue del 92%, descendiendo al 45% para los pacientes MMP-9 positivos. En los pacientes positivos, la supervivencia disminuyó conforme aumentaba el grado de intensidad de la expresión de la MMP-9. Para los pacientes con positividad intensa la supervivencia a los 5 años fue del 36%, para los pacientes con positividad moderada fue del 50%, y para los de positividad leve del 57%. De acuerdo con los resultados de un estudio multivariante, el estadiaje de la enfermedad apareció como el factor pronóstico más relevante, si bien la positividad frente a la MMP-9 mantuvo su capacidad pronóstica.

Otros autores que encontraron una relación significativa entre la expresión de la MMP-2 y la supervivencia, fueron Liu y cols⁵⁵, que evaluaron mediante inmunohistoquímica la actividad MMP-2 y MMP-9 en una cohorte de 72 pacientes con carcinomas de la laringe tratados de forma quirúrgica. De

acuerdo con sus resultados, existió una diferencia significativa en la supervivencia ajustada de los pacientes en función de la positividad para la MMP-2, con unos valores de supervivencia actuarial a los 5 años para los pacientes MMP-2 negativos (n=36) del 72.2% y para los pacientes MMP-2 positivos (n=36) del 38.9% (P=0.0031). En el caso de la MMP-9, se produjo una tendencia hacia el mejor pronóstico para los pacientes MMP-9 negativos (n=19), que contaron con una supervivencia ajustada a los 5 años del 73.7%, frente al 49.1% correspondiente a los pacientes MMP-9 positivos (n=53) (P=0.078). La Figura 50 muestra las curvas de supervivencia ajustada en función de la positividad de las MMPs estudiadas.

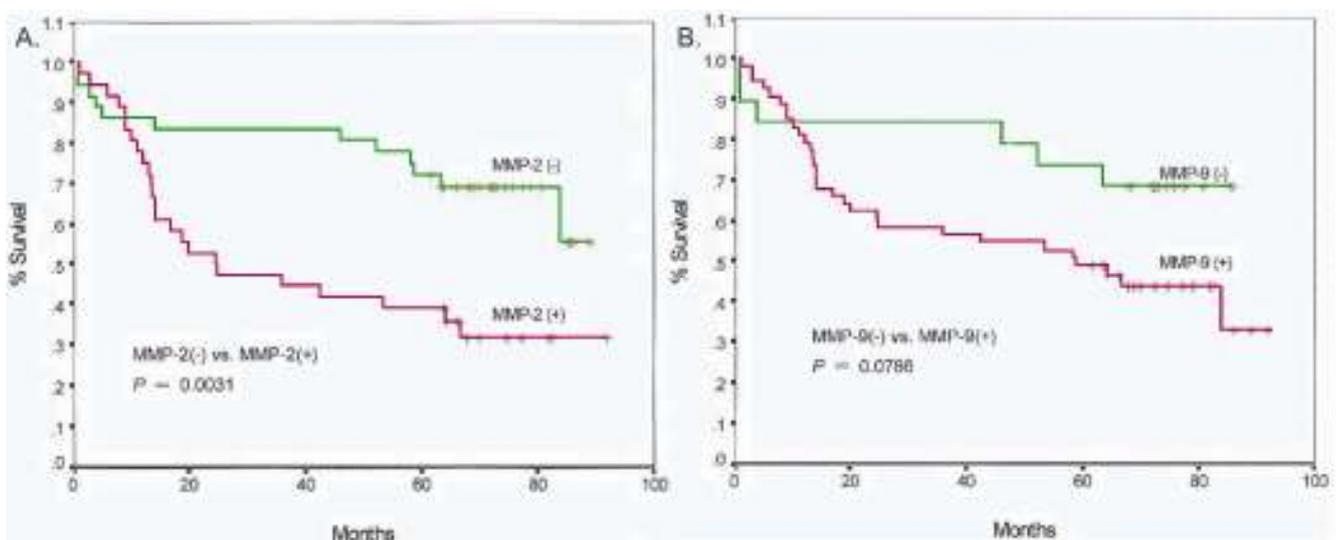


Figura 50⁵⁵: Supervivencia ajustada en pacientes con o sin expresión de MMP-2 (A) y MMP-9 (B).

Zhang y cols⁴⁴ comunicaron que la supervivencia ajustada en un grupo de 85 pacientes con carcinomas de la supraglotis tratados quirúrgicamente se relacionó de forma significativa con el nivel de la MMP-14. Por el contrario, en el mismo estudio, no apareció una relación entre el resultado oncológico y los niveles de expresión de las MMPs -15 y -16. La Figura 51 muestra las curvas de supervivencia en función de los niveles de expresión de la MMP-14.

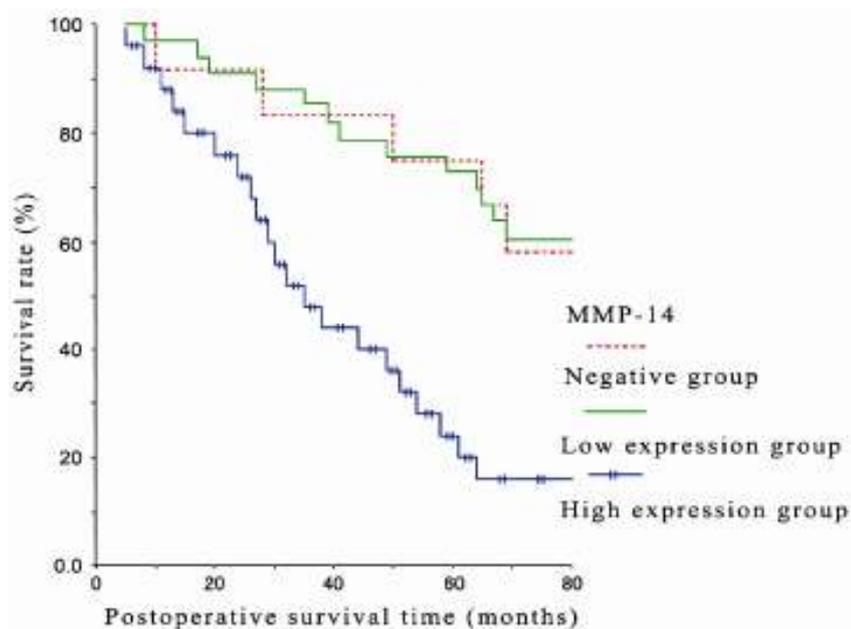


Figura 51⁴⁴: Curva de supervivencia del carcinoma de supraglotis en función de la expresión de MMP-14. El grupo con expresión elevada MMP-14 tiene un rango de supervivencia disminuida en relación al grupo con MMP-14 negativa ($P < 0.05$). La diferencia en el rango de supervivencia entre el grupo con expresión baja de MMP-14 y el grupo con MMP-14 negativa no fue significativa ($P > 0.05$).

Luukkaa y cols⁴⁵ encontraron significativa la relación entre la positividad a la MMP-13 y la supervivencia ajustada en 60 pacientes con carcinomas de cabeza y cuello tratados con intención radical preferentemente con cirugía. Los autores clasificaron a los pacientes de acuerdo con el grado de positividad a la MMP-13, de manera que consideraron un grupo de mal pronóstico, formado por los pacientes con positividad en más del 90% de las células tumorales ($n=7$), y el resto de pacientes sin expresión de la proteína o menos del 90% de

células positivas (n=53). La Figura 52 muestra las curvas de supervivencia ajustada en función del grado de positividad frente a la MMP-13.

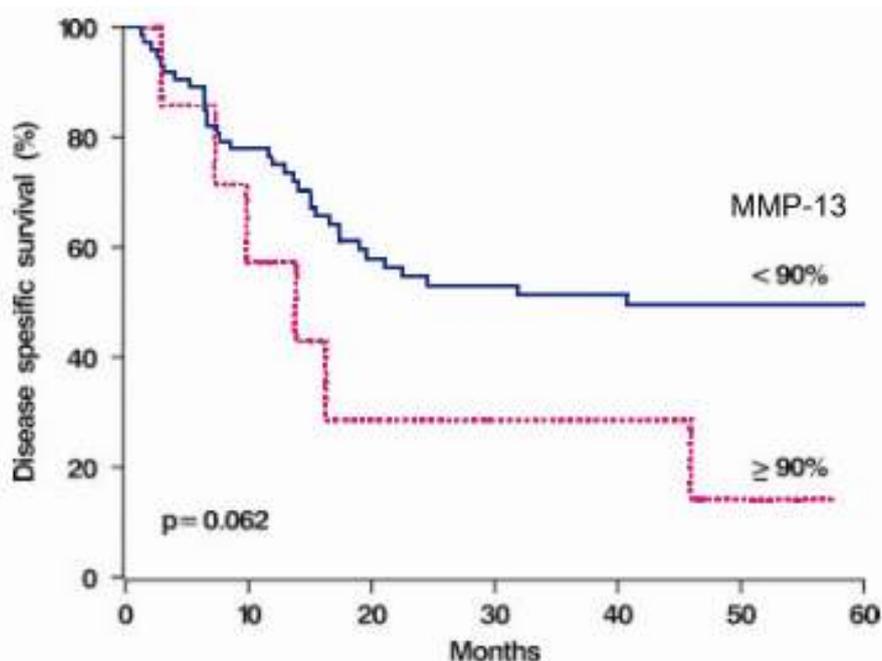


Figura 52⁴⁵: Curva de supervivencia de pacientes con carcinomas escamosos primarios de cabeza y cuello con < 90% de positividad de MMP-13 en células tumorales, y ≥ 90% MMP-13.

Sin embargo, no todos los autores han encontrado que la expresión de MMPs se relacionaba de forma significativa con el pronóstico de la enfermedad. En una serie de estudios en los que se analizaron la MMP-2, MMP-7, MMP-9 y MMP-14 en pacientes con carcinomas de cavidad oral tratados quirúrgicamente, de Vicente y cols^{41,42} no encontraron relación significativa entre la expresión de ninguna de las MMPs estudiadas y la supervivencia de los pacientes. Igualmente, Kosunen y cols⁴³ no encontraron relación entre la expresión inmunohistoquímica de MMP-9 y la supervivencia en 124 pacientes con carcinomas de cavidad oral tratados mayoritariamente (84%) con cirugía. Por su parte, en un estudio desarrollado en 60 pacientes con carcinomas de cavidad oral tratados quirúrgicamente, Patel y cols¹⁵ no encontraron diferencias

significativas en la supervivencia en función del porcentaje de activación de las MMP-2 y la MMP-9.

Además, no en todas las ocasiones la sobreexpresión de las MMPs se ha asociado a un peor pronóstico de la enfermedad. Saussez y cols⁴⁶ realizaron un estudio en 73 pacientes con carcinoma de hipofaringe y 45 con carcinoma de laringe tratados quirúrgicamente, llevando a cabo una determinación de la expresión de la MMP-9, analizando el porcentaje de tejido positivo y la intensidad de la tinción mediante técnicas de morfometría. De acuerdo con sus resultados, existieron diferencias significativas en la supervivencia a favor de los pacientes con una mayor expresión de MMP-9, tal como muestran las siguientes curvas, en que se valoró la supervivencia de los pacientes en función del porcentaje de tejido positivo (labelling index, LI).

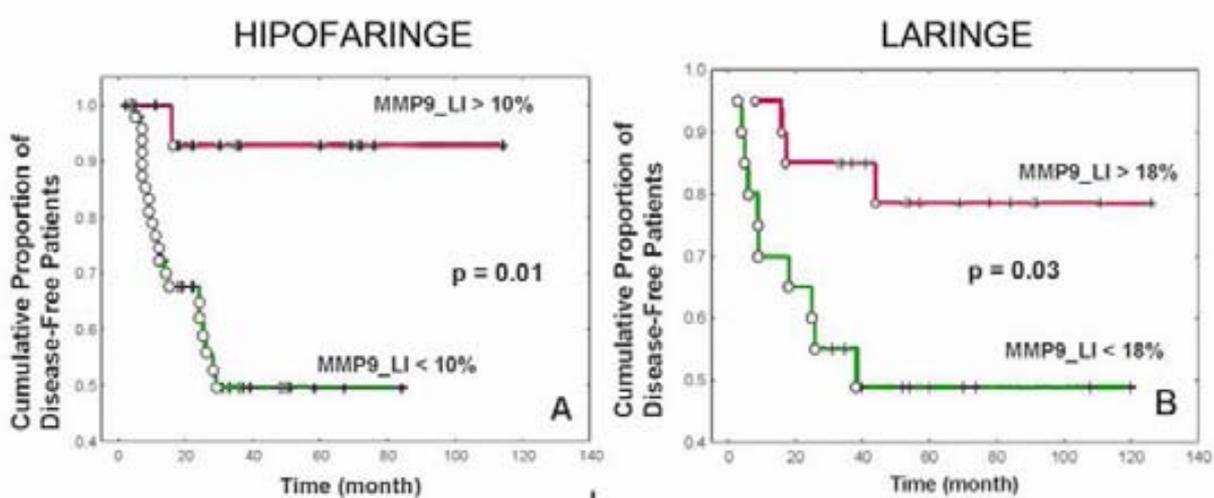


Figura 53⁴⁶: Curvas de supervivencia en carcinomas de hipofaringe (A) y laringe (B) para los dos grupos de pacientes identificados en base al porcentaje de tejido positivo (LI), y su umbral en cada panel. Pacientes con enfermedad y vivos están representados por círculos y cruces respectivamente. Los valores de P se obtuvieron con el test de Wilcoxon.

Korpi y cols⁷⁸ realizaron un estudio inmunohistoquímico analizando un total de 90 pacientes con carcinomas de lengua tratados quirúrgicamente, en el que se analizó la expresión del tumor en relación a las MMPs -2, -7, -8, -9 y -28. La

única MMP que se relación con el resultado obtenido con el tratamiento fue la MMP-8. Los pacientes con bajos niveles de expresión de la MMP-8 contaron con un peor pronóstico que los pacientes con niveles de expresión alto, tal como aparece en la Figura 54.

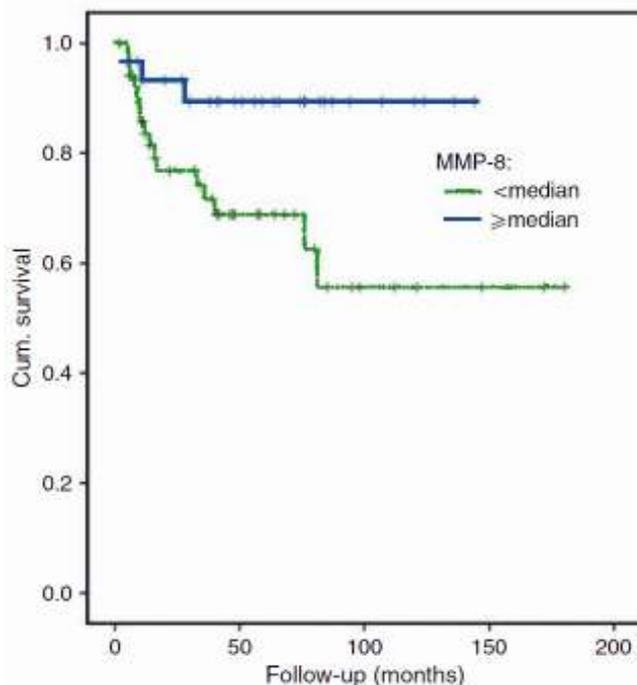


Figura 54⁷⁸: La expresión de MMP-8 en células tumorales se correlaciona con una mejoría de la supervivencia en carcinoma de lengua.

De acuerdo con los resultados de un estudio multivariante, los pacientes con tumores con expresión baja de la MMP-8 contaron con un riesgo 3.70 veces superior de fallecer como consecuencia de la evolución del tumor (IC 95%: 1.04-12.5).

En este estudio Korpi y cols⁷⁸ encontraron que las mujeres contaron con una tendencia a mostrar valores más elevados de MMP-8 y una mayor supervivencia que los hombres. A partir de un abordaje experimental, los autores encontraron que la expresión de la MMP-8 pareció contar con un efecto diferenciado en función del sexo. Estudiaron la inducción de carcinomas en

cavidad oral a partir de la aplicación tópica de una sustancia carcinogénica en ratones manipulados genéticamente que no expresaban MMP-8. En comparación con ratones normales, las hembras de ratones “knockout” contaron con un incremento en la incidencia de carcinomas del 67%, en tanto que el incremento en incidencia para los ratones machos se limitó al 20%. De acuerdo con los autores, la MMP-8 podría contar con una actividad protectora en el caso de los carcinomas de cavidad oral, con un mecanismo de acción que podría encontrarse relacionado con la expresión estrogénica.

12.- PAPEL DE LAS MMPs COMO FACTOR PREDICTOR DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO.

Se han desarrollado estudios que intentan evaluar el papel predictor de la expresión de las MMPs frente a la utilización de determinados tratamientos en los pacientes con carcinomas de cabeza y cuello.

En un intento de identificar marcadores biológicos de respuesta a la quimioterapia de inducción, Blons y cols⁷⁹ llevaron a cabo un estudio en 148 pacientes con carcinomas avanzados de cabeza y cuello que recibieron tratamiento con 3 ciclos de quimioterapia de inducción (CDDP-5 FU). Sobre la base que la MMP-3 estaría implicada en la vía del FasL, a su vez implicada en la resistencia a genotóxicos, los autores evaluaron la relación entre determinados polimorfismos de las MMPs y la respuesta. Se encontró una correlación significativa entre genotipos de la MMP3 y la respuesta a la quimioterapia. Así, los pacientes con genotipo 6A/6A contaron con un mayor nivel de respuesta (86%) que los pacientes 5A/6A (65%), o que los pacientes 5A/5A (55%) ($P=0.04$).

En un estudio in vitro realizado con líneas celulares de carcinomas de cabeza y cuello en que se realizó una comparación de los perfiles de expresión utilizando matrices (arrays) entre una línea sensible y dos líneas resistentes a la acción del cisplatino, Ansell y cols⁸⁰ definieron la presencia de 20 genes reguladores que se encontraban expresados de forma diferencial en las líneas celulares en función de la sensibilidad al citostático. Entre los genes reguladores se encontraron los que codifican MMP-7, MMP-13 y TIMP-3. A continuación, los autores llevaron a cabo un estudio en que evaluaron la relación entre la resistencia al cisplatino y la expresión de MMP-7 y MMP-13 en 25 líneas

celulares de carcinoma de cabeza y cuello. Se clasificaron las líneas celulares en función de que tuvieran un nivel de expresión de las MMPs alto o bajo. Tal como muestra la siguiente figura, existió una relación entre el grado de resistencia al platino (ICS) y la expresión de MMPs. Las líneas celulares con niveles de expresión elevadas de MMP-7 y MMP-13 contaron con unos índices de resistencia al platino significativamente superiores a las correspondientes a líneas celulares con niveles de expresión de MMPs bajos ($P=0.0013$ y $P=0.058$ respectivamente).

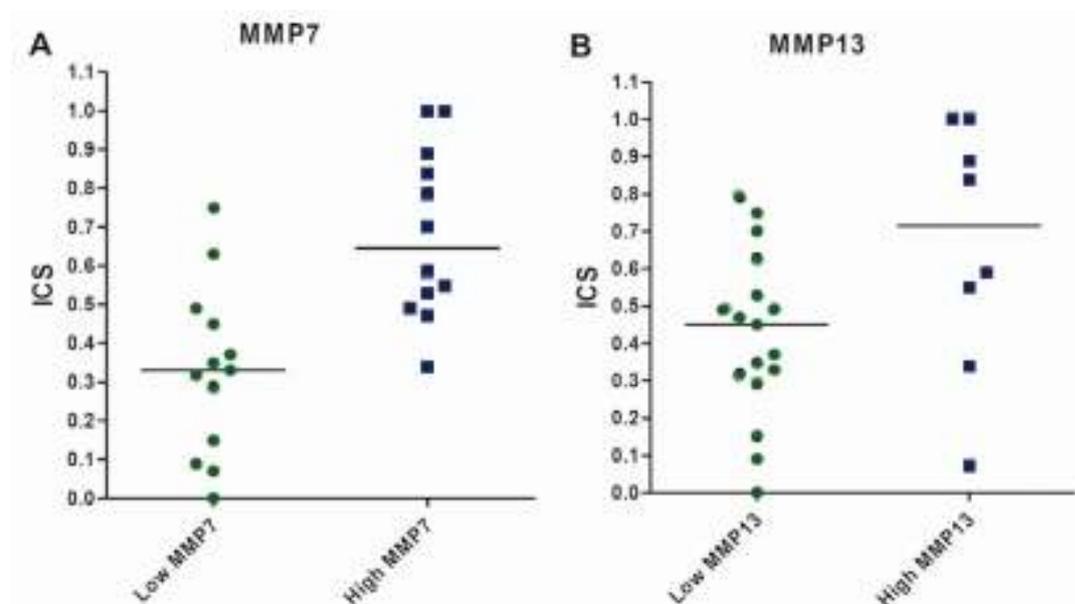


Figura 55⁸⁰: Impacto de la MMP-7 y MMP-13 como factor predictor de resistencia a Cisplatino. El posible uso de MMP-7 y MMP-13 como marcador predictor de la sensibilidad intrínseca (ICS) fue evaluada en 25 líneas celulares de CECC usando RT-PCR. Las líneas celulares se dividieron en dos grupos: baja y alta expresión de ARNm. (A) La expresión elevada de MMP-7 está asociada a una resistencia a Cisplatino significativa ($P=0.0013$). (B) La expresión de MMP-13 muestra una tendencia a influir en la ICS ($P=0.058$). Análisis de significación realizó con el test U Mann-Whitney. Significación estadística, $P < 0.05$.

13.- PAPEL DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE LAS MMPs.

Además de estudiar la expresión a nivel tisular, diversos autores han llevado a cabo determinaciones de los niveles de MMPs e TIMPs a nivel plasmático, evaluando su capacidad pronóstica.

Ranuncolo y cols⁸¹ fueron los primeros en evaluar la actividad a nivel plasmático de las MMPs. A partir de un estudio de zimografía en gelatina, demostraron que los pacientes con carcinomas de laringe y orofaringe contaban con una actividad gelatinasa asociada a la MMP-9 a nivel plasmático que doblaba a la correspondiente a sujetos control, con diferencias significativas entre ambos grupos ($P < 0.01$). No apareció relación entre dicha actividad plasmática y parámetros clínico-patológicos dependientes del tumor.

Ruokolainen y cols⁸², por su parte, analizaron los niveles séricos de MMP-9 en 67 pacientes con carcinomas de cabeza y cuello. No encontraron relación entre la MMP-9 sérica y el estadiaje de la enfermedad ni la localización anatómica del tumor, en tanto que sí que existió una correlación significativa entre dichos niveles séricos y el grado de expresión de la proteína a nivel del tumor medida en base a la inmunorreactividad ($P = 0.028$). Los autores encontraron una correlación significativa entre los niveles plasmáticos de MMP-9 y la supervivencia ajustada. La supervivencia ajustada a los 5 años correspondiente a los pacientes con unos niveles bajos de MMP-9 plasmática ($n = 22$) fue del 69%, en tanto que la correspondiente a los pacientes con unos niveles altos ($n = 45$) descendió al 40% ($P = 0.027$).

La Figura 56 muestra las curvas de supervivencia en función de los niveles plasmáticos de MMP-9 para los pacientes incluidos en el estudio.

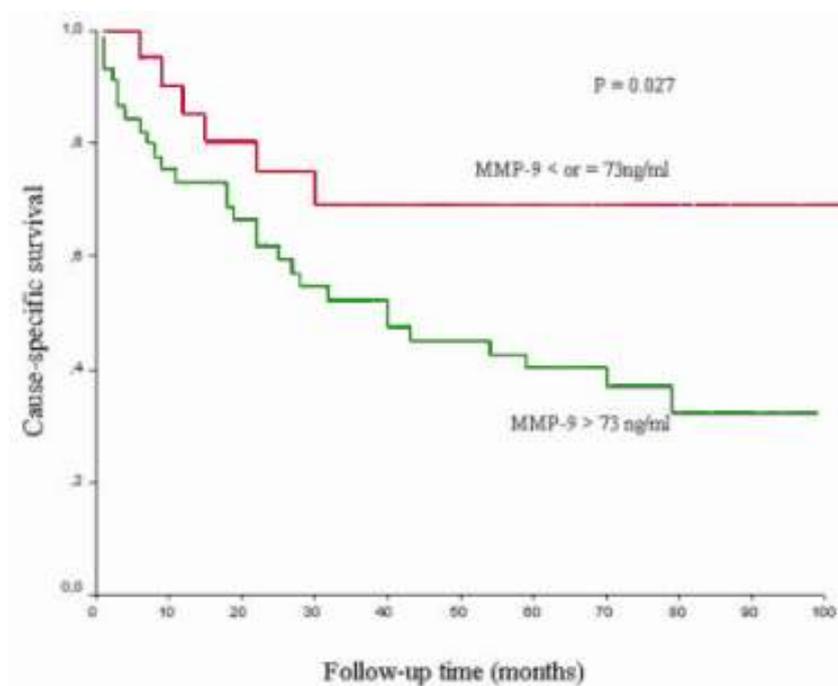


Figura 56⁸²: Curva supervivencia en función de los niveles plasmáticos de MMP-9.

De acuerdo con los resultados de un estudio multivariante, la variable pronóstica que se relacionó de forma más intensa con la supervivencia fue el estadiaje de la enfermedad. El nivel de actividad plasmática de la MMP-9 mantuvo relación con el pronóstico, pero sin alcanzar una significación estadística. Los pacientes con unos niveles altos de actividad MMP-9 contaron con un riesgo de fallecimiento como consecuencia de la evolución del tumor 2.0 veces superior que los pacientes con niveles bajos de actividad ($P=0.15$).

Con posterioridad, el mismo grupo de autores⁴⁰ llevó a cabo un estudio para determinar el papel pronóstico jugado por los niveles plasmáticos en este caso de la TIMP-1, donde se pudo evidenciar de nuevo una relación entre los niveles

plasmáticos de TIMP-1 y su representación tisular a nivel del tumor ($P=0.13$), y la supervivencia ajustada, tal como se muestra en la Figura 57.

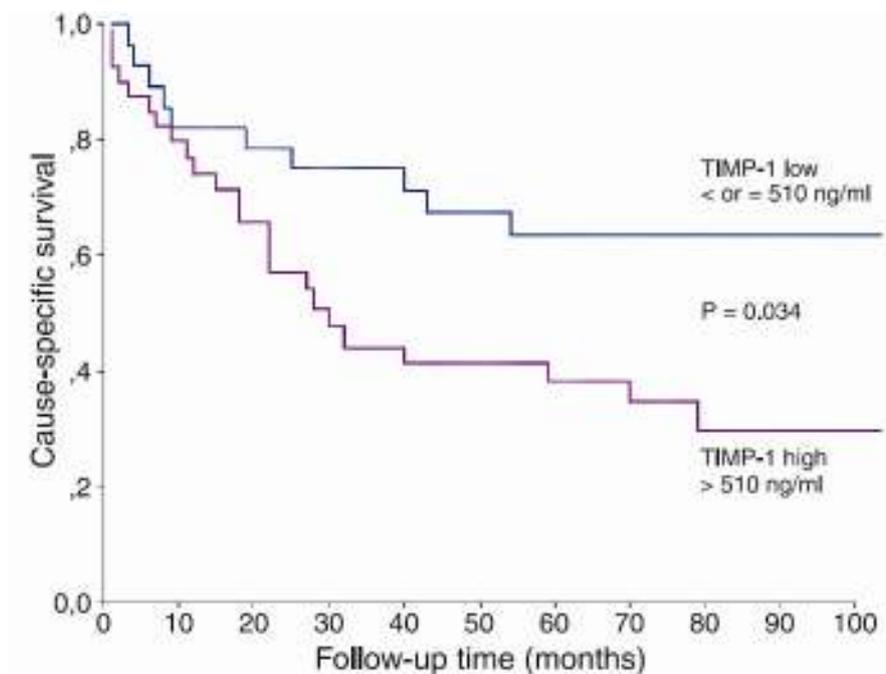


Figura 57⁴⁰: Efecto de la proteína inmunorreactiva TIMP-1 en la supervivencia en CECC. Bajo (low), n=28. Alto (high), n=40.

Finalmente, Ruokolainen y cols³⁹ efectuaron un estudio similar para analizar el papel jugado por la MMP-2 y TIMP-2 plasmáticas. En esta ocasión no se encontró relación entre los niveles de expresión tisular a nivel tumoral y la actividad plasmática de ambas proteínas, ni entre los niveles plasmáticos y la supervivencia.

Otros autores han analizado la capacidad pronóstica de los niveles circulantes de MMP-9. El Houda Agueznay y cols⁸³, evaluaron 84 pacientes con carcinomas de cabeza y cuello tratados con cirugía sola o combinada con radioterapia, y pudieron observar cómo los niveles séricos de la MMP-9 se asociaban con la supervivencia. Los pacientes con unos niveles séricos bajos contaron con una supervivencia global a los 2 años del 73.7%, en tanto que para los pacientes con unos niveles altos fue del 40% ($P=0.036$). De acuerdo con un análisis multivariante, los pacientes con niveles altos de MMP-9 tuvieron un riesgo 2.2 veces superior de fallecimiento (IC 95%: 0.81-6.01). La Figura 58 muestra las curvas de supervivencia correspondientes a este grupo de pacientes.

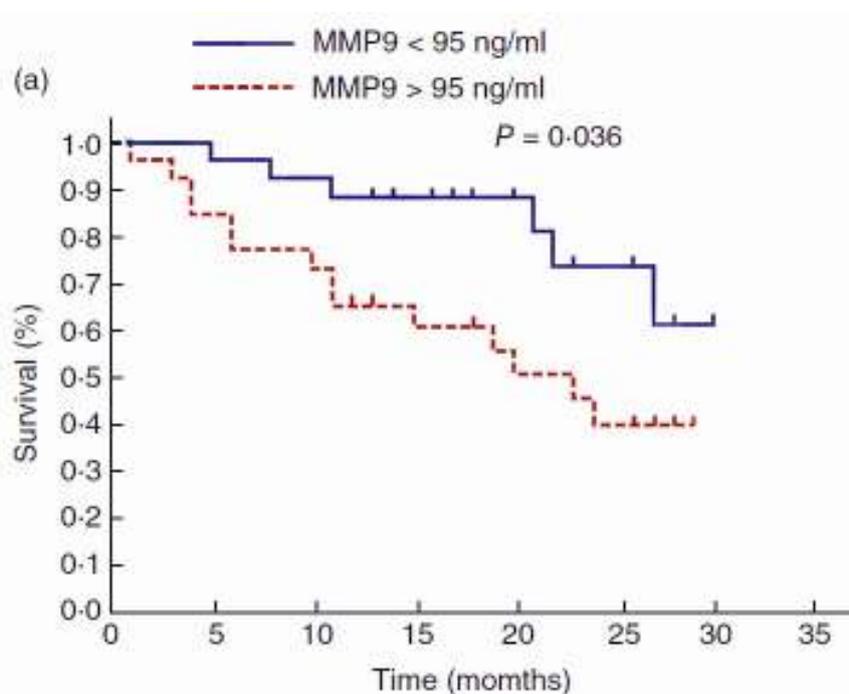


Figura 58⁸³: Supervivencia de pacientes con CECC en función de los niveles plasmáticos de MMP-9.

De nuevo, Liu y cols⁸⁴ evaluaron el papel pronóstico de la MMP-9 sérica en los carcinomas de cabeza y cuello. En este caso se estudiaron 161 pacientes con carcinomas escamosos de cabeza y cuello sometidos a tratamiento, llevándose a cabo determinaciones de la actividad sérica de la MMP-9 y el VEGF. Los autores encontraron una correlación entre la actividad plasmática de MMP-9 y el estadiaje de la enfermedad, con unos niveles séricos superiores para los pacientes N+ (Figura 59).

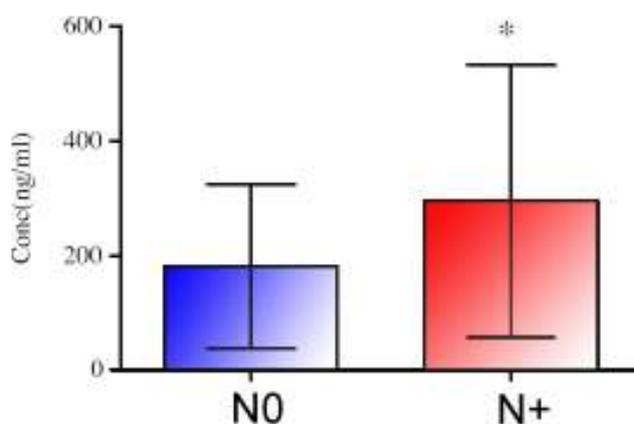


Figura 59⁸⁴: Metastasis ganglionar y niveles de MMP-9 plasmática pretratamiento. Los niveles plasmáticos de MMP-9 en pacientes con metastasis ganglionar(N+) fueron significativamente superiores en comparación con los pacientes sin afectación ganglionar (N0).

Existieron diferencias en la supervivencia en función de los niveles plasmáticos de la MMP-9, contando los pacientes con unos niveles plasmáticos bajos (n=97) con una supervivencia significativamente superior a la correspondiente a los pacientes con niveles altos (n=64) (P=0.006).

Los niveles plasmáticos de MMP-9 aparecieron como un factor pronóstico significativo en el análisis multivariante ($P=0.031$) (Figura 60).

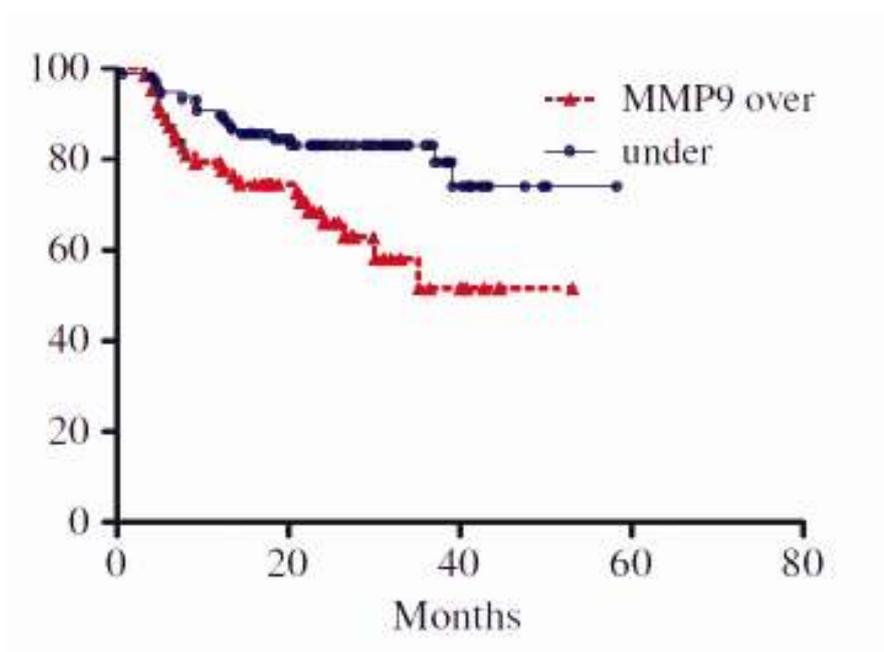


Figura 60⁸⁴: Curvas de supervivencia en función de los niveles preoperatorios de MMP-9 plasmática.

Además, en un grupo de 40 pacientes tratados quirúrgicamente en los que se obtuvo una muestra sérica seis semanas después de la cirugía, se comprobó una reducción significativa de los niveles plasmáticos de MMP-9 en relación a los valores previos al tratamiento (Figura 61).

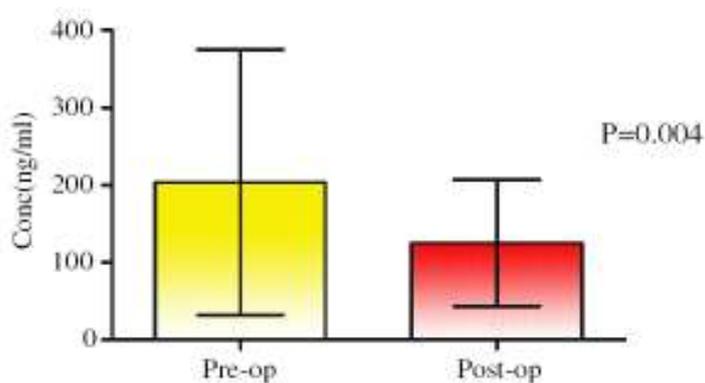


Figura 61⁸⁴: Cambios a nivel plasmático de MMP-9 en el postoperatorio.

Existió un alto grado de correlación entre los niveles plasmáticos de MMP-9 y VEGF, tal como se evidencia en la Figura 62($P < 0.0001$).

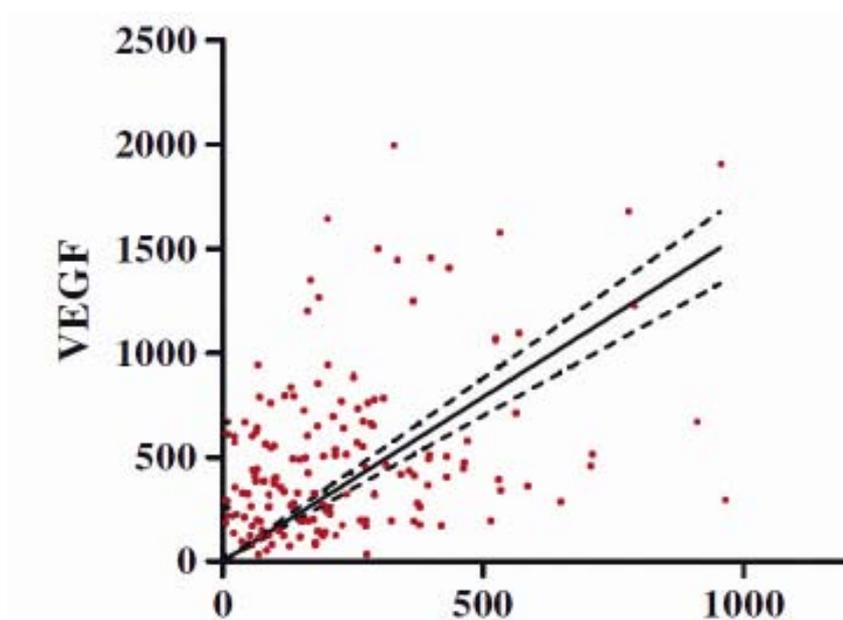


Figura 62⁸⁴: Correlación preoperatorio entre los niveles plasmáticos de MMP-9 y VEGF.

Finalmente, Pradhan-Palikhe y cols⁸⁵ estudiaron la relación de la MMP-8 y el TIMP-1 circulantes como factor pronóstico en 136 pacientes con carcinomas de cabeza y cuello. Si bien los niveles plasmáticos de MMP-8 no se asociaron a la supervivencia, sí que aparecieron diferencias significativas en función de los niveles de TIMP-1, tal como muestra la Figura 63.

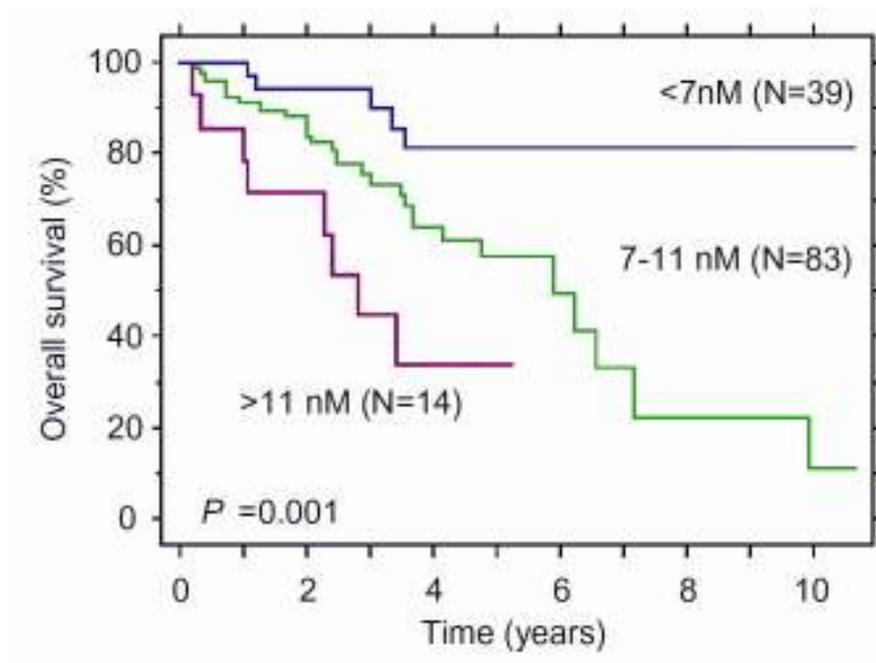


Figura 63⁸⁵: Curva de supervivencia de 136 CECC en función de la concentración plasmática de TIMP-1. Los pacientes se agruparon en 3 grupos en función de la concentración plasmática: < 7nM (N=39), 7-11 nM (n=83), y >11 nM (n=14). Significación, $P < 0.001$.

14.- PAPEL DE LOS POLIMORFISMOS DE LAS MMPs EN LA SUSCEPTIBILIDAD AL DESARROLLO DE LOS CARCINOMAS DE CABEZA Y CUELLO.

Existen evidencias alcanzadas a través de estudios epidemiológicos y moleculares de acuerdo con las cuales determinados polimorfismos genéticos de las MMPs podrían contribuir al riesgo de aparición y a la progresión de diversos modelos tumorales, como los carcinomas de pulmón⁸⁶, esófago⁸⁷, colon⁸⁸ o mama^{89,90}.

O-charoenrat y Khantapura⁹⁰ fueron los primeros autores en describir que la presencia de un polimorfismo de un nucleótido en el fragmento promotor de la MMP-2 (-1306 C→T) y el TIMP-2 (-418 G→C) con capacidad de disminuir la expresión de los genes, se relacionaban con el riesgo de aparición de los carcinomas de cabeza y cuello, pudiendo contar además con significado pronóstico. Los autores evaluaron un total de 239 pacientes con carcinomas de cabeza y cuello, comparándolos con un total de 250 controles apareados en una población tailandesa, así como un panel de 17 líneas celulares. El genotipo MMP-2 CC se asoció con un incremento significativo en el riesgo de aparición de carcinomas de cabeza y cuello (OR 1.97, IC 95%: 1.23-3.15) en comparación con la variante CT o TT. Por su parte, el alelo variante de TIMP-2 GC o CC se asoció con un incremento moderado del riesgo en relación al alelo común GG (OR 1.43, IC 95%: 0.98-2.08). El polimorfismo en ambos genes mostró un cierto efecto aditivo, con el mayor riesgo de carcinoma de cabeza y cuello correspondiendo a los pacientes MMP-2 CC /TIMP-2 GC o CC (OR 2.34, IC 95%: 1.31-4.18).

En el estudio desarrollado en las líneas celulares, se evidenció la existencia de una correlación entre el polimorfismo en la región promotora del gen MMP-2 y los niveles de expresión del ARNm. Se observó que 14 líneas celulares presentaron el genotipo MMP-2 CC (82%), 3 líneas presentaron el genotipo CT y ninguna expresó el genotipo TT. Los niveles de expresión de MMP-2 en células tumorales con genotipo CC, fue significativamente mayor que las con genotipo CT (Figura 64).

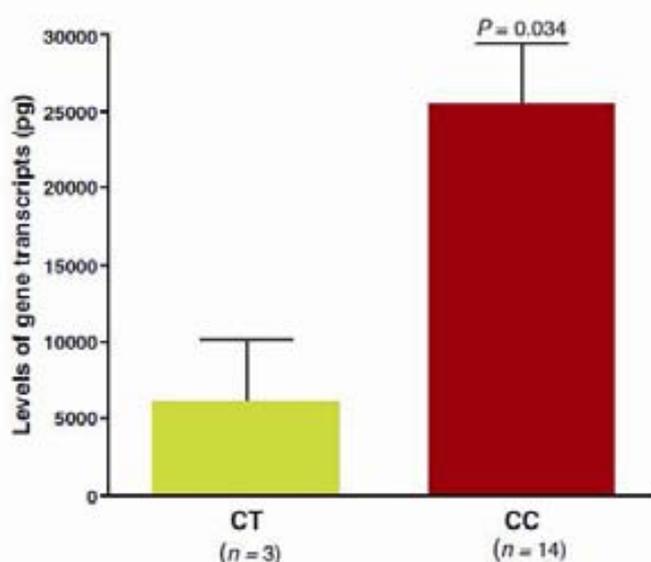


Figura 64^o: Expresión de ARNm de MMP-2 en líneas celulares con CECC con diferentes genotipos.

Existió una relación significativa entre la afectación ganglionar y el genotipo de la MMP-2. Para los pacientes MMP-2 CC (n=206) el porcentaje de pacientes N+ fue del 67.9%, en tanto que para los pacientes MMP-2 CT (n=33) fue tan sólo del 36.3% (P=0.0008). Existieron también diferencias significativas en relación a los estadios avanzados de la enfermedad, con un porcentaje de estadios III-IV en pacientes CC del 71,8% y CT del 45,4% (P=0.0043), y en la profundidad de infiltración tumor, con una infiltración superior a los 10 mm en un 64.5% de los CC y del 42.4% para los CT (P=0.020).

El mismo grupo de O-charoenrat y cols⁹¹ estudió también la susceptibilidad a la aparición de carcinomas de cabeza y cuello en relación a la existencia del polimorfismo de inserción de guanina (2G) en la región promotora del gen MMP-1, que resulta en un incremento en la actividad transcripcional. Se evaluaron 300 pacientes con carcinomas de cabeza y cuello y 300 controles apareados. Ajustando con otros factores de confusión, los sujetos homocigotos 2G/2G contaron con un mayor riesgo de sufrir un carcinoma de cabeza y cuello en comparación con otros genotipos (OR 2.28, IC 95%: 1.58-3.27). Se encontró una correlación entre los niveles de expresión del ARNm MMP-1 y los polimorfismos presentes en la región promotora del gen, tal como se muestra Figura 65.

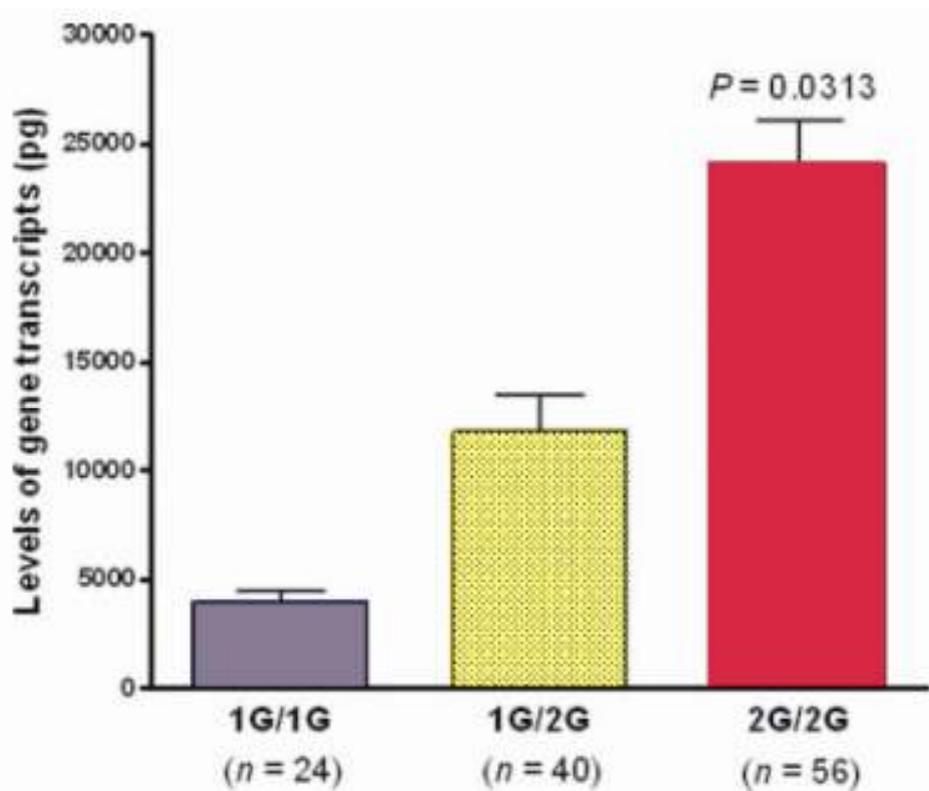


Figura 65⁹¹: Expresión de ARNm de MMP-1 en líneas celulares con CECC con diferentes genotipos.

Al igual que sucedió con el polimorfismo CC del gen MMP-2, existió una relación significativa entre el genotipo del gen MMP-1, la afectación regional y la profundidad de la infiltración. El porcentaje de pacientes N+ para los genotipos 1G/1G o 1G/2G (n=151) fue del 49.6%, en tanto que para los pacientes 2G/2G (n=149) fue del 71.1% (P=0.0002). Por otra parte, el porcentaje de pacientes con infiltración tumoral superior a los 10 mm para los pacientes 1G/1G o 1G/2G fue del 49.6%, y para los pacientes 2G/2G del 65.7% (P=0.0005). Un estudio in vitro desarrollado en líneas celulares mostró que aquellas líneas con genotipo 2G/2G contaban con un nivel de expresión del gen MMP-1 significativamente superior que el correspondiente a los otros genotipos.

Cao y Li¹¹ también estudiaron el polimorfismo 1G/2G en la región promotora del gen MMP-1 en un grupo de 96 pacientes con carcinomas de cavidad oral y 120 controles apareados en una población de etnia oriental, encontrando que la frecuencia del alelo 2G fue significativamente superior en el grupo de pacientes con carcinoma (OR 2.23, IC 95%: 1.47-3.37).

Con posterioridad a estos estudios iniciales, han sido diversos los autores que han estudiado la trascendencia de los polimorfismos en los genes que codifican MMPs y sus inhibidores específicos (TIMPs) en pacientes con carcinomas escamosos de cabeza y cuello [revisado por Chaudhary y cols⁹²].

Peng y cols han publicado recientemente un metaanálisis en el que evaluaban los resultados en relación con el riesgo de aparición de carcinoma obtenidos por todos los estudios de polimorfismos de las MMP-1 y -3⁹³, y las MMP-2 y -9⁹⁴. La Tabla 11 resume los resultados obtenidos en relación a los carcinomas de cabeza y cuello alcanzados en dichos metaanálisis.

La valoración conjunta de los estudios obtuvo como resultado que el polimorfismo MMP-1 1607 / 1G>2G supuso un incremento significativo en el riesgo de aparición de carcinomas de cabeza y cuello, en tanto que el polimorfismo MMP-2 1306 C>T condujo a una disminución en dicho riesgo. Los resultados obtenidos para los polimorfismos analizados en MMP-7 y MMP-9 no alcanzaron resultados estadísticamente significativos.

Tabla 11 : Resultados de los metaanálisis en relación al riesgo de aparición de carcinomas de cabeza y cuello en función de los polimorfismos en los genes responsables de la codificación de las MMPs^{93,94}.

Polimorfismo	nº estudios	caso/control	Modelo dominante OR (IC 95%)	Modelo recesivo OR (IC 95%)	Contraste alélico OR (IC 95%)
MMP-1 1607 / 1G>2G	11	1570/1925	1.61 (1.26-2.07)	1.49 (1.09-2.03)	1.43 (1.20-1.69)
MMP-2 1306 C>T	3	930/870	0.10 (0.01-0.78)	0.53 (0.41-0.69)	0.50 (0.35-0.70)
MMP-2 735 C>T	2	622/635	-	0.90 (0.43-1.87)	-
MMP-3 1171 5A>6A	5	816/1158	0.91 (0.63-1.30)	0.90 (0.65-1.24)	0.96 (0.75-1.23)
MMP-9 1562 C>T	5	781/1050	1.70 (0.63-4.60)	1.13 (0.91-1.41)	1.13(0.93-1.37)

15.- PAPEL DE LAS MMPs COMO DIANAS TERAPÉUTICAS.

Dado el papel que juegan las MMPs en la proliferación, angiogénesis, infiltración y capacidad de metastatización, se ha venido prestando atención al desarrollo de tratamientos que permitan antagonizar las funciones de esta familia de enzimas. Existen diferentes estrategias a partir de las cuales se podría conseguir una inhibición en la función de las MMPs (revisado por Overall y López-Otín⁹).

Por un lado existiría la posibilidad de bloquear la transcripción de los genes responsables de la síntesis de las MMPs. Este bloqueo transcripcional podría alcanzarse a tres niveles:

1.- Bloqueo de los factores extracelulares responsables de la activación de las vías de transcripción de las MMPs. Una inhibición de las citoquinas que promueven la transcripción de los genes responsables de las MMPs o de los dominios extracelulares de los receptores implicados, conseguiría una disminución en actividad de la vía de las MMPs. Si bien, dada la diversidad de agentes que median en la inducción de la vía de las MMPs, la consecución de este objetivo es compleja, existen moléculas como el interferón- γ que tiene la capacidad de inhibir la transcripción de varias MMPs⁹⁵.

2.- Una segunda estrategia consiste en bloquear la propia vía de transcripción, tal como sucede por ejemplo con una sustancia alcaloide, la halofuginona, que se ha comprobado que cuenta con la capacidad de bloquear la expresión de la MMP-2⁹⁶.

Por su parte, en un estudio in vitro realizado en líneas celulares de carcinoma de cavidad oral Tsai y cols³⁴ demostraron la posibilidad de disminuir la actividad gelatinolítica asociada a las MMP-2 y -9 por parte de inhibidores de la protein

quinasa C (H7 y ST), tal como muestra la Figura 66 correspondiente a los resultados obtenidos con la MMP-2.

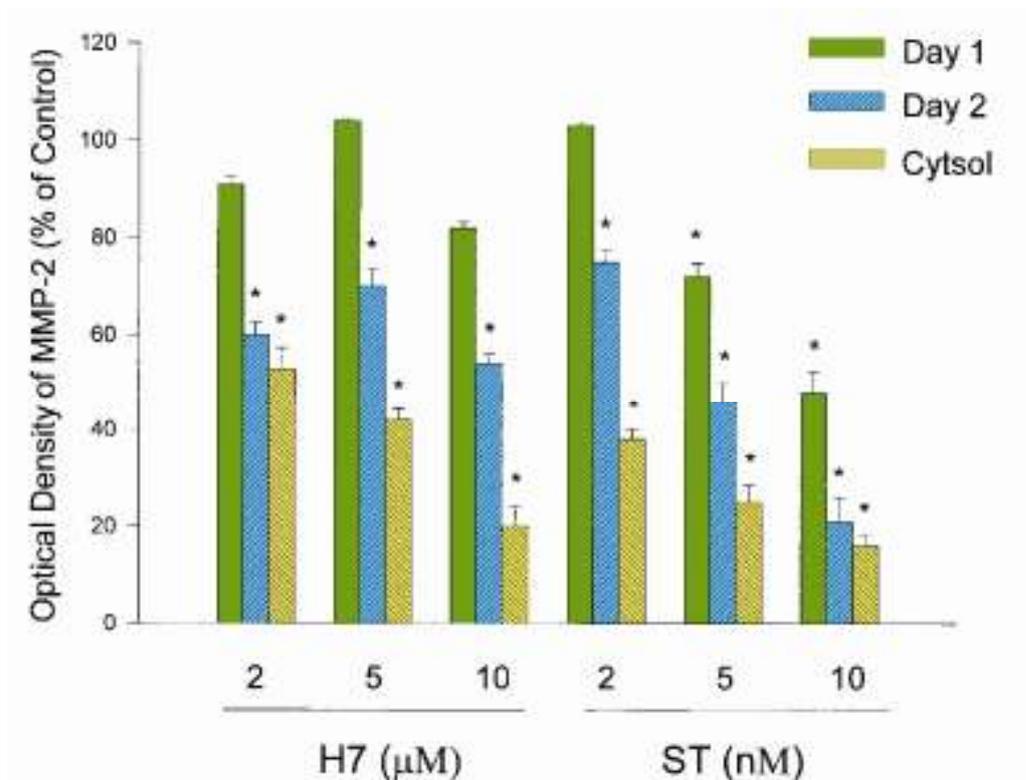


Figura 66³⁴: Cálculo a partir de la actividad gelatinolítica de los niveles de MMP-2 en un medio condicionado y en el citosol de queratinocitos de mucosa oral, tratados con H7 y Estaurosporina (ST). Los Días 1 y 2 (*Days 1 and 2*), representan la recogida del medio condicionado. El Citosol (*Cytosol*) representa el extracto de células recogido el día 2. *Los valores corresponden a medias y SD de la densidad óptica de experimentos independientes realizados tres veces. * Significación, P<.05.*

3.- Una tercera opción para bloquear la sobreexpresión de las MMPs en los tumores es actuar sobre los factores nucleares que regulan estos genes. Por ejemplo, existen sustancias que actúan sobre el NF-κB (nuclear factor kappa B) con lo que se bloquea la transcripción de las MMPs^{97,98}.

La Figura 67 esquematiza las vías de señal implicadas en la transcripción de las MMPs, así como las posibles estrategias a seguir para conseguir su inhibición.

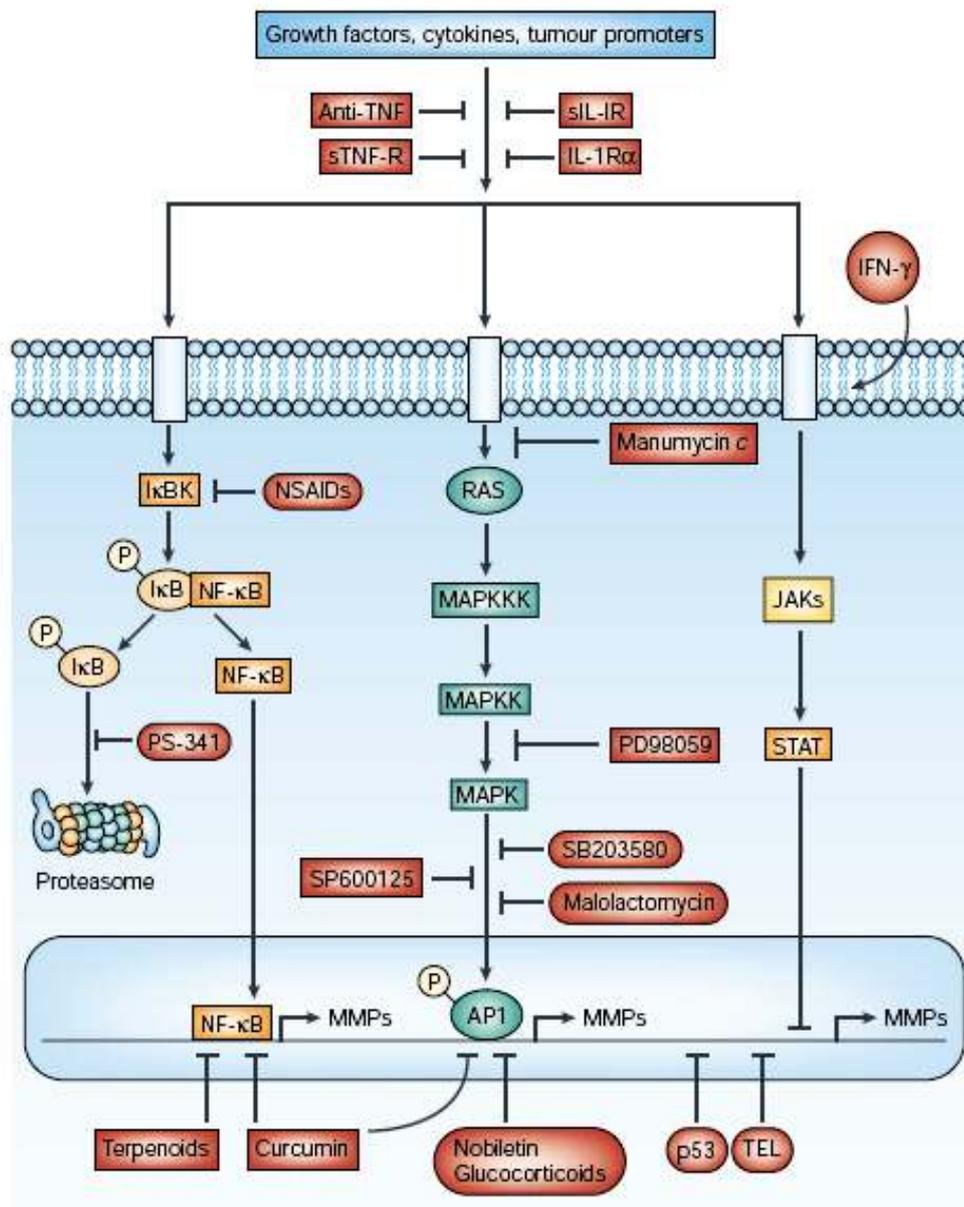


Figura 67: Vías de señalización e inhibición de la transcripción de MMPs.

Otro mecanismo por el cual se podría regular la actividad de las MMPs sería mediante el bloqueo de la activación de las proMMPs. Sustancias con capacidad de inhibir la plasmina, o inhibidores selectivos de la furina, la proteasa endógena responsable de la activación de la MMP-14, conseguirían una disminución de la actividad MMP a nivel del tumor a partir de la interferencia con los mecanismos de activación de las proMMPs.

Finalmente, existe la posibilidad de contrarrestar la actividad de las MMPs con el bloqueo directo de la actividad enzimática. Se han diseñado fármacos con la capacidad de inhibir la actividad metabólica de las MMPs. En general, este tipo de fármacos contienen ácido hidroxámico, una sustancia con capacidad quelante del zinc. Estas moléculas ocupan el lugar de interacción de la enzima con el sustrato impidiendo la actividad enzimática. Un ejemplo de este tipo de sustancias es el Marimastat, un inhibidor de la MMP-9 que en un modelo experimental de carcinoma de cabeza y cuello demostró actividad antitumoral directa y actuó como radiosensibilizador en un tratamiento con quimioradioterapia⁹⁹.

En relación con los carcinomas de cabeza y cuello, existen evidencias experimentales que señalan que la administración de sustancias con capacidad de inhibir la actividad MMP, contarían con efectividad en el tratamiento de los tumores. En estudio desarrollado en líneas celulares de carcinoma de cabeza y cuello, Katori y cols^{100,101} demostraron que la incubación de las células con MMI-166, una molécula con capacidad de inhibición selectiva de las MMP-2 y -9, disminuía de forma drástica los niveles de ambas MMPs en los cultivos, y en un modelo animal reducía la proliferación del tumor y la densidad vascular.

Por otra parte, se ha comprobado cómo la eficacia terapéutica obtenida de algunos fármacos dependía de su efecto sobre la actividad de las MMPs. Li y cols¹⁰¹ han descrito como la disminución en la capacidad de infiltración tumoral en un modelo experimental de carcinoma de lengua ejercido por el Celecoxib, un inhibidor COX-2 selectivo, se ejercía a partir de la inhibición en la función de la MMP-2.

II.-JUSTIFICACIÓN.

Existen muchas evidencias obtenidas tanto a nivel de expresión genética mediante PCR como a nivel de expresión de proteína conseguidas mayoritariamente a través de estudios de inmunohistoquímica de acuerdo con las cuales la actividad de las MMPs en el tejido tumoral se encuentra incrementada en referencia a la correspondiente al tejido sano en los pacientes con carcinomas de cabeza y cuello.

Igualmente, se han realizado gran cantidad de estudios intentando relacionar los niveles de expresión de las MMPs con acontecimientos clínicos trascendentes como la existencia de afectación ganglionar o el control de la enfermedad, sin que exista unanimidad en los resultados alcanzados.

La gran mayoría de los estudios realizados en los cuales se evalúa la capacidad pronóstica de las MMPs han valorado la actividad de las mismas a partir de técnicas de inmunohistoquímica, mayoritariamente en pacientes sometidos a un tratamiento quirúrgico.

No existen estudios que hayan evaluado la capacidad pronóstica de las MMPs a partir de su nivel de expresión genética mediante técnicas de PCR.

III.-HIPÓTESIS.

Los niveles de expresión genética de determinadas MMPs medidos mediante PCR, se correlacionan con variables con impacto clínico como puedan ser la afectación ganglionar o el control de la enfermedad en los pacientes con carcinomas de cabeza y cuello.

IV.-OBJETIVOS.

1.- Como objetivo global del presente estudio se pretende evaluar la existencia de relación entre los niveles de expresión de los genes responsables de la codificación de las metaloproteinasas (MMPs) medidos mediante PCR y el control de la enfermedad en los pacientes con carcinomas de cabeza y cuello.

Como objetivos concretos se plantean:

2.- Comparar los niveles de expresión de las MMPs en el tejido tumoral y los correspondientes a las mucosas normales.

3.- Evaluar la existencia de correlaciones en los niveles de expresión a nivel del tumor de las diferentes MMPs estudiadas.

4.- Valorar la capacidad pronóstica de los niveles de expresión de las diferentes MMPs en relación a la presencia de metástasis ganglionares.

5.- Valorar la existencia de relación entre los niveles de expresión correspondientes a las diferentes MMPs analizadas y variables como la localización del tumor primario, la extensión local de la enfermedad o el grado de diferenciación tumoral.

6.- Evaluar la capacidad pronóstica de los niveles de expresión de las MMPs analizadas en relación a la supervivencia ajustada de la enfermedad.

7.- Analizar la capacidad pronóstica de los niveles de expresión de las MMPs analizadas en relación al control local, regional y a distancia de la enfermedad.

8.- Valorar si la agrupación de los niveles de expresión de las MMPs en función de su categoría funcional mejora la capacidad pronóstica.

9.- Valorar si la relación entre los niveles de expresión de las MMPs estudiadas y sus inhibidores específicos (TIMP) mejoran la capacidad pronóstica.

10.- Evaluar si existe relación entre los niveles de expresión de las MMPs y el grado de respuesta conseguido en los pacientes que iniciaron la secuencia terapéutica con quimioterapia de inducción.

11.- Analizar la existencia de correlaciones entre los niveles de expresión de las MMPs y los correspondientes a genes relacionados con su actividad biológica.

**V.- MATERIAL Y
MÉTODOS.**

1.- CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO.

El presente estudio fue realizado a partir de material de biopsia obtenido de pacientes diagnosticados en el Hospital de Sant Pau de Barcelona que cumplieron los siguientes criterios de inclusión:

- contar con un carcinoma escamoso localizado a nivel de cavidad oral, orofaringe, hipofaringe o laringe diagnosticado en el periodo 2004-2008
- ausencia de antecedentes previos de lesiones tumorales a nivel de cabeza y cuello
- posibilidad de obtención de una muestra de biopsia del tumor, con confirmación histológica de que se trataba de un carcinoma escamoso, y de una muestra de mucosa sana obtenida de una localización alejada a la correspondiente al tumor primario
- haber seguido tratamiento con intención radical y contar con un seguimiento mínimo de 12 meses

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

Los datos correspondientes a las características epidemiológicas, de tratamiento y seguimiento de los pacientes se extrajeron de forma retrospectiva de una base de datos que, de forma prospectiva, recoge la información relevante de todos los pacientes con tumores malignos de cabeza y cuello diagnosticados y tratados en el Hospital de Sant Pau de Barcelona desde 1985¹⁰².

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

Se trataba de 68 paciente varones (89.5%) y 8 mujeres (1.5%) con una edad media en el momento del diagnóstico de 63.4 años (desviación estándar 11.4 años, rango 63.4 a 85.9 años).

La siguiente tabla muestra la distribución de los pacientes en función de la localización del tumor primario.

Localización	n° pacientes	Porcentaje (%)
Cavidad oral	12	15,8
Orofaringe	14	18,4
Hipofaringe	9	11,8
Laringe	41	53,9
Total	76	100,0

Tabla 12: Localización del tumor primario del total de pacientes.

Un porcentaje elevado de pacientes contaron con el antecedente de consumo de tóxicos como el alcohol y el tabaco. La Tabla 13 muestra la distribución de los pacientes en función de los niveles de consumo de dichas sustancias.

			ALCOHOL			Total
			No	< 80 gr/día	> 80 gr/día	
TABACO	No	n	7	0	0	7
		% del total	9,2%	0%	0%	9,2%
	< 20 cig/día	n	4	4	2	10
		% del total	5,3%	5,3%	2,6%	13,2%
	> 20 cig/día	n	9	27	23	59
		% del total	11,8%	35,5%	30,3%	77,6%
Total		n	20	31	25	76
		% del total	26,3%	40,8%	32,9%	100,0%

Tabla 13: Consumo de alcohol y tabaco del total de pacientes.

Un 9.2% de los pacientes no contaron con el antecedente en el consumo de tóxicos, un 10.6% reconocían un consumo moderado (<20 cig/día y < 80 gr de alcohol/día), en tanto que el 80.2% restante contaron con el antecedente de un consumo severo de alcohol y/o tabaco.

El grado histológico del tumor aparece en la Tabla 14, que demuestra un predominio de los tumores considerados como moderadamente diferenciados, tal como ocurre de forma habitual en estas localizaciones de cabeza y cuello.

Grado Histológico	n	Porcentaje(%)
Bien diferenciado	7	9,2
Moderadamente diferenciado	62	81,6
Mal diferenciado	7	9,2
Total	76	100

Tabla 14: Grado histológico de las muestras tumorales del total de pacientes.

La Tabla 15 muestra la distribución en función de la categoría de extensión local (T) y regional (N) de los pacientes en el momento del diagnóstico de acuerdo a los criterios establecidos por la 6ª edición de la clasificación TNM¹⁰³.

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

Tabla 15: Extensión ganglionar y regional en el momento del diagnóstico del total de los pacientes.

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

De acuerdo con la distribución de las categorías de extensión local y regional, los pacientes contaron los siguientes estadios (Tabla 16).

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

Estadios	n	Porcentaje (%)
1	6	7,9
2	19	25
3	21	27,6
4	30	39,5
Total	76	100

Tabla 16: Estadio de los pacientes al momento del diagnóstico.

De los tratamientos realizados a nivel de la localización primaria del tumor, 37 pacientes (48.7%) siguieron un tratamiento con radioterapia o quimio-radioterapia concomitante, 19 pacientes (25.0%) un tratamiento con cirugía, y los 20 pacientes restantes (26.3%) un tratamiento con cirugía y radioterapia postoperatoria. Veintidós pacientes (28.9%) iniciaron la secuencia terapéutica con un tratamiento con quimioterapia de inducción, consistente en la gran mayoría de ocasiones en la administración de 3 ciclos de cisplatino y 5-fluoruracilo.

Del total de pacientes incluidos en el estudio, en 41 ocasiones (53.9%) la secuencia terapéutica incluyó la realización de vaciamientos cervicales.

Hasta el momento del cierre del estudio, un total de 12 pacientes (15.8%) habían sufrido una recidiva del tumor a nivel local como localización exclusiva del fracaso terapéutico, 3 pacientes (3.9%) una recidiva ganglionar exclusiva, y 6 pacientes (7.9%) una recidiva conjunta local y regional. En ausencia de recidiva local o regional del tumor, 7 pacientes (9.2%) sufrieron la aparición de metástasis a distancia como única localización del fracaso terapéutico.

En el momento del cierre del estudio, un total de 45 pacientes (59.2%) se encontraban vivos y sin enfermedad, 3 pacientes se encontraban vivos con enfermedad (un paciente con una recidiva local y dos pacientes con metástasis a distancia), y 28 pacientes habían fallecido. Los fallecimientos fueron consecuencia de la evolución del tumor de cabeza y cuello en 20 ocasiones, como consecuencia de una segunda neoplasia no relacionada en 2, y por enfermedad intercurrente en ausencia de tumor de cabeza y cuello en 6.

A efectos de cálculo de supervivencia, los tres pacientes vivos con enfermedad fueron considerados como fallecidos como consecuencia de la evolución del tumor con fecha del último control.

La Figura 68 muestra la curva de supervivencia actuarial ajustada para los pacientes incluidos en el estudio.

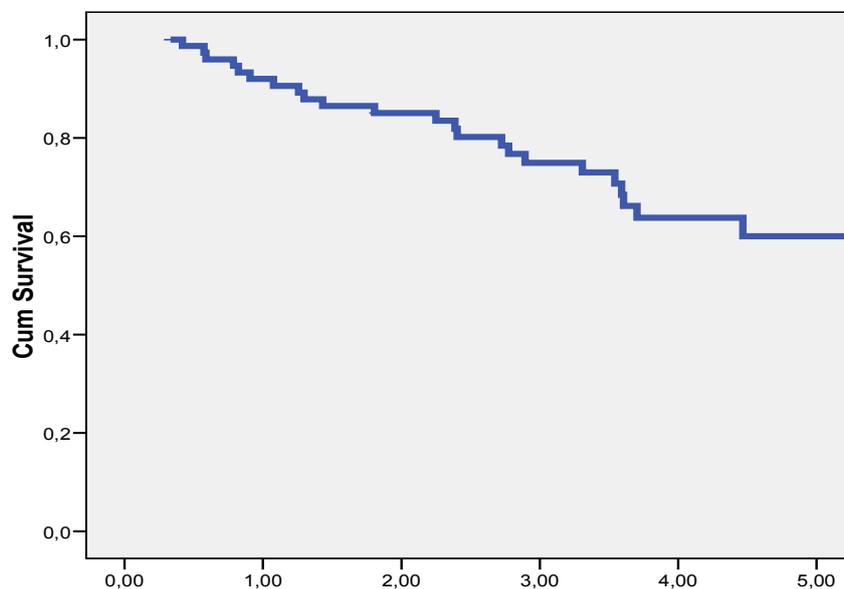


Figura 68: Curva de Supervivencia del total de pacientes incluidos.

La supervivencia ajustada a los 5 años para los pacientes incluidos en el estudio fue del 60,0% (IC 95%: 46-73,9%).

La Figura 69 muestra la supervivencia ajustada en función del estadiaje de los pacientes. No se alcanzaron diferencias significativas ($P=0,068$), siendo la supervivencia correspondiente a los pacientes incluidos en el estadio II inferior a la que contaron los pacientes con tumores en estadio III.

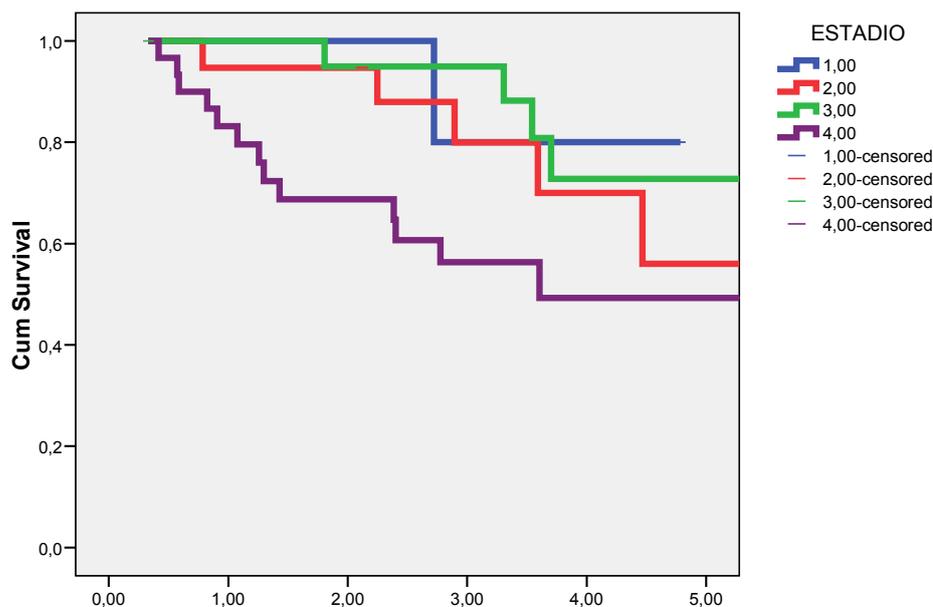


Figura 69: Supervivencia ajustada en función del estadio.

Tampoco aparecieron diferencias significativas en la supervivencia en función del tipo de tratamiento empleado, si bien la supervivencia conseguida con la radioterapia superó a la conseguida con los tratamientos quirúrgicos (Figura 70).

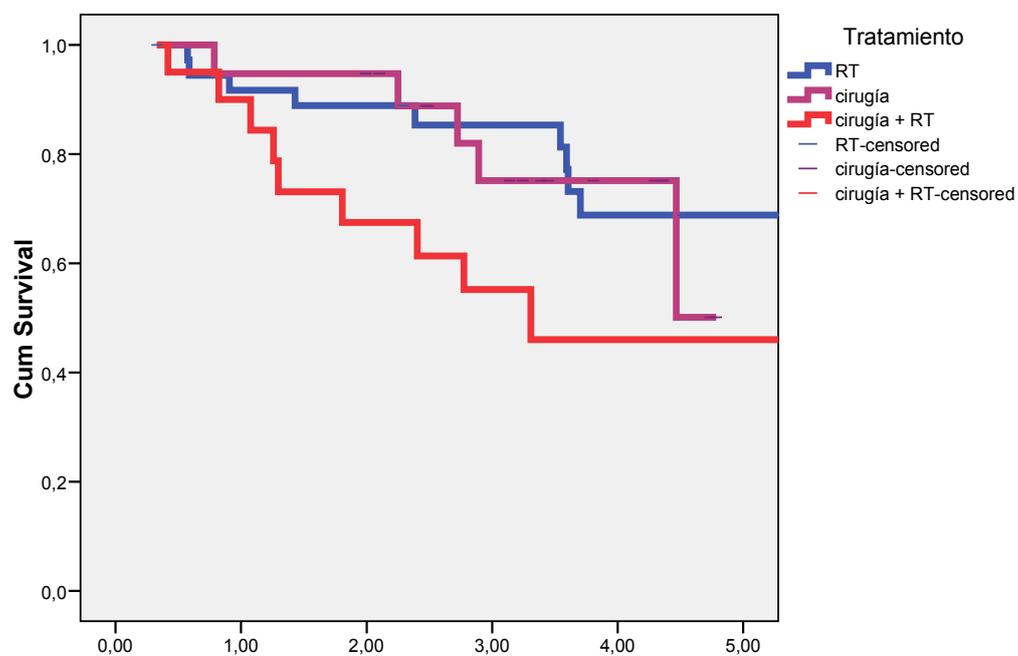


Figura 70: Curvas de supervivencia en función de la modalidad terapéutica.

Se analizó además la supervivencia de los pacientes incluidos en el estudio de acuerdo con la categoría de extensión local de la enfermedad, comparando los pacientes con tumores iniciales (T1-2) con los pacientes con tumores localmente avanzados (T3-4) (Figura 71).

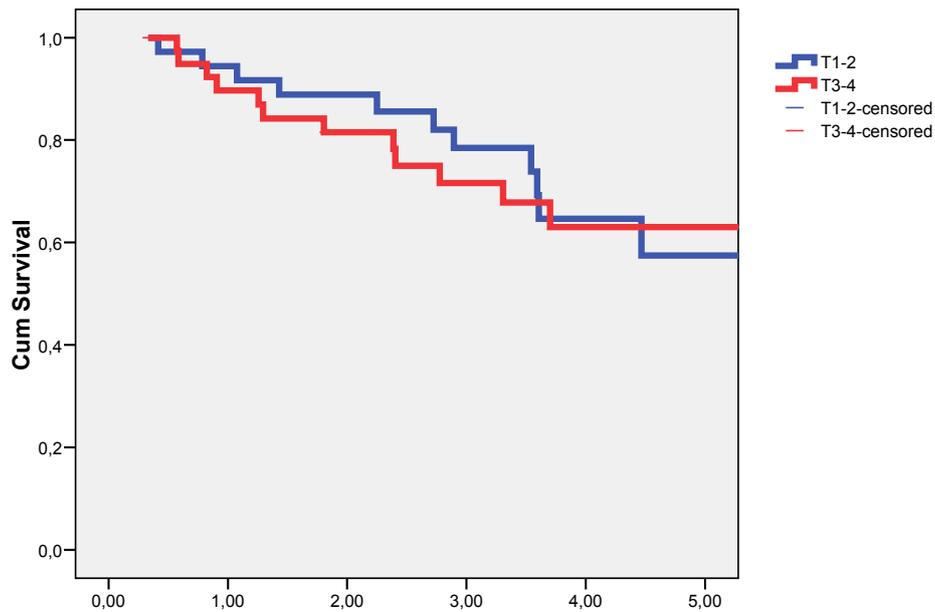


Figura 71: Curvas de supervivencia en función de la categorización de estadios T1-2 y T3-4.

No aparecieron diferencias significativas en la supervivencia en función de la categoría de extensión local ($P=0.801$).

Tampoco aparecieron diferencias significativas en la supervivencia en relación a la presencia de metástasis ganglionares (N0 vs N+) tal como aparece en las siguientes curvas de supervivencia (P=0.189) (Figura 72).

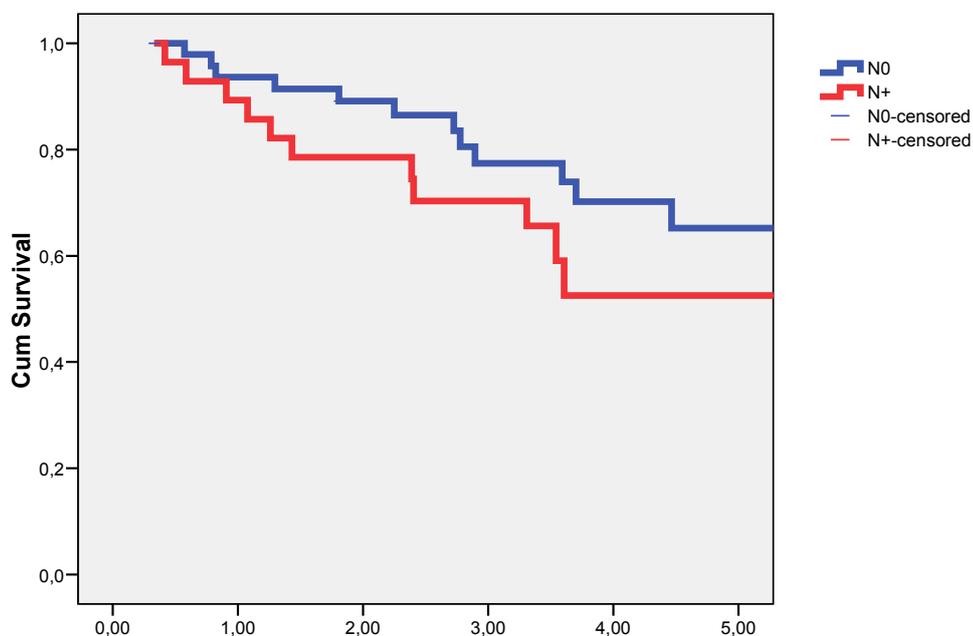


Figura 72: Curvas de supervivencia en función de la presencia (N+) o no (N0) de metástasis ganglionares.

Finalmente, se analizó la supervivencia en función de la localización del tumor primario (cavidad oral/orofaringe vs laringe/hipofaringe). En este caso existieron diferencias en la supervivencia a favor de los pacientes con carcinomas localizados en la laringe, si bien éstas no alcanzaron significación estadística ($P=0.091$) (Figura 73).

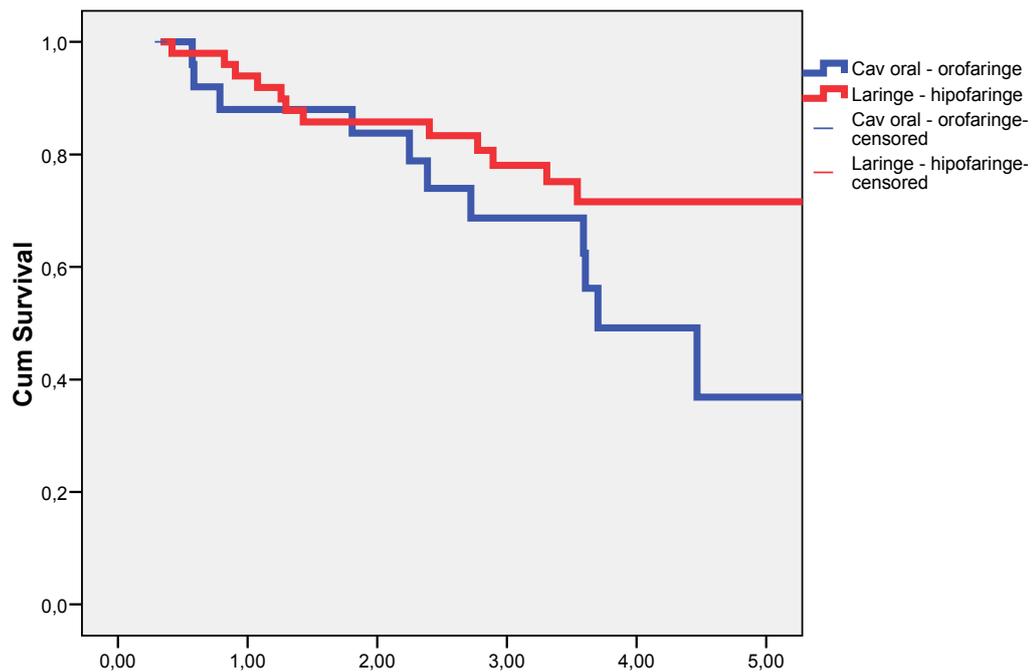


Figura 73: Curvas de supervivencia en función de la localización del tumor primario. Cavidad Oral/Orofaringe v/s Laringe/Hipofaringe.

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

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

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

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

2.1.- Aislamiento del ARN con TRIzol.

Materiales: - TRIzol Reagent® (Invitrogen)

- Cloroformo
- Isopropanol
- Etanol al 75% en agua
- Agua libre de RNAsa

2.1.1. Homogeneización.

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

2.1.2. Extracción del ARN.

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

Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y se precipitó el ARN con la adición de isopropanol añadiendo 0.5 ml de isopropanol por ml de TRIzol® e incubando a 15.-30°C durante 10 min. De nuevo se centrifugó a 12.000 x g a 4°C. EL ARN precipitado, no visible de forma previa al centrifugado, forma entonces un pellet en el fondo del tubo utilizado en la preparación. Se extrajo en sobrenadante, y se lavó el pellet (x2) con 1 ml de etanol al 75%. Al final del

proceso se procedió al secado del pellet de ARN al aire durante 5-10 min, y se disolvió en agua libre de ARNsas, conservando la muestra a -80°C .

2.1.3. Determinación de la concentración y pureza del ARN.

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

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

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

2.2.- Cuantificación de la expresión del ARN mediante RT-PCR.

La RT-PCR es una técnica que permite la determinación de la expresión de un gen determinado. Se basa en la síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir del ARN mediante la reacción con transcriptasa inversa (transcripción inversa, RT) y la posterior amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Figura 74).

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

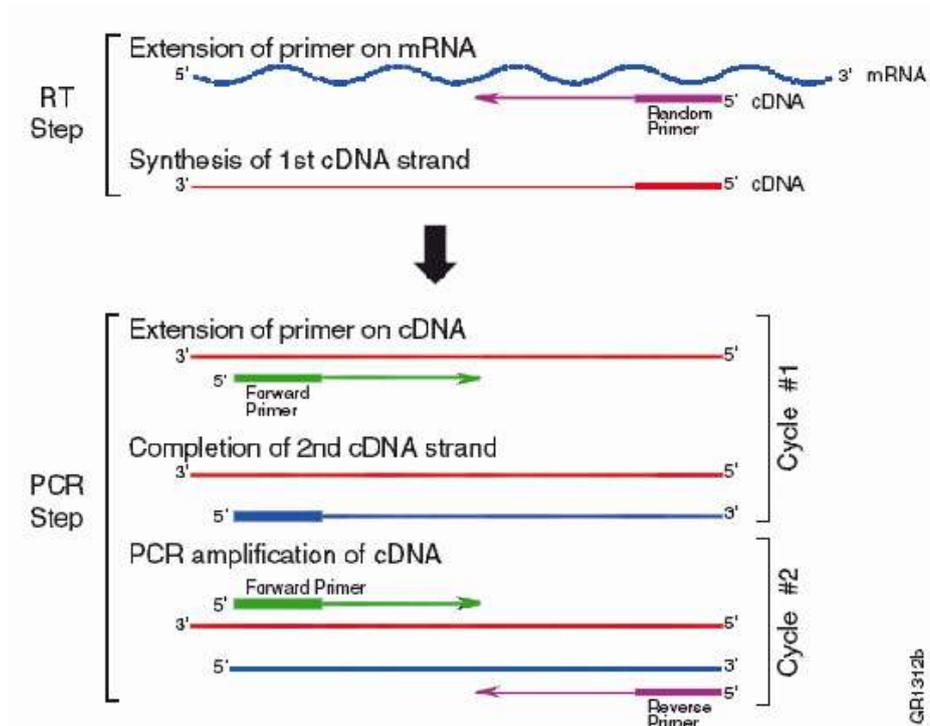


Figura 74: Síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir del ARN mediante la reacción con transcriptasa inversa (transcripción inversa, RT) y la posterior amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

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

2.2.1. Transcripción inversa.

Material:

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit®, Applied Biosystems

La transcripción inversa se realizó utilizando el KIT "High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit". La transcriptasa inversa sintetiza una cadena de ADN complementaria (ADNc) a la molécula de ARN a partir de un cebador.

Este kit utiliza cebadores random para iniciar la síntesis de ADNc. Los cebadores random aseguran que la síntesis de la primera hebra ocurra eficientemente con todas las especies de ARN presentes.

El kit contiene los reactivos que combinados rinden una mezcla de reacción 2X. A ésta mezcla se le añade un volumen igual de ARN. Para preparar la mezcla de reacción 2X para un volumen de reacción de 20 μ l:

Componentes	Volumen (μ l) por Reacción
Tampón de RT 10X	2.0
Mezcla de dNTP 25X (100mM)	0.8
Cebadores Random 10X	2.0
Transcriptasa Inversa	1.0
Inhibidor de RNAsas	1.0
H ₂ O libre de Nucleasas	3.2
Total por Reacción	10.0

A cada 10 μ l de mezcla de reacción se le añadió 1 μ g de ARN disuelto en 10 μ l de H₂O y se procedió a la transcripción inversa en el termociclador

Las condiciones del ciclo para la retrotranscripción son las siguientes:

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura	25°C	37°C	85°C	4°C
Tiempo	10 min	120 min	5 min	∞

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

2.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RT-q-PCR).

Materiales:

TaqMan 2X Universal PCR Master Mix®, Applied Biosystems

Gene Expression Assays®, Applied Biosystems

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

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

Cada ensayo contiene tres oligonucleótidos con dianas específicas:

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

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

- .- Las sondas TaqMan hibridan en el ADNc molde entre los dos cebadores no marcados. La señal fluorescente en el extremo 5' de la

sonda es amortiguada por el NFQ del extremo 3' mediante transferencia de energía de resonancia (FRET, mecanismo de transferencia de energía entre cromóforos).

.- Durante la PCR, la Taq polimerasa alarga los cebadores no marcados usando el ADNc como molde. Cuando la polimerasa alcanza la sonda TaqMan la hidroliza por su actividad exonucleasa, lo que provoca la separación del fluorocromo del amortiguador y por tanto la emisión de fluorescencia. El equipo detecta la fluorescencia emitida que está relacionada con la cantidad de amplicón producido.

.- En cada ciclo de PCR se liberan moléculas de fluorocromo, resultando en un incremento de la intensidad de fluorescencia, proporcional a la cantidad de amplicón sintetizado.

La TaqMan 2X Universal PCR Master Mix®, es una mezcla de los reactivos (excepto cebadores, sondas y molde) necesarios para realizar RT-q-PCR. La mezcla contiene la Taq-polimerasa, dNTPs, ROX™ que es un fluorocromo referencia interna que sirve para normalizar la señal del reportero durante el análisis para mejorar la precisión, (corrige las fluctuaciones causadas por cambios en concentración, volumen o efectos de la muestra) y tampones adecuados para la reacción (Figura 75).

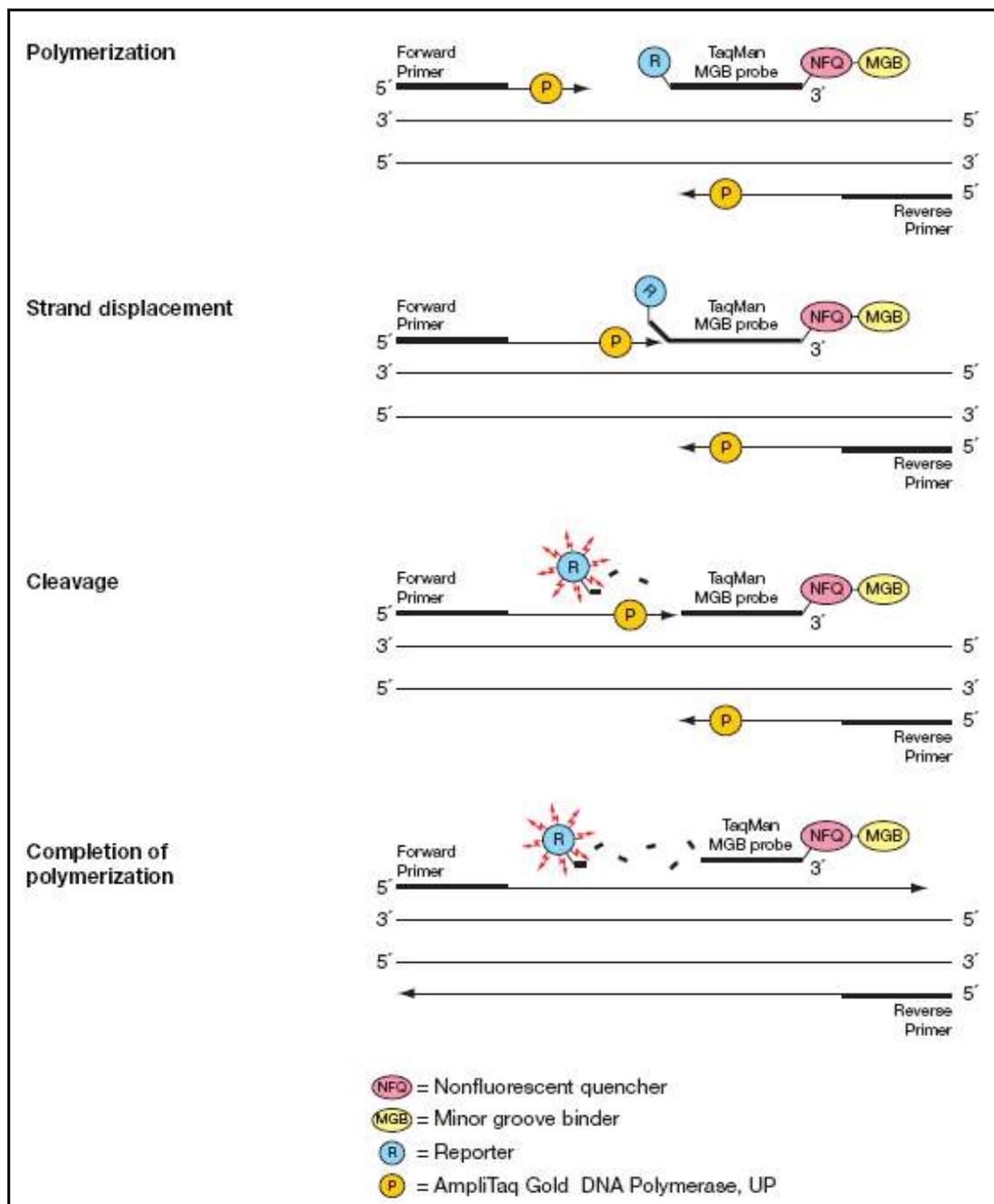


Figura 75: Pasos de la reacción en cadena polimerasa cuantitativa o PCR en tiempo real (RT-q-PCR).

Para preparar la reacción de un volumen de 10 μ l:

Componentes	Volumen (μ l) por Reacción
20X TaqMan® Gene Expression Assays	0.5
2X TaqMan Universal PCR Master Mix®	5.0
ADNc diluído	4.5

Las condiciones del ciclo fueron:

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

La curva de amplificación contiene la información para la cuantificación del ARN. La línea umbral (threshold) es el nivel de detección o punto en el que la reacción alcanza una intensidad de fluorescencia por encima del ruido de fondo. Se sitúa en la fase exponencial de la amplificación. El ciclo en el cual la muestra alcanza este nivel se llama ciclo umbral (C_T). Este valor es el que se utiliza para realizar la cuantificación (Figura 76).

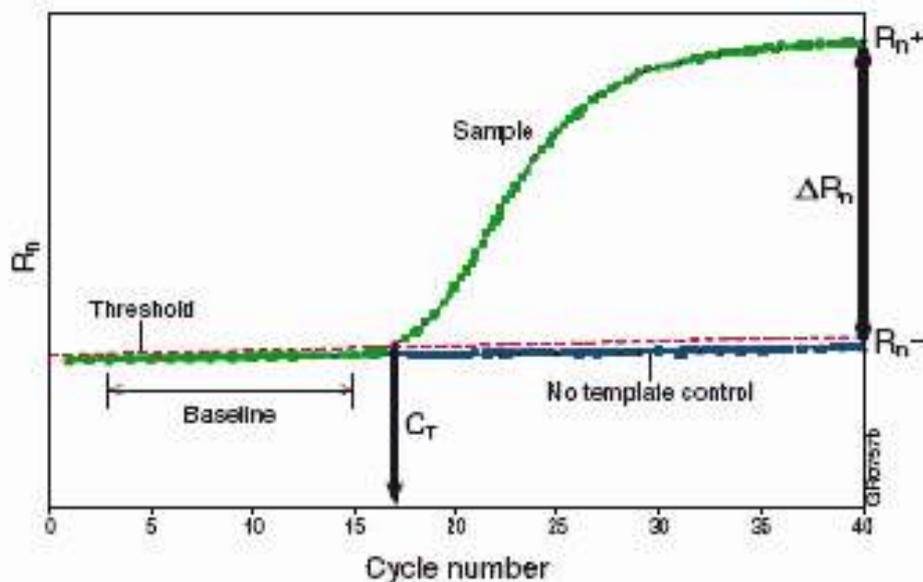


Figura 76: Curva de amplificación de ADNc. Permite cuantificar mediante la reacción fluorescente generada después de cada ciclo de amplificación, la expresión del ARN.

Se realizó una cuantificación relativa, que no requiere curva de calibrado. La cuantificación relativa se basa en la comparación entre el nivel de expresión del gen a estudiar *versus* un gen control (también llamado de referencia, interno o normalizador o, en inglés, *housekeeping gene*) que es considerado constante¹⁰⁴.

Se utilizó la fórmula:

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

Donde ΔC se calcula:

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

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

2.3.-Batería de genes evaluados en el presente estudio.

En la elaboración del presente estudio se analizó el nivel de expresión correspondiente a una serie de MMPs y uno de sus inhibidores específicos. Además, se llevaron a cabo determinaciones de la expresión de otros genes relacionados con el metabolismo de las MMPs (Tabla 17).

Metabolismo del Ac. Araquidónico	MMPs	Químioquinas	Factores de crecimiento	Factores de transcripción
COX-1	MMP-1	SDF-1	VEGF	HIF-1 α
COX-2	MMP-2	IL-8		NF κ B (p65)
mPGES-1	MMP-3			
mPGES-2	MMP-9			
	MMP-10			
	MMP-13			
	TIMP-1			

Tabla 17: Batería de los genes evaluados en el estudio.

3.- TÉCNICAS ESTADÍSTICAS.

El estudio estadístico se realizó con el programa SPSS 15.0 para Windows.

Se procedió en primer lugar a realizar una descripción de los valores de los niveles de expresión correspondientes a las diferentes MMPs estudiadas mediante estadísticos descriptivos de tendencia central y el rango. Se confirmó la ausencia de una distribución normal en los valores de expresión de las MMPs mediante el test de Kolmogorov-Smirnof.

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

Las correlaciones entre los niveles de expresión de las diferentes MMPs estudiadas y los genes relacionados con su actividad se realizó de acuerdo con los valores del coeficiente de correlación r de Pearson, considerando los valores de 0.4-0.6 como de correlación moderada, de 0.6-0.8 como de correlación alta, y de 0.8-1.0 como de correlación muy alta.

En la evaluación del significado clínico de los valores de expresión de las MMPs se eligió el método de curvas ROC. Se utilizó el área bajo la curva y el nivel de significación correspondiente para escoger aquellas MMPs que

contaron con una relación más intensa con las variables clínicas, como la afectación ganglionar o el control de la enfermedad.

Para aquellas MMPs que se relacionaron de forma significativa con el control de la enfermedad, la categorización de la variable continua correspondiente al valor de expresión se realizó de acuerdo con los resultados obtenidos con un análisis de partición recursiva, utilizando la técnica *de classification and regression trees* (CRT).

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

V.-RESULTADOS.

1.- Valores de expresión correspondientes a las MMPs estudiadas.

La siguiente tabla muestra los valores correspondientes a los niveles de expresión de las MMPs estudiadas a nivel del tumor, así como del TIMP-1.

	N	Media	Desviación estándar (SD)	Mediana	Mínimo	Máximo
MMP-1	76	1,808	3,285	0,456	,003	19,820
MMP-2	76	0,299	0,520	0,136	,016	3,283
MMP-3	76	0,251	0,775	0,034	,000	5,635
MMP-9	76	0,144	0,300	0,045	,000	1,758
MMP-10	76	0,217	0,533	0,055	,000	4,313
MMP-13	76	0,071	0,255	0,003	,000	1,736
TIMP-1	76	2,938	10,254	0,512	0,012	77,023

Tabla 18: Niveles de expresión de MMPs y TIMP.

Las siguientes figuras muestran la distribución correspondiente a los diferentes valores de expresión de las MMPs estudiadas a nivel del tumor.

.- MMP-1.

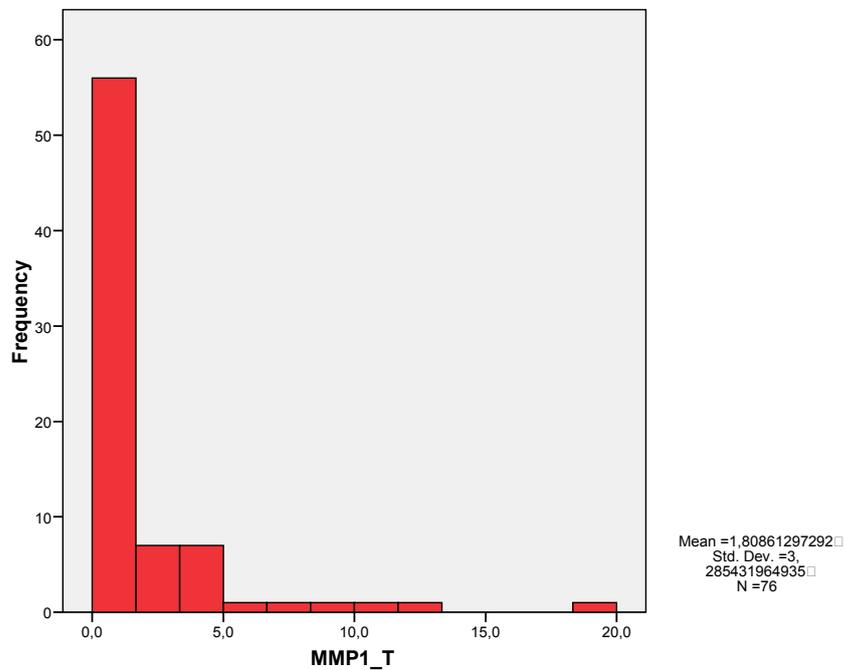


Figura 77: Histograma de distribución de MMP-1

.- MMP-2

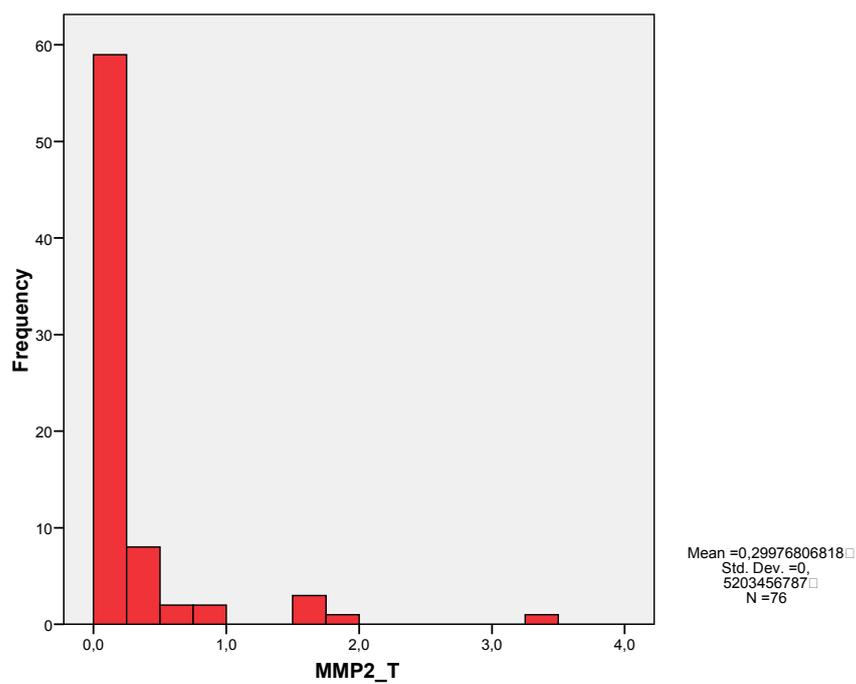


Figura 78: Histograma de distribución de MMP-2

.- MMP-3

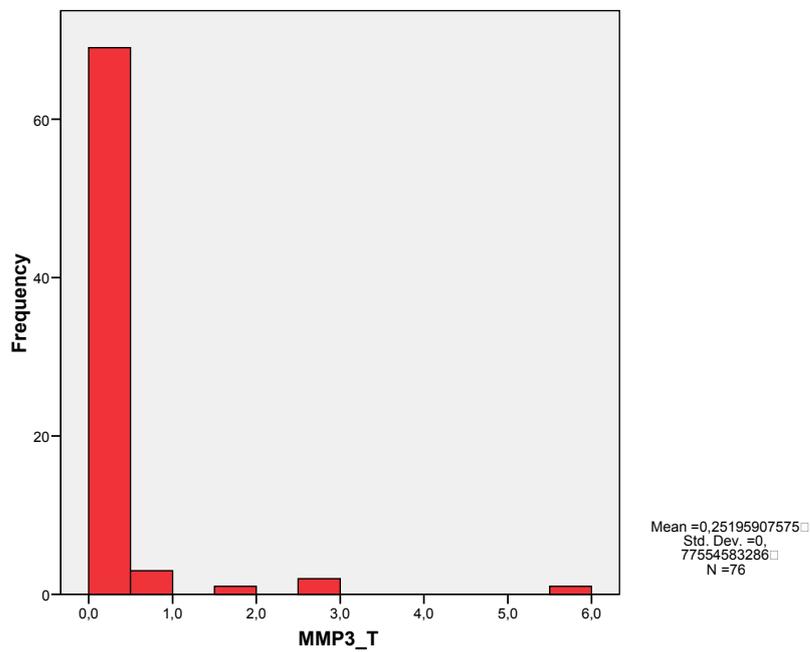


Figura 79: Histograma de distribución de MMP-3

- MMP-9

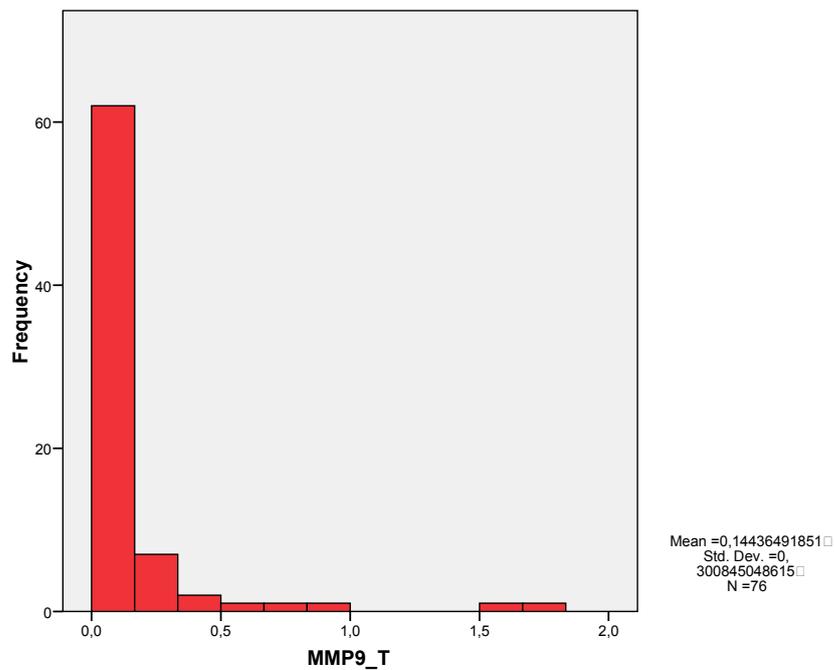


Figura 80: Histograma de distribución de MMP-9

.- MMP-10

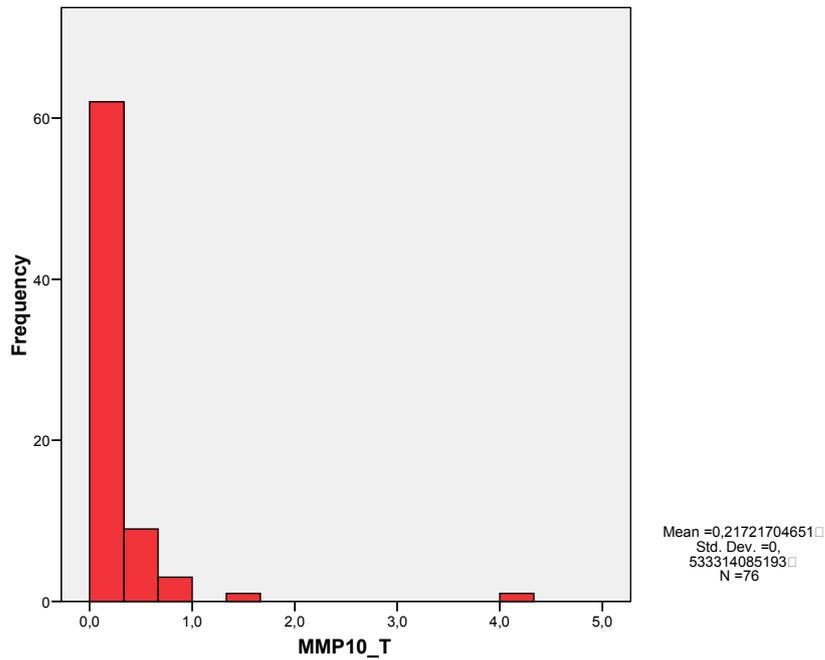


Figura 81: Histograma de distribución de MMP-10

.- MMP-13

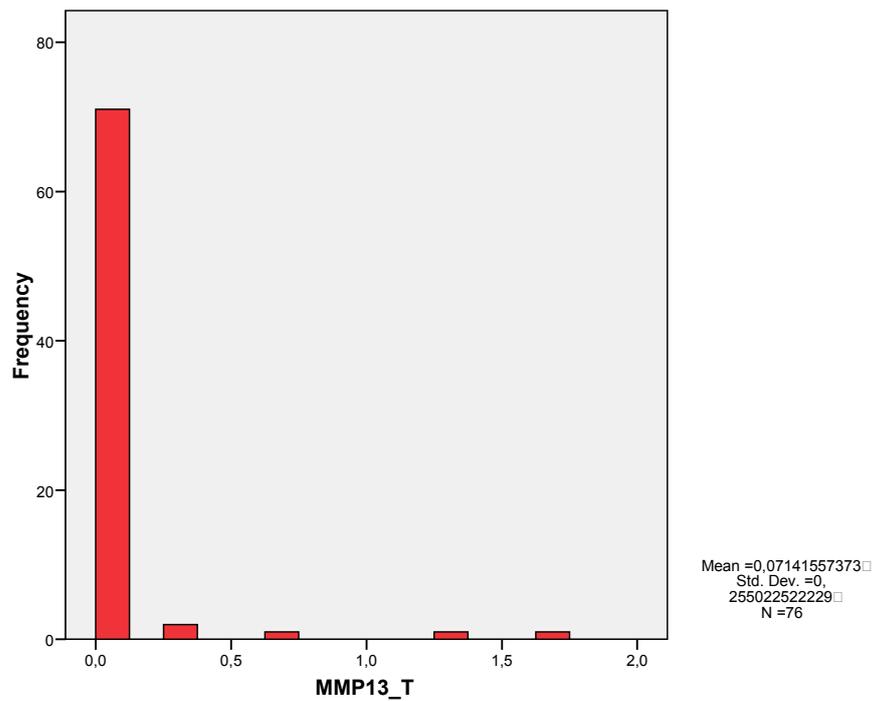


Figura 82: Histograma de distribución de MMP-13

.- TIMP-1

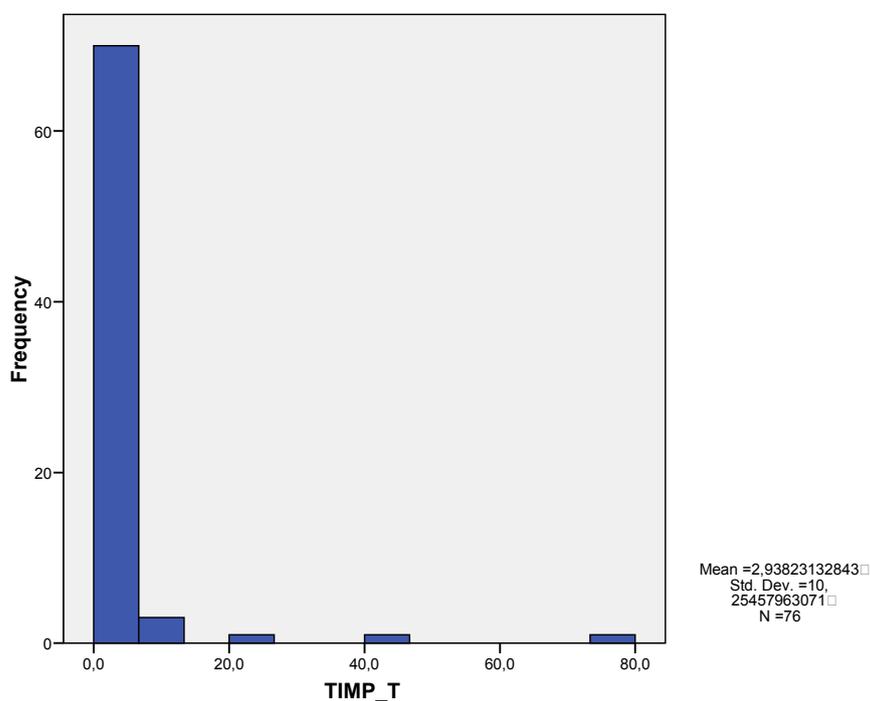


Figura 83: Histograma de distribución de TIMP-1

Tal como puede apreciarse a partir de la morfología de los histogramas, la distribución de los valores de expresión de las MMPs y el TIMP-1 no siguió una distribución normal. La Tabla 19 muestra los valores correspondientes al test de Kolmogorov-Smirnov, que constatan la ausencia de una distribución normal en todas las variables estudiadas.

	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-9	MMP-10	MMP-13	TIMP-1
N	76	76	76	76	76	76	76
Kolmogorov-Smirnov Z	2,540	2,754	3,249	2,753	2,983	3,417	3,718
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000

Tabla 19: Test de Kolmogorov-Smirnov.

2.- COMPARACIÓN EN LA EXPRESIÓN ENTRE TEJIDO TUMORAL Y MUCOSA SANA.

A continuación se llevó a cabo una comparación entre los niveles de expresión correspondientes al tejido tumoral y la mucosa sana. Se dispuso de una determinación de los niveles de expresión a nivel de la mucosa sana para las MMP-1, -2, -3 y -9, y para el TIMP-1.

Se presentan a continuación los boxplot correspondientes a los niveles de expresión comparando el tejido tumoral con la mucosa sana.

.- MMP1

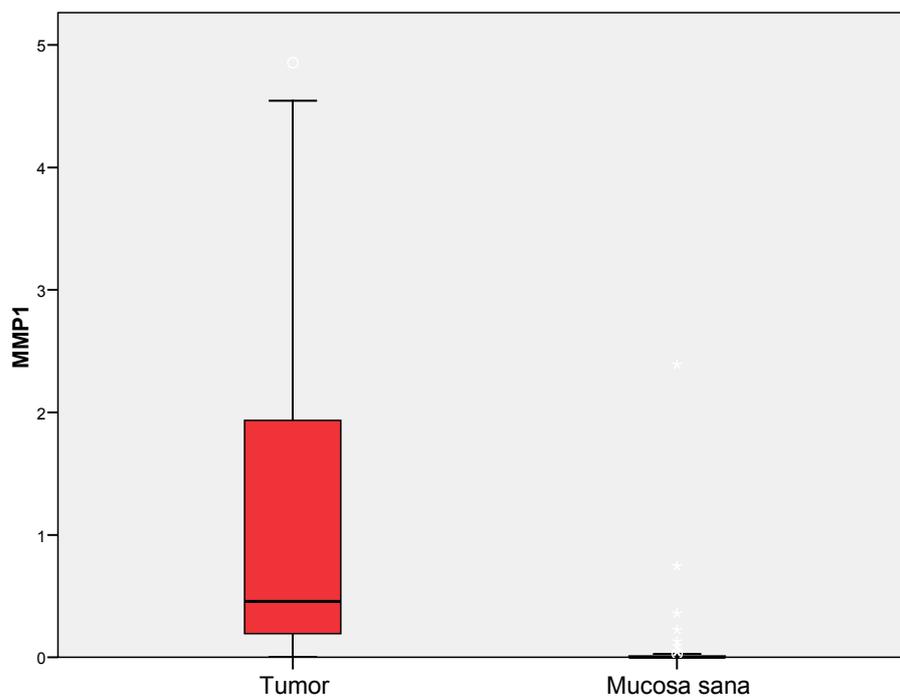


Figura 84: Niveles de expresión de MMP-1 entre mucosa tumoral y mucosa sana.

.- MMP-2

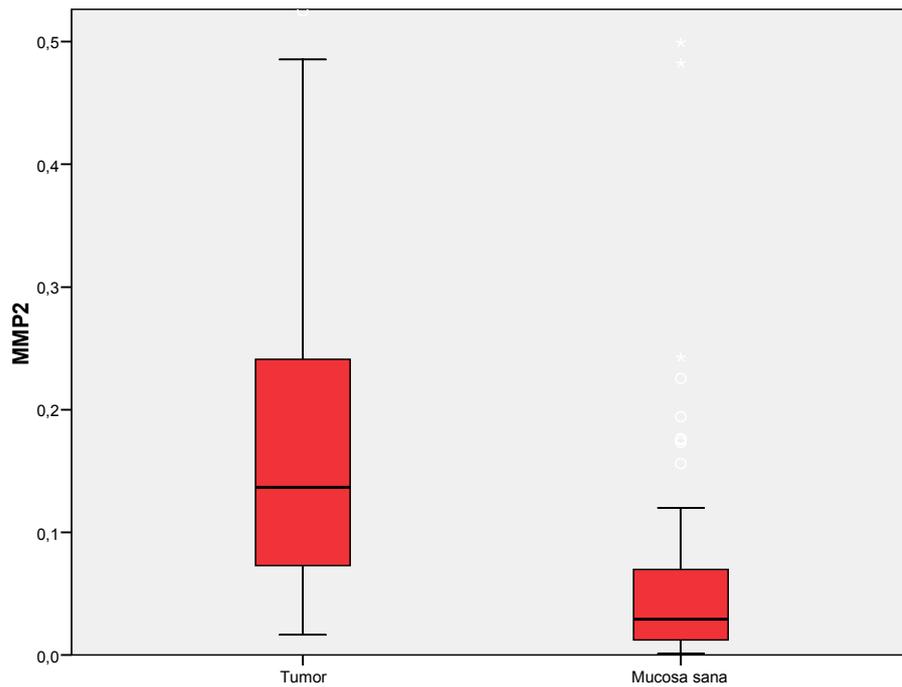


Figura 85: Niveles de expresión de MMP-2 entre mucosa tumoral y mucosa sana.

.- MMP-3

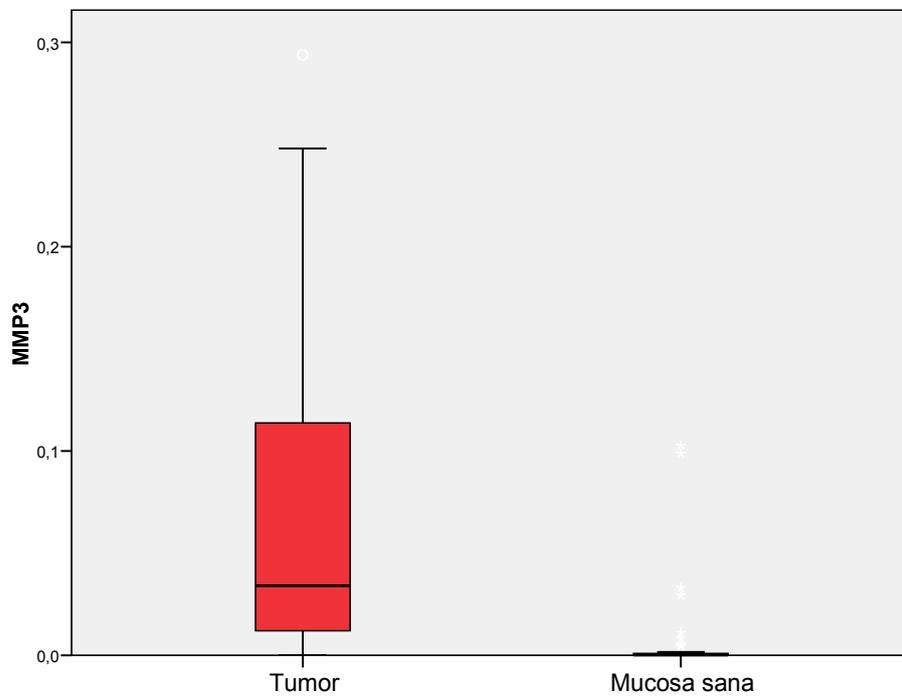


Figura 86: Niveles de expresión de MMP-3 entre mucosa tumoral y mucosa sana.

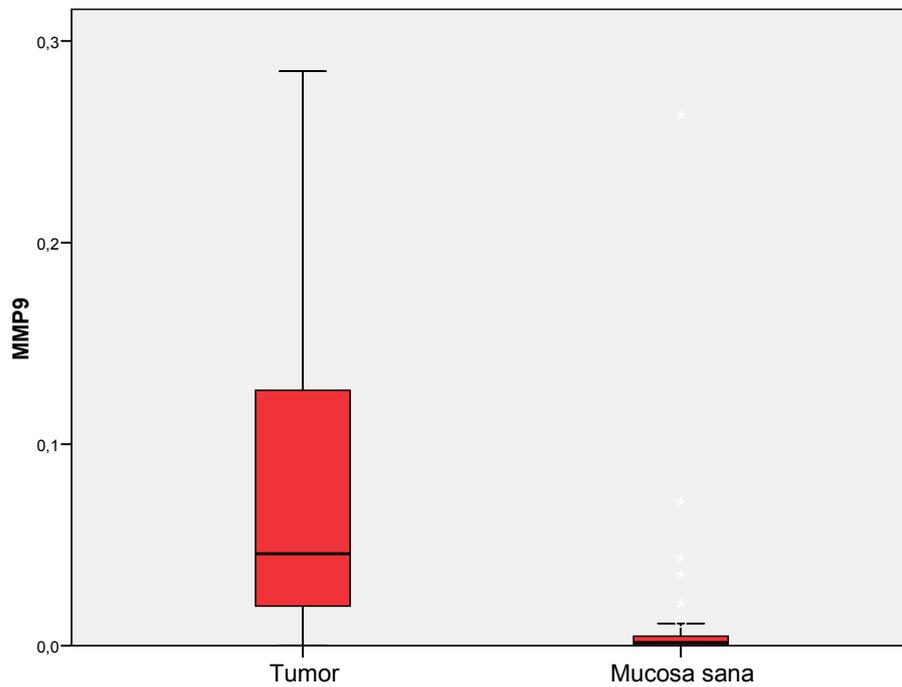
.- MMP-9

Figura 87: Niveles de expresión de MMP-9 entre mucosa tumoral y mucosa sana.

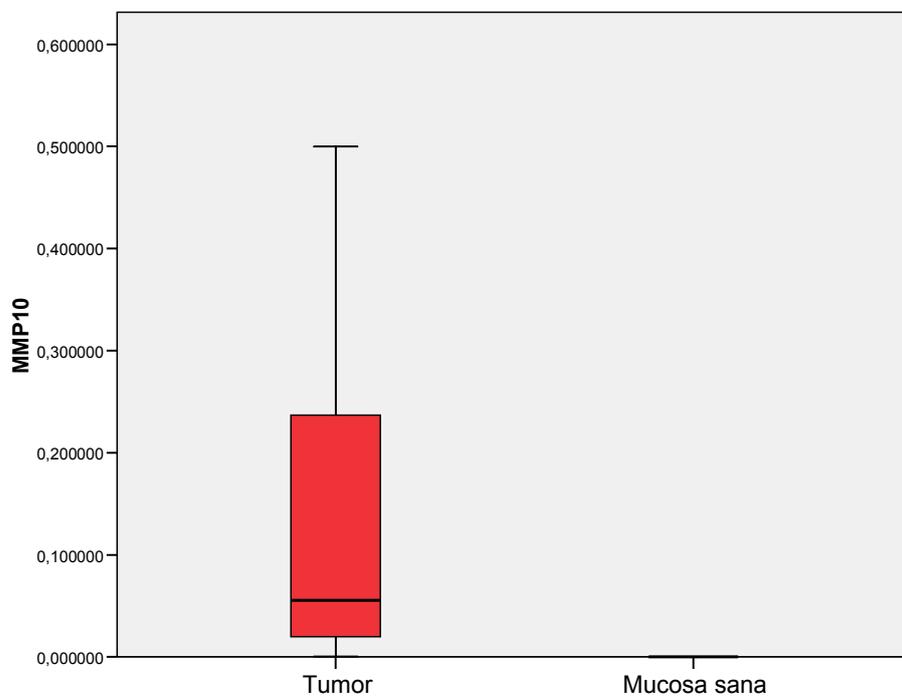
.- MMP-10

Figura 88: Niveles de expresión de MMP-10 entre mucosa tumoral y mucosa sana.

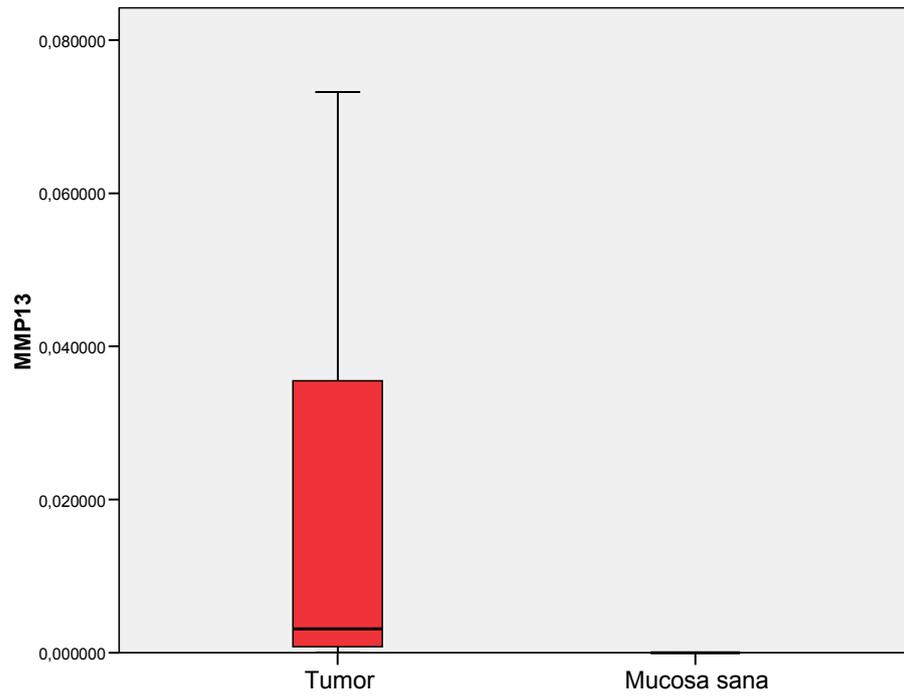
.- MMP-13

Figura 89: Niveles de expresión de MMP-13 entre mucosa tumoral y mucosa sana.

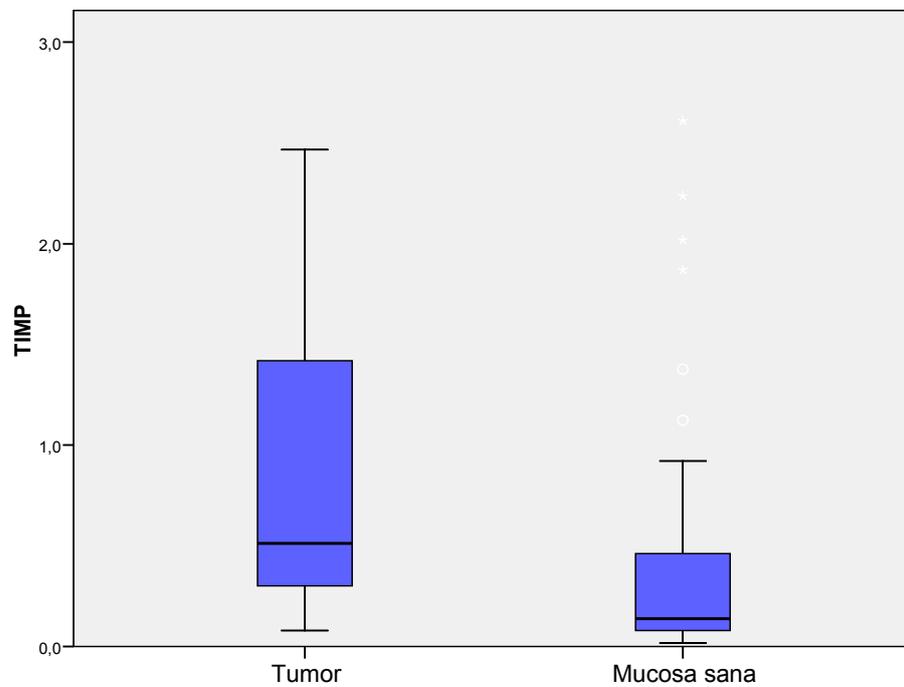
.- TIMP-1

Figura 90: Niveles de expresión de TIMP-1 entre mucosa tumoral y mucosa sana.

Puede apreciarse una diferencia sustancial en los niveles de expresión de las MMPs en función del tipo de tejido analizado, siendo la expresión de las MMP-1, -3 y -9 prácticamente inexistente a nivel de la mucosa sana en relación al tumor. No existió evidencia de la expresión de las MMP-10 y -13 en la mucosa normal.

La Tabla 20 muestra los resultados correspondientes al test no paramétrico de Wilcoxon para medidas repetidas, que muestran la existencia de diferencias significativas en los niveles de expresión de las MMPs y el TIMP-1 entre el tejido tumoral y la mucosa normal.

	MMP-1 S	MMP-2 S	MMP-3 S	MMP-9 S	TIMP-1 S
	MMP-1 T	MMP-2 T	MMP-3 T	MMP-9 T	TIMP-1 T
Z	-6,100(a)	-5,077(a)	-5,841(a)	-6,677(a)	-3,246(a)
Asymp.Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000	,001

Tabla 20: Test no paramétrico de Wilcoxon de los niveles de expresión de las MMPs y TIMPs de muestras de tejido sano(S) y tumoral (T).

No se llevó a cabo un estudio estadístico en el caso de las MMP-10 y MMP-13 dada la ausencia de expresión en la mucosa normal.

3.- CORRELACIÓN ENTRE LAS MMPs Y EL TIMP-1.

Se estudió el nivel de correlación en los niveles de expresión a nivel del tejido tumoral entre las diferentes MMPs estudiadas y el TIMP-1. La siguiente tabla muestra el coeficiente de correlación de Pearson junto con el nivel de significación alcanzado.

		MMP1	MMP2	MMP3	MMP9	MMP10	MMP13	TIMP-1
MMP-1	Correlación Pearson	1	,707(**)	,911(**)	,423(**)	,526(**)	,339(**)	,608(**)
	Sig.		,000	,000	,000	,000	,003	,000
MMP-2	Correlación Pearson	,707(**)	1	,543(**)	,718(**)	,313(**)	,325(**)	,656(**)
	Sig.	,000		,000	,000	,006	,004	,000
MMP-3	Correlación Pearson	,911(**)	,543(**)	1	,295(**)	,401(**)	,255(*)	,497(**)
	Sig.	,000	,000		,010	,000	,026	,000
MMP-9	Correlación Pearson	,423(**)	,718(**)	,295(**)	1	,343(**)	,250(*)	,519(**)
	Sig.	,000	,000	,010		,002	,029	,000
MMP-10	Correlación Pearson	,526(**)	,313(**)	,401(**)	,343(**)	1	,727(**)	,746(**)
	Sig.	,000	,006	,000	,002		,000	,000
MMP-13	Correlación Pearson	,339(**)	,325(**)	,255(*)	,250(*)	,727(**)	1	,617(**)
	Sig.	,003	,004	,026	,029	,000		,000
TIMP-1	Correlación Pearson	,608(**)	,656(**)	,497(**)	,519(**)	,746(**)	,617(**)	1
	Sig.	,000	,000	,000	,000	,000	,000	

Tabla 21: Correlación entre la expresión de MMPs y TIMPs en muestras de tejido tumoral
Correlación de Pearson.

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

. * Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Se clasificaron los niveles de relación obtenidos entre los niveles de expresión de los genes evaluados en función del valor del coeficiente r de acuerdo con los siguientes criterios:

Coeficiente	Interpretación
0	Relación nula
0 – 0,2	Relación muy baja
0,2 – 0,4	Relación baja
0,4 – 0,6	Relación moderada
0,6 – 0,8	Relación alta
0,8 - 1	Relación muy alta
1	Relación perfecta

Tabla 22: Criterios de valoración en función del coeficiente r .

Se enumeran los niveles de relación alta o muy alta correspondientes a cada una de las MMPs y el TIMP-1.

			r
MMP-1	Muy alta	MMP-3	0.911
	Alta	MMP-2	0.707
		TIMP-1	0.608
MMP-2	Alta	MMP-9	0.718
		MMP-1	0.707
		TIMP-1	0.656
MMP-3	Muy alta	MMP-1	0.911
MMP-9	Alta	MMP-2	0.718
MMP-10	Alta	TIMP-1	0.746
		MMP-13	0.727
MMP-13	Alta	MMP-10	0.727
		TIMP-1	0.617
TIMP-1	Alta	MMP-10	0.746
		MMP-2	0.656
		MMP-13	0.617
		MMP-1	0.608

Tabla 23: Grado de correlación entre MMPs y TIMP-1 en muestras de tejido tumoral.

Del estudio de correlaciones, destaca el elevado grado de concordancia entre los niveles de expresión existente entre una de las colagenasas (MMP-1) y una de las estromelisininas (MMP-3). La Figura 91 muestra la distribución de ambas MMPs (dada la distribución no normal de los valores, se incluye en el recuadro la distribución correspondiente a la transformación logarítmica de los valores, que permite evaluar de forma más fácil la correspondencia existente en los valores de ambas MMPs).

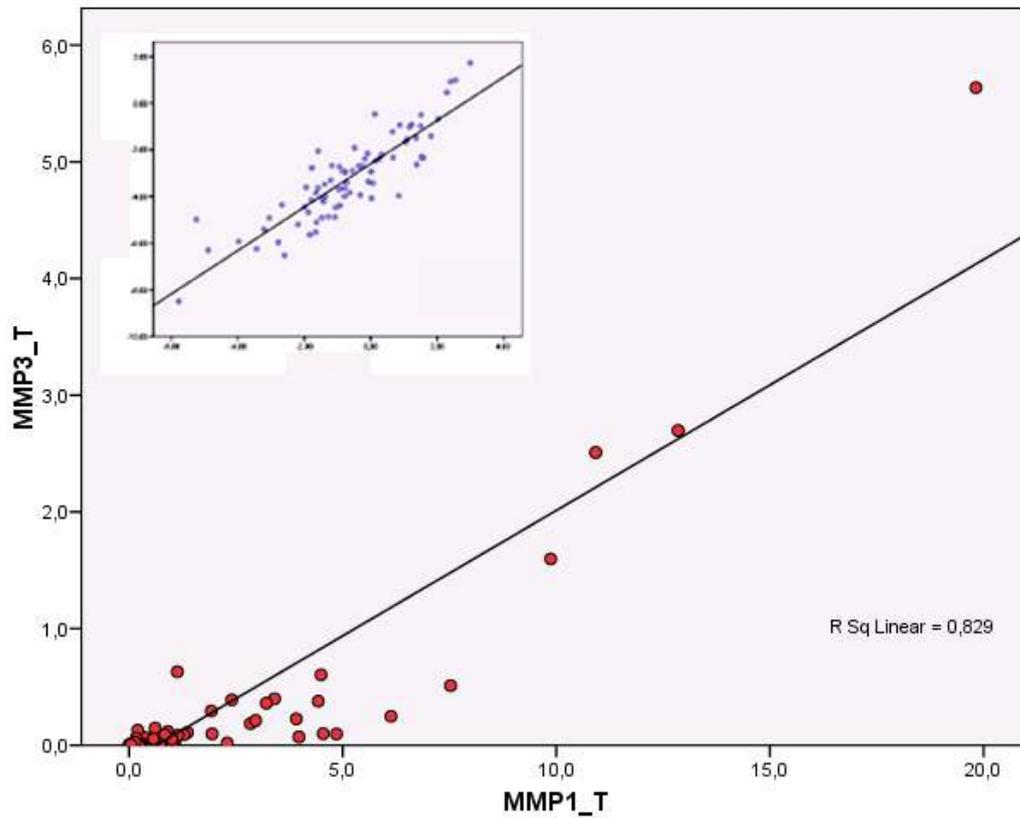


Figura 91: Distribución de la correlación entre los niveles de expresión MMP-1 y MMP-3.

Igualmente, existió un elevado nivel de correlación entre las gelatinasas MMP-2 y MMP-9, tal como puede apreciarse en la siguiente figura.

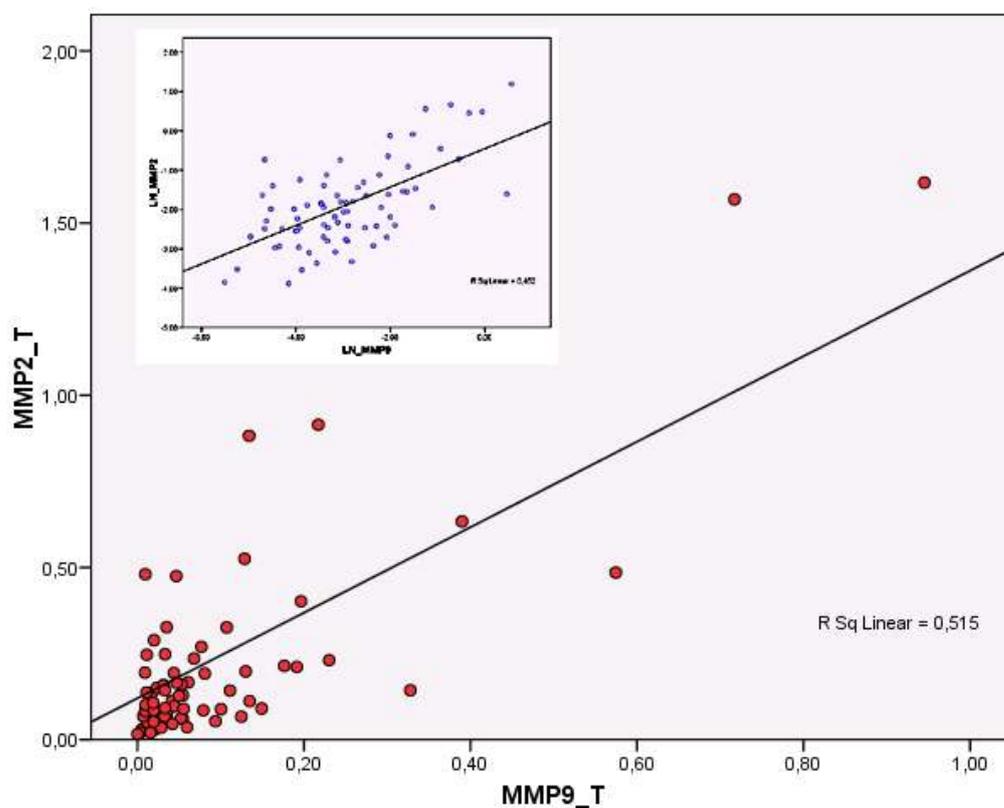


Figura 92: Distribución de la correlación entre los niveles de expresión de MMP-2 y MMP-9.

Finalmente, cabe destacar que los valores de expresión del TIMP-1 mantuvieron unos niveles de correlación elevados con la mayoría de las MMPs evaluadas.

4.- SIGNIFICADO CLÍNICO DE LAS MMPs. AFECTACIÓN GANGLIONAR.

En el momento del diagnóstico, un total de 28 pacientes (36.8%) presentaban metástasis a nivel ganglionar. De los pacientes inicialmente N0, se llevó a cabo un vaciamiento electivo en 21 casos, constatándose la presencia de metástasis ganglionares ocultas en 9 ocasiones (N0/pN+). A efectos de evaluación de la relación existente entre los niveles de expresión de las MMPs y la afectación regional, estos pacientes N0/pN+ se agruparon con los pacientes N+. De los pacientes inicialmente N+, en 2 ocasiones en que se llevó a cabo un vaciamiento en ausencia de tratamiento previo, el dictamen patológico no evidenció presencia de enfermedad a nivel ganglionar (N+/pN0), siendo excluidos estos del grupo de pacientes con metástasis a nivel cervical. Se consideró con presencia de metástasis ganglionares un total de 35 pacientes (46.1%).

Se determinó la sensibilidad y especificidad correspondientes a los valores de expresión de las MMPs y el TIMP-1 en relación a la presencia de metástasis ganglionares mediante curvas ROC. La Tabla 24 y Figura 93 muestran las curvas ROC obtenidas, así como los valores del área bajo la curva y el nivel de significación de la prueba.

	Area	Error SD ^a	Sig.Asint. ^b	IC 95% asintótico	
				Lim Inferior	Lim Superior
MMP-1	,556	,068	,402	,423	,689
MMP-2	,525	,068	,704	,392	,659
MMP-3	,531	,068	,643	,399	,663
MMP-9	,519	,068	,774	,387	,652
MMP-10	,564	,067	,340	,433	,695
MMP-13	,503	,067	,963	,371	,635
TIMP-1	,500	,068	,996	,367	,634

Tabla 24: Valores del área bajo la curva de las curvas ROC de la expresión de MMPs/TIMP en relación a la presencia de metástasis ganglionar.

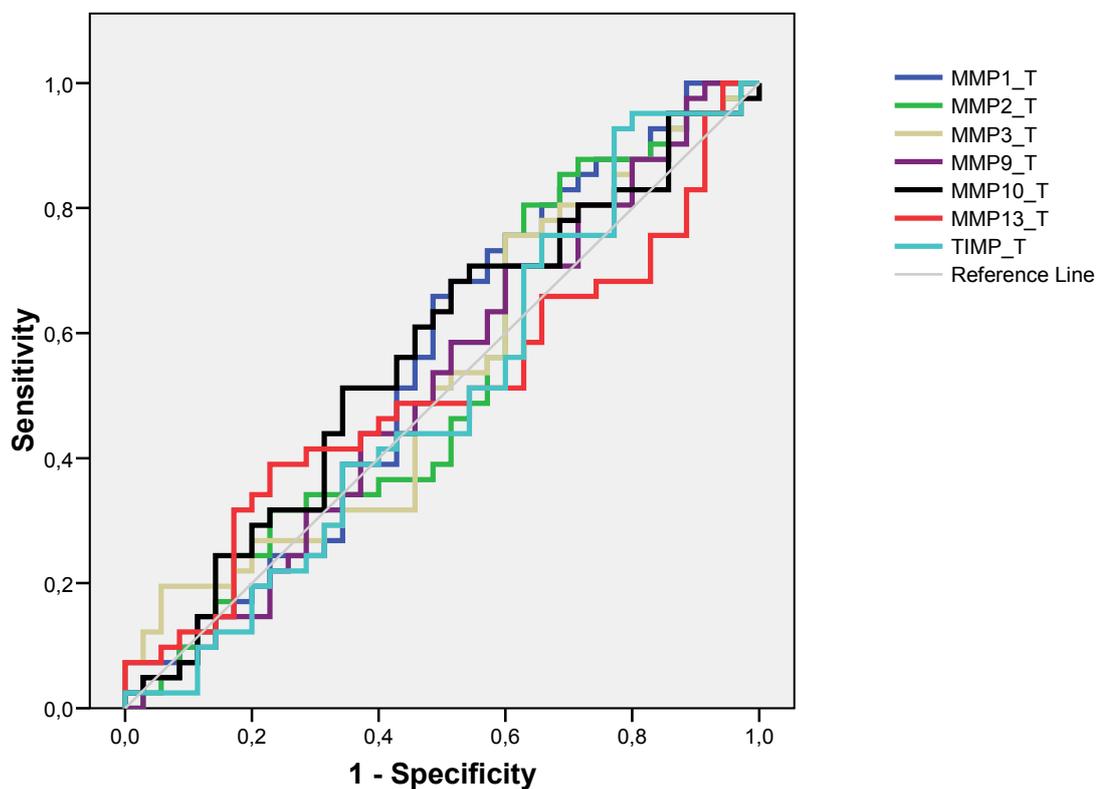


Figura 93: Curva ROC de la expresión de MMPs/TIMP en relación a la presencia de metástasis ganglionar.

De acuerdo con nuestros resultados, los valores de expresión de las MMPs y el TIMP-1 no se correlacionaron de forma significativa con el riesgo de presencia de metástasis a nivel regional, careciendo en consecuencia de capacidad pronóstica.

5.- RELACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LAS MMPs CON LAS VARIABLES CLÍNICAS.

Se llevó a cabo una determinación de la relación entre los niveles de expresión de las MMPs y diversas variables clínicas. En primer lugar se analizó la relación con la localización primaria del tumor. Para aumentar la potencia de la prueba se procedió a agrupar por un lado los pacientes con carcinomas localizados en la cavidad oral y la orofaringe, y por el otro los pacientes con tumores localizados en la laringe y la hipofaringe. La siguiente tabla muestra los resultados del test no paramétrico de Wilcoxon correspondiente al estudio de la relación entre los niveles de expresión y la localización primaria del tumor.

	MMP-1 T	MMP-2 T	MMP-3 T	MMP-9 T	MMP-10 T	MMP-13 T	TIMP-1 T
Mann-Whitney U	482	627	453	495	546	550	563
Wilcoxon W	1757	1902	1728	1770	1821	901	1838
Z	-1,839	-.252	-2,157	-1,697	-1,139	-1,095	-.953
Sig. Asint. (2 colas).	,066	,801	,031	,090	,255	,274	,341

Tabla 25: Relación entre los niveles de expresión de MMPs/TIMP y la localización primaria tumoral (T).

De acuerdo con estos resultados, existieron diferencias significativas sólo en el caso de la MMP-3, con unos niveles más elevados para los pacientes con carcinomas localizados a nivel de la cavidad oral-orofaringe. Para la MMP-1 y MMP-9 existió también una tendencia según la cual los tumores localizados en cavidad oral-orofaringe contaron con unos niveles de expresión más elevados, pero sin que las diferencias alcanzasen en este caso la significación estadística.

La siguiente figura muestra la distribución correspondiente a la expresión de la MMP-3 en función de la localización del tumor primario.

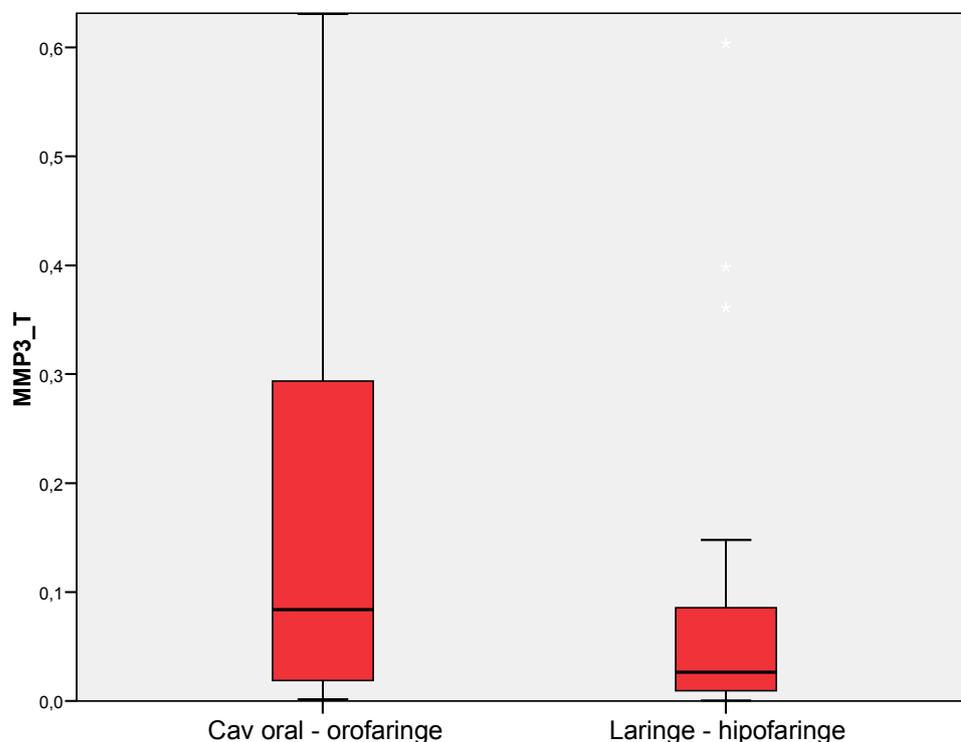


Figura 94: Distribución de MMP-3 en relación a la localización del tumor primario.

No aparecieron diferencias significativas en los niveles de expresión de MMPs o TIMP-1 en función de la categoría de extensión local del tumor (T1-2 v/s T3-4), tal como puede apreciarse en los siguientes resultados del test no paramétrico de Wilcoxon (Tabla 26).

	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-9	MMP-10	MMP-13	TIMP-1
Mann-Whitney U	716	696	714	692	709	649	613
Wilcoxon W	1536	1362	1380	1358	1375	1315	1279
Z	-.042	-.250	-.062	-.291	-.114	-.739	-1,113
Sig. Asint. (2colas)	.967	.803	.950	.771	.909	.460	.266

Tabla 26: Relación entre los niveles de expresión MMPs y TIMP y la extensión local del tumor.

Igualmente, tampoco se apreciaron diferencias significativas en los niveles de expresión en función del grado histológico (bien diferenciado v/s moderadamente diferenciado v/s mal diferenciado). La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-9	MMP-10	MMP-13	TIMP-1
Chi-Cuadrado	1,639	1,454	,400	,289	,583	1,067	,942
df	2	2	2	2	2	2	2
Sig.Asint.	,441	,483	,819	,866	,747	,587	,624

Tabla 27: Test Kruskal-Wallis para la expresión de MMPs y TIMP-1 en función del grado histológico.

Por último, tal como puede deducirse de la ausencia de capacidad pronóstica de los niveles de expresión de las MMPs y el TIMP-1 en relación a la presencia de metástasis ganglionares (N0 v/s N+), no aparecieron diferencias significativas en los niveles de expresión de los genes estudiados en función de la afectación ganglionar (resultados obtenidos con el test no paramétrico de Wilcoxon)(Tabla 28).

	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-9	MMP-10	MMP-13	TIMP-1
Mann-Whitney U	637	681	673	690	626	713	717
Wilcoxon W	1267	1311	1303	1320	1256	1343	1347
Z	-,839	-,380	-,464	-,287	-,954	-,047	-,005
Sig.Asint.(2colas)	,402	,704	,643	,774	,340	,963	,996

Tabla 28: Relación entre la expresión de MMPs y TIMP-1 en función de la afectación ganglionar.

6.- CAPACIDAD PRONÓSTICA DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE MMPs Y TIMP-1.

Se evaluó la relación entre los niveles de MMPs y la supervivencia ajustada. En una primera aproximación, se llevó a cabo una evaluación de la cohorte de pacientes mediante la técnica de curvas ROC, considerando en este caso como resultado la muerte como consecuencia del tumor de cabeza y cuello.

La siguiente figura muestra las curvas ROC obtenidas, así como los valores del área bajo la curva correspondientes.

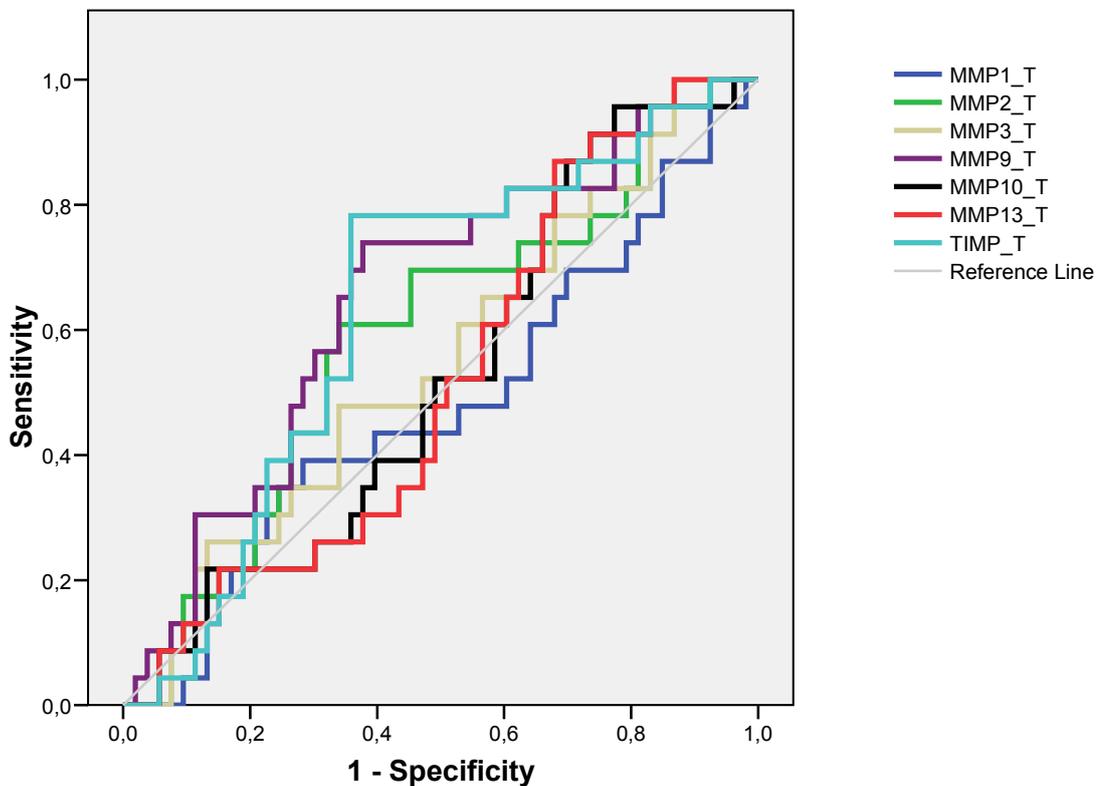


Figura 95: Curva ROC de los niveles de expresión de MMPs y TIMP-1 en relación a la supervivencia ajustada.

	Area	Error SD ^a	Sig.Asint. ^b	IC 95% asintótico	
				Lim Inferior	Lim Superior
MMP-1	,481	,074	,790	,335	,626
MMP-2	,591	,071	,207	,453	,730
MMP-3	,549	,071	,501	,410	,688
MMP-9	,650	,068	,039	,516	,784
MMP-10	,524	,069	,739	,389	,660
MMP-13	,519	,069	,790	,385	,654
TIMP-1	,633	,067	,066	,501	,765

Tabla 29: Valores del área bajo la curva de las curvas ROC de MMPs y TIMP-1 en relación a la supervivencia ajustada.

De acuerdo con los resultados obtenidos, los niveles de expresión de la MMP-9 fueron los únicos que se relacionaron de forma significativa con la supervivencia ajustada, apreciándose una tendencia hacia la significación estadística en el caso del TIMP-1.

Se evaluó el papel jugado por las variables clínicas, como la localización del tumor o el estadiaje en la capacidad pronóstica de los niveles de expresión de las MMPs, sin que se apreciaran diferencias respecto al patrón mostrado para el total de los pacientes, salvo en el caso de los pacientes con carcinomas de laringe-hipofaringe para los cuales la curva ROC correspondiente a la determinación del TIMP-1 alcanzó valores de significación estadística.

La capacidad pronóstica de los niveles de expresión de las MMPs sí que se vio influida de forma notable por el tipo de tratamiento empleado. La capacidad de discriminación de la MMP-9 apareció de forma preferente en el grupo de pacientes sometidos a tratamiento conservador con radioterapia, en tanto que para los pacientes que recibieron tratamiento quirúrgico perdió parte de su capacidad de discriminación pronóstica.

La Figura 96 y Tabla 30 muestran las curvas ROC y los valores del área bajo la curva correspondientes al grupo de pacientes tratados con radioterapia (n=37).

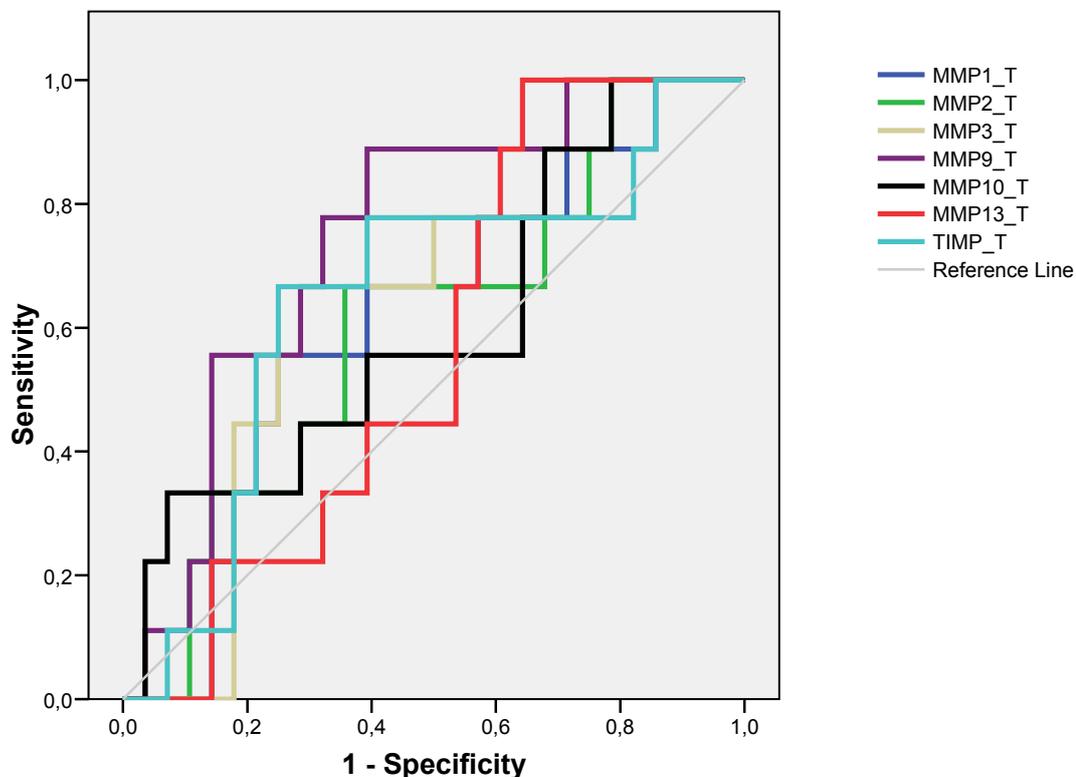


Figura 96: Curva ROC de la expresión de MMPs y TIMP-1 en relación a los pacientes tratados con radioterapia.

	Area	Error SD ^a	Sig.Asint. ^b	IC 95% asintótico	
				Lim Inferior	Lim Superior
MMP-1	,615	,105	,304	,410	,820
MMP-2	,603	,106	,357	,396	,811
MMP-3	,651	,097	,179	,461	,841
MMP-9	,746	,088	,028	,575	,918
MMP-10	,603	,110	,357	,387	,820
MMP-13	,567	,096	,547	,380	,755
TIMP-1	,647	,108	,190	,435	,859

Tabla 30: Valores del área bajo la curva de las curvas ROC de MMPs y TIMP-1 en relación a pacientes tratados con RT.

A pesar de tratarse de un grupo reducido de pacientes, los niveles de expresión de MMP-9 alcanzaron significación estadística, con un valor de área bajo la curva considerable.

Por el contrario, al considerar al grupo de pacientes tratados con cirugía (n=39), que incluye los casos que recibieron radioterapia postoperatoria, ninguno de los niveles de expresión evaluados alcanzó la significación estadística en el estudio mediante curvas ROC (Figura 97, Tabla 31).

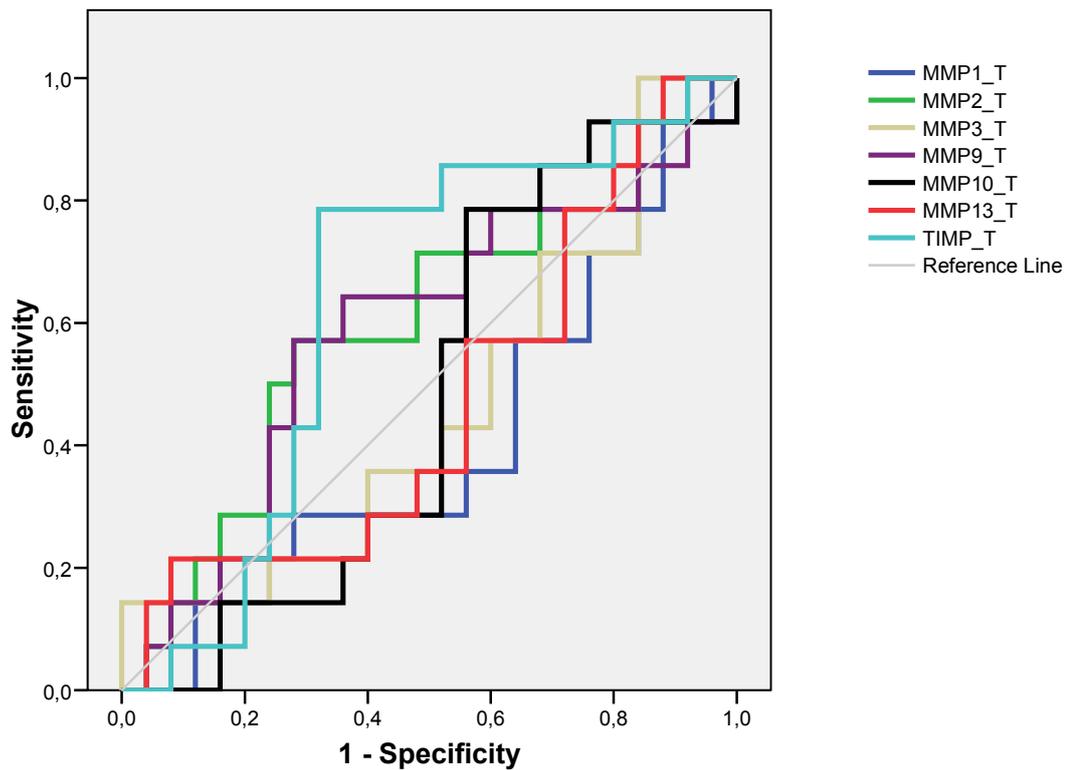


Figura 97: Curva ROC de la expresión de MMPs y TIMP-1 en relación a los pacientes tratados con cirugía.

	Area	Error SD ^a	Sig.Asint. ^b	IC 95% asintótico	
				Lim Inferior	Lim Superior
MMP-1	,406	,96	,334	,217	,594
MMP-2	,597	,097	,320	,406	,788
MMP-3	,466	,098	,725	,273	,658
MMP-9	,583	,099	,396	,388	,778
MMP-10	,480	,094	,838	,295	,665
MMP-13	,471	,098	,770	,279	,664
TIMP-1	,634	,093	,169	,452	,817

Tabla 31: Valores del área bajo la curva de las curvas ROC de MMPs y TIMP-1 en relación a pacientes tratados con cirugía.

7.- CAPACIDAD PRONÓSTICA DE LA MMP-9.

De los resultados obtenidos con el estudio de las curvas ROC se deduce que los niveles de expresión que se relacionaron de forma más significativa con la supervivencia fueron la MMP-9 y el TIMP-1. Para determinar los puntos de corte correspondientes a los niveles de expresión que permitiesen discriminar de forma adecuada el pronóstico en nuestra cohorte de pacientes, se utilizó un árbol de clasificación, con el método *CRT (classification and regression trees)* como técnica de partición.

Al considerar como variable independiente los valores de expresión de la MMP-9 se obtuvo el siguiente árbol de clasificación.

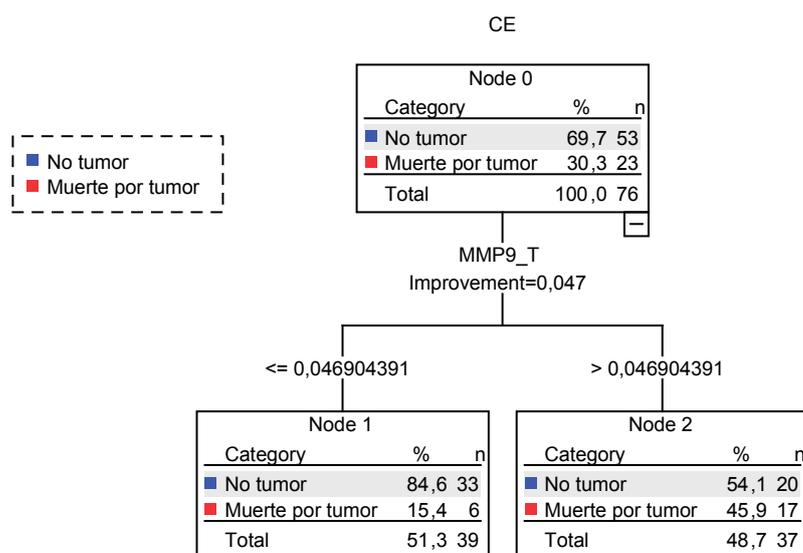


Figura 98: Resultados de CRT usando como variable independiente la MMP-9.

De acuerdo con este método, el punto de corte que conseguía una mejor discriminación pronóstica correspondió al valor de expresión de MMP-9 de 0.047, que dividió la muestra en dos grupos con prácticamente el mismo número de pacientes.

La siguiente figura muestra las curvas de supervivencia ajustada obtenidas al clasificar los pacientes de acuerdo con este punto de corte, donde el grupo 1 representa los pacientes con valores de MMP-9 por debajo del punto de corte (n=39), y el grupo 2 los pacientes con valores superiores al mismo (n=37).

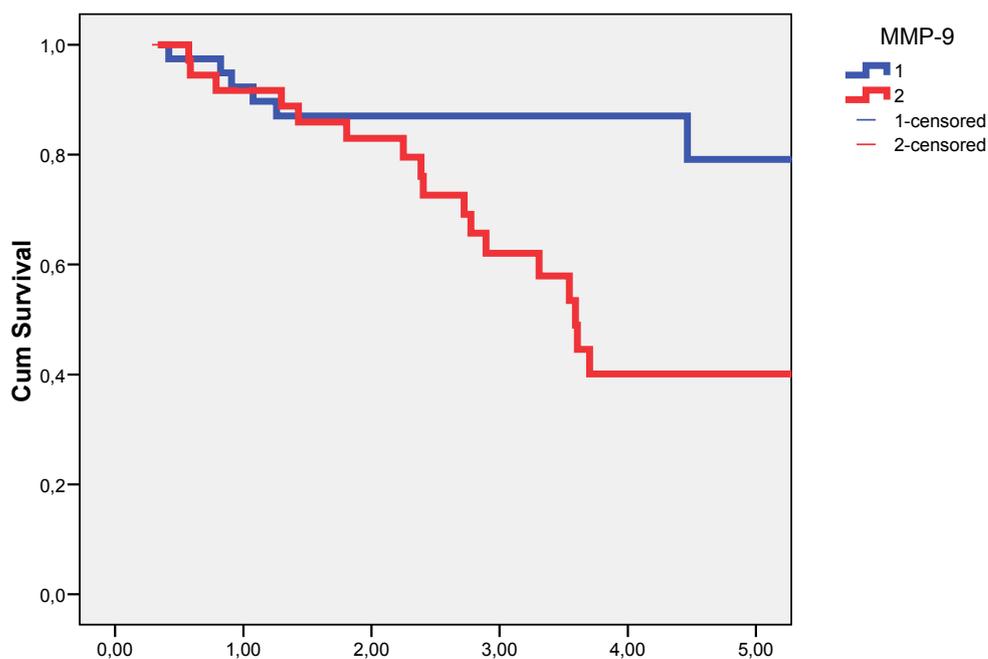


Figura 99: Curvas de supervivencia ajustada en función del punto de corte de la MMP-9.

La supervivencia ajustada a los 5 años para los pacientes con niveles bajos de MMP-9 fue del 79.1% (IC 95%: 61.5-96.7%) y para los pacientes con niveles elevados del 40.1% (IC 95%: 21.1-59.1%). Existieron diferencias significativas en la supervivencia en función de los niveles de expresión de la MMP-9 (P=0.004).

Tal como señalamos al analizar las curvas ROC, gran parte de la capacidad pronóstica asociada a los niveles de expresión de la MMP-9 apareció a expensas de los pacientes tratados con radioterapia. En la Figura 100 se

exponen las curvas de supervivencia en función de los niveles de MMP-9 de acuerdo al tipo de tratamiento realizado.

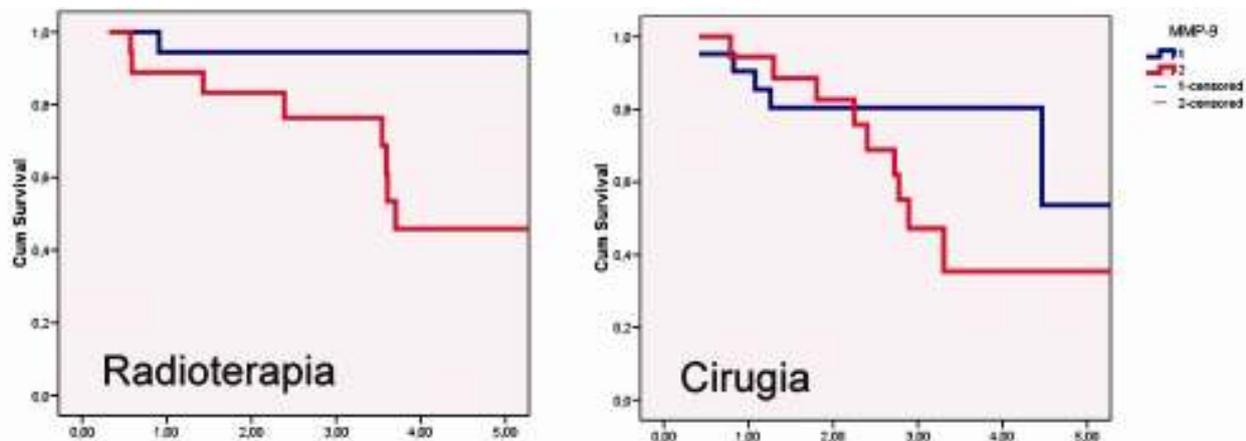


Figura 100: Curvas de supervivencia ajustada de los niveles de MMP-9 en función de la modalidad terapéutica.

No existieron diferencias significativas en la supervivencia en los pacientes tratados de forma quirúrgica ($P=0.110$), en tanto que para los pacientes tratados con radioterapia el nivel de expresión de la MMP-9 contó con una notable capacidad pronóstica ($P=0.011$).

La Tabla 32 muestra los resultados obtenidos con un estudio multivariante realizado de acuerdo con el modelo de riesgos proporcionales de Cox. Se incluyeron como variables independientes la localización del tumor (cavidad oral-orofaríngea vs laringe-hipofaríngea), la categoría de extensión local (T1-2 vs T3-4) y regional (N0 vs N+), y la clasificación de los pacientes de acuerdo con los niveles de expresión de la MMP-9, y como variable dependiente la supervivencia ajustada.

	Sig.	Exp(B)	IC 95% para Exp(B)	
Cavidad oral-orofaringe		1		
Laringe-hipofaringe	,213	,586	,253	1,359
T1-2		1		
T3-4	,736	1,158	,493	2,722
N0		1		
N+	,296	1,580	,670	3,725
MMP-9 bajo		1		
MMP-9 alto	,010	3,428	1,340	8,771

Tabla 32: Estudio multivariante de la supervivencia ajustada en relación a la localización, estadio, la presencia de metástasis ganglionar y niveles de MMP-9.

La única variable que contó con capacidad pronóstica independiente fue el grado de expresión correspondiente a la MMP-9. En relación a los pacientes que contaron con un nivel de expresión bajo, los pacientes con un nivel de expresión elevado contaron con un riesgo de fallecimiento asociado al tumor 3.4 veces superior (IC 95%: 1.3-8.7).

Al realizar el análisis multivariante en función del tipo de tratamiento, las conclusiones fueron similares a los hallazgos encontrados al valorar las curvas de supervivencia. Para los pacientes tratados con radioterapia, la única variable con capacidad pronóstica siguió siendo la expresión de la MMP-9 (OR 7.2, IC 95%: 0.9-58.7, P=0.064), en tanto que para los pacientes quirúrgicos ninguna de las variables estudiadas guardó relación significativa con el resultado.

Se procedió a analizar la causa de fracaso terapéutico en función del nivel de expresión de la MMP-9. La Tabla 33 refleja el porcentaje de pacientes con recidiva local, regional o a distancia de la enfermedad en función de la expresión de la MMP-9.

	Grupo 1	Grupo 2	P
	(MMP-9 bajo)	(MMP-9 alto)	
Recidiva local	10.3%	37.8%	0.005
Recidiva regional	10.3%	13.5%	0.733
Metástasis a distancia	7.7%	13.5%	0.475

Tabla 33: Porcentaje de pacientes con recidiva local, regional y metástasis a distancia en función de los niveles de MMP-9.

Tal como puede apreciarse, el pronóstico asociado a la presencia de unos niveles elevados de MMP-9 fue consecuencia del peor control local conseguido en este grupo de pacientes, en tanto que no se apreciaron diferencias significativas en el fracaso regional o a distancia en función del nivel de expresión de la MMP-9.

La siguiente tabla muestra los porcentajes de recidiva a diferentes niveles para los pacientes tratados con radioterapia.

	Grupo 1	Grupo 2	P
	(MMP-9 bajo)	(MMP-9 alto)	
Recidiva local	11.1%	57.9%	0.003
Recidiva regional	5.6%	15.8%	0.604
Metástasis a distancia	0%	10.5%	0.486

Tabla 34: Porcentaje de pacientes con recidiva local, regional y metástasis a distancia tratados con radioterapia, en función de los niveles de MMP-9.

De igual manera, se presentan los porcentajes de fracaso correspondientes a los pacientes tratados con cirugía.

	Grupo 1 (MMP-9 bajo)	Grupo 2 (MMP-9 alto)	P
Recidiva local	9.5%	16.7%	0.647
Recidiva regional	14.3%	11.1%	1.00
Metástasis a distancia	14.3%	16.7%	1.00

Tabla 35: Porcentaje de pacientes con recidiva local, regional y metástasis a distancia tratados con cirugía, en función de los niveles de MMP-9.

Tal como puede apreciarse, para los pacientes tratados con cirugía el nivel de expresión de la MMP-9 no se relacionó con el fracaso en ninguno de los niveles, en tanto que los pacientes con unos niveles elevados de MMP-9 tratados con radioterapia contaron con un incremento muy notable del porcentaje de fracasos a nivel local.

La siguiente figura muestra las curvas de supervivencia actuarial libres de recidiva local para los pacientes tratados con radioterapia en función del nivel de expresión de la MMP-9.

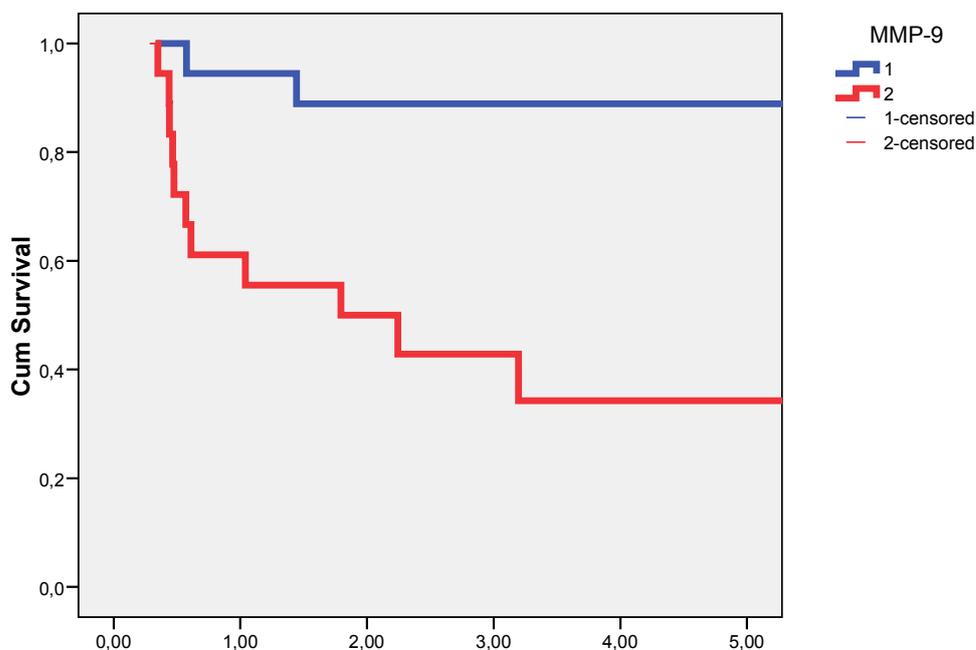


Figura 101: Curvas de supervivencia actuarial libres de recidiva local para los pacientes tratados con radioterapia en función del nivel de expresión de la MMP-9.

Para los pacientes tratados con radioterapia, existieron diferencias significativas en la supervivencia libre de enfermedad local en función del nivel de expresión de la MMP-9 ($P=0.001$). Los pacientes con unos niveles bajos contaron con una supervivencia libre de recidiva local a los 5 años del 88.9% (IC 95%: 74.4-103.4%), en tanto que para los pacientes con un nivel de expresión elevado descendió al 34.3% (IC 95%: 10.2-58.4%).

8.- CAPACIDAD PRONÓSTICA DEL TIMP-1.

En el caso del TIMP-1 se procedió de una manera similar. La siguiente figura muestra los resultados obtenidos al aplicar la técnica de clasificación CRT a los valores de expresión del TIMP-1.

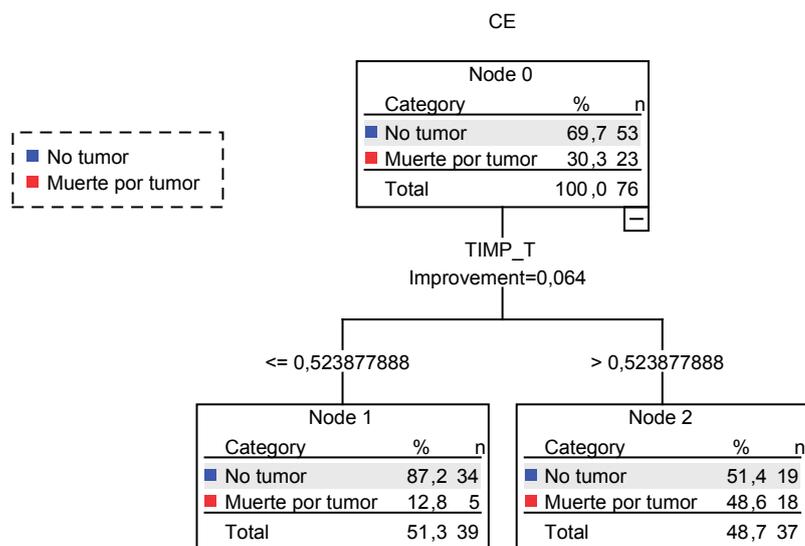


Figura 102: Resultados de CRT usando como variable independiente la expresión de TIMP-1.

Los pacientes con unos niveles elevados del TIMP-1 contaron con un peor pronóstico. Se muestra a continuación la curva de supervivencia ajustada correspondiente a los niveles de expresión del TIMP-1.

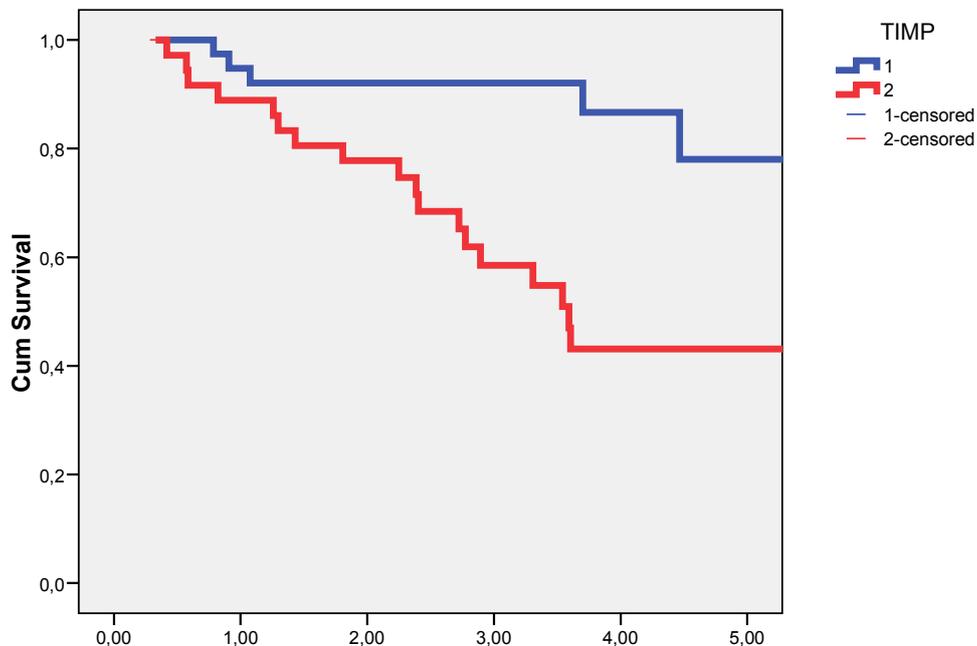


Figura 103: Curvas de supervivencia ajustada en función del punto de corte del TIMP-1.

La supervivencia ajustada a los 5 años para los pacientes con unos niveles de expresión bajos del TIMP-1 (n=39) fue del 78.0% (IC 95%: 58-98%) y la correspondiente a los pacientes con unos niveles elevados (n=37) del 43.1% (IC 95%: 25.1-61.1%). Existieron diferencias significativas en la supervivencia ajustada en función del grado de expresión del TIMP-1 (P=0.001).

De acuerdo con un análisis multivariante, el nivel de expresión del TIMP-1 fue la única de las variables evaluadas con capacidad pronóstica independiente, tal como puede apreciarse en los resultados de la Tabla 36.

	Sig.	Exp(B)	95,0% CI for Exp(B)	
Cavidad oral-orofaringe		1		
Laringe-hipofaringe	,209	,572	,239	1,369
T1-2		1		
T3-4	,948	1,030	,422	2,515
N0		1		
N+	,348	1,509	,639	3,561
TIMP-1 bajo		1		
TIMP-1 alto	,006	4,105	1,512	11,144

Tabla 36: Estudio multivariante de la supervivencia ajustada en relación a la localización, estado, la presencia de metástasis ganglionar y niveles de TIMP-1.

A diferencia de los que sucedía con la MMP-9, la capacidad discriminadora del TIMP-1 se mantuvo independiente del tipo de tratamiento realizado. La Figura 104 muestra las curvas de supervivencia ajustada en función de los niveles de expresión del TIMP-1 en relación al tipo de tratamiento efectuado.

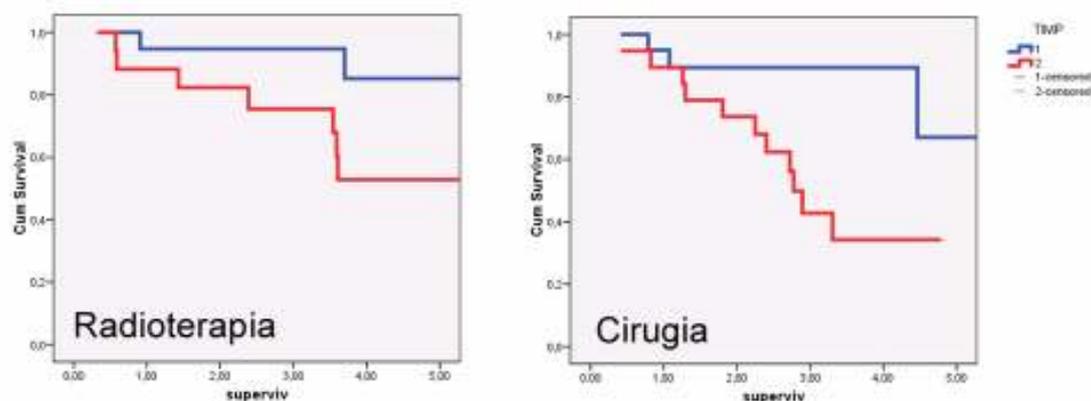


Figura 104: Curvas de supervivencia ajustada de los niveles del TIMP-1 en función de la modalidad terapéutica.

Existieron diferencias significativas en la supervivencia en función del nivel de expresión del TIMP-1 tanto para los pacientes tratados con radioterapia ($P=0.049$) como para los tratados con cirugía ($P=0.008$).

Al analizar el patrón de fracasos, también aparecieron ciertas diferencias respecto a los hallazgos obtenidos al analizar la MMP-9. La siguiente tabla muestra el porcentaje de fracasos a nivel local, regional y a distancia en función del nivel de expresión del TIMP-1.

	Grupo 1 (TIMP-1 bajo)	Grupo 2 (TIMP-1 alto)	P
Recidiva local	17.9%	29.7%	0.227
Recidiva regional	12.8%	10.8%	1.00
Metástasis a distancia	2.6%	18.9%	0.027

Tabla 37: Porcentaje de pacientes con recidiva local, regional y metástasis a distancia en función de los niveles de TIMP-1.

En este caso, si bien los pacientes con unos niveles de expresión del TIMP-1 elevados contaron con un porcentaje más alto de fracasos a nivel local, las diferencias no llegaron a alcanzar la significación estadística. Por el contrario, sí que aparecieron diferencias estadísticamente significativas en el riesgo de aparición de metástasis a distancia, que se concentraron de forma casi exclusiva en los pacientes con unos niveles elevados de TIMP-1.

La siguiente figura muestra las curvas de supervivencia libres de metástasis a distancia en función del grado de expresión del TIMP-1.

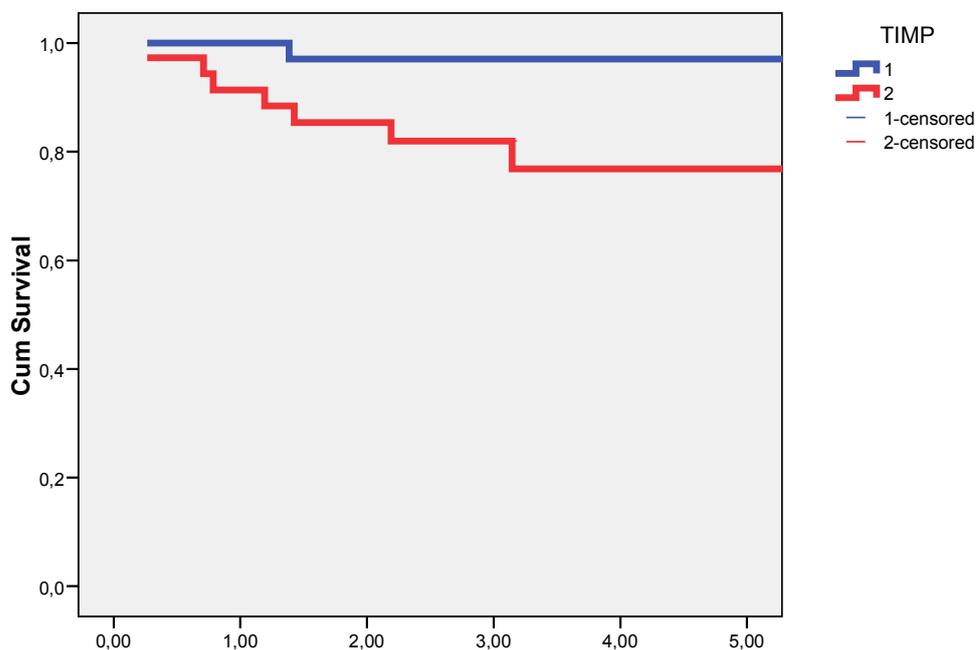


Figura 105: Curvas de supervivencia libres de metástasis a distancia en función del grado de expresión del TIMP-1

Se analizaron igualmente los patrones de fracaso en función del tipo de tratamiento. A continuación se muestra la tabla de porcentajes de fracaso correspondiente a los pacientes tratados con radioterapia.

	Grupo 1 (TIMP-1 bajo)	Grupo 2 (TIMP-1 alto)	P
Recidiva local	21.1%	50.0%	0.065
Recidiva regional	5.3%	16.7%	0.340
Metástasis a distancia	5.3%	5.6%	1.00

Figura 106: Porcentaje de pacientes con recidiva local, regional y metástasis a distancia tratados con radioterapia, en función de los niveles de TIMP-1.

Se procedió a analizar las causas de fracaso correspondientes a los pacientes sometidos a tratamiento quirúrgico.

	Grupo 1 (TIMP-1 bajo)	Grupo 2 (TIMP-1 alto)	P
Recidiva local	15.0%	10.5%	1.00
Recidiva regional	20.0%	5.3%	0.342
Metástasis a distancia	0%	31.6%	0.008

Figura 107: Porcentaje de pacientes con recidiva local, regional y metástasis a distancia tratados con cirugía, en función de los niveles de TIMP-1.

En este caso el patrón de fracaso en función del nivel de expresión del TIMP-1 correspondiente a los pacientes tratados con radioterapia fue predominantemente a expensas del control local de la enfermedad, pero sin llegar a alcanzar diferencias significativas. Para los pacientes tratados con cirugía el fracaso a nivel local y regional en los pacientes con niveles de expresión bajos fue algo superior, pero donde se produjeron diferencias notables en el resultado fue en relación a la diseminación metastásica del tumor, que afectó a casi un tercio de los pacientes con niveles elevados de expresión del TIMP-1.

9.- EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PRONÓSTICA CORRESPONDIENTE A LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LAS MMPs AGRUPADAS EN FUNCIÓN DE SU CATEGORÍA FUNCIONAL.

Dado que las diferentes MMPs cuentan con unas funciones metabólicas diferenciadas, se llevó a cabo una determinación de la capacidad pronóstica agrupando los niveles de actividad correspondientes para cada una de las categorías funcionales evaluadas: colagenasas (MMP-1 y -13), gelatinasas (MMP-2 y -9), y estromelisininas (MMP-3 y -10).

Para realizar la adición de la actividad correspondiente a cada una de las MMP, y teniendo en cuenta que no contaban con una distribución normal, se procedió a la estandarización de cada una de las variables a partir de su transformación logarítmica y la división del resultado por la media aritmética del logaritmo de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Valor MMP estandarizado} = \frac{\text{Ln MMP}}{\bar{X} \text{ Ln MMP}}$$

En la Figura 108 y Tabla 38 se muestran los valores de significación y área bajo la curva correspondientes a las curvas ROC obtenidas con valores normalizados de las colagenasas, gelatinasas, y estromelisininas.

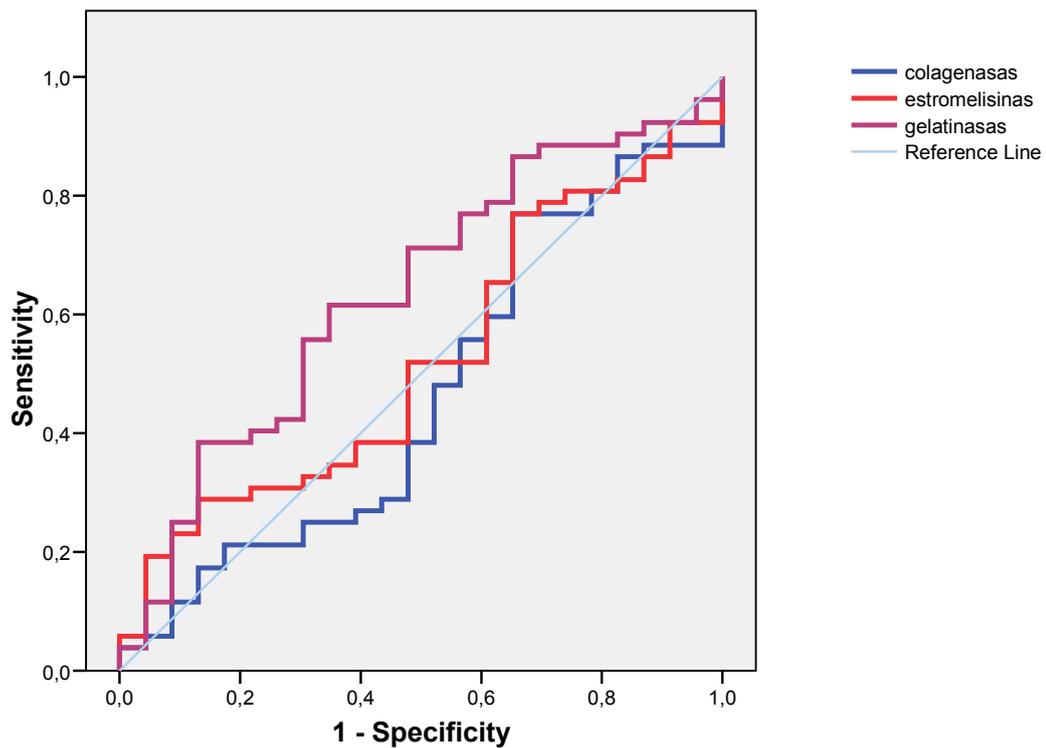


Figura 108: Curvas ROC correspondientes a la adición de los valores normalizados de las colagenasas, gelatinasas, y estromelisin.

	Area	Slg. Asint.(b)	IC 95% Asint.
Colagenasas	,467	,646	,322
Estromelisin	,523	,748	,385
Gelatinasas	,635	,063	,500

Tabla 38: Valores del área bajo la curva de las curvas ROC correspondientes a la adición de los valores normalizados de las colagenasas, gelatinasas, y estromelisin.

Ninguna de las variables alcanzó un valor pronóstico significativo, apareciendo una tendencia en el caso de las gelatinasas. La principal conclusión sería que la actividad conjunta de los diferentes tipos de MMPs no mejora la capacidad pronóstica respecto a la que posee la expresión individual de cada uno de los genes.

10.- EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PRONÓSTICA CORRESPONDIENTE A LA VALORACIÓN CONJUNTA DE LOS NIVELES DE MMPs Y TIMP-1.

Dado que el papel fundamental del TIMP-1 consiste en inhibir de forma directa la actividad de las MMPs, se valoró si la interacción del valor del TIMP-1 con el correspondiente de las diferentes MMPs podía contar con capacidad pronóstica.

En primer lugar se evaluó el cociente entre el valor de cada una de las MMPs analizadas y el correspondiente al TIMP-1. La siguiente figura muestra los resultados obtenidos al utilizar curvas ROC en la valoración de la supervivencia ajustada con los cocientes MMP/TIMP-1.

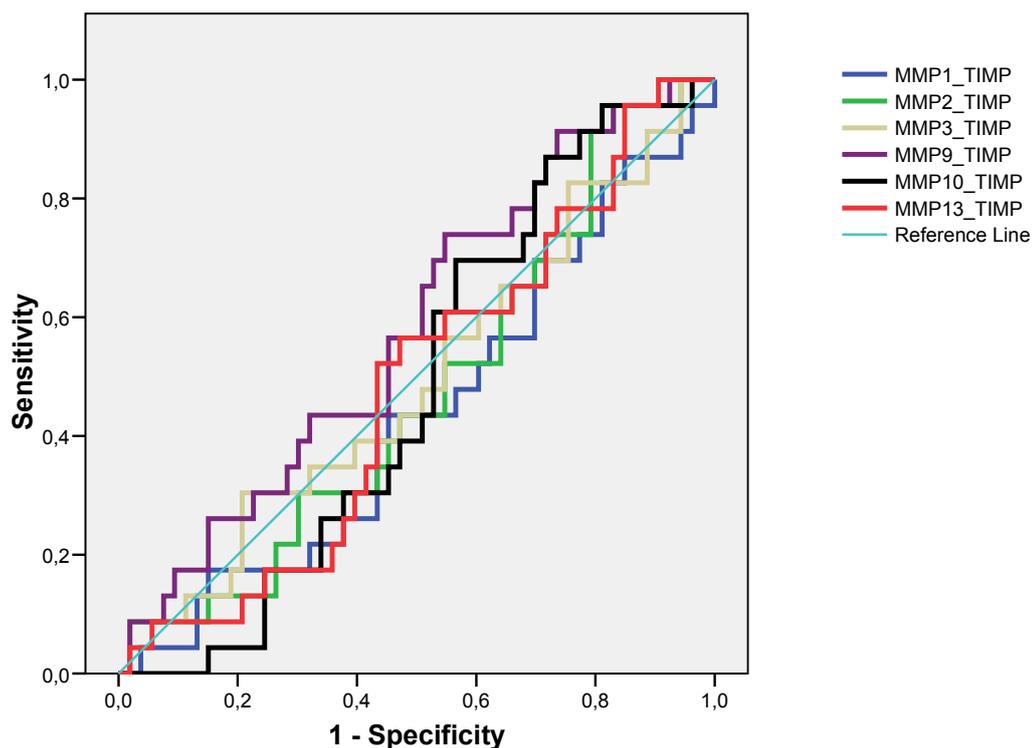


Figura 109: Curvas ROC de la valoración de la supervivencia ajustada en relación a los cocientes MMP/TIMP-1.

La siguiente tabla muestra los valores del área bajo la curva correspondiente a las curvas ROC.

	Area	Error SD ^a	Sig.Asint. ^b	IC 95% asintótico	
				Lim Inferior	Lim Superior
MMP-1/ TIMP-1	,437	,071	,387	,298	,577
MMP-2/ TIMP-1	,475	,070	,730	,337	,613
MMP-3/ TIMP-1	,494	,073	,932	,350	,637
MMP-9/ TIMP-1	,580	,069	,270	,444	,716
MMP-10/ TIMP-1	,480	,066	,782	,350	,610
MMP-13/ TIMP-1	,482	,070	,799	,345	,618

Tabla 39: Valores del área bajo la curva de las curvas ROC de la valoración de la supervivencia ajustada en relación a los cocientes MMP/TIMP-1.

El cociente MMP/TIMP-1 no consiguió mejorar la capacidad pronóstica, no alcanzando un nivel de significación en las curvas ROC ninguno de los cocientes analizados.

Se evaluó a continuación la capacidad pronóstica correspondiente al producto MMP x TIMP-1. La Figura 110 y Tabla 40 muestran las curvas ROC obtenidas a partir de estos productos y los valores del área bajo la curva.

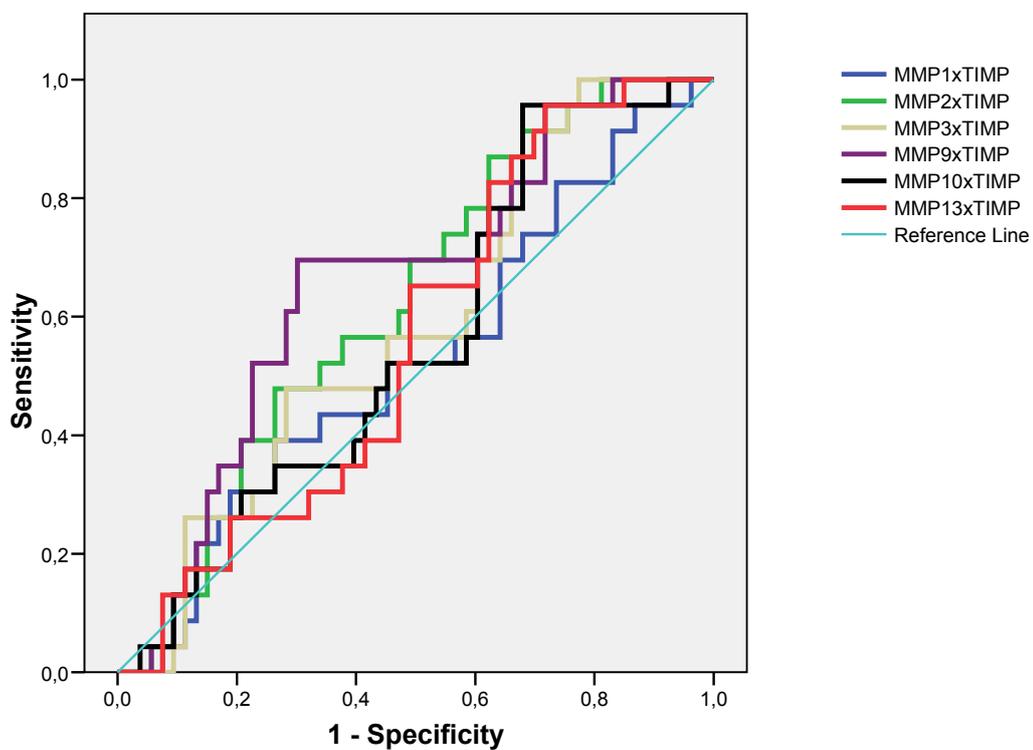


Figura 110: Curvas ROC de la valoración de la supervivencia ajustada en relación al producto MMPxTIMP-1.

	Area	Error SD ^a	Sig. Asint. ^b	IC 95% asintótico	
				Lim Inferior	Lim Superior
MMP-1x TIMP-1	,528	,072	,696	,387	,670
MMP-2x TIMP-1	,624	,065	,087	,496	,753
MMP-3x TIMP-1	,586	,068	,237	,453	,719
MMP-9x TIMP-1	,656	,067	,031	,526	,787
MMP-10x TIMP-1	,558	,068	,425	,424	,692
MMP-13x TIMP-1	,560	,067	,406	,429	,692

Tabla 40: Valores del área bajo la curva de las curvas ROC de la valoración de la supervivencia ajustada en relación al producto MMPxTIMP-1.

En este caso, la única variable que alcanzó significación estadística en la valoración de las curvas ROC fue el producto MMP-9 x TIMP-1, en tanto que el correspondiente al producto MMP-2 x TIMP-1 contó con una tendencia hacia la significación.

La siguiente figura muestra los valores de curvas ROC obtenidos con los valores de expresión de MMP-9 y TIMP-1, así como su cociente (MMP-9 / TIMP-1) y su producto (MMP-9 x TIMP-1), con los valores del área bajo la curva correspondientes (Tabla 41).

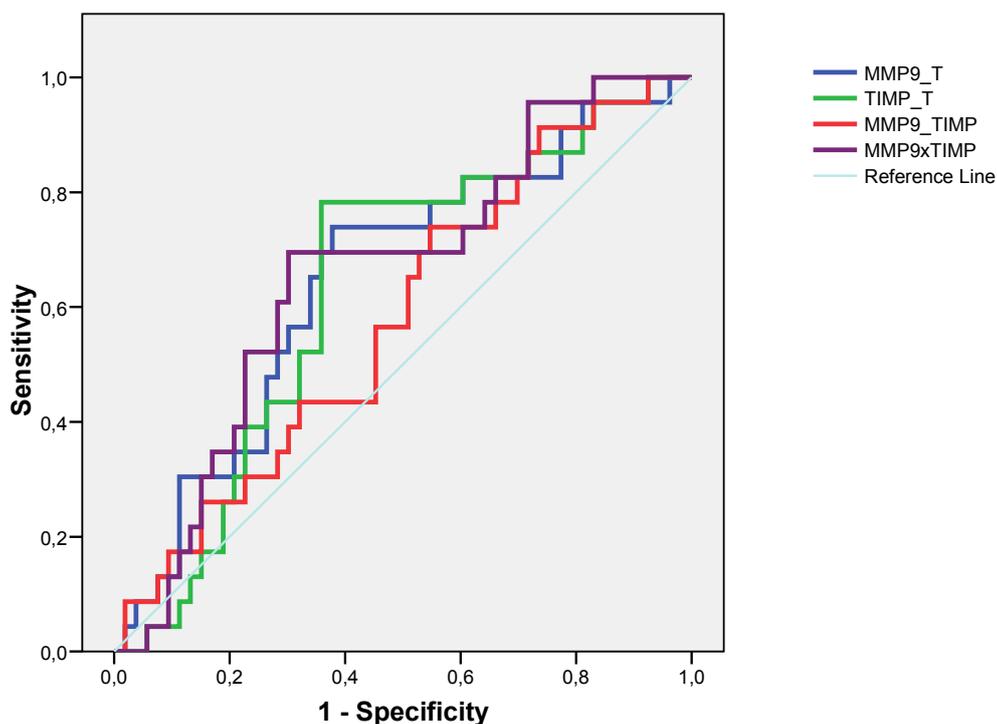


Figura 111: Curvas ROC obtenidos con los valores de expresión de MMP-9 y TIMP-1, así como su cociente (MMP-9 / TIMP-1) y su producto (MMP-9 x TIMP-1).

	Area	Error SD ^a	Sig.Asint. ^b	IC 95% asintótico	
				Lim Inferior	Lim Superior
MMP-9	,650	,068	,039	,516	,784
TIMP-1	,633	,067	,066	,501	,765
MMP-9/ TIMP-1	,580	,069	,270	,444	,716
MMP-9x TIMP-1	,656	,067	,031	,526	,787

Tabla 41: Valores del área bajo la curva de las curvas ROC obtenidos con los valores de expresión de MMP-9 y TIMP-1, así como su cociente (MMP-9 / TIMP-1) y su producto (MMP-9 x TIMP-1).

Tal como puede observarse, la variable que obtuvo un valor de área bajo la curva más elevado fue el correspondiente al producto MMP-9xTIMP-1.

Tal como se procedió al analizar la MMP-9 y el TIMP-1, se realizó un estudio de clasificación CRT para evaluar el punto de corte con mayor capacidad de discriminación pronóstica correspondiente a esta nueva variable.

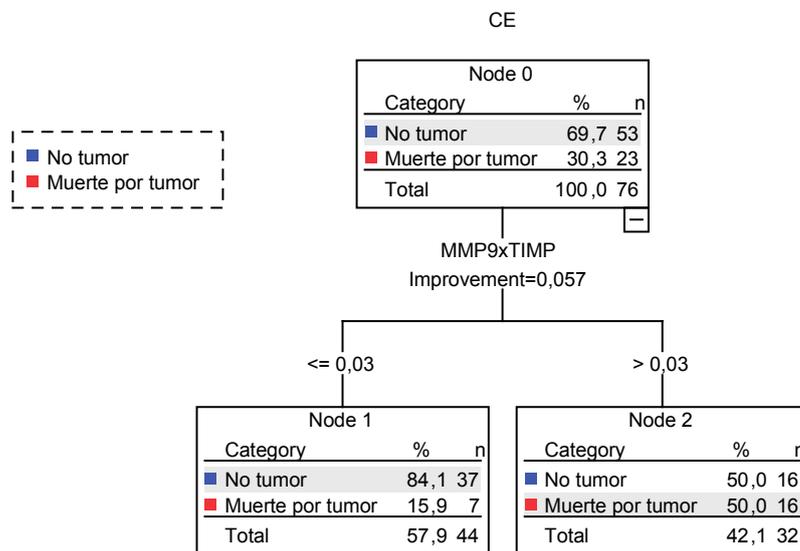


Figura 112: Resultados de CRT usando como variable independiente la expresión del producto de MMP-9xTIMP-1.

De acuerdo con el punto de corte obtenido, se llevó a cabo una determinación de la supervivencia ajustada.

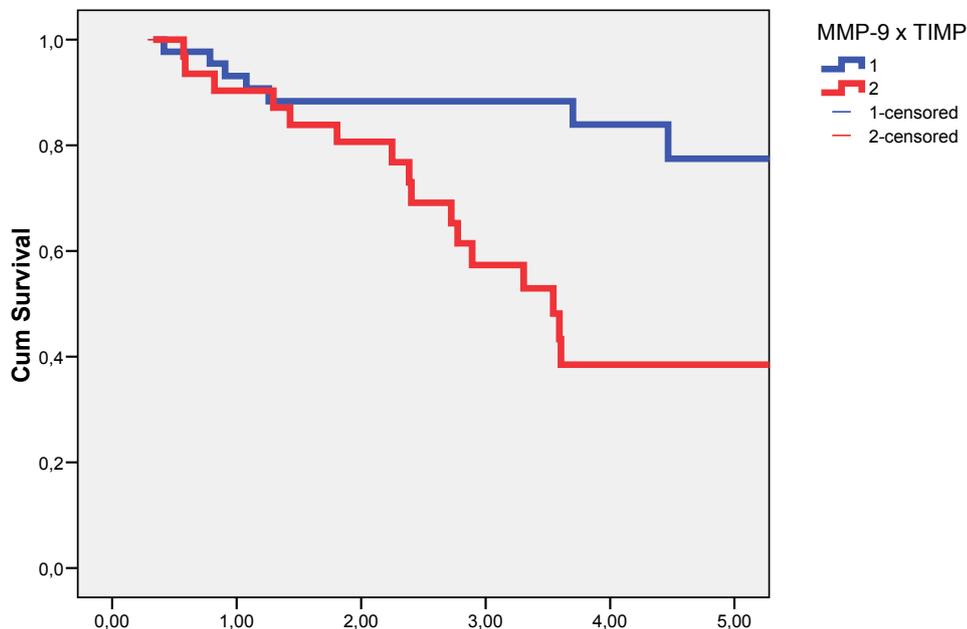


Figura 113: Curvas de supervivencia ajustada en función del punto de corte del producto de MMP-9xTIMP-1.

Existieron diferencias significativas en la supervivencia ajustada en función de la categoría correspondiente al producto MMP-9 x TIMP-1 ($P=0.002$). La supervivencia ajustada a los 5 años para los pacientes con unos valores bajos del producto fue del 77.5% (IC 95%: 60.8-94.2%), y para los pacientes con los valores elevados disminuyó hasta el 38.5% (IC 95%: 18.9-58.1%).

Al igual que con la MMP-9 y el TIMP-1, se procedió a valorar la capacidad pronóstica del producto MMP-9 x TIMP-1 en relación al tipo de tratamiento empleado. La Figura 114 muestra las curvas de supervivencia ajustada de acuerdo con los niveles del producto MMP-9 x TIMP-1 en función del tratamiento efectuado.

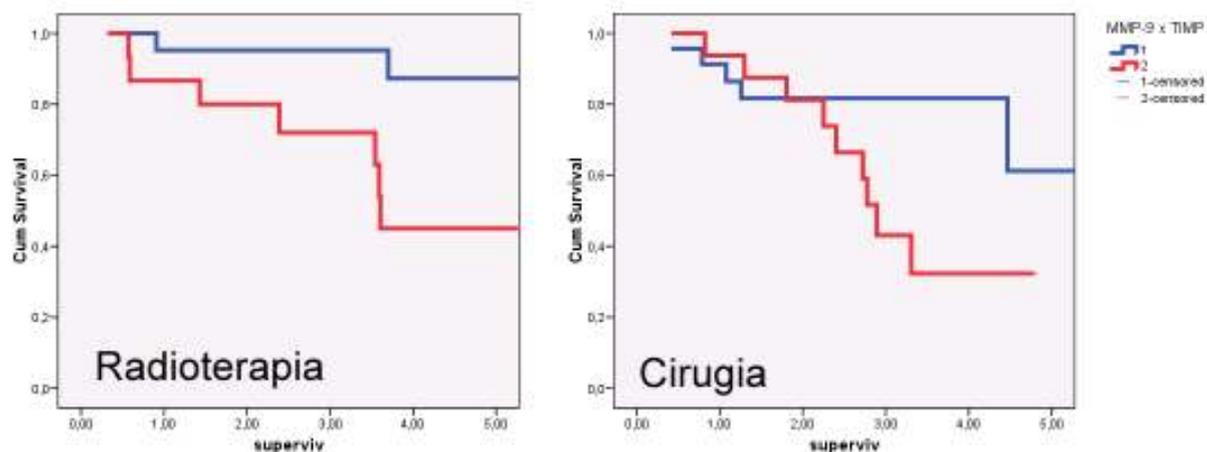


Figura 114: Curvas de supervivencia ajustada del producto de MMP-9xTIMP-1 en función de la modalidad terapéutica.

Existieron diferencias significativas en la supervivencia en función de los niveles del producto MMP-9 x TIMP-1 tanto para los pacientes tratados con radioterapia ($P=0.011$) como para los tratados con cirugía ($P=0.045$).

Al considerar las causas de fracaso, pudo apreciarse una tendencia hacia un peor control local para los pacientes con niveles elevados del producto MMP-9 x TIMP-1, en tanto que no existieron diferencias significativas en cuanto al riesgo de fracaso a nivel regional o a distancia.

	Grupo 1 (MMP-9xTIMP-1 bajo)	Grupo 2 (MMP-9xTIMP-1 alto)	P
Recidiva local	15.9%	34.4%	0.062
Recidiva regional	11.4%	12.5%	1.0
Metástasis a distancia	6.8%	15.6%	0.270

Tabla 42: Porcentaje de pacientes con recidiva local, regional y metástasis a distancia en función del nivel del producto de MMP-9xTIMP-1.

Al analizar las causas de fracaso en función del tipo de tratamiento utilizado de acuerdo con los niveles correspondientes al producto MMP-9 x TIMP-1, pudo observarse como para los pacientes tratados con radioterapia aparecieron diferencias significativas en el control local, en tanto que para los pacientes tratados con cirugía las mayores diferencias aparecieron en el riesgo de metástasis a distancia, tal como muestran los resultados que se exponen en las siguientes tablas.

Grupo de pacientes tratados con radioterapia (n=37)

	Grupo 1	Grupo 2	P
	(MMP-9xTIMP-1 bajo)	(MMP-9xTIMP-1 alto)	
Recidiva local	19.0%	56.3%	0.019
Recidiva regional	4.8%	18.8%	0.296
Metástasis a distancia	4.8%	6.3%	1.00

Tabla 43: Porcentaje de pacientes con recidiva local, regional y metástasis a distancia tratados con radioterapia, en función del nivel del producto de MMP-9xTIMP-1.

Grupo de pacientes tratados con cirugía (n=39)

	Grupo 1	Grupo 2	P
	(MMP-9xTIMP-1 bajo)	(MMP-9xTIMP-1 alto)	
Recidiva local	13%	12.5%	1.00
Recidiva regional	17.4%	6.3%	0.631
Metástasis a distancia	8.7%	25%	0.205

Tabla 44: Porcentaje de pacientes con recidiva local, regional y metástasis a distancia tratados con cirugía, en función del nivel del producto de MMP-9xTIMP-1.

11.- RELACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LAS MMPs Y EL TIMP-1 CON LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON QUIMIOTERAPIA DE INDUCCIÓN.

Tal como se puso de manifiesto en la introducción, existen indicios clínicos y experimentales que señalan una posible relación entre la actividad de determinadas MMPs y la respuesta conseguida al tratamiento con quimioterapia de inducción.

A pesar de tratarse de una muestra limitada y heterogénea para evaluar este propósito, se llevó a cabo una determinación de la posible relación entre la expresión de las MMPs y TIMP-1 evaluados y la respuesta a la quimioterapia.

Un total de 22 pacientes incluidos en el estudio iniciaron la secuencia terapéutica con un tratamiento con quimioterapia de inducción. El tipo de quimioterapia utilizado consistió en la administración de CDDP-5 fluoruracilo en 18 ocasiones, y CDDP-5 fluoruracilo-paclitaxel en 3. De los pacientes que iniciaron tratamiento con quimioterapia de inducción, uno recibió sólo un ciclo de quimioterapia por toxicidad, no siendo valorada la respuesta. Para los 21 pacientes restantes que completaron el tratamiento neoadyuvante, se consiguió una respuesta completa a nivel de la localización primaria del tumor en 3 ocasiones, parcial superior al 50% en 7, parcial inferior al 50% en 9, y una ausencia de respuesta en 2. De cara a mejorar la potencia del estudio estadístico, se agruparon las respuestas completas y parciales superiores al 50% (n=10, 48%) y las respuestas inferiores (n=11, 52%).

La siguiente tabla muestra los resultados del test no paramétrico de Mann-Whitney en que se evaluó la relación entre los niveles de expresión de las diferentes MMPs estudiadas y el TIMP-1, y los niveles de respuesta a la quimioterapia de inducción.

	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-9	MMP-10	MMP-13	TIMP-1
Mann-Whitney U	45	53	49	48	40	43	52
Wilcoxon W	111	119	115	114	106	98	118
Z	-,704	-,141	-,423	-,493	-1,056	-,845	-,211
Sig. Asint. (2colas)	,481	,888	,673	,622	,291	,398	,833
Sig. Exacta [2*(1-cola sig.)]	,512(a)	,918(a)	,705(a)	,654(a)	,314(a)	,426(a)	,863(a)

Tabla 45: Relación entre los niveles de expresión de las MMPs y TIMP-1, y los niveles de respuesta a la quimioterapia de inducción.

No existieron diferencias significativas en los niveles de expresión de ninguna de las MMPs ni del TIMP-1 en función del grado de respuesta conseguido tras la administración del tratamiento con quimioterapia.

12.- RELACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LAS MMPs CON LOS DE OTROS GENES QUE PARTICIPAN EN LOS PROCESOS DE CARCINOGENESIS EN LOS PACIENTES CON CARCINOMAS DE CABEZA Y CUELLO.

El presente estudio pretende evaluar de forma específica la importancia de la expresión de las MMPs en los pacientes con carcinomas de cabeza y cuello, pero fue llevado a cabo dentro de un proyecto más general en que se analizaba la expresión de diferentes genes implicados en los procesos de inflamación relacionados con el desarrollo de carcinomas de cabeza y cuello. Por ello, se dispuso de información referente a los niveles de expresión de diferentes genes que podrían tener relaciones más o menos directas con el papel metabólico jugado por las MMPs en los tumores de cabeza y cuello.

De entre los genes estudiados, se analizó la relación existente entre los niveles de expresión de las diferentes MMPs evaluadas y los genes responsables de la codificación de COX1, COX2, mPGES1, mPGES2, cPGES, SDF1, IL8, NF κ B, VEGF, y HIF.

Se presentan a continuación las tablas correspondientes a las correlaciones obtenidas con los diferentes genes analizados para cada una de las MMPs estudiadas y el TIMP-1.

MMP-1.

		MMP-1	COX-1	COX-2	mPGES-1	mPGES-2	Sdf-1	IL-8	NFKb	VGEF	HIF
MMP-1	Correlación Pearson Sig.	1	,708**	,397**	,744**	,493**	,812**	,583**	,685**	,557**	,778**
COX-1	Correlación Pearson Sig.	,708**	1	,389**	,693**	,426**	,834**	,495**	,595**	,304**	,623**
COX-2	Correlación Pearson Sig.	,397**	,389**	1	,417**	,154	,335**	,675**	,165	,312**	,345**
mPGES-1	Correlación Pearson Sig.	,744**	,693**	,417**	1	,534**	,697**	,650**	,552**	,508**	,775**
mPGES-2	Correlación Pearson Sig.	,493**	,426**	,154	,534**	1	,579**	,255	,886**	,639**	,602**
Sdf-1	Correlación Pearson Sig.	,812**	,834**	,335**	,697**	,579**	1	,512**	,795**	,520**	,788**
IL-8	Correlación Pearson Sig.	,583**	,495**	,675**	,650**	,255	,512**	1	,312**	,405**	,482**
NFKb	Correlación Pearson Sig.	,685**	,595**	,165	,552**	,886**	,795**	,312**	1	,622**	,710**
VGEF	Correlación Pearson Sig.	,557**	,304**	,312**	,508**	,639**	,520**	,405**	,622**	1	,773**
HIF	Correlación Pearson Sig.	,778**	,623**	,345**	,775**	,602**	,788**	,482**	,710**	,773**	1

Tabla 46: Correlación entre la expresión de MMP-1 y otros genes estudiados (COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2, Sdf-1, IL-8, NFKb, VGEF, HIF).

***. La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).*

**. La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).*

MMP-2.

		MMP-2	COX-1	COX-2	mPGES-1	mPGES-2	Sdf-1	IL-8	NFKb	VGEF	HIF
MMP-2	Correlación	1	,563**	,206	,680**	,861**	,747**	,484**	,891**	,587**	,678**
	Pearson Sig.		,000	,074	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000
COX-1	Correlación	,563**	1	,389**	,693**	,426**	,834**	,495**	,595**	,304**	,623**
	Pearson Sig.	,000		,001	,000	,000	,000	,000	,000	,008	,000
COX-2	Correlación	,206	,389**	1	,417**	,154	,335**	,675**	,165	,312**	,345**
	Pearson Sig.	,074	,001		,000	,185	,003	,000	,155	,006	,002
mPGES-1	Correlación	,680**	,693**	,417**	1	,534**	,697**	,650**	,552**	,508**	,775**
	Pearson Sig.	,000	,000	,000		,000	,000	,000	,000	,000	,000
mPGES-2	Correlación	,861**	,426**	,154	,534**	1	,579**	,255	,886**	,639**	,602**
	Pearson Sig.	,000	,000	,185	,000		,000	,026	,000	,000	,000
Sdf-1	Correlación	,747**	,834**	,335**	,697**	,579**	1	,512**	,795**	,520**	,788**
	Pearson Sig.	,000	,000	,003	,000	,000		,000	,000	,000	,000
IL-8	Correlación	,484**	,495**	,675**	,650**	,255	,512**	1	,312**	,405**	,482**
	Pearson Sig.	,000	,000	,000	,000	,026	,000		,006	,000	,000
NFKb	Correlación	,891**	,595**	,165	,552**	,886**	,795**	,312**	1	,622**	,710**
	Pearson Sig.	,000	,000	,155	,000	,000	,000	,006		,000	,000
VGEF	Correlación	,587**	,304**	,312**	,508**	,639**	,520**	,405**	,622**	1	,773**
	Pearson Sig.	,000	,008	,006	,000	,000	,000	,000	,000		,000
HIF	Correlación	,678**	,623**	,345**	,775**	,602**	,788**	,482**	,710**	,773**	1
	Pearson Sig.	,000	,000	,002	,000	,000	,000	,000	,000	,000	

Tabla 47: Correlación entre la expresión de MMP-2 y otros genes estudiados

***. La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).*

**. La correlación es significante al nivel 0,05 (bilateral).*

MMP-3.

		MMP-3	COX-1	COX-2	mPGES-1	mPGES-2	Sdf-1	IL-8	NFKb	VGEF	HIF
MMP-3	Correlación	1	,761**	,422**	,719**	,281*	,829**	,601**	,549**	,403**	,691**
	Pearson										
COX-1	Correlación	,761**	1	,389**	,693**	,426**	,834**	,495**	,595**	,304**	,623**
	Pearson										
COX-2	Correlación	,422**	,389**	1	,417**	,154	,335**	,675**	,165	,312**	,345**
	Pearson										
mPGES-1	Correlación	,719**	,693**	,417**	1	,534**	,697**	,650**	,552**	,508**	,775**
	Pearson										
mPGES-2	Correlación	,281*	,426**	,154	,534**	1	,579**	,255*	,886**	,639**	,602**
	Pearson										
Sdf-1	Correlación	,829**	,834**	,335**	,697**	,579**	1	,512**	,795**	,520**	,788**
	Pearson										
IL-8	Correlación	,601**	,495**	,675**	,650**	,255*	,512**	1	,312**	,405**	,482**
	Pearson										
NFKb	Correlación	,549**	,595**	,165	,552**	,886**	,795**	,312**	1	,622**	,710**
	Pearson										
VGEF	Correlación	,403**	,304**	,312**	,508**	,639**	,520**	,405**	,622**	1	,773**
	Pearson										
HIF	Correlación	,691**	,623**	,345**	,775**	,602**	,788**	,482**	,710**	,773**	1
	Pearson										
	Sig.		,000	,000	,000	,014	,000	,000	,000	,000	,000

Tabla 48: Correlación entre la expresión de MMP-3 y otros genes estudiados.

***. La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).*

**. La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).*

MMP-9.

		MMP-9	COX-1	COX-2	mPGES-1	mPGES-2	Sdf-1	IL-8	NFKb	VGEF	HIF
MMP-9	Correlación Pearson	1	,368**	,030	,377**	,737**	,536**	,187	,753**	,459**	,491**
	Sig.		,001	,794	,001	,000	,000	,105	,000	,000	,000
COX-1	Correlación Pearson	,368**	1	,389**	,693**	,426**	,834**	,495**	,595**	,304**	,623**
	Sig.	,001		,001	,000	,000	,000	,000	,000	,008	,000
COX-2	Correlación Pearson	,030	,389**	1	,417**	,154	,335**	,675**	,165	,312**	,345**
	Sig.	,794	,001		,000	,185	,003	,000	,155	,006	,002
mPGES-1	Correlación Pearson	,377**	,693**	,417**	1	,534**	,697**	,650**	,552**	,508**	,775**
	Sig.	,001	,000	,000		,000	,000	,000	,000	,000	,000
mPGES-2	Correlación Pearson	,737**	,426**	,154	,534**	1	,579**	,255	,886**	,639**	,602**
	Sig.	,000	,000	,185	,000		,000	,026	,000	,000	,000
Sdf-1	Correlación Pearson	,536**	,834**	,335**	,697**	,579**	1	,512**	,795**	,520**	,788**
	Sig.	,000	,000	,003	,000	,000		,000	,000	,000	,000
IL-8	Correlación Pearson	,187	,495**	,675**	,650**	,255	,512**	1	,312**	,405**	,482**
	Sig.	,105	,000	,00	,000	,026	,000		,006	,000	,000
NFKb	Correlación Pearson	,753**	,595**	,165	,552**	,886**	,795**	,312**	1	,622**	,710**
	Sig.	,000	,000	,155	,000	,000	,000	,006		,000	,000
VGEF	Correlación Pearson	,459**	,304**	,312**	,508**	,639**	,520**	,405**	,622**	1	,773**
	Sig.	,000	,008	,006	,000	,000	,000	,000	,000		,000
HIF	Correlación Pearson	,491**	,623**	,345**	,775**	,602**	,788**	,482**	,710**	,773**	1
	Sig.	,000	,000	,002	,000	,000	,000	,000	,000	,000	

Tabla 49: Correlación entre la expresión de MMP-9 y otros genes estudiados.

***. La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).*

**. La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).*

MMP-10.

		MMP-10	COX-1	COX-2	mPGES-1	mPGES-2	Sdf-1	IL-8	NFKb	VGEF	HIF
MMP-10	Correlación	1	,368**	,030	,377**	,737**	,536**	,187	,753**	,459**	,491**
	Pearson Sig.		,001	,794	,001	,000	,000	,105	,000	,000	,000
COX-1	Correlación	,368**	1	,389**	,693**	,426**	,834**	,495**	,595**	,304**	,623**
	Pearson Sig.	,001		,001	,000	,000	,000	,000	,000	,008	,000
COX-2	Correlación	,030	,389**	1	,417**	,154	,335**	,675**	,165	,312**	,345**
	Pearson Sig.	,794	,001		,000	,185	,003	,000	,155	,006	,002
mPGES-1	Correlación	,377**	,693**	,417**	1	,534**	,697**	,650**	,552**	,508**	,775**
	Pearson Sig.	,001	,000	,000		,000	,000	,000	,000	,000	,000
mPGES-2	Correlación	,737**	,426**	,154	,534**	1	,579**	,255**	,886**	,639**	,602**
	Pearson Sig.	,000	,000	,185	,000		,000	,026	,000	,000	,000
Sdf-1	Correlación	,536**	,834**	,335**	,697**	,579**	1	,512**	,795**	,520**	,788**
	Pearson Sig.	,000	,000	,003	,000	,000		,000	,000	,000	,000
IL-8	Correlación	,187	,495**	,675**	,650**	,255**	,512**	1	,312**	,405**	,482**
	Pearson Sig.	,105	,000	,000	,000	,026	,000		,006	,000	,000
NFKb	Correlación	,753**	,595**	,165	,552**	,886**	,795**	,312**	1	,622**	,710**
	Pearson Sig.	,000	,000	,155	,000	,000	,000	,006		,000	,000
VGEF	Correlación	,459**	,304**	,312**	,508**	,639**	,520**	,405**	,622**	1	,773**
	Pearson Sig.	,000	,008	,006	,000	,000	,000	,000	,000		,000
HIF	Correlación	,491**	,623**	,345**	,775**	,602**	,788**	,482**	,710**	,773**	1
	Pearson Sig.	,000	,000	,002	,000	,000	,000	,000	,000	,000	

Tabla 50: Correlación entre la expresión de MMP-10 y otros genes estudiados.

***. La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).*

**. La correlación es significante al nivel 0,05 (bilateral).*

MMP-13.

		MMP-13	COX-1	COX-2	mPGES-1	mPGES-2	Sdf-1	IL-8	NFKb	VGEF	HIF
MMP-13	Correlación	1	,179	-,035	,088	,168	,390**	,197	,387**	,412**	,487**
	Sig.		,122	,766	,452	,147	,000	,087	,001	,000	,000
COX-1	Correlación	,179	1	,389**	,693**	,426**	,834**	,495**	,595**	,304**	,623**
	Sig.	,122		,001	,000	,000	,000	,000	,000	,008	,000
COX-2	Correlación	-,035	,389**	1	,417**	,154	,335**	,675**	,165	,312**	,345**
	Sig.	,766	,001		,000	,185	,003	,000	,155	,006	,002
mPGES-1	Correlación	,088	,693**	,417**	1	,534**	,697**	,650**	,552**	,508**	,775**
	Sig.	,452	,000	,000		,000	,000	,000	,000	,000	,000
mPGES-2	Correlación	,168	,426**	,154	,534**	1	,579**	,255*	,886**	,639**	,602**
	Sig.	,147	,000	,185	,000		,000	,026	,000	,000	,000
Sdf-1	Correlación	,390**	,834**	,335**	,697**	,579**	1	,512**	,795**	,520**	,788**
	Sig.	,000	,000	,003	,000	,000		,000	,000	,000	,000
IL-8	Correlación	,197	,495**	,675**	,650**	,255*	,512**	1	,312**	,405**	,482**
	Sig.	,087	,000	,000	,000	,026	,000		,006	,000	,000
NFKb	Correlación	,387**	,595**	,165	,552**	,886**	,795**	,312**	1	,622**	,710**
	Sig.	,001	,000	,155	,000	,000	,000	,006		,000	,000
VGEF	Correlación	,412**	,304**	,312**	,508**	,639**	,520**	,405**	,622**	1	,773**
	Sig.	,000	,008	,006	,000	,000	,000	,000	,000		,000
HIF	Correlación	,487**	,623**	,345**	,775**	,602**	,788**	,482**	,710**	,773**	1
	Sig.	,000	,000	,002	,000	,000	,000	,000	,000	,000	

Tabla 51: Correlación entre la expresión de MMP-13 y otros genes estudiados.

***. La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).*

**. La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).*

TIMP-1.

		TIMP-1	COX-1	COX-2	mPGES-1	mPGES-2	Sdf-1	IL-8	NFKb	VGEF	HIF
TIMP-1	Correlación	1	,382**	,113	,516**	,549**	,621**	,278*	,730**	,602**	,805**
	Sig.		,001	,332	,000	,000	,000	,015	,000	,000	,000
COX-1	Correlación	,382**	1	,389**	,693**	,426**	,834**	,495**	,595**	,304**	,623**
	Sig.	,001		,001	,000	,000	,000	,000	,000	,008	,000
COX-2	Correlación	,113	,389**	1	,417**	,154	,335**	,675**	,165	,312**	,345**
	Sig.	,332	,001		,000	,185	,003	,000	,155	,006	,002
mPGES-1	Correlación	,516**	,693**	,417**	1	,534**	,697**	,650**	,552**	,508**	,775**
	Sig.	,000	,000	,000		,000	,000	,000	,000	,000	,000
mPGES-2	Correlación	,549**	,426**	,154	,534**	1	,579**	,255*	,886**	,639**	,602**
	Sig.	,000	,000	,185	,000		,000	,026	,000	,000	,000
Sdf-1	Correlación	,621**	,834**	,335**	,697**	,579**	1	,512**	,795**	,520**	,788**
	Sig.	,000	,000	,003	,000	,000		,000	,000	,000	,000
IL-8	Correlación	,278*	,495**	,675**	,650**	,255*	,512**	1	,312**	,405**	,482**
	Sig.	,015	,000	,000	,000	,026	,000		,006	,000	,000
NFKb	Correlación	,730**	,595**	,165	,552**	,886**	,795**	,312**	1	,622**	,710**
	Sig.	,000	,000	,155	,000	,000	,000	,006		,000	,000
VGEF	Correlación	,602**	,304**	,312**	,508**	,639**	,520**	,405**	,622**	1	,773**
	Sig.	,000	,008	,006	,000	,000	,000	,000	,000		,000
HIF	Correlación	,805**	,623**	,345**	,775**	,602**	,788**	,482**	,710**	,773**	1
	Sig.	,000	,000	,002	,000	,000	,000	,000	,000	,000	

Tabla 52: Correlación entre la expresión de TIMP-1 y otros genes estudiados.

***. La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).*

**. La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).*

Se detallan solamente las correlaciones con valores altos o muy altos para cada una de las MMPs y el TIMP-1.

			r
MMP-1	Muy altos	SDF-1	0.812
	Altos	HIF	0.778
		mPGES-1	0.744
		COX-1	0.708
		NFκB	0.685

Tabla 53: Valores de correlación entre la MMP-1 y el resto de los genes estudiados.
Muy alto (0.6<r<0.8); Alto (0.8<r<1.0).

			r
MMP-2	Muy altos	NFκB	0.891
		mPGES2	0.861
	Altos	SDF-1	0.747
		mPGES1	0.680
		HIF	0.678

Tabla 54: Valores de correlación entre la MMP-2 y el resto de los genes estudiados.
Muy alto (0.6<r<0.8); Alto (0.8<r<1.0).

			r
MMP-3	Muy altos	SDF-1	0.829
	Altos	COX-1	0.761
		mPGES1	0.719
		HIF	0.691
		IL8	0.601

Tabla 55 Valores de correlación entre la MMP-3 y el resto de los genes estudiados.
Muy alto (0.6<r<0.8); Alto (0.8<r<1.0).

			r
MMP-9	Altos	NFκB	0.737
		mPGES2	0.737

Tabla 56: Valores de correlación entre la MMP-9 y el resto de los genes estudiados.
Muy alto (0.6<r<0.8); Alto (0.8<r<1.0).

			r
MMP-10	Altos	HIF	0.703

Tabla 57: Valores de correlación significativo entre la MMP-10 y el resto de los genes estudiados.
Muy alto (0.6<r<0.8); Alto (0.8<r<1.0).

			r
MMP-13	No se alcanzó ninguna relación con $r > 0.6$		

Tabla 58: Valores de correlación entre la MMP-13 y el resto de los genes estudiados.
Muy alto (0.6<r<0.8); Alto (0.8<r<1.0).

			r
TIMP-1	Muy altos	HIF	0.805
	Altos	NFκB	0.730
		SDF-1	0.621
		VEGF	0.602

Tabla 59: Valores de correlación entre el TIMP-1 y el resto de los genes estudiados.
Muy alto ($0.6 < r < 0.8$); *Alto* ($0.8 < r < 1.0$).

De la totalidad de correlaciones significativas entre las diferentes variables analizadas, destacan la existencia de unas correlaciones alta o muy alta entre diferentes MMPs (MMP-1, -2, -3, y -9) y el TIMP-1 y factores nucleares como el SDF-1 y el NFκB, y la existencia de unos niveles de correlación alta o muy alta de MMPs (MMP-1, -2, -3, y -10) y el TIMP-1 con un gen relacionado con la promoción de la angiogénesis como el HIF.

Sólo la expresión de una de las MMPs estudiadas, la MMP-13, no mantuvo correlación a nivel alto o muy alto con ninguno de los genes estudiados.

VI.-DISCUSIÓN.

1.- EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LAS MMPs ENTRE EL TUMOR Y LA MUCOSA SANA.

De acuerdo con los resultados obtenidos en nuestro estudio, existieron diferencias significativas en la expresión de las diferentes MMPs evaluadas y el TIMP-1 entre el tejido tumoral y la mucosa sana. Para la mayoría de las MMPs estudiadas (MMP-1, -3, -10 y -13) la expresión correspondiente a las mucosas normales fue muy reducida o inexistente respecto a la correspondiente al tejido tumoral. Para las gelatinasas, MMP-2 y -9, así como para el TIMP-1, se evidenció un cierto grado de actividad a nivel del tejido no tumoral, pero en todo caso significativamente inferior a la del tumor.

Han sido diversos los autores que han analizado la expresión diferencial de los genes responsables de la codificación de las MMPs y sus inhibidores entre el tejido tumoral y la mucosa sana, en pacientes con carcinomas escamosos de cabeza y cuello mediante técnicas de PCR.

En un estudio en que se evaluaba la expresión de MMPs y TIMPs en pacientes con carcinomas de laringe, Birkedal-Hansen y cols³⁶ encontraron un incremento significativo en la expresión de MMP-10 y -14 y casi significativo en la MMP-3 en el tumor respecto a mucosa sana adyacente. Sin embargo no aparecieron diferencias en la MMP-7, MMP-11 y los TIMPs -1, -2 y -3. Los niveles de expresión medidos con PCR en una muestra limitada de 8 pacientes con carcinomas de laringe e hipofaringe por Magary y cols³⁷, mostraron unos resultados superiores en el tumor respecto a la mucosa sana para las MMPs -1, -2 y -9, en tanto que no se apreciaron diferencias en el nivel de expresión correspondiente al TIMP-1. Igualmente, Imanishi y cols¹³ encontraron un incremento significativo en la expresión de la MMP-2 y MMP-14 en el tumor

respecto a tejido sano en pacientes con carcinomas de cabeza y cuello. En un estudio de las MMPs asociadas a membrana en pacientes con carcinomas de supraglotis, Zhang y cols⁴⁴ demostraron unos niveles de expresión correspondientes a las MMPs -14, -15 y -16 significativamente aumentados en el tumor respecto a la mucosa sana.

En el estudio más extenso y completo desarrollado hasta la fecha de los niveles de transcripción correspondientes a los genes responsables de la codificación de las MMPs y los TIMPs, Stokes y cols⁴⁷ demostraron unos niveles de actividad en el tejido tumoral superiores a los presentes en la mucosa sana. Del total de genes evaluados, coincidiendo con nuestros hallazgos, la MMP-2 y el TIMP-1 fueron los que contaron con unos niveles de expresión más elevados en la mucosa sana, aunque significativamente inferior a los correspondientes al tejido tumoral.

Este incremento en los niveles de expresión transcripcional se vio confirmado por los estudios inmunohistoquímicos, en los que se demostraba unos niveles de positividad en el tumor superior al correspondiente a la mucosa sana.

Diversos autores han encontrado un incremento en la expresión de MMP-2^{33,52}, MMP-9^{33,44,46,52}, MMP-14⁴⁴, MMP-15⁴⁴ y MMP-16⁴⁴ en el carcinoma respecto a mucosa sana.

Finalmente, mediante técnicas de zimografía se ha demostrado que la actividad proteolítica del tejido tumoral supera de forma significativa a la de la mucosa sana^{15,52}.

Una de las limitaciones de los estudios en que se evalúa la actividad transcripcional de los genes mediante técnicas de RT-PCR, es que los niveles de expresión calculados no equivalen necesariamente a la actividad biológica

final ejercida por la proteína correspondiente. En el caso de las MMPs, existe un complejo grupo de factores post-transcripcionales con capacidad reguladora que podrían modificar el significado atribuido al nivel de expresión de un gen.

Además, no todas las MMPs sintetizadas contarían con actividad biológica, ya que dependen de la activación de la pro-MMP en MMP activa. En un estudio con Western blot realizado en 15 muestras pareadas de carcinoma de cavidad oral y mucosa normal, Chuang y cols⁶⁶ encontraron expresión de la MMP-7 en 9 de las 15 muestras del tumor, de las cuales en 8 (89%) se trataba de la forma activa de la proteína. Apareció expresión de MMP-7 en 2 de las muestras de mucosa normal, sin que en ninguno de los dos casos correspondiese a la forma activa de la proteína.

De todas formas, tal como se ha descrito anteriormente, el incremento en la actividad transcripcional en los carcinomas de cabeza y cuello se ha visto confirmado a nivel de la expresión de proteínas en estudios de inmunohistoquímica, así como de la actividad proteolítica, mediante técnicas de zimografía.

En un estudio desarrollado por Xie y cols⁶⁰ en pacientes con carcinomas de supraglotis en que se evaluó la expresión de las MMPs -1, -2, -7, -9 y -10 mediante RT-PCR e inmunohistoquímica, si bien no se llevó a cabo una correlación directa de los valores de expresión obtenidos mediante cada una de las técnicas, existió una elevada concordancia en los porcentajes de positividad obtenidos con la PCR y con el estudio histológico.

La siguiente tabla muestra los valores de positividad para cada una de las MMPs estudiadas.

	RT-PCR	IHQ
MMP-1	44%	38%
MMP-2	78%	63%
MMP-7	66%	59%
MMP-8	16%	19%
MMP-9	75%	63%
MMP-10	34%	25%

Tabla 60⁶⁰: Porcentaje de positividad de las MMPs estudiadas por Xie y cols mediante RT-PCR e inmunohistoquímica.

Por su parte, Stokes y cols⁴⁷ evaluaron la relación entre el nivel de transcripción para las MMPs -2, -3, -9 y -14 y la expresión de proteína medida mediante Western blot y su actividad a partir de técnicas de zimografía, encontrando una correspondencia entre ambos.

La conclusión que puede obtenerse a partir de nuestros resultados y de los publicados en la literatura es que los carcinomas de cabeza y cuello cuentan con un incremento en la actividad de la mayoría de las MMPs, y que dicho incremento es resultado de un aumento de la actividad transcripcional.

2.- CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LAS DIFERENTES MMPs.

Del estudio de las correlaciones que los niveles de expresión de las MMPs y el TIMP-1 mantuvieron entre sí, destacaron la existencia de unos niveles de correlación elevados (coeficiente $r > 0.6$) o muy elevados (coeficiente $r > 0.8$) entre la MMP-1 (colagenasa 1) y la MMP-3 (estromelisin 1), entre las gelatinasas (MMP-2 y -9), y entre diferentes MMPs (-1, -2, -10 y -13) y su inhibidor específico (TIMP-1).

Otros autores han citado la existencia de correlaciones significativas entre diferentes MMPs y de éstas con los TIMPs. En un estudio en que se evaluó la MMP-2 y MMP-14 en 42 pacientes con carcinomas de cabeza y cuello mediante RT-PCR, Imanishi y cols¹³ encontraron una correlación altamente significativa ($P=0.0005$) entre los niveles de expresión correspondientes a ambas MMP, tal como aparece en la siguiente figura.

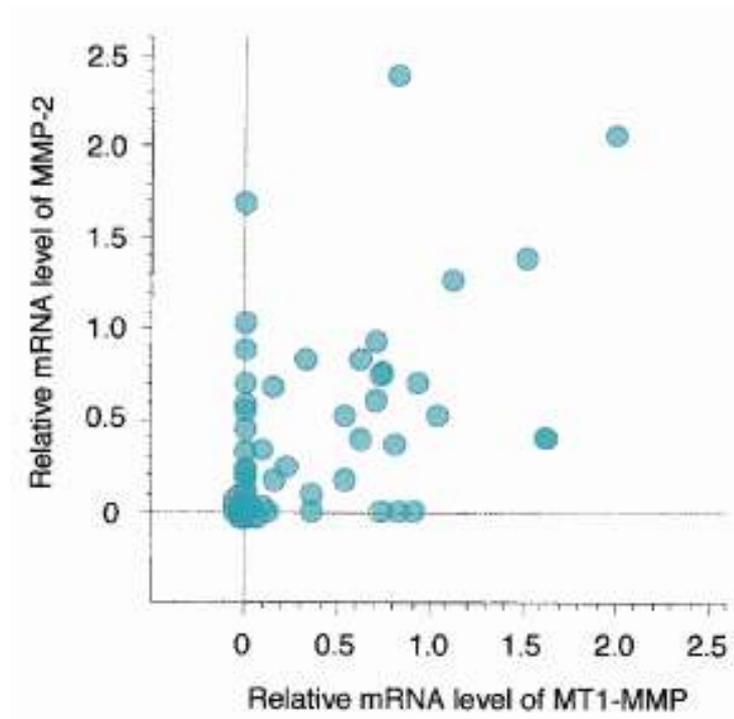


Figura 115¹³: Correlación entre los niveles de expresión de MMP-2 y MT1-MMP (MMP-14). Coeficiente de correlación r fue 0.453 ($P=0.0005$).

Otros autores que han encontrado unas correlaciones altamente significativas entre los valores de expresión de la MMP-2 y la MMP-14 (MT1-MMP) en esta ocasión analizados mediante técnicas de inmunohistoquímica, fueron Yoshizaki y cols⁶³, que a partir del análisis de 51 pacientes con carcinomas de lengua, encontraron una correspondencia elevada en la positividad de ambas MMPs (coeficiente $r=0.902$, $P<0.0001$).

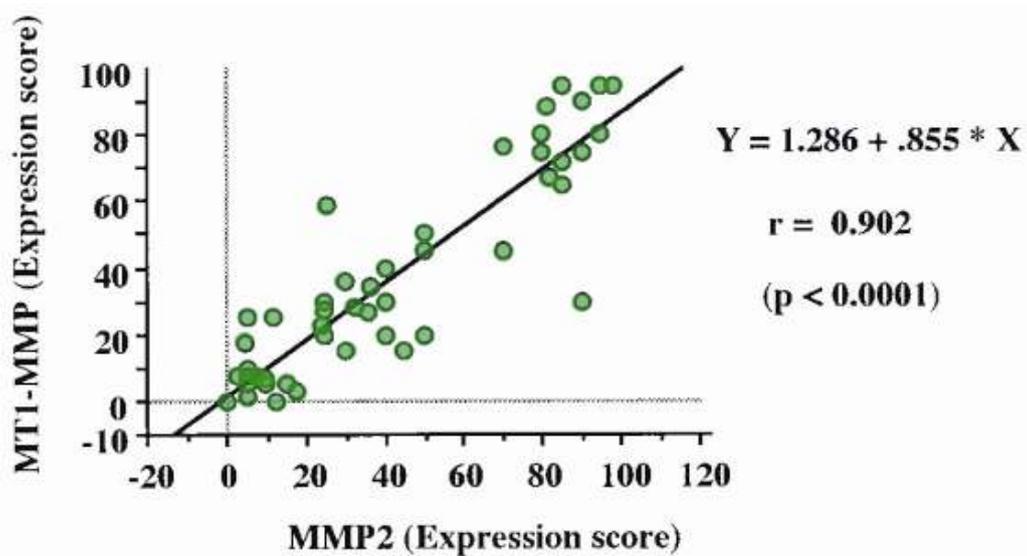


Figura 116⁶³: Correlación entre los niveles de expresión de MMP-2 y MT1-MMP (MMP-14).

Ondruschka y cols⁶⁴ describieron una correlación significativa ($P=0.004$) entre los niveles de positividad inmunohistoquímica de las MMPs -2 y -9 en un estudio realizado en 74 pacientes con carcinomas de cabeza y cuello, y Kurahara y cols⁵⁰, en un estudio de características similares realizado en pacientes con carcinomas localizados en la cavidad oral, encontraron una correlación significativa entre los niveles de expresión de la TIMP-1 y la MMP-1 ($P<0.05$), MMP-3 ($P<0.01$) y MMP-9 ($P<0.0001$).

Por su parte, de Vicente y cols⁴² encontraron unos niveles de correlación significativa entre la MMP-7, TIMP-1 ($P<0.0005$) y TIMP-2 ($P=0.008$) en pacientes con carcinomas de cavidad oral estudiados con inmunohistoquímica, en tanto que la relación con las MMP-2 y -9 no alcanzó niveles de significación estadística. En el mismo estudio, los autores no encontraron relación entre la positividad frente a la MMP-14 y la correspondiente a las gelatinasas (MMP-2 y -9) y el TIMP -1 y -2.

3.- RELACIÓN DE LAS MMPs CON LA AFECTACIÓN GANGLIONAR.

Tal como destacamos en la Introducción, existe una gran variabilidad en los resultados que vinculan la expresión de determinadas MMPs con el riesgo de aparición de metástasis ganglionares. En la Introducción del presente estudio se incluyó una tabla que resumía los hallazgos de la literatura respecto de la influencia de la expresión de las diferentes MMPs y TIMPs en relación a la afectación ganglionar. Del análisis de este resumen de los trabajos publicados puede deducirse la existencia de dos tipos de relación entre la expresión de las MMPs y la presencia de metástasis ganglionares. Existe un grupo de MMPs, que incluye las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) y la MMP-14, que son los que han recibido una mayor atención al analizar la relación con la afectación ganglionar, para los cuales un número sustancial de estudios encontraron una relación significativa entre la expresión de la MMP y la afectación ganglionar. Por el contrario, otro grupo de MMP, incluyendo la MMP-1, -3, -7,-8, -10, -15, -16 y -26, no han contado con tal vinculación o el número de estudios que encontraron tal relación es muy reducido. Por último, en el caso de los TIMPs, además de contar con resultados dispares en la relación entre TIMPs y afectación regional, algunos autores han citado una relación inversa en el sentido de que el incremento en los niveles de expresión del TIMP-1 y -2 actuaría como una variable que se relacionaría con una disminución en el riesgo de afectación ganglionar⁵⁸.

Un metaanálisis publicado en 2005 a partir de los resultados publicados hasta entonces⁶⁷, ofrece unos resultados compatibles con las anteriores apreciaciones. Según este metaanálisis no apareció una relación significativa

entre la expresión de la MMP-1 y la presencia de metástasis ganglionares, en tanto que existió una relación significativa con los niveles de expresión de las MMPs -2, -9 y -14. En el caso de la MMP-3 aparecieron diferencias significativas, si bien todos los estudios incluidos en el metaanálisis pertenecían a un único grupo.

La mayoría de estudios que han estudiado la relación con la afectación regional han utilizado inmunohistoquímica, si bien algunos autores llevaron a cabo el análisis mediante técnicas de RT-PCR.

Imanishi y cols¹³ evaluaron mediante RT-PCR la expresión de la MMP-2 y -14 en un grupo de 42 pacientes con carcinomas de cabeza y cuello, 20 de los cuales contaron con la presencia de metástasis cervicales. Los autores no encontraron una relación significativa entre el nivel de expresión del gen y la afectación ganglionar en el caso de la MMP-2, en tanto que sí que apareció tal relación con la MMP-14 ($P < 0.01$). En un estudio inmunohistoquímico llevado a cabo sobre el mismo grupo de pacientes se obtuvieron unos resultados similares.

Por su parte, O. Charoenrat y cols⁷¹ evaluaron un grupo de 54 pacientes consecutivos con carcinomas de cabeza y cuello, un 50% de los cuales contaban con la presencia de metástasis ganglionares, y pudieron constatar cómo los niveles de ARNm correspondientes a la MMP-9 se correlacionaron de forma intensa con la afectación ganglionar, en tanto que no aparecía tal correlación en el caso de las MMPs -2, -7 y -11.

En un estudio realizado en 32 pacientes con carcinomas de supraglotis, 12 de los cuales contaron con la presencia de metástasis regionales, Xie y cols⁶⁰ encontraron una relación significativa entre los niveles de expresión de las

MMPs -2, -7 y -9 y la afectación regional. De nuevo un estudio inmunohistoquímico desarrollado en los mismos pacientes confirmó los hallazgos obtenidos mediante la técnica de PCR.

Görögh y cols⁵⁸ evaluaron un total de 47 pacientes con carcinomas de la laringe, 24 de ellos N+, encontrando relación entre la positividad ganglionar y la expresión en el caso de la MMP-2, pero no para las MMPs -1, -9 y -10. Además, tal como se citó anteriormente, los autores encontraron una relación significativa inversa entre la actividad del TIMP y la presencia de adenopatías, lo que les llevó a hipotetizar que unos incrementos en los niveles transcripcionales del TIMP-1 y TIMP-2 conducía a una disminución en la actividad MMP, dificultando en consecuencia la aparición de metástasis ganglionares.

Zhang y cols⁴⁴ analizaron la relación entre la expresión del gen responsable de la síntesis de las MMP-14 y la afectación ganglionar en un grupo de 85 pacientes con carcinomas de supraglotis, 44 de los mismos con metástasis cervicales, encontrando una relación significativa que se confirmó en el estudio inmunohistoquímico.

Al igual que sucedía al valorar los estudios inmunohistoquímicos que relacionan MMPs y afectación ganglionar, los resultados obtenidos al analizar los estudios que evalúan la expresión de las diferentes MMPs a nivel transcripcional también ofrecieron resultados contradictorios en alguna de las MMPs evaluadas.

La siguiente tabla resume los hallazgos obtenidos por los diferentes autores que han evaluado la relación entre MMP y afectación ganglionar analizando la expresión de las MMPs mediante PCR.

Autor	n	N0/N+	MMP							
			1	2	7	8	9	10	14	
Imanishi ¹³	42	22/20		-						+
O.Chaoenrat ⁷¹	54	27/27		-	-			+		
Xie ⁶⁰	32	20/12	-	+	+	-	+			
Görögh ⁵⁸	47	23/24	-	+				-	-	
Zhang ⁴⁴	85	41/44								+

Tabla 61: Estudios que describen la relación entre MMPs y la afectación ganglionar, analizadas mediante PCR.

De acuerdo con nuestros resultados, no existió una relación significativa entre el grado de expresión de las MMPs analizadas o el TIMP-1 y la afectación regional.

4.- RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS MMPs Y EL TIMP-1 CON VARIABLES CLÍNICAS.

Independientemente de la relación de las MMPs y los TIMPs con la presencia de metástasis a nivel regional, la gran mayoría de autores no han encontrado unos patrones de asociación definidos entre sus niveles de expresión y variables clínicas relevantes como la localización primaria del tumor^{39,40,45,65,71}, la categoría de extensión local^{13,41,42,55,63-65}, o el grado histológico^{13,40,42,44,55,65,71}.

Ocasionalmente, algunos autores han correlacionado los niveles de expresión de MMP-1⁷¹, MMP-9⁷¹, MMP-14⁴⁴ y el TIMP-1^{71,40} con la categoría de extensión local del tumor, y de la MMP-9⁴¹ o la MMP-13⁴⁵ con el grado histológico del tumor.

Según nuestros resultados, no existieron diferencias significativas en los niveles de expresión de las diferentes MMPs estudiadas y el TIMP-1 en relación al grado histológico del tumor, a la categoría de extensión local, o la localización del tumor primario. Tan sólo se apreció la existencia de unos niveles más elevados de MMP-3 en los tumores localizados a nivel de la cavidad oral-orofaringe.

De acuerdo con los resultados obtenidos en nuestro estudio y los correspondientes a los publicados en la literatura, consideramos que para los pacientes con carcinomas de cabeza y cuello no existen tendencias definidas en la actividad de las MMPs y TIMPs en función de variables como la localización primaria del tumor, la categoría de extensión local o el grado histológico.

5.- RELACIÓN DE LAS MMPs CON EL CONTROL ONCOLÓGICO.

Por el contrario, sí que aparecieron relaciones significativas entre los niveles de expresión de alguna de las MMPs evaluadas y la supervivencia ajustada, significando que dichos niveles de expresión podrían ser utilizados como un factor pronóstico en los pacientes con carcinomas de cabeza y cuello.

En la evaluación de la relación entre expresión de MMP y el resultado oncológico, optamos por explorar el conjunto de datos mediante la técnica de curvas ROC, que permite una apreciación objetiva de un conjunto de variables continuas en referencia a un resultado dicotómico. En este caso, la variable dependiente evaluada fue la mortalidad atribuible al carcinoma de cabeza y cuello. A partir de esta técnica estadística se obtuvieron los siguientes resultados (Figura 117).

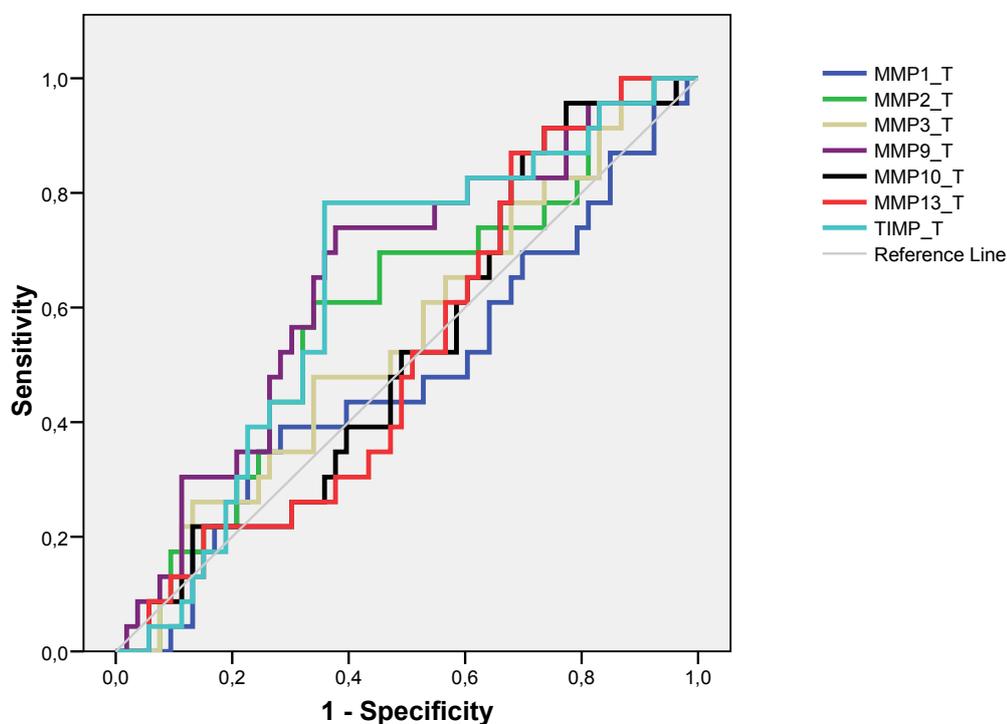


Figura 117: Curva ROC de la expresión de MMPs y TIMP-1 en relación a la mortalidad atribuible a el carcinoma de cabeza y cuello.

Del análisis de la figura y de los resultados correspondientes a la determinación de las áreas bajo la curva de las diferentes curvas ROC, se determinó que las variables relacionadas de forma significativa con el resultado oncológico obtenido en nuestro grupo de pacientes fueron los niveles de expresión correspondientes a la MMP-9 y al TIMP-1. Además, pudo evidenciarse como la capacidad pronóstica de la MMP-9, y en menor medida la del TIMP-1 se encontraba modificada en función del tipo de tratamiento administrado. La capacidad pronóstica correspondiente a la MMP-9 aumentó al considerar sólo los pacientes tratados con radioterapia.

Para los pacientes tratados con cirugía, el valor del área bajo la curva correspondiente al TIMP-1 se mantuvo respecto al global de pacientes, en tanto que la expresión de MMP-9 perdió capacidad pronóstica.

Al igual que sucedió al analizar los datos publicados en la literatura al evaluar la capacidad pronóstica de las MMPs en relación a la presencia de metástasis ganglionares, los resultados obtenidos al relacionar los niveles de expresión de las diferentes MMPs con la supervivencia no siempre fueron concordantes entre los diferentes estudios.

En la Tabla 62 se resumen los resultados obtenidos por los diferentes autores en relación a la capacidad pronóstica conseguida por los niveles de expresión de las MMPs y TIMPs.

Tabla 62: Resumen de los resultados en relación a la capacidad pronóstica según los niveles de expresión de las MMPs y TIMPs.

Autor	nº	% cirugía	estudio	MMP-2	MMP-7	MMP-9	MMP-13	MMP-14	TIMP-1	TIMP-2	Localización
Katayama y cols ⁵⁴	53	89%	IHQ	-		+		-		+	CO
Ruokolainen y cols ³⁸	74	82%	IHQ			+					H&N
Kosunen y cols ⁴³	138	92%	IHQ			-					CO
Yoshizaki y cols ⁶³	51	100%	IHQ	+				+		+	CO
Ondruschka y cols ⁶⁴	106	100%	IHQ	+							H&N
de Vicente y cols ⁴¹	68	100%	IHQ	-		-					CO
de Vicente y cols ⁴²	69	100%	IHQ		-			-			CO
Zhang y cols ⁴⁴	85	100%	IHQ					+			L
Luukkaa y cols ⁴⁵	81	59%	IHQ				+				H&N
Patel y cols ¹⁵	60	100%	zimografía	-		-					CO
Ruokolainen y cols ³⁹	72	90%	IHQ	+/-						+	H&N
Saussez y cols ⁴⁶	118	100%	IHQ			+					L,H
Ruokolainen y cols ⁴⁰	68	82%	IHQ						+		H&N
Liu y cols ⁵⁵	72	100%	IHQ	+		-					L

Tal como puede apreciarse, existen discrepancias en los resultados obtenidos para la mayoría de las MMPs evaluadas. Por el contrario, todos los autores que analizaron el significado pronóstico atribuible a los TIMPs encontraron una relación significativa con el resultado oncológico.

Un primer elemento a considerar es que la práctica totalidad de estudios que han analizado la capacidad pronóstica de las MMPs y los TIMPs utilizaron técnicas de inmunohistoquímica como método de determinación de los niveles de expresión. Tan sólo en un estudio se cuantificó la actividad proteolítica correspondiente a la MMP-9 mediante zimografía. No existen en nuestro conocimiento datos en la literatura que hayan utilizado los niveles de expresión transcripcional de las MMPs en la evaluación de los resultados oncológicos correspondientes a los pacientes con carcinomas de cabeza y cuello.

Por otro lado, tal como hemos comprobado a partir de nuestros resultados, es posible que el tipo de tratamiento utilizado sea un elemento con capacidad de condicionar el significado pronóstico de la actividad de las MMPs.

El incluir de forma preferente pacientes sometidos a tratamiento quirúrgico, tal como es el caso para la mayoría de autores que han analizado la capacidad pronóstica de las MMPs, es posible que condicione en parte sus resultados. Es posible que en los pacientes quirúrgicos la expresión de las MMPs cuente con menor trascendencia pronóstica, y al incluirlos mayoritariamente en los estudios, sea un elemento que justifique la disparidad de los resultados conseguidos por los diferentes autores. Otras variables que podrían contribuir a las discrepancias en la capacidad pronóstica de las MMPs serían la variabilidad en la localización y extensión de los tumores estudiados en las diferentes

series, así como la heterogeneidad en la valoración de las técnicas de inmunohistoquímica entre los diferentes estudios.

Una de las ventajas de la utilización de las técnicas de RT-PCR es que ofrecen un resultado cuantitativo, no sujeto al grado de subjetividad correspondiente a las determinaciones inmunohistoquímicas. A partir de estos valores cuantitativos, y mediante una técnica estadística de clasificación basada en los métodos de partición recursiva, pudimos definir en nuestro caso unos puntos de corte en los valores de expresión de la MMP-9 y el TIMP-1 que contaron con la máxima capacidad pronóstica.

La siguiente figura muestra las curvas de supervivencia obtenidas al clasificar a los pacientes en niveles altos y bajos de expresión de acuerdo con los puntos de corte correspondientes a la MMP-9 y el TIMP-1.

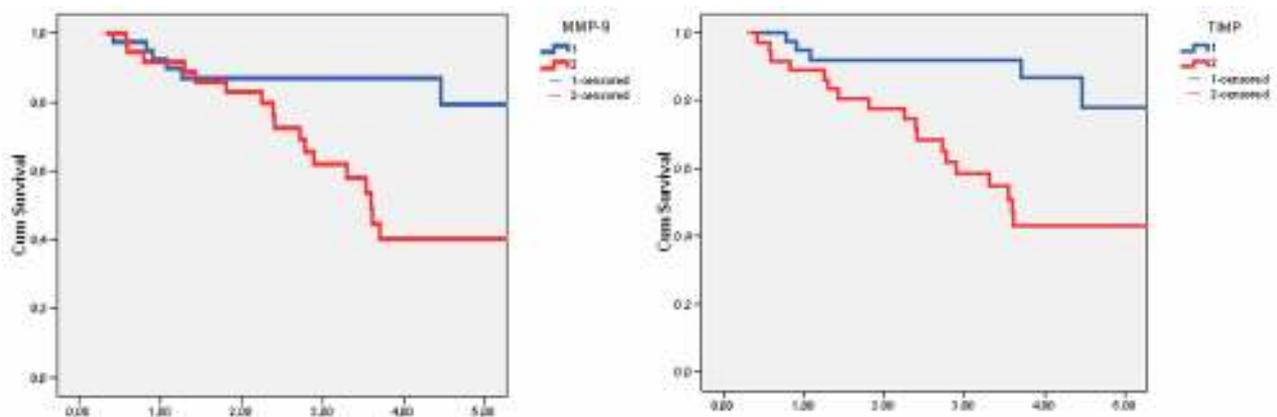


Figura 118: Curvas de supervivencia según los puntos de corte correspondientes para MMP-9 y TIMP-1.

6.- RELACIÓN DE LA MMP-9 CON EL CONTROL DE LA ENFERMEDAD.

La MMP-9, una gelatinasa implicada en los procesos de degradación de la membrana basal, apareció como la variable más relacionada con el resultado oncológico. Otros autores que han encontrado una relación entre los niveles de expresión de la MMP-9 y la supervivencia ajustada fueron Katayama y cols⁵⁴, que analizaron pacientes con carcinomas de cavidad oral en estadios iniciales, Ruokolainen y cols³⁸, que lo hicieron con carcinomas de cabeza y cuello con localizaciones y estadios diversos, y Saussez y cols⁴⁶, con pacientes con carcinomas localizados en laringe-hipofaringe. Por el contrario, otra serie de autores que evaluaron pacientes con tumores localizados en la cavidad oral^{15,41,43} o la laringe⁵⁵ no encontraron una relación significativa entre la MMP-9 y la supervivencia.

Tal como señalamos anteriormente, la capacidad pronóstica obtenida por la MMP-9 en nuestros pacientes dependió en gran medida del tipo de tratamiento utilizado. Al aplicar los criterios de clasificación obtenidos con los puntos de corte a los pacientes que habían recibido un tratamiento quirúrgico pudimos observar una pérdida notable en la discriminación pronóstica, en tanto que dicha capacidad se mantuvo al evaluar de forma exclusiva los pacientes tratados con radioterapia.

Además, al analizar los motivos del fracaso terapéutico, pudimos comprobar como gran parte de la competencia pronóstica correspondiente a la MMP-9 se correspondía con la capacidad de definir las posibilidades de control local en los pacientes tratados con radioterapia, en tanto que el control regional o a distancia de los pacientes irradiados, así el control local, regional o a distancia

de los pacientes sometidos a tratamiento quirúrgico no se vieron modificados por los niveles de expresión de la MMP-9.

La supervivencia libre de enfermedad local a los 5 años para los pacientes irradiados con unos niveles de expresión baja de la MMP-9 fue del 88.9%, disminuyendo al 34.3% en caso de expresión elevada de la MMP-9 ($P=0.001$).

Para confirmar la capacidad pronóstica en el control local de la MMP-9 en los pacientes tratados con radioterapia se realizó un estudio con un modelo de Cox en que se incluyó como variable dependiente la supervivencia libre de recidiva local, y como variable independiente el nivel de expresión de la MMP-9 considerada como variable continua. El resultado mostró la existencia de una relación significativa entre el valor de expresión de la MMP-9 y la supervivencia libre de recidiva local ($P=0.025$).

Finalmente, se realizó un estudio multivariante en el que se incluyeron como variables independientes las categorías de extensión local y regional del tumor, su localización, y el nivel de expresión de la MMP-9 categorizado de acuerdo con los puntos de corte obtenidos con la técnica RPA.

La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos con este estudio multivariante.

		OR	IC 95%	P
Cavidad oral- orofaringe		1		
	Laringe- hipofaringe	4.98	1.15-21.47	0.031
T1-2		1		
	T3-4	2.42	0.76-7.69	0.133
N0		1		
	N+	2.12	0.64-7.00	0.215
MMP-9	Baja	1		
	Elevada	11.56	2.44-54.65	0.002

Tabla 63: Estudio multivariante de la supervivencia ajustada en relación a la localización del tumor, tumor primario, presencia de metástasis ganglionar y expresión de MMP-9 según el punto de corte.

De las variables incluidas en el modelo, la que mantuvo una relación más intensa con el control local de la enfermedad fue el nivel de expresión de la MMP-9. En relación a los pacientes con un nivel de expresión bajo de MMP-9, los pacientes con un nivel de expresión elevado contaron con un riesgo 11.5 veces superior de sufrir una recidiva local del tumor.

La siguiente figura muestra las curvas de supervivencia libres de recidiva local para los pacientes tratados con radioterapia en función del cuartil correspondiente de los niveles de expresión de la MMP-9.

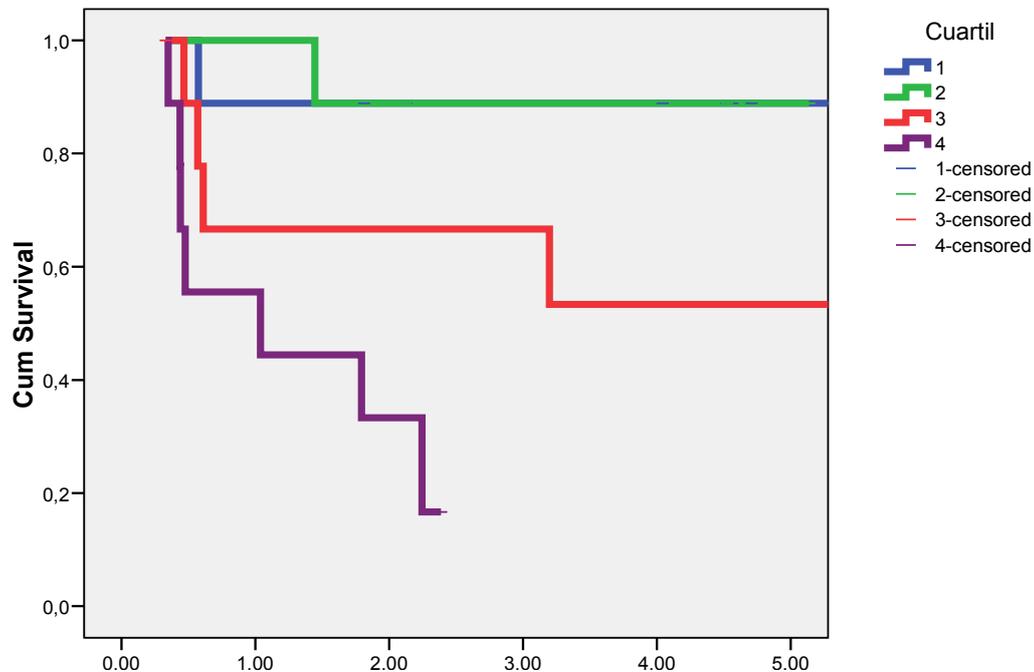


Figura 119: Curvas de supervivencia libres de recidiva local para los pacientes tratados con radioterapia en función de los cuartiles correspondiente a los niveles de expresión de la MMP-9.

Tal como puede apreciarse, los pacientes incluidos en los dos primeros cuartiles contaron con un riesgo bajo de recidiva local, en tanto que para los pacientes incluidos en los cuartiles 3° y 4° el riesgo fue significativamente superior, y tanto más alto cuanto mayor fue el nivel de expresión de la MMP-9 (P=0.001).

Una de las conclusiones principales que parecen derivar de nuestros resultados es la existencia de una relación lineal entre el nivel de expresión de la MMP-9 y el riesgo de recidiva tras tratamiento con radioterapia, con la

consiguiente capacidad de utilizar la MMP-9 como marcador pronóstico a este nivel.

En un estudio inmunohistoquímico desarrollado en 74 pacientes con carcinomas de cabeza y cuello tratados de forma mayoritaria con cirugía, Ruokolainen y cols³⁸ encontraron una relación significativa entre la supervivencia y el grado de expresión de la MMP-9. Los autores detallaron las causas de fracaso terapéutico de los pacientes estudiados. De los 39 pacientes recidivados, 37 (94.8%) mostraron positividad frente a la MMP-9, con unos porcentajes del 100% para los 9 casos de recidiva local, 92% para los 23 casos de recidiva ganglionar, y 100% para los pacientes con metástasis a distancia. Cabe recordar que en este estudio, una mayoría de pacientes recibieron tratamiento con cirugía.

No existen datos en la literatura en referencia al papel jugado por la expresión de la MMP-9 en relación al control local de la enfermedad conseguido por la radioterapia en los pacientes con carcinomas de cabeza y cuello. Sin embargo, en otros modelos tumorales se ha comprobado dicha relación entre la MMP-9 y el control local del tumor. En pacientes con adenocarcinoma de colon, Unsal y cols¹⁰⁵ describieron una relación significativa entre el nivel de expresión de la MMP-9 y la respuesta histológica conseguida tras la administración preoperatoria de quimiorradioterapia, tal como muestra la Figura 120.

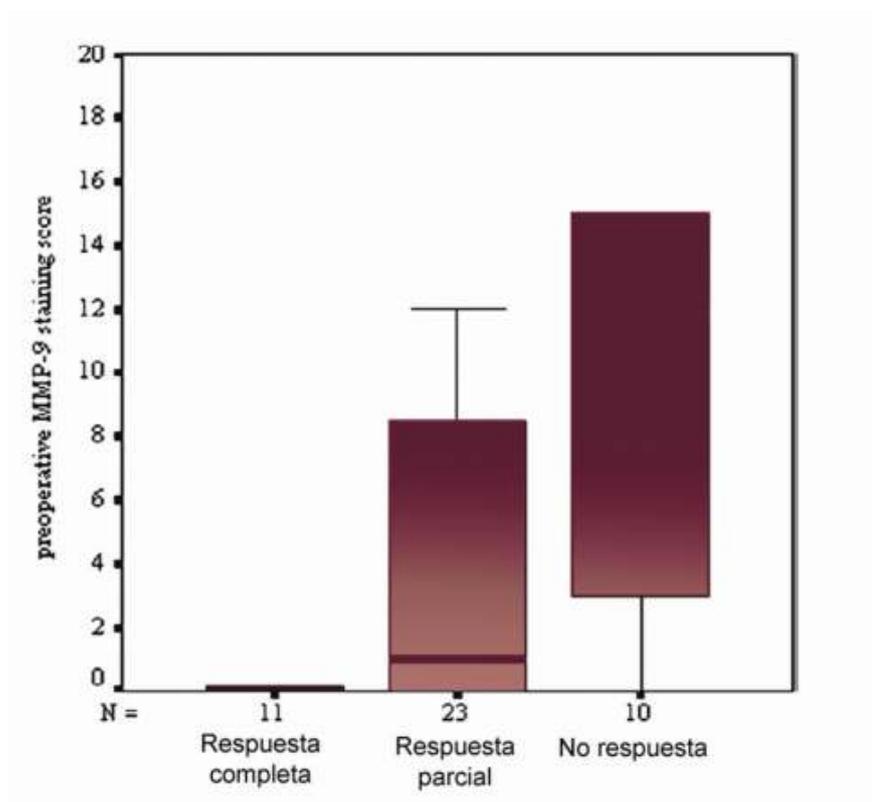


Figura 120: Correlación entre el nivel de expresión de la MMP-9 y la respuesta histológica conseguida tras la administración de quimiorradioterapia preoperatoria.

7.- Relación del TIMP-1 con el control de la enfermedad.

De acuerdo con nuestros resultados, la otra variable que se relacionó de forma significativa con el resultado oncológico fue el TIMP-1.

Al igual que en el caso de la MMP-9, se obtuvo una clasificación de los pacientes de acuerdo con un punto de corte del valor de la expresión de la TIMP-1 que hacía máxima la capacidad pronóstica. De acuerdo con este punto de corte se definieron dos grupos de pacientes con un pronóstico diferenciado, tal como muestra la siguiente curva de supervivencia.

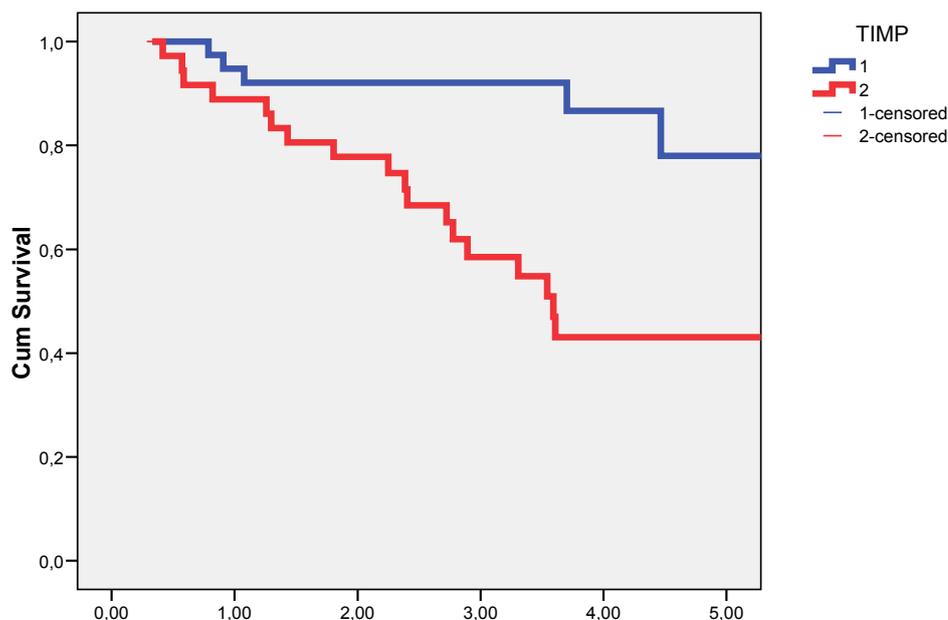


Figura 121: Curva de supervivencia según el punto de corte de la expresión de TIMP-1.

En esta ocasión, a diferencia de lo que sucedía con la MMP-9, la capacidad pronóstica del TIMP-1 no se vio influida de forma tan notable por el tipo de tratamiento realizado, manteniéndose significativa tanto para los pacientes del grupo tratado con radioterapia ($P=0.049$) como los del grupo quirúrgico ($P=0.0008$).

Al analizar las causas de fracaso llamó sobre todo la atención que los niveles de TIMP-1 se relacionaron de forma significativa con la aparición de metástasis a distancia, y que dicha asociación se produjo en el grupo de pacientes tratados de forma quirúrgica. Para los pacientes quirúrgicos, la supervivencia a los 5 años libre de metástasis a distancia correspondiente al grupo con niveles de expresión bajo de TIMP-1 fue del 100%, en tanto que para los pacientes con TIMP-1 elevado fue del 58.3% ($P=0.006$), tal como muestra la siguiente figura, que corresponde a la supervivencia libre de metástasis a distancia.

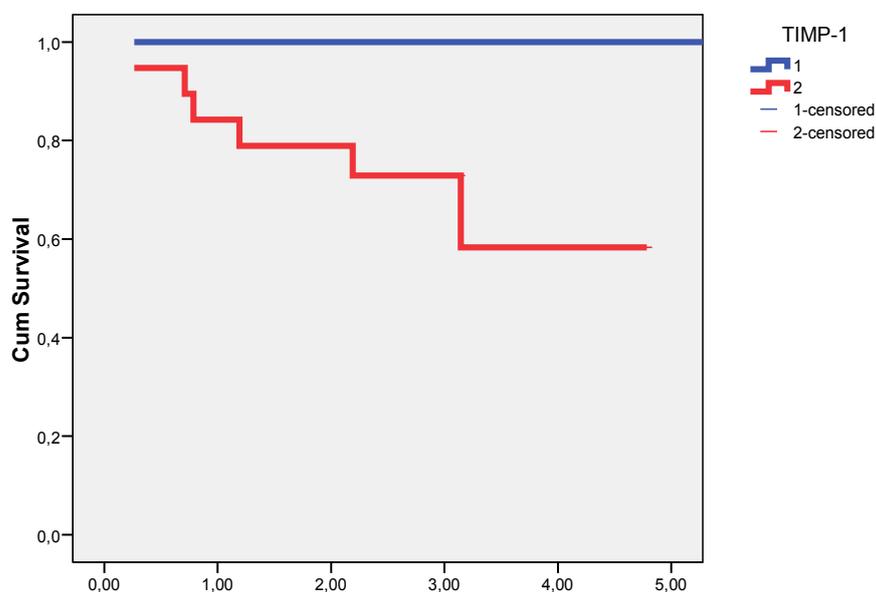


Figura 122: Curva de supervivencia libre de metástasis a distancia en relación a los niveles de expresión de TIMP-1.

Sólo un autor ha evaluado la relación del TIMP-1 con el pronóstico en los pacientes con carcinomas de cabeza y cuello. Ruokolainen y cols⁴⁰ evaluaron los resultados correspondientes a 68 pacientes con carcinomas de cabeza y cuello, encontrando una relación significativa entre la expresión del TIMP-1 a nivel del tumor estudiado mediante inmunohistoquímica, y los niveles plasmáticos del mismo cuantificados mediante ELISA, y la supervivencia

ajustada de la enfermedad. El porcentaje de positividad a nivel del tumor primario para los pacientes con una recidiva local de la enfermedad (n=7) fue del 88%, para los pacientes con recidiva regional (n=22) del 92%, y para los pacientes con metástasis a distancia (n=5) del 100%.

Otros autores han analizado la relación existente entre los niveles del TIMP-2, otro de los inhibidores específicos de las MMPs, y la supervivencia^{39,54,63}, encontrando en todas las ocasiones una relación significativa. En un estudio realizado en pacientes con carcinomas de cavidad oral tratados con cirugía, Yoshizaki y cols⁶³ relacionaron el nivel de expresión del TIMP-2 con la causa de fracaso, encontrando una relación significativa tanto para los casos de recidiva local (P=0.04), regional (P=0.01) y a distancia (P=0.001). De acuerdo con los resultados de su estudio, el porcentaje de pacientes positivos para el TIMP-2 que no sufrieron la aparición de metástasis a distancia (n=15) fue del 34%, alcanzando el 100% en aquellos pacientes con diseminación metastásica (n=7).

Igualmente, Ruokolainen y cols³⁹ en un estudio que incluyó pacientes con carcinomas de cabeza y cuello tratados mayoritariamente de forma quirúrgica, encontraron una correlación entre la aparición de recidivas a nivel regional y a distancia y el grado de expresión del TIMP-2, tal como muestra el siguiente gráfico.

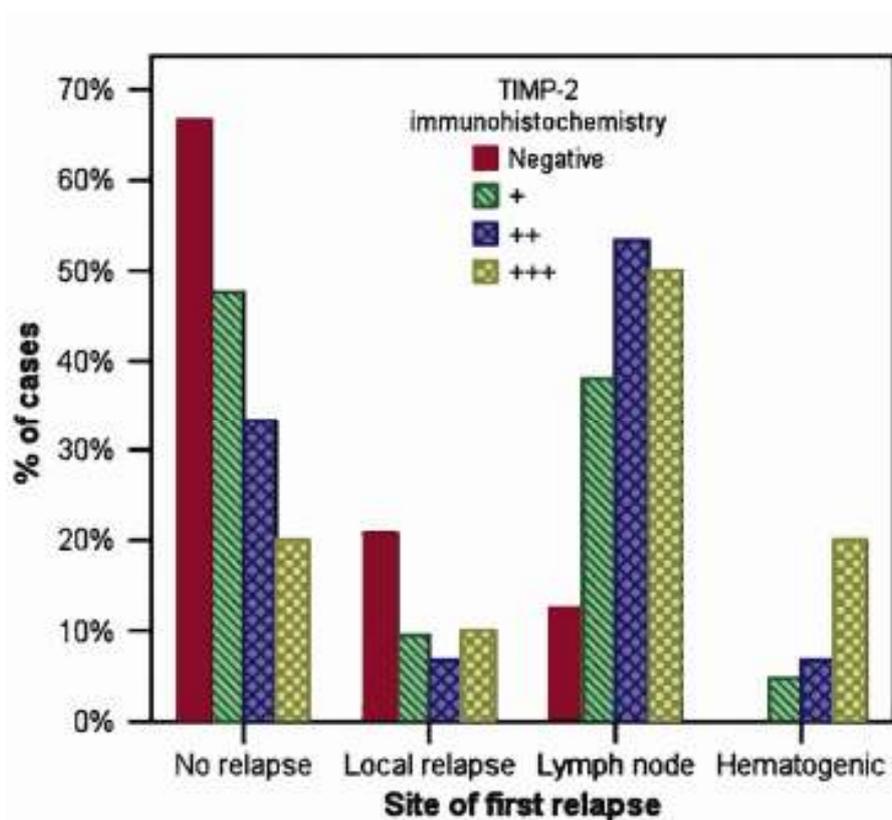


Figura 123: Correlación entre el grado de expresión de TIMP-2 y la aparición de recidivas a nivel local, regional y a distancia.

La totalidad de pacientes que sufrieron la aparición de metástasis a distancia mostraron positividad frente al TIMP-2, existiendo un incremento en el riesgo a medida que se incrementaba el nivel de positividad.

En otros modelos tumorales se ha relacionado la expresión del TIMP-1 con la aparición de metástasis a distancia. Así, Ree y cols¹⁰⁶ encontraron diferencias significativas en los valores de expresión del TIMP-1 valorados mediante PCR

en función de la aparición de metástasis ganglionares y a distancia ($P=0.021$) en pacientes con carcinoma de mama, tal como se muestra en la siguiente figura.

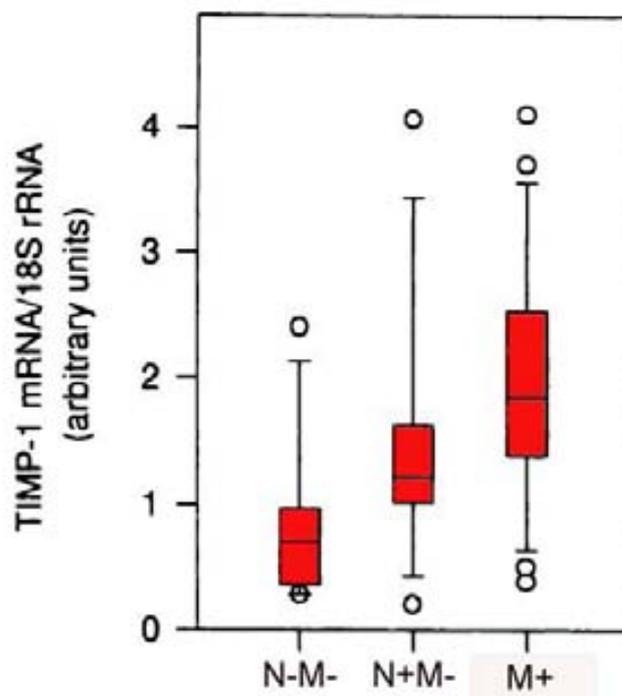


Figura 124¹⁰⁶: Niveles de expresión del TIMP-1 en 34 pacientes con carcinoma primario de mama, en relación a la afectación local (N-M-), regional (N+M-) y distancias (N+M+)(box plot). La distribución es estadísticamente significativa entre los distintos grupos ($p=0.021$).

Por su parte, Zeng y cols¹⁰⁷ obtuvieron unos resultados similares al analizar pacientes con adenocarcinoma de colon.

8.- EVALUACIÓN CONJUNTA DE LOS NIVELES DE MMPs y TIMP.

Existe una interacción biológica entre la actividad de las MMPs y la correspondiente a los TIMPs, que cuentan con la capacidad de inhibir de forma específica la acción proteolítica de las MMPs. Desde un punto de vista teórico, los TIMPs actuarían como elementos que disminuirían el potencial procarcinógeno de las MMPs, jugando en consecuencia un papel protector frente al desarrollo tumoral.

El incremento de la expresión del TIMP-1 y -2 a nivel del tumor respecto a la mucosa sana, estudiado habitualmente en los carcinomas de cabeza y cuello, podría hacer pensar que la actividad del TIMP actuaría como un elemento de protección. Sin embargo, tal como hemos visto anteriormente, existen evidencias en la literatura que correlacionan un mayor nivel de expresión de los TIMPs con un peor pronóstico de la enfermedad en los pacientes con carcinomas escamosos de cabeza y cuello. Este hallazgo hace suponer que la relación entre el nivel de actividad del TIMP y el pronóstico no dependería de la actividad metabólica intrínseca del TIMP como inhibidor de las MMPs, sino de la existencia de mecanismos que actuarían de forma simultánea sobre el TIMP y sobre otras vías pro-carcinogénicas, de manera que el resultado final favoreciese la actividad de estas últimas. A este respecto, cabe señalar el elevado coeficiente de correlación obtenido entre la actividad TIMP-1 y la correspondiente a genes como el HIF, VEGF, SDF-1 o el NF κ B, genes que codifican todos ellos proteínas que cuentan con una reconocida capacidad en la promoción tumoral.

En un modelo de carcinoma medular de tiroides, Cavalheiro y cols¹⁰⁸ encontraron una relación significativa en el cociente de la actividad MMP-2/TIMP-2 y la afectación ganglionar y el control de la enfermedad, de manera que los pacientes con un valor elevado del cociente contaron con mayor probabilidad de contar con la presencia de metástasis ganglionares y con un peor pronóstico oncológico.

Por su parte, Nakopoulou y cols¹⁰⁹ encontraron una relación significativa entre el resultado del cociente TIMP-2/MMP-2 y la supervivencia en pacientes con carcinoma de mama, tal como puede apreciarse en la siguiente figura.

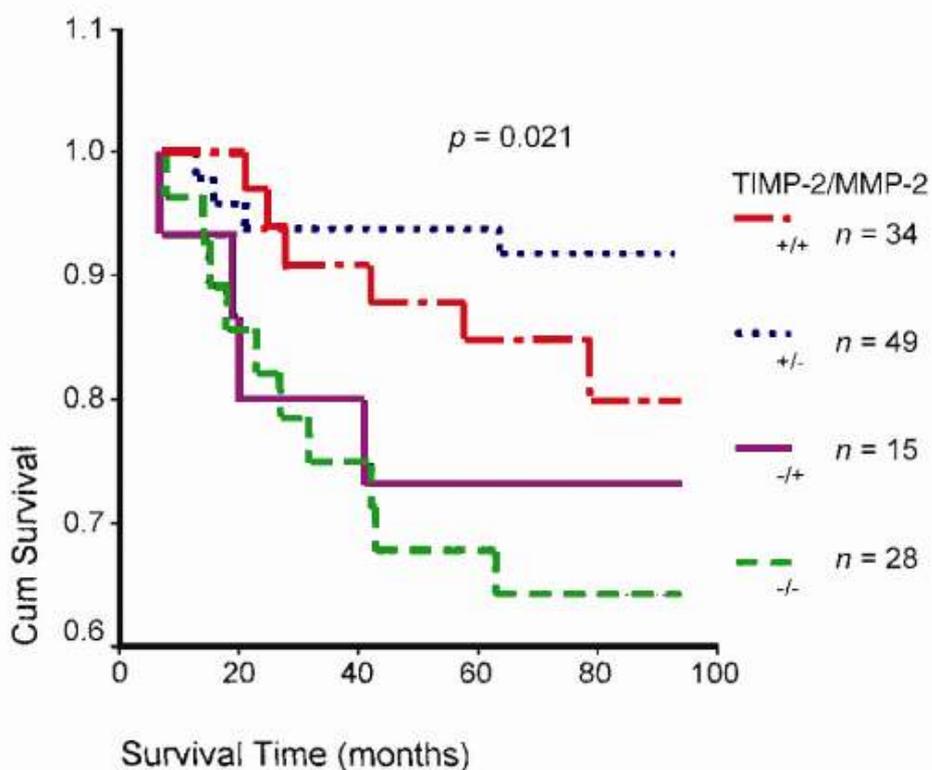


Figura 125: Curvas de supervivencia según el cociente TIMP-2/MMP-2.

De acuerdo con nuestros resultados, tanto la MMP-9 como el TIMP-1 contaron con un significado pronóstico. Además la capacidad pronóstica no afectaba ni al mismo grupo de pacientes ni al mismo nivel de control de la enfermedad. La MMP-9 contó con una capacidad de discriminación preferente en relación al control local de la enfermedad en los pacientes tratados con radioterapia, y el TIMP-1 en la aparición de metástasis a distancia en los pacientes quirúrgicos. No existen estudios que hayan evaluado la capacidad del cociente MMP/TIMP en pacientes con carcinomas escamosos de cabeza y cuello. De acuerdo con nuestros resultados, el cociente MMP/TIMP-1 no mejoró la capacidad pronóstica para la supervivencia ajustada ni para el diagnóstico de la presencia de adenopatías metastásicas con ninguna de las MMPs estudiadas.

Por el contrario, el producto MMP-9 x TIMP-1 sí que consiguió mejorar las posibilidades de discriminación en relación a la supervivencia ajustada. El producto MMP-9 x TIMP-1 mejoró el área bajo la curva respecto a los valores individuales correspondientes a la MMP-9 y el TIMP-1.

Desde un punto de vista conceptual, el producto MMP-9 x TIMP-1, a diferencia del cociente entre ambos, carece de significado biológico, ya que se trata de proteínas que cuentan a priori con una función opuesta. Sin embargo, el producto MMP-9 x TIMP-1 no hace más que unificar en una única variable la potencialidad pronóstica de cada una de ellas, lo que justifica los resultados conseguidos.

9.- RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE LAS MMPs Y EL TIMP-1 Y LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON QUIMIOTERAPIA DE INDUCCIÓN.

Existen datos clínicos⁷⁹ y experimentales⁸⁰ que han relacionado determinados polimorfismos o niveles de expresión de MMPs con la respuesta conseguida tras la administración de un tratamiento con quimioterapia basada en el platino en los carcinomas de cabeza y cuello.

De acuerdo con nuestros resultados, no existió relación entre la respuesta a la administración de quimioterapia de inducción y el nivel de expresión para ninguna de las MMPs estudiadas ni para el TIMP-1.

Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que nuestro estudio contó con un número muy limitado de pacientes que iniciaron tratamiento con quimioterapia de inducción (n=21), por lo que los resultados obtenidos al respecto cuentan con escasa potencia desde el punto de vista estadístico.

10.- RELACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LAS MMPs CON LOS DE OTROS GENES QUE PARTICIPAN EN LOS PROCESOS DE CARCINÓGENESIS EN LOS PACIENTES CON CARCINOMAS ESCAMOSOS DE CABEZA Y CUELLO.

Finalmente, se evaluó la relación existente entre los niveles de expresión de los genes que codifican las diferentes MMPs estudiadas y el TIMP-1 y los correspondientes a una serie de genes implicados en la respuesta inflamatoria y la angiogénesis, y que se han visto relacionados con la actividad MMP.

10.1.- Relación de MMPs con la vía de síntesis de prostaglandinas (PG): COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2.

La biosíntesis de la PGE₂ implica la oxidación e isomerización del ácido araquidónico (AA) a partir de tres reacciones enzimáticas. El paso metabólico inicial corresponde a la liberación del AA desde la membrana celular a partir de la acción de la fosfolipasa A₂. El AA es metabolizado entonces a PGG₂ y a PGH₂ a partir de las actividades ciclooxigenasa y peroxidasa de la enzima ciclooxigenasa (COX). Hasta la fecha se han descrito tres isoformas de la enzima COX, la COX-1 y COX-3 codificadas por el gen COX-1, y la COX-2 codificada por el gen COX-2. La COX-1 es una enzima constitutiva presente en la mayoría de tejidos, y regula la producción de los prostanoïdes necesarios para el mantenimiento de la homeostasis. En contraste, la COX-2 es una enzima inducible, que no se expresa en condiciones normales, en tanto que lo hace en respuesta a la presencia de hormonas, factores de crecimiento, citoquinas pro-inflamatorias, endotoxinas bacterianas o la acción de determinados oncogenes. La PGH₂ es el precursor común de los prostanoïdes bioactivos (PGs y tromboxanos), cuya síntesis depende de sintetasas específicas, que cuentan con diferentes estructuras y una distribución tisular y

celular específica. Las enzimas que catalizan la conversión de PGH_2 a PGE_2 son conocidos como PGE-sintetasas (PGES). Hasta el momento se han identificado tres proteínas con actividad PGES: microsomal-PGES (mPGES)-1, y mPGES-2; y citosólica-PGES (cPGES). Por último, el efecto celular de la PGE_2 se ejerce a través de una familia de receptores proteicos designados como EP1, EP2, EP3 y EP4, que se acoplan a diferentes vías de señal intracelular. La siguiente figura esquematiza las vías metabólicas implicadas en el metabolismo de las PGE.

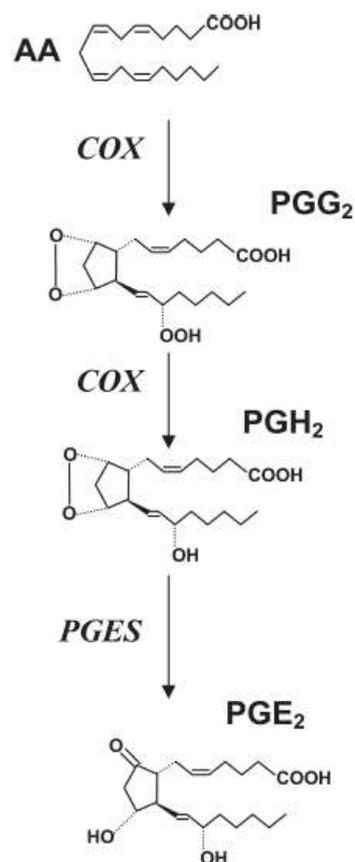


Figura 126: Representación esquemática de la vía metabólica de la PGE_2 a partir de Ácido Araquidónico (AA). PG, prostaglandina; PGES, PGE-sintetasa.

Se ha detectado unos niveles elevados de PG en carcinomas de diferentes localizaciones, incluyendo los carcinomas escamosos de cabeza y cuello¹¹⁰.

Existen evidencias de que el incremento en la presencia de PGE₂ en los carcinomas de cabeza y cuello está asociado a la sobre-expresión de la COX-2¹¹¹, y de que esta sobre-expresión es un acontecimiento precoz en el proceso de la carcinogénesis, apareciendo en las lesiones pre-neoplásicas^{112,113}.

La PGE₂ está implicada en los fenómenos de carcinogénesis y desarrollo del tumor estimulando su crecimiento a partir de la inducción de diferentes factores de crecimiento¹¹⁴, inhibiendo la apoptosis¹¹⁵, promoviendo la angiogénesis¹¹⁶, alterando los mecanismos inmunitarios con capacidad de contrarrestar al tumor¹¹⁷, o modulando la capacidad invasiva de las células tumorales y su potencialidad metastásica a partir de la modulación de la actividad MMP¹¹⁸.

En un estudio de la actividad a nivel transcripcional de los genes implicados en el metabolismo de la PGE₂ en carcinomas de cabeza y cuello, Camacho y cols¹¹⁹ demostraron un incremento significativo en la expresión de COX-2 y cPGES, en tanto que no existieron diferencias significativas en la expresión de COX-1 y mPGES-1 y -2 entre el tejido tumoral y el correspondiente a mucosa sana(Figura 127).

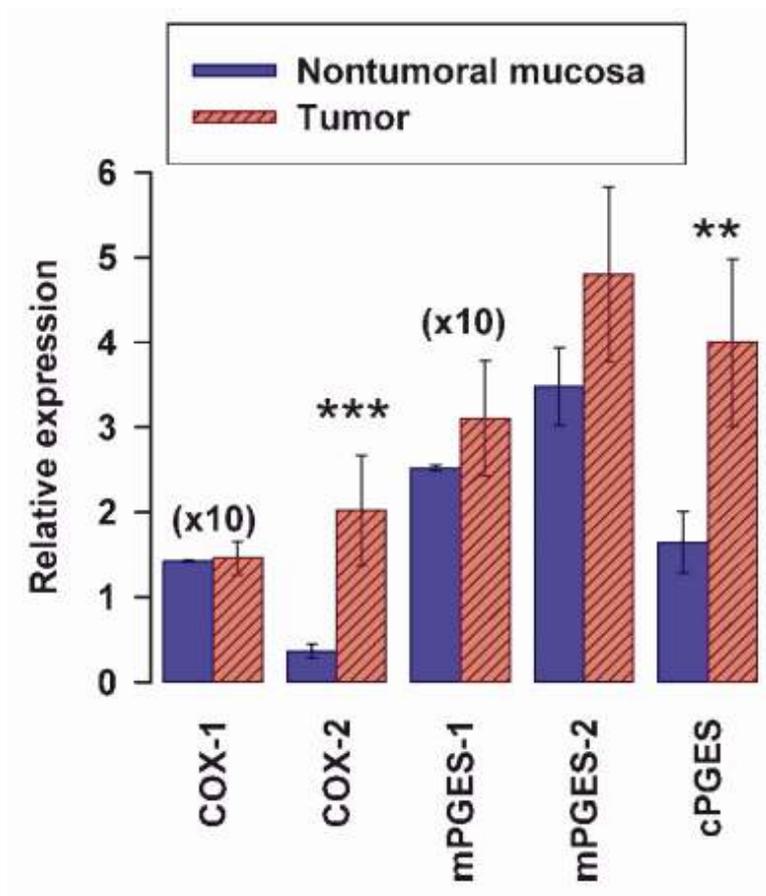


Figura 127¹¹⁹: Niveles de RNAm de la ciclooxigenasa-1(COX-1), ciclooxigenasa-2(COX-2), PGEsintetasa-1 microsomal (mPGES-1), PGEsintetasa-2 microsomal (mPGES-2), y PGEsintetasa citosólica, en muestras de mucosa tumoral y no tumoral, determinadas por RT-PCR en tiempo real. N=34; media (** $p < .01$ (*t student para datos apareados*); *** $p < .001$).

La inhibición de la actividad COX induce una reducción en la expresión de MMPs a nivel transcripcional y de actividad inmunohistoquímica, reduciéndose la capacidad de invasión y migración celular en modelos de carcinoma de mama¹²⁰ y de próstata¹²¹.

En estudios de diseño similar realizados en carcinomas de cabeza y cuello, Kurihara y cols¹²², y Koontongkaew y cols¹²³, alcanzaron las mismas conclusiones, una disminución en la invasividad por parte de una línea celular de carcinoma de cavidad oral al inhibir de forma selectiva la actividad COX-2. Esta supresión de la capacidad invasiva se asoció con una disminución en la expresión de las MMPs -2 y -9, y la reducción consiguiente de la capacidad gelatinolítica.

En nuestro conocimiento, no existen estudios en la literatura que hayan evaluado las relaciones entre los niveles de los genes que codifican la expresión de las MMPs y los implicados en el metabolismo de la PGE₂. De acuerdo con nuestros resultados, la correlación existente entre los niveles de expresión de la COX-2 y las diferentes MMPs estudiadas y el TIMP-1, no alcanzó valores elevados o muy elevados en ningún caso. Por el contrario, sí existió una correlación intensa entre la expresión de la MMP-1 y MMP-3 con la COX-1. En los casos en que se produjo una correlación elevada con la COX-1, apareció igualmente una correlación elevada con la mPGES-1. Por otra parte, apareció una correlación elevada entre los niveles de expresión correspondientes a las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 y la mPGES-2.

10.2.- Relación de MMPs con el SDF-1.

El SDF-1 (stromal derived factor-1 o CXCL12) es una quimioquina codificada por un gen localizado en el cromosoma 10q11.1, en contraposición a la mayoría de las quimioquinas que se codifican en el cromosoma 4. Es expresado por una amplia variedad de tipos celulares, incluyendo células endoteliales y fibroblastos del estroma. El SDF-1 cuenta con unos receptores específicos de membrana, CXCR4 y CXCR7, que se encuentran sobre-expresados en las células tumorales de los carcinomas de cabeza y cuello¹²⁴.

La actividad del eje SDF-1/CXCR4 favorece los fenómenos de carcinogénesis a través de diferentes vías (revisado en Kryzek y cols¹²⁵): favoreciendo la proliferación y supervivencia de las células tumorales, la angiogénesis, la migración celular y degradación de la matriz extracelular a partir de la acción de las MMPs, y suprimiendo el control dependiente del sistema inmunitario.

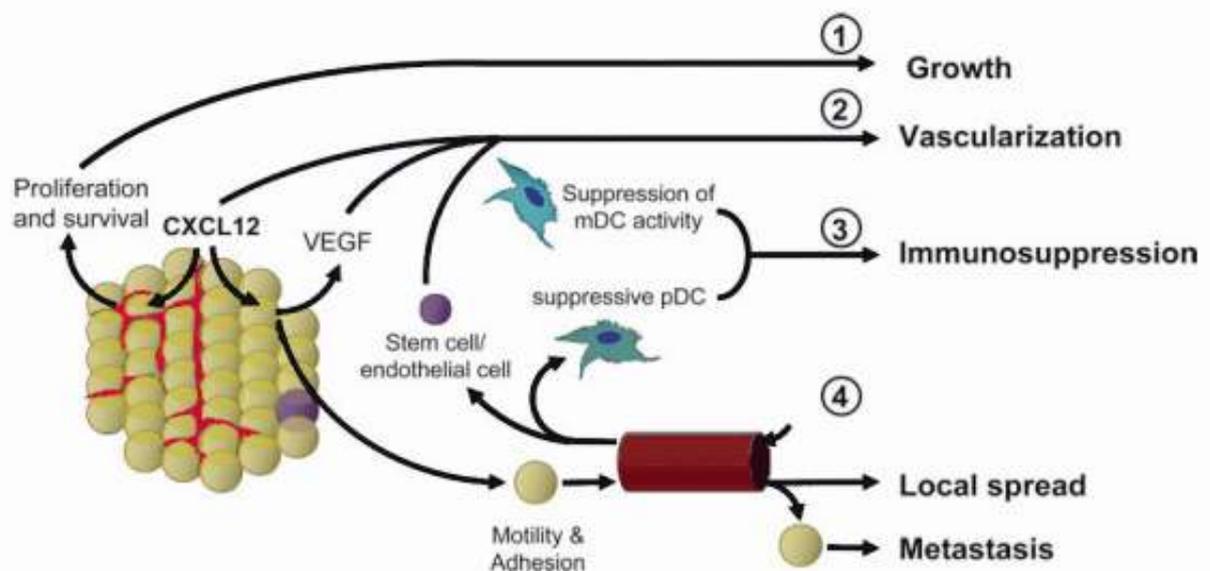


Figura 128¹²⁵: Vías de acción mediada por CXCL12 sobre la biología tumoral.

- 1) CXCL12 promoción del crecimiento tumoral y malignización.
- 2) CXCL12 aumenta la neovascularización tumoral.
- 3) CXCL12 promueve un entorno de inmunosupresión
- 4) CXCL12 media la migración de células tumorales, adhesión e invasión.

**mDC*: células dendríticas mieloides; *pDC*: células dendríticas plasmocitoides.

A partir de líneas celulares de carcinoma escamoso de cavidad oral, Hong y cols⁶⁸ demostraron una disminución en capacidad invasiva a partir del silenciamiento de la expresión del CXCR4, el receptor específico del SDF-1, mediante ARN de interferencia.

En un estudio inmunohistoquímico realizado en 30 pacientes con carcinomas de laringe-hipofaringe, Tan y cols¹²⁶ demostraron la positividad en la membrana y citoplasma frente al CXCR4 de las células tumorales, pero no en las células del estroma asociadas al tumor, en tanto que el SDF-1, aparecía positivo a nivel citoplasmático de forma preferente en las células del estroma. En dos líneas celulares de carcinoma de cabeza y cuello, que mostraban expresión de CXCR4 pero no del SDF-1, el tratamiento con SDF-1 condujo a un incremento en la capacidad migratoria y de invasión celular. Estos incrementos se relacionaron con un aumento en la expresión de una colagenasa (MMP-13), en tanto que no se modificaron los niveles de expresión correspondientes a las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9).

Por su parte, en un estudio in vitro realizado por Samara y cols¹²⁷ con 5 líneas celulares de carcinoma de cabeza y cuello, se comprobó como la activación del CXCR4 por parte del SDF-1 producía un incremento en la adhesividad y capacidad de migración de las células tumorales que se relacionaba con un aumento de la expresión de la MMP-9, en tanto que no se produjeron modificaciones en los niveles de expresión de la MMP-2.

A partir de todos estos datos se ha descrito un modelo según el cual las células tumorales expresarían el receptor CXCR4, en tanto que la secreción del SDF-1 dependería de las células del estroma. Una vez activado el receptor, se

pondrían en marcha una serie de vías que favorecerían los procesos de carcinogénesis tumoral.

No existen trabajos que evalúen la correlación en las expresiones de CXCR-4 y SDF-1 en los pacientes con carcinomas de cabeza y cuello. A partir de los datos obtenidos en nuestro estudio, no existió una correlación con nivel alto o muy alto entre el CXCR4 y ninguna de las MMPs estudiadas y el TIMP-1 (datos no incluidos en el presente estudio), en tanto que sí que se alcanzaron estos niveles de correlación entre el SDF-1 y la expresión correspondiente a las MMPs -1 y 3 (con unos coeficientes de correlación con valores superiores a 0.8), y a la MMP-2 y el TIMP-1. Las correlaciones con el resto de MMPs, si bien fueron significativas, alcanzaron unos coeficientes más discretos.

10.3.- Relación de MMPs con la interleuquina 8 (IL-8).

La IL-8 es una quimioquina producida por los macrófagos, las células epiteliales y endoteliales. Es uno de los mayores mediadores de la respuesta inflamatoria, contando con una capacidad quimiotáctica y promotora de la angiogénesis. El gen que codifica la IL-8 se localiza, junto con los genes de otras quimioquinas de la familia CXC, en el cromosoma 4q. Existen muchos receptores en la superficie de la membrana celular capaces de unirse a la IL-8, entre ellos los receptores CXCR1 y CXCR2, y los receptores toll-like, que se relacionan con el sistema inmune. La función primaria de la IL-8 consiste en inducir la quimiotaxis de los neutrófilos.

En los carcinomas de cabeza y cuello se ha comprobado la presencia de IL-8 a nivel del frente de infiltración tumoral, pero sin que existieran relaciones entre el

grado de expresión inmunohistoquímica y las características clínicas del tumor¹²⁸.

En un modelo de melanoma maligno, la inducción de la actividad IL-8 indujo un incremento en la expresión de la MMP-2, demostrándose un aumento significativo de la actividad proteolítica y de la capacidad de metastatización por parte del tumor¹²⁹.

De acuerdo con nuestros resultados, existió una correlación elevada entre la expresión del gen que codifica IL-8 y el correspondiente a la MMP-3, alcanzándose correlaciones moderadas con las MMP-1 y -2. No existen estudios en la literatura que analicen la expresión conjunta de la IL-8 y las MMPs en pacientes con carcinomas de cabeza y cuello.

10.4.- Relación de MMPs con el factor nuclear kappa B (NFκB).

El NFκB es un elemento regulador de los genes que codifican proteínas relacionadas con la inflamación, inmunidad, proliferación celular y apoptosis, fenómenos todos ellos relacionados con la carcinogénesis (revisado en Allen y cols¹³⁰).

La familia de los NFκB en los mamíferos cuenta con 5 proteínas distribuidas en 2 clases: clase I formada por el NFκB1 (p105, codificado en el cromosoma 4q24), y el NFκB2 (p100, cromosoma 10q24); y clase II formada por el RelA (p65, cromosoma 11q13), RelB (cromosoma 19q13.2-19q13), y cRel (cromosoma 2 p13-p12). Las proteínas de la clase I se sintetizan en forma de precursores. En el proceso de activación sufren una proteólisis a nivel del dominio C-terminal obteniéndose las formas activas, la p50 a partir de la p105, y la p52 a partir de la p100. El NFκB está compuesto por dímeros formados a

partir de proteínas de cada una de las clases. En las células no estimuladas, el NF κ B aparece secuestrado en el citoplasma celular por una familia de inhibidores específicos denominados I κ B (inhibitor of κ B). Existen dos vías de activación del NF κ B. La vía clásica se activa en respuesta a la presencia de citoquinas proinflamatorias y a procesos infecciosos. Esta vía se aplica a los dímeros compuestos por RelA/cRel y p105, activándose el complejo I κ B quinasa (IKK), que libera el NF κ B, permitiendo su traslocación al núcleo, donde ejercerá su efecto biológico. La siguiente figura esquematiza el mecanismo de activación correspondiente a esta vía clásica o canónica.

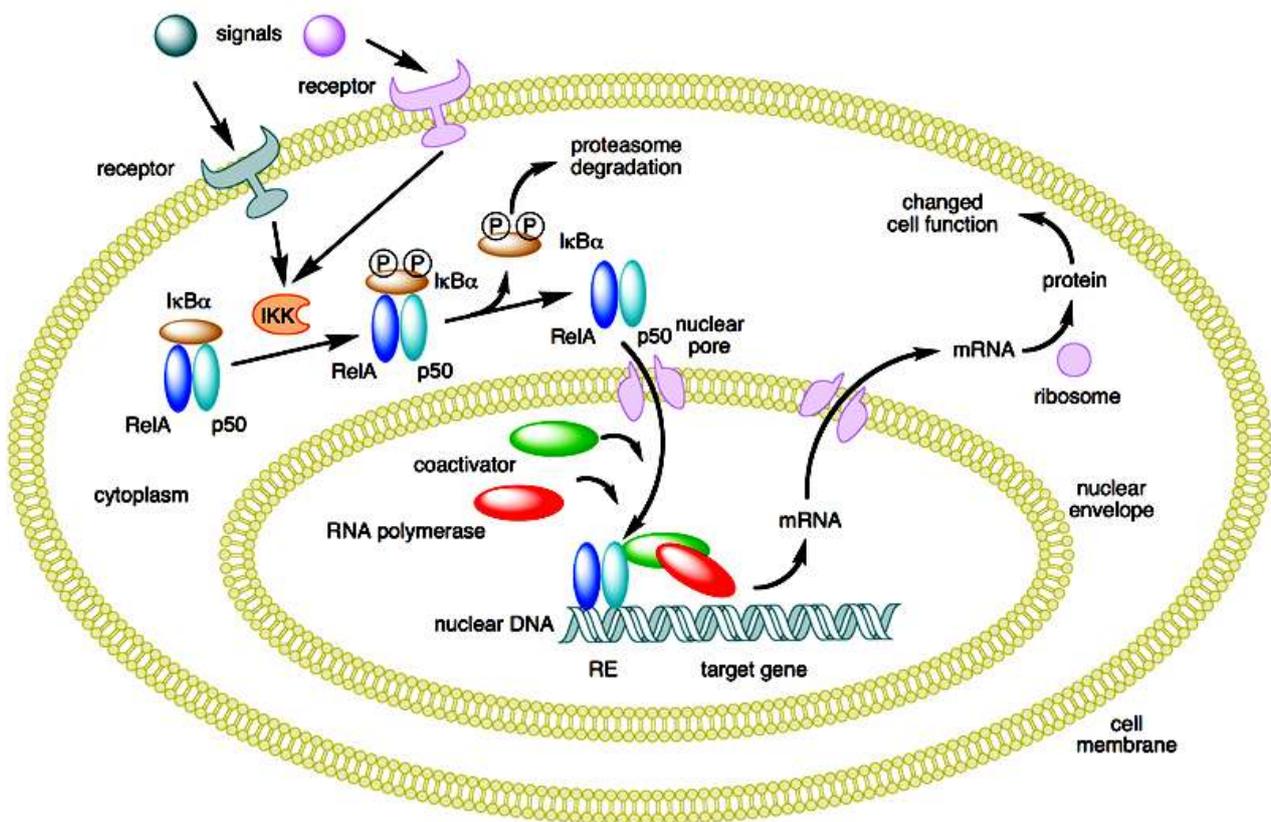


Figura 129: Vía clásica de activación del NF κ B.

La vía alternativa afecta a NF κ B2, que dimeriza de forma preferente con RelB.

Esta vía queda activada por ciertas citoquinas de la familia del TNF (tumor necrosis factor), liberándose el dímero RelB/p52 y permitiendo su traslocación al núcleo.

Una vez a nivel nuclear, el NF κ B regula la expresión de una serie de genes que se engloban dentro de cuatro grandes categorías: inmunorregulación e inflamación, anti-apoptosis, promotores de la proliferación celular, y genes que codifican reguladores negativos del NF κ B. El siguiente listado enumera las proteínas finales reguladas por la expresión del NF κ B en los pacientes con carcinomas escamosos de cabeza y cuello:

Función en CECC	Producto genético
Progresión ciclo celular	Ciclina D1
Regulación de la apoptosis	Bcl-XL A1/Bfl-1 IAP-1/IAP-2 TRAF1 TRAF2 Mdm2
Inflamación / Angiogénesis	TNF α IL-1,6,8 GRO α VEGF
Invasión Tisular / Metástasis	MMP-9 Heparinasa uPA TIMPs
Resistencia Terapéutica	Glicoproteína-P GADD45 V-GCS

Tabla 64: Listado de las diversas proteínas reguladas por la expresión de NF κ B. IAP, inhibidor de la apoptosis; TRAF, factor asociado al receptor de factor de necrosis tumoral; MDM2, homólogo humano de ratón minuto doble 2; TNF, Factor necrosis tumoral; IL, interleukina; GRO, onocogén relacionado al crecimiento; VEGF, factor crecimiento endotelial vascular; uPA, activador plasminógeno urokinasa; GADD, proteína inducible de daño del ADN y detención del crecimiento; GCS, glutamil-cistein sintetasa.

Existen evidencias estudiadas en diferentes modelos celulares que señalan que la expresión de las MMPs se encuentra regulada por la actividad del NF κ B^{98,131,132}. Además, se ha descrito cómo el NF κ B estimula la expresión de la heparinasa, la MMP-9 y el activador del plasminógeno urokinasa-like, todos ellos favorecedores de la migración celular y metastatización, en tanto que de forma recíproca provoca una inhibición en la regulación de los TIMPs y de los inhibidores del plasminógeno¹³³. En un estudio reciente realizado en un modelo de sarcomas, Kim y cols¹³⁴ demostraron que la supresión de la actividad NF κ B redujo la capacidad de migración e invasión celular a partir de una disminución significativa de la actividad de la MMP-9 y en menor medida de la MMP-2.

Bindhu y cols³³ realizaron un estudio inmunohistoquímico en pacientes con lesiones displásicas y carcinomas de cavidad oral en el que se evaluaron las MMPs -2 y -9 y el NF κ B, pudiendo observarse que un paralelismo en la progresión de la positividad de las gelatinasas y el factor nuclear a medida que progresaban histológicamente las lesiones.

En nuestro grupo de pacientes pudimos observar un nivel de correlación alto entre la actividad transcripcional de la MMP-1 y -9 y el TIMP-1, y un nivel de correlación muy alto con la MMP-2.

Existen evidencias en la literatura que señalan la existencia de relación entre el control local y la expresión del NF κ B en pacientes con carcinomas de cabeza y cuello tratados con radioterapia. Yoshida y cols¹³⁵ realizaron un estudio con la finalidad de evaluar el significado de la expresión del NF- κ B como marcador de resistencia a la radioterapia en pacientes con carcinomas de la laringe en estadio inicial (T1-T2N0). Se analizaron un total de 35 pacientes con recidiva a nivel local del tumor y 70 pacientes que consiguieron el control local de la

enfermedad. La determinación de la expresión del NF- κ B se llevó a cabo a partir de un estudio inmunohistoquímico realizado sobre las biopsias del tumor previas al tratamiento, evaluando la intensidad en la tinción citoplasmática y/o nuclear. De acuerdo con los resultados obtenidos, un 77% de los pacientes del grupo resistente a la radioterapia fueron positivos frente al NF- κ B, frente a un 50% en el grupo de pacientes que consiguió el control local con el tratamiento con radioterapia ($P=0.01$). Ni la expresión del bcl-2 ni la del EGFR se correlacionaron con la eficacia de la radioterapia en conseguir el control de la enfermedad. La siguiente figura muestra las curvas de supervivencia en función a positividad de NF- κ B.

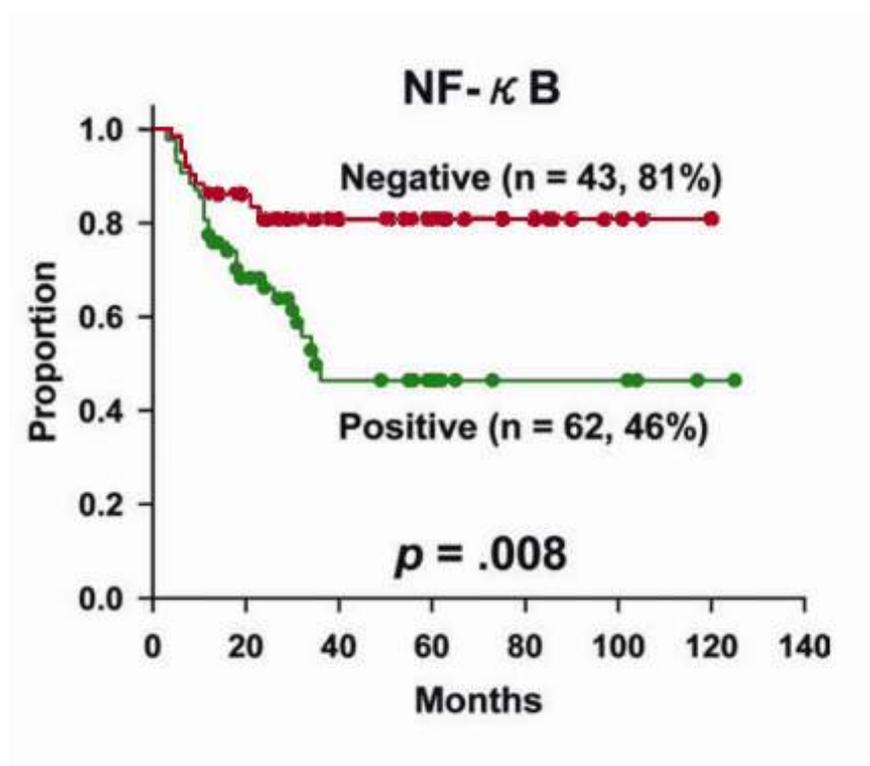


Figura 130: Curvas de supervivencia libres de recidiva local en relación a la positividad de NF κ B.

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

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

A partir de estos resultados, decidimos analizar la relación entre la expresión a nivel transcripcional del NF- κ B y el control local de la enfermedad en el grupo de nuestros pacientes que habían seguido un tratamiento con radioterapia. Se procedió de manera semejante a la realizada en el caso de la determinación de la capacidad pronóstica de las MMPs, con una evaluación del punto de corte óptimo mediante un análisis recursivo. La siguiente figura muestra el árbol de decisión obtenido al aplicar esta técnica estadística.

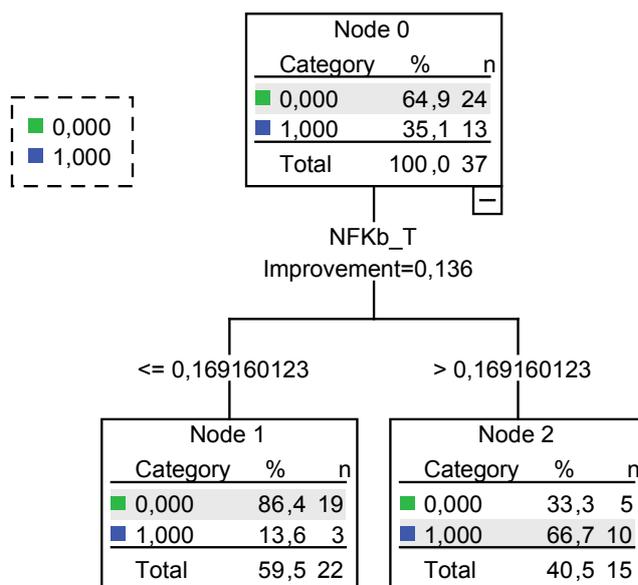


Figura 131: Resultados de CRT usando como variable independiente la expresión de NF- κ B.

Se procedió a continuación a determinar la supervivencia libre de recidiva local correspondiente a los pacientes tratados con radioterapia en función de la clasificación obtenida de acuerdo con los niveles de expresión del NF- κ B. La siguiente figura muestra las curvas de supervivencia libres de recidiva local correspondientes.

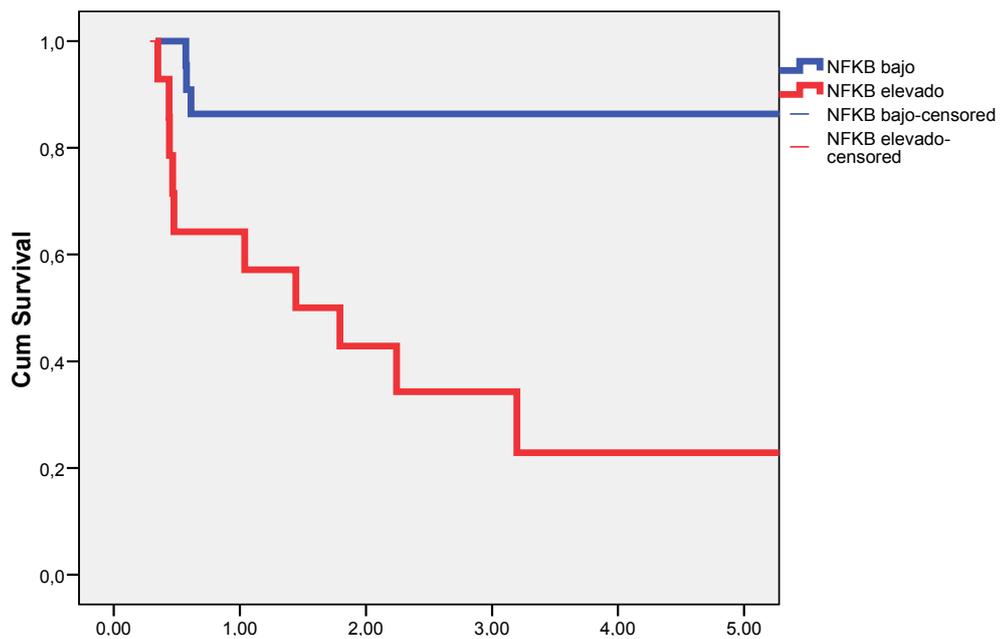


Figura 132: Curvas de supervivencia libre de recidiva local de pacientes tratados con radioterapia en relación a los niveles de expresión de NF κ B según el punto de corte establecido.

Existieron diferencias significativas en el control local de la enfermedad en función del nivel de expresión del NF- κ B ($P < 0,0001$).

Se procedió de una manera similar con la MMP-9, clasificándose sólo el grupo de pacientes tratados con radioterapia y considerando como variable dependiente el control local de la enfermedad. A partir de estas premisas, se obtuvo el siguiente árbol de clasificación pronóstica.

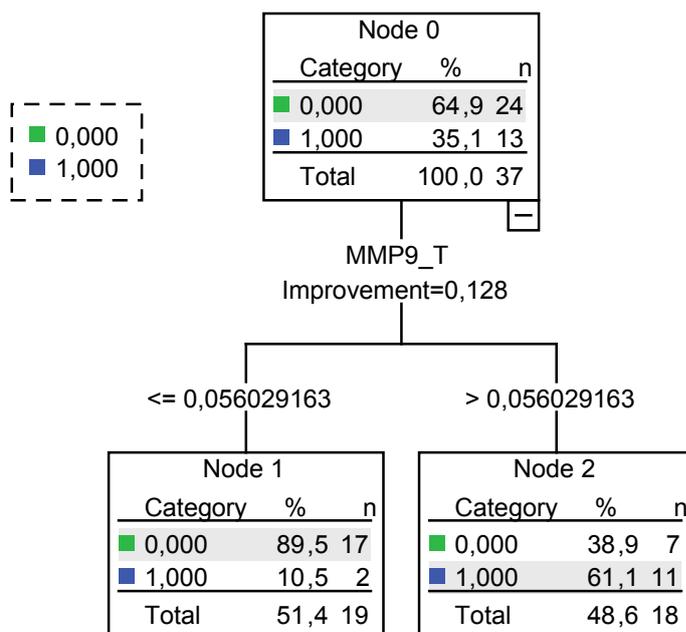


Figura 133: Resultados de CRT en pacientes tratados con radioterapia con control local usando como variable independiente la expresión de MMP-9.

De acuerdo con esta clasificación se procedió a evaluar la supervivencia libre de recidiva local.

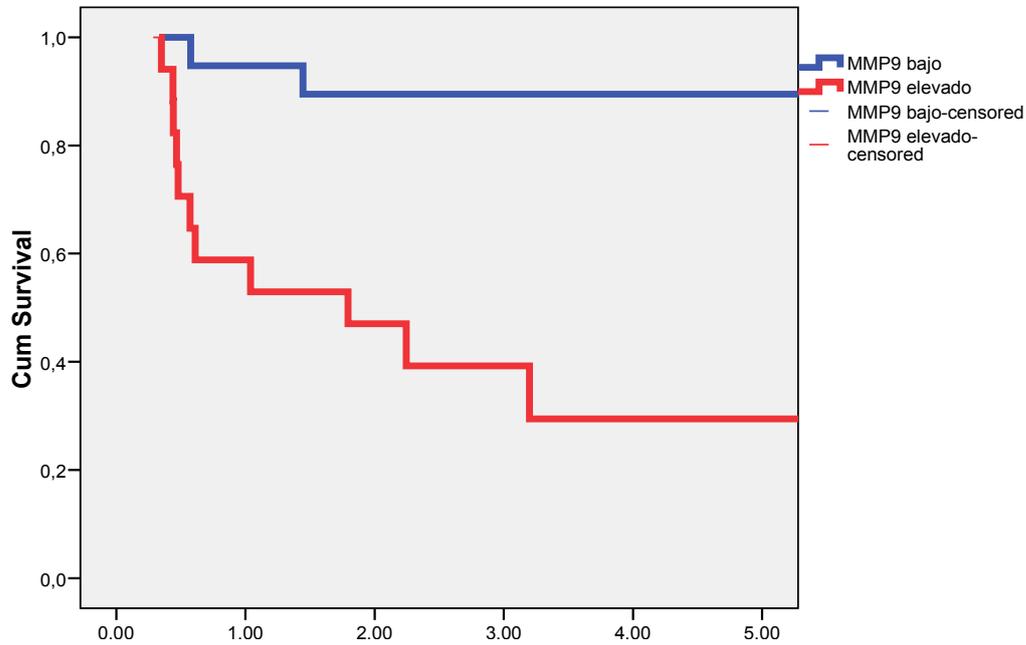


Figura 134: Curvas de supervivencia libre de recidiva local en relación a los niveles de MMP-9 según el punto de corte establecido.

Igualmente, aparecieron diferencias significativas en el control local de la enfermedad en función del nivel de expresión de la MMP-9.

La siguiente tabla de contingencia muestra la relación existente entre las clasificaciones realizadas en función de los niveles de expresión del NF- κ B y de la MMP-9.

		MMP9		Total
		Bajo	Elevado	
NF- κ B	Bajo	17	5	22
		45,9%	13,5%	59,5%
	Elevado	2	13	15
		5,4%	35,1%	40,5%
Total		19	18	37
		51,4%	48,6%	100,0%

Tabla 65: Relación existente entre las clasificaciones realizadas en función de los niveles de expresión del NF- κ B y de la MMP-9.

Existió una relación significativa entre ambas clasificaciones ($P < 0.0001$).

La conclusión que puede obtenerse del conjunto de datos analizados es que la MMP-9 cuenta con capacidad pronóstica significativa en relación al control local de la enfermedad. Es posible que en gran medida dicha capacidad pronóstica sea dependiente del nivel de expresión del NF- κ B, que es uno de los factores que está regulando la expresión de la MMP-9. En este caso, la MMP-9 contaría con una capacidad pronóstica significativa subrogada y condicionada a la actividad correspondiente al factor nuclear.

10.5.- Relación de MMPs con los promotores de angiogénesis HIF y VEGF.

El HIF-1 (hypoxia-inducible factor) es una proteína que juega un papel fundamental en la respuesta celular frente a la hipoxia. HIF-1 es un heterodímero compuesto por dos subunidades: HIF-1 α y HIF-1 β . La regulación dependiente del oxígeno se realiza a través de la subunidad HIF-1 α , que es sintetizada de forma constitutiva y degradada de forma rápida en condiciones de oxigenación habitual, de manera que el HIF-1 α cuenta con una vida media muy corta en las células normóxicas. En condiciones de hipoxia el proceso de degradación se suprime, lo que conlleva el incremento de su expresión.

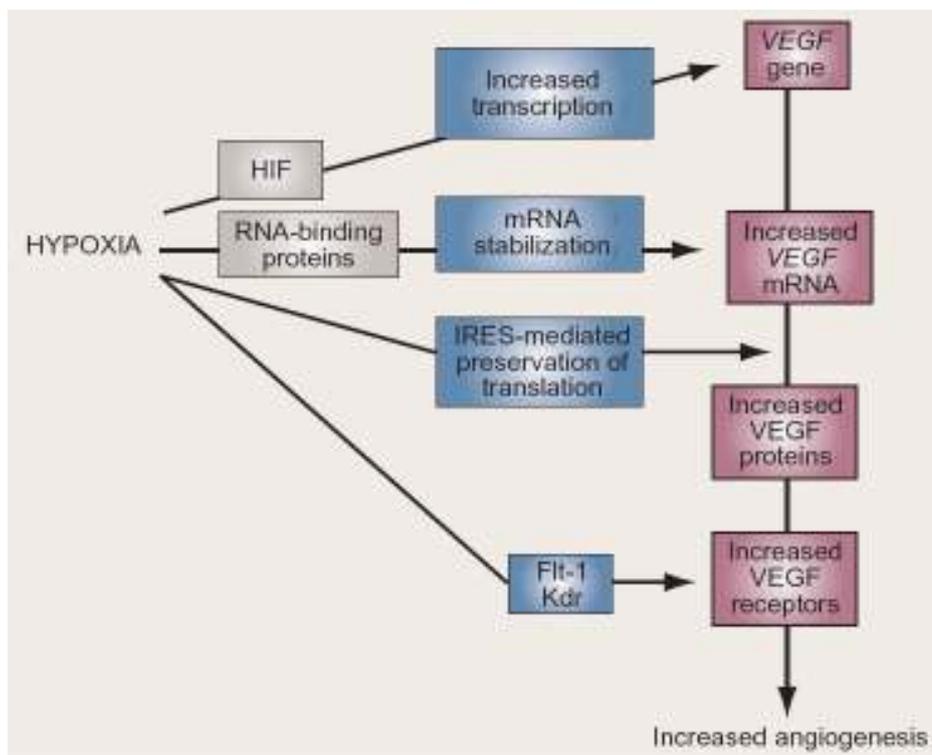


Figura 135: Vías de activación en respuesta a la hipoxia.

El HIF-1 α juega su papel biológico a partir de la transactivación de más de 70 genes que tienen como misión el incrementar la disponibilidad de oxígeno o favorecer la adaptación metabólica en un ambiente hipóxico. Entre los genes activados por la acción del HIF-1 α destaca el que codifica el VEGF (vascular

endothelial growth factor), requerido para promover los procesos de angiogénesis. La activación del HIF-1 α en situaciones de hipoxia depende a su vez de la actividad del NF- κ B.

En un estudio inmunohistoquímico desarrollado por Beasley y cols¹³⁶ en 69 pacientes sometidos a tratamiento quirúrgico, un 63.7% de los pacientes mostraron una sobre-expresión del HIF-1 α a nivel del tumor. Los autores encontraron una relación significativa entre esta positividad con un peor resultado oncológico, tal como muestra la siguiente figura que corresponde a la supervivencia ajustada en función del HIF-1 α .

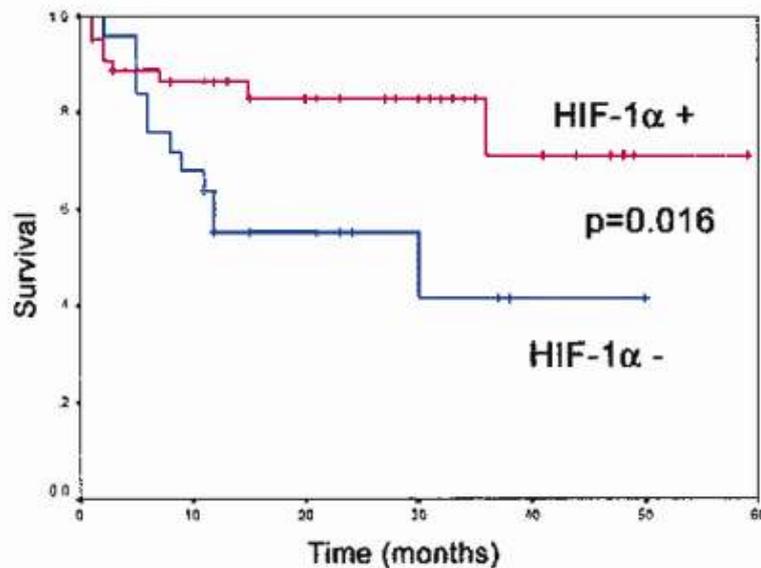


Figura 136: Supervivencia ajustada en función de la HIF-1 α .

Por su parte, existen gran cantidad de estudios que han evaluado la expresión del VEGF y su relevancia clínica en los pacientes con carcinomas de cabeza y cuello. En 2005 Kyzas y cols¹³⁷ publicaron los resultados de un metaanálisis en el que se evaluaba el significado pronóstico del VEGF, concluyendo que el

riesgo estimado de muerte a los 2 años para los pacientes positivos fue 1.88 veces superior (IC 95%: 1.43-2.45, $P < 0.001$).

En un trabajo realizado a partir del estudio inmunohistoquímico de muestras de 52 pacientes con carcinomas escamosos de cabeza y cuello, Riedel y cols⁵³ encontraron una relación significativa entre la expresión de la MMP-9 y el VEGF ($P < 0.05$). Por su parte, Arora y cols³⁵ encontraron también una relación significativa ($P = < 0.0001$) entre la MMP-11 y el VEGF tanto en carcinomas como en lesiones precancerosas de cavidad oral evaluadas mediante inmunohistoquímica.

Sin embargo, no existen estudios que hayan relacionado los niveles de transcripción correspondientes a las MMPs y HIF-1 α o VEGF.

De acuerdo con nuestros resultados, existió una correlación de nivel elevado entre la mayoría de las MMPs estudiadas, MMP-1, -2, -3, y -10 y el HIF-1 α . La correlación entre el HIF-1 α y la MMP-9, si bien alcanzó la significación estadística, mantuvo unos niveles más discretos. Por otro lado, también pudimos observar como la correlación del TIMP-1 con el HIF-1 α alcanzó niveles muy elevados.

Por el contrario, las correlaciones existentes a nivel transcripcional entre las MMPs y el VEGF se mantuvieron a unos niveles más discretos, sin que los coeficientes alcanzaran valores elevados para ninguna de las MMPs estudiadas. De los genes evaluados, el único que mantuvo una correlación con valores del coeficiente elevados fue el TIMP-1.

De estos resultados puede deducirse que apareció en general una correlación elevada entre expresión de MMPs y HIF-1 α , en tanto que la alcanzada con el

VEGF fue más discreta. El TIMP-1 mantuvo unos niveles de correlación intensos tanto con HIF-1 α como con VEGF.

VII.-CONCLUSIONES.

1.- Existe una relación entre los niveles de expresión de los genes que codifican las metaloproteínas (MMPs) medidos mediante una técnica de PCR a tiempo real y el control de la enfermedad en los pacientes con carcinomas escamosos de cabeza y cuello.

2.- Los niveles de expresión a nivel del tumor fueron significativamente superiores a los correspondientes a la mucosa sana para la totalidad de las MMPs estudiadas.

3.- En general, existió una correlación significativa entre los niveles de expresión a nivel del tumor para todas las MMPs evaluadas. Destacan los niveles de correlación alcanzados entre las MMP-1 y MMP-3, entre la MMP-1 y MMP-2, entre la MMP-2 y MMP-9, entre la MMP-10 y MMP-13, y entre la MMP-10 y el TIMP-1.

4.- No se encontraron diferencias significativas entre los niveles de expresión de las MMPs estudiadas y la afectación ganglionar.

5.- No se encontraron diferencias significativas entre los niveles de expresión de las MMPs estudiadas y la extensión local del tumor o el grado de diferenciación histológico. En relación a la localización primaria del tumor, sólo aparecieron diferencias significativas en los niveles de expresión de la MMP-3, que fueron superiores en los tumores localizados en cavidad oral y orofaringe en relación a los de laringe e hipofaringe.

6.- Los niveles de expresión de la MMP-9 y el TIMP-1 se relacionaron de forma significativa con la supervivencia ajustada de la enfermedad. Los pacientes con unos niveles de expresión elevados de MMP-9 o TIMP-1 contaron con una peor supervivencia.

7.- La MMP-9 apareció como un marcador con capacidad pronóstica para el control local de la enfermedad en aquellos pacientes sometidos a un tratamiento con radioterapia, en tanto que el TIMP-1 se relacionó especialmente con la aparición de metástasis a distancia en aquellos pacientes sometidos a un tratamiento quirúrgico.

8.- La agrupación de los valores de expresión normalizados de las MMPs en función de su categoría funcional no mejoró su capacidad pronóstica.

9.- El cociente entre los valores de expresión de las MMPs analizadas y el TIMP-1 no mejoró su capacidad pronóstica.

10.- Para los pacientes que recibieron quimioterapia de inducción, no existió una relación significativa entre los valores de expresión de las MMPs y el grado de respuesta conseguido.

11.- Existieron correlaciones significativas entre los niveles de expresión de las MMPs estudiadas y los correspondientes a genes relacionados con su actividad biológica. Destacaron los niveles de correlación alcanzados entre la MMP-1 y el SDF-1; entre la MMP-2 y el factor nuclear kappa-B y la

prostaglandin-E sintetasa microsomal 2; entre la MMP-3 y el SDF-1; y entre el TIMP-1 y el HIF.

VIII.-BIBLIOGRAFÍA.

1. Howell GM, Grandis JR. Molecular mediators of metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2005;27:710-717.
2. Liotta LA. Tumor invasion and metastases--role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award lecture. *Cancer Res* 1986;46:1-7.
3. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992;69:11-25.
4. Fisher RA, Race RR. Rh gene frequencies in Britain. *Nature* 1946;157:48.
5. Lopez-Otin C, Matrisian LM. Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 2007;7:800-808.
6. Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1962;48:1014-1022.
7. Hohberger L, Wuertz BR, Xie H, Griffin T, Ondrey F. TNF-alpha drives matrix metalloproteinase-9 in squamous oral carcinogenesis. *Laryngoscope* 2008;118:1395-1399.
8. Olson MW, Gervasi DC, Mobashery S, Fridman R. Kinetic analysis of the binding of human matrix metalloproteinase-2 and -9 to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2. *J Biol Chem* 1997;272:29975-29983.
9. Overall CM, Lopez-Otin C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer* 2002;2:657-672.
10. Rosenthal EL, Vidrine DM, Zhang W. Extracellular matrix metalloprotease inducer stimulates fibroblast-mediated tumor growth in vivo. *Laryngoscope* 2006;116:1086-1092.
11. Cao ZG, Li CZ. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter enhances oral squamous cell carcinoma susceptibility in a Chinese population. *Oral Oncol* 2006;42:32-38.
12. Polette M, Gilbert N, Stas I et al. Gelatinase A expression and localization in human breast cancers. An in situ hybridization study and immunohistochemical detection using confocal microscopy. *Virchows Arch* 1994;424:641-645.
13. Imanishi Y, Fujii M, Tokumaru Y et al. Clinical significance of expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase and matrix metalloproteinase-2 in human head and neck squamous cell carcinoma. *Hum Pathol* 2000;31:895-904.
14. Rosenthal EL, McCrory A, Talbert M, Carroll W, Magnuson JS, Peters GE. Expression of proteolytic enzymes in head and neck cancer-associated fibroblasts. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;130:943-947.
15. Patel BP, Shah SV, Shukla SN, Shah PM, Patel PS. Clinical significance of MMP-2 and MMP-9 in patients with oral cancer. *Head Neck* 2007;29:564-572.
16. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
17. Sun Y, Liu M, Yang B, Li B, Lu J. Role of siRNA silencing of MMP-2 gene on invasion and growth of laryngeal squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2008;265:1385-1391.
18. Sun Y, Liu M, Yang B, Lu J, Li B. Inhibition of laryngeal cancer cell invasion and growth with lentiviral-vector delivered short hairpin RNA targeting human MMP-9 gene. *Cancer Invest* 2008;26:984-989.
19. Rodrigo JP, Garcia LA, Ramos S, Lazo PS, Suarez C. EMS1 gene amplification correlates with poor prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2000;6:3177-3182.
20. Clark ES, Whigham AS, Yarbrough WG, Weaver AM. Cortactin is an essential regulator of matrix metalloproteinase secretion and extracellular matrix degradation in invadopodia. *Cancer Res* 2007;67:4227-4235.
21. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2:442-454.
22. Haro H, Crawford HC, Fingleton B, Shinomiya K, Spengler DM, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase-7-dependent release of tumor necrosis factor-alpha in a model of herniated disc resorption. *J Clin Invest* 2000;105:143-150.
23. Fowlkes JL, Enghild JJ, Suzuki K, Nagase H. Matrix metalloproteinases degrade insulin-like growth factor-binding protein-3 in dermal fibroblast cultures. *J Biol Chem* 1994;269:25742-25746.
24. Manes S, Mira E, Barbacid M et al. Identification of insulin-like growth factor-binding protein-1 as a potential physiological substrate for human stromelysin-3. *J Biol Chem* 1997;272:25706-25712.

25. Suzuki M, Raab G, Moses MA, Fernandez CA, Klagsbrun M. Matrix metalloproteinase-3 releases active heparin-binding EGF-like growth factor by cleavage at a specific juxtamembrane site. *J Biol Chem* 1997;272:31730-31737.
26. Simpson CJ, Talhouk RS, Alexander CM et al. Targeted expression of stromelysin-1 in mammary gland provides evidence for a role of proteinases in branching morphogenesis and the requirement for an intact basement membrane for tissue-specific gene expression. *J Cell Biol* 1994;125:681-693.
27. Fang J, Shing Y, Wiederschain D et al. Matrix metalloproteinase-2 is required for the switch to the angiogenic phenotype in a tumor model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:3884-3889.
28. Bergers G, Brekken R, McMahon G et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000;2:737-744.
29. Lamoreaux WJ, Fitzgerald ME, Reiner A, Hasty KA, Charles ST. Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro. *Microvasc Res* 1998;55:29-42.
30. O'Reilly MS, Wiederschain D, Stetler-Stevenson WG, Folkman J, Moses MA. Regulation of angiostatin production by matrix metalloproteinase-2 in a model of concomitant resistance. *J Biol Chem* 1999;274:29568-29571.
31. Wen W, Moses MA, Wiederschain D, Arbiser JL, Folkman J. The generation of endostatin is mediated by elastase. *Cancer Res* 1999;59:6052-6056.
32. Sterz CM, Kulle C, Dakic B et al. A basal-cell-like compartment in head and neck squamous cell carcinomas represents the invasive front of the tumor and is expressing MMP-9. *Oral Oncol* 2010;46:116-122.
33. Bindhu OS, Ramadas K, Sebastian P, Pillai MR. High expression levels of nuclear factor kappa B and gelatinases in the tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2006;28:916-925.
34. Tsai CH, Hsieh YS, Yang SF, Chou MY, Chang YC. Matrix metalloproteinase 2 and matrix metalloproteinase 9 expression in human oral squamous cell carcinoma and the effect of protein kinase C inhibitors: preliminary observations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;95:710-716.
35. Arora S, Kaur J, Sharma C et al. Stromelysin 3, Ets-1, and vascular endothelial growth factor expression in oral precancerous and cancerous lesions: correlation with microvessel density, progression, and prognosis. *Clin Cancer Res* 2005;11:2272-2284.
36. Birkedal-Hansen B, Pavelic ZP, Gluckman JL, Stambrook P, Li YQ, Stetler-Stevenson WG. MMP and TIMP gene expression in head and neck squamous cell carcinomas and adjacent tissues. *Oral Dis* 2000;6:376-382.
37. Magary SP, Ryan MW, Tarnuzzer RW, Kornberg L. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in laryngeal and pharyngeal squamous cell carcinoma: A quantitative analysis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;122:712-716.
38. Ruokolainen H, Paakko P, Turpeenniemi-Hujanen T. Expression of matrix metalloproteinase-9 in head and neck squamous cell carcinoma: a potential marker for prognosis. *Clin Cancer Res* 2004;10:3110-3116.
39. Ruokolainen H, Paakko P, Turpeenniemi-Hujanen T. Tissue and circulating immunoreactive protein for MMP-2 and TIMP-2 in head and neck squamous cell carcinoma--tissue immunoreactivity predicts aggressive clinical course. *Mod Pathol* 2006;19:208-217.
40. Ruokolainen H, Paakko P, Turpeenniemi-Hujanen T. Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 is prognostic in head and neck squamous cell carcinoma: comparison of the circulating and tissue immunoreactive protein. *Clin Cancer Res* 2005;11:3257-3264.
41. de Vicente JC, Fresno MF, Villalain L, Vega JA, Hernandez Vallejo G. Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2005;41:283-293.
42. de Vicente JC, Lequerica-Fernandez P, Santamaria J, Fresno MF. Expression of MMP-7 and MT1-MMP in oral squamous cell carcinoma as predictive indicator for tumor invasion and prognosis. *J Oral Pathol Med* 2007;36:415-424.
43. Kosunen A, Pirinen R, Ropponen K et al. CD44 expression and its relationship with MMP-9, clinicopathological factors and survival in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2007;43:51-59.
44. Zhang H, Liu M, Sun Y, Lu J. MMP-14 can serve as a prognostic marker in patients with supraglottic cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2009;266:1427-1434.
45. Luukka M, Vihinen P, Kronqvist P et al. Association between high collagenase-3 expression levels and poor prognosis in patients with head and neck cancer. *Head Neck* 2006;28:225-234.

46. Saussez S, Cludts S, Capouillez A et al. Identification of matrix metalloproteinase-9 as an independent prognostic marker in laryngeal and hypopharyngeal cancer with opposite correlations to adhesion/growth-regulatory galectins-1 and -7. *Int J Oncol* 2009;34:433-439.
47. Stokes A, Joutsa J, Ala-Aho R et al. Expression profiles and clinical correlations of degradome components in the tumor microenvironment of head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2010;16:2022-2035.
48. Kusakawa J, Sasaguri Y, Shima I, Kameyama T, Morimatsu M. Expression of matrix metalloproteinase-2 related to lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. A clinicopathologic study. *Am J Clin Pathol* 1993;99:18-23.
49. Charous SJ, Stricklin GP, Nanney LB, Netterville JL, Burkey BB. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997;106:271-278.
50. Kurahara S, Shinohara M, Ikebe T et al. Expression of MMPs, MT-MMP, and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis. *Head Neck* 1999;21:627-638.
51. Ikebe T, Shinohara M, Takeuchi H et al. Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase in tumor tissues correlates with the invasiveness of oral cancer. *Clin Exp Metastasis* 1999;17:315-323.
52. Hong SD, Hong SP, Lee JI, Lim CY. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oral squamous cell carcinomas with regard to the metastatic potential. *Oral Oncol* 2000;36:207-213.
53. Riedel F, Gotte K, Schwalb J, Bergler W, Hormann K. Expression of 92-kDa type IV collagenase correlates with angiogenic markers and poor survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2000;17:1099-1105.
54. Katayama A, Bandoh N, Kishibe K et al. Expressions of matrix metalloproteinases in early-stage oral squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastases and prognosis. *Clin Cancer Res* 2004;10:634-640.
55. Liu WW, Zeng ZY, Wu QL, Hou JH, Chen YY. Overexpression of MMP-2 in laryngeal squamous cell carcinoma: a potential indicator for poor prognosis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;132:395-400.
56. Yuce I, Bayram A, Cagli S, Canoz O, Bayram S, Guney E. The role of CD44 and matrix metalloproteinase-9 expression in predicting neck metastasis of supraglottic laryngeal carcinoma. *Am J Otolaryngol* 2010.
57. Germani RM, Civantos FJ, Elgart G, Roberts B, Franzmann EJ. Molecular markers of micrometastasis in oral cavity carcinomas. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2009;141:52-58.
58. Gorogh T, Beier UH, Baumken J et al. Metalloproteinases and their inhibitors: influence on tumor invasiveness and metastasis formation in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck* 2006;28:31-39.
59. Kawano K, Yanagisawa S. Predictive value of laminin-5 and membrane type 1-matrix metalloproteinase expression for cervical lymph node metastasis in T1 and T2 squamous cell carcinomas of the tongue and floor of the mouth. *Head Neck* 2006;28:525-533.
60. Xie M, Sun Y, Li Y. Expression of matrix metalloproteinases in supraglottic carcinoma and its clinical implication for estimating lymph node metastases. *Laryngoscope* 2004;114:2243-2248.
61. Agra IM, Carvalho AL, Pinto CA et al. Biological markers and prognosis in recurrent oral cancer after salvage surgery. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2008;134:743-749.
62. Yoshizaki T, Sato H, Maruyama Y et al. Increased expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase in head and neck carcinoma. *Cancer* 1997;79:139-144.
63. Yoshizaki T, Maruyama Y, Sato H, Furukawa M. Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 correlates with activation of matrix metalloproteinase-2 and predicts poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2001;95:44-50.
64. Ondruschka C, Buhtz P, Motsch C et al. Prognostic value of MMP-2, -9 and TIMP-1,-2 immunoreactive protein at the invasive front in advanced head and neck squamous cell carcinomas. *Pathol Res Pract* 2002;198:509-515.
65. Culhaci N, Metin K, Copcu E, Dikicioglu E. Elevated expression of MMP-13 and TIMP-1 in head and neck squamous cell carcinomas may reflect increased tumor invasiveness. *BMC Cancer* 2004;4:42.
66. Chuang HC, Su CY, Huang H et al. Active matrix metalloproteinase-7 is associated with invasion in buccal squamous cell carcinoma. *Mod Pathol* 2008;21:1444-1450.
67. Wiegand S, Dunne AA, Muller H et al. Metaanalysis of the significance of matrix metalloproteinases for lymph node disease in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 2005;104:94-100.

68. Hong JS, Pai HK, Hong KO et al. CXCR-4 knockdown by small interfering RNA inhibits cell proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma cells. *J Oral Pathol Med* 2009;38:214-219.
69. Stoltzfus P, Hogmo A, Lindholm J, Aspenblad U, Auer G, Munck-Wikland E. The gamma2 chain of laminin-5 as an indicator of increased risk for recurrence in T1 stage tongue cancer. *Anticancer Res* 2004;24:3109-3114.
70. de Amorim RF, da Silveira EJ, Queiroz LM, Galvao HC, de Souza LB, de Almeida Freitas R. Matrilysins may not predict the metastatic potential in squamous cell carcinoma of the tongue. *Acta Odontol Scand* 2010;68:228-231.
71. P OC, Rhys-Evans PH, Eccles SA. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001;127:813-820.
72. Kusakawa J, Sasaguri Y, Morimatsu M, Kameyama T. Expression of matrix metalloproteinase-3 in stage I and II squamous cell carcinoma of the oral cavity. *J Oral Maxillofac Surg* 1995;53:530-534.
73. Sawatsubashi M, Mizokami H, Tokunaga O, Shin T. Expression of MMP-1, TIMP-1, and type I collagen in laryngeal carcinoma. *Mod Pathol* 1998;11:878-885.
74. Repassy G, Forster-Horvath C, Juhasz A, Adany R, Tamassy A, Timar J. Expression of invasion markers CD44v6/v3, NM23 and MMP2 in laryngeal and hypopharyngeal carcinoma. *Pathol Oncol Res* 1998;4:14-21.
75. Krecicki T, Zalesska-Krecicka M, Jelen M, Szkudlarek T, Horobiowska M. Expression of type IV collagen and matrix metalloproteinase-2 (type IV collagenase) in relation to nodal status in laryngeal cancer. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 2001;26:469-472.
76. Franchi A, Santucci M, Masini E, Sardi I, Paglierani M, Gallo O. Expression of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 in carcinoma of the head and neck. *Cancer* 2002;95:1902-1910.
77. Impola U, Uitto VJ, Hietanen J et al. Differential expression of matrilysin-1 (MMP-7), 92 kD gelatinase (MMP-9), and metalloelastase (MMP-12) in oral verrucous and squamous cell cancer. *J Pathol* 2004;202:14-22.
78. Korpi JT, Kervinen V, Maklin H et al. Collagenase-2 (matrix metalloproteinase-8) plays a protective role in tongue cancer. *Br J Cancer* 2008;98:766-775.
79. Blons H, Gad S, Zinzindohoue F et al. Matrix metalloproteinase 3 polymorphism: a predictive factor of response to neoadjuvant chemotherapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:2594-2599.
80. Ansell A, Jerhammar F, Ceder R, Grafstrom R, Grenman R, Roberg K. Matrix metalloproteinase-7 and -13 expression associate to cisplatin resistance in head and neck cancer cell lines. *Oral Oncol* 2009;45:866-871.
81. Ranuncolo SM, Matos E, Loria D et al. Circulating 92-kilodalton matrix metalloproteinase (MMP-9) activity is enhanced in the euglobulin plasma fraction of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 2002;94:1483-1491.
82. Ruokolainen H, Paakko P, Turpeenniemi-Hujanen T. Serum matrix metalloproteinase-9 in head and neck squamous cell carcinoma is a prognostic marker. *Int J Cancer* 2005;116:422-427.
83. El Houda Aguezny N, Badoual C, Hans S et al. Soluble interleukin-2 receptor and metalloproteinase-9 expression in head and neck cancer: prognostic value and analysis of their relationships. *Clin Exp Immunol* 2007;150:114-123.
84. Liu CJ, Chang KW, Lin SC, Cheng HW. Presurgical serum levels of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2009;45:920-925.
85. Pradhan-Palikhe P, Vesterinen T, Tarkkanen J et al. Plasma level of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 but not that of matrix metalloproteinase-8 predicts survival in head and neck squamous cell cancer. *Oral Oncol* 2010;46:514-518.
86. Yu C, Pan K, Xing D et al. Correlation between a single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 promoter and risk of lung cancer. *Cancer Res* 2002;62:6430-6433.
87. Yu C, Zhou Y, Miao X, Xiong P, Tan W, Lin D. Functional haplotypes in the promoter of matrix metalloproteinase-2 predict risk of the occurrence and metastasis of esophageal cancer. *Cancer Res* 2004;64:7622-7628.
88. Xu E, Lai M, Lv B, Xing X, Huang Q, Xia X. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 promoter is associated with colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;324:999-1003.

89. Zhou Y, Yu C, Miao X et al. Substantial reduction in risk of breast cancer associated with genetic polymorphisms in the promoters of the matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 genes. *Carcinogenesis* 2004;25:399-404.
90. P OC, Khantapura P. The role of genetic polymorphisms in the promoters of the matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 genes in head and neck cancer. *Oral Oncol* 2006;42:257-267.
91. P Oc, Leksrisakul P, Sangruchi S. A functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 gene promoter is associated with susceptibility and aggressiveness of head and neck cancer. *Int J Cancer* 2006;118:2548-2553.
92. Chaudhary AK, Singh M, Bharti AC, Asotra K, Sundaram S, Mehrotra R. Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases and their inhibitors in potentially malignant and malignant lesions of the head and neck. *J Biomed Sci* 2010;17:10.
93. Peng B, Cao L, Wang W et al. Polymorphisms in the promoter regions of matrix metalloproteinases 1 and 3 and cancer risk: a meta-analysis of 50 case-control studies. *Mutagenesis* 2010;25:41-48.
94. Peng B, Cao L, Ma X, Wang W, Wang D, Yu L. Meta-analysis of association between matrix metalloproteinases 2, 7 and 9 promoter polymorphisms and cancer risk. *Mutagenesis* 2010;25:371-379.
95. Ala-aho R, Johansson N, Grenman R, Fusenig NE, Lopez-Otin C, Kahari VM. Inhibition of collagenase-3 (MMP-13) expression in transformed human keratinocytes by interferon-gamma is associated with activation of extracellular signal-regulated kinase-1,2 and STAT1. *Oncogene* 2000;19:248-257.
96. McGaha TL, Phelps RG, Spiera H, Bona C. Halofuginone, an inhibitor of type-I collagen synthesis and skin sclerosis, blocks transforming-growth-factor-beta-mediated Smad3 activation in fibroblasts. *J Invest Dermatol* 2002;118:461-470.
97. Bond M, Baker AH, Newby AC. Nuclear factor kappaB activity is essential for matrix metalloproteinase-1 and -3 upregulation in rabbit dermal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;264:561-567.
98. Han YP, Tuan TL, Wu H, Hughes M, Garner WL. TNF-alpha stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF-(kappa)B mediated induction of MT1-MMP. *J Cell Sci* 2001;114:131-139.
99. Skipper JB, McNally LR, Rosenthal EL, Wang W, Buchsbaum DJ. In vivo efficacy of marimastat and chemoradiation in head and neck cancer xenografts. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2009;71:1-5.
100. Katori H, Baba Y, Imagawa Y et al. Reduction of in vivo tumor growth by MMI-166, a selective matrix metalloproteinase inhibitor, through inhibition of tumor angiogenesis in squamous cell carcinoma cell lines of head and neck. *Cancer Lett* 2002;178:151-159.
101. Li WZ, Huo QJ, Wang XY, Xu F. Inhibitive effect of celecoxib on the adhesion and invasion of human tongue squamous carcinoma cells to extracellular matrix via down regulation of MMP-2 expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2010;93:113-119.
102. Leon X, Orus C, Quer M. [Design, maintenance, and exploitation of an oncologic database for patients with malignant tumors of the head and neck]. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2002;53:185-190.
103. Sobin LH WC. *UICC: TNM classification of malignant tumors. 6th ed.* Hoboken, New Jersey: : John Wiley & Sons., 2002.
104. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-408.
105. Unsal Kilic D, Uner A, Akyurek N, Erpolat P, Dursun A, Pak Y. Matrix metalloproteinase-9 expression correlated with tumor response in patients with locally advanced rectal cancer undergoing preoperative chemoradiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;67:196-203.
106. Ree AH, Florenes VA, Berg JP, Maelandsmo GM, Nesland JM, Fodstad O. High levels of messenger RNAs for tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2) in primary breast carcinomas are associated with development of distant metastases. *Clin Cancer Res* 1997;3:1623-1628.
107. Zeng ZS, Cohen AM, Zhang ZF, Stetler-Stevenson W, Guillem JG. Elevated tissue inhibitor of metalloproteinase 1 RNA in colorectal cancer stroma correlates with lymph node and distant metastases. *Clin Cancer Res* 1995;1:899-906.
108. Cavalheiro BG, Junqueira CR, Brandao LG. Ratio of metalloproteinase 2 to tissue inhibitor of metalloproteinase 2 in medullary thyroid carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2009;135:812-817.

109. Nakopoulou L, Tsirmpa I, Alexandrou Pet al. MMP-2 protein in invasive breast cancer and the impact of MMP-2/TIMP-2 phenotype on overall survival. *Breast Cancer Res Treat* 2003;77:145-155.
110. Jung TT, Berlinger NT, Juhn SK. Prostaglandins in squamous cell carcinoma of the head and neck: a preliminary study. *Laryngoscope* 1985;95:307-312.
111. Chan G, Boyle JO, Yang EK et al. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* 1999;59:991-994.
112. Sudbo J, Ristimaki A, Sondresen JE et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in high-risk premalignant oral lesions. *Oral Oncol* 2003;39:497-505.
113. Shibata M, Kodani I, Osaki Met al. Cyclo-oxygenase-1 and -2 expression in human oral mucosa, dysplasias and squamous cell carcinomas and their pathological significance. *Oral Oncol* 2005;41:304-312.
114. Pai R, Soreghan B, Szabo IL, Pavelka M, Baatar D, Tarnawski AS. Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. *Nat Med* 2002;8:289-293.
115. Liu CH, Chang SH, Narko Ket al. Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J Biol Chem* 2001;276:18563-18569.
116. Gallo O, Franchi A, Magnelli Let al. Cyclooxygenase-2 pathway correlates with VEGF expression in head and neck cancer. Implications for tumor angiogenesis and metastasis. *Neoplasia* 2001;3:53-61.
117. Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol* 2002;23:144-150.
118. Dohadwala M, Batra RK, Luo Jet al. Autocrine/paracrine prostaglandin E2 production by non-small cell lung cancer cells regulates matrix metalloproteinase-2 and CD44 in cyclooxygenase-2-dependent invasion. *J Biol Chem* 2002;277:50828-50833.
119. Camacho M, Leon X, Fernandez-Figueras MT, Quer M, Vila L. Prostaglandin E(2) pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2008;30:1175-1181.
120. Larkins TL, Nowell M, Singh S, Sanford GL. Inhibition of cyclooxygenase-2 decreases breast cancer cell motility, invasion and matrix metalloproteinase expression. *BMC Cancer* 2006;6:181.
121. Attiga FA, Fernandez PM, Weeraratna AT, Manyak MJ, Patierno SR. Inhibitors of prostaglandin synthesis inhibit human prostate tumor cell invasiveness and reduce the release of matrix metalloproteinases. *Cancer Res* 2000;60:4629-4637.
122. Kurihara Y, Hatori M, Ando Yet al. Inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses the invasiveness of oral squamous cell carcinoma cell lines via down-regulation of matrix metalloproteinase-2 production and activation. *Clin Exp Metastasis* 2009;26:425-432.
123. Koontongkaew S, Monthanapisut P, Saensuk T. Inhibition of arachidonic acid metabolism decreases tumor cell invasion and matrix metalloproteinase expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2010;93:100-108.
124. Ueda M, Shimada T, Goto Yet al. Expression of CC-chemokine receptor 7 (CCR7) and CXC-chemokine receptor 4 (CXCR4) in head and neck squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx* 2010;37:488-495.
125. Kryczek I, Wei S, Keller E, Liu R, Zou W. Stroma-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;292:C987-995.
126. Tan CT, Chu CY, Lu YC et al. CXCL12/CXCR4 promotes laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinoma metastasis through MMP-13-dependent invasion via the ERK1/2/AP-1 pathway. *Carcinogenesis* 2008;29:1519-1527.
127. Samara GJ, Lawrence DM, Chiarelli CJ et al. CXCR4-mediated adhesion and MMP-9 secretion in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 2004;214:231-241.
128. de Oliveira MV, Fraga CA, Gomez RS, Paula AM. Immunohistochemical expression of interleukin-4, -6, -8, and -12 in inflammatory cells in surrounding invasive front of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2009;31:1439-1446.
129. Luca M, Huang S, Gershenwald JE, Singh RK, Reich R, Bar-Eli M. Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis. *Am J Pathol* 1997;151:1105-1113.
130. Allen CT, Ricker JL, Chen Z, Van Waes C. Role of activated nuclear factor-kappaB in the pathogenesis and therapy of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 2007;29:959-971.
131. Bond M, Fabunmi RP, Baker AH, Newby AC. Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: an absolute requirement for transcription factor NF-kappa B. *FEBS Lett* 1998;435:29-34.

132. Ogawa K, Chen F, Kuang C, Chen Y. Suppression of matrix metalloproteinase-9 transcription by transforming growth factor-beta is mediated by a nuclear factor-kappaB site. *Biochem J* 2004;381:413-422.
133. Andela VB, Schwarz EM, Puzas JE, O'Keefe RJ, Rosier RN. Tumor metastasis and the reciprocal regulation of prometastatic and antimetastatic factors by nuclear factor kappaB. *Cancer Res* 2000;60:6557-6562.
134. Kim A, Kim MJ, Yang Y, Kim JW, Yeom YI, Lim JS. Suppression of NF-kappaB activity by NDRG2 expression attenuates the invasive potential of highly malignant tumor cells. *Carcinogenesis* 2009;30:927-936.
135. Yoshida K, Sasaki R, Nishimura H et al. Nuclear factor-kappaB expression as a novel marker of radioresistance in early-stage laryngeal cancer. *Head Neck* 2010;32:646-655.
136. Beasley NJ, Leek R, Alam M et al. Hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in head and neck cancer: relationship to tumor biology and treatment outcome in surgically resected patients. *Cancer Res* 2002;62:2493-2497.
137. Kyzas PA, Cunha IW, Ioannidis JP. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor immunohistochemical expression in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *Clin Cancer Res* 2005;11:1434-1440.