



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

# Estudio del valor pronóstico de SERPINA E1 y su papel en el crecimiento y la diseminación metastática del carcinoma escamoso de cabeza y cuello

Irene Arroyo Solera



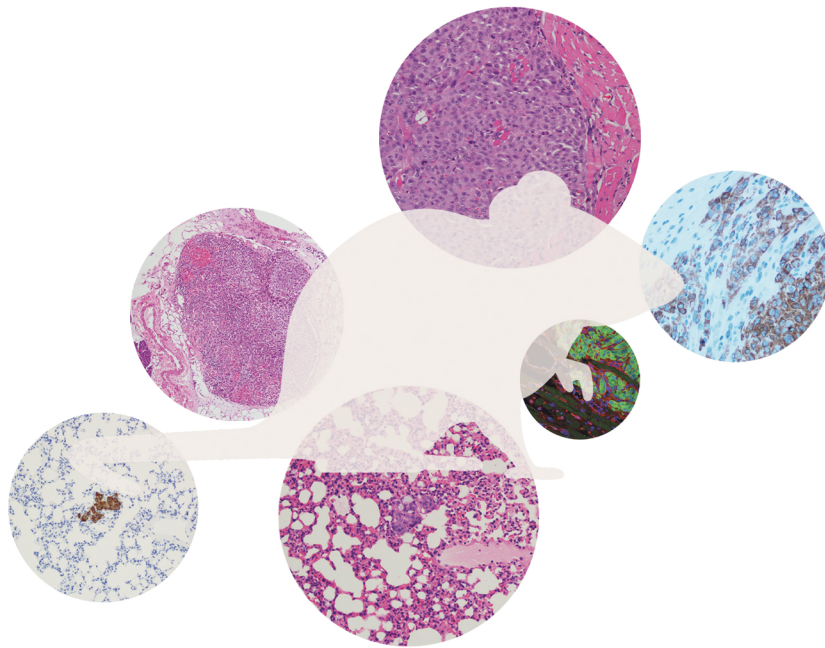
Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0. Spain License.**

UNIVERSITAT DE BARCELONA  
FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

**ESTUDIO DEL VALOR PRONÓSTICO DE SERPINA E1  
Y SU PAPEL EN EL CRECIMIENTO Y LA DISEMINACIÓN METASTÁTICA  
DEL CARCINOMA ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO**



IRENE ARROYO SOLERA  
2017

UNIVERSITAT DE BARCELONA  
FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

DOCTORAT EN BIOMEDICINA

**ESTUDIO DEL VALOR PRONÓSTICO DE SERPINA E1  
Y SU PAPEL EN EL CRECIMIENTO Y LA DISEMINACIÓN METASTÁTICA  
DEL CARCINOMA ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO**

Memoria presentada por Irene Arroyo Solera para optar al título de doctor  
por la Universitat de Barcelona

---

Codirectores:

**Dr. Ramon Mangues Bafalluy**

**Dr. Miguel Ángel Pavón Ribas**

Doctorando:

**Irene Arroyo Solera**

Tutor:

**Dr. Albert Tauler Girona**

IRENE ARROYO SOLERA  
2017

# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>6</b>
<b>1. CARCINOMA ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO</b> .....	<b>6</b>
1.1. Introducción general.....	6
1.2. Epidemiología .....	7
1.3. Etiología y factores de riesgo .....	8
1.3.1. Tabaco y alcohol .....	8
1.3.2. Infección por Virus del Papiloma Humano (VPH).....	8
<b>2. MODELO DE PATOGÉNESIS Y BASES MOLECULARES DEL CECC</b> .....	<b>10</b>
2.1. Patogénesis.....	10
2.1.1. Patogénesis asociada a la infección por VPH .....	12
2.2. Alteración en las vías de señalización .....	14
2.2.1. Vía del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) .....	16
2.2.2. Vía de fosfatidilinositol 3-quinasa / protein-quinasa B (PI3K/Akt) .....	17
2.2.3. Vía del factor nuclear-kappaB (NF-kB) .....	18
2.2.4. Vía de quinasas Janus/transductores de señal y activadores de la transcripción (JAK/STAT).....	18
2.2.5. Vía del factor de crecimiento transformante B (TGFβ).....	19
<b>3. ASPECTOS CLÍNICOS Y PATOLÓGICOS DEL CARCINOMA ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO</b> .....	<b>20</b>
3.1. Diagnóstico y estadiaje del CECC .....	20
3.2. Factores pronóstico en pacientes con CECC .....	21
3.2.1. Factores pronóstico clinicopatológicos .....	22
3.2.2. Factores pronóstico de origen molecular .....	28
3.3. Tratamiento del CECC .....	30
3.3.1. Cisplatino .....	31
<b>4. SERPINA E1</b> .....	<b>32</b>
4.1. Clasificación, estructura, función y regulación .....	33
4.2. Interacciones no canónicas de SERPINA E1 .....	35
4.3. Implicación de SERPINA E1 en cáncer.....	36
<b>5. MODELOS MURINOS EN CÁNCER</b> .....	<b>36</b>
5.1. Modelos murinos xenógrafos de CECC .....	38
5.1.1. Implantación ectópica.....	39
5.1.2. Implantación ortotópica .....	40
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	<b>41</b>
<b>III. METODOLOGÍA</b> .....	<b>42</b>
<b>1. EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i></b> .....	<b>42</b>
1.1. Cultivo celular .....	42
1.1.1. Líneas celulares de CECC.....	42

1.1.2. Subcultivo, congelación y descongelación de líneas celulares .....	43
1.1.3. Detección de Mycoplasma .....	45
1.1.4. Contaje y determinación de la viabilidad celular .....	45
1.1.5. Ensayos de proliferación .....	46
1.1.6. Ensayo de migración .....	46
1.1.7. Ensayo de apoptosis.....	47
1.2. Análisis de los niveles de expresión proteica.....	48
1.2.1. Extracción de proteínas .....	48
1.2.2. Cuantificación de extractos proteicos.....	49
1.2.3. Western blot .....	49
1.3. Análisis de los niveles de RNA mensajero de SERPINA E1 .....	52
1.3.1. Extracción de RNA.....	52
1.3.2. Reacción de retrotranscripción (RT-PCR).....	53
1.3.3. PCR cuantitativa .....	54
1.4. Clonaje de la secuencia de SERPINA E1 en el vector pFUGW .....	55
1.4.1. Construcciones plasmídicas .....	55
1.4.2. Digestión con enzimas de restricción, electroforesis y purificación en gel.....	57
1.4.3. Ligación del inserto SERPINA E1 y el vector pFUGW.....	58
1.4.4. Transformación bacteriana .....	58
1.4.5. Amplificación y purificación del plásmido pFUGW_SERPINA E1 .....	59
1.4.6. Reacción de secuenciación .....	60
1.4.7. Transfección liposomal .....	61
1.5. Transducción con partículas lentivirales portadoras de pSIN-DUAL-GFP1-Luciferase, pFUGW_SERPINA E1 y pLKO.1-puro_shRNA .....	61
1.5.1. Construcciones plasmídicas .....	61
1.5.2. Producción de partículas lentivirales .....	62
1.5.3. Titulación lentiviral.....	63
1.5.4. Transducción de las líneas de CECC .....	64
1.5.5. Selección de las células transducidas.....	64
1.6. Análisis estadístico.....	64
<b>2. EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i> .....</b>	<b>65</b>
2.1. Cepas de ratón.....	65
2.2. Técnicas de implantación .....	65
2.2.1. Inyección subcutánea .....	65
2.2.2. Inyección ortotópica .....	66
2.3. Seguimiento <i>in vivo</i> del crecimiento tumoral por luminiscencia.....	67
2.4. Necropsia y procesamiento de tejidos .....	67
2.4.1. Necropsia y registro <i>ex vivo</i> .....	67
2.4.2. Procesamiento y análisis histopatológico .....	68

2.4.3. Análisis inmunohistoquímico de marcadores fenotípicos .....	70
2.4.4. Análisis por inmunofluorescencia de SERPINA E1 .....	71
2.5. Caracterización fenotípica del tumor primario .....	72
2.5.1. Análisis de apoptosis mediante conteo de cuerpos apoptóticos por tinción fluorescente DAPI .....	72
2.5.2. Cuantificación de crecimiento invasivo mediante <i>Tumor Budding</i> .....	73
2.5.3. Determinación del ratio tumor-estroma .....	73
2.6. Determinación de las metástasis a distancia .....	74
2.7. Análisis estadístico .....	75
<b>3. ANÁLISIS DE MUESTRAS DE PACIENTES CON CECC .....</b>	<b>76</b>
3.1. Características de los pacientes y seguimiento clínico .....	76
3.2. RECOGIDA Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS .....	77
3.2.1. Recogida y procesamiento de biopsias de tejido fresco .....	77
3.2.2. Inmunohistoquímica y determinación de los niveles de expresión de SERPINA E1 en biopsias parafinadas .....	78
3.3. Estudio de la asociación entre niveles de SERPINA E1 y la evolución clínica de los pacientes .....	78
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>80</b>
<b>1. SERPINA E1 COMO MARCADOR PRONÓSTICO EN PACIENTES CON CECC.....</b>	<b>80</b>
1.1. La expresión de la proteína SERPINA E1 se asocia con una mayor tasa de metástasis y una peor evolución clínica en pacientes con CECC.....	80
1.2. Los niveles de RNA mensajero de SERPINA E1 se asocian con una elevada tasa de metástasis y una evolución clínica desfavorable en pacientes con CECC .....	83
1.3. Confirmación del papel pronóstico de SERPINA E1 en una tercera cohorte de pacientes.....	87
<b>2. SERPINA E1 EN LA PROLIFERACIÓN, MIGRACIÓN Y CITOTOXICIDAD DE LÍNEAS CELULARES DE CECC.....</b>	<b>90</b>
2.1. Niveles de expresión de SERPINA E1 en líneas celulares de CECC.....	90
2.2. Efecto de la sobre-expresión de SERPINA E1 en la tasa de proliferación, la capacidad de migración y la resistencia a cisplatino en células de CECC.....	91
2.2.1. El aumento en la expresión de SERPINA E1 estimula la migración de las células tumorales.....	91
2.2.2. La sobre-expresión de SERPINA E1 disminuye la capacidad proliferativa de las células tumorales de CECC .....	92
2.2.3. Las células que presentan mayores niveles de expresión de SERPINA E1 son más resistentes al tratamiento con cisplatino.....	92
2.3. La infra-expresión de SERPINA E1 influye en la tasa de proliferación, la capacidad de migración y la sensibilidad a cisplatino en células de CECC .....	93
2.3.1. La tasa de proliferación de las células de CECC aumenta tras disminuir la expresión de SERPINA E1. ....	94
2.3.2. La infra-expresión de SERPINA E1 disminuye la capacidad de migración de las células de CECC .....	94
2.3.3. La resistencia de las células de CECC al tratamiento con cisplatino disminuye al reducir los niveles de expresión de SERPINA E1 .....	95
2.4. Estudio del estado de activación de la vía PI3K/Akt en las células que infra- o sobre-expresan SERPINA E1 .....	96

2.4.1. El bloqueo de la vía PI3K/Akt revierte el aumento de la capacidad de migración y la resistencia a la apoptosis en la línea que sobre-expresa SERPINA E1 .....	97
<b>3. DESARROLLO DE UN MODELO MURINO ORTOTÓPICO Y METASTÁTICO DE CECC .....</b>	<b>100</b>
3.1. Generación de líneas de CECC con actividad luciferasa y fluorescentes .....	100
3.2. Estudio de la capacidad tumorigénica de líneas celulares de CECC a partir de un modelo murino de crecimiento subcutáneo en la cepa Swiss nude .....	101
3.3. Estudio de la capacidad tumorigénica y el patrón de diseminación de diferentes líneas celulares de CECC a partir del modelo murino ortotópico en la cepa Swiss nude.....	105
3.4. Estudio de la capacidad tumorigénica y el patrón de diseminación de diferentes líneas de CECC a partir de un modelo murino ortotópico en la cepa NOD/SCID .....	107
<b>4. ESTUDIO <i>IN VIVO</i> DEL PAPEL DE SERPINA E1 A TRAVÉS DE UN MODELO ORTOTÓPICO DE CECC EN LA CEPA NSG .....</b>	<b>111</b>
4.1. Fenotipos asociados a agresividad tumoral en el tumor primario generado por la línea que sobre-expresa SERPINA E1 y su correspondiente línea parental.....	117
4.1.1. El aumento en la expresión de SERPINA E1 disminuye la apoptosis de las células a nivel de tumor primario .....	118
4.1.2. La sobre-expresión de SERPINA E1 cambia el patrón de invasión de las células en el margen del tumor primario .....	119
4.1.3. La sobre-expresión de SERPINA E1 aumenta la proporción de estroma en el tumor primario .....	120
4.2. Implicación de SERPINA E1 en el desarrollo de metástasis ganglionares.....	121
4.3. Implicación de SERPINA E1 en el desarrollo de metástasis a distancia .....	126
4.3.1. La sobre-expresión de SERPINA E1 aumenta la capacidad de dispersión durante la colonización del pulmón y estimula la generación de focos de mayor tamaño .....	126
4.3.2. Papel de SERPINA E1 en las metástasis hepáticas .....	132
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>135</b>
<b>1. IDENTIFICACIÓN DE SERPINA E1 COMO MARCADOR INDEPENDIENTE DE MAL PRONÓSTICO EN PACIENTES CON CECC .....</b>	<b>135</b>
1.1 El nivel elevado de SERPINA E1 se asocia con peor supervivencia en pacientes con CECC.....	136
1.2. Niveles elevados de SERPINA E1 se asocian con peor respuesta al tratamiento en pacientes con CECC	138
1.3. Desarrollo del nivel de SERPINA E1 como marcador pronóstico .....	139
<b>2. SERPINA E1 INFLUYE EN LA CAPACIDAD DE migración, DE proliferación y de resistencia a la muerte inducida por cisplatino en células de CECC .....</b>	<b>141</b>
2.1. SERPINA E1 estimula la migración de las células de CECC a través de la activación de Akt .....	142
2.2. SERPINA E1 reduce la proliferación en las células de CECC.....	144
2.3. SERPINA E1 inhibe la apoptosis inducida por cisplatino en células de CECC a través de la activación de la vía PI3K/Akt .....	144
<b>3. Papel de SERPINA E1 en la agresividad tumoral en un modelo ortotópico de CECC.....</b>	<b>147</b>
3.1. SERPINA E1 aumenta la invasividad, la proporción de estroma y la resistencia a apoptosis del tumor primario .....	149
3.2. SERPINA E1 aumenta la diseminación a ganglios cervicales y la tasa de crecimiento de las metástasis ganglionares .....	152

3.3. SERPINA E1 se asocia con un patrón de colonización metastática disperso y estimula el crecimiento de las células tumorales en pulmón .....	154
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>157</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>158</b>
<b>VIII. ANEXOS .....</b>	<b>171</b>



# I. INTRODUCCIÓN

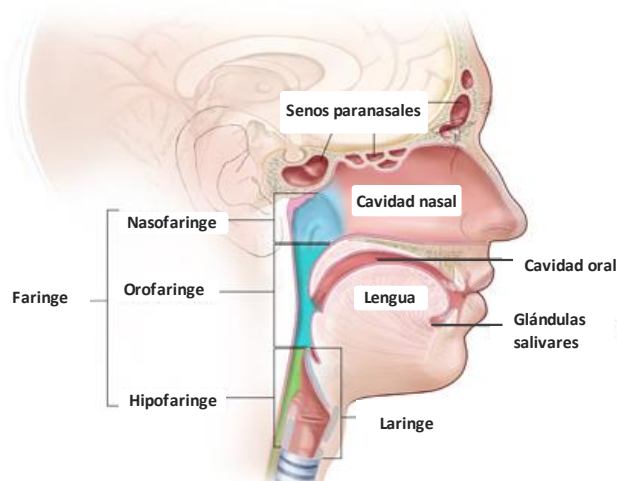
## 1. CARCINOMA ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO

### 1.1. Introducción general

Entre los diferentes tipos de carcinomas, el carcinoma de cabeza y cuello engloba aquellos que se originan en el tracto aerodigestivo superior, siendo el de tipo escamoso el más frecuente con una prevalencia del 95%. El cáncer escamoso de cabeza y cuello (CECC) se origina a partir de la transformación de las células epiteliales que recubren estas superficies, mientras que los carcinomas de cabeza y cuello no escamosos son menos frecuentes y pueden tener un origen muy variado, como por ejemplo las células neuroendocrinas o glandulares de la mucosa (1).

Anatómicamente, el tracto aerodigestivo superior incluye zonas muy diferentes como son la cavidad oral, la faringe, la laringe y los senos paranasales (**Figura 1**). Dentro de la cavidad oral se incluyen los labios, la mucosa bucal, los 2/3 anteriores de la lengua, el suelo de boca, el paladar duro y la cresta alveolar. La faringe incluye la nasofaringe, la orofaringe y la hipofaringe, y dentro de la orofaringe, a su vez, se incluyen la base de la lengua, el paladar blando y el pilar y fosa tonsilar. Por último, la laringe incluye la supraglotis, la glotis y la subglotis (2).

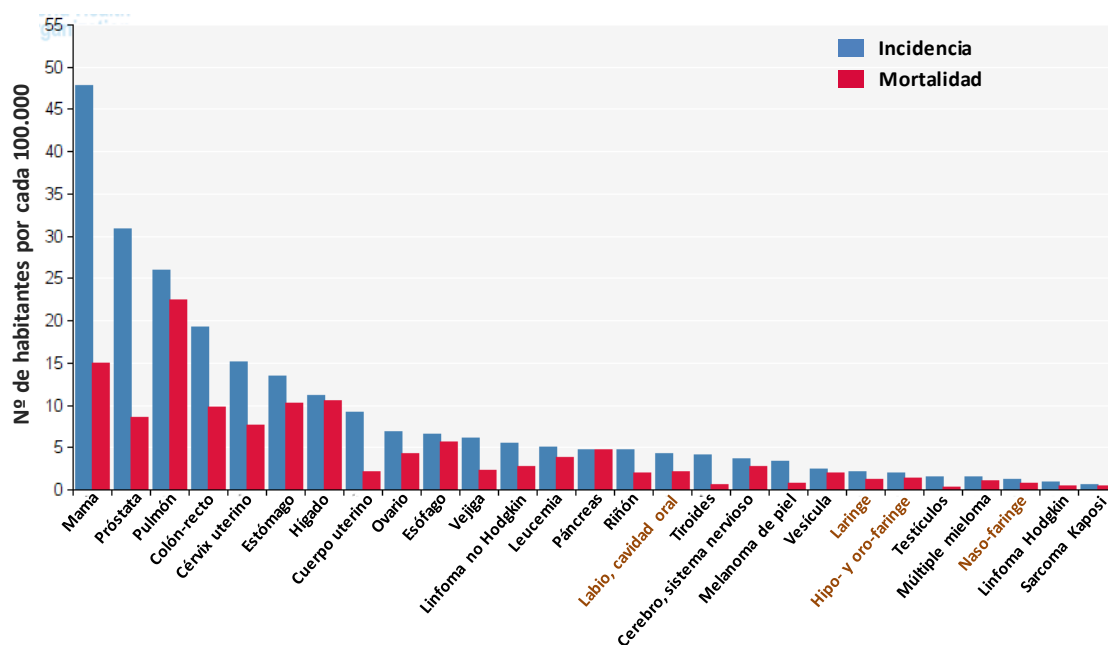
El cáncer oral es el subtipo de cáncer de cabeza y cuello con mayor frecuencia y engloba aquellos cánceres que se desarrollan en la cavidad oral y en la faringe, siendo el suelo de boca y la lengua las localizaciones más frecuentes (el 90% de casos de cáncer oral) (3). Aunque en todos los casos los tumores escamosos se originan a partir de células epiteliales, existen diferencias entre las distintas regiones en relación con sus características histológicas y su drenaje linfático y venoso. Como consecuencia, los pacientes diagnosticados con CECC presentan una evolución clínica muy diferente en función de la región concreta donde se origina el tumor primario (4).



**Figura 1. Estructuras anatómicas incluidas en la región de la cabeza y el cuello que se consideran durante el diagnóstico del carcinoma escamoso de cabeza y cuello.** Estas incluirían la cavidad oral, la faringe, la laringe, los senos paranasales y la cavidad nasal y las glándulas salivares. Adaptada de (5).

## 1.2. Epidemiología

El carcinoma escamoso de cabeza y cuello constituye el sexto cáncer más común a nivel mundial, apareciendo 650.000 casos nuevos cada año y provocando 350.000 muertes anuales (**Figura 2**). Sólo un 10% de los pacientes diagnosticados con CECC presenta metástasis a distancia. El principal problema en este tipo de carcinoma es que casi un 70% de los pacientes se encuentran en estadios avanzados a nivel locorregional (tumor primario de gran tamaño y/o ganglios linfáticos infiltrados) en el momento del diagnóstico. En un periodo de dos años, el 50-60% de estos pacientes desarrolla recidivas locorregionales (reaparición de cáncer cerca o en la misma localización donde se había originado el tumor inicial (local) y en otras estructuras adyacentes y ganglios linfáticos, tras un periodo en el que no se había detectado cáncer en el paciente y el 20-30% desarrollaran metástasis a distancia (6).



**Figura 2.** Histograma de número de habitantes por cada 100.000 que presentaron cáncer en cada localización (incidencia) o que murieron debido a cada tipo de cáncer (mortalidad), a nivel mundial en el año 2012. Las localizaciones que conforman el cáncer de cabeza y cuello aparecen en marrón. Base de datos GLOBOCAN 2012 (IARC).

La tasa de preservación de órgano en los pacientes con CECC ha mejorado en los últimos años gracias a los avances en cirugía y tratamientos quimio-radioterápicos. A pesar de ello, en las últimas décadas solo se ha conseguido una modesta mejora de la supervivencia de los pacientes que se encuentra entorno al 40-50% a los 5 años desde el inicio del tratamiento (7).

Aunque el CECC se considera una enfermedad predominantemente locorregional, la presencia de metástasis a distancia es un factor determinante del pronóstico del paciente. En el momento del diagnóstico, aproximadamente el 10% de los pacientes presentan metástasis a distancia y de estos pacientes, el 88% no sobrevivirá más de doce meses. Los sitios donde con más frecuencia aparece metástasis a distancia son los pulmones, con una frecuencia del 70-85%, el hueso 15-39% y el hígado 10-30% (7).

### 1.3. Etiología y factores de riesgo

Existen diferentes factores que contribuyen al desarrollo de CECC, pudiéndose clasificar en factores etiológicos externos o internos. Los factores internos hacen referencia a la predisposición genética del individuo a desarrollar CECC. Entre los factores externos se encuentra el tabaco, el alcohol, la exposición a luz UV, la exposición a radiación o a otros compuestos ambientales como el petróleo o el níquel, y la infección por determinados virus. Entre estos factores, los más importantes son el tabaco, el alcohol y el virus del papiloma humano (VPH). La importancia de estos factores se evidencia en el hecho de que, hace más de 20 años, al menos el 75% de los casos de CECC en los países industrializados se atribuían a la combinación de los hábitos de beber alcohol y fumar tabaco (8). Durante los últimos 20 años, la incidencia de los cánceres en la cavidad oral ha disminuido, mientras que la incidencia de los cánceres orofaríngeos ha ido aumentando, sobre todo en países desarrollados como Australia, Canadá, Dinamarca, Noruega, Holanda, EEUU y Reino Unido. Esta incidencia divergente entre cánceres orofaríngeos y de la cavidad oral se asocia con un aumento de la prevalencia en estas poblaciones de la infección por VPH (9).

#### 1.3.1. Tabaco y alcohol

La exposición al tabaco y al alcohol se ha considerado durante mucho tiempo el principal factor de riesgo implicado en el desarrollo de CECC. Las personas que fuman más de 20 cigarrillos al día y consumen más de 100g de alcohol al día presentan mayor riesgo de sufrir alteraciones en el epitelio oral que preceden con mucha frecuencia al desarrollo de un CECC. Concretamente, el consumo elevado de alcohol (más de 3 veces al día) es un factor de riesgo independiente asociado a la aparición de tumores localizados en la faringe y en la laringe (10).

Las personas fumadoras de cigarrillos presentan 6 veces más riesgo de padecer cáncer de cabeza y cuello que las personas no fumadoras. Entre estas, aquellas personas que fuman muchos cigarrillos tienen un 20% más de riesgo de morir debido a un cáncer de laringe. El consumo de puros también es un factor de riesgo asociado a la aparición de CECC, pero en este caso, los tumores se desarrollan en la orofaringe y el esófago, zonas donde hay mayor acumulación de saliva y carcinógenos. Por último, el tabaco de mascar se asocia al desarrollo de cáncer en la cavidad oral.

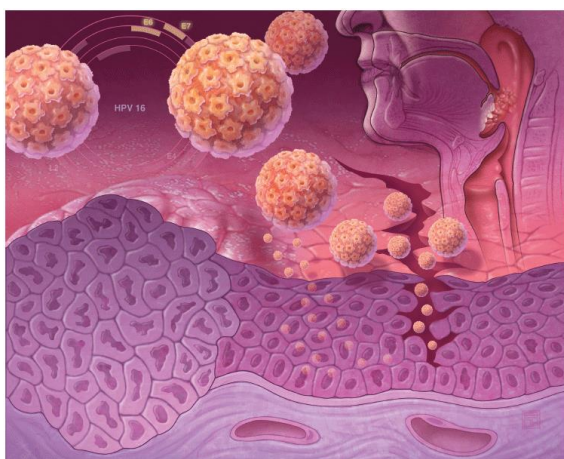
El consumo elevado de alcohol (más de 3 veces al día) es un factor de riesgo independiente asociado a la aparición de tumores localizados en la faringe y en la laringe. Además, el consumo de tabaco junto con el consumo de alcohol tiene un efecto sinérgico, multiplicando la probabilidad de desarrollar CECC (11).

#### 1.3.2. Infección por Virus del Papiloma Humano (VPH)

Estudios epidemiológicos sugieren que la infección por VPH es responsable de más del 25% de los casos de CECC a nivel mundial. Entre los CECC VPH positivos, el 50% se originan en la orofaringe, en

concreto en la base de la lengua y las amígdalas, y sólo un 25% en la cavidad oral. De hecho, la incidencia del cáncer orofaríngeo está aumentando a nivel mundial entre personas jóvenes no bebedoras ni fumadoras y este hecho se asocia con el aumento de la prevalencia de personas con infección por VPH. Este aumento se relaciona con cambios en el comportamiento sexual de las nuevas generaciones, como la práctica de sexo oral y tener múltiples parejas sexuales (12) (**Figura 3**).

De entre los diferentes genotipos de VPH, el genotipo VPH-16 es responsable de hasta el 90% de los cánceres orofaríngeos relacionados con VPH, mientras que los subtipos VPH-18, 31 y 33 son responsables del 10% restante (13).



**Figura 3. El virus del papiloma humano (VPH) se transmite sexualmente y puede ser contraído por practicar sexo oral sin protección.** El virus, el subtipo VPH-16 en el 90% de los casos, infecta principalmente las células basales del epitelio de las criptas amigdalinas o de la base de la lengua. La expresión de las oncoproteínas virales E6 y E7 son responsables de la transformación maligna en un huésped susceptible (14).

Diferentes estudios sugieren que los cánceres orofaríngeos VPH positivos representan una entidad tumoral distinta con características clínicas, patológicas y biológicas diferentes al resto de cánceres orofaríngeos (**Tabla 1**). Actualmente, la infección por VPH se considera un factor de buen pronóstico en cáncer de cabeza y cuello ya que los pacientes con cáncer VPH positivos presentan menor riesgo de aparición de tumores secundarios, un aumento en la sensibilidad a la quimio/radioterapia y menor mortalidad (13). La tasa de supervivencia a los 5 años de los pacientes con cáncer orofaríngeo VPH positivo frente a la de los pacientes con cáncer VPH negativo es del 70-80% frente al 25-40%, respectivamente, independientemente de la edad, el género y el estadio tumoral (15).

**Tabla 1. Características diferenciales entre cánceres de cabeza y cuello VPH positivos y VPH negativos**

Características	Tumor VPH negativo	Tumor VPH positivo
<b>Localización</b>	Cualquier localización de la cabeza y cuello	Amígdalas y base de la lengua (Orofaringe)
<b>Factores de riesgo</b>	Tabaco/alcohol	Comportamiento sexual
<b>Edad</b>	Edad avanzada	Jóvenes
<b>Sexo</b>	3 hombres: 1 mujer	3 hombres: 1 mujer
<b>Incidencia</b>	Disminuyendo	Aumentando
<b>Field cancerization</b>	Si	No
<b>Estadio</b>	Variable	T: reducido; N: elevado

<b>Pronóstico</b>	Desfavorable	Favorable
<b>Histología</b>	Queratinizado	Basaloide, escasamente diferenciado
<b>p53</b>	Mutado	Sin mutar
<b>p16</b>	Expresión baja	Expresión elevada

Clasificación TNM del estadio tumoral: T (tamaño del tumor primario), N (grado de afectación de ganglios linfáticos). Tabla adaptada de (14).

## 2. MODELO DE PATOGÉNESIS Y BASES MOLECULARES DEL CECC

### 2.1. Patogénesis

El epitelio que recubre la parte superior del tracto aerodigestivo humano a nivel de cavidad oral, orofaringe e hipofaringe es un epitelio estratificado escamoso no queratinizante, mientras que en la laringe encontramos un epitelio respiratorio ciliado que se sustituye por epitelio escamoso estratificado queratinizante a medida que avanza la edad del individuo. Las células epiteliales presentan fuertes uniones intercelulares y una estructura polar, con una zona apical externa y una zona basal más profunda. En los epitelios de tipo escamoso estratificados las células más superficiales son planas o escamosas y son eliminadas por desgaste y reemplazadas por células basales que se dividen y diferencian hacia la parte apical. Todo este epitelio se sustenta sobre un lámina basal debajo de la cual hay tejido conectivo formado principalmente por fibras de colágeno (16) .

El proceso carcinogénico mediante el cual las células epiteliales se transforman y acaban generando un carcinoma, es un proceso de múltiple pasos, muy complejo y heterogéneo. No existe un modelo de patogénesis común pero se hipotetiza que la exposición del epitelio a los agentes carcinogénicos (tabaco y/o alcohol) induce una serie de alteraciones en las células epiteliales que cuando aparecen en superficie se denominan clínicamente leucoplasias, lesiones blanquecinas que no se desprenden (o eritroplasias si hay presencia de eritrocitos). Estas lesiones, en las etapas tempranas se caracterizan histológicamente por presentar hiperqueratosis e hiperplasia (células epiteliales con morfología atípica, con un aumento de células en mitosis en la parte basal, pleomorfismo nuclear, hipercromatismo nuclear y alteraciones en la estructura estratificada del epitelio) (17) . A nivel molecular, se producen una serie de alteraciones como la reactivación de la telomerasa (90% de los casos de CECC), la pérdida de la región cromosómica 9p21 (70-80% casos de CECC), inactivación del inhibidor de la división celular *p16* y la pérdida del cromosoma 3. Dependiendo de factores de riesgo como el grado de hiperplasia, la extensión de la lesión y la exposición a agentes carcinogénicos, estas lesiones pueden progresar hasta generar una displasia, en la cual aumentan las alteraciones citológicas y estructurales del epitelio (**Figura 4**) (1). Estas alteraciones se caracterizan a nivel molecular por cambios en la expresión de genes relacionados con inflamación, potencial replicativo y apoptosis (VEGF, p53, Bcl-2, Ki-67), expresión de metaloproteasas (MMP-1 y MMP-9), expresión diferencial de

citoqueratinas (K4 y K13 se expresan en displasias moderadas mientras que K14 y K17 se expresan en displasias severas) y aumento progresivo del receptor del factor de crecimiento epidérmico conforme aumenta el grado de displasia.

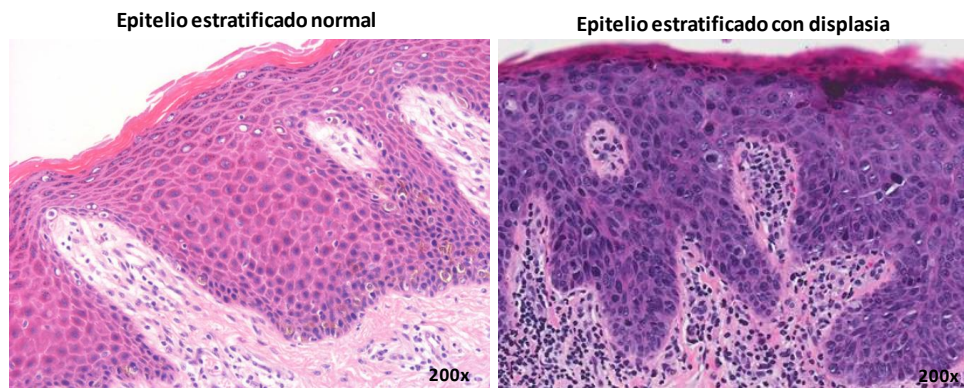


Figura 4. Tinción de hematoxilina-eosina de un epitelio estratificado sin alteraciones histológicas (izquierda) y de un epitelio con displasia (derecha) que muestra pérdida de la polaridad del epitelio, pleomorfismo nuclear y mitosis en todos los niveles.

Cuando la displasia alcanza un grado severo debido a la acumulación de mutaciones y alteraciones cromosómicas, y aumenta su extensión ocupando desde la base hasta la superficie del epitelio, se considera que es un carcinoma *in situ*. Finalmente, cuando el carcinoma atraviesa la interfase epitelio-estroma e invade otras estructuras como la lámina propia o la submucosa subyacente, se define como carcinoma invasivo. Con el avance del proceso carcinogénico también aumenta la inestabilidad genómica lo que conduce a la pérdida de los fragmentos cromosómicos 11q13, 13q21, 10q23 y 3q26 y la deleción de los brazos cromosómicos 8p y 18q, en los carcinomas *in situ* o en los carcinomas invasivos (Figura 5) (17).

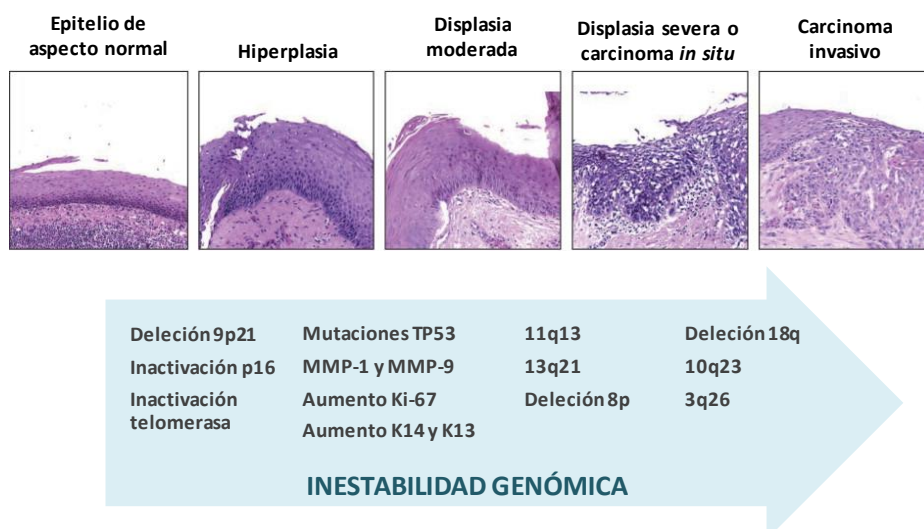


Figura 5. Esquema donde se muestran las etapas de un proceso carcinogénico hasta desarrollar un carcinoma escamoso invasivo, junto con las alteraciones cromosómicas y de expresión de marcadores más frecuentes en cada paso. Adaptado de Argiris *et al.* (18).

Un término relacionado con la patogénesis en CECC es el proceso de *Field cancerization*, definido por primera vez en 1953 al analizar al microscopio diferentes muestras de carcinomas de labio, cavidad

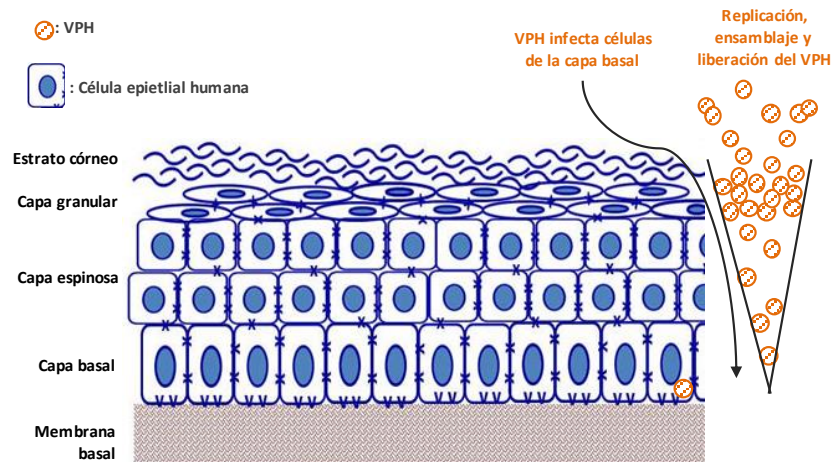
oral y faringe. Slaughter *et al.* observaron que en la mayor parte de los casos analizados, el epitelio adyacente al tumor presentaba displasia, carcinoma *in situ* o carcinoma invasivo, con alteraciones de diferentes tipos, cada una de las cuales las definió como campos o *field*. Dicho autor relacionó la presencia de múltiples campos en el epitelio formados por células con múltiples alteraciones con el hecho de que los pacientes con CECC presentaran una elevada probabilidad de desarrollar múltiples tumores primarios (originados a partir de células provenientes de campos independientes al tumor inicial) y recidivas locales (originadas por células provenientes del mismo campo a partir de cual se originó el tumor primario inicial) (19). En 1996 Califano *et al.* propusieron un modelo genético de progresión en múltiples pasos donde se caracterizaron genéticamente algunos de los cambios morfológicos del epitelio escamoso que se producían durante el proceso de carcinogénesis (muchos de ellos explicados en el apartado anterior). Algunas de estas alteraciones genéticas consistían en la pérdida de heterocigosidad en determinados cromosomas, es decir, la pérdida de un alelo de un gen en el cual el otro alelo ya se encuentra inactivado. Teniendo en cuenta los descubrimientos moleculares, el término *field cancerization* se redefinió como la presencia de una o más áreas de la mucosa formadas por células epiteliales que presentan alteraciones genéticas o epigenéticas asociadas con cáncer. Un campo o *field* es monoclonal en origen y no muestra crecimiento invasivo o comportamiento metastático, y, en ocasiones, puede contener aberraciones histológicas características de displasia. La comparación de los perfiles genéticos de los carcinomas frente a los perfiles de los campos que se encuentran a su alrededor, a menudo indica una relación clonal, en la cual los carcinomas presentan un elevado número de alteraciones genéticas, algunas de ellas compartidas con los campos adyacentes (20).

### 2.1.1. Patogénesis asociada a la infección por VPH

El inicio del proceso carcinogénico en los tumores de CECC asociados al VPH es diferente al de los tumores no asociados al VPH que se ha explicado anteriormente. Los virus infectan las células basales del epitelio, que quedan expuestas tras una lesión en las capas superficiales del mismo. Los virus entran en las células por endocitosis y son transportados al núcleo donde persisten de manera episomal o son integradas en el genoma de la célula huésped. En cualquier caso, el DNA viral se expresa y se producen las proteínas E6 y E7. E6 interacciona con p53 y una ubiquitin ligasa lo que induce la degradación mediada por proteosomas de p53, impidiendo la activación de la apoptosis. Las proteínas supresoras de tumores de la familia retinoblastoma pRB, p130 y p107 son inactivadas por E7, provocando la liberación de E2F, lo que estimula la progresión del ciclo celular. La acción conjunta de las proteínas virales E6 y E7, promueve la transformación de las células epiteliales. Tras la inactivación de la vía pRB debido a la interacción con E7, p16 se sobre-expresa y queda liberado de su actividad como inhibidor del ciclo celular. Por ese motivo la sobre-expresión de p16 se utiliza como un marcador subrogado de la infección de VPH y de la expresión de proteínas virales, que permite distinguir en la mayoría de

ocasiones a estos tumores de los tumores VPH negativos o VPH positivos en los que la infección es solo un evento secundario que no juega un papel causal en la enfermedad (21) .

Conforme el DNA de la célula epitelial se replica también lo hace el DNA vírico, consiguiéndose el mayor nivel de replicación viral en la capa granular del epitelio. Los virus maduros se liberan en la capa más externa del epitelio (estrato córneo) (**Figura 6**) (22).



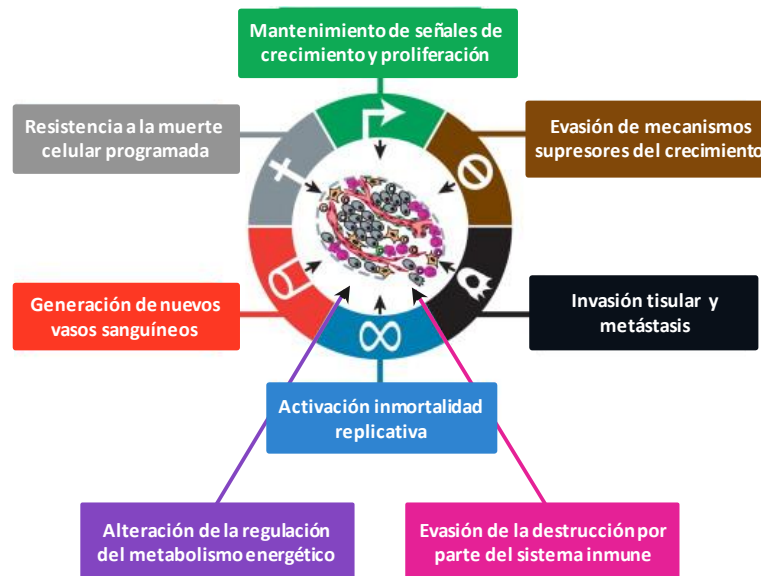
**Figura 6. Progresión de la Infección del virus del papiloma humano (VPH) tras infectar las células basales del epitelio escamoso.** El DNA viral se replica cuando lo hace el DNA de la célula huésped, llegando a sus máximos niveles en el estrato granular del epitelio, donde se ensambla y forma los nuevos virus. Los virus se liberan en el estrato córneo. Adaptada de Miller y col. (22).

Las características clínicas e histopatológicas de los tumores asociados a la infección por VPH son diferentes a las de los tumores no asociados. A nivel histológico los tumores VPH positivos presentan menor grado de queratinización y una morfología basaloide prominente, en comparación con los tumores VPH negativos. A pesar de que algunas de las alteraciones genómicas asociadas a tumor están presentes en los tumores de CECC VPH positivos y VPH negativos (amplificación de TP63, SOX2 y PIK3CA), la cantidad total de alteraciones cromosómicas y las amplificaciones son significativamente más bajas que en los tumores VPH negativos. El análisis mutacional de TP53 también muestra una relación inversa entre los tumores VPH positivos y negativos, encontrándose mutado el gen TP53 en la mayor parte de casos VPH negativos y no mutado en los VPH positivos. Además, los estudios funcionales basados en el genoma y el transcriptoma de tumores de CECC muestran que los tumores VPH asociados y los VPH negativos presentan características moleculares diferentes por lo que, a ese nivel, deberían ser consideradas entidades patológicas diferentes (23) . En un estudio publicado por el consorcio del atlas del genoma del cáncer, se muestra que los tumores VPH positivos presentan mutaciones activantes en PI3KCA, pérdida de expresión de TRAF3 y amplificación de E2F1, a diferencia de los tumores VPH negativos donde es frecuente encontrar amplificación de CCND1, FADD, BIRC2 y YAP1, así como mutaciones en CASP8 y HRAS. Tanto en los tumores VPH asociados como no asociados es frecuente encontrar amplificaciones de TP63, SOX2 y PI3KCA (24).



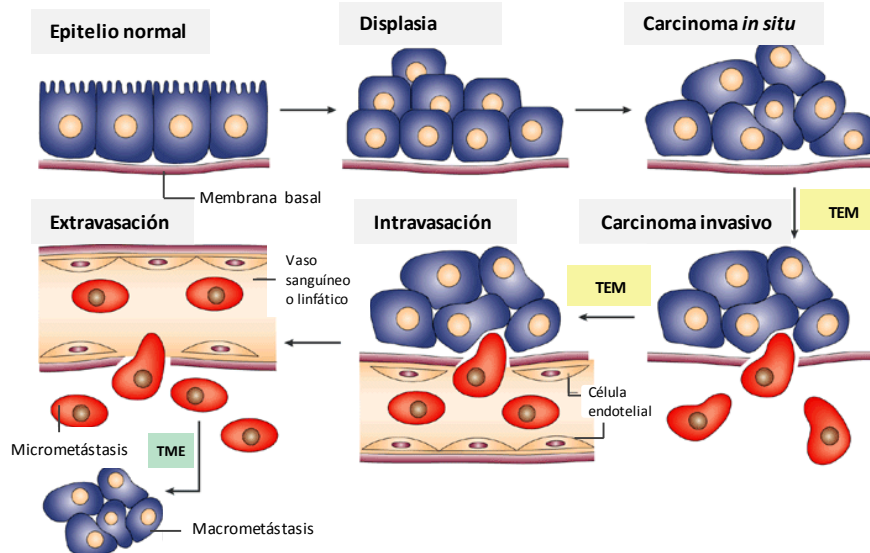
## 2.2. Alteración en las vías de señalización

Durante el proceso carcinogénico, desde la displasia hasta el desarrollo de un carcinoma o la metástasis a distancia, así como durante la progresión y diseminación tumoral, las células epiteliales deben adquirir una serie de capacidades y activar una serie de mecanismos que las diferencia de sus respectivas células normales y les permite llevar a cabo cada uno de los pasos necesarios. Las principales capacidades o características de las células tumorales fueron descritas y recopiladas por Hanahan y Weinberg (25) y se muestran en la **figura 7**.



**Figura 7. Mecanismos y/o características que adquieren las células tumorales durante el proceso carcinogénico y la progresión tumoral.** Adaptada de Hanahan y Weinberg (25).

En relación con los procesos de invasión tisular y metástasis a distancia, se ha observado que las células epiteliales alteran su fenotipo adhesivo y polarizado pasando a un fenotipo mesenquimal caracterizado por un aumento en la migración celular y su potencial invasivo, una remodelación del citoesqueleto y una mayor resistencia a la apoptosis, el conjunto de todos estos eventos se incluye dentro del proceso denominado transición epitelio-mesénquima (TEM). El programa de regulación TEM que sufren determinadas células tumorales es un proceso reversible que las células pueden activar de manera transitoria o estable y en diferentes grados (25).



**Figura 8.** Procesos en los que las células sufren una transición epitelio-mesénquima (TEM) o una transición mesénquima-epitelio (TME) durante la emergencia y progresión de un carcinoma. Adaptada de Thiery (26) .

La reorganización del citoesqueleto, la modulación de las moléculas de adhesión y de las proteínas extracelulares son eventos clave durante la TEM que sufre una célula tumoral (**Figura 8**). Las células epiteliales se caracterizan por contactos célula-célula estables y la formación de uniones adherentes. Estas uniones y contactos son predominantemente dependientes de E-caderina y se conectan a los filamentos de actina a través de  $\alpha$ - o  $\beta$ -catenina. En los tumores que están sufriendo una TEM se observa la pérdida de expresión de E-caderina y la relocalización de  $\beta$ -catenina desde la membrana celular al núcleo, con un aumento en la expresión de N-caderina. Otro marcador clásico de TEM es el filamento intermedio del citoesqueleto vimentina, que en las células mesenquimales es responsable de controlar la motilidad celular. En los tumores primarios de CECC, la baja expresión de E-caderina y la elevada expresión de vimentina se asocian con mayor probabilidad de desarrollar metástasis a distancia. Por otro lado, la N-caderina es pro-oncogénica y potencia la invasión y migración de las células tumorales. La elevada expresión de N-caderina en CECC correlaciona con tumores poco diferenciados y patrones de crecimiento más invasivos (27). Además de la alteración en el patrón de expresión de vimentina, E-caderina y N-caderina, existen otras moléculas que promueven la TEM en CECC. Las más destacadas constituyen proteínas de la superficie celular como integrinas, elementos del citoesqueleto como la actina  $\alpha$ -SMA y la  $\beta$ -catenina, proteínas de la matriz como diferentes subtipos de colágeno, fibronectina y laminina y algunos factores de transcripción como SNAIL, TWIST y LEF-1 (28) .

Para activar los procesos descritos por Hannahan y Weinberg, las células tumorales alteran el funcionamiento, directa o indirectamente, de diferentes vías de señalización intracelular. En el caso del CECC, se han descrito mutaciones o inactivaciones de genes que juegan un papel importante en proliferación celular, incluyendo TP53, retinoblastoma (Rb), CDKN2A (p16, INK4A) y CCND1, así como en la supervivencia celular, PIK3CA, PTEN, CASP8 y HRAS (29). Otra de las alteraciones encontradas,

en el 30-90% de los pacientes con CECC, es una sobre-expresión de EGFR, siendo más frecuente en los pacientes que se encuentran en estadios avanzados de la enfermedad (30). Por último, la expresión de HER-2 (c-erbB-2), asociada con una disminución en la supervivencia global de los pacientes con CECC, se encuentra en el 40-60% de los pacientes. Además de todas estas alteraciones genéticas o en niveles de expresión proteica, también se han estudiado alteraciones relacionadas con regiones no codificantes del genoma, sobre todo microRNAs (miRNA). Estas secuencias de RNA no codificante regulan la expresión a nivel post-transcripcional de muchos genes, y se ha visto que alteraciones en sus niveles de expresión correlacionan con la patogénesis de múltiples tipos de cáncer, incluyendo el CECC (31). Las principales vías de señalización que se encuentran alteradas en los pacientes con CECC debido a variaciones en los niveles de expresión de uno o varios de los elementos que las constituyen, se explican a continuación.

### 2.2.1. Vía del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

La molécula EGFR forma parte de la familia de proteínas ErbB compuesta por 4 receptores tirosina-quinasa relacionados estructuralmente y trece ligandos extracelulares polipeptídicos (32). Los 4 receptores se denominan Her1 (EGFR, ErbB1), Her2 (Neu, ErbB2), Her3 (ErbB3), y Her4 (ErbB4). La unión del ligando a su receptor induce la fosforilación del receptor, lo que activa las vías de señalización relacionadas con la proliferación celular, el control de la transcripción y la progresión del ciclo celular (Ras-MAPK-ERK), vías relacionadas con antiapoptosis (PI3K/Akt) y vías relacionadas con migración celular (JAK/STAT) (30). La unión de EGF a EGFR puede inducir también la translocación de EGFR al núcleo donde actuaría como factor de transcripción y entre sus dianas encontramos CCND1 que codifica para ciclina D1 implicada en la progresión del ciclo celular (33).

En los pacientes con CECC las mutaciones en el gen EGFR son poco frecuentes, sólo en el 1-7% de los casos se han descrito mutaciones puntuales en este gen, en cambio entre el 30-90% de los pacientes presentan sobre-expresión de EGFR, principalmente a nivel de transcripción. Además, los niveles de expresión de EGFR en CECC varían en función de la localización del tumor, los tumores de la laringe presentan bajos niveles de expresión en comparación con los tumores de la cavidad oral o la orofaringe (34). La expresión de EGFR es más elevada en aquellos carcinomas que se encuentran en un estadio más avanzado, así como en aquellos poco diferenciados. De hecho, la sobreexpresión de EGFR está asociada con un descenso en la tasa de supervivencia de los pacientes con CECC (30). Por último, datos recientes muestran que la amplificación y sobre-expresión de EGFR es menos frecuente en tumores asociados a VPH (24).

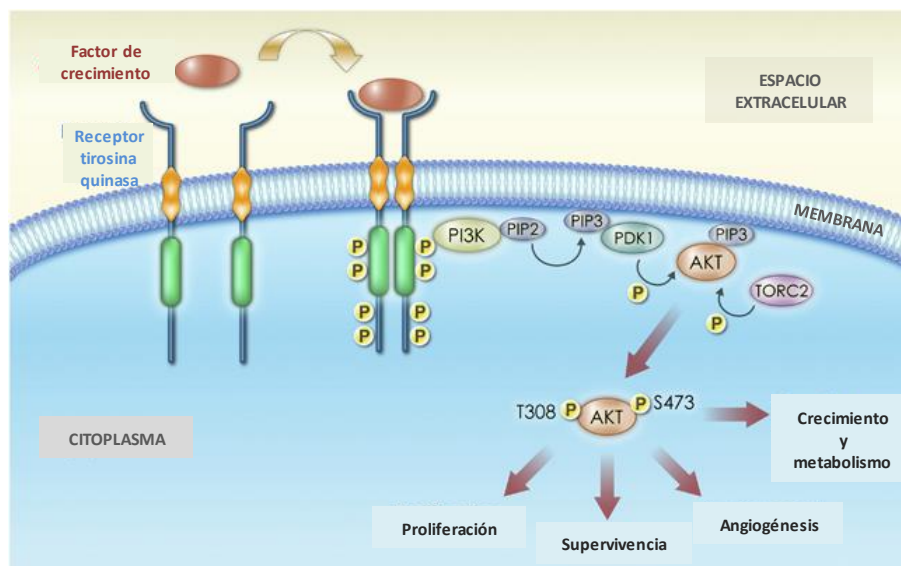
En base a todo lo expuesto anteriormente, la vía EGFR es la diana terapéutica molecular más validada hasta la fecha en pacientes con CECC no asociados al VPH. El cetuximab es un anticuerpo monoclonal dirigido contra el dominio extracelular de EGFR que bloquea la unión de sus ligandos al receptor, habiendo sido aprobado para su uso como tratamiento en pacientes con CECC. Sin embargo,

la tasa de respuesta es sólo del 13% en los pacientes tratados con cetuximab como única modalidad terapéutica debido a la aparición de mecanismos de resistencia (35).

### 2.2.2. Vía de fosfatidilinositol 3-quinasa / protein-quinasa B (PI3K/Akt)

PI3K constituye una familia de enzimas que fosforilan el grupo –OH de las moléculas fosfatidilinositol. El mecanismo general de activación de la vía se muestra en la **figura 9**. Uno de los inhibidores de la vía es la fosfatasa-3 PTEN (fosfatasa y homóloga de la tensina) ya que revierte la acción de PI3K al desfosforilar PIP3. Se considera que Akt es el mediador central de la vía de señalización canónica de PI3K. Akt fosforila numerosas dianas que regulan un amplio rango de procesos celulares importantes durante el desarrollo y progresión tumoral. Uno de sus principales efectores es el complejo 1 de mTOR (mTORC1), el cual se encuentra activado en múltiples cánceres y es una de las principales dianas en terapias y quimioprevención. Entre los ligandos que activan la vía encontraríamos, EGF y el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (36).

La vía de señalización PI3K se encuentra activada en cánceres humanos mediante múltiples mecanismos. Con bastante frecuencia se debe a mutaciones directas que activan o amplifican genes que codifican para elementos clave de la vía, como PI3KCA y AKT1, o pérdida de PTEN. En CECC, concretamente se han observado mutaciones de pérdida de función en PTEN y mutaciones de ganancia de función en PI3KCA (37).



**Figura 9. Representación esquemática de la vía PI3K/Akt y de sus elementos principales.** Tras la activación de un receptor de crecimiento específico (normalmente receptores tirosina quinasa), se produce el reclutamiento de PI3K que cataliza la fosforilación de PIP2, aumentando los niveles de PIP3 en la membrana. El aumento de los niveles de PIP3 estimula la translocación a la membrana de diferentes moléculas como PDK1 y Akt. En ese contexto, Akt es fosforilado en dos residuos diferentes, Thr-308 y Ser-473, por PDK1 y PDK2 (mTORC2), respectivamente. Una vez activado, Akt fosforila y activa otros efectores citosólicos y nucleares. En las células tumorales, Akt se encuentra activado constitutivamente lo que conlleva la desregulación de la proliferación, el crecimiento celular y la supervivencia. Además, la activación de esta vía estimula la angiogénesis. PIP2: fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato; PIP3: fosfatidilinositol 3, 4, 5-trisfosfato; PDK1: proteína quinasa 1 dependiente de 3-fosfoinositido; PI3K: fosfoinositol 3-quinasa; TORC2: complejo 2 de la molécula diana de la rapamicina. Imagen adaptada de (38).

La señalización PI3-K/Akt juega un papel central en numerosos procesos celulares, incluyendo el metabolismo, crecimiento celular, apoptosis, supervivencia y diferenciación, que pueden contribuir a la progresión del CECC. En este sentido, las alteraciones de la vía de señalización de PI3K/Akt/mTOR, incluyendo PIK3CA, PTEN, mTOR y Akt/PKB, son muy frecuentes en CECC y a menudo tienen un significado pronóstico. Todo ello hace que esta vía haya resultado muy atractiva en los últimos años para el desarrollo de nuevos fármacos diana (37).

### 2.2.3. Vía del factor nuclear-kappaB (NF-kB)

NF-kB es un factor de transcripción regulador clave de genes implicados en inflamación (IL-6, IL-1 $\alpha$ ), angiogénesis (IL-8, VEGF), proliferación celular (ciclina D1), apoptosis (Bcl-xL) e invasión y metástasis (MMP-9, uPA). En el 85% de los pacientes con CECC, se ha visto un aumento en la localización nuclear de NF-kB (39). La expresión de esta molécula también se ha asociado con tumorigénesis y metástasis, así como con la reducción de la sensibilidad de las células ante tratamientos radioterápicos (40). Estudios previos realizados en nuestro grupo asocian la sobre-expresión de genes implicados con la activación de NF-kB con un subtipo de CECC con peor pronóstico (41).

### 2.2.4. Vía de quinasas Janus/transductores de señal y activadores de la transcripción (JAK/STAT)

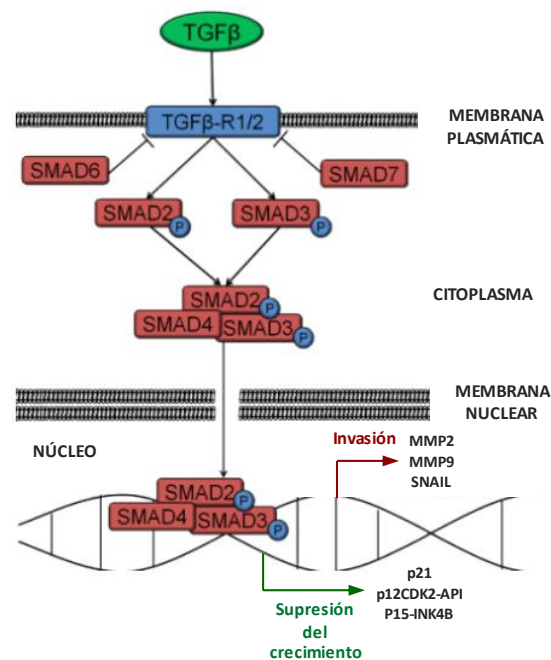
Las quinasas Janus inactivas en forma dimérica se unen a regiones transmembrana de receptores de la superficie celular. La activación del receptor a través de la unión de sus ligandos, provoca un cambio conformacional en el mismo que induce la fosforilación y activación de la actividad tirosina-quinasa del dímero de JAK. Las JAKs activas fosforilan residuos de tirosina situados en las colas citoplasmáticas del receptor lo que estimula el reclutamiento de STATs citoplasmáticos. En esta localización, residuos conservados de tirosina de STATs, son fosforilados (p-STATs), por JAK u otras quinasas, lo que induce la dimerización de STATs que pasan al núcleo donde se unen a regiones promotoras específicas y modulan la transcripción de genes que controlan procesos celulares como proliferación, diferenciación y apoptosis. En humanos se han descrito 4 miembros de la familia JAK, JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2, y 7 miembros de la familia STAT, STAT1-4, STAT5A, STAT5B y STAT6. Debido a la diversidad de receptores asociados a la vía JAK/STAT, no se puede establecer una relación entre miembros concretos de la familia JAK y la activación de determinados miembros de la familia STAT. En general, STAT3 y STAT5A/B promueven la oncogénesis mientras que la activación de STAT1 presenta efectos opuestos. En pacientes con CECC (42).

En CECC, las líneas celulares tumorales presentan elevados niveles de la forma fosforilada de STAT3 y se ha demostrado que este hecho provoca alteraciones en la progresión del ciclo celular y promueve la proliferación y supervivencia en estas células. Además, la activación de STAT3 podría representar

un evento temprano decisivo durante el proceso de carcinogénesis oral, ya que tanto el tumor como el epitelio normal adyacente presentan niveles elevados de expresión y fosforilación de STAT3. La forma activada de STAT3 correlaciona con metástasis ganglionar y la presencia de pSTAT3 en el núcleo se asocia con una supervivencia libre de enfermedad más corta en pacientes con CECC (43). Aunque en muchos tipos tumorales se desconoce el mecanismo mediante el cual se altera el funcionamiento de la vía JAK/STAT, en CECC la fosforilación de STAT3 se considera que es consecuencia del aumento de IL-6 por las células tumorales (44).

### 2.2.5. Vía del factor de crecimiento transformante B (TGF $\beta$ )

La superfamilia TGF $\beta$  incluye los ligandos TGF $\beta$  (TGF $\beta$ 1, 2 y 3), proteínas morfogénicas de hueso (BMPs) y activinas/inhibinas. Los ligandos TGF $\beta$  se unen a dos tipos de receptores quinasa serina/treonina transmembrana, el receptor I TGF $\beta$  (TGF $\beta$ R1) y el receptor II TGF $\beta$  (TGF $\beta$ R2). El mecanismo de activación de la vía canónica TGF $\beta$  se muestra en la **figura 10**. También existen diferentes vías de señalización no canónicas activadas por TGF $\beta$ , como la vía PI3K/AKT, MAP quinasas y Rho GTPasa (45).



**Figura 10. Mecanismo de activación de la vía canónica del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ).** La unión del TGF $\beta$  a sus receptores (TGF $\beta$ -R1/2) induce la fosforilación de SMAD2 y SMAD3, que forman un heterotrímero con SMAD4. El complejo se transloca al núcleo donde dirige la transcripción de genes diana. En células tumorales, estos genes pueden tratarse de genes promotores de invasión (por ejemplo, MMP2, MMP9, SNAIL) o genes supresores del crecimiento (por ejemplo, p21, p12CDK2-AP1, p15-INK4B). SMAD6 y SMAD7 son inhibidores de la vía a nivel de SMADs ya que previenen la fosforilación de SMAD2/3. Imagen adaptada de (45).

La principal función mediada por la señalización TGF $\beta$  es regular la homeostasis tisular a través de la modulación del crecimiento celular, diferenciación, apoptosis, migración, inflamación y angiogénesis. En células epiteliales normales, TGF $\beta$  inhibe la proliferación y promueve, tanto la apoptosis como la diferenciación. En múltiples tipos de cáncer la vía de señalización TGF $\beta$  se encuentra

alterada y puede promover o bloquear la progresión tumoral en función de la etapa en la que encuentre el cáncer. En concreto, en el 80% de los tumores de CECC se detectan niveles elevados del ligando TGF $\beta$ 1, y se correlaciona con estadios avanzados de la enfermedad y una supervivencia más corta de los pacientes. Por otro lado, la expresión de TGF $\beta$ RII se encuentra reducida en más del 70% de los tumores de CECC, esta reducción se asocia con una menor diferenciación tumoral y un comportamiento clínico más agresivo. Smad4 es otro elemento de la vía cuya expresión se encuentra reducida, en CECC el 86% de los tumores y el 67% de las mucosas normales adyacentes, presentan una reducción superior al 50% en la expresión de Smad4. La inactivación somática de Smad4 se ha descrito en el 22-40% de los CECC humanos, considerándose un potente supresor de tumores, no solo en CECC sino en muchos otros tipos de cáncer (46).

Por último, la expresión de la proteína Smad2 también se encuentra reducida en tumores de CECC, entre 1-38% de los tumores presentan una pérdida completa de expresión de esta proteína, siendo mucho más común entre los tumores poco diferenciados. Además, niveles reducidos de fosfo-Smad2 en los tumores de CECC se asocian con mal pronóstico y mayor probabilidad de metástasis ganglionar y a distancia. El papel protector de Smad2 frente a la progresión tumoral se atribuye a su función de regular la diferenciación celular, ya que la pérdida de esta proteína promueve la transición epitelio-mesénquima lo que dota a los tumores de mayor agresividad (46).

### 3. ASPECTOS CLÍNICOS Y PATOLÓGICOS DEL CARCINOMA ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO

#### 3.1. Diagnóstico y estadiaje del CECC

El diagnóstico de las neoplasias de cabeza y cuello se establece en base a la historia clínica del paciente y tras realizar una serie de exploraciones y pruebas diagnósticas. En primer lugar, se realiza una exploración física mediante palpación, seguida de una endoscopia para valorar macroscópicamente la morfología de la lesión, su tamaño, la extensión y la movilidad de las cuerdas vocales. Esta exploración se acompaña de una biopsia para la confirmación histológica de la presencia de CECC. Posteriormente, se realizan estudios de imagen como la resonancia magnética nuclear y/o la tomografía computarizada, con la finalidad de determinar la extensión de la lesión y detectar la presencia de metástasis. En base a los resultados obtenidos en las pruebas anteriores, se determina el estadio tumoral en el que se encuentra el paciente siguiendo la clasificación TNM establecida por *American Joint Committee on Cancer* (AJCC). En la **tabla 2** se muestra cómo se determina el estadio de la enfermedad basado en el sistema TNM.

**Tabla 2.** Codificación de los parámetros del sistema TNM empleados durante el diagnóstico de los pacientes con CECC, establecido por la institución *American Joint Committee on Cancer*

<b>T</b> tumor primario	<b>Tx</b>	No se puede evaluar el tumor primario
	<b>T0</b>	Sin evidencia de tumor primario
	<b>Tis</b>	Carcinoma <i>in situ</i>
	<b>T1-4</b>	Presencia de tumor primario, se le asigna un valor en función del tamaño y/o invasión de estructuras subyacentes
<b>N</b> ganglios linfáticos regionales	<b>Nx</b>	No se puede estudiar la presencia de células tumorales en los ganglios linfáticos regionales
	<b>N0</b>	No hay metástasis en ganglios linfáticos regionales
	<b>N1-3</b>	Metástasis en ganglios linfáticos regionales, se le da un valor en función del número de ganglios infiltrados, su tamaño, si es bilateral o ipsilateral y si hay o no extensión extracápsular
<b>M</b> metástasis a distancia	<b>M0</b>	No hay metástasis a distancia
	<b>M1</b>	Metástasis a distancia

La definición de cada uno de los posibles valores que se le pueden asignar a cada parámetro del sistema TNM depende en cada caso de la localización del tumor primario. En el caso de los tumores que se originan en los labios, la cavidad oral o la orofaringe, se les asigna un valor T (1-4) en función del tamaño del tumor primario. En cambio, a los tumores originados en la laringe o hipofarínge, se les asigna un valor T en función de la invasión o no de estructuras subyacentes y su extensión, siendo específico para cada subzona. La asignación de los valores de N y de M son uniformes para todas las localizaciones excepto para los carcinomas de la nasofaringe. En el caso de los cánceres orofaríngeos, el valor del parámetro N también varía en función de si el cáncer está asociado a la infección por VPH o no.

En función de los valores asignados a cada parámetro TNM, los pacientes se clasifican en estadios I, II, III o IV. Aunque la definición exacta del estadio puede variar en base a la localización del tumor primario, los estadios I y II incluyen a pacientes con tumores primarios relativamente pequeños y sin afectación ganglionar, y los estadios III y IV (estadios avanzados) incluyen a pacientes con tumores primarios de mayor tamaño que con frecuencia presentan invasión de estructuras subyacentes y /o invasión de ganglios linfáticos o metástasis a distancia (5).

### 3.2. Factores pronóstico en pacientes con CECC

Los factores pronóstico en pacientes con CECC constituyen variables biológicas, clínicas e histopatológicas que correlacionan con la supervivencia global y/o supervivencia libre de enfermedad en pacientes con CECC e informan sobre la evolución de la enfermedad con independencia de la terapia anti-tumoral. Su uso permitiría definir qué pacientes deben someterse a un tratamiento más o menos agresivo, así como a aquellos pacientes a los que se les debe proporcionar un seguimiento más frecuente y exhaustivo de la enfermedad, en función de la evolución clínica esperada en cada caso.



Los factores pronóstico asociados al CECC se pueden clasificar en dos grandes grupos, factores clinicopatológicos y factores pronóstico de origen molecular.

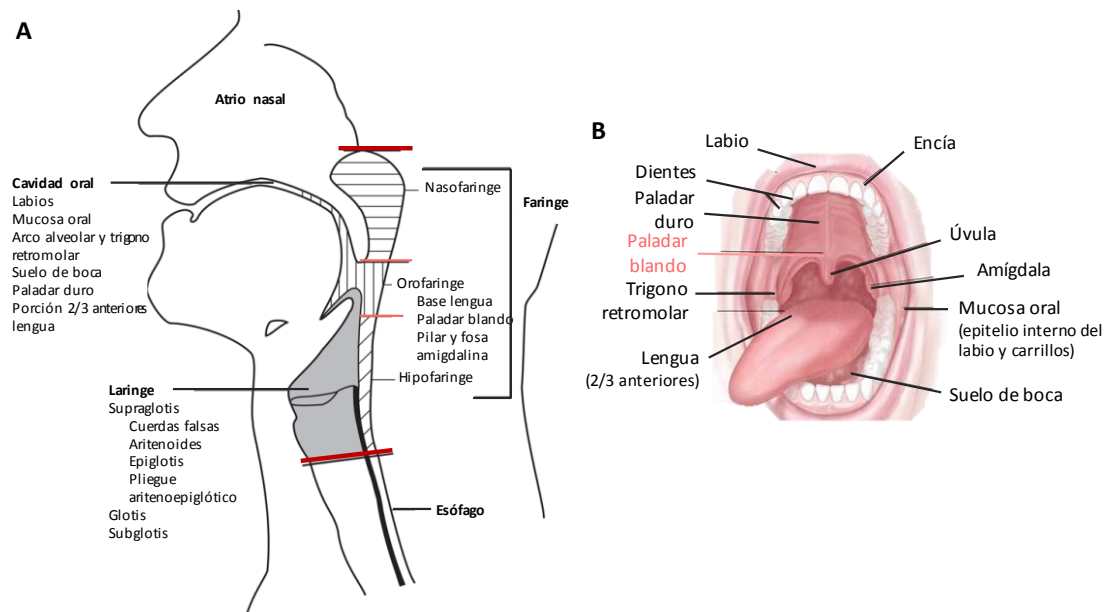
### 3.2.1. Factores pronóstico clinicopatológicos

Actualmente solo se utilizan factores clinicopatológicos para decidir el tipo de tratamiento al que será sometido un paciente con CECC. Estos factores son los incluidos dentro del sistema TNM, donde se tiene en cuenta el tamaño del tumor primario (T), el número y el tamaño de los ganglios con metástasis, así como la presencia de extensión extracapsular (N) y la presencia o no de metástasis a distancia (M). Los valores asignados a cada parámetro depende de la localización del tumor primario, que también guarda relación con la evolución clínica del paciente. Además de estos factores, existen más factores clinicopatológicos que se asocian con la evolución clínica de los pacientes con CECC, aunque no se utilicen en la práctica clínica para decidir la modalidad de tratamiento. A continuación se explicaran con detalle cada uno de ellos, clasificándolos en función de si se relacionan con el tumor primario o con los ganglios, así como también los incluidos dentro del sistema TNM.

#### 3.2.1.1. Factores pronóstico relacionados con el tumor primario

##### **Localización anatómica**

Durante el diagnóstico de los pacientes con CECC, tanto el estadio que se le asigna a los pacientes como la elección del tratamiento y su tasa de supervivencia a los 5 años se encuentran relacionados con la localización del tumor primario (**Figura 11**). Por ejemplo, los pacientes con cáncer en el labio presentan una tasa de supervivencia a los 5 años superior al 80% mientras que en los pacientes con cáncer en la hipofaringe esta tasa no supera el 30% (47). Los pacientes con tumor a nivel de glándulas salivares o de nasofaringe presentan menor supervivencia debido a la aparición de recidivas locales mientras que los pacientes con cáncer de laringe presentan mayor supervivencia gracias a un mejor control local de la enfermedad. En relación con la recidiva regional, los pacientes con cáncer de faringe presentan menor recidiva regional de la enfermedad que los pacientes con cáncer en la cavidad oral, lo que se asocia a una menor supervivencia en estos últimos. Y por último, los pacientes con cáncer de laringe presentan mejor pronóstico debido a una menor probabilidad de desarrollar metástasis a distancia. Además de estas diferencias a nivel de localización del tumor primario, también se han encontrado diferencias según el subsitio donde se desarrolle el tumor dentro de cada localización. Dentro de los cánceres que se desarrollan en la cavidad oral, los situados en el suelo de boca presentan peor pronóstico que los cánceres gingivales y entre los cánceres de laringe, los que se desarrollan en la supra- y sub-glottis presentan peor pronóstico que los cánceres en la glottis (48).



**Figura 11. Sitios y subsitios anatómicos incluidos dentro de la cabeza y el cuello (excepto el esófago).** (A) Las principales regiones son la cavidad oral, la faringe y la laringe (separación por líneas rojo oscuro). Los subsitios incluidos en cada región también se muestran (separación por líneas rojo claro). Adaptada de (5). (B) Imagen ampliada de los elementos que forman parte de la cavidad oral (excepto el paladar blando que se incluye dentro de la faringe). Adaptada de (49).

Hay diferentes factores que pueden explicar las diferencias a nivel de evolución clínica entre pacientes con CECC en diferentes localizaciones anatómicas, uno de ellos puede ser el tratamiento diferencial al que son sometidos los pacientes en función de la localización del tumor, incluyendo la posibilidad o no de una resección quirúrgica completa. Otro de los factores que pueden explicar dichas diferencias es que cada zona o subzona presenta una irrigación vascular, linfática y una composición de la matriz extracelular diferente según la región, lo que puede influir en la capacidad de diseminación de las células tumorales (50).

### Dimensiones del tumor primario

El tamaño y la extensión del tumor primario determinan el valor que se le asigna a la variable T dentro del sistema TNM. El valor se establece clínicamente midiendo el diámetro máximo en superficie de la neoplasia presente en la mucosa o, patológicamente, midiendo el diámetro máximo en la sección transversal del tumor reseccionado. El tamaño y extensión del tumor primario se ha considerado como un factor de riesgo relacionado con las metástasis en ganglios linfáticos, la recidiva local y la supervivencia de los pacientes con CECC (51–53). A pesar de esto, se han encontrado ciertas limitaciones en su uso como factor pronóstico debido a la dificultad de establecer el volumen real que ocupa el tumor a partir del diámetro máximo, y a la ausencia de correlación mostrada por otros grupos entre diámetro tumoral y supervivencia o metástasis en ganglios linfáticos (54–56). Otro parámetro relacionado con el tumor primario que tiene un papel pronóstico en pacientes con CECC es la profundidad de invasión. En los carcinomas de lengua, de hipofaringe o de supraglotis sin afectación ganglionar, la profundidad de invasión del tumor primario es un indicador aceptado que se asocia con

la presencia de metástasis cervical oculta, utilizándose como criterio preferente para llevar a cabo una extirpación de los ganglios del cuello (57,58).

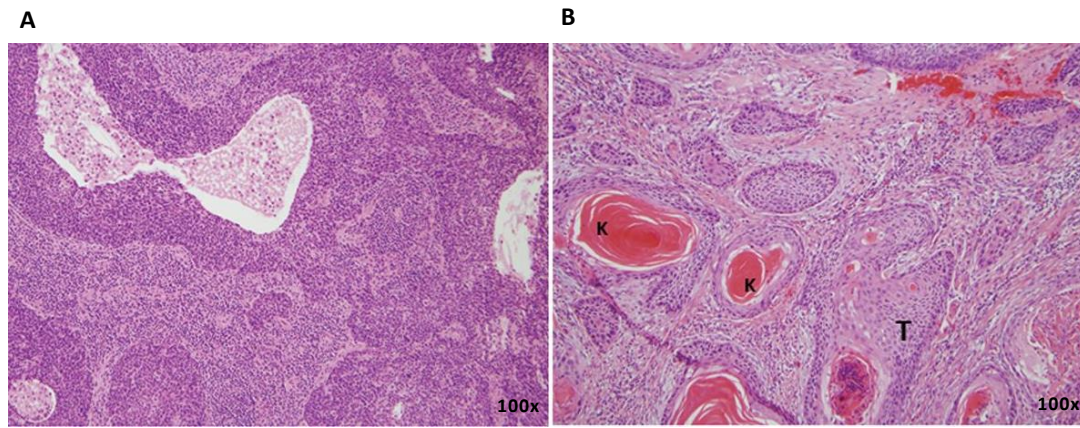
### **Estado de los márgenes tras la resección del tumor primario**

Otro de los factores que se ha visto que determina el control local de la enfermedad en pacientes con CECC, es el estado de los márgenes cuando se lleva a cabo la escisión quirúrgica o resección del tumor primario (59). Múltiples estudios muestran una asociación entre presencia de márgenes positivos y mayor riesgo de sufrir recidivas loco-regionales, así como una supervivencia libre de enfermedad o global más cortas en aquellos pacientes con CECC con márgenes positivos (60–62). De manera opuesta, otros estudios no han encontrado una correlación entre la presencia o no de márgenes positivos y la evolución clínica de los pacientes con CECC (63,64). Estas discrepancias entre estudios podrían ser debidas a diferencias en las técnicas quirúrgicas así como en la determinación del estado del margen de la resección (positivo o negativo), en función de la institución donde se haya llevado a cabo el procedimiento y el cirujano que lo haya realizado (65).

### **Grado histológico de malignidad**

El primer sistema cuantitativo basado en el grado histológico fue establecido por Broders en 1920, y ha sido ampliamente utilizado para el estadiaje histopatológico de carcinomas escamosos en múltiples localizaciones. Se basa en el grado de diferenciación de las células tumorales, clasificando los carcinomas en 3 grados:

- **Tumor diferenciado (grado bajo):** las células tumorales son similares a las células epiteliales de la mucosa normal. Entre el 75-100% de las células se encuentran diferenciadas. El tumor presenta queratinización intra- o extra-celular. Se observan pocas células en división, con escaso pleomorfismo nuclear o variaciones en el tamaño o la forma celular. Las mitosis atípicas son poco frecuentes o están ausentes (**Figura 12B**).
- **Tumor moderadamente diferenciado (grado medio):** las células tumorales presentan menor grado de queratinización y se observan más células en mitosis. Entre el 50-75% de las células se encuentran diferenciadas. Aparecen células con pleomorfismo nuclear o variaciones en su forma y tamaño. Pueden encontrarse algunas figuras mitóticas atípicas.
- **Tumor escasamente diferenciado (grado alto):** las células tumorales presentan escasa o ausencia de queratinización y hay abundantes células en mitosis. Entre el 25-50% de las células están diferenciadas. El pleomorfismo nuclear y las variaciones en la forma y el tamaño celular son frecuentes. Abundan las mitosis atípicas (**Figura 12A**).



**Figura 12. Carcinomas escamosos de cabeza y cuello con diferente grado de diferenciación. (A)** Tumor escasamente diferenciado (grado alto). **(B)** Tumor diferenciado (grado bajo) donde se observa perlas de queratina (K) y crecimiento tumoral en nidos (T). Imágenes obtenidas de (22).

Los tumores escasamente diferenciados se suelen comportar de manera más agresiva, debido a que aumentan el riesgo de recidiva y reducen la supervivencia de los pacientes (66–70). Este sistema ha sido muy criticado debido a su subjetividad y a que deja de ser un factor pronóstico independiente cuando se analiza a través de un modelo multivariado (66,71–73). A lo largo de los años, diferentes investigadores han introducido nuevos sistemas para clasificar los tumores en base a sus características histopatológicas. Uno de ellos es el sistema basado en el grado de malignidad que, además de los parámetros anteriores, incluye parámetros como el modo de invasión, el estadio de invasión, la presencia de invasión vascular y la presencia de respuesta celular (infiltración limfoplasmocitaria) (74). Otro de los sistemas es el sistema de grados multifactorial que evalúa parámetros relacionados con la población celular tumoral (grado de queratinización, pleomorfismo nuclear y número de mitosis) y con la interacción tumor-entorno (patrón de invasión, profundidad de invasión, infiltración de células inflamatorias) (75). Otros investigadores sugirieron que solo tendría valor pronóstico el estado de diferenciación de las células en el frente invasivo del tumor (76). Y por último, Brandwein-Gensler *et al.* propusieron un modelo de riesgo histológico basado en la evaluación de tres parámetros, el patrón de invasión, la respuesta linfocitaria del huésped y la invasión perineural, que se relaciona con la supervivencia global y libre de enfermedad de los pacientes con carcinoma escamoso en la cavidad oral (77).

### Ratio tumor-estroma

El estroma del tumor está formado por dos tipos de elementos, por un lado células no tumorales como fibroblastos, células mesenquimales especializadas de tejido y células del sistema inmune innato y adaptativo, y por otro lado, matriz extracelular formada por proteínas estructurales (colágeno y elastina), proteínas especializadas (fibrilina, fibronectina y elastina) y proteoglicanos. Estos elementos en su conjunto constituyen un soporte físico y nutricional necesario para el crecimiento del tumor,

importante para la eliminación de productos de deshecho por parte de las células tumorales y una barrera frente al resto de células del tejido huésped (78).

En cáncer de mama (79), de colon (80), cervical (81) y de esófago (82), una mayor proporción de estroma en el tumor primario (ratio tumor-estroma reducido) se ha asociado con una menor supervivencia en los pacientes. En base a estos resultados el ratio tumor-estroma se ha propuesto en este tipo de cánceres como factor pronóstico independiente relacionado con la supervivencia de los pacientes. En el CECC, aunque se ha demostrado en múltiples estudios la contribución de diferentes elementos del estroma al crecimiento e invasión a nivel de tumor primario (83–86), el ratio tumor-estroma no se utiliza como factor pronóstico en los pacientes con CECC.

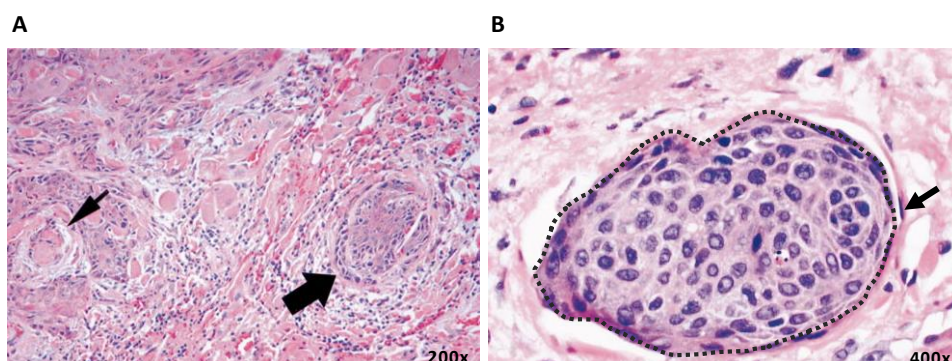
### ***Tumor budding***

*Tumor budding* es un tipo de crecimiento invasivo que puede estar presente en los carcinomas y está caracterizado por la presencia de células individuales o pequeños grupos de células (<5 células) en el estroma del frente invasivo del tumor. La presencia de *tumor budding* se considera un factor pronóstico independiente para la supervivencia global, la metástasis a ganglios linfáticos y las metástasis a distancia en pacientes con CECC, independientemente de la localización del tumor primario (87,88).

### **Invasión perineural e invasión vascular**

La proporción de tumores de CECC en los que se ha detectado invasión perineural (presencia de células tumorales en espacios perineurales, **figura 13A**) varía según el estudio, desde 14% hasta 63.2% (89). A pesar de la diferente incidencia, en todos los estudios la presencia de invasión perineural correlaciona con un aumento de la recidiva locorregional y una disminución de la supervivencia de los pacientes con CECC (90–94).

La invasión vascular (presencia de células tumorales en el interior de un vaso sanguíneo, **figura 13B**) a nivel de tumor primario correlaciona con la presencia de metástasis en ganglios cervicales concomitantes en pacientes con CECC (57,91,95,96). Además, en los pacientes con CECC tratados quirúrgicamente, la presencia de invasión vascular aumenta el riesgo de padecer recidivas locorregionales (69,97,98).



**Figura 13. Tinción de hematoxilina-eosina de un tumor primario de carcinoma escamoso de cabeza y cuello. (A)** Presencia de células tumorales en el espacio perineural (flechas negras). **(B)** Presencia de células tumorales (línea negra discontinua) en un vaso sanguíneo, delimitado por células endoteliales (flecha negra). Imágenes adaptadas de (99).

### 3.2.2.2. Factores relacionados con los ganglios linfáticos cervicales

La presencia de metástasis a nivel de ganglios linfáticos determina el pronóstico y el tratamiento de los pacientes con CECC. Los pacientes con metástasis en un único ganglio linfático presentan una tasa de supervivencia a los 5 años del 50%, mientras que aquellos que también tienen afectada la cadena ganglionar del otro lado, se reduce al 33% (100). Los parámetros relacionados con la metástasis en ganglios linfáticos que pueden influir en el pronóstico de los pacientes con CECC se explican a continuación.

#### **Número de ganglios linfáticos positivos**

El tamaño, el número y la localización de los ganglios linfáticos cervicales infiltrados por células tumorales definen el estadio N del sistema TNM empleado en el diagnóstico del CECC y aporta información importante relacionada con el pronóstico y la selección del tipo de tratamiento en los pacientes con CECC. Concretamente, el número de ganglios linfáticos positivos tras la confirmación histológica constituye uno de los marcadores pronóstico más importantes en CECC, ya que predice el riesgo de presentar metástasis a distancia, recidivas locorreionales y además, correlaciona con la supervivencia de los pacientes (101–103).

#### **Extensión extracapsular**

La extensión extracapsular, o invasión de células tumorales más allá de la pared ganglionar, aparece en el 60% de los pacientes con CECC que presentan ganglios cervicales positivos y puede estratificarse en tres niveles: (a) diseminación extracapsular macroscópica con implicación de otras estructuras anatómicas adyacentes, (b) diseminación extracapsular macroscópica confinada al tejido fibro-adiposo contiguo y (c) diseminación extracapsular microscópica (104). La presencia de extensión extracapsular aumenta el riesgo de sufrir recidivas regionales, presentar metástasis a distancia y reduce la supervivencia en los pacientes con CECC (69,105–107). Actualmente también se incluye para la determinación del estadio N durante el diagnóstico del paciente.

#### **Tamaño de los ganglios linfáticos positivos**

El diámetro del ganglio linfático cervical positivo más grande se utiliza para la determinación del parámetro N en el sistema TNM empleado en el diagnóstico de los pacientes con CECC. Aunque algunos investigadores han encontrado una relación entre el tamaño del mayor ganglio linfático patológico y el riesgo de sufrir recidivas regionales en pacientes con CECC (101,108), muchos otros no han encontrado dicha asociación ni a nivel de recidivas locales ni regionales (109,110). En relación con la supervivencia, algunos investigadores encontraron el tamaño de los ganglios infiltrados como factor

pronóstico de la supervivencia global en los pacientes con CECC, pero en la gran mayoría de estudios, cuando se incluyeron otras variables patológicas relevantes, el tamaño de los ganglios dejó de estar asociado a supervivencia (71,110,111).

### 3.2.2. Factores pronóstico de origen molecular

En la actualidad, la elección de la modalidad de tratamiento al que se someten los pacientes con CECC depende de parámetros clínicos, radiológicos e histopatológicos, observándose una amplia heterogeneidad en la evolución clínica y respuesta al tratamiento de estos pacientes. Además, la tasa de supervivencia a los 5 años de los pacientes con CECC no ha mejorado en los últimos 30 años. En este contexto, surge la necesidad de identificar nuevos factores clínicos y biológicos que puedan ser utilizados como marcadores pronóstico de la enfermedad y predictivos de la respuesta al tratamiento. Los marcadores moleculares o biomarcadores se definen como moléculas presentes en los fluidos corporales o tejidos que son signos de un proceso normal o anormal, o de una condición o enfermedad. Existen biomarcadores diagnóstico, pronóstico y predictivos. Los biomarcadores pronóstico se asocian con la evolución del paciente independientemente del tratamiento, mientras que los biomarcadores predictivos se asocian con la evolución del paciente tras un tratamiento específico. A pesar de que tienen diferentes definiciones, un mismo marcador puede tener capacidad pronóstica y predictiva (112). Gracias a los avances en los últimos años en investigación básica y genómica que han permitido ampliar el conocimiento sobre las bases biológicas en relación con la aparición y la progresión tumoral del CECC, se han identificado numerosos marcadores moleculares con el potencial para predecir la evolución de la enfermedad y la respuesta al tratamiento de los pacientes (113). Las funciones que presentan dichos marcadores son diversas, desde regulación del ciclo celular (p53, p16, CCND1), vía de síntesis de prostaglandinas (Cox-2), transducción de señal (EGFR, VEGF, PIK3CA), degradación de la matriz extracelular (MMP-2 y MMP-9), hasta relacionados con inestabilidad genómica (FHIT) (114).

En el 2011 se publicaron los primeros estudios de secuenciación de nueva generación (NGS) basados en la secuenciación completa del exoma del CECC. La secuenciación de todos los exones del genoma humano conocido de un total de 106 tumores de CECC, permitió confirmar las mutaciones que se habían encontrado previamente en genes clave relacionados con la patogénesis del CECC como TP53, CDKN2A y PIK3CA y además identificaron por primera vez mutaciones en NOTCH1 (**Tabla 3**) (29,115).

**Tabla 3. Genes mutados con mayor frecuencia en tumores de CECC.** Obtenidos de estudios basados en secuenciación de nueva generación (NGS)

Símbolo gen	Nombre gen	Localización cromosómica	Función gen	Dianas <i>downstream</i>	Tasa mutación (Porcentaje)
TP53	<i>Tumor protein p53</i>	17p13.1	Supresor tumoral: "El guardian del genoma. Regula el paro del ciclo celular en respuesta a daño celular, apoptosis o senescencia"	P21, BAX y PUMA	40-60

<b>NOTCH1</b>	Notch1	9p34.3	En función del tejido actúa como supresor tumoral o como oncogen. Regula el ciclo celular, el compromiso de linaje celular y el desarrollo embrionario	Hes/Hey, p21	14-15
<b>HRAS</b>	<i>Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i>	11p15.5	Oncogen; proteína de unión a GTP que promueve proliferación celular y supervivencia a través de Raf y PI3K	Activa la vía Raf/MEK/ERK y la vía PI3K/Akt	4-35
<b>PIK3CA</b>	<i>Phosphoinositide-3-kinase catalytic alpha polypeptide</i>	3q26.32	Oncogen. Subunidad catalítica de PI3K. Diana de activación por Ras. Regula la diferenciación celular, el compromiso de linaje celular y el desarrollo embrionario	Activa Akt y PLCgamma1	6-8
<b>CDKN2A</b>	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>	9p21.3	Codifica para la proteína p16. Supresor tumoral. Regula la progresión del ciclo de la fase G1 a la fase S	Inhibe CDK4/6	9

Tabla adaptada de (116).

En un estudio previo realizado en nuestro laboratorio con muestras de pacientes con CECC localmente avanzado y el uso de microarrays, se identificaron tres subtipos tumorales basados en su perfil de expresión génica. La clasificación de los subtipos se asoció significativamente con la SLRL, la SLP y la supervivencia global (SG) de los pacientes. En los tumores del subtipo I, asociados con peor pronóstico, se observó una activación de procesos biológicos relacionados con invasión, motilidad y progresión tumoral. En los tumores del subtipo III, asociados con menor recidiva y mayor supervivencia, se sobre-expresaban genes relacionados con morfogénesis epidérmica, cuyos productos se localizan en estructuras celulares características de los queratinocitos diferenciados. En el subtipo II, se detectó una activación de genes implicados en el desarrollo del epitelio tubular, la oligomerización de proteínas y un patrón de diferenciación intermedio entre los tumores del subtipo I y del subtipo II. La principal utilidad de esta firma de expresión génica sería identificar subgrupos de pacientes que se pudieran beneficiar de tratamientos genotóxicos a partir de biopsias pre-tratamiento (41).

Finalmente, los avances tecnológicos de los últimos años han hecho posible la detección de DNA circulante en muestras clínicas de sangre, ya sea a partir del DNA tumoral circulante o a partir de las células tumorales circulantes. Los dos tipos de metodologías permitirían la detección temprana del cáncer, la monitorización de la enfermedad y su seguimiento tras el tratamiento, la detección de resistencias a agentes diana antes de que fuera detectable por técnicas de imagen y la posibilidad de profundizar en los mecanismos de resistencia evitando el riesgo asociado a la toma de muestra (117).



### 3.3. Tratamiento del CECC

El tratamiento de los pacientes con CECC es complejo. La localización y extensión de la enfermedad así como los hallazgos patológicos dictan el tratamiento adecuado (cirugía, radioterapia, quimioterapia). Generalmente, el 40% de los pacientes en estadios iniciales (I y II) se tratan con una sola modalidad de tratamiento. Por el contrario, el 60% restante diagnosticado en estadios avanzados (estadios III y IV) se benefician de terapias combinadas (5). Los pacientes que se diagnostican en estadios iniciales de la enfermedad son sometidos a cirugía o a radioterapia dependiendo de la localización del tumor primario y la posibilidad de que afecte a la función de órgano. En los tumores pequeños más accesibles, como los presentes en la cavidad oral, faringe o laringe, se suele realizar cirugía, obteniendo elevadas tasas de preservación de órgano (118). En cambio, en los tumores situados en la glotis, la base de la lengua o el paladar, el tratamiento con radioterapia consigue un gran control del tumor y tasas elevadas de curación (18).

Actualmente, los protocolos de tratamiento más utilizados en pacientes con CECC en estadios localmente avanzados son la quimioterapia de inducción o neoadyuvante (se administra en primer lugar antes de cualquier otro tratamiento a nivel local), seguida de radioterapia o cirugía, y la quimio-radioterapia concomitante (se administra de forma simultánea con la radioterapia).

En el caso de los pacientes que inician tratamiento con quimioterapia de inducción, se utiliza el grado de respuesta tumoral conseguido para decidir la terapia ulterior más adecuada. Los pacientes que consiguen una reducción tumoral adecuada tras el tratamiento con quimioterapia de inducción son considerados candidatos a un tratamiento conservador con radioterapia o quimio-radioterapia. En caso de no conseguirse una respuesta adecuada, se considera al paciente candidato a resección quirúrgica.

Por otro lado, una alternativa conservadora es iniciar el tratamiento con quimio-radioterapia concomitante, que ha pasado a ser considerado como tratamiento estándar en el manejo de pacientes con CECC en estadios avanzados en una mayoría de guías clínicas (119).

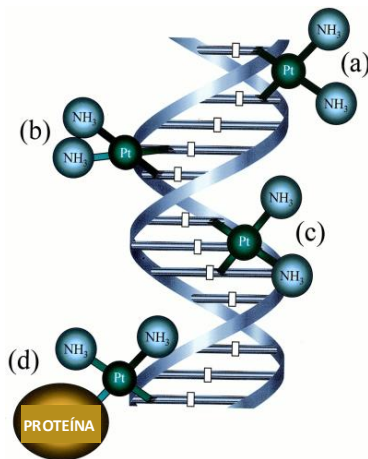
Entre los compuestos quimioterápicos que se suelen aplicar en el tratamiento de CECC, encontramos el 5-Fluoracilo, inhibidor de la timidina sintasa, que actúa bloqueando la replicación del DNA, el cisplatino (CDDP), un agente alquilante que desestabiliza la estructura del DNA y bloquea su replicación y los taxanos, estabilizadores de los microtúbulos, que impiden la división de la célula durante la mitosis. La combinación de cisplatino y 5-fluoracilo se emplea como tratamiento neoadyuvante estándar en el tratamiento de CECC y se ha observado que permite mejorar la preservación de órgano y la supervivencia. La incorporación hace unos años de los taxanos (Docetaxel y Paclitaxel) al tratamiento estándar quimioterápico ha permitido aumentar las tasas de supervivencia y mejorar la respuesta de los pacientes (119).

El conjunto de compuestos quimioterápicos expuestos anteriormente actúan a nivel sistémico, principalmente sobre las células que se encuentra en división sin tener una diana definida. Existen otros tipos de compuestos quimioterápicos que actúan sobre moléculas diana, fundamentalmente sobre proteínas concretas (terapia molecular dirigida). Los más utilizados en CECC están dirigidos contra el receptor EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), que se encuentra sobre-expresado en el 80% de los tumores de CECC (30). Entre los compuestos utilizados encontramos los anticuerpos monoclonales anti-EGFR (Cetuximab y Panitumumab) y los inhibidores de la actividad tirosina quinasa del receptor (Gefitinib y Erlotinib) (120). El uso de Cetuximab en pacientes con CECC localmente avanzado de manera concomitante con radioterapia, mejora el control locorregional de la enfermedad, aumenta la supervivencia de los pacientes pero no disminuye la aparición de metástasis a distancia (121).

A continuación, se explican los mecanismos de acción y el uso de cisplatino en el tratamiento de los pacientes con CECC, ya que es el fármaco con el que realizamos los ensayos in vitro de apoptosis inducida en esta tesis doctoral.

### 3.3.1. Cisplatino

El cisplatino (cis-diamminedichloroplatinum (II), CDDP) es un fármaco quimioterápico formado por un átomo de platino unido a dos grupos  $\text{NH}_3$  y dos grupos  $\text{Cl}$ . Los dos ligandos de cloro son estables en el torrente sanguíneo pero cuando el CDDP es internalizado por las células, los ligandos de cloro se sustituyen por agua o grupos hidroxilo, produciendo especies cargadas positivamente que tienden a reaccionar con moléculas nucleofílicas intracelulares mediante reacciones de alquilación. Entre estas moléculas encontramos el RNA, fosfolípidos de membrana, filamentos del citoesqueleto, moléculas con grupos tiol y las bases púricas. Aunque tan solo el 1% del CDDP internalizado reacciona con el DNA celular, se considera que la mayor parte de las lesiones celulares inducidas por CDDP son debidas a esa interacción. Su interacción con el DNA genera agregados formados por uniones DNA-proteína y DNA-DNA (**Figura 14**). Los agregados generados, sobre todo entre las bases púricas de una misma cadena de DNA y el CDDP (entrecruzamiento intracatenario), son los responsables de la acción citotóxica del CDDP que incluye parada replicativa, inhibición de la transcripción, parada del ciclo celular, bloqueo de la reparación del DNA y apoptosis. La interacción del CDPP con los grupos tiol de las proteínas también contribuye al efecto antiproliferativo del CDDP (122).



**Figura 14. Principales agregados formados tras la interacción del cisplatino con el DNA.** (a) Entrecruzamiento intercatenario del DNA. (b) Entrecruzamiento intracatenario 1,2- del DNA. (c) Entrecruzamiento intracatenario 1,3- del DNA. (d) Entrecruzamiento proteína-DNA. Adaptada de (123).

La quimioradioterapia concomitante es el tratamiento de elección para los pacientes con un tumor localmente avanzado no resecable o como estrategia de conservación de órgano. La administración de cisplatino y radiación de manera simultánea, contribuye a aumentar un 6.5% la tasa de supervivencia a 5 años de los pacientes tratados y consigue mejorar el control locorregional de la enfermedad. Sin embargo, esta mejora también conlleva una elevada toxicidad y una reducción en la calidad de vida de los pacientes. El uso de cetuximab como alternativa al CDDP, minimiza la toxicidad pero todavía se desconoce si presenta la misma eficacia. El análisis de la expresión o mutación de EGFR resulta insuficiente para predecir la respuesta al tratamiento con Cetuximab por lo que resulta indispensable el desarrollo de nuevos biomarcadores que permitan identificar a los pacientes que se beneficiarían de este tratamiento (124).

#### 4. SERPINA E1

La molécula SERPINE1 (SERpin Peptidase Inhibitor, clado E, miembro 1) o SERPINA E1, también denominada PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor, type 1), constituye uno de los principales elementos reguladores del sistema fibrinolítico. Este sistema juega un papel fundamental en el mantenimiento del sistema vascular y en la disolución de los coágulos sanguíneos. Los elementos principales que lo forman son el plasminógeno, una proenzima inactiva que se convierte en plasmina, y sus dos activadores, el activador tisular del plasminógeno (tPA) y el activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA). El elemento central del sistema, el plasminógeno, es convertido a plasmina por sus dos activadores uPA y tPA. La plasmina presenta como sustrato varias glicoproteínas y proteoglicanos de la matriz extracelular como la laminina, fibronectina, vitronectina, fibrina, etc. Además, puede activar otras proteinasas como las metaloproteinasas (MMP) -1,-3 y -9 y activar o liberar factores de señalización presentes en la matriz como TGF $\beta$  o VEGF. La regulación de este sistema está mediada por varios inhibidores que pueden actuar a nivel de activación del plasminógeno, mediante el inhibidor del activador del plasminógeno (SERPINA E1 o PAI-1) o mediante el inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI), o a nivel de plasmina, mediante  $\alpha$ -antiplasmina.

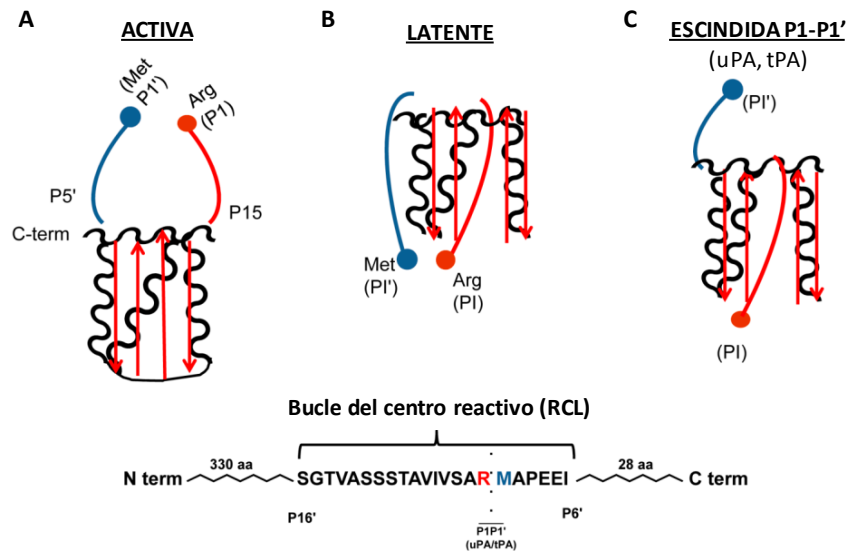
La actividad tPA es responsable de la disolución de la fibrina presente en la circulación, mientras que la actividad de uPA depende de su unión a un receptor específico de la superficie de las células denominado uPAR, y su principal función es la inducción de la proteólisis pericelular que es necesaria durante la remodelación y reparación tisular, la acción de los macrófagos, la ovulación, la implantación embrionaria y la invasión tumoral (125).

#### 4.1. Clasificación, estructura, función y regulación

SERPINA E1 es una glicoproteína que pertenece al subgrupo 1 del clado E de la superfamilia SERPIN (SERine Protease INhibitor). Esta superfamilia está compuesta por un gran número de proteínas funcionalmente diferentes pero estructuralmente similares que se pliegan formando una estructura central altamente conservada esencial para su actividad catalítica. Se han descrito hasta 500 SERPINAs diferentes, las cuales se clasifican en 16 clados (A-P) y 10 secuencias huérfanas en base a sus relaciones filogenéticas. Las SERPINAs presentes en vertebrados se pueden agrupar, a su vez, en 6 subgrupos teniendo en cuenta su secuencia génica y de aminoácidos.

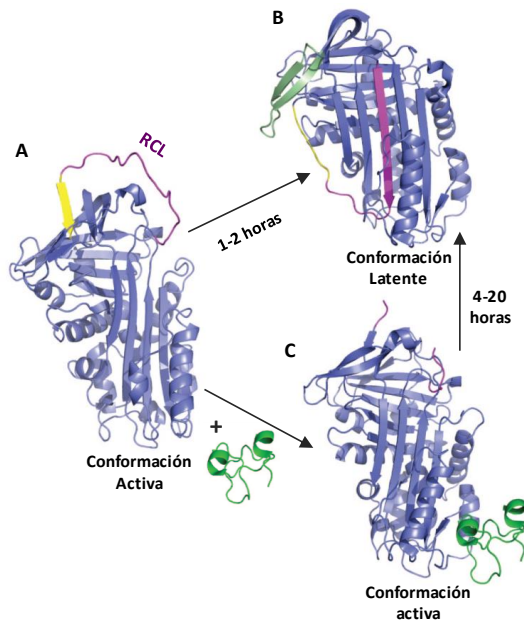
Estructuralmente, SERPINA E1 está compuesta por una única cadena de 379 aminoácidos y presenta un peso molecular de 52KDa. Está formada por 3 hojas beta (A, B, C), 9 hélices alfa (A-I), un péptido señal en el extremo N-terminal y un tramo flexible responsable del reconocimiento del sustrato que conforma el bucle del centro reactivo (RCL) (126).

A nivel funcional, SERPINA E1 actúa inhibiendo a otras proteasas mediante un mecanismo de inhibición irreversible denominado inactivación suicida. SERPINA E1 interacciona con su proteasa diana formando un complejo no covalente a través de los residuos (P1-P1') que flanquean el enlace escindible. Tras esta unión, la serina del centro activo en el enlace escindible de SERPINA E1 es atacada y, como resultado, se genera un enlace éster covalente entre la Ser-196 de la proteasa y el grupo carbonil del residuo P1 de SERPINA E1. Como consecuencia, el enlace P1-P1' se rompe, la proteasa unida al RCL se trasloca y su sitio activo se distorsiona, lo que provoca la inactivación de la proteasa. En estas condiciones, se forma un complejo covalente irreversible proteasa-SERPINA E1 donde SERPINA E1 se encuentra en su conformación más estable y la proteasa carece de actividad. La especificidad de cada SERPIN por su proteasa viene marcada por los residuos que forman el enlace escindible P1-P1'. En el caso de SERPINE1, sus sustratos son las proteasas uPA y tPA del sistema fibrinolítico (127).



**Figura 15. Conformaciones de SERPINA E1.** (A) En la conformación activa, el extremo C-terminal del bucle del centro reactivo (RCL) se encuentra en una posición rígida. (B) La conversión a la conformación latente implica la inserción del lado N-terminal del RCL en la hoja β A (en rojo), formándose una nueva hoja β, la extensión del extremo C-terminal del RCL y la disrupción del péptido P1-P1'. En esta conformación (latente), SERPINA E1 no puede unirse a sus proteasa diana pero puede ser reactivada bajo determinadas circunstancias (reversible). (C) Cuando SERPINA E1 se encuentra en su conformación activa puede servir de sustrato para proteasas diana las cuales cortan el enlace P1 (Arg346, bola roja) - P1' (Met347, bola azul). El extremo N-terminal cortado del RCL se inserta en la hoja β A (en rojo), forma una nueva hoja β y distorsiona el péptido P1-P1'. Esta conformación (escindida) es irreversible y SERPINA E1 no tiene actividad anti-proteasa. Adaptada de (128).

La molécula de SERPINA E1 es expresada por una gran variedad de células, como son las células musculares lisas vasculares, las células endoteliales, los fibroblastos, las células inflamatorias, las plaquetas y las células tumorales. Además, puede encontrarse en el organismo en tres conformaciones diferentes que son interconvertibles entre sí, conformación activa, latente y de sustrato o escindida (**Figura 15**). SERPINA E1 es sintetizada por las células y secretada al exterior en su conformación activa, pero espontáneamente se convierte en la conformación latente con un tiempo de vida medio de 1-2 horas. Este tiempo de vida medio puede aumentar de 2 a 10 veces gracias a su unión, por puentes disulfuro, al dominio somatomedina B de la vitronectina (**Figura 16**). En su forma latente, SERPINA E1 carece de actividad pero puede ser reactivada parcialmente mediante agentes desnaturizantes. Además, SERPINA E1 presenta una tercera conformación, denominada de sustrato o escindida, que se genera cuando SERPINA E1 es cortada a nivel de enlace escindible, por determinadas proteasas sin llegar a formar un complejo con ellas. En esta conformación, SERPINA E1 se encuentra inactiva, es incapaz de interactuar con nuevas moléculas de tPA o uPa, y no es posible su conversión a la forma activa (inactivación irreversible). Fisiológicamente, SERPINA E1 en su conformación activa se encuentra circulante en plasma formando un complejo con la vitronectina. A nivel tisular, también otras moléculas como las integrinas o uPAR se unen a vitronectina, por lo que SERPINA E1 compete con todas ellas por la unión a vitronectina (129).



**Figura 16. Cambio conformacional espontáneo de SERPINA E1.** (A) Estructura de SERPINA E1 en su conformación activa recién secretada al espacio extracelular (el bucle del centro reactivo de muestra en morado, RCL). (B) Estructura de SERPINA E1 en su conformación latente que se forma espontáneamente a partir de la conformación activa tras 1-2 horas de ser secretada. (C) Estructura de SERPINA E1 unida al dominio somatomedina B (en verde) de la vitronectina. Esta unión estabiliza la conformación activa de SERPINA E1 aumentando su tiempo de vida media de 4 a 20 horas. Adaptada de (130).

En relación con la regulación de la expresión de SERPINA E1, numerosos factores de transcripción controlan la expresión de SERPINA E1 según el tipo celular, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. La expresión de SERPINA E1 está finamente regulada por citoquinas y factores de crecimiento como TGF- $\beta$ , interleuquina-1- $\beta$ , EGF, insulina, lipopolisacárido y lipoproteínas (131).

#### 4.2. Interacciones no canónicas de SERPINA E1

En los últimos años se le han otorgado a SERPINE1 otras funciones además de su función canónica como proteasa dentro del sistema fibrinolítico y esto es posible debido a su interacción con diferentes elementos de la matriz extracelular y de la superficie de las células. Entre estos elementos encontramos ligandos como glucosaminoglicanos (heparina), componentes de la matriz extracelular (vitronectina) y receptores scavenger (proteínas relacionadas con el receptor de lipoproteína, LRP). La unión de SERPINA E1 al dominio somatomedina B de la vitronectina retrasa la conversión de SERPINA E1 activa a su forma latente, por lo que aumenta su estabilidad. Además, la interacción con vitronectina provoca un pequeño cambio en la conformación del centro activo de SERPINE1 alterando su especificidad por el sustrato y capacitándola para inhibir otras serina proteasas como la trombina. Cuando SERPINA E1 forma el complejo con uPA, que a su vez se encuentra unida a uPAR anclado en la superficie de las células, SERPINE1 disminuye su afinidad por vitronectina y la aumenta por el receptor LRP. La unión de SERPINA E1 al receptor LRP induce la endocitosis mediada por clatrina del complejo formado por uPAR-uPA-SERPINA E1 y una vez en el interior de las células, uPA y SERPINA E1 son degradadas mientras que uPAR se recicla y se transporta de nuevo a la membrana. SERPINA E1 también presenta un sitio de unión a heparina muy próximo al lugar en el que se encuentra el de vitronectina. La unión de SERPINE1 a heparina aumenta la reactividad de SERPINA E1 sobre la trombina pero su estabilidad no varía (129).

### 4.3. Implicación de SERPINA E1 en cáncer

Varios estudios clínicos y epidemiológicos han demostrado que SERPINA E1 está implicada en diferentes procesos fisiopatológicos como fibrinolisis, trombosis, restenosis, aterosclerosis, obesidad, apoptosis, adhesión celular, migración celular, cicatrización, angiogénesis, inflamación, quimiotaxis, fibrosis y cáncer. El papel de SERPINE1 en dichos procesos no solo está mediado por su actividad proteasa sino por sus interacciones con otras moléculas como heparina, LRP1 o incluso elementos estructurales de la matriz extracelular, como vitronectina.

En relación con el cáncer, SERPINA E1 ha sido establecido como marcador de mal pronóstico en cáncer de mama, gástrico, ovárico, de vejiga, colorectal y oral (132), aunque no se conocen al completo todos los mecanismos mediante los cuales SERPINA E1 contribuye a la progresión tumoral. Múltiples estudios *in vitro* demuestran su implicación en procesos como adhesión celular, migración, invasión, inhibición de la apoptosis, proliferación y angiogénesis (133).

En el caso de CECC, múltiples estudios correlacionan un nivel elevado de expresión de SERPINA E1 en biopsias tumorales de pacientes con una evolución clínica desfavorable (134–141). La mayoría de los estudios concluyen que los pacientes con CECC cuyos tumores presentan elevados niveles de expresión de SERPINA E1 presentan una supervivencia más corta que los pacientes con tumores con menor expresión de SERPINA E1. Además, un estudio previo realizado en nuestro laboratorio con muestras de pacientes con CECC basado en microarrays, muestra que SERPINA E1 se sobre-expresa en el subtipo de tumores asociados a peor evolución clínica (mayor riesgo de recidivas y supervivencia más corta) (41).

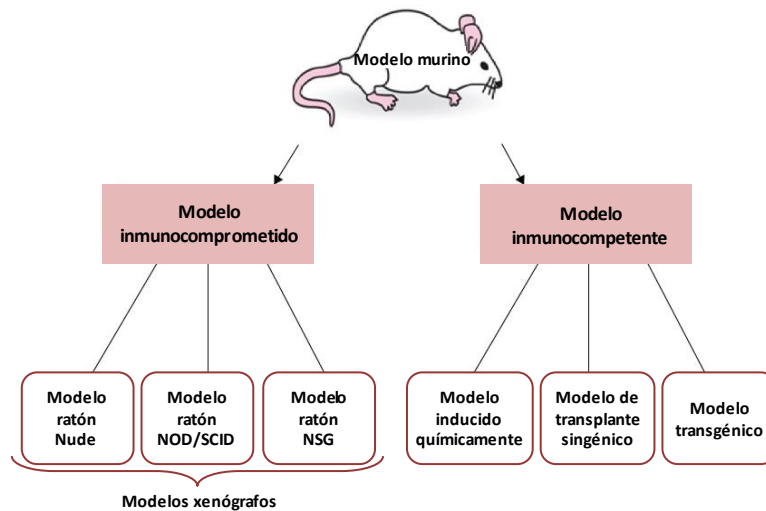
## 5. MODELOS MURINOS EN CÁNCER

El cáncer es una enfermedad compleja constituida por múltiples pasos, y en la que se encuentran implicados múltiples procesos biológicos. Algunos de estos procesos biológicos no pueden ser estudiados en modelos *in vitro* debido a que dependen de la interacción de las células tumorales con otros componentes del entorno, como la matriz extracelular, otras células no tumorales, células estromales y células del sistema inmune. El desarrollo y el uso de los modelos animales ha permitido estudiar el tipo de crecimiento del tumor primario, la invasión, la metástasis y la respuesta al tratamiento en diferentes tipos de cáncer (142).

El modelo animal que se utiliza con mayor frecuencia en cáncer es el ratón (*Mus musculus*). Su uso, desde hace más de un siglo, ha permitido descubrir nuevos aspectos sobre la biología y la genética del cáncer. Algunas de las ventajas que justifican la elección del ratón como modelo animal son su pequeño tamaño, lo que implica fácil estabulación, mantenimiento y manipulación, la similitud a nivel

fisiológico y molecular con la especie humana y el hecho de que su genoma este completamente secuenciado.

En general los modelos murinos que se emplean en cáncer, se clasifican en cuatro grandes grupos, modelos xenógrafos, modelos singénicos, modelos manipulados genéticamente (transgénicos) y modelos inducidos por carcinógenos (**Figura 17**). Cada modelo presenta sus ventajas y desventajas, por lo que en función del objetivo del estudio interesará utilizar un tipo de modelo u otro. A continuación se explica un poco más en detalle en qué consiste cada modelo y las ventajas y desventajas de cada uno.



**Figura 17. Modelos murinos de carcinoma escamoso de cabeza y cuello.** En función del origen de las células tumorales se utilizan cepas de ratón inmunocomprometidas, si se inyectan células de origen humano (modelo xenógrafo), o inmunocompetentes si se inyectan células de ratón o se induce la aparición de un carcinoma química o genéticamente. Adaptada de (143).

En los modelos singénicos se inyectan o implantan células tumorales de origen murino en ratones inmunocompetentes (implantación o trasplante homólogo). El sistema inmune de los ratones en este tipo de modelo se encuentra intacto, lo que es importante si se quiere estudiar la contribución del sistema inmune en alguna o diversas etapas del establecimiento y progresión tumoral. La principal limitación es que las células tumorales no son de origen humano y por tanto, las vías y mecanismos implicados en el desarrollo y progresión tumoral pueden ser diferentes a los implicados en el CECC humano.

En los modelos murinos transgénicos los ratones se modifican genéticamente lo que provoca una ganancia de función de genes tumorogénicos (onogenes) o una pérdida de función de genes supresores de tumores, de manera que desarrollan espontáneamente el cáncer de interés. En CECC se han descrito varios modelos basados en la sobre-expresión de K-ras G12D mediante el uso de promotores específicos de la mucosa oral (queratina 5 y queratina 14) (144,145), así como otro modelo basado en la activación constitutiva de Akt en la cavidad oral de los ratones junto con la infra-expresión de Trp53 que genera lesiones pre-neoplásicas en los ratones y acaban desarrollando un carcinoma



escamoso en la cavidad oral (146). Estos modelos recapitulan las principales características clínicas del CECC, y permiten estudiar la implicación de un gen concreto en alguna etapa del proceso carcinogénico, pero también presentan ciertas limitaciones. En primer lugar, los niveles de expresión del transgen, regulado normalmente por promotores heterólogos, no se asemejan a los niveles de expresión en condiciones fisiológicas. Además, el microambiente tumoral donde se desarrolla el CECC en el modelo es diferente al encontrado en pacientes, ya que las células estromales del ratón también pueden sobre- o infra-expresar el transgen. Y por último, la modificación de la expresión de uno o unos pocos genes, no permite recapitular el proceso carcinogénico ya que es un proceso complejo en el que se encuentran implicados muchos más genes, siendo inviable la modificación de múltiples genes en los ratones (147).

En los modelos murinos inducidos, los ratones son expuestos a determinados agentes carcinogénicos durante semanas o meses hasta que desarrollan el cáncer de interés. Como en los modelos singénicos, los ratones presentan un sistema inmune intacto, lo que permite estudiar su contribución en el proceso de carcinogénesis y además, se puede analizar el efecto de los diferentes agentes etiológicos que también se encuentran implicados en el desarrollo del cáncer en humanos. En los modelos inducidos de CECC los ratones se exponen, ya sea por contacto directo con diferentes zonas de la cabeza o el cuello, o por administración oral en el agua de bebida, a determinados productos carcinogénicos. Algunos de los inconvenientes de este tipo de modelo es que no permite el estudio de genes específicos en el proceso de carcinogénesis, que en ocasiones el tratamiento con el agente carcinogénico puede alargarse meses hasta que se desarrolla el CECC y que el proceso de transformación que sufren las células tumorales de ratón puede estar mediado por mecanismos o vías de señalización diferentes a los que tienen lugar en las células tumorales humanas. Además, la localización u origen celular del tumor no siempre es la esperada para un tumor de cabeza y cuello escamoso.

Los modelos murinos xenógrafos se explicarán con detalle en el siguiente apartado ya que se corresponde con el tipo de modelo que se ha utilizado durante la realización de esta tesis doctoral.

## 5.1. Modelos murinos xenógrafos de CECC

Consiste en la implantación de células tumorales de origen humano en ratones (implantación o trasplante heterólogo). Se emplean ratones inmunodeprimidos para evitar que el sistema inmune del ratón rechace la implantación y el crecimiento de las células tumorales humanas. El uso de este tipo de modelo presenta un serie de ventajas, se trabaja con células tumorales humanas, por lo que las posibles vías implicadas en la progresión tumoral son las mismas que en pacientes y las condiciones experimentales están más controladas por el experimentador, al decidir donde implantar y qué

número de células inyectar, lo que permite comparar grupos de ratones a los que sólo se ha modificado la variable objeto de estudio, como por ejemplo el tipo de tratamiento.

Las cepas de ratones que se utilizan con mayor frecuencia como modelo para estudiar el CECC son los ratones nude atímicos, que carecen de linfocitos T funcionales. También se utilizan los ratones SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*), que carecen de la actividad mediada por los linfocitos T y B, y sus cepas derivadas, NOD/SCID y NSG, con un mayor grado de inmunodeficiencia. El uso de cepas de ratón cada vez más inmunodeprimidas permite mejorar la tasa de injerto, potenciar el crecimiento del tumor primario y aumentar la diseminación y crecimiento en órganos a distancia, aunque, por otro lado, se alejan cada vez más de lo que ocurre en pacientes con CECC, que si presentan un sistema inmune funcional (148). Un subtipo de modelo xenógrafo que intenta solventar esta limitación son los modelos xenógrafos humanizados, a los que además de implantar células tumorales humanas, a los ratones se les inyecta células mononucleares humanas de sangre periférica y se les administra exógenamente hormonas humanas, factores de crecimiento y citoquinas con el objetivo de simular un sistema fisiológico humano (143). En cualquier caso, todos los modelos por definición presentan limitaciones, lo relevante es utilizar un modelo que replique en el ratón aquellos componentes más relevantes del proceso estudiado en la tumorigénesis humana.

Dependiendo de la localización anatómica donde se implantan las células, el modelo xenógrafo de CECC se considera ortotópico, si se implantan en una zona que coincide con la localización del tumor primario, en este caso la cabeza o el cuello, o ectópico, si se implantan en una localización diferente.

#### 5.1.1. Implantación ectópica

Entre los modelos ectópicos más utilizados encontramos el modelo subcutáneo, en el cual las células se inyectan a nivel subcutáneo, normalmente en la parte dorsal del ratón. Se utiliza con frecuencia para evaluar la eficacia de diferentes fármacos debido a su fácil establecimiento, reproducibilidad y medición. Pero ha sido criticado debido a que el microambiente que rodea a las células tumorales no refleja el entorno en el que se encontrarían en el organismo humano y, por tanto, la respuesta de las células a los tratamientos testados no es aplicable a lo que sucedería en pacientes. Otro inconveniente del modelo es que no permite el estudio de las metástasis regionales o a distancia ya que el tumor queda confinado en la zona subcutánea del tejido del ratón, apareciendo metástasis a distancia en menos del 2% de los casos (149). En CECC, el primer modelo murino xenógrafo se realizó con ratones nude a los que se les transplantó un total de 130 carcinomas provenientes de pacientes con CECC (150). Posteriormente, este modelo xenógrafo subcutáneo ha sido ampliamente utilizado en relación con el CECC para estudiar el efecto antitumoral de diferentes tipos de compuestos quimioterápicos (143).

Dentro de los modelos ectópicos también encontraríamos el modelo de metástasis experimental en el que las células tumorales se inyectan a través de la vena de la cola del ratón. Este modelo se suele

utilizar para estudiar el crecimiento de metástasis en pulmón ya que las células tumorales inyectadas quedan atrapadas en los capilares pulmonares, donde pueden crecer y generar focos metastáticos. Otra aproximación es la inyección intra-cadéica o intra-arterial de células tumorales para el estudio de su distribución a nivel sistémico, en la que se puede evaluar si presentan una distribución preferencial hacia órganos o tejidos concretos así como su capacidad para implantarse y proliferar en dichos órganos.

### 5.1.2. Implantación ortotópica

A diferencia del modelo anterior, en el modelo ortotópico de CECC las células tumorales se inyectan en una localización anatómica que coincide con la localización del tumor primario en pacientes con CECC. En el caso del modelo ortotópico de CECC, la inyección de las células tumorales se realiza en cualquier estructura o tejido que forma parte del tracto aerodigestivo superior (la cavidad oral, la faringe o la laringe). Las localizaciones más utilizadas son la lengua y el suelo de boca debido a su accesibilidad anatómica, aunque también se inyectan las células tumorales a nivel de mejilla, en el paladar, etc. En este tipo de modelos, el microambiente que rodea el tumor se asemeja más al entorno donde se desarrollaría el tumor en pacientes con CECC, en comparación con la implantación de tipo ectópica. La interacción con el microambiente se ha demostrado que influye en la sensibilidad de las células tumorales al tratamiento por quimio- y radio-terapia, y en su capacidad para diseminar localmente y a distancia, siendo el modelo de implantación ortotópica el más adecuado para predecir la respuesta de los pacientes al tratamiento y para recapitular la progresión tumoral que tiene lugar en pacientes con CECC (151). En CECC, el primer modelo ortópico fue desarrollado en 1990 por Dinesman y col., tras inocular células de carcinoma de laringe en el suelo de boca de ratones nude y permitió estudiar los mecanismos de invasión y metástasis de los tumores generados (152). Tras este primer modelo ortotópico de CECC, se han utilizado diferentes métodos para desarrollar modelos capaces de metastatizar, siendo la implantación en suelo de boca o en lengua de ratones nude el modelo más utilizado (143).

## II. OBJETIVOS

1. Establecimiento y validación de SERPINA E1 como marcador pronóstico en pacientes con carcinoma escamoso de cabeza y cuello
2. Papel de SERPINA E1 en la proliferación, la migración y la citotoxicidad producida por cisplatino en líneas celulares de carcinoma escamoso de cabeza y cuello manipuladas genéticamente.
3. Establecimiento de un modelo murino ortotópico y metastático de carcinoma escamoso de cabeza y cuello que represente dicha patología en humanos.
4. Estudio *in vivo* del crecimiento y la diseminación metastática de las células de CECC con diferente nivel de expresión de SERPINA E1.

### III. METODOLOGÍA

#### 1. EXPERIMENTOS *IN VITRO*

##### 1.1. Cultivo celular

###### 1.1.1. Líneas celulares de CECC

Todas las líneas celulares de CECC se cultivaron en su correspondiente medio específico suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS), 2mM de glutamina y 100u/ml de penicilina-estreptomicina (Life Technologies). Todas las células se cultivaron bajo condiciones estándar, a 37°C en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>.

**UM-SCC-22A:** línea celular humana establecida por *University of Michigan* y obtenida a partir de un tumor primario localizado en la hipofaringe. La línea celular **UM-SCC-22B** es una línea celular originada a partir de la metástasis en cuello de la línea UM-SCC-22A. Ambas se cultivaron en medio *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM, Life Technologies) con alto contenido en glucosa y suplementado.

**UM-SCC-74B:** originada a partir de un tumor en la laringe. Se cultivó en medio DMEM con alto contenido en glucosa y suplementado.

**293T:** deriva de la línea celular 293, una línea celular humana establecida a partir de células de riñón embrionarias. Las células 293T, a diferencia de las anteriores, expresan constitutivamente el antígeno T grande de *Simian Virus 40*. En esta tesis estas células se emplearon únicamente para la producción y titulación de partículas lentivirales. Se cultivaron en medio DMEM con alto contenido en glucosa y suplementado.

**SCC-9:** línea celular establecida a partir de un tumor primario localizado en la lengua. Se cultivó en medio DMEM:F12 (1:1) con 0.4µg/mL de hidrocortisona y suplementado.

**SCC-25:** línea celular establecida a partir de un carcinoma en la lengua. Se cultivó en medio DMEM:F12 (1:1) con 0.4µg/mL de hidrocortisona y suplementado.

Se comprobó la autenticidad de las líneas celulares mediante la comparación de los perfiles en tándem de cada línea con su respectivo perfil descrito en las bases de datos para cada línea. Para ello se utilizó el kit Cell ID (Promega Corporation) que permite la amplificación y detección simultánea de 9 Small Tandem Repeats (STR) (D21S11, TH01, TPOX, vWA, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317 y D5S818) y la Amelogenina para la determinación del sexo. Este kit utiliza como control positivo la línea K562, cuyo genotipo es conocido. De manera previa, se extrajo el DNA genómico de cada línea celular siguiendo las instrucciones del kit *Wizard Genomic DNA Purification kit* (Promega Corporation). Tras la detección de los fragmentos amplificados mediante 3130xl *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems)

según el protocolo del fabricante, se analizaron los resultados utilizando el programa *GeneMapper* v4.0 que genera un perfil de picos representativos de cada uno de los alelos amplificados. En la **tablas 4 y 5** se muestran los perfiles de expresión obtenidos para cada línea de CECC analizada y los originales de cada línea celular, respectivamente.

**Tabla 4. Resultados del análisis del perfil genético basado en 9 *Short Tandem Repeats* (STR) de líneas de CECC, empleando el kit Cell ID (Promega)**

STR	UM-SCC-22A	UM-SCC-22B	UM-SCC-74B	SCC-9	SCC-25	K562
Línea celular						
Amelogenina	X	X	X	X, Y	X	X
CSF1PO	10	10	9, 12	11	10	9, 10
D13S317	8, 12	8, 12	12	9	13	8
D16S539	9, 11	9, 11	10, 12	10, 11	11, 12	11, 12
D5S818	12	12	12	12	12	11, 12
D7S820	8,9	8, 9	11	8	12	9, 11
TH01	6	6	6, 9.3	8, 9	8	9.3
TPOX	8, 11	8, 11	8	9, 11	8, 12	8, 9
vWA	15, 18	15, 18	15, 16	17	17, 19	16
D21S11	28	28	30, 34.2	ND	ND	29, 30, 31

**Tabla 5. Perfiles genéticos de expresión basado en 9 *Short Tandem Repeats* (STR) de líneas de CECC**

STR	UM-SCC-22A <sup>1</sup>	UM-SCC-22B <sup>1</sup>	UM-SCC-74B <sup>3</sup>	SCC-9 <sup>2</sup>	SCC-25 <sup>2</sup>	K562
Línea celular						
Amelogenina	X	X	X	X, Y	X	X
CSF1PO	10, 10	10	ND	11	10	9, 10
D13S317	8, 12	8, 12	12	9	13	8
D16S539	9, 11	9, 11	ND	10, 11	11, 12	11, 12
D5S818	12, 12	12	12	12	12	11, 12
D7S820	8, 9	8, 9	11	8	12	9, 11
TH01	6, 6	6	ND	8, 9	8	9.3
TPOX	8, 11	8, 11	ND	9, 11	8, 12	8, 9
vWA	15, 18	15, 18	15, 16	17	17, 19	16
D21S11	28	28	30, 34.2	ND	ND	29, 30, 31

<sup>1</sup>Brenner y col. (153), <sup>2</sup>ATCC y <sup>3</sup>Zhao y col. (154)

### 1.1.2. Subcultivo, congelación y descongelación de líneas celulares

Para la ampliación y mantenimiento de las células, estas se sembraron en *flascos* de 75cm<sup>2</sup> de superficie en un volumen de 10mL de medio de cultivo. Cuando las células llegaron a una ocupación de 2/3 de la superficie del *flascón*, se pasaron a un nuevo *flascón*, evitando así que las células llegaran a la confluencia. Sólo se sembraron las células en *flascos* de mayor superficie (150cm<sup>2</sup>) cuando se necesitó un gran número de células, como fue el caso de los experimentos *in vivo*. En la **tabla 6** se

muestra el número de células obtenidas tras el cultivo en flascos de 150cm<sup>2</sup> de superficie. Al tratarse de células en adhesión, para pasar las células a un nuevo *flascón*, se retiró el medio por decantación, se realizó un lavado con PBS atemperado y después se añadieron 3mL de tripsina (0.05% *Trypsin-EDTA*, Life Technologies). Tras una incubación de 2-6 minutos a 37°C en tripsina, las células se desprendieron y se resuspendieron en su medio general para bloquear la acción de la tripsina. Las células resuspendidas en su medio general se centrifugaron durante 5 minutos a 300g y el pellet obtenido se repartió en tantos *flascos* como se quisieron obtener, asegurándonos de que las células quedaban bien repartidas en el nuevo volumen de medio.

**Tabla 6. Crecimiento de las líneas celulares de CECC en cultivo**

LÍNEA CELULAR	Nº CÉLULAS (Flascón 150cm <sup>2</sup> )	CRECIMIENTO
UM-SCC-74B	1.8x10 <sup>7</sup>	Exponencial
74BserpE1up	9.5x10 <sup>6</sup>	Exponencial
UM-SCC-22A	7.3x10 <sup>6</sup>	Exponencial
UM-SCC-22B	2.4x10 <sup>6</sup>	Exponencial
SCC-9	1x10 <sup>6</sup>	Exponencial
SCC-25	6.8x10 <sup>6</sup>	Exponencial

Para su conservación, las células se congelaron en una solución de 10% DMSO (Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich) en FBS. Las líneas o pases de líneas de uso más frecuente se almacenaron en un congelador a -80°C, mientras que los stocks y líneas de uso menos frecuente se almacenaron en un tanque de nitrógeno. El procedimiento para congelar las células fue el mismo que para su mantenimiento, excepto que en el último punto, que el pellet celular se resuspendió en una solución al 10% DMSO en FBS en un criotubo. Cada uno de los criotubos se introdujo en un recipiente con isopropanol, *frosty* (Nalgene, Waltham, USA). El *frosty* con las células se introdujo en el congelador de -80°C durante 24h, lo que permitió una congelación progresiva de las células evitando la formación de cristales. Pasadas las 24h, se extrajeron los criotubos del *frosty* y se guardaron en cajas en el congelador de -80°C o en el tanque de nitrógeno.

Para la obtención de las células congeladas, se sacaron los criotubos de -80°C y se descongelaron colocándolos en el baño a 37°C durante unos minutos. Una vez en estado líquido, se diluyó la suspensión celular en su medio general, se homogenizó evitando la formación de acúmulos celulares, y se centrifugó durante 5 minutos a 300g. El pellet obtenido se resuspendió en el medio general específico de las células pero con un 10% de FBS adicional, y las células se sembraron en un *flascón* de 75cm<sup>2</sup> de superficie.

### 1.1.3. Detección de Mycoplasma

La presencia de *Mycoplasma* sp. en el cultivo celular es una de las contaminaciones bacterianas más frecuentes y puede provocar alteraciones muy variadas a nivel funcional y morfológico sobre las líneas que infecta. No obstante, todas las líneas empleadas en esta tesis estaban libres de *Mycoplasma* en el momento que se comenzaron a usar y cada cierto tiempo, se realizaron test, como control, para detectar la presencia de *Mycoplasma* en los cultivos. Adicionalmente, también se les realizó el test a las células antes de ser congeladas o antes de un experimento *in vivo*. Para ello se utilizó el kit *LookOut Mycoplasma PCR Detection Kit* (Sigma-Aldrich), y consistió en una PCR que amplificaba específicamente la región codificante del RNA ribosómico 16S altamente conservada del género *Mycoplasma* sp. El test se realizó a partir de un pequeño volumen de sobrenadante de un cultivo con elevado crecimiento (90-100% de confluencia).

### 1.1.4. Contaje y determinación de la viabilidad celular

Para el contaje de las células se empleó el contador automático *Countess*<sup>®</sup> (Life Technologies). Este instrumento permite cuantificar el número de células, así como distinguir entre células viables y no viables, gracias a las propiedades ópticas diferenciales que presentan ambos tipos de células. El contaje de una suspensión celular concreta empleando el *Countess*<sup>®</sup> se realizó diluyendo una pequeña parte de la suspensión celular en PBS en un rango de  $1 \times 10^4$ - $1 \times 10^7$  cel/mL. Esta suspensión diluida se mezcló en una proporción (1:1) con *trypan blue* al 0.4% (Life Technologies) y se introdujeron 10 $\mu$ L de esta mezcla en cada uno de los reservorios (A y B) de una lámina de contaje. La lectura de los dos reservorios se realizó a través del *Countess*<sup>®</sup>, que automáticamente determinó la concentración celular total de la suspensión, así como la de células viables y el porcentaje de viabilidad. La determinación de la concentración de la suspensión celular de interés se calculó multiplicando la concentración celular por la inversa de la dilución aplicada.

Otro procedimiento que se utilizó para el contaje de las células y la determinación de la viabilidad celular, fue mediante el uso de la cámara de *Neubauer*. Esta técnica se utilizó cuando las suspensiones celulares contenían muchos restos celulares que podían interferir en la capacidad automática del *Countess*<sup>®</sup> para distinguir entre células viables, células muertas o restos celulares/precipitados. Para el contaje a través de cámara de *Neubauer*, se prepararon varias soluciones a diferentes concentraciones a partir de la suspensión de partida (concentración óptima  $1 \times 10^6$  cel/mL), se mezclaron a una proporción 1:1 con *trypan blue* al 0.4% y se introdujeron 10 $\mu$ L de la suspensión en cada uno de los compartimentos de la cámara de *Neubauer*. Se contabilizaron 5 cuadrados grandes (superficie 1mm<sup>2</sup>) por compartimento de la cámara y dos cámaras por suspensión celular, descartando las células que cayeron sobre las líneas superior e izquierda. Para la obtención de la concentración celular final, se aplicó la siguiente fórmula: **Células/ $\mu$ L** = (células contadas x factor dilución) / (superficie



contada ( $\text{mm}^2$ ) x profundidad cámara (mm)), siendo la superficie de la cámara de  $1\text{mm}^2$  y la profundidad de 0.1mm.

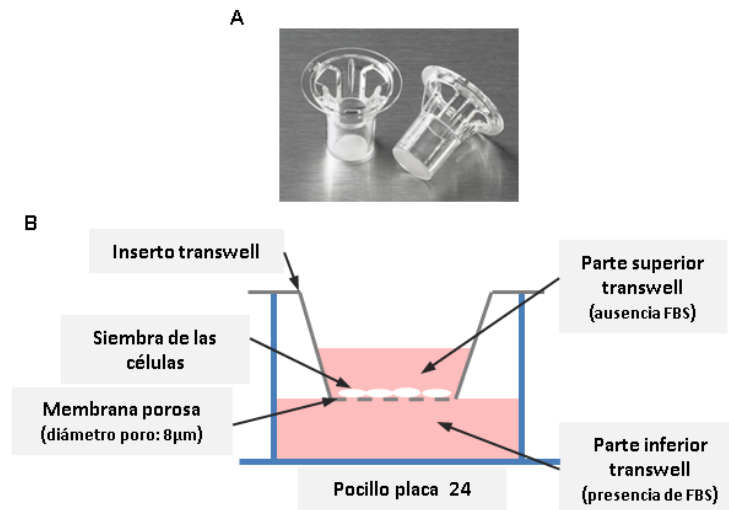
#### 1.1.5. Ensayos de proliferación

La proliferación celular se determinó contando el número de células presente en cada pocillo a diferentes tiempos, desde las 16 horas del momento de la siembra, cada 24 horas, hasta las 96 horas (24h, 48h, 72h y 96h). Para ello, se sembraron las células (UM-SCC-74B y 74BserpE1up:  $3.5 \times 10^4$  células y SCC-9 scramble, SCC9 shRNA004 y SCC9 shRNA159:  $7 \times 10^4$  células) en placas de 6 pocillos, realizando 2 réplicas por punto de contaje. Para el contaje de las células, cada réplica se tripsinizó, bloqueó y resuspendió de manera independiente en PBS. La suspensión final obtenida se mezcló en proporción 1:1 con 0.4% *trypan blue* y se contabilizó a través del *Countess*<sup>®</sup>. Sólo se tuvo en cuenta la densidad celular de células viables, no la total. Además, cada réplica se contabilizó dos veces y se calculó la media de los valores obtenidos. Se obtuvieron valores a 24h, 48h, 72h y 96h.

#### 1.1.6. Ensayo de migración

Se realizaron ensayos de migración con las líneas celulares con diferente nivel de expresión de SERPINA E1, UM-SCC-74B, 74BserpE1up, SCC9 scramble y SCC9 shRNA004. Adicionalmente, con la línea 74BserpE1up se hizo un ensayo de migración en el que las células habían sido previamente tratadas durante 48 horas con MK-2206 (20nM y 100nM) (Selleckchem).

La capacidad de las células para moverse activamente se testó mediante el uso de *Transwells*<sup>®</sup> (poros de  $8\mu\text{m}$  de diámetro, Corning) (**Figura 18A**), unos soportes con una membrana porosa en su base. Los *transwells* se colocaron sobre pocillos de placas de 24 pocillos que contenían en su interior medio de cultivo con 10% FBS (molécula atrayente). En la parte superior del transwell se sembraron  $2 \times 10^4$ - $4 \times 10^4$  células en medio sin FBS, cultivadas previamente 24 horas en ausencia de FBS, y se incubaron 24 horas siguiendo las condiciones estándar de cultivo (**Figura 18B**). Pasadas las 24 horas, se retiró el medio y las células de la parte superior del *transwell* con ayuda de hisopos de algodón. La parte inferior del transwell, donde se encontraban las células que habían migrado, se fijó durante 15 minutos en una solución al 100% de metanol y después se tiñó con una solución al 1% cristal violeta (Probus) en 10% de etanol (Sigma-Aldrich) durante 15 minutos. Se realizaron varios lavados con agua destilada hasta eliminar el exceso de colorante y se dejó secar a temperatura ambiente. El número de células que había atravesado la membrana porosa se contabilizó a partir de 5 imágenes tomadas a un aumento de 100x por cada transwell, haciendo uso del programa del microscopio óptico, *CellSens dimension v1.9\_software* (Olympus Corporation). La capacidad de migración de las células se determinó a partir de la fracción de área media ocupada por las células adheridas en la parte externa de la membrana del *transwell*. En cada ensayo de migración se realizaron 3 réplicas por condición y el ensayo se repitió como mínimo dos veces.



**Figura 18. Ensayo de migración mediante *transwell*® (Corning).** (A) Imagen de un transwell real. (B) Esquema representativo de un ensayo de migración realizado en un pocillo de una placa de 24 mediante *transwell*.

### 1.1.7. Ensayo de apoptosis

Uno de los eventos tempranos que tiene lugar durante la muerte celular programada o apoptosis es la condensación de la cromatina nuclear en estructuras denominadas cuerpos apoptóticos. Cuando las células se tiñen con un colorante que tiene afinidad por el DNA, como el marcador fluorescente DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol), se pueden distinguir estos cuerpos apoptóticos en aquellas células que han iniciado la apoptosis. La inducción de la apoptosis en las líneas celulares se llevó a cabo tratando las células con cisplatino, *cis-diamminedichloroplatinum (II)* (CDDP), uno de los fármacos que se utiliza en clínica para tratar a los pacientes con CECC. La concentración utilizada de este fármaco para tratar las células correspondió con el IC50, determinado con anterioridad en nuestro laboratorio (155) para cada línea celular (**Tabla 7**). Se contabilizó el número de células apoptóticas en las líneas UM-SCC-74B, 74BserpE1up, SCC9 scramble y SCC9 shRNA004. Las líneas celulares obtenidas a partir de transducción lentiviral se trataron con la misma concentración de CDDP con la que se trataron sus respectivas líneas parentales. Se utilizó como diluyente el suero fisiológico para preparar las diferentes concentraciones de CDDP a partir del stock original (5000µM, Pfizer). Adicionalmente, las líneas UM-SCC-74B y 74BserpE1up fueron pre-tratadas con 100nM de MK-2206 durante 48 horas y luego se realizó el ensayo de apoptosis con cisplatino, como se explica a continuación.

Se sembraron  $6 \times 10^5$  células en placas de 60mm de diámetro que contenían en su interior un portaobjetos estéril. Tras 48 horas de incubación en condiciones estándar, se cambió el medio de las células por medio que contenía disuelto el CDDP a la concentración del IC50 de la línea celular de trabajo. Se incubaron en presencia de CDDP durante 16h, tras esto, se extrajo el portaobjetos de la placa, se lavó con PBS y se fijaron las células adheridas en su superficie, introduciendo el portaobjetos, 1 min en una solución con 100% de metanol. Se lavaron con PBS y se cubrieron con el reactivo *ProLong®Gold Antifade DAPI* (Life Technologies), protegiéndolas de la luz. El número de células

apoptóticas y no apoptóticas se contabilizó a través del microscopio de fluorescencia Olympus BX53 y la lámpara de fluorescencia U-HGLGPS. Se estableció el porcentaje medio de células apoptóticas a partir de 6 imágenes por cada muestra a 200 aumentos tomadas con la cámara Olympus DP73 acoplada al microscopio.

**Tabla 7. Concentraciones de cisplatino correspondientes al IC50 de cada línea**

Línea celular	IC50 ( $\mu\text{M}$ )
UM-SCC-74B	15,4
SCC-9	40,9

## 1.2. Análisis de los niveles de expresión proteica

Determinamos el nivel de expresión de las proteínas SERPINA E1, PI3K y p-Akt en extractos totales de proteínas de las líneas celulares UM-SCC-74B, 74BserpE1up, SCC9 scramble y SCC9 shRNA004 cultivadas en condiciones estándar o pre-tratadas durante 48 horas antes de la extracción con diferentes concentraciones de MK-2206 (20nM, 100nM y 200nM). También se obtuvo el extracto proteico de la línea 74BserpE1up pre-tratada durante 48 horas con 50nM de PAI-039 (Axon Medchem) para analizar el nivel de expresión de la proteína SERPINA E1 y p-Akt.

### 1.2.1. Extracción de proteínas

La extracción de proteínas se realizó a partir de células en cultivo en *flascones* de 75cm<sup>2</sup>. En función del objetivo del estudio, se recogieron las células del sobrenadante y/o las células adheridas. Para la obtención del extracto proteico de las células adheridas, se eliminó el medio de cultivo y se realizó un lavado con PBS intentando reducir al máximo el volumen de PBS retenido por las células. A partir de aquí, se intentó maximizar el tiempo que las células se encontraban sobre hielo para evitar la degradación de las proteínas. Una vez retirado todo el volumen de medio, se añadió un volumen concreto de tampón de extracción (100-200 $\mu\text{L}$  dependiendo del crecimiento de la línea celular) compuesto por 1M Tris/acetato, 1M Sucrosa, 100mM EDTA, 100mM EGTA, 10% Tritón X-100, 100mM Naortovanadato, 1M  $\beta$ -glicerofosfato, 0.5M Fluoruro de sodio, 100mM pirofosfato de sodio, 100mM benzamidina, 1.74mg/mL PMSF, 2mg/mL leupeptina,  $\beta$ -mercaptoetanol y agua destilada. Para separar las células de la superficie del *flascón* se empleó un *scraper* y se recogió todo el volumen, arrastrando el mayor número de células posible, en un tubo de 1.5mL. Esta suspensión se sonicó (Bandelin Sonoplus GM70) dos veces en ciclos de 10 pulsos para romper al máximo las estructuras celulares y se incubó 20 minutos en hielo. Terminada la incubación, los extractos se centrifugaron a 4°C durante 10 minutos a 14.000rpm y el pellet con la fracción proteica se pasó a un nuevo tubo. Estos extractos se guardaron a -20°C, si se utilizaron durante los días siguientes a la extracción, o a -80°C si no se utilizaron hasta pasada más de una semana.

### 1.2.2. Cuantificación de extractos proteicos

Para la determinación de diferencias en los niveles de expresión de una proteína concreta entre diferentes líneas celulares, condiciones o tratamientos, es necesario partir de la misma cantidad de extracto proteico total. Por este motivo, tras la obtención de los extractos proteicos, estos se cuantificaron.

El método que empleamos para ello fue el ensayo colorimétrico de *Bradford*, basado en la afinidad del marcador *Coomassie Brilliant Blue G-250* por las proteínas, que presenta una absorbancia máxima a 595nm cuando se encuentra asociado a proteínas. Para la realización del ensayo se emplearon los reactivos del kit *Bradford Protein Assay* (Biorad). El ensayo consistió en un método de cuantificación relativa donde se utilizó como referencia la absorbancia correspondiente a diferentes soluciones de concentración conocida de una proteína estándar (0, 5, 10, 15, 20, 25 µg/ml), en concreto la albúmina de suero bovino (BSA, Sigma-Aldrich). Se realizó una recta de regresión lineal relacionando la absorbancia a 595nm con la concentración de las soluciones de BSA. Tanto las soluciones de BSA estándar como las muestras problema se prepararon y midieron bajo las mismas condiciones y al mismo tiempo, cada solución y muestra por triplicado. Si alguna de las muestras presentaba una intensidad de color aparentemente superior a la solución más concentrada de proteína estándar, se diluyó en agua destilada hasta que se encontrara dentro del rango de niveles de intensidad de las soluciones estándar. A partir de la recta obtenida, interpolando los valores de absorbancia a 595nm de las muestras problema, se determinó la concentración total de proteínas en cada una de las muestras, aplicando los factores de dilución pertinentes en cada caso.

### 1.2.3. Western blot

Esta técnica permite, partiendo de la misma cantidad de proteínas totales por muestra, comparar los niveles de expresión de una o varias proteínas entre diferentes muestras o extractos proteicos. Tras la extracción y cuantificación de proteínas totales en las muestras, estas se separaron en función de su masa molecular mediante una electroforesis en condiciones desnaturizantes y las proteínas de interés se detectaron empleando anticuerpos específicos.

#### 1.2.3.1. Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis es la técnica mediante la cual las moléculas con carga en una disolución se separan cuando son sometidas a un campo eléctrico. En concreto, una electroforesis SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), se aplica para la separación de proteínas que previamente se han sometido a un agente desnaturizante, como lo es el SDS, y que, por tanto, sólo mantienen su estructura primaria formada por la secuencia de aminoácidos. Además, todas las proteínas presentan la misma carga al estar recubiertas por SDS (carga negativa) y como consecuencia, su movilidad electroforética sólo dependerá de su masa molecular. En nuestro caso, utilizamos el

sistema SE600 (Hoefer), un sistema vertical para geles grandes, y el sistema *Miniprotein* (BioRad), para geles pequeños.

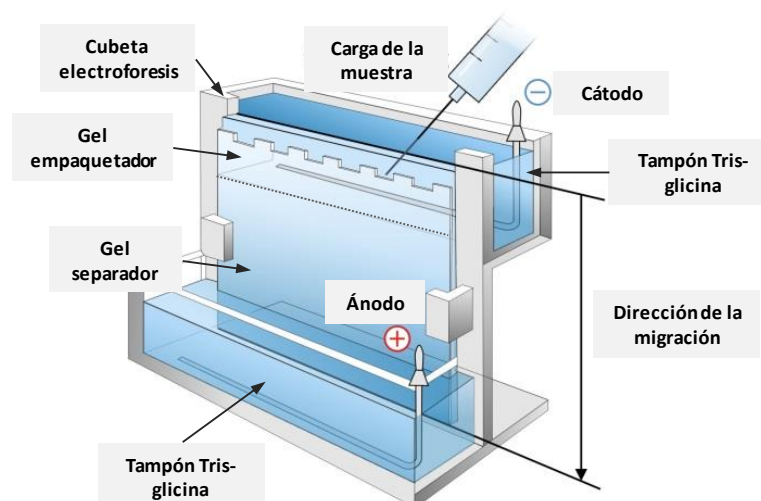
En ambos casos, la electroforesis fue de tipo discontinua, es decir, el gel estaba formado por dos tramos con una composición ligeramente diferente. El primer tramo, donde se cargó la muestra, estaba compuesto por el gel empaquetador que presentaba una concentración de 4% acrilamida y un pH de 6.8, y cuya función fue concentrar la muestra en una banda estrecha para aumentar la resolución. El segundo tramo, donde la muestra se separó, estaba formado por el gel separador, cuyo pH era de 8.8 y su concentración de acrilamida varió en función del tamaño de las proteínas que se quisieron separar, desde 12-15%. La composición final de cada uno de los dos geles, sin incluir la acrilamida, fue la que sigue:

**Gel empaquetador:** 125mM Tris pH6.8, 0.03% bis-acrilamida, 0.1% SDS, 0.2% APS, 0.1% TEMED y agua destilada.

**Gel separador:** 0.09% bis-acrilamida, 375mM Tris pH 8.8, 0.1% SDS, 0.1% APS, 0.07% TEMED y agua destilada.

Tras la polimerización de los dos tramos del gel entre dos cristales que dejaban una separación de 1.5mm, se prepararon las muestras. En un gel pequeño se cargaron 35-50µg de proteína mientras que en un gel grande 100µg de proteína por pocillo, a este volumen concreto de solución proteica se le añadió tampón de carga 6x (0.21M Tris-HCl pH 6.8, 8.4% SDS, 6.3% glicerol, 0.3% azul de bromofenol y 2M DTT). Tras esto, se incubaron durante 5 minutos a 100°C y después 5 minutos en hielo, para favorecer la desnaturalización y reducción de las proteínas.

El gel se introdujo en la cubeta de electroforesis y se cubrió de tampón Tris-glicina (25mM Tris pH 8.3, 250mM glicina, 0.1% SDS) (**Figura 19**). Las muestras se cargaron junto con un marcador de peso molecular. La electroforesis se programó a amperaje constante 50mA para 1 gel pequeño o a voltaje constante 150V para un gel grande, permitiendo que el frente del marcador llegara hasta el final del gel (aprox. 1 hora en gel pequeño y 4 horas en gel grande).

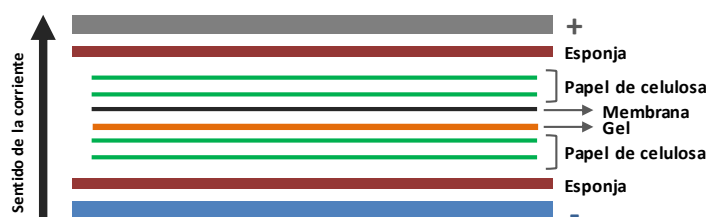


**Figura 19.** Esquema de los principales elementos necesarios para realizar una electroforesis de proteínas. Adaptada de (156).

### 1.2.3.2. Transferencia de proteínas

Para favorecer la interacción de las proteínas con los anticuerpos que nos permitieron su posterior detección específica, estas se transfirieron a una membrana, en este caso, de nitrocelulosa (Protran, Whatman). Para ello, de nuevo empleamos la capacidad de las proteínas, todas cargadas negativamente, de moverse hacia el polo positivo (ánodo), donde colocamos la membrana, cuando las sometimos a un campo eléctrico, proceso denominado electrotransferencia (**Figura 20**).

Para realizar la transferencia, se colocaron dos hojas de papel de celulosa (3MM Chr, Whatman), el gel, la membrana y otras dos hojas de papel de celulosa en el interior de un soporte que mantuvo unida esta estructura y todo empapado en tampón de transferencia (0.3% glicina, 0.04% SDS, Tris base y 20% metanol). La transferencia se programó a amperaje fijo de 200mA (un gel) o 300mA (dos geles) durante 4 horas o toda la noche (gel grande).



**Figura 20.** Esquema representativo de la disposición de los diferentes elementos necesarios para la transferencia de las proteínas desde el gel a la membrana. Las proteínas se encuentran cargadas negativamente y migran hacia el polo con carga positiva (+), donde se encuentra la membrana.

### 1.2.3.3. Inmunodetección de proteínas

Una vez transferidas las proteínas a la membrana y para comprobar que la transferencia se había producido correctamente, se incubó la membrana con 0.2% de colorante *Ponceau S* (Sigma-Aldrich) en 3% ácido acético, durante 5 minutos en agitación. Tras la eliminación del exceso de colorante con agua destilada, se pudo observar el bandeo generado por el extracto proteico de las distintas muestras.

Para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos a la membrana en las zonas donde no había proteína, se bloqueó la misma con una solución de leche desnatada al 5% disuelta en TBS (132mM NaCl, 20mM Tris pH 7.5, 0.1% Tween 20) durante 2 horas en agitación. A continuación se hicieron 3 lavados seguidos en TBS de 15, 5 y 5 minutos, y se incubó la membrana en una solución de 0.1% BSA en TBS que contenía el anticuerpo primario específico (**Tabla 8**). Las incubaciones con los anticuerpos primarios se realizaron durante toda la noche en agitación a 4°C, excepto el GAPDH que se incubó durante 1-2 horas a temperatura ambiente en agitación. Pasado el tiempo de incubación establecido, se hicieron 3 lavados en TBS y se incubó la membrana con el anticuerpo secundario correspondiente

(anti-rabbit o anti-mouse, Jackson Inmunoresearch) según la especie donde se había generado el anticuerpo primario, diluido 1/10000 en una solución de TBS al 0.1%BSA, durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Al terminar, se hicieron 3 lavados en TBS y se reveló la membrana, incubándola 5 min con la solución *SuperSignal West Pico* (Thermo Scientific). Esta solución aporta el sustrato para el enzima peroxidasa conjugado al anticuerpo secundario, que produce un compuesto quimioluminiscente. La señal luminiscente se detectó a través de un fotodocumentador y se analizó mediante el software específico del aparato (G-BOX Syngene, Imagen Technologies).

**Tabla 8. Anticuerpos primarios empleados para la detección de proteínas por western blot**

Anticuerpo primario	Peso molecular	Dilución	Anticuerpo secundario	Casa comercial
<b>GAPDH, clone 6C5</b>	38 KDa	1/10.000	Rabbit	Millipore
<b>SERPINE1, clone 1D5</b>	45 KDa	1/1.000	Mouse	Abnova
<b>Phospo-Akt (Thr308)</b>	60 KDa	1/1.000	Rabbit	Cell Signaling
<b>PI3 Kinase</b>	85 KDa	1/2.500	Mouse	BD

### 1.3. Análisis de los niveles de RNA mensajero de SERPINA E1

Este tipo de análisis se llevó a cabo para determinar los niveles de RNA mensajero de SERPINA E1 y el gen endógeno (HPRT1) en las líneas de CECC objeto de estudio, así como en las muestras de pacientes con CECC provenientes de biopsias de tejido fresco. Se maximizaron las medidas de limpieza (zona limpia de DNAsas y RNAsas uso de puntas con filtro y material/reactivos libres de nucleasas) para evitar la degradación del RNA.

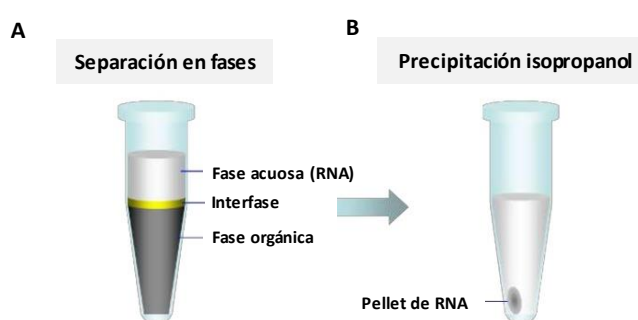
#### 1.3.1. Extracción de RNA

Para la obtención de RNA total a partir de un cultivo celular, se eliminó el medio de cultivo del *flascón* de 75cm<sup>2</sup> y se hizo un lavado con PBS. Se añadieron 3ml de Trizol® (Life Technologies) cubriendo toda la superficie y se dejó en incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, con ayuda de un *scraper*, se recogió toda la suspensión y se repartió en 3 tubos, 1mL por tubo.

Para la extracción de RNA de tejido, tras obtener 15-20mg de tejido tumoral, se disgregó mecánicamente, se resuspendió en trizol (explicado más adelante en el apartado 3.2.1) y se siguió el mismo procedimiento que cuando se partía de células en cultivo, explicado a continuación.

A cada tubo, con 1mL de trizol, se le añadió 200µl de cloroformo, se mezcló por inversión durante 15 segundos y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Para generar las fases que nos permitieron separar el RNA del DNA y restos celulares o proteínas, la muestra se centrifugó durante 30 minutos a 12.000g, 4°C. Se recogió la fase acuosa que contenía el RNA (parte superior), unos 400µL, y se pasó a un nuevo tubo (**Figura 21A**). A este nuevo tubo, se le añadió el mismo volumen de

isopropanol, se mezcló por inversión durante 15 segundos y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente para favorecer la precipitación del RNA. Tras esto, el tubo se centrifugó a 4°C durante 10 minutos a 12.000g (**Figura 21B**). Se eliminó el sobrenadante por decantación y el *pellet* se lavó con 700µL de una solución de 75% etanol. El tubo se agitó manualmente hasta desprender el pellet y se centrifugó durante 10 minutos a 7500g, 4°C. En este punto el sobrenadante se eliminó mediante una pipeta automática y el pellet se dejó secar en un termobloque a 40°C. Una vez seco el pellet de RNA, se añadieron, dependiendo del tamaño del pellet observado, de 10-40µL de agua y se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos para favorecer la disolución progresiva del RNA. Una vez resuspendido empleando una pipeta automática, se congeló introduciéndolo en el congelador de -80°C.



**Figura 21.** Dos de los pasos de la extracción de RNA mediante el uso de Trizol® (Life Technologies). **(A)** La separación en diferentes fases tras centrifugar la muestra resuspendida en trizol permite separar el RNA en la fase acuosa. **(B)** La precipitación mediada por isopropanol y posterior centrifugación concentra el RNA de la muestra en un pellet.

### 1.3.2. Reacción de retrotranscripción (RT-PCR)

Utilizando como molde el RNA extraído de la muestra, se realizó una reacción de retrotranscripción obteniendo su cDNA correspondiente. Con el objetivo de poder comparar entre diferentes muestras, se cargó por reacción la misma cantidad de RNA, 1.5µg. La cuantificación del RNA de cada muestra se determinó midiendo la absorbancia a 260nm en un espectrofotómetro *Nanodrop*® (Thermo Scientific).

Para la reacción de retrotranscripción, se calculó el volumen de *master mix* en función del número de muestras y los controles (**Tabla 9**). Se empleó *High Capacity cDNA Reverse Transcription kit* (Applied Biosystems). El volumen final de la reacción para cada muestra fue de 50µL, a cada muestra se le añadió 15.5µL de *master mix*, el volumen de RNA correspondiente a 1.5µg y el volumen restante, hasta completar los 50µL, de agua libre de RNAsas.

**Tabla 9.** Reacción de retrotranscripción para una muestra empleando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher)

Reactivos	Volumen por muestra (µL)
10x RT Buffer	5
25x dNTP mix (100mM)	2
10x Random primers	5
MultiScribe Reverse Transcriptase (100U/µL)	2.5



RNase inhibitor (40u/μL)

1

Todas las muestras se introdujeron en un termociclador (*Thermal cycler 2720*, Applied Biosystems) y se programó 10 minutos a 26°C, 2 horas a 37°C y 3 minutos a 90°C. Una vez terminada la reacción, se les dio un spin a los tubos y se guardaron a -20°C.

### 1.3.3. PCR cuantitativa

Técnica de cuantificación relativa que nos permitió determinar los niveles de cDNA de SERPINA E1 en las muestras analizadas, en relación con una muestra calibradora de referencia. La muestra calibradora consistió en la línea UM-SCC-22A en el caso de las líneas celulares o las muestras de tejido tumoral de pacientes, o las líneas parentales (UM-SCC-74B y SCC9 scramble) cuando se analizó el nivel de SERPINA E1 de sus respectivas líneas transducidas (74BserpE1up, SCC9 shRNA004 y SCC9 shRNA159). Empleamos para ello el ensayo basado en las sondas *TaqMan*<sup>®</sup> (Applied Biosystems) y utilizamos como gen endógeno, el gen HPRT1 (*Hypoxanthine PhosphoRibosylTransferase 1*). Para la normalización de los resultados aplicamos el algoritmo  $\Delta\Delta Ct$ ,  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  (muestra problema) -  $\Delta Ct$  (muestra calibradora), donde  $\Delta Ct$  representó  $\Delta Ct = Ct$  (gen diana) -  $Ct$  (gen endógeno).

Para llevar a cabo la reacción de PCR cuantitativa, se empleó el reactivo *TaqMan Universal PCR MasterMix* y el termociclador ABI 7900 HT (Applied Biosystems), en formato de placa de 384 pocillos. Por muestra, se realizaron 3 réplicas, y se añadieron 10μL de *TaqMan MasterMix*, 1μL de *Gene Expression Assay Mix* (Applied Biosystems), 7μL de agua libre de nucleasas y 2μL de muestra de cDNA (volumen final 20μL). El *Gene Expression Assay Mix* se trata de un reactivo que contiene los *primers forward* y los *primers reverse* específicos del gen que se quiere estudiar junto con una sonda marcada (**Tabla 10**). Una vez cargadas cada una de las muestras por triplicado con el *Gene Expression Assay Mix* del gen diana y por triplicado con el *Gene Expression Assay Mix* del gen endógeno, se cargó la placa en el instrumento y se programó 2 minutos a 50°C seguidos por 10 minutos a 95°C y 40 ciclos compuestos por 15 segundos a 95°C seguidos por 1 minuto a 60°C. El *software* empleado para nombrar la placa y programar la reacción fue el SDSv2.4 y el empleado para exportar los datos fue el RQ Manager 1.2.1 (Applied Biosystems). Los datos exportados se correspondieron con los valores Ct para cada gen en cada muestra y se analizaron aplicando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  explicado anteriormente.

**Tabla 10. Sondas específicas marcadas con fluorescencia empleadas en la reacción de PCR cuantitativa**

NOMBRE DEL GEN	TIPO DE GEN	CÓDIGO
HPRT1 ( <i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i> )	Endógeno	Hs99999909_m1
SERPINE E1 ( <i>serine protease inhibitor E1</i> )	Problema	Hs01126604_m1

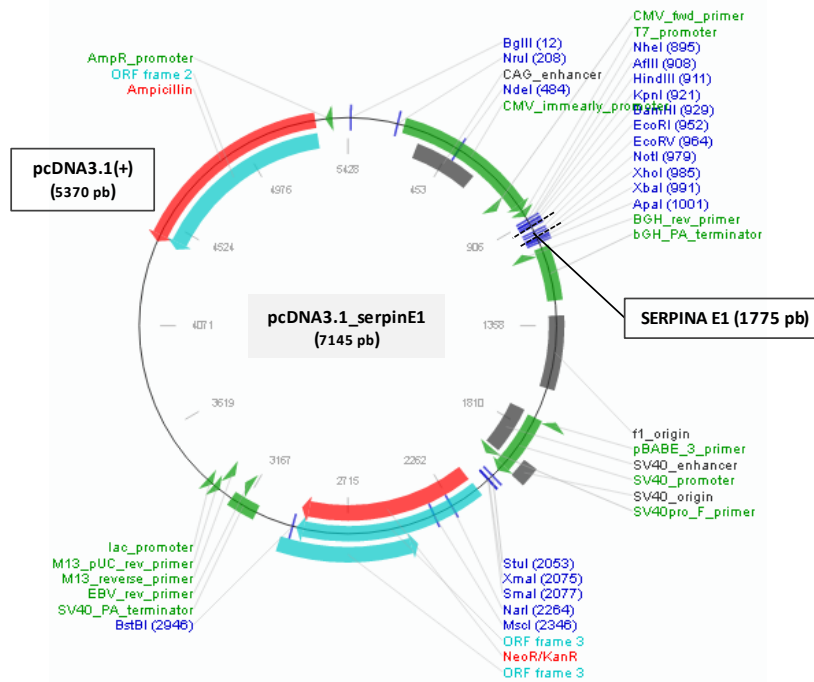
## 1.4. Clonaje de la secuencia de SERPINA E1 en el vector pFUGW

Partimos de la secuencia de SERPINA E1 clonada en un vector pcDNA3.1\_serpinE1, cedido por el Dr. Higgins. La secuencia de SERPINA E1 se clonó en el vector pFUGW que contenía todas las secuencias necesarias para su empaquetamiento en lentivirus, obtenido a partir del plásmido FUtdTW (Plasmid #22478, Addgene) tras eliminar la secuencia que codificaba para tdTomato y WPRE (WHP *Posttranscriptional Regulatory Element*).

Para el clonaje de SERPINA E1 desde el pcDNA3.1\_serpinE1 al vector pFUGW, en primer lugar se cortó el plásmido pcDNA3.1\_serpinE1 y el vector FUtdTW de manera independiente mediante enzimas de restricción, se separó el DNA digerido mediante electroforesis para aislar las secuencias de interés de cada una de las digestiones, se purificaron las secuencias a partir del gel, se incubó la secuencia de SERPINA E1 junto con el vector pFUGW en presencia de ligasa, se transformaron bacterias con los productos de la ligación, y una vez seleccionadas los clones de bacterias que habían incorporado el vector de interés (pFUGW\_SERPINA E1), se amplificó y se purificó el plásmido a partir del crecimiento de las mismas. Finalmente, la secuencia obtenida se secuenció para comprobar que coincidía con la secuencia teórica diseñada a partir de las bases de datos.

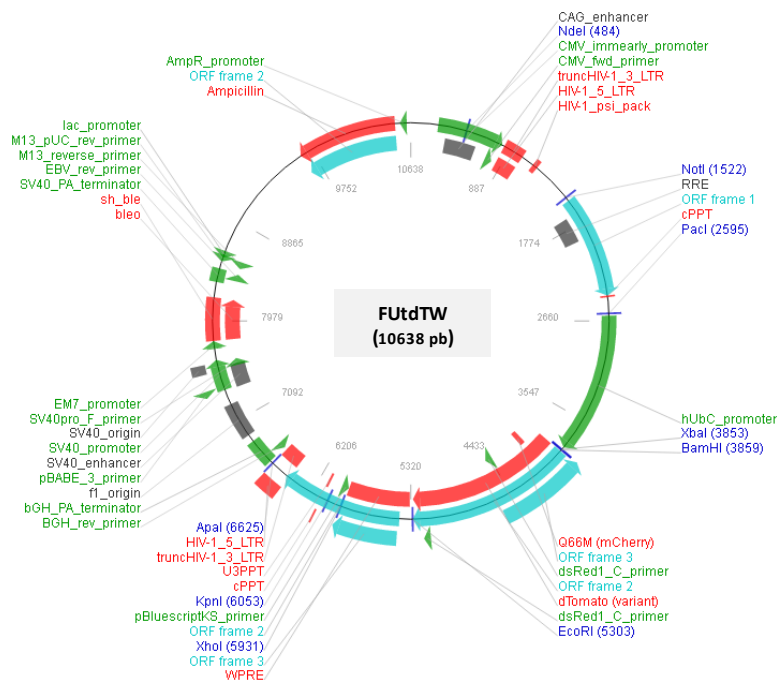
### 1.4.1. Construcciones plasmídicas

**pcDNA3.1\_serpinE1:** esta construcción fue cedida por el Dr Paul J. Higgins, contenía el gen que codifica para SERPINA E1 bajo un promotor de expresión constitutiva en células eucariotas (promotor de *Citomegalovirus*, CMV), contenía un gen de resistencia a neomicina en células eucariotas y un gen de resistencia a ampicilina en células procariontas. Su tamaño era de 7145 pares de bases (1775 pares de bases correspondientes con la secuencia de SERPINA E1 y 5370 pares de bases del plásmido original pcDNA3.1(+)) y se utilizó como plásmido donador de la secuencia de SERPINA E1 (**Figura 22**).



**Figura 22. Mapa circular del plásmido pcDNA3.1\_serpinE1 (plásmido donador).** Se muestra la posición de los sitios de restricción para cada enzima (azul oscuro) y la localización de los elementos funcionales del plásmido, *primers*, promotores y terminadores (verde), genes de resistencia (*Ampicillin* y *NeoR/KanR*, en rojo), pautas abiertas de lectura (ORF, en azul claro) y secuencias potenciadoras (*enhancer*, en negro). Adaptada de Addgene (<https://www.addgene.org/>).

**FUtdTW:** vector adquirido a partir del repositorio de plásmidos de *Addgene*. Contena diversos promotores de expresión en células eucariotas, la secuencia que nos interesaba estaba bajo el promotor hUbc, y codificaba para la proteína fluorescente tdTomato. Este plásmido dotaba de resistencia en células eucariotas para bleomicina y en células procariotas para ampicilina (**Figura 23**). Su tamaño era de 10638 pares de bases y se utilizó como plásmido aceptor de la secuencia de SERPINA E1.

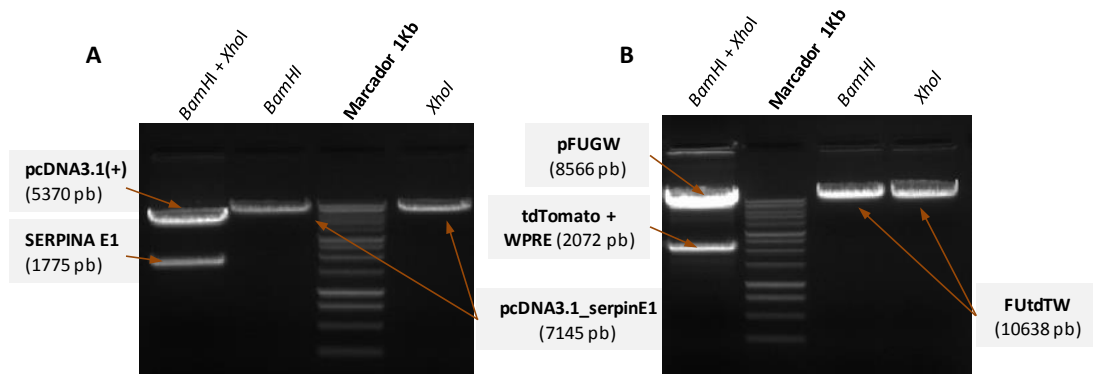


**Figura 23. Mapa circular del plásmido FUtdTW (plásmido aceptor).** Se muestra la posición de los sitios de restricción para cada enzima (azul oscuro) y la localización de los elementos funcionales del plásmido, *primers*, promotores y terminadores (verde), genes de resistencia (*Ampicillin* y *bleo*) y elementos de reconocimiento y empaquetamiento en lentivirus (secuencias LTR, *psi*, PPT y WPRE) (en rojo), pautas abiertas de lectura (ORF, en azul claro) y secuencias potenciadoras (*enhancer*, en negro). Adaptada de Addgene (<https://www.addgene.org/>).

#### 1.4.2. Digestión con enzimas de restricción, electroforesis y purificación en gel

La secuencia de SERPINA E1 contenida en el plásmido pcDNA3.1\_serpinE1 (plásmido donador) se introdujo en el plásmido FUtdTW (plásmido aceptor) una vez eliminada la secuencia de tdTomato y WPRE (pFUGW). Para la obtención de la secuencia de SERPINA E1, se realizó una digestión doble con 2µg de DNA del plásmido pcDNA3.1\_serpinE1, incubándolo con las enzimas de restricción *XhoI* y *BamHI* (Promega) durante toda la noche a 37°C. Se realizó una electroforesis en gel de 1% agarosa que se dejó correr 45 minutos a 130 voltios (**Figura 24A**). Para la preparación del gel, se disolvió 1g de agarosa en 100mL de tampón TAE 1x (diluido a partir del tampón TAE 5x: 2M Tris-Base, 1M ácido bórico y 50mM EDTA, pH8) y se le añadió 8µL bromuro de etidio.

A partir de este gel, se recortó, situando el gel en un transiluminador, la banda correspondiente a la secuencia de SERPINA E1 de 1775 pares de bases. En paralelo, se incubaron durante toda la noche a 37°C 2µg del vector FUtdTW con las enzimas de restricción *BamHI* y *XhoI*. Y se realizaron los mismos pasos que para aislar la secuencia de SERPINA E1, obteniéndose un fragmento de 8566 pares de bases que se correspondía con el plásmido pFUGW (FUtdTW sin tdTomato (tdT) ni la secuencia WPRE) (**Figura 24B**).

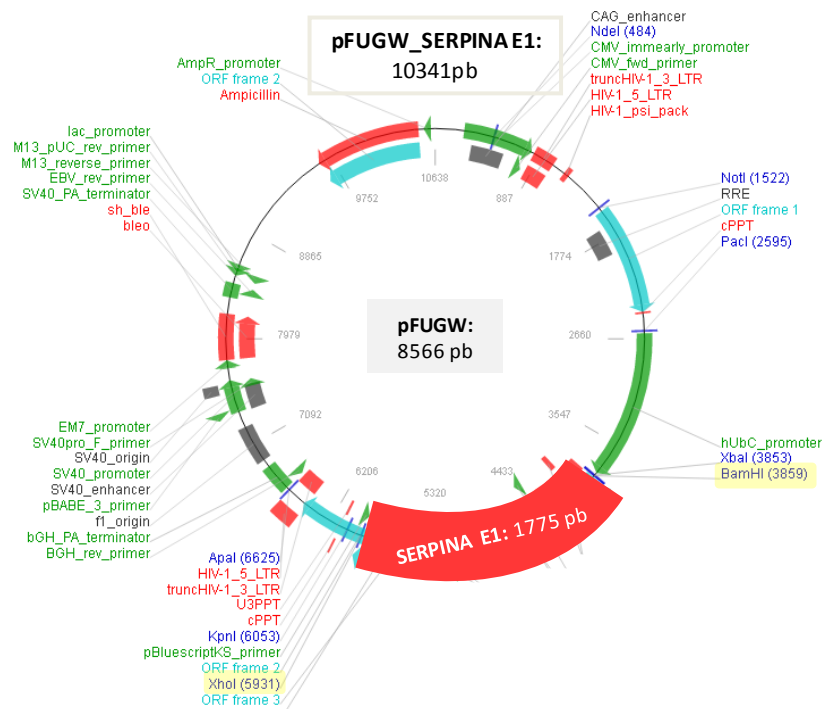


**Figura 24. Geles producto de una electroforesis teñidos con bromuro de etidio observados a través de un transiluminador. (A)** Fragmentos de DNA lineal producto de la digestión del plásmido pcDNA3.1\_serpinE1 con *BamHI* + *XhoI* (carril 1), *BamHI* (carril 2) o *XhoI* (carril 4). **(B)** Fragmentos de DNA lineal producto de la digestión del plásmido FUtdTW con *BamHI* + *XhoI* (carril 1), *BamHI* (carril 3) o *XhoI* (carril 4).

Se repitió todo este procedimiento dos veces con cada construcción, se juntaron las dos bandas aisladas de cada construcción (en total 4µg de DNA digerido) y se purificaron mediante *QIAquick® Gel Extraction kit* (Qiagen). Las suspensiones de DNA purificado de SERPINA E1 y de pFUGW se cuantificaron en un espectrofotómetro *Nanodrop®* (Thermo Scientific). Se realizaron diferentes digestiones con enzimas de restricción y electroforesis en agarosa para comprobar que las secuencias purificadas se correspondían con lo esperado teóricamente.

### 1.4.3. Ligación del inserto SERPINA E1 y el vector pFUGW

Se preparó la reacción de ligación del vector pFUGW (FUtdTW sin tdT y sin WPRE) con el inserto de SERPINA E1 en presencia de la ligasa T4 DNA Ligase (Invitrogen). Se realizaron dos reacciones de ligación diferentes, manteniendo una relación vector:inserto 1:3 y manteniendo una relación 1:4, en cada una se añadió 0.5µL de Ligasa (1U/µL) por reacción. Se incubó a 26°C durante 2 horas. El mapa del plásmido pFUGW\_SERPINA E1 (10341 pares de bases, pb), resultante de la ligación del fragmento de SERPINA E1 (1775 pb) en el vector pFUGW (8566 pb), se puede observar en la **figura 25**.



**Figura 25. Mapa circular del vector pFUGW\_SERPINA E1.** Se generó tras la clonación de la secuencia de SERPINA E1 (1775 pares de bases) en el plásmido pFUGW (8552 pares de bases). Los sitios de corte de las enzimas de restricción se marcan en azul oscuro, en azul claro las pautas abiertas de lectura (ORF), en rojo las regiones codificantes y los elementos lentivirales, en verde las regiones reguladoras de la transcripción y en gris regiones potenciadoras de la transcripción (enhancer) y orígenes de replicación víricos (origen). Adaptada de Addgene (<https://www.addgene.org/>).

### 1.4.4. Transformación bacteriana

Las construcciones ligadas se introdujeron en bacterias *E.coli* de la cepa Stbl3. Las bacterias *One Shot® Stbl3™ Chemically Competent E. Coli* (Thermo Fisher Scientific) presentan una mayor eficiencia en la replicación de secuencias que contienen elementos repetitivos como las secuencias lentivirales. Se descongelaron en hielo tantos viales con 50µL de cultivo bacteriano como reacciones de transformación se realizaron, en total 5, y cada vial se le añadió:

- 10ng del producto de reacción de ligación 1:3
- 10ng del producto de la reacción de ligación 1:4
- 20ng del producto de la reacción de ligación 1:3

- 10ng del plásmido digerido no circularizado pFUGW
- 10pg del plásmido control del kit puC19

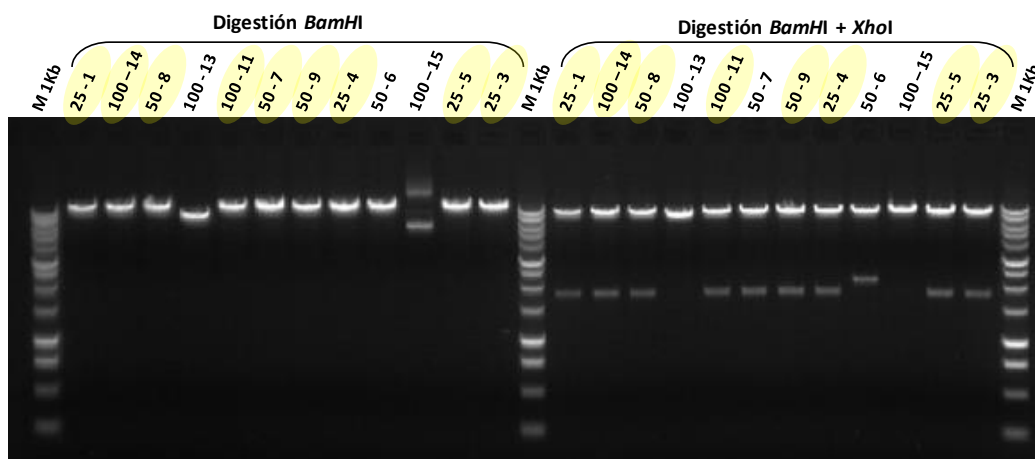
Cada vial se mezcló mediante agitación manual, se incubó en hielo durante 30 minutos y se pasó a un baño a 42°C durante 45 segundos. Se incubaron durante 2 minutos en hielo y se les añadió 250µL de medio S.O.C. (0.5% extracto de levadura, 2% triptona, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM MgSO<sub>4</sub> y 20mM glucosa) atemperado. El contenido de los tubos se pasó a un tubo de 15mL y se incubaron verticalmente en agitación, a 37°C durante 1 hora. Por cada reacción de transformación se sembraron 3 placas con medio LB y 100µg/mL de ampicilina. El medio LB se preparó con 10g de peptona de caseína, 5g de extracto de levadura y 10g de NaCl en 1 litro de agua destilada, el pH se ajustó a 7 con NaOH y la mezcla se autoclavó durante 25 minutos a 121°C. Para la preparación de las placas, a la mezcla anterior, antes de autoclavar, se le añadió 15g de agar (1.5%). Al sacar el medio del autoclave, cuando alcanzó una temperatura de 50-60°C aproximadamente, se le añadió ampicilina (100mg/mL, Sigma-Aldrich) a una concentración final de 100µg/mL, se agitó manualmente y se repartió en placas *petri*, que se dejaron solidificar a temperatura ambiente.

A partir de cada reacción de transformación se prepararon 3 suspensiones de bacterias, realizando una dilución 1/2 en LB (50µL LB + 50µL suspensión), realizando una dilución 1/4 en LB (75µL LB + 25µL suspensión) y la suspensión sin diluir. Tras la siembra de 100µL de cada suspensión, las placas se incubaron invertidas a 37°C durante toda la noche.

#### 1.4.5. Amplificación y purificación del plásmido pFUGW\_SERPINA E1

A partir de las placas donde se observó mayor número de colonias, se aislaron del orden de 12-15 colonias y se sembraron cada una en 5mL de LB con 100µg/mL de ampicilina. Se incubaron en agitación a 37°C toda la noche. A partir del crecimiento bacteriano obtenido, se realizó una Miniprep (Qiagen) para aislar el DNA plasmídico.

Para comprobar cuáles de las 12 suspensiones purificadas de DNA se correspondía con el pFUGW\_SERPINA E1 (plásmido FUtdTW sin tdTomato ni WPRE que ha incorporado la secuencia de SERPINA E1), se realizaron dos digestiones con cada suspensión. Una digestión simple con *Bam*HI y una digestión doble con *Xho*I y *Bam*HI, la primera para comprobar el tamaño del plásmido y la segunda para comprobar la presencia de la secuencia de SERPINA E1 (1775 pb). Los productos de las digestiones se separaron mediante una electroforesis en agarosa. Como se puede observar en la **figura 26**, 9 de los 12 clones bacterianos habían incorporado el vector de interés (pFUGW\_SERPINA E1) (subrayados en amarillo).



**Figura 26.** Gel obtenido tras una electroforesis de los productos de la reacción de ligación pFUGW (8552 pb) + SERPINA E1 (1775 pb). Cada carril es el producto de una digestión con *Bam*HI (2-13) o con *Bam*HI+*Xho*I (15-26) de extractos de DNA plasmídico obtenido de diferentes clones bacterianos transformados con el producto de las diferentes reacciones de ligación. Los carriles 1, 14 y 27 se corresponden con un marcador de hasta 10000 pares de bases. Sólo los clones bacterianos sombreados de amarillo incorporaron el vector de interés pFUGW\_SERPINA E1.

#### 1.4.6. Reacción de secuenciación

Para confirmar la presencia de *serpinE1* en el nuevo vector generado, pFUGW\_SERPINA E1, se secuenciaron las regiones de unión pFUGW + SERPINA E1 en el extremo 5' y 3', en las diferentes suspensiones de DNA plasmídico purificado y que se seleccionaron tras los resultados de la electroforesis en el paso anterior (9 clones). Los *primers* se diseñaron tomando como referencia la secuencia teórica obtenida tras el clonaje, haciendo uso del programa online *Primer3 v4.0*. La reacción de secuenciación se llevó a cabo empleando *Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems). Cada reacción se preparó añadiendo 300ng de DNA molde, 3.2pmol de *primer*, 4μL *Ready Reaction Premix*, 2μL *Big Dye Buffer* y el volumen restante de agua libre de nucleasas hasta llegar a un volumen final de 20μL. Se preparó una reacción con el primer forward y otra reacción con el primer reverse para cada muestra a secuenciar. Todos los tubos se introdujeron en un termociclador y se programó, subida rápida a 96°C e incubación durante 1 minuto y 25 ciclos compuestos por subida rápida a 96°C, incubación durante 10 segundos, bajada rápida a 50°C, incubación durante 5 segundos, subida rápida a 60°C e incubación durante 4 minutos. Al terminar los 25 ciclos, las muestras se guardaron a 4°C en oscuridad hasta su purificación.

El producto de las reacciones de secuenciación se purificó para eliminar los nucleótidos marcados no incorporados, mediante una precipitación con etanol y EDTA. A cada reacción se le añadió 5μL de 125mM EDTA y 60μL de 100% etanol y se mezcló por inversión 4 veces. Se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 3000g durante 30 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se lavó el pellet con 60μL de 70% etanol. Se centrifugaron los tubos 2000g a 4°C durante 15 minutos y se eliminó el sobrenadante. Las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente y se resuspendieron en formamida Hi-Di (Life Technologies). La electroforesis se realizó en

el equipo *ABI 3130xl Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas se alinearon con las secuencias teóricas esperadas, obtenidas a partir de la base de datos pública de NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (Gene ID: 5054), para comprobar la presencia de SERPINA E1, empleando el programa *BioEdit*. Las construcciones cuyas secuencias analizadas presentaron mayor porcentaje de alineamiento con respecto a las secuencias de referencia, se seleccionaron para ser introducidas mediante transducción lentiviral en las líneas de CECC.

#### 1.4.7. Transfección liposomal

La transfección mediada por liposomas catiónicos o lipofección, se empleó para introducir el plásmido pFUGW\_SERPINA E1 en las líneas celulares de CECC y comprobar transitoriamente, antes de la transducción estable lentiviral, la sobreexpresión de SERPINA E1 en estas líneas.

Se sembraron  $1 \times 10^5$  células en placas de 6 pocillos. Tras 16 horas de incubación a 37°C en atmósfera 5% CO<sub>2</sub>, se prepararon las mezclas de transfección. El reactivo empleado para la transfección fue *DOTAP Liposomal Transfection Reagent* (Roche). La mezcla de transfección se preparó añadiendo por tubo o reacción, 1µg de DNA y 20µL de DOTAP y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. A cada mezcla de transfección se le añadió 1mL del medio de cultivo general, se eliminó el medio de un pocillo de las células sembradas, y se le añadió este contenido a las células. Las células junto con la mezcla de transfección se incubaron 24 horas a 37°C en atmósfera 5% CO<sub>2</sub>.

Para comprobar si las células habían incorporado el plásmido pFUGW\_SERPINA E1, tras 48 horas desde el momento de la transfección, las células se lavaron con PBS, se les añadió 1mL de Trizol, se incubaron durante 5 minutos y se recogieron con ayuda de un *scraper* en un tubo de 1.5mL. A partir de aquí, se siguieron los pasos explicados en el apartado “1.3. Análisis de los niveles de RNA mensajero de SERPINA E1”.

### 1.5. Transducción con partículas lentivirales portadoras de pSIN-DUAL-GFP1-Luciferase, pFUGW\_SERPINA E1 y pLKO.1-puro\_shRNA

#### 1.5.1. Construcciones plasmídicas

##### 1.5.1.1. Plásmidos de interés

**pSIN-DUAL-GFP1-Luciferase:** contenía una secuencia que codificaba para GFP (Green Fluorescent Protein) y otra secuencia que codificaba para la enzima luciferasa (G3 firefly Luciferase). También presentaba todas las secuencias necesarias para el empaquetamiento en lentivirus y su inserción en el genoma de la célula huésped. Este plásmido se nos fue cedido por Dr Mary Collins (College Medical School, Cleveland, OH).



**pFUGW\_SERPINA E1:** plásmido generado a partir de la clonación de la secuencia de SERPINA E1, reemplazando la secuencia tdTomato y WPRE, en el plásmido FUtdTW. Conteníó todas las secuencias necesarias para el empaquetamiento en lentivirus y su inserción en el genoma de la célula huésped, además del gen que dota de resistencia a bleomicina en células de mamífero.

**pLKO.1-puro shRNA:** se emplearon tres plásmidos, dos de los cuales contenían un shRNA diferente diseñado contra el RNAm de SERPINA E1 y un tercero que contenía un shRNA que no presentaba como diana ningún gen de mamífero (*scramble*). Las secuencias de los shRNA fueron desarrolladas por TRC (The RNAi Consortium, Broad Institute) y son de libre acceso a través de su librería pública. Los dos shRNA\_SERPINA E1 empleados se correspondían con el número de clon TRCN0000331004 (004) y TRCN0000370159 (159), y se adquirieron en formato de bacterias en glicerol que contenían los plásmidos de interés (Sigma-Aldrich). Los tres vectores, además de contener el shRNA específico para SERPINA E1 o la secuencia *scramble*, contenían, como elementos a destacar, las secuencias necesarias para la generación de lentivirus (SIN/LTR, 5' LTR, Psi, RRE) y un gen que dota de resistencia a puromicina (*puroR*) en células de mamífero.

#### 1.5.1.2. Plásmidos víricos

**pCMV-dR 8.91:** contenía las secuencias que codificaban para las proteínas de la cápside y los genes reguladores de la replicación y síntesis lentiviral. Este plásmido se nos fue cedido por Dr Mary Collins (College Medical School, Cleveland, OH).

**pVSV-G:** contenía las secuencias que codificaban para las proteínas de la envuelta lentiviral. Este plásmido se nos fue cedido por Dr Mary Collins (College Medical School, Cleveland, OH).

#### 1.5.2. Producción de partículas lentivirales

Se emplearon como células empaquetadoras, las células de la línea celular 293T. Se sembraron  $3 \times 10^6$  células 293T en placas Petri de 60-mm previamente recubiertas con poli-L-lisina. Se incubaron durante 16 horas a 37°C en atmósfera 5% CO<sub>2</sub>. Las células se transfectaron mediante lipofectamina (*Lipofectamine* 2000, Invitrogen), preparando dos soluciones:

**Solución de DNA interés-DNA vírico:** se preparó siguiendo una proporción en cantidades de DNA de 3:2:1, plásmido interés : pCMV-dR 8.91 : pVSV-G, respectivamente. Por reacción de transfección se mezclaron 2.25µg plásmido de interés, 1.5µg del plásmido pCMV-dR 8.91 y 0.75µg del plásmido pVSV-G. Se añadieron 500µL de Opti-MEM a esta mezcla.

**Solución de lipofectamina:** se mezcló 12µL de lipofectamina con 500µL de opti-MEM, se agitó y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente.

La solución de transfección se preparó mezclando el contenido de la solución de DNAs con la solución de lipofectamina, la mezcla se incubó a temperatura ambiente 20 minutos y se añadió a cada

placa de células 293T, retirándoles previamente el medio, junto con 500µL más de Opti-MEM. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Se les retiró el medio y se les añadió 50% Opti-MEM 50% DMEM con 2%FBS. Se incubaron las células 48 horas más para que se produjeran las partículas víricas conteniendo en su interior el plásmido de interés. A las 48 horas se recogió el sobrenadante que se centrifugó 10 minutos a 2500rpm 4°C y se filtró a través de un filtro de 0.22µm. La suspensión de virus filtrada se guardó en criotubos en el congelador de -80°C.

El medio de cultivo Opti-MEM es un medio de cultivo modificado a partir del medio esencial Eagle, tamponado con HEPES y bicarbonato sódico, y suplementado con hipoxantina, timidina, piruvato de sodio, L-glutamina, elementos traza y factores de crecimiento, que favorece la transfección celular.

### 1.5.3. Titulación lentiviral

Se determinó la concentración de partículas víricas de las suspensiones recogidas de manera indirecta a partir del porcentaje de células 293T GFP positivas tras la transducción con diferentes diluciones de las suspensiones lentivirales recogidas. La detección de las células infectadas se realizó mediante citometría de flujo, debido a que las células infectadas expresaban la proteína GFP. Por este motivo, solo se titularon las suspensiones de partículas víricas que contenían en su interior el plásmido de interés pSIN-DUAL-GFP1-Luciferase. Para el resto de suspensiones víricas (no fluorescentes), se generaron virus portadores de pSIN-DUAL-GFP1-Luciferase en paralelo con la generación de dichas partículas no fluorescentes (pFUGW\_SERPINA E1 y pLKO.1-puro\_shRNA) y se tomó de referencia la titulación de las suspensiones con GFP en células 293T para la posterior transducción de las líneas de CECC.

Se sembraron 2x10<sup>5</sup> células 293T en pocillos de placa de 12 pocillos y se prepararon 4 soluciones a diferentes concentraciones a partir de la suspensión vírica a cuantificar, diluida 1/2, 1/10, 1/100 y 1/1000 en medio DMEM con FBS inactivado por calor. A cada pocillo de células, se le añadió 400µL de las suspensiones anteriores y a otro pocillo 400µL de medio, en total 5 pocillos por suspensión a cuantificar. Se incubaron las placas durante 6 horas a 37°C atmósfera 5% CO<sub>2</sub> y se añadió 500µL más de medio DMEM. Tras 48 horas de incubación, se recogieron las células mediante tripsinización, bloqueo con medio, 2 lavados con PBS y resuspensión final en 400µL de PBS y se pasaron por el citómetro FACSCalibur (BD). Este análisis nos permitió determinar el porcentaje de células GFP positivas de la población celular. A partir de este valor, se calculó el número de unidades de infección por mililitro o el título de virus (IU/mL) = ((Frecuencia de células fluorescentes x número de células sembradas)/Volumen de suspensión vírica (mL)) x Factor de dilución de la suspensión vírica.

#### 1.5.4. Transducción de las líneas de CECC

Este procedimiento se empleó para infectar o transducir las líneas de CECC con tres tipos diferentes de construcciones, el plásmido pSIN-DUAL-GFP1-Luciferase, el plásmido pFUGW\_SERPINA E1 y las 3 construcciones pLKO.1-puro shRNA (*scramble*, 004 y 159).

Se sembraron  $1 \times 10^5$  células por pocillo en placas de 24 pocillos y se incubaron durante 16 horas. Se calcularon los volúmenes necesarios para infectar las células a diferentes MOIs (*Multiplicity of infection*) que representó el número de partículas víricas o unidades de infección por célula a infectar. Se probaron MOI=1 y MOI=2, además del control negativo MOI=0, en un volumen final de 200  $\mu$ L, completándolo con medio DMEM con FBS inactivado por calor. A las 6h, se añadió a cada pocillo 300  $\mu$ L de medio DMEM general y se dejaron en incubación 48h más. El FBS inactivado por calor se preparó a partir de una alícuota de FBS congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$ , se descongeló a  $37^{\circ}\text{C}$  y se incubó durante una hora en un baño a  $56^{\circ}\text{C}$ , agitando el tubo por inversión cada 10 minutos.

#### 1.5.5. Selección de las células transducidas

En el caso de las células transducidas con el plásmido pSIN-DUAL-GFP1-Luciferase, pasadas 48 horas desde la infección, se recogieron las células y se pasaron por el citómetro para comprobar la expresión de GFP. El resto de células se ampliaron en cultivo hasta llegar a  $10 \times 10^6$  células, y esta población se pasó por el citómetro FACS Aria (BD) para seleccionar y recoger sólo aquellas células que expresaron GFP.

En el caso de las células transducidas con el plásmido pFUGW\_SERPINA E1 o con los plásmidos pLKO.1-puro shRNA, pasadas 48 horas desde la infección, se añadió al medio el antibiótico zeocin (Life Technologies) a una concentración final de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  o puomicina (10mg/ml, InvivoGen) a una concentración de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivamente, y se seleccionaron cambiando el medio con antibiótico cada 3 días durante 1 mes. Para comprobar si la población final seleccionada contenía el plásmido pFUGW\_SERPINA E1 o el plásmido pLKO.1-puro correspondiente, se realizó un análisis de los niveles de expresión de serpinE1 siguiendo el procedimiento explicado en el apartado “Análisis de los niveles de RNA mensajero”.

### 1.6. Análisis estadístico

Para analizar las diferencias entre el valor medio de una variable con dos condiciones o grupos en los ensayos *in vitro* (p. ej.: porcentaje de células apoptóticas de la línea UM-SCC-74B en comparación con el de la línea 74BserpE1up; área ROI ocupada por las células de la línea SCC9 scramble en comparación con la de la línea SCC9 shRNA004 o la de la de la línea SCC9 shRNA159), se utilizó el test no paramétrico Mann Whitney, debido al reducido tamaño muestral de los ensayos.

## 2. EXPERIMENTOS *IN VIVO*

### 2.1. Cepas de ratón

Se emplearon hembras de ratones atímicos **Swiss Nude** (Crl:NU(Ico)-Foxn1<sup>nu</sup>) con 4 semanas de edad, obtenidos a partir de *Charles Rivers Laboratories*. Al carecer de timo son incapaces de producir linfocitos T, por lo que se encuentran parcialmente inmunodeprimidos.

Se emplearon hembras **NOD SCID** (NOD.CB17-Prkdc<sup>scid</sup>/NcrCrl) con 4 semanas de edad. Se trata de ratones inmunodeprimidos debido a una mutación en el gen SCID que altera la función de los linfocitos T y linfocitos B. El background NOD de esta cepa es responsable de la falta de función de los linfocitos NK, aunque si conservan parte de su función.

Se emplearon hembras de ratones **NSG** o NOD *scid* gamma (NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ) de 4 semanas de edad, desarrollados por *The Jackson Laboratory* (JaxTM Mice Strain). Esta cepa carece de células T maduras, células B o células NK funcionales, y presenta deficiencias en la señalización mediada por citoquinas.

Las 3 cepas empleadas consistieron en cepas de ratones inmunodeprimidos pero en diferente grado. La cepa Swiss Nude es la menos inmunodeprimida, solo carecen de parte de la respuesta adaptativa, la mediada por los linfocitos T, pero la respuesta innata es funcional al 100% en estos ratones. Las cepas NOD SCID y NSG presentan un bloqueo casi total de la respuesta adaptativa (solo acción de las células dendríticas) y función parcial de la respuesta innata. En concreto, los ratones NOD SCID carecen del sistema del complemento, mantienen una actividad completa de los granulocitos y una actividad parcial de los macrófagos y células NK. En cambio, en los ratones NSG, además de la falta de función de los macrófagos y del sistema del complemento, sus células NK no son funcionales.

Todos los ratones se estabularon en racks con ventilación controlada, localizados en una zona SPF (*Specific Pathogen Free*), alimentados con comida y agua estériles *ad libitum*. Los procedimientos a los que fueron sometidos los ratones fueron aprobados previamente por el Comité Ético del *Institut de Recerca de l'Hospital de la Sant Creu i Sant Pau* y formaban parte de un *Protocolo de procedimiento de experimentación animal* aprobado por la Generalitat de Cataluña.

### 2.2. Técnicas de implantación

#### 2.2.1. Inyección subcutánea

Los ratones se anestesiaron vía intraperitoneal (IP) con una mezcla de 100mg/Kg ketamina (Ketolar, Parke Davis SL, Pfizer) y 10mg/Kg de xilacina (Rompun, Bayer). Una vez anestesiados, los ratones se colocaron sobre una manta térmica para evitar la bajada excesiva de su temperatura corporal. A cada ratón se le inyectó, en dos o cuatro flancos, una suspensión celular concreta según la línea celular y/o

el experimento haciendo uso de una jeringa de insulina de 29G (BD). En todas las condiciones las células provenían de células en cultivo *in vitro*, las cuales se tripsinizaron y se lavaron con medio para eliminar la tripsina (explicado apartado “1.1.2. Subcultivo, congelación y descongelación de líneas celulares”). El pellet celular se resuspendió en su correspondiente medio de cultivo llegando a un volumen final por flanco de 100 $\mu$ L.

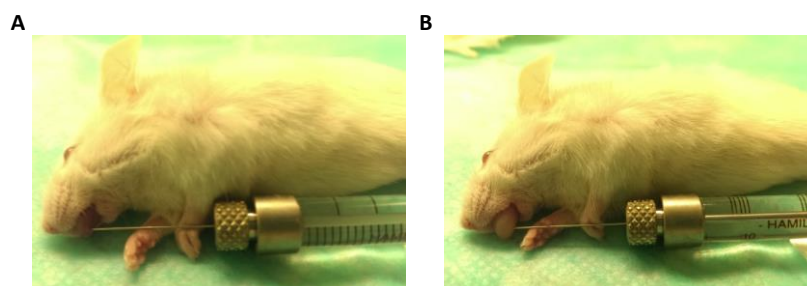
### 2.2.2. Inyección ortotópica

Los ratones se anestesiaron con una mezcla de 100mg/Kg ketamina y 10mg/Kg de xilacina, y pasados 2-4 minutos, se comprobó la pérdida del reflejo de la pata. Una vez estaban completamente anestesiados, se colocaron sobre una manta térmica para evitar la bajada excesiva de su temperatura corporal. Aunque en la mayoría de experimentos *in vivo* las células en el modelo ortotópico se inyectaron en la lengua de los ratones, también se testaron otros sitios localizados en la cabeza del ratón, como la mejilla y el suelo de boca.

En todas las localizaciones ortotópicas testadas, la inyección de las células tumorales se realizó con una jeringa calibrada para medir volúmenes pequeños (Microliter Serie 800, Hamilton), con una aguja de 30G.

#### 2.2.2.1. Inyección en lengua

Una vez anestesiado el ratón, se localizó la parte más anterior de la lengua, y se inyectó una suspensión celular concreta en la submucosa del tejido lingual (**Figura 27**), resuspendidas en 20-30 $\mu$ L de su medio de cultivo general, según la línea celular/experimento (**Tabla 11**). Se empleó una jeringa Hamilton de un calibre de 29G (Microliter Serie 800, Hamilton). Cuando se detectó tumor macroscópico en la lengua de los ratones y estos comenzaron a disminuir de peso (menos de un gramo), se reseccionó la mayor parte del tumor generado. El día antes de la resección a los ratones se les puso buprenorfina una concentración de 0.0015mg/ml en el agua del biberón. La resección consistió en el corte con tijeras quirúrgicas de la mayor parte del tumor primario generado en la lengua sin comprometer la funcionalidad de la misma. Tras la escisión, se cauterizó la lengua por calor con ayuda de un cauterizador eléctrico.



**Figura 27. Inyección ortotópica en la lengua de un ratón NOD SCID de  $1 \times 10^6$  células tumorales en un volumen de 25 $\mu$ L. (A) Antes de la inoculación de las células. (B) Después de la inoculación de las células.**

Tabla 11. Condiciones establecidas en los experimentos de inyección ortotópica

LOCALIZACIÓN INYECCIÓN	CEPA RATÓN	Nº DE RATONES	LÍNEA CELULAR	Nº DE CÉLULAS	VOLUMEN SUSPENSIÓN CELULAR	TIPO DE RESECCIÓN (Tiempo)
Lengua	Swiss Nude	3	UM-SCC-74B	1x10 <sup>6</sup>	30µl	Parcial (8 días)
		3	74BserpE1up			
		3	UM-SCC-22A			
		2	UM-SCC-22B			
		3	SCC-25			
		3	SCC-9			
Lengua	NOD SCID	10	UM-SCC-22A	1x10 <sup>6</sup>	25µl	Parcial (7 días)
		15	UM-SCC-74B			Parcial (5 días)
		11	74BserpE1up			Parcial (5 días)
Lengua	NSG	13	UM-SCC-74B	3x10 <sup>5</sup>	25µl	Total (6-7 días)
		14	74BserpE1up			

### 2.3. Seguimiento *in vivo* del crecimiento tumoral por luminiscencia

El seguimiento del estado de los ratones se realizó siguiendo las indicaciones del procedimiento aprobado por el Comité de Ética del *Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau*.

La transducción de las células de las líneas de CECC con plásmidos que expresaban luciferasa (pSIN-DUAL-GFP1-Luciferase), permitió el seguimiento de las células tumorales *in vivo*. El registro de los animales se realizó utilizando el sistema de imagen *Xenogen IVIS Spectrum* (Caliper Life Sciences) acoplado al sistema de anestesia por isofluorano XGI-8 (Xenogen). 5 minutos antes de cada registro, a los ratones se les inyectó 2.25mg de D-luciferina por vía intraperitoneal (150µl de luciferina 15mg/ml diluida en suero fisiológico estéril). Según la zona de implantación, el registro de los ratones se realizó en posición ventral o en posición dorsal, el tiempo de exposición se ajustó automáticamente en función de la intensidad de luminiscencia de cada ratón y línea celular. La frecuencia con la que se realizó cada registro dependió del objetivo de cada experimento, pero como mínimo se dejó un tiempo de 2 o 3 días entre registros para disminuir la exposición de los ratones al isofluorano.

### 2.4. Necropsia y procesamiento de tejidos

#### 2.4.1. Necropsia y registro *ex vivo*

En todos los experimentos los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical. El criterio de sacrificio o punto final dependió en cada caso del objetivo del experimento. En aquellos experimentos que se quiso analizar el tiempo de vida del ratón tras la implantación, los ratones se sacrificaron cuando alcanzaron una puntuación de 15 o superior en el protocolo de supervisión donde se tenían en cuenta cambios a nivel de aspecto general (secreciones de las mucosas, falta de movilidad), pérdida de peso (superior al 20% del peso inicial) y cambios comportamentales (automutilaciones, movimientos erráticos, agresividad, pasividad, vocalizaciones) (**Anexo 1**). En otros experimentos, aunque los ratones no cumplieron los criterios de sacrificio del protocolo de supervisión, se sacrificaron para poder cumplir los objetivos del experimento.

Antes de sacrificar cada ratón, se les inyectó 2.25mg de D-luciferina por vía intraperitoneal y se anestesiaron mediante el sistema de administración de isoflurano por inhalación. Después de 5 minutos, cada ratón se registró de manera individual en el sistema *IVIS Spectrum* (registro pre-sacrificio) y después se sacrificó por dislocación cervical. En el caso de los ratones implantados ortotópicamente, inmediatamente después del sacrificio cada ratón se volvió a registrar, habiéndole resecaado la lengua o el suelo de boca o la mejilla con tumor primario, y retirando la piel que recubría el tórax, para detectar señal de luminiscencia en otros órganos. La lengua, los ganglios cervicales, los pulmones y el hígado de cada ratón se registraron individualmente (registro *ex vivo*), cubriéndolos con una solución de 0.75mg/ml de luciferina. En el caso de los ratones en los que las células tumorales se implantaron subcutáneamente, sólo se recogieron los tumores subcutáneos y estos se registraron *ex vivo*.

Tras finalizar el registro de luminiscencia de cada ratón y sus correspondientes órganos, los órganos se recogieron en casetes y se sumergieron en una solución de fijación (formaldehído al 4% en buffer fosfato 0.1M), entre ellos los ganglios linfáticos cervicales, la lengua cortada longitudinalmente y otros órganos como el pulmón y el hígado. También se recogió cualquier otra estructura u órgano que presentó señal de luminiscencia o que se sospechaba que pudiera contener células tumorales. Cada órgano, tras su fijación, se incluyó en bloques de parafina y se cortó en secciones dependiendo del objetivo del experimento y el órgano en cuestión.

#### 2.4.2. Procesamiento y análisis histopatológico

Tras la recogida y fijación de las muestras durante 24 horas, se deshidrataron, se incluyeron en parafina, se cortaron y se reservaron y/o se tiñeron con hematoxilina-eosina. A continuación se explica cada uno de los procedimientos punto por punto.

- 1. Deshidratación de las muestras:** tras la fijación de las muestras durante 24 horas inmersas en la solución de fijación, las muestras se deshidrataron para poder incluirlas en parafina. En primer lugar se hicieron 3 lavados de la muestra en agua destilada durante 10 minutos cada uno para eliminar la mayor parte de la solución de fijación. Para su deshidratación, se incubó secuencialmente en soluciones con concentraciones crecientes de etanol (70, 80, 96 y 100%), 3 veces en cada solución y durante 5 minutos. Por último, se incubó en 3 soluciones de xileno al 100% durante 10 minutos cada una.
- 2. Inclusión en parafina:** se realizaron 3 incubaciones de la muestra en 3 soluciones de parafina durante 1 hora cada una en una estufa a 60°C. Pasadas las 3 horas, la muestra se colocó, orientada según interés, sobre un molde metálico, se cubrió con parafina líquida y se colocó encima un casete ya rotulado con el nombre de la muestra. Se dejó enfriar a temperatura ambiente.

3. **Corte:** una vez solidificada la parafina, se realizaron cortes del tejido con un grosor de 3-5µm en un micrótopo y los diferentes cortes se adhirieron a un portaobjetos recubierto con gelatina.
4. **Rehidratación:** las muestras se incubaron durante 30-60 minutos a 60°C, posteriormente se realizaron dos incubaciones en xileno al 100%, dos incubaciones en etanol 100% y una incubación en etanol 96%, etanol 80%, y por último de 50%. En cada incubación la muestra se dejó 10 minutos.
5. **Tinción de hematoxilina-eosina:** los portaobjetos se incubaron durante 5 minutos en agua destilada, durante 5-10 minutos en la solución de Hematoxilina de Mayer y después un lavado con agua durante 10-15 minutos. Una vez diferenciadas algunas estructuras del tejido, se realizaron dos lavados en agua destilada durante 5 minutos y se incubó de 0.5-2 minutos en eosina al 0.2%. Se volvió a deshidratar la muestra, siguiendo los mismos pasos que en el apartado “Deshidratación de las muestras”. Por último, la muestra se cubrió con medio de montaje y un cubreobjetos.

Aunque a nivel técnico todos los órganos se procesaron de la misma manera, el número de cortes y el tipo de tinción en cada uno fue diferente en función del objetivo del experimento. En la **tabla 12** se indica el procesamiento final de cada órgano y/o estructura recogida en los diferentes experimentos de manera general. De manera particular, algunos órganos del experimento con ratones NSG se procesaron mediante otras técnicas adicionales, además de las generales (indicadas entre paréntesis en la **tabla 12**). Además, la inmunohistoquímica de vimentina a nivel de tumor primario o pulmón se realizó únicamente con los ratones implantados ortotópicamente con las líneas UM-SCC-74B o 74BserpE1up (explicado con detalle en el apartado 2.4.3) pero no con los órganos de los ratones implantados con el resto de líneas de CECC.

**Tabla 12. Procesamiento final de los órganos y/o estructuras recogidas en los experimentos *in vivo* en función del tipo de implantación**

TIPO DE IMPLANTACIÓN	ÓRGANOS O ESTRUCTURAS PROCESADAS	PROCESAMIENTO FINAL
<b>Subcutánea</b>	Tumores subcutáneos	- 1x Tinción de HE - 3x IHQ
	Lengua	- 1x Tinción de HE - 1x IHQ de vimentina (experimento ratones NSG) - 2x IF (experimento ratones NSG)
<b>Ortotópica</b>	Ganglios cervicales	- Pequeño tamaño (<3mm diámetro): cortar todo el ganglio y teñir todo de HE - Mayor tamaño (≥3mm diámetro): 1x tinción de HE
	Pulmón	6x_ Niveles o zonas. Por nivel o zona 4 preparaciones (2 cortes pulmón/preparación): - Preparación 1: tinción de HE - Preparación 2: IHQ de vimentina



	- Preparación 3 y 4: reservar para IHQ o IF
Hígado	Desbastar hasta la zona central del hígado, hacer una preparación (2 cortes) y teñir con HE (experimento ratones NSG)

Inmunohistoquímica: IHQ, Inmunofluorescencia: IF, Hematoxilina-eosina: HE

### 2.4.3. Análisis inmunohistoquímico de marcadores fenotípicos

Esta técnica se empleó para detectar proteínas específicas en muestras tisulares resultantes de experimentos *in vivo*. En concreto, se utilizó para caracterizar los tumores subcutáneos generados por las líneas celulares de CECC mediante detección de marcadores epiteliales (E-cadherina) o mesenquimales (vimentina y N-cadherina). Por otro lado, la inmunohistoquímica de vimentina se utilizó también en el experimento ortotópico con ratones NSG, gracias al elevado nivel de expresión de la proteína vimentina por parte de las células de la línea UM-SCC-74B y de la línea 74BserpE1up, para facilitar el conteo de células individuales y distinguirlas del tejido del ratón (ausencia de marcaje) a nivel de tumor primario y de pulmón.

Las muestras sobre las que se realizó una inmunohistoquímica se fijaron, se deshidrataron, se incluyeron en parafina y se cortaron como se ha explicado anteriormente. Los cortes se colocaron sobre portas cargados eléctricamente para evitar la pérdida del tejido (*FLEX IHC Microscope Slides*, Dako). A partir de aquí, las muestras se incubaron durante 30 minutos a 60°C y se rehidrataron como se ha explicado anteriormente (apartado “Rehidratación”). La recuperación antigénica de las muestras se realizó en el sistema *PT Link* (Dako), programando una incubación a 95°C durante 10 minutos y luego una incubación de 45 minutos a 65°C en un buffer citrato de pH 9 (Dako). La inmunotinción se realizó mediante el sistema automatizado *Autostainer Link 48* (Dako), utilizando los reactivos pertenecientes al kit *EnVision Flex, High pH* (Dako) y programando las siguientes incubaciones: 1 minuto en *rinse buffer*, 5 minutos en *Peroxidase-Blocking Reagent*, lavado en *rinse buffer* durante 1 minuto, incubación con el anticuerpo primario (**Tabla 13**), diluido en *rinse buffer* según el caso, durante 30 minutos, lavado con *rinse buffer* durante 1 minuto, incubación durante 20 minutos con el reactivo *EnVision/HRP*, lavado con *rinse buffer* durante 1 minuto, incubación con la solución cromogénica compuesta por los reactivos *DAB+ Chromogen* y *Substrate Buffer*, lavado con *rinse buffer* durante 1 minuto, contra-tinción con hematoxilina incubando durante 5 minutos y un lavado final con *rinse buffer* durante 1 minuto.

**Tabla 13. Anticuerpos primarios utilizados en la inmunohistoquímica basada en el revelado por diaminobenzidina. La dilución de los anticuerpos se realizó en *rinse buffer* (Dako)**

Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Casa comercial
Vimentin, clon V9, ready to use	1/4	Mouse	Dako
E-cadherin, Clon NCH-38, ready to use	Sin diluir	Mouse	Dako
N-cadherin, Clon 6G11	1/50	Mouse	Dako

#### 2.4.4. Análisis por inmunofluorescencia de SERPINA E1

Esta técnica se empleó para detectar y cuantificar la proteína SERPINA E1 en los tumores primarios generados por las líneas UM-SCC-74B y 74BserpE1up en la lengua de ratones NSG y así poder confirmar la sobre-expresión de SERPINA E1 *in vivo* de la línea 74BserpE1up.

Se realizó una inmunofluorescencia con 3 anticuerpos primarios diferentes y un marcador fluorescente (DAPI), sobre 3 lenguas con tumor primario generado por la línea UM-SCC-74B o por la línea 74BserpE1up. Para llevarla a cabo se siguieron los mismos pasos que para realizar una inmunohistoquímica (explicado anteriormente), desde la fijación de la muestra hasta la rehidratación y la recuperación antigénica. A partir de aquí se realizaron 3 lavados en TBS 1x (132mM NaCl, 20mM Tris pH 7.5, 0.1% Tween 20) durante 5 minutos cada uno, y se bloqueó el posible marcaje inespecífico debido al anticuerpo secundario, incubando la muestra 1 hora a temperatura ambiente en una solución formada por TBS, 0.5% triton y 3% de suero de burro (*Donkey Serum*, Millipore). La incubación con los anticuerpos primarios (**Tabla 14**) se realizó durante toda la noche a 4°C, diluyendo los anticuerpos en TBS 1x, 0.1% triton y 3% de suero de burro. Al día siguiente, se alargó la incubación con el anticuerpo primario durante 2 horas más a temperatura ambiente. Se hicieron 3 lavados de 5 minutos cada uno en TBS 1x y se incubó la muestra con los anticuerpos secundarios, según **tabla 14**, diluyéndolos en TBS 1x e incubando durante 2 horas a 37°C. Se hizo una incubación de 4 minutos a temperatura ambiente de la muestra en *sudan black* 1% (Panreac) en OH al 70%, para reducir la autofluorescencia del tejido, y después 3 lavados con TBS 1x durante 5 minutos. Se incubó la muestra a temperatura ambiente durante 10 minutos con una solución de marcaje DAPI (TermoFisher) diluida 1/10000 en TBS y la preparación se cubrió con medio de montaje especial para fluorescencia (56mM glicina, 5.25mM NaOH, 87mM NaCl, 4.6mM NaN<sub>3</sub>, 0.24M Propil gallato en 70% de glicerol), un cubreobjetos y se selló con esmalte.

**Tabla 14. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en la inmunofluorescencia. La dilución de los anticuerpos se realizó en TBS 1x (132mM NaCl, 20mM Tris pH 7.5, 0.1% Tween 20)**

Anticuerpo	Tipo de anticuerpo	Especie de origen	Dilución	Tipo de marcaje	Casa comercial
<b>Anti-SERPINE1, clone 1D5 (IgG)</b>	Primario	Mouse	1/200	–	Abnova
<b>Anti-GFP (IgY)</b>	Primario	Chicken	1/250	–	AVES
<b>Anti-KU-80/HNA (IgG)</b>	Primario	Rabbit	1/400	–	Cell Signaling
<b>Anti-chicken (IgY)</b>	Secundario	Donkey	1/50	Alexa Fluor 488	Jackson
<b>Anti-mouse (IgG)</b>	Secundario	Donkey	1/200	Cyanine 3	Jackson
<b>Anti-rabbit (IgG)</b>	Secundario	Donkey	1/200	Alexa Fluor 647	Jackson

Las muestras sobre las que se realizó la inmunofluorescencia se analizaron y se tomaron imágenes para su posterior cuantificación en un microscopio confocal (*Confocal TCS SPE*, Leica), haciendo uso

del programa LAS AF (Leica). Se analizaron un total de 3 tumores primarios generados por cada línea celular y se tomaron 5 imágenes a 200 aumentos de las zonas donde se observó un mayor marcaje de SERPINA E1. La toma de las imágenes se realizó el mismo día y con el mismo microscopio y láseres, con el objetivo de minimizar la posible variabilidad. Se cuantificó el área total ocupada y la intensidad del marcaje fluorescente correspondiente a SERPINA E1 (Cyanine 3) en cada imagen. Para ello se utilizó la extensión Fiji del programa Image J (<http://fiji.sc/>). Mediante el microscopio confocal se obtuvieron diferentes imágenes correspondientes a un mismo plano xy pero con diferente plano z (en profundidad), y en cada plano z se tomó una imagen a través de 4 canales diferentes. Para la cuantificación, sólo se utilizaron las imágenes obtenidas a través del canal donde se detectaba SERPINA E1 (Cyanine 3). Cada imagen de un mismo plano xy se apiló o fusionó según el método de máxima intensidad (*Z stack\_Max intensity*), se ajustó la escala de la imagen, se aplicó un filtro para eliminar el marcaje inespecífico (Filtro de mediana: 1pixel), se pasó la imagen a escala de grises (mínima intensidad=0, máxima intensidad=255) y se seleccionó el área de interés en función de la intensidad de la señal, de manera que se seleccionará el marcaje correspondiente a SERPINA E1 pero no zonas con marcaje inespecífico. Se estableció el mismo valor umbral mínimo y máximo para todas las imágenes, tanto de una línea celular como de la otra y se cuantificó el área ocupada por el marcaje de SERPINA E1 (en  $\mu\text{m}^2$ ) y su intensidad media (en escala de grises, expresado como unidades arbitrarias) en cada una de las imágenes analizadas.

## 2.5. Caracterización fenotípica del tumor primario

### 2.5.1. Análisis de apoptosis mediante conteo de cuerpos apoptóticos por tinción fluorescente DAPI

Se analizó el número de células apoptóticas mediante tinción fluorescente DAPI con respecto al total de células en el tumor primario generado por la línea UM-SCC-74B o por la línea 74BserpE1up en las lenguas de ratones NSG. Se utilizaron las lenguas reseccionadas de 3 ratones implantados con la línea UM-SCC-74B y de 3 ratones implantados con la línea 74BserpE1up. Tras la resección de las lenguas, estas se cortaron longitudinalmente, se fijaron, se parafinaron, se cortaron y se colocaron sobre portaobjetos convencionales (explicado en el apartado 2.4.2). A partir de aquí se desparafinaron, se rehidrataron (explicado anteriormente) y se cubrieron con el reactivo *ProLong®Gold Antifade DAPI* (Life Technologies), protegiéndolas de la luz. Tras dejarlas 24h a 4°C en oscuridad, se observaron a través del filtro DAPI del microscopio Olympus BX53 activando la lámpara de fluorescencia U-HGLGPS (Olympus). Se tomaron 8 imágenes a 400 aumentos correspondientes a diferentes zonas del tumor primario presente en la lengua de cada ratón. Se utilizó la cámara digital Olympus DP73 y se procesaron haciendo uso del programa *CellD Imaging 3.3* (Olympus). A través del programa ImageJ 1.51f (Wayne Rasband, National Institutes of Health), se contabilizó el número de células viables y el

número de células en apoptosis (condensación nuclear en agregados) y se estableció el porcentaje de células apoptóticas (**Porcentaje de células apoptóticas** = (Número células apoptóticas / (Número células apoptóticas + Número de células viables)) x100) para cada imagen.

### 2.5.2. Cuantificación de crecimiento invasivo mediante *Tumor Budding*

Publicaciones recientes han establecido que *Tumor budding* es un tipo de crecimiento invasivo presente en el CECC y está caracterizado por la presencia de células individuales o grupos aislados de células (<5 células) en el estroma del frente invasivo del tumor. Para la cuantificación de estas células o grupos de células aisladas, se utilizaron las preparaciones de inmunohistoquímica de vimentina (explicado en el apartado 2.4.3) correspondientes al fragmento de las lenguas reseccionadas que contenía el tumor primario de ratones NSG implantados con la línea UM-SCC-74B o con la línea 74BserpE1up. Se seleccionaron 6 imágenes a 400 aumentos del frente invasivo (zonas tumorales más avanzadas que limitaban el tumor primario del tejido no tumoral) donde se cuantificó la presencia de grupos de células aislados formados por 1-5 células tumorales, a partir de 3 ratones implantados con cada línea. El microscopio utilizado para la toma de las imágenes se trataba de un Olympus BX53 con una cámara DP73 y el *software CellD Imaging 3.3* (Olympus). El conteo de los grupos de células se realizó manualmente con ayuda del software libre ImageJ 1.51f (Wayne Rasband, National Institutes of Health).

### 2.5.3. Determinación del ratio tumor-estroma

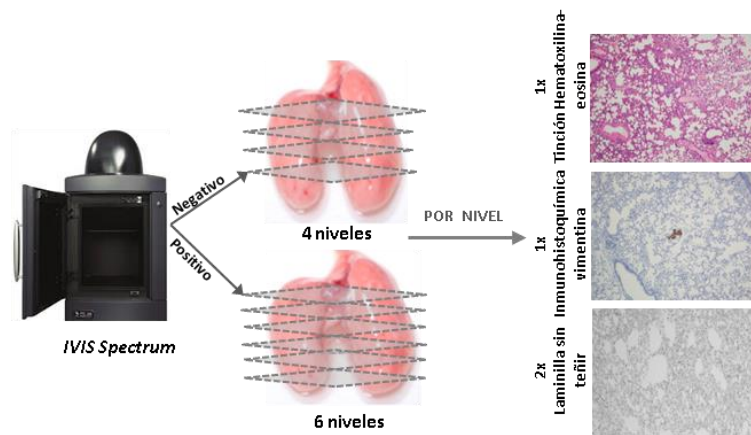
Se utilizaron también las preparaciones de inmunohistoquímica de vimentina del fragmento de las lenguas reseccionadas que contenía el tumor primario de ratones NSG implantados con la línea UM-SCC-74B o con la línea 74BserpE1up. El marcaje de vimentina sólo reconocía la vimentina humana (expresada por las células tumorales) y no por las células del estroma, de origen murino. En este caso se seleccionaron 4 zonas centrales del tumor primario alejadas del frente invasivo. Se analizaron las lenguas de 6 ratones implantados con cada línea celular y de cada lengua se tomaron 4 imágenes a 200 aumentos. De nuevo, se utilizó el microscopio Olympus BX53 con la cámara DP73 y el *software CellD Imaging 3.3* (Olympus). Se seleccionaron las áreas sin teñir con vimentina, correspondientes con el estroma del tumor, de cada imagen, marcando sus perímetros y el software realizó el cálculo del área en  $\mu\text{m}^2$ . Se realizó el sumatorio de todas las áreas y se determinó el área total de estroma por imagen. Por imagen, se calculó el porcentaje de estroma observado en función del área total de cada imagen (**Porcentaje área de estroma** = (Área estroma/Área total) x100) y este valor se restó al 100% para obtener el porcentaje de tumor, concepto definido como ratio tumor-estroma.

## 2.6. Determinación de las metástasis a distancia

En los experimentos *in vivo* de implantación ortotópica, se analizó la presencia y distribución de células tumorales en otras localizaciones alejadas del sitio de implantación del tumor primario (metástasis a distancia). Los órganos objeto de estudio en las metástasis a distancia generadas por los CECC fueron los pulmones y el hígado.

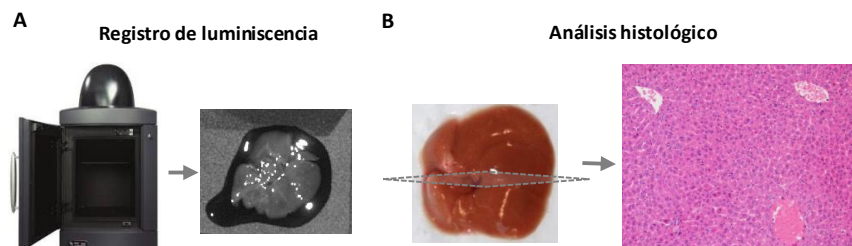
Como se ha explicado anteriormente, en el momento del sacrificio los órganos se registraron *ex vivo* en el *IVIS Spectrum* mediante la determinación de emisión de luminiscencia, y se procesaron mediante técnicas histológicas para su conservación y análisis.

En relación con los pulmones de los ratones implantados ortotópicamente con las líneas UM-SCC-74B o 74BserpE1up, se utilizaron dos estrategias para mejorar la detección de focos de pequeño tamaño (focos formados por 1-5 células tumorales) y estudiar la dispersión de las células tumorales dentro del órgano. Una de las estrategias se basó en la elevada expresión que presentaron ambas líneas celulares de la proteína vimentina y consistió en realizar inmunohistoquímicas empleando un anticuerpo que reconocía exclusivamente la vimentina humana, lo que nos permitió distinguir específicamente las células tumorales con respecto al tejido del ratón (incluso grupos de 1 a 3 células). La otra estrategia consistió en analizar diferentes secciones o niveles histológicos de un mismo pulmón y así poder estudiar la dispersión de las células tumorales dentro del pulmón. En cada nivel se realizaron 8 cortes de tejido secuenciales repartidos en 4 portaobjetos (2 cortes por portaobjetos). Los dos primeros cortes de cada nivel se tiñeron con hematoxilina-eosina, los dos segundos se utilizaron para realizar una inmunohistoquímica de vimentina y los cuatro restantes se reservaron para posteriores análisis de expresión de otras moléculas. El número de niveles o zonas analizadas de cada pulmón dependió de la presencia o no de señal de luminiscencia durante el registro *ex vivo* tras el sacrificio de los ratones. De los pulmones que no presentaron señal de luminiscencia *ex vivo*, se analizaron 4 niveles mientras que de los pulmones que si presentaron señal de luminiscencia en el momento del sacrificio, se analizaron 6 niveles (**Figura 28**), siguiendo los cortes de cada nivel el mismo procesamiento en todos los casos (explicado en el apartado 2.4.2). En cada nivel de pulmón se contabilizó el número de focos y el tamaño de dichos focos (expresado como área en  $\mu\text{m}^2$ ), tanto en la preparación teñida con hematoxilina-eosina como en la preparación de inmunohistoquímica de vimentina.



**Figura 28.** Representación del análisis y procesamiento que se realizó con el pulmón de cada ratón tras el sacrificio. En primer lugar los pulmones se registraron en el *IVIS Spectrum* y aquellos que presentaron señal de luminiscencia, se cortaron en 6 niveles, realizándose 1 tinción de hematoxilina-eosina, 1 inmunohistoquímica de vimentina y 2 laminillas sin teñir por cada nivel. Los pulmones negativos en señal de luminiscencia se procesaron de la misma manera pero sólo realizando 4 niveles.

En el caso de los hígados, también se realizó un registro de señal de luminiscencia *ex vivo* en el *Ivis Spectrum* tras el sacrificio de los ratones. Posteriormente, los hígados se fijaron y procesaron mediante técnicas histológicas para su conservación y posterior análisis (explicado en el apartado 2.4.2). En la última etapa del procesamiento, cada hígado se desbastó hasta llegar a la zona central y de ahí se obtuvieron dos cortes de tejido hepático que se tiñeron con hematoxilina-eosina en la misma preparación. Se determinó la presencia y el número de focos de células tumorales a nivel hepático a través del análisis en el microscopio de estos dos cortes de tejido y/o la presencia de señal de luminiscencia durante el registro *ex vivo* de cada hígado (**Figura 29**).



**Figura 29.** Representación del análisis y procesamiento que se realizó con el hígado de cada ratón tras el sacrificio. (A) En primer lugar el hígado se registró en el *IVIS Spectrum* (Xenogen) y (B) posteriormente se procesó histológicamente hasta obtener una preparación de hematoxilina-eosina que se analizó en el microscopio óptico.

## 2.7. Análisis estadístico

Para comparar las diferencias en el valor de una variable entre dos grupos de ratones, se empleó el test no paramétrico Mann Whitney (p. ej. porcentaje medio de células apoptóticas en los tumores generados por la línea UM-SCC-74B vs 74BserpE1up o número medio de grupos de 1-5 células en el frente invasivo de los tumores (*tumor budding*) generados por la línea UM-SCC-74B vs 74BserpE1up). En algunos casos los datos se representaron gráficamente mediante un diagrama de cajas para mostrar la distribución de los datos de la variable de estudio, pertenecientes a uno y otro grupo objeto de comparación.

Para analizar si hay diferencias entre diferentes medidas de un mismo individuo a lo largo del tiempo en relación con una variable determinada (ej. Incremento de la intensidad de luminiscencia de un mismo ratón a lo largo del tiempo) se utilizó el test no paramétrico para muestras relacionadas, el test de Friedman.

Para estudiar las diferencias entre dos grupos de ratones en relación a dos categorías de una misma variable (variable categórica) (p. ej. número de ratones con metástasis ganglionar del grupo implantado con la línea UM-SCC-74B vs el grupo implantado con 74BserpE1up), los datos se representaron a través de una tabla de contingencia y se aplicó el test de Fisher, cuando alguna de las categorías presentó una frecuencia absoluta inferior a 5, o el test Chi-cuadrado, cuando todas las categorías presentaron una frecuencia igual o superior a 5. Cuando la variable se dividió en más de dos categorías, se aplicó el test Chi-cuadrado, independientemente de si la frecuencia de alguna de las categorías fue inferior a 5 o no.

Para la realización de todos estos test estadísticos se utilizó el programa IBM® SPSS® Statistics v.22.

### 3. ANÁLISIS DE MUESTRAS DE PACIENTES CON CECC

#### 3.1. Características de los pacientes y seguimiento clínico

Durante la realización de esta tesis, se trabajó con dos tipos de muestras de pacientes con CECC confirmado patológicamente, biopsias tumorales parafinadas y biopsias tumorales de tejido fresco, cada una de las cuales se obtuvo de cohortes independientes de pacientes. En ambas cohortes se excluyeron los pacientes en estadios avanzados que presentaron metástasis a distancia en el momento del diagnóstico (M=0). En el caso de las biopsias tumorales parafinadas, las muestras fueron fijadas en formalina al 10% y embebidas en parafina y se obtuvieron de pacientes con CECC en estadios avanzados (III, IVa y IVb) de la enfermedad. Las biopsias se recogieron entre 1995 y 2003 en el *Hospital de Santa Creu i Sant Pau* (HSCSP) antes de que los pacientes hubieran iniciado ningún tratamiento. Las muestras que provenían de la otra cohorte de pacientes se trataba de biopsias de tejido fresco de tumores pertenecientes a pacientes tratados en el HSCSP (n=167) y en Hospital Moises Broggi (n=23) desde 2002 hasta 2012. También se recogieron biopsias de tejido fresco de áreas sin lesiones visibles de pacientes con CECC (n=24).

Adicionalmente, se trabajó con un tercer grupo de pacientes con CECC, incluidos en la base de datos *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) (<http://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/>), donde se incluía información sobre el nivel de expresión de SERPINA E1 en 520 muestras de tumor primario y en 44 mucosas normales. El nivel de expresión de SERPINA E1 contenidos en dicha base de datos se correspondía con los valores normalizados de expresión del nivel 3 de RNASeqv2. Los datos de supervivencia sólo estuvieron disponibles en 507 pacientes.

Algunos de los conceptos relacionados con el seguimiento clínico de los pacientes que se utilizaron al estudiar estas tres cohortes de pacientes fueron, supervivencia libre de recidiva local (SLRL), definida como el tiempo desde que el paciente inició el tratamiento hasta que se volvió a detectar tumor en la misma localización donde se originó el tumor inicial. La supervivencia libre de progresión (SLP) se definió como el tiempo desde que el paciente inició el tratamiento hasta que sufrió una progresión del tumor. Se considera progresión tumoral cuando se produce un aumento del tamaño tumoral del 25% o superior o bien, por la aparición de nuevas lesiones (recidiva local o regional o metástasis a distancia). La supervivencia específica de cáncer (SEC) se definió como el tiempo desde que el paciente es diagnosticado hasta que este muere debido al CECC.

## 3.2. RECOGIDA Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

### 3.2.1. Recogida y procesamiento de biopsias de tejido fresco

Las biopsias tumorales y no tumorales de tejido fresco se obtuvieron por especialistas del Servicio de Otorrinolaringología del *Hospital de la Santa Creu i Sant Pau*, mediante endoscopia de pacientes con CECC antes de que iniciasen el tratamiento. Para evitar la degradación del RNA, las muestras recién extraídas se introdujeron en una solución de RNA *later* (Invitrogen) y se congelaron introduciéndolas en un baño frío de isopentano, *histobath* (ThermoFisher). Las biopsias se almacenaron en nitrógeno líquido hasta el momento de ser procesadas. Una parte de la biopsia se utilizó para confirmar, mediante diagnóstico histopatológico, la presencia de células tumorales. Las muestras que no presentaron un elevado porcentaje de tejido tumoral (>80%) se excluyeron del estudio. Las biopsias de mucosa normal se obtuvieron de localizaciones alejadas del tumor primario, donde no se apreciaba clínicamente ninguna alteración, y posteriormente, se confirmó que las 24 mucosas sólo contenían tejido normal mediante análisis histopatológico.

A partir de las biopsias congeladas se extrajo el RNA que se utilizaría para la determinación de los niveles de expresión de SERPINA E1 mediante PCR cuantitativa. Para la extracción de RNA, las muestras congeladas se cortaron con ayuda de un bisturí frío y siempre sobre hielo seco para evitar su descongelación y la posible degradación del RNA. Tras su fragmentación, el tejido se introdujo en un tubo con 200µl de Trizol frío y se disgregó mecánicamente con ayuda de un *pestle*, trabajando siempre sobre hielo. Cuando el tejido se disgregó y la mezcla se volvió homogénea, se añadió Trizol hasta llegar a un volumen final de 1ml. Los tubos con los tumores disgregados y resuspendidos en Trizol se guardaron, como máximo un mes, en el congelador de -80°C hasta que se hizo la extracción de RNA siguiendo el protocolo explicado en el apartado 1.3.1.

Tras la extracción de RNA de las muestras, se realizó una retrotranscripción (explicado en el apartado 1.3.2) y una PCR cuantitativa (apartado 1.3.3). La determinación de los niveles de expresión de RNAm de SERPINA E1 en cada muestra se realizó aplicando el método  $\Delta\Delta Ct$  (explicado en el



apartado 1.3.3), empleando como muestra calibradora los niveles de expresión de SERPINA E1 de la línea celular UM-SCC-22A y como gen endógeno, el gen HPRT1.

### 3.2.2. Inmunohistoquímica y determinación de los niveles de expresión de SERPINA E1 en biopsias parafinadas

Las biopsias parafinadas de pacientes con CECC se cortaron en fragmentos de 5µm de grosor, se desparafinaron en xileno (3 incubaciones de 10 minutos cada una) y se rehidrataron sumergiéndolas en soluciones de concentración decreciente de etanol (100%, 96%, 80%, 70% y 50%), como se ha explicado anteriormente. La recuperación antigénica se realizó incubando las muestras en una solución de recuperación Tris/EDTA a pH 9 (Dako) y autoclavadas durante 10 minutos a 121°C. La peroxidasa endógena del tejido se inactivó incubando las muestras en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-SERPINE1 (clon 1D5; Abnova) diluido 1/200, durante 1 hora a temperatura ambiente. El revelado se realizó con el reactivo EnVision TM FLEX y FLEX+ (Dako) realizando los procedimientos estándar descritos anteriormente (apartado 2.4.3). Como controles positivos se emplearon dos muestras quirúrgicas de cabeza y cuello y un bloque celular de la línea SCC-9 que sobre-expresaba SERPINA E1. Como control negativo se emplearon las mismas muestras pero sustituyendo la incubación con el anticuerpo primario por suero de ratón no inmunizado.

Dos observadores independientes analizaron las inmunohistoquímicas de SERPINA E1 de las biopsias tumorales analizadas a través de un microscopio Olympus BX53. Se determinaron los niveles de expresión proteica de SERPINA E1 a través de dos parámetros, el porcentaje de células positivas (0-100%) y la intensidad de tinción global (1: sin tinción o débil; 2: moderada; 3: fuerte). Se analizaron eligiendo aleatoriamente 5 campos del microscopio a un aumento de 100X por cada muestra. La expresión de SERPINA E1 solo se analizó en células tumorales. Los dos observadores coincidieron en el 95% de las muestras, el resto de muestras se re-evaluaron y se tomó una decisión consensuada entre ambos observadores. Las imágenes se tomaron usando una cámara digital Olympus DP73 y se procesaron a través del programa CellID Imaging 3.3 (Olympus).

### 3.3. Estudio de la asociación entre niveles de SERPINA E1 y la evolución clínica de los pacientes

Mediante el análisis basado en Árboles de Clasificación y Regresión (ACR), se estableció el valor umbral correspondiente al nivel de expresión de SERPINA E1 más adecuado, con mayor sensibilidad y especificidad, para establecer dos grupos de pacientes con diferente riesgo de recaída asociada al CECC. En base a este análisis se definieron dos grupos de pacientes, un grupo de pacientes con niveles elevados de expresión de SERPINA E1 y un grupo de pacientes con niveles bajos de expresión de SERPINA E1 y que se asociaron con el riesgo de recaída de los pacientes. Este tipo de análisis se utilizó

tanto en el análisis basado en los niveles relativos de RNAm de SERPINA E1 en las muestras de tejido fresco como en el estudio con los datos extraídos de la base de datos del TCGA.

Los test para variables categóricas, de Fisher (dos categorías en cada variable) o Chi-cuadrado (alguna variable con más de 2 categorías) se utilizaron para estudiar la relación entre algunas características de los pacientes, como sexo, edad, localización del tumor, tamaño del tumor, estado de los nódulos linfáticos, consumo de alcohol y tabaco, tasa de recidiva, con el nivel de expresión de SERPINA E1, a través de la clasificación en dos grupos de pacientes (bajo nivel de expresión de SERPINA E1 o alto nivel de expresión de SERPINA E1), establecidos anteriormente mediante ACR. Se emplearon los conceptos de recidiva local (aparición de un tumor en el mismo sitio anatómico donde se había originado el tumor primario) o recidiva metastásica (aparición de metástasis en ganglios linfáticos o a distancia).

Las curvas de Kaplan Meier y el test Log-Rank se utilizaron para representar y comparar, respectivamente, la supervivencia (SLRL, SLP, SEC) entre grupos de pacientes con diferente nivel de expresión de SERPINA E1. Para estudiar el efecto de otras variables en la supervivencia de los pacientes (SLP y SEC), se aplicó el modelo de regresión de Cox. Las variables analizadas fueron el sexo (hombre o mujer), el tamaño del tumor (T3-T4 o T1-T2), el estado de los ganglios cervicales (positivos o negativos), la edad (menor o mayor de 60 años) y los niveles de expresión de RNAm de SERPINA E1 (alto o bajo). En el caso del estudio prospectivo se aplicó un modelo de Cox multivariado para testar la independencia o no de la influencia de las variables estudiadas en la supervivencia de los pacientes y en el estudio basado en TCGA, se aplicó un modelo univariado y posteriormente uno multivariado.

Para la realización de todos estos test estadísticos se utilizó el programa IBM® SPSS® Statistics v.22.

## IV. RESULTADOS

### 1. SERPINA E1 COMO MARCADOR PRONÓSTICO EN PACIENTES CON CECC

Con el objetivo de confirmar el valor pronóstico de SERPINA E1, identificado en un estudio de microarrays previo (41), como un marcador asociado a la supervivencia de los pacientes con CECC, hemos analizado su expresión en biopsias pre-tratamiento obtenidas de pacientes pertenecientes a tres cohortes independientes. Una primera cohorte de pacientes seleccionada de modo prospectivo, en la que se analizaron los niveles de RNA mensajero de SERPINA E1 mediante PCR cuantitativa; una segunda cohorte seleccionada de modo retrospectivo, en la que se analizaron la expresión de SERPINA E1 mediante técnicas inmunohistoquímicas; y finalmente una tercera cohorte de pacientes incluidos en el proyecto *The Cancer Genome Atlas* (TCGA, <https://gdc-portal.nci.nih.gov/projects/TCGA-HNSC>), donde se analizaron los niveles de expresión de SERPINA E1 obtenidos mediante técnicas de secuenciación masiva de RNA.

#### 1.1. La expresión de la proteína SERPINA E1 se asocia con una mayor tasa de metástasis y una peor evolución clínica en pacientes con CECC

Se determinaron los niveles de expresión proteica de SERPINA E1 en 80 biopsias tumorales parafinadas pertenecientes a pacientes con CECC localmente avanzado antes de que iniciasen el tratamiento y con un seguimiento medio de 68 meses (tabla 15). La determinación del nivel de expresión proteica se realizó mediante análisis inmunohistoquímico. Las muestras fueron observadas en el microscopio por dos investigadores diferentes para determinar el porcentaje de células positivas y la intensidad de la tinción para SERPINA E1. El porcentaje de células positivas para la extensión de SERPINA E1 fue muy similar en todas las muestras, entre el 80% y el 95% de células teñidas, mientras que la intensidad de tinción permitió clasificar los tumores en 3 subgrupos (**Figura 30**). En el subgrupo con baja intensidad de tinción o ausencia de expresión de SERPINA E1, se incluyeron 26 biopsias, en el subgrupo de intensidad intermedia, 25 biopsias y en el subgrupo con intensidad elevada se incluyeron 29 biopsias tumorales.

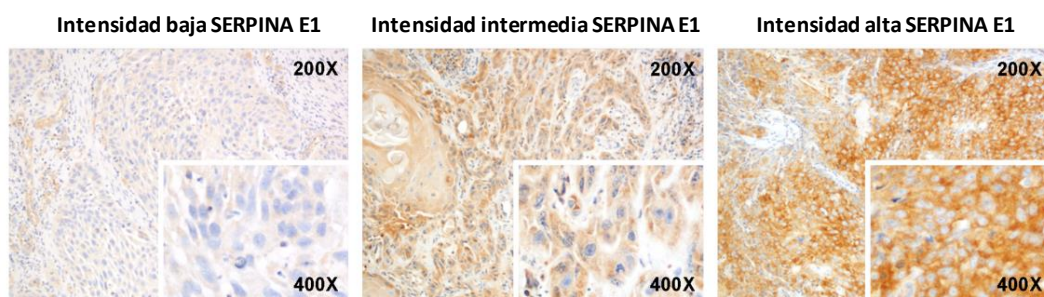


Figura 30. Inmunohistoquímicas de SERPINA E1 de biopsias tumorales pre-tratamiento de pacientes con CECC representativas de cada uno de los 3 subgrupos de tumores con diferente nivel de intensidad de tinción de SERPINA E1.

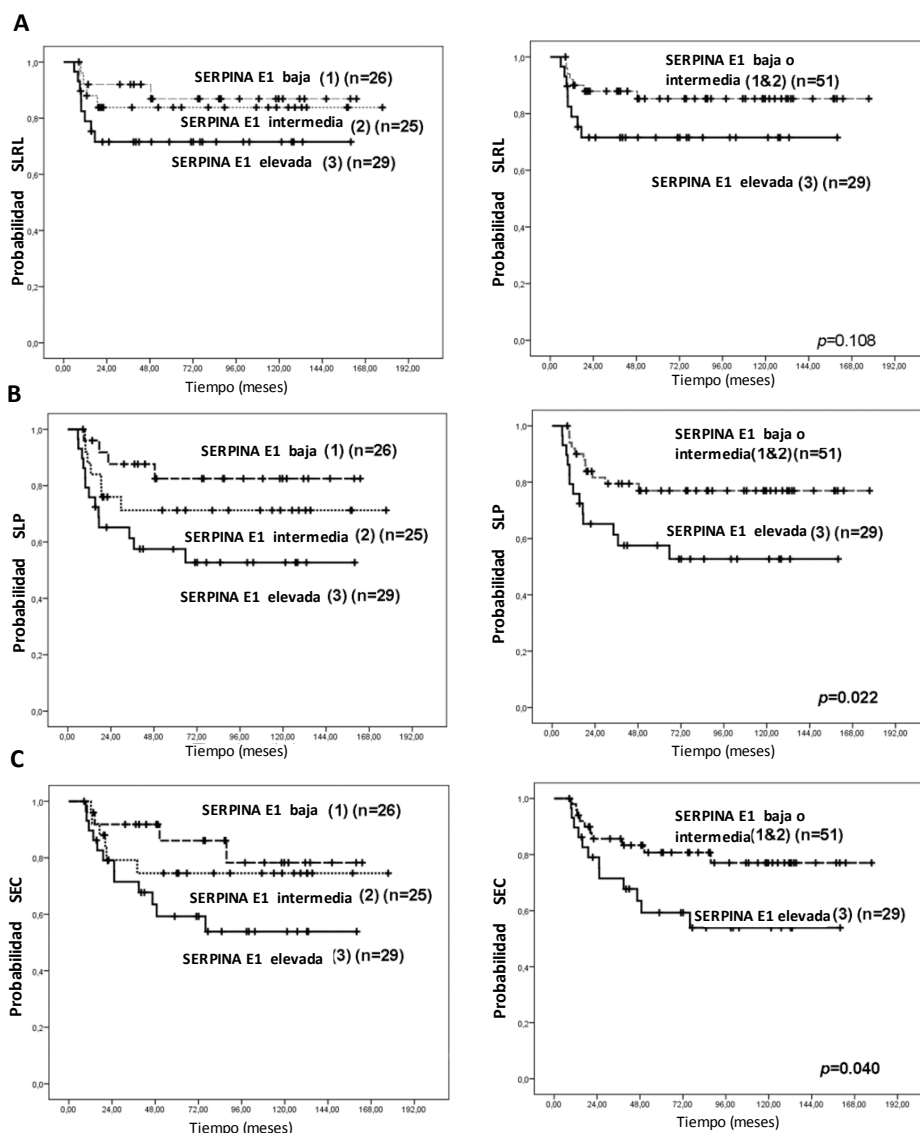
Como se puede observar en la **tabla 15**, se encontraron diferencias significativas en relación con la recidiva metastática entre el grupo con nivel de intensidad elevado de SERPINA E1 y el grupo que incluía las biopsias con nivel intermedio y bajo. En concreto, se encontró una mayor proporción de pacientes que habían sufrido recidiva metastática en el subgrupo de pacientes con nivel de expresión elevada de SERPINA E1 en comparación con el subgrupo de expresión intermedia o baja ( $p=0.045$ ).

**Tabla 15. Características de los pacientes incluidos en el análisis basado en los niveles de proteína SERPINA E1 en muestras tumorales parafinadas de pacientes con CECC localmente avanzado (cohorte retrospectiva de pacientes)**

Variable	Pacientes totales (n=80)	Niveles elevados de SERPINA E1 (n=29)	Niveles intermedios o bajos de SERPINA E1 (n=51)	P valor (Test de Fisher/ Chi-cuadrado)
<b>Sexo</b>				
Hombre	76	26	50	0.182
Mujer	4	3	1	
<b>Edad (años)</b>				
<60	30	11	19	0.952
>60	50	18	32	
<b>Localización tumor</b>				
Cavidad oral	7	5	2	0.095
Orofaringe	13	2	11	
Hipofaringe	13	4	9	
Laringe	47	18	29	
<b>Tamaño tumor (T)</b>				
T2	8	4	4	0.690
T3	51	18	33	
T4	21	7	14	
<b>Afectación ganglionar</b>				
Positivo	44	19	25	0.157
Negativo	36	10	26	
<b>Diferenciación tumor</b>				
Bien	6	2	4	0.438
Moderada	67	26	41	
Escasa	7	1	6	
<b>Tabaco</b>				
No fumadores	4	2	2	0.560
<20 cigarros/día	5	1	4	
>20 cigarros/día	70	26	44	
Puro o pipa	1	–	1	
<b>Alcohol</b>				
No bebedor	13	7	6	0.152
<100g/día	32	10	22	
>100g/día	35	12	23	
<b>Recidiva local</b>				
Si	15	8	7	0.111
No	65	21	44	
<b>Recidiva metastática</b>				
Si	9	6	3	<b>0.045</b>

No	71	23	48	
<b>Tratamiento</b>				
Radioterapia	42	16	26	0.720
Cirugía +/- radio	38	13	25	

La niveles proteicos de SERPINA E1 en las biopsias tumorales, se asociaron significativamente con la supervivencia libre de progresión (SLP) (**Figura 31B**) y con la supervivencia específica de cáncer (SEC) de los pacientes (**Figura 31C**). Los pacientes cuyos tumores presentaron niveles proteicos altos de SERPINA E1 tuvieron una supervivencia libre de progresión ( $p=0.022$ ) y una supervivencia específica de cáncer ( $p=0.040$ ) más corta que el grupo de pacientes con tumores cuya expresión proteica de SERPINA E1 fue intermedia o baja. Aunque el grupo de pacientes con niveles de expresión de SERPINA E1 intermedia y baja presentó una mayor supervivencia libre de recidiva local que el grupo de expresión alta, las diferencias no alcanzaron la significancia ( $p=0.108$ ) (**Figura 31A**).



**Figura 31. Niveles elevados de proteína SERPINA E1 se asocian con una evolución clínica desfavorable en pacientes con CECC.** El grupo de pacientes con intensidad de tinción de SERPINA E1 alta presentó diferencias significativas con el grupo de intensidad intermedia y baja con respecto a la supervivencia libre de progresión (SLP) (**B**) y supervivencia específica de cáncer (SEC) (**C**), pero no con respecto a la supervivencia libre de recidiva local (SLRL) (**A**) ( $p=0.022$ ,  $p=0.040$ ,  $p=0.108$ , Test Log-Rank).

Adicionalmente, se analizó el efecto de la presencia de muestras de orofaringe VPH positivas en la población de estudio en relación con el nivel de SERPINA E1 y la evolución clínica de los pacientes. Sólo una de las muestras de orofaringe fue VPH positiva y se incluyó dentro del subgrupo con niveles elevados de expresión de SERPINA E1. La SLP de los pacientes siguió siendo significativamente más corta en el subgrupo de pacientes con niveles elevados de SERPINA E1 cuando se excluyó del análisis la muestra de orofaringe VPH positiva ( $p=0.015$ ).

## 1.2. Los niveles de RNA mensajero de SERPINA E1 se asocian con una elevada tasa de metástasis y una evolución clínica desfavorable en pacientes con CECC

Para confirmar el papel pronóstico de SERPINA E1, se analizaron los niveles de expresión de RNA mensajero de SERPINA E1 en 190 biopsias tumorales pertenecientes a una serie independiente de pacientes con CECC, con un seguimiento medio de 37 meses (**Tabla 16**). También se analizaron los niveles de expresión en 24 muestras de mucosa normal obtenidas de pacientes con CECC a partir de áreas alejadas del tumor primario y sin lesiones macroscópicas visibles.

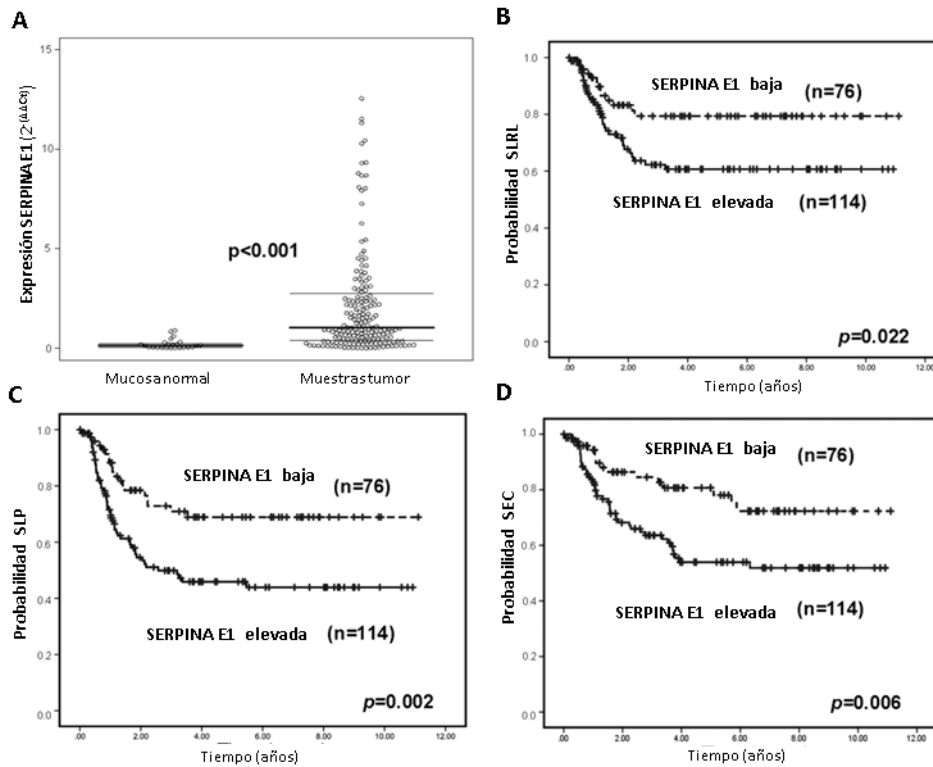
**Tabla 16. Características de los pacientes incluidos en el análisis basado en los niveles de RNA mensajero de SERPINA E1 (cohorte prospectiva de pacientes)**

Variable	Pacientes totales (n=190)	Niveles elevados de SERPINA E1 (n=114)	Niveles bajos de SERPINA E1 (n=76)	P valor (Test de Fisher/Chi-cuadrado)
<b>Sexo</b>				
Hombre	172	105	67	0.363
Mujer	18	9	9	
<b>Edad (años)</b>				
<60	86	53	33	0.677
>60	104	61	43	
<b>Localización tumor</b>				
Cavidad oral	31	17	14	0.391
Orofaringe	65	43	22	
Hipofaringe	22	15	7	
Laringe	62	39	33	
<b>Tamaño tumor (T)</b>				
T1	12	4	8	0.145
T2	60	34	26	
T3	73	45	28	
T4	45	31	14	
<b>Afectación ganglionar</b>				
Positivo	111	73	38	0.054
Negativo	79	41	38	
<b>Grado de diferenciación tumor</b>				
Diferenciado	13	5	8	0.085
Moderadamente	163	99	64	
Poco diferenciado	14	10	4	
<b>Tabaco</b>				
No fumadores	14	7	7	0.687
<20 cigarrillos/día	28	15	13	

>20 cigarros/día	146	91	55	
Puro o pipa	2	1	1	
<b>Alcohol</b>				
No bebedor	34	16	18	<b>0.037</b>
<100g/día	81	45	36	
>100g/día	75	53	22	
<b>Recidiva local</b>				
Si	49	36	13	<b>0.028</b>
No	141	78	63	
<b>Recidiva metastática</b>				
Si	65	46	19	<b>0.029</b>
No	125	68	57	
<b>Tratamiento</b>				
Radioterapia	51	27	24	0.124
Quimio cisp*/radio	74	52	22	
Quimio cetux*/radio	6	4	2	
Cirugía	59	31	28	

\*cisp: cisplatino, \*cetux: cetuximab

La expresión de SERPINA E1 fue significativamente más elevada en muestras de tejido tumoral que en la mucosa normal ( $p < 0.001$ ) (**Figura 32A**). Mediante el uso de árboles de clasificación y regresión (CART), se estableció un valor umbral para separar dos grupos de pacientes en base al nivel de expresión de RNAm de SERPINA E1 en el tumor primario y la probabilidad de recidiva en estos pacientes (nivel de expresión de SERPINA E1  $< 0$  o  $> 0.8$ ). Setenta y seis pacientes presentaron tumores con una expresión baja de SERPINA E1 mientras que 114 pacientes presentaron tumores con una expresión elevada. Se observó una mayor proporción de pacientes con niveles elevados de SERPINA E1 que habían sufrido una recidiva local o una recidiva metastática cuando se comparó con el subgrupo de pacientes con expresión baja ( $p = 0.028$  y  $p = 0.029$ , Test de Fisher, respectivamente) (**Tabla 16**). El consumo de alcohol en estos pacientes también se asoció significativamente con la expresión de SERPINA E1, se encontró una mayor proporción de pacientes con un consumo elevado de alcohol en el subgrupo de pacientes con elevados niveles de SERPINA E1 en comparación con el subgrupo de con niveles bajos ( $p = 0.037$ , Test Chi-cuadrado) (**Tabla 16**).



**Figura 32. Niveles elevados de RNA mensajero de SERPINA E1 se asocian con una evolución clínica desfavorable en pacientes con CECC. (A)** Los niveles de RNAm de SERPINA E1 en muestras tumorales de CECC son significativamente superiores a los de la mucosa normal ( $p < 0.001$ , Test Mann Whitney.) La supervivencia libre de recidiva local (SLRL) **(B)**, libre de progresión (SLP) **(C)** y específica de cáncer (SEC) **(D)** fueron significativamente más bajas en el grupo de pacientes con niveles elevados de RNAm de SERPINA E1 ( $p = 0.022$ ,  $p = 0.002$ ,  $p = 0.006$ , Test Log-Rank).

Los pacientes con niveles elevados de RNAm de SERPINA E1 mostraron un supervivencia libre de recidiva local (SLRL) ( $p = 0.022$ ) **(Figura 32B)**, libre de progresión (SLP) ( $p = 0.002$ ) **(Figura 32C)** y específica de cáncer (SEC) ( $p = 0.006$ ) **(Figura 32D)** más cortas que los pacientes del subgrupo con niveles bajos. Para estudiar la asociación de otras variables clínicas pronósticas utilizadas actualmente en clínica, además de los niveles de expresión de SERPINA E1, se realizó un análisis multivariado basado en el modelo de Cox. La expresión de SERPINA E1 (HR 1.73, IC 95% 1.02-2.92,  $p = 0.042$ ), el tamaño del tumor (HR 2.18, IC 95% 1.29-3.70,  $p = 0.004$ ), y la afectación ganglionar (HR 1.88, IC 95% 1.13-3.16,  $p = 0.016$ ) se identificaron como factores de riesgo independientes en relación con la supervivencia libre de progresión **(Tabla 17)**, de manera que los pacientes con tumor primario de gran tamaño, mayor afectación ganglionar o mayores niveles de expresión RNAm de SERPINA E1 presentaron una supervivencia libre de progresión más baja **(Tabla 17)**. Además, el tamaño del tumor (HR 1.78, IC 95% 0.99-3.18,  $p = 0.050$ ) y la afectación ganglionar (HR 2.23, IC 95% 1.22-4.07,  $p = 0.009$ ) se identificaron como factores de riesgo independientes de la supervivencia de los pacientes. Aunque se observó una tendencia en relación con niveles altos de expresión de RNAm de SERPINA E1 y una supervivencia más corta, el resultado no alcanzó la significancia en el análisis multivariado (HR 1.78, IC 95% 0.98-3.23,  $p = 0.057$ ) **(Tabla 17)**. Cuando se realizó el mismo análisis pero excluyendo los pacientes que habían estado sometidos a cirugía, el tamaño del tumor (HR 2.39, IC 95% 1.29-4.39,  $p = 0.005$ ) y el nivel de



RNAM de SERPINA E1 (HR 1.92, IC95% 1.03-3.59,  $p=0.043$ ) se identificaron como factores de riesgo independiente en relación con la supervivencia libre de progresión en los pacientes tratados con quimio-radioterapia como principal opción de tratamiento, mientras que la presencia o no de afectación ganglionar apareció como factor de riesgo independiente de la supervivencia específica de cáncer (HR 2.41, IC 95% 1.15-5.06,  $p=0.020$ ) en este subgrupo de pacientes (**Tabla 18**).

**Tabla 17. Análisis multivariado basado en el modelo de Cox para el análisis de la supervivencia en pacientes con CECC tratados con quimio-radioterapia y/o sometidos a cirugía (cohorte prospectiva de pacientes)**

Pacientes totales (n=190)	SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN (SLP)		SUPERVIVENCIA ESPECÍFICA DE CÁNCER (SEC)	
	Variable	HR (IC 95%)	p valor	HR (IC 95%)
Sexo	1.02 (0.39-2.61)	0.976	1.76 (0.72-4.30)	0.217
Tamaño tumor (T)	2.18 (1.29-3.70)	<b>0.004</b>	1.78 (0.99-3.18)	<b>0.050</b>
Afectación ganglionar (N)	1.88 (1.13-3.16)	<b>0.016</b>	2.23 (1.22-4.07)	<b>0.009</b>
Edad	0.86 (0.54-1.37)	0.514	0.767 (0.46-1.29)	0.320
SERPINA E1	1.73 (1.02-2.92)	<b>0.042</b>	1.78 (0.98-3.23)	0.057

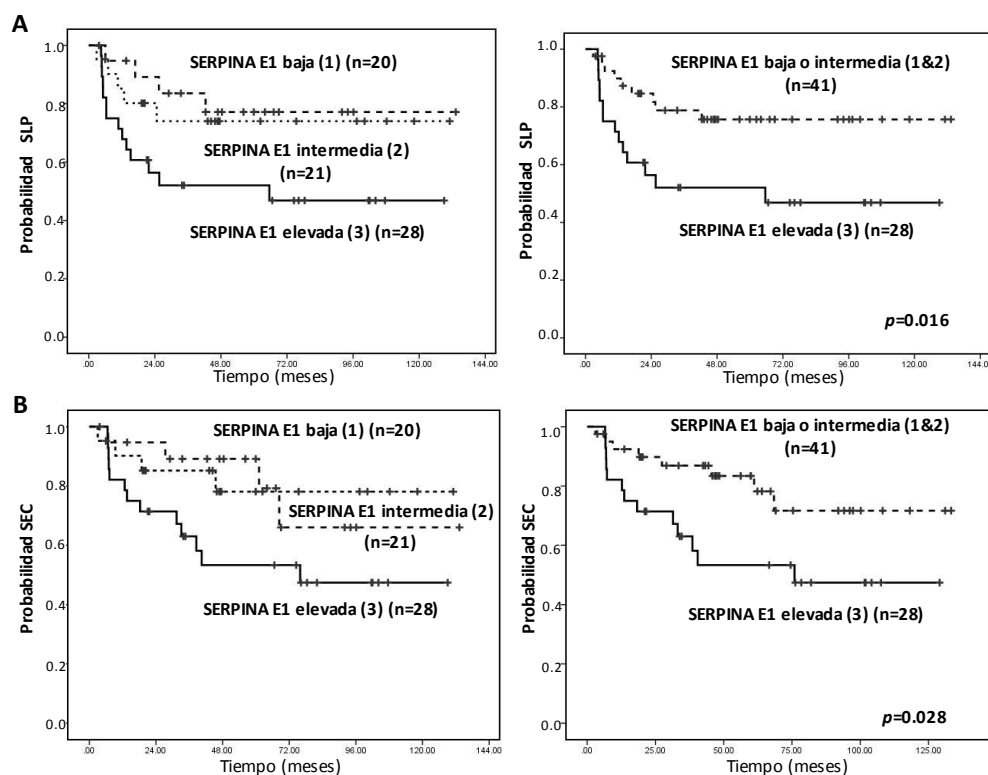
Sexo: hombres vs mujeres; Tamaño tumor: T3-T4 vs T1-T2; Afectación ganglionar: positiva vs negativa; Edad: >60años vs <60años; SERPINA E1: alto vs bajo nivel RNA mensajero  
HR: Hazard Ratio; IC 95%: intervalo de confianza al 95%.

**Tabla 18. Análisis multivariado basado en el modelo de Cox para el análisis de la supervivencia en pacientes con CECC tratados con quimio-radioterapia (cohorte prospectiva de pacientes)**

Pacientes tratados con quimio-radioterapia (n=131)	SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN (SLP)		SUPERVIVENCIA ESPECÍFICA DE CÁNCER (SEC)	
	Variable	HR (IC 95%)	p valor	HR (IC 95%)
Sexo	1.13 (0.39-3.29)	0.976	1.76 (0.58-5.30)	0.317
Tamaño tumor (T)	2.39 (1.29-4.39)	<b>0.005</b>	1.95 (0.97-3.89)	0.059
Afectación ganglionar (N)	1.71 (0.94-3.11)	0.077	2.41 (1.15-5.06)	<b>0.020</b>
Edad	0.83 (0.48-1.44)	0.507	0.84 (0.443-1.59)	0.594
SERPINA E1	1.92 (1.03-3.59)	<b>0.043</b>	1.80 (0.86-3.78)	0.117

Sexo: hombres vs mujeres; Tamaño tumor: T3-T4 vs T1-T2; Afectación ganglionar: positiva vs negativa; Edad: >60años vs <60años; SERPINA E1: alto vs bajo nivel RNA mensajero  
HR: Hazard Ratio; IC 95%: intervalo de confianza al 95%.

Además, para confirmar los resultados obtenidos por PCR cuantitativa mediante una técnica diferente, se analizó el nivel de expresión de SERPINA E1 mediante inmunohistoquímica en un subgrupo de pacientes incluidos en el estudio prospectivo (n=69). El nivel de expresión de SERPINA E1 correlacionó con la SLP y la SEC de los pacientes, de manera que los pacientes con niveles elevados de SERPINA E1 presentaron una SLP ( $p=0.016$ ) y una SEC ( $p=0.028$ ) más cortas que los pacientes cuyos niveles proteicos de SERPINA E1 fueron bajos (**Figura 33**).



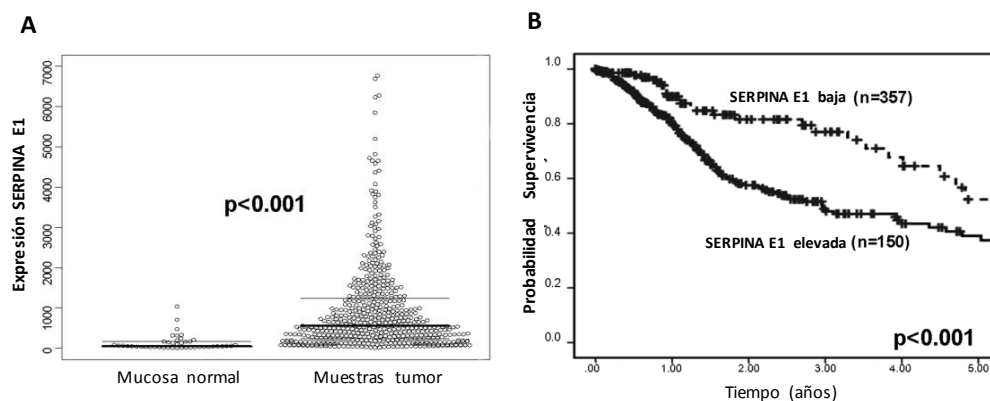
**Figura 33.** Análisis de los niveles de SERPINA E1 por inmunohistoquímica de un subgrupo de pacientes del estudio prospectivo (n=69). **(A)** La supervivencia libre de progresión (SLP) y **(B)** específica de cáncer (SEC) fueron significativamente más cortas en el grupo de pacientes con niveles elevados de SERPINA E1 ( $p=0.016$ ,  $p=0.028$ , Test Log-Rank).

Adicionalmente, se analizó el estado VPH de las muestras incluidas en el estudio prospectivo cuyos pacientes fueron tratados en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Treinta y cinco tumores fueron VPH negativos, 9 fueron VPH positivos y en 20 pacientes el estado VPH no estuvo disponible. El nivel de SERPINA E1 siguió apareciendo como marcador de la SLP cuando se excluyeron los pacientes con tumores VPH positivos y con tumores con estado VPH desconocido. La SLP de los pacientes con tumores VPH negativos fue significativamente más corta en aquellos con niveles elevados de SERPINA E1 cuando se comparó con el subgrupo de niveles bajos ( $p=0.015$ ).

### 1.3. Confirmación del papel pronóstico de SERPINA E1 en una tercera cohorte de pacientes

Se realizó un tercer estudio con muestras de pacientes con CECC basado en los resultados de secuenciación de RNA en tumores primarios obtenidos a partir de una cohorte independiente de 520 pacientes. Los datos se obtuvieron de la base de datos de *The Cancer Genome Atlas* (TCGA, <https://gdc-portal.nci.nih.gov/projects/TCGA-HNSC>), donde también se obtuvo la información correspondiente a la secuenciación de RNA de 44 muestras de mucosa normal. La expresión de SERPINA E1 fue significativamente más elevada en muestras de CECC que en muestras de mucosa normal ( $p<0.001$ ) (**Figura 34A**). De nuevo, mediante el uso de árboles de clasificación y regresión (CART), se estableció un valor umbral para separar dos grupos de pacientes en base al nivel de RNA secuenciado de SERPINA

E1 en el tumor primario y la probabilidad de recidiva en estos pacientes. El análisis de la supervivencia en los pacientes con CECC mostró que los pacientes con tumores que expresaban niveles elevados de RNA de SERPINA E1, tenían una supervivencia más corta que los que presentaban niveles bajos de SERPINA E1 a nivel tumoral ( $p < 0.001$ ) (Figura 34B).



**Figura 34. Estudio de los niveles de expresión de SERPINA E1 en una cohorte de pacientes obtenidos de la base de datos del TCGA. (A)** Los niveles de RNA de SERPINA E1 secuenciados en tumores primarios de pacientes con CECC son superiores con respecto a los de muestras de mucosa normal ( $p < 0.001$ , Test Mann Whitney). **(B)** Curvas de supervivencia de dos subgrupos de pacientes con CECC con diferente nivel de RNA de SERPINA E1 en tumor primario. El subgrupo con expresión alta presentó una supervivencia más corta que el subgrupo con niveles bajos ( $p < 0.001$ , Test Log Rank).

La supervivencia fue significativamente más baja en los pacientes cuyos tumores primarios presentaron niveles altos de SERPINA E1 cuando se comparó con la supervivencia de los pacientes cuyos tumores primarios presentaron niveles bajos, mediante el análisis de Cox univariado (HR: 2.03, IC 95%:1.32-3.10,  $p = 0.01$ ). En el análisis del modelo de Cox multivariado, se identificaron como factores de riesgo independientes de muerte, los niveles de expresión de SERPINA E1 (HR: 1.73, IC 95%: 1.05-2.79,  $p = 0.027$ ) y la presencia o no de afectación ganglionar (en base a un criterio histopatológico) (HR: 1.58, IC 95%: 1.09-2.31,  $p = 0.017$ ). Otras variables clínicas como el sexo, el tamaño del tumor y la edad no se asociaron significativamente con la supervivencia de los pacientes (Tabla 19).

**Tabla 19. Modelo de COX univariado y multivariado donde se analiza el efecto de diferentes variables clínicas y los niveles de RNA de SERPINA E1 en la supervivencia de pacientes con CECC (cohorte de pacientes extraída de la base de datos *The Cancer Genome Atlas*)**

Variable	COX UNIVARIADO		COX MULTIVARIADO	
	HR (IC 95%)	p valor	HR (IC 95%)	p valor
Sexo	1.23 (0.88-1.71)	0.225	1.09 (0.73-1.64)	0.665
Tamaño tumor (T)	1.22 (0.87-1.71)	0.233	1.25 (0.81-1.92)	0.311
Afectación ganglionar	1.62 (1.11-2.35)	<b>0.012</b>	1.58 (1.09-2.31)	<b>0.017</b>
Edad	1.30 (0.94-1.81)	0.112	1.31 (0.89-1.93)	0.169
SERPINA E1	2.03 (1.32-3.10)	<b>0.010</b>	1.725 (1.06-2.79)	<b>0.027</b>

Sexo: hombres vs mujeres; Tamaño tumor: T3-T4 vs T1-T2; Afectación ganglionar analizada por histología positiva vs negativa; Edad: >60años vs <60años; SERPINA E1: alta vs baja expresión  
 HR: Hazard Ratio; IC 95%: intervalo de confianza al 95%.

Por último, se analizó la supervivencia global del subgrupo de pacientes con nivel elevado o con nivel bajo de expresión de SERPINA E1 excluyendo los pacientes con tumores VPH positivos. De las 520 muestras incluidas en el estudio basado en TCGA, 20 tumores fueron VPH positivos. La supervivencia global de los pacientes siguió siendo significativamente más corta en el subgrupo con niveles elevados de SERPINA E1 ( $p=0.001$ ) en el conjunto de muestras VPH negativas.

## 2. SERPINA E1 EN LA PROLIFERACIÓN, MIGRACIÓN Y CITITOXICIDAD DE LÍNEAS CELULARES DE CECC

En base a los resultados obtenidos en las muestras de pacientes con CECC, en relación con niveles elevados de expresión de SERPINA E1 y la evolución desfavorable de los pacientes, se decidió estudiar la posible implicación causal de SERPINA E1 en diferentes mecanismos relacionados con agresividad tumoral. Para ello, se analizaron los niveles de expresión de SERPINA E1 en diferentes líneas celulares de CECC y, tras sobre- o infra-expresar dicha proteína en algunas de estas líneas, se realizaron diferentes ensayos funcionales.

### 2.1. Niveles de expresión de SERPINA E1 en líneas celulares de CECC

Se analizaron los niveles de expresión de SERPINA E1 en diferentes líneas de CECC (UM-SCC-22A, UM-SCC-74B, UM-SCC-22B, SCC-9, FaDu y SCC-25) mediante PCR cuantitativa. El nivel medio de expresión relativa ( $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ ) de SERPINA E1 en las 6 líneas celulares fue de 15.49, encontrándose en un rango de 1.00-69.24. El nivel de expresión de cada línea se relativizó en base al nivel de la línea UM-SCC-22A y se utilizó como gen endógeno el gen HPRT1. La línea que presentó mayores niveles de RNAm fue la línea SCC-9, mientras que el resto de líneas presentaron niveles más bajos y similares entre ellas (Figura 35).

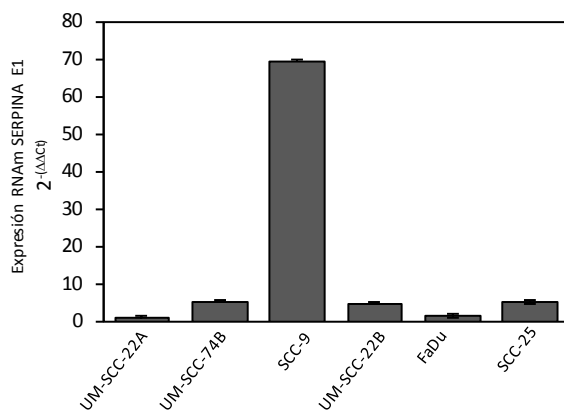
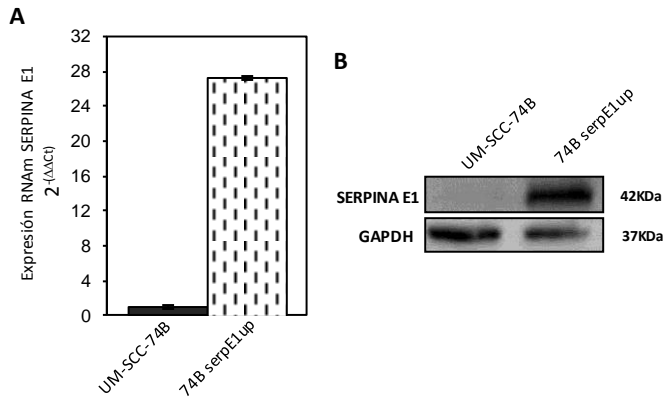


Figura 35. Nivel de expresión relativa de SERPINA E1 en 6 líneas celulares de CECC determinados por PCR cuantitativa, tomando como referencia los niveles de expresión de la línea UM-SCC-22A.

En base a estos resultados, se seleccionó la línea SCC-9, con los niveles más elevados de expresión de SERPINA E1, para infra-expresar dicha proteína y realizar diferentes ensayos funcionales con las nuevas líneas generadas. En cambio, la sobre-expresión de SERPINA E1 se realizó con el resto de líneas celulares, con unos niveles más bajos que la SCC-9 y similares entre ellas, pero solo se consiguió mantener una población que sobre-expresara de manera estable dicha proteína con la línea UM-SCC-74B.

## 2.2. Efecto de la sobre-expresión de SERPINA E1 en la tasa de proliferación, la capacidad de migración y la resistencia a cisplatino en células de CECC

La sobre-expresión de SERPINA E1 se consiguió de manera estable tras la transducción lentiviral de la línea UM-SCC-74B con el plásmido pFUGW\_SERPINA E1, generándose la línea 74BserpE1up. El nivel de expresión de SERPINA E1 en la nueva línea celular generada se comprobó mediante PCR cuantitativa y *western blot*, comparando los niveles de expresión de SERPINA E1 de la línea 74BserpE1up con los de la línea parental UM-SCC-74B (Figura 36A y 36B).



### 2.2.1. El aumento en la expresión de SERPINA E1 estimula la migración de las células tumorales

Para comprobar el efecto de la sobre-expresión de SERPINA E1 en células tumorales de CECC, se realizó un ensayo *transwell* de migración a través de una membrana porosa. Se encontraron diferencias significativas en la capacidad de migración de la línea parental UM-SCC-74B en comparación con la de las células de la línea 74BserpE1up, con mayores niveles de expresión de SERPINA E1 ( $p < 0.01$ , Test Mann Whitney) (Figura 37). En concreto, la migración de las células de la línea 74BserpE1up tras 24 horas de incubación, fue superior al de la línea UM-SCC-74B, por lo que la sobre-expresión de SERPINA E1 favoreció la migración de las células tumorales.

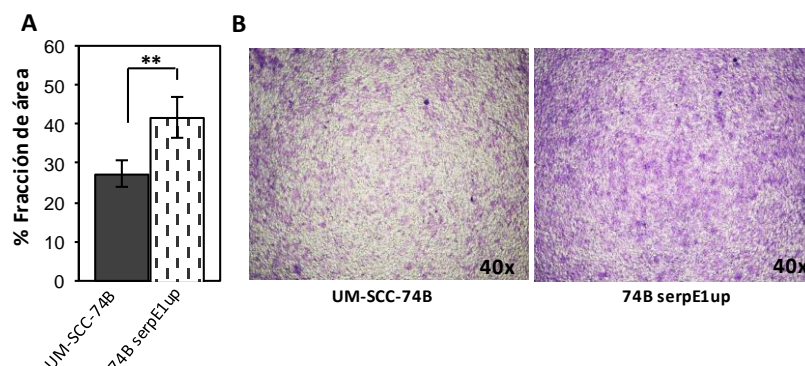
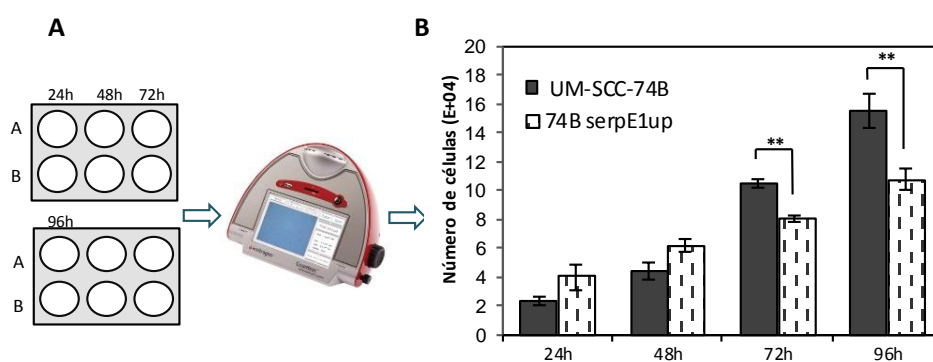


Figura 37. Ensayo de migración realizado con la línea celular UM-SCC-74B y la línea transducida con pFUGW\_SERPINA E1, 74BserpE1up. (A) Histograma donde se muestran los valores medios de fracción del área ocupada del *transwell* por las células que migran a través de los poros de la membrana desde la cámara de incubación superior a la inferior. Las barras representan la desviación estándar de las réplicas realizadas con cada línea celular (\*\* $p < 0.01$ , Test Mann-Whitney). (B) Imágenes representativas de la superficie de membrana atravesada por las células, teñidas con cristal violeta, de las dos líneas celulares estudiadas. Magnificación original 40x.

### 2.2.2. La sobre-expresión de SERPINA E1 disminuye la capacidad proliferativa de las células tumorales de CECC

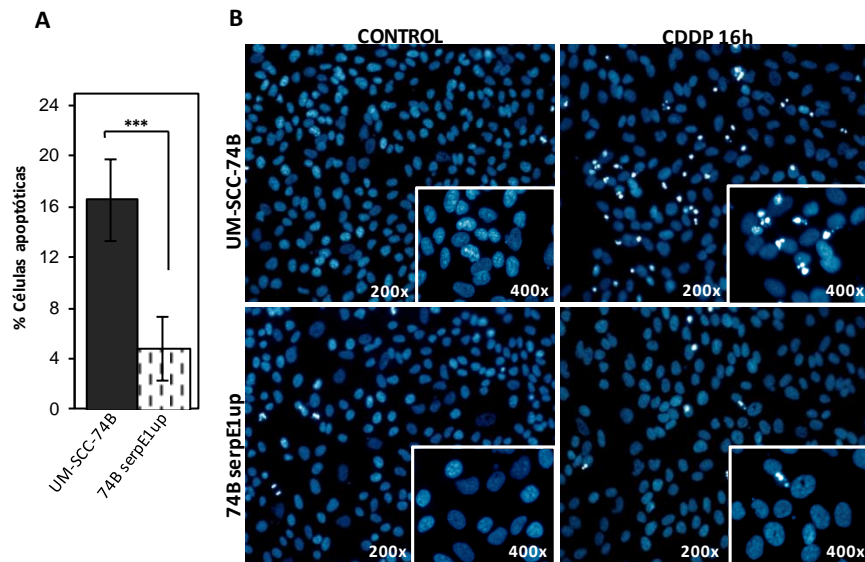
Se evaluó la tasa de proliferación de la línea UM-SCC-74B, con niveles basales de expresión de SERPINA E1, y la de la línea 74BserpE1up. Se sembraron  $3.5 \times 10^4$  células tumorales de cada una de las líneas y se contabilizó el número de células a diferentes tiempos desde el momento de la siembra, cada 24 horas hasta llegar a las 96 horas (**Figura 38A**). Como se observa en la **figura 38B**, se encontraron diferencias significativas en el número medio de células a las 72h ( $p < 0.01$ ) y a las 96h tras la siembra ( $p < 0.01$ , Test Mann Whitney) entre las líneas con diferentes niveles de expresión de SERPINA E1, siendo más bajo, en ambos puntos, el número de células de la línea con mayores niveles de expresión de SERPINA E1 (74BserpE1up). Por tanto, la sobre-expresión de SERPINA E1 disminuyó la proliferación de las células tumorales.



**Figura 38. Ensayo de proliferación realizado con la línea celular UM-SCC-74B y la línea transducida con pFUGW\_SERPINA E1, 74BserpE1up.** (A) Esquema del diseño experimental de cada ensayo de proliferación, siembra en placas de 6 pocillos y conteo del número de células en un contador automático (Countess, Invitrogen). (B) Histograma que muestra el número medio de células contadas a las 24, 48, 72 y 96 horas desde la siembra, así como las barras de desviación estándar asociadas a cada conjunto de valores (\*\* $p < 0.01$ , Test Mann-Whitney).

### 2.2.3. Las células que presentan mayores niveles de expresión de SERPINA E1 son más resistentes al tratamiento con cisplatino

Cuando se comparó el número de células apoptóticas pertenecientes a la línea UM-SCC-74B o a la línea 74BserpE1up, tras el tratamiento durante 16 horas con  $15 \mu\text{M}$  de cisplatino, se encontraron diferencias significativas entre ambas líneas con diferente nivel de expresión de SERPINA E1 ( $p < 0.001$ , Test Mann Whitney) (**Figura 39A**). En concreto, el número de células apoptóticas fue superior en el grupo tratado de la línea UM-SCC-74B, demostrando que la sobre-expresión de SERPINA E1 hace a las células más resistentes a la apoptosis inducida por cisplatino. En la **figura 39B** se muestran imágenes representativas de células de la línea UM-SCC-74B o de la línea 74BserpE1up tratadas con  $15 \mu\text{M}$  de cisplatino o sin tratar, marcadas con DAPI y observadas en el microscopio de fluorescencia.

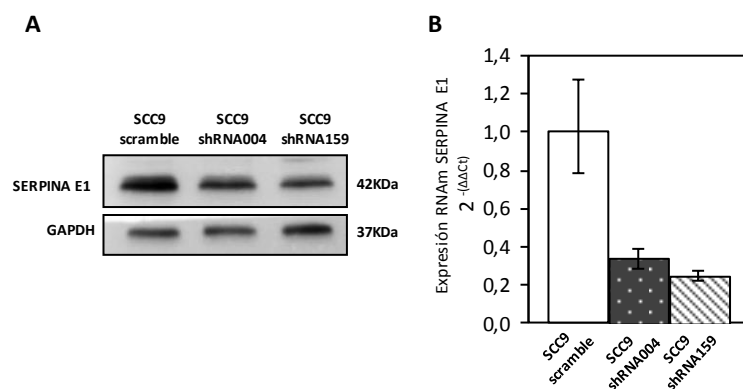


**Figura 39.** Estudio del efecto del tratamiento con cisplatino (CDDP) en la línea que sobre-expresa SERPINA E1, 74BserpE1up, y en la línea parental, UM-SCC-74B. (A) Histograma donde se muestra el número medio de células apoptóticas para cada una de las líneas celulares (\*\*\*)  $p < 0.001$ , Test Mann-Whitney). (B) Imágenes teñidas con DAPI representativas de células tratadas durante 16h con cisplatino (CDDP 16h) y de células sin tratar (control) para la línea UM-SCC-74B y la línea 74BserpE1up (magnificación original x200 o x400 según la imagen).

### 2.3. La infra-expresión de SERPINA E1 influye en la tasa de proliferación, la capacidad de migración y la sensibilidad a cisplatino en células de CECC

Para confirmar el efecto de SERPINA E1 a nivel funcional, tras realizar diferentes ensayos con una línea de CECC que sobre-expresaba dicha proteína (74BserpE1up), se realizaron los mismos ensayos pero en una línea donde se infra-expresó de manera estable SERPINA E1 mediante transducción con shRNA. Entre las líneas de CECC, se seleccionó la línea SCC-9 ya que presentaba los niveles más altos de expresión de SERPINA E1. Tras generar dos líneas a partir de la línea SCC-9 que infra-expresaban SERPINA E1 de manera estable, SCC9 shRNA004 y SCC9 shRNA159, y una línea control SCC9 scramble, se comprobó la disminución en los niveles de expresión de SERPINA E1, tanto a nivel de proteína como de RNA mensajero. En la **figura 40** se muestran los resultados obtenidos en las tres líneas celulares generadas, SCC9 scramble, SCC9 shRNA004 y SCC9 shRNA159, a nivel de RNA mensajero, mediante PCR cuantitativa, y a nivel de proteínas, por *western blot* en relación con los niveles de SERPINA E1. Como se puede observar en la **figura 40B**, los niveles de RNAm de SERPINA E1 se redujeron aproximadamente un 65% y un 75% en las líneas SCC9 shRNA004 y SCC9 shRNA159, respectivamente, con respecto a la línea control SCC9 scramble.

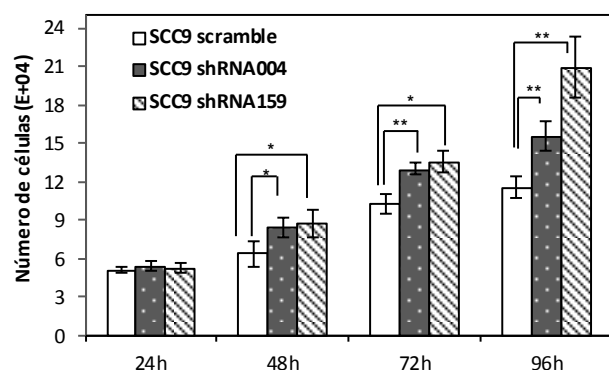




**Figura 40. Reducción de la expresión de SERPINA E1 de manera estable en las células SCC-9.** (A) Western blot de extractos proteicos de la línea control SCC-9 (SCC9 scramble) y las líneas transducidas con un shRNA contra SERPINA E1. Se empleó como control la proteína gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). (B) Histograma con el nivel de expresión relativa de RNAm de SERPINA E1 en las 3 líneas celulares de SCC-9 transducidas empleando como referencia la línea SCC9 scramble.

### 2.3.1. La tasa de proliferación de las células de CECC aumenta tras disminuir la expresión de SERPINA E1.

Se sembraron  $3.5 \times 10^4$  células de las líneas SCC9 scramble, SCC9 shRNA004 y SCC9 shRNA159 y se determinó el número de células a diferentes tiempos 24h, 48h, 72h y 96h. Como se puede observar en la **figura 41**, se encontraron diferencias significativas entre las dos líneas que infra-expresan SERPINA E1 y la línea scramble en relación con el número de células a las 48, 72 y 96 horas ( $p < 0.001$ , Test Mann Whitney). La disminución de los niveles de expresión de SERPINA E1 provocó un aumento en la capacidad proliferativa de las células tumorales.

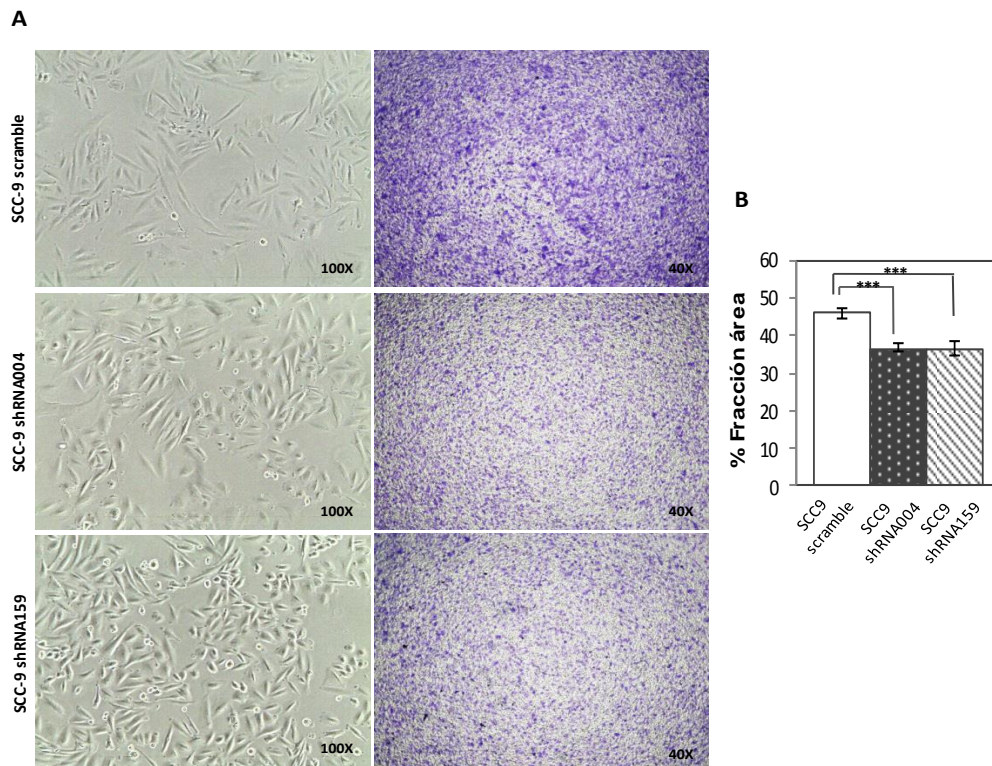


**Figura 41. Ensayo de proliferación con las líneas SCC9 transducidas con un plásmido shRNA scramble (SCC9 scramble) o con un plásmido shRNA contra SERPINA E1 (SCC9 shRNA004, SCC9 shRNA159).** Histograma representativo del número medio de células tras 24h, 48h, 72h y 96h desde el momento de la siembra (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , Test Mann-Whitney).

### 2.3.2. La infra-expresión de SERPINA E1 disminuye la capacidad de migración de las células de CECC

Se testó la capacidad de migración de las células a través una membrana porosa semipermeable (*transwell*), empleando como atrayente suero bovino fetal (FBS). A las 24 horas, el porcentaje de área ocupada por las células con capacidad de migración de las líneas que infra-expresaban SERPINA E1 fue inferior al de la línea control SCC-9 scramble, obteniéndose diferencias significativas en ambos casos ( $p < 0.001$ , Test Mann Whitney) (**Figura 42**). Por tanto, la reducción en la expresión de SERPINA E1

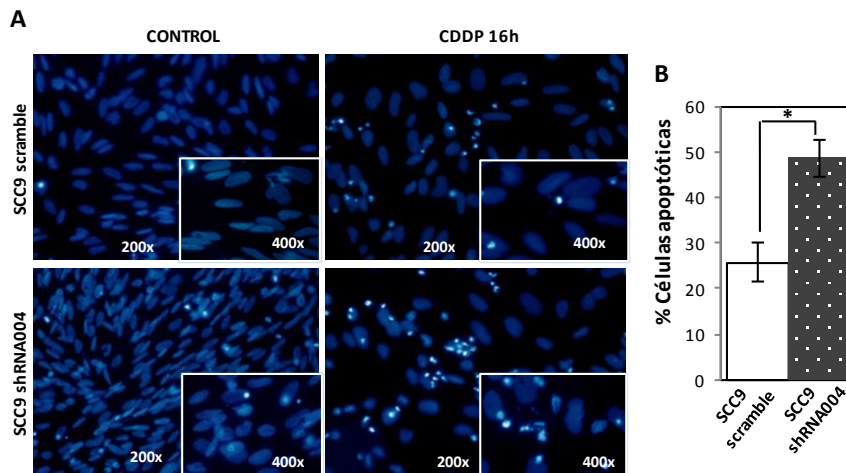
redujo la capacidad de las células tumorales para migrar activamente a través de una membrana porosa a favor de un gradiente de FBS.



**Figura 42.** Ensayo de migración a través de *Transwell*<sup>®</sup> con las líneas SCC9 transducidas con un plásmido shRNA scramble (SCC9 scramble) o con un plásmido shRNA contra SERPINA E1 (SCC9 shRNA004, SCC9 shRNA159). **(A)** Imágenes de células sin teñir de cada una de las líneas SCC-9 generadas (columna izquierda) y de las células teñidas con cristal violeta tras atravesar la membrana del *Transwell* (columna derecha). **(B)** Histograma del porcentaje de área ocupada por las células teñidas con cristal violeta, comparando las líneas que infra-expresan SERPINA E1 con respecto a la línea control (\*\*\*) $p < 0.001$ , Test Mann-Whitney).

### 2.3.3. La resistencia de las células de CECC al tratamiento con cisplatino disminuye al reducir los niveles de expresión de SERPINA E1

Con el objetivo de comparar la sensibilidad de las células a la apoptosis inducida por cisplatino tras la reducción de los niveles de expresión de SERPINA E1, las líneas SCC-9 scramble y SCC-9 shRNA004 se trataron durante 16 horas con 60 $\mu$ M de cisplatino. Como se observa en la **figura 43**, el porcentaje de células apoptóticas fue más elevado en la línea donde se redujeron los niveles de expresión de SERPINA E1 al compararla con las células de la línea control (SCC-9 scramble). El análisis estadístico mostró que dichas diferencias fueron significativas ( $p < 0.05$ , Test Mann Whitney) y por tanto, que la expresión de SERPINA E1 protege a las células tumorales frente a la apoptosis inducida por cisplatino.



**Figura 43.** Ensayo de apoptosis tras el tratamiento con cisplatino (CDDP) de dos líneas SCC9 transducidas con un plásmido shRNA scramble (SCC9 scramble) o con un plásmido shRNA contra SERPINA E1 (SCC9 shRNA004). (A) Células marcadas con DAPI observadas en el microscopio de fluorescencia tras el tratamiento con CDDP o sin tratar (CONTROL), de ambas líneas celulares. (B) Histograma del porcentaje de células apoptóticas contabilizadas, comparando una de las líneas que infra-expresa SERPINA E1 con respecto a la línea control (\* $p < 0.05$ , Test Mann-Whitney).

## 2.4. Estudio del estado de activación de la vía PI3K/Akt en las células que infra- o sobre-expresan SERPINA E1

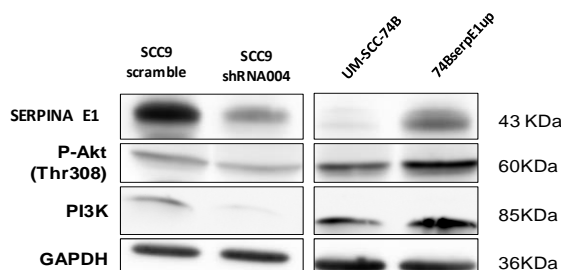
Con el objetivo de estudiar el efecto de los niveles de expresión de SERPINA E1 en el estado de activación de la vía PI3K/Akt, se comparó el nivel de expresión o de activación de algunas de las moléculas que participan en dicha vía, en las líneas celulares de CECC, antes y después de modificar los niveles de expresión de SERPINA E1.

Se determinó, mediante *western blot*, el nivel de activación de la proteína Akt mediante fosforilación (Akt fosforilado en la treonina 308, Thr308 (p-Akt)), y el nivel de expresión de PI3K, todos mediadores de la vía PI3K/Akt, en las líneas celulares generadas con diferente nivel de expresión de SERPINA E1 (SCC-9 scramble, SCC-9 shRNA004, UM-SCC-74B y 74BserpE1up). También se incluyó en los ensayos la detección de la proteína SERPINA E1 y de la proteína endógena GAPDH, como control. Como se puede observar en la **figura 44**, los niveles de expresión de SERPINA E1 se mantuvieron más elevados en las líneas SCC-9 scramble y 74BserpE1up en comparación con las líneas SCC-9 shRNA004 y UM-SCC-74B, respectivamente, mientras que el nivel de la proteína endógena GAPDH fue el mismo en las 4 líneas celulares.

En la línea UM-SCC-74B, se observó que el aumento en la expresión de SERPINA E1 provocó un aumento en la expresión de la proteína PI3K así como una mayor activación de Akt (aumento en los niveles de Akt fosforilado (p-Akt)) cuando se comparó con la línea parental, UM-SCC-74B, con la línea que sobre-expresaba SERPINA E1, 74BserpE1up. Por el contrario, la infra-expresión de SERPINA E1 en la línea SCC-9, provocó una disminución de los niveles de expresión de la proteína PI3K y una

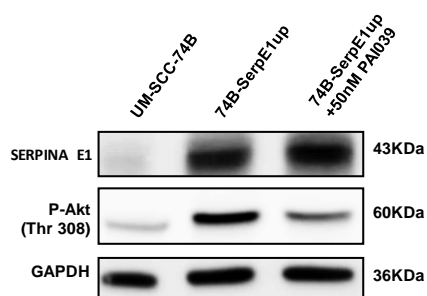
disminución de los niveles de Akt activado (p-Akt), cuando se analizó en la línea donde se infra-expresó SERPINA E1 (SCC9 shRNA004) en comparación con la línea control (SCC9 scramble).

Los hallazgos obtenidos indican que la sobre-expresión de SERPINA E1 induce la activación de la vía PI3K/Akt en la línea UM-SCC-74B de CECC, mientras que su infra-expresión en la línea SCC-9 de CECC bloquea la activación de la vía PI3K/Akt.



**Figura 44. Niveles de expresión de algunas proteínas mediadoras de la vía PI3K/AKT.** Anlizado por *western blot* en las líneas celulares donde se infra- (SCC-9 shRNA004) o sobre-expresó (74BserpE1up) SERPINA E1 y su correspondiente línea control (SCC-9 scramble) o parental (UM-SCC-74B).

Con el objetivo de confirmar la relación entre los niveles de expresión de SERPINA E1 y el estado de activación de la vía PI3K/Akt, se analizó el efecto del tratamiento de las células 74BserpE1up con un inhibidor de SERPINA E1 (PAI-039), que induce el cambio conformacional de SERPINA E1 al estado inactivo, sobre los niveles de expresión de SERPINA E1 y la activación de Akt (p-Akt, Thr-308). Estos niveles se compararon con respecto a la propia línea y la línea parental (UM-SCC-74B) sin tratar. Para ello, las células de la línea 74BserpE1up se trataron durante 48 horas con 50nM del inhibidor PAI-039. Como se puede observar en la **figura 45**, el tratamiento con el inhibidor de SERPINA E1 provocó un descenso de Akt activado (nivel de p-Akt) mientras que no varió el nivel de SERPINA E1, lo que confirma la relación directa entre los niveles de expresión de SERPINA E1 y el nivel de activación de la vía PI3K/Akt.

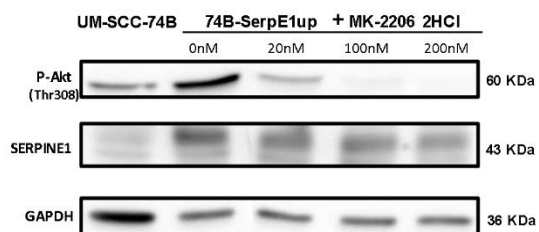


**Figura 45. Detección por *western blot* de las proteínas SERPINA E1, p-Akt y GAPDH (proteína endógena) en células de la línea 74BserpE1up sin tratar y tratadas con el inhibidor de SERPINA E1 (PAI-039).** La línea parental (UM-SCC-74B) sin tratar se empleó como control.

#### 2.4.1. El bloqueo de la vía PI3K/Akt revierte el aumento de la capacidad de migración y la resistencia a la apoptosis en la línea que sobre-expresa SERPINA E1

En primer lugar, se comprobó el efecto de un inhibidor de la vía PI3K/Akt (MK-2206) sobre la expresión de SERPINA E1 y los niveles de p-Akt en la línea celular 74BserpE1up. Este inhibidor actúa a nivel de Akt, bloqueando su fosforilación y consiguiente activación. El tratamiento durante 48 horas con MK-2206 provocó una disminución progresiva del nivel de activación de Akt conforme aumentaba

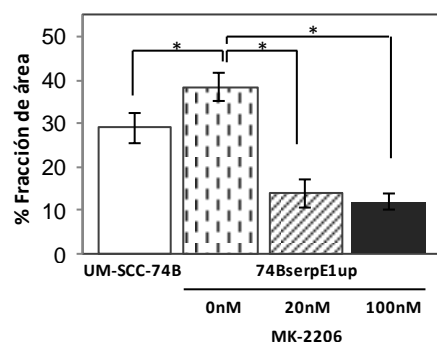
la concentración del inhibidor (0nM, 20nM, 100nM y 200nM), llegando a unos niveles casi indetectables de p-Akt a las concentraciones de 100nM y 200nM (**Figura 46**).



**Figura 46.** Detección por *western blot* de las proteínas SERPINA E1, p-Akt y GAPDH (proteína endógena) en la línea 74BserpE1up tras el tratamiento con diferentes concentraciones (0nM, 20nM, 100nM y 200nM) del inhibidor de p-Akt, MK-2206. La línea parental (UM-SCC-74B) sin tratar se empleó como control.

Tras comprobar la efectividad del inhibidor MK-2206 sobre los niveles de Akt activado en la línea 74BserpE1up, se realizaron ensayos funcionales para estudiar el efecto de la inhibición de la vía PI3K/Akt sobre la migración y la resistencia a la apoptosis inducida por cisplatino en la línea 74BserpE1up.

El tratamiento de la línea 74BserpE1up durante 48 horas con diferentes concentraciones del inhibidor MK-2206 (0nM, 20nM y 100nM) antes de realizar el ensayo de migración, provocó una disminución en la capacidad de migración de las células tumorales, revertiendo de este modo el aumento de migración observado tras la sobre-expresión de SERPINA E1. Se encontraron diferencias significativas tanto a 20nM como a 100nM ( $p < 0.05$ , Test Mann Whitney) cuando se comparó la proporción de células con capacidad de migración pertenecientes a la línea 74BserpE1up tratada o sin tratar (**Figura 47**).



**Figura 47.** Ensayo de migración a través de Transwell® con la línea celular 74BserpE1up tras el tratamiento con diferentes concentraciones (0, 20 y 100 nM) de un inhibidor de Akt (MK-2206). Se determinó el porcentaje de área ocupado por las células al otro lado de la membrana en cada condición/línea celular (\* $p < 0.05$ , Test Mann Whitney).

Para estudiar si el efecto inhibitorio de SERPINA E1 sobre la apoptosis inducida por cisplatino estaba mediado por la vía PI3K/Akt, se testó la sensibilidad a la apoptosis inducida por cisplatino en la línea 74BserpE1up tras el tratamiento con el inhibidor MK-2206. Tras 72 horas de tratamiento con 100nM del inhibidor MK-2206 y 16 horas de tratamiento con 15 $\mu$ M de cisplatino, se analizó el porcentaje de células apoptóticas pertenecientes a la línea UM-SCC-74B o a la línea que sobre-expresa SERPINA E1, 74BserpE1up.

En la **figura 48** se muestra como la inactivación de la vía PI3K/Akt confiere a las células mayor sensibilidad a la apoptosis inducida por cisplatino tanto en la línea parental como en la línea que sobre-expresa SERPINA E1 al aumentar el número de células apoptóticas ( $p < 0.05$ , Test Mann Whitney). Como ya se vio en un experimento anterior, las células 74BserpE1up fueron más resistentes a la apoptosis

que las células de la línea parental (condición 15 $\mu$ M CDDP) ( $p < 0.05$ , Test Mann Whitney). Por último, cuando comparamos el porcentaje de células apoptóticas de las células tratadas con cisplatino y con el inhibidor MK-2206, no se encontraron diferencias entre la línea parental y la línea 74BserpE1up ( $p > 0.05$ , Test Mann Whitney), lo que indica que la resistencia que SERPINA E1 confiere a las células tumorales frente a la apoptosis inducida por cisplatino está mediada a través de la vía PI3K/Akt.

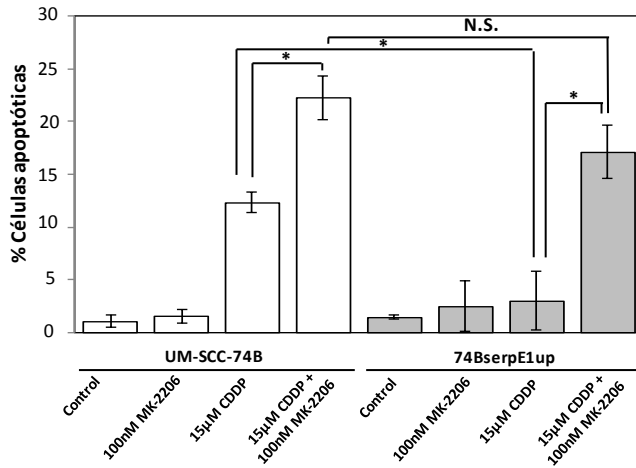


Figura 48. Ensayo de apoptosis con las líneas UM-SCC-74B y 74BserpE1up sin tratar (Control), tratadas con el inhibidor MK-2206 de p-Akt durante 72 horas (100nM MK-2206), tratadas con cisplatino (CDDP) durante 16 horas (15 $\mu$ M CDDP) o tratadas con inhibidor y cisplatino (15 $\mu$ M CDDP + 100nM MK-2206). En cada condición se representa el porcentaje de células apoptóticas con respecto al número total de células  $\pm$  desviación típica (\* $p < 0.05$ , N.S.= no significativo, Test Mann Whitney).

### 3. DESARROLLO DE UN MODELO MURINO ORTOTÓPICO Y METASTÁTICO DE CECC

#### 3.1. Generación de líneas de CECC con actividad luciferasa y fluorescentes

Para facilitar el seguimiento del crecimiento y diseminación tumoral de las células de CECC en el modelo murino, las líneas de CECC UM-SCC-74B, UM-SCC-22A, UM-SCC-22B, SCC-25, SCC-9 y 74BserpE1up fueron transducidas con partículas lentivirales portadoras de una construcción GFP-Luciferasa controlada bajo el mismo promotor constitutivo SFFV (*Spleen Focus Forming Virus*). Las células transducidas con esta construcción expresan GFP (señal fluorescente) y luciferasa (señal de luminiscencia bajo exposición a luciferina). Tras la transducción, las células GFP-Luciferasa positivas se seleccionaron mediante técnicas de citometría y FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*), determinando la fluorescencia emitida por las líneas transducidas. En la **tabla 20** se muestra el porcentaje de células fluorescentes en las poblaciones de las diferentes líneas celulares tras la transducción (*pre-sorter*), después del FACS (*post-sorter*) y tras un segundo FACS (*re-sorter*).

**Tabla 20. Porcentaje de la población celular que presenta fluorescencia (GFP), antes (*pre-sorter*), después (*post-sorter*) y tras un segundo *sorting* celular (*re-sorter*)**

Línea celular	% GFP pre-sorter	% GFP post-sorter	% GFP re-sorter
UM-SCC-22A	24.54	93.85	-
UM-SCC-22B	13.51	83.39	92.12
UM-SCC-74B	8.66	86.10	89.03
74BserpE1up	-	-	92.12
SCC-25	7.14	81.63	88.75
SCC-9	10.51	86.48	-

Algunas de las líneas tuvieron que someterse de nuevo a FACS (*re-sorter*) porque, tras varios pases en cultivo, disminuyó el porcentaje de células GFP positivas en la población. Antes de ser inyectadas en los ratones, se comprobó mediante citometría de flujo que todas las líneas presentaban un porcentaje de células fluorescentes en torno al 90% o superior. En la **figura 49** se muestra la distribución de la población de la línea celular parental UM-SCC-22A (GFP-Luciferasa negativa) y de la línea celular UM-SCC-22A transducida con los virus GFP-Luciferasa y seleccionada por *sorting* celular.

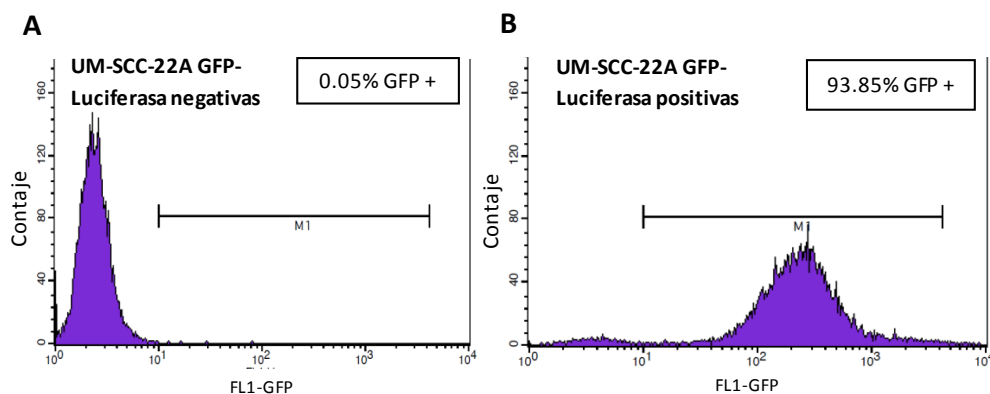


Figura 49. Histograma de citometría de flujo representativo de la línea UM-SCC-22A antes (A) y después de ser transducida con partículas lentivirales portadoras de la construcción pSIN-DUAL-GFP1-Luciferase (B). El intervalo M1 representa las células UM-SCC-22A GFP positivas de la población.

El uso de líneas celulares con actividad luciferasa en el modelo *in vivo*, permitió el seguimiento de las células tumorales a través de la medición de la señal luminiscente, tanto a nivel local como a distancia mediante una técnica no invasiva para los ratones.

### 3.2. Estudio de la capacidad tumorigénica de líneas celulares de CECC a partir de un modelo murino de crecimiento subcutáneo en la cepa Swiss nude

La implantación subcutánea de las diferentes líneas celulares de CECC en ratones Swiss nude nos permitió determinar la capacidad de cada línea para generar tumores sólidos a partir de diferentes inóculos celulares cultivados *in vitro*. En el primer experimento que se realizó se testaron 3 inóculos diferentes de 5 líneas celulares de CECC. En la **tabla 21** se muestran los resultados obtenidos en cada condición ( $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$  y  $1 \times 10^7$  células) separada por apartados y para cada línea, en las diferentes filas. Los ratones se sacrificaron cuando el tamaño de alguno de sus tumores alcanzó un volumen superior al 20% del peso del ratón. Los ratones que no desarrollaron tumor subcutáneo se sacrificaron a los 40 días.

Tabla 21. Porcentaje de implantación subcutánea en ratones Swiss nude de 3 inóculos celulares diferentes ( $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$  y  $1 \times 10^7$  células) de 5 líneas de CECC

	1,00E+06 células			5,00E+06 células		
	Nº sitios implantación	Nº tumores (Tiempo sacrificio*)	Porcentaje implantación	Nº sitios implantación	Nº tumores (Tiempo sacrificio*)	Porcentaje implantación
UM-SCC-74B	3	0 (28días)	0%	3	2 (28días)	66%
SCC-9	3	0 (40días)	0%	3	0 (40días)	0%
SCC-25	3	0 (40días)	0%	2	0 (40días)	0%
UM-SCC-22A	3	3 (28días)	100%	3	3 (28días)	100%
UM-SCC-22B	2	2 (35días)	100%	1	1 (35días)	100%

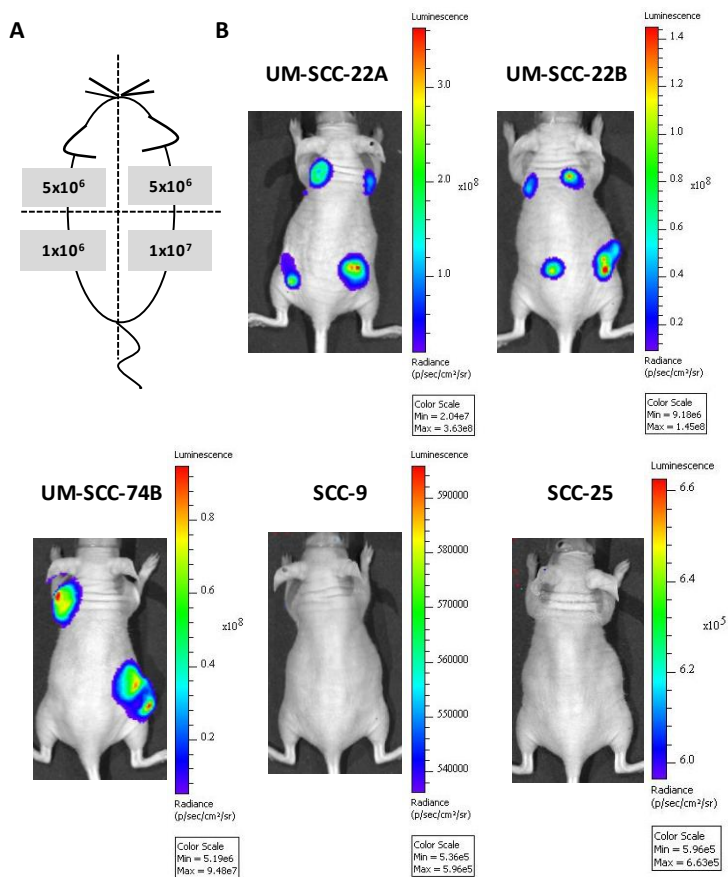
	1,00E+07 células		
	Nº sitios implantación	Nº tumores (Tiempo sacrificio*)	Porcentaje implantación
UM-SCC-74B	2	2 (28días)	100%
SCC-9	2	0 (40días)	0%
SCC-25	0	-	-



UM-SCC-22A	2	2 (28días)	100%
UM-SCC-22B	1	1 (35días)	100%

\*Tiempo sacrificio: tiempo de vida medio del grupo de ratones

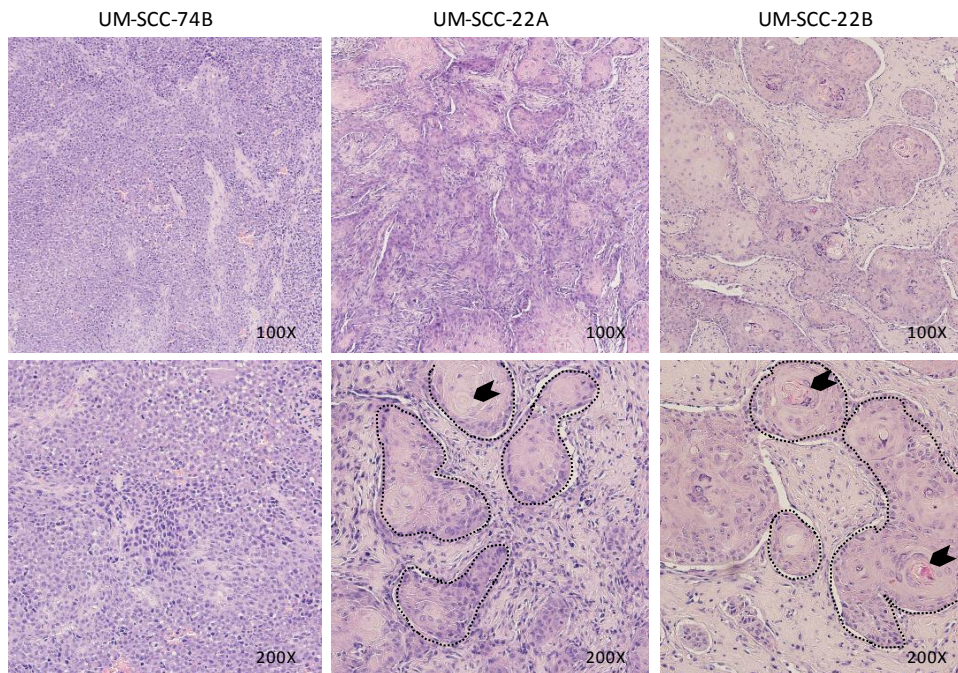
Las líneas UM-SCC-74B, UM-SCC-22A y UM-SCC-22B generaron tumores subcutáneos mientras que las líneas SCC-9 y SCC-25 no generaron tumores en ninguna de las condiciones estudiadas. Las líneas UM-SCC-22A y UM-SCC-22B presentaron una tasa de implantación del 100%, independientemente del número de células inyectadas. La línea UM-SCC-74B sólo generó tumores subcutáneos cuando se inocularon  $5 \times 10^6$  células o  $1 \times 10^7$  células, siendo la tasa de implantación del 100% en la condición más alta de número de células. En la **figura 50** se muestran imágenes representativas de un registro de luminiscencia de un ratón de cada línea a los 26 días desde el momento de la inyección subcutánea de las células tumorales.



**Figura 50. Registro de luminiscencia a los 26 días de la implantación subcutánea. (A)** Esquema del número de células inyectadas en cada uno de los 4 flancos de un ratón. **(B)** Imagen de un ratón representativo de cada línea celular inyectado de manera subcutánea según el esquema que aparece en el apartado (A).

El análisis histológico de los tumores subcutáneos permitió estudiar las características fenotípicas y el tipo de crecimiento de los tumores generados por cada línea celular. En la **figura 51** se muestran preparaciones tisulares teñidas con hematoxilina-eosina representativas de tumores subcutáneos de cada una de las líneas. Como se observa en la segunda y tercera columna de la **figura 51**, la línea UM-SCC-22A y la línea UM-SCC-22B generaron tumores altamente diferenciados que presentaron un crecimiento en nidos tumorales (marcados con líneas negras discontinuas) cuyas células se diferenciaron hacia el interior y generaron perlas de queratina (flechas negras). Por el contrario, la

línea UM-SCC-74B generó tumores poco diferenciados que no produjeron queratina y sus células crecieron de manera desorganizada sin generar nódulos o nidos (primera columna, **figura 51**).



**Figura 51. Tinción de hematoxilina-eosina de tumores subcutáneos generados *in vivo* por diferentes líneas celulares de CECC. Crecimiento en nidos tumorales (línea discontinua) y perlas de queratina (flechas negras).**

Se realizó un análisis inmunohistoquímico de los tumores generados por las líneas UM-SCC-22A, UM-SCC-22B y UM-SCC-74B con diferentes anticuerpos asociados a un fenotipo epitelial (E-cadherina) o mesenquimal (vimentina, N-cadherina). La línea UM-SCC-74B presentó una expresión elevada de vimentina, moderada de N-cadherina y pérdida de expresión de E-cadherina. Por el contrario, las líneas UM-SCC-22A y UM-SCC-22B mostraron elevada expresión de E-cadherina y baja expresión de vimentina y N-cadherina (**Figura 52**). En base al nivel de expresión de estos marcadores, la línea UM-SCC-74B se asociaría a un fenotipo mesenquimal y las líneas UM-SCC-22A y UM-SCC-22B a un fenotipo epitelial.

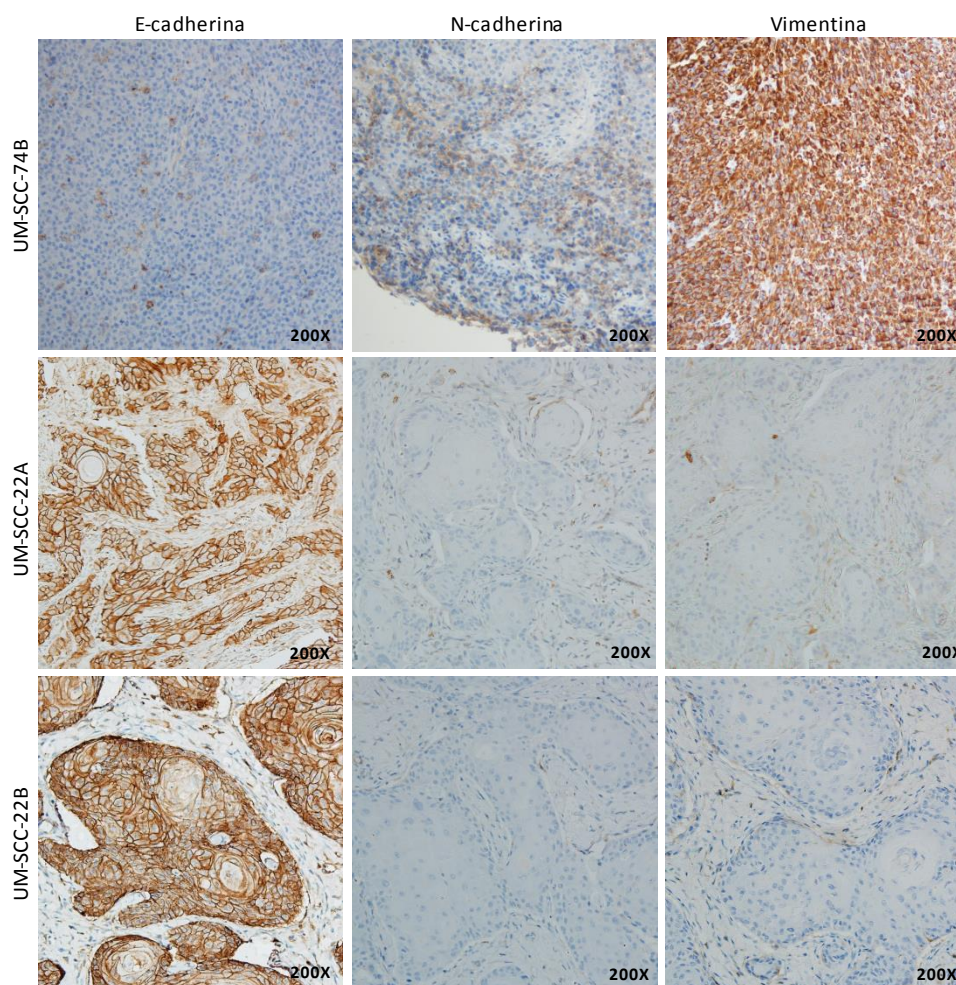


Figura 52. Inmunohistoquímicas con anticuerpos de marcadores asociados con fenotipo epitelial (E-cadherina) o mesenquimal (N-cadherina, vimentina), sobre tumores subcutáneos generados en ratones Swiss nude por las líneas celulares UM-SCC-22A, UM-SCC-22B y UM-SCC-74B de CECC.

Se realizó un segundo experimento de implantación subcutánea donde se implantaron las 5 líneas celulares de CECC empleadas en el primer experimento y se añadió la línea 74BserpE1up, que sobreexpresa SERPINA E1 y fue generada mediante transducción lentiviral a partir de la línea UM-SCC-74B. Se realizaron 12 puntos de implantación para aquellas líneas que no generaron tumor subcutáneo en el anterior experimento y 8 para las restantes. Se inocularon  $5 \times 10^6$  células por punto de implantación de todas las líneas. Como se observa en la **tabla 22**, las líneas que no generaron tumores subcutáneos en el primer experimento, tampoco los generaron en este segundo (SCC-25 y SCC-9). De las 4 líneas de CECC que generaron tumores subcutáneos *in vivo*, sólo la línea UM-SCC-74B presentó una tasa de implantación ( $(\text{n}^\circ \text{ de tumores generados} / \text{n}^\circ \text{ de sitios de implantación}) * 100$ ) inferior al 100%.

Tabla 22. Porcentaje de implantación tras la inyección subcutánea de  $5 \times 10^6$  células pertenecientes a 6 líneas celulares de CECC en ratones Swiss nude. Se muestra el número de sitios de implantación y el tiempo de vida medio de los ratones implantados con cada línea

	Nº sitios implantación	Nº tumores (tiempo)	Tasa implantación
UM-SCC-74B	8	5 (28días)	63%
74BserpE1up	8	8 (27días)	100%

SCC-9	12	0 (32días)	0%
SCC-25	12	0 (40días)	0%
UM-SCC-22A	8	8 (35días)	100%
UM-SCC-22B	8	8 (41días)	100%

El análisis histológico de los tumores generados confirmó el fenotipo asociado a los tumores derivados de cada línea obtenido en el experimento inicial. La línea 74BserpE1up presentó un fenotipo similar a la línea UM-SCC-74B.

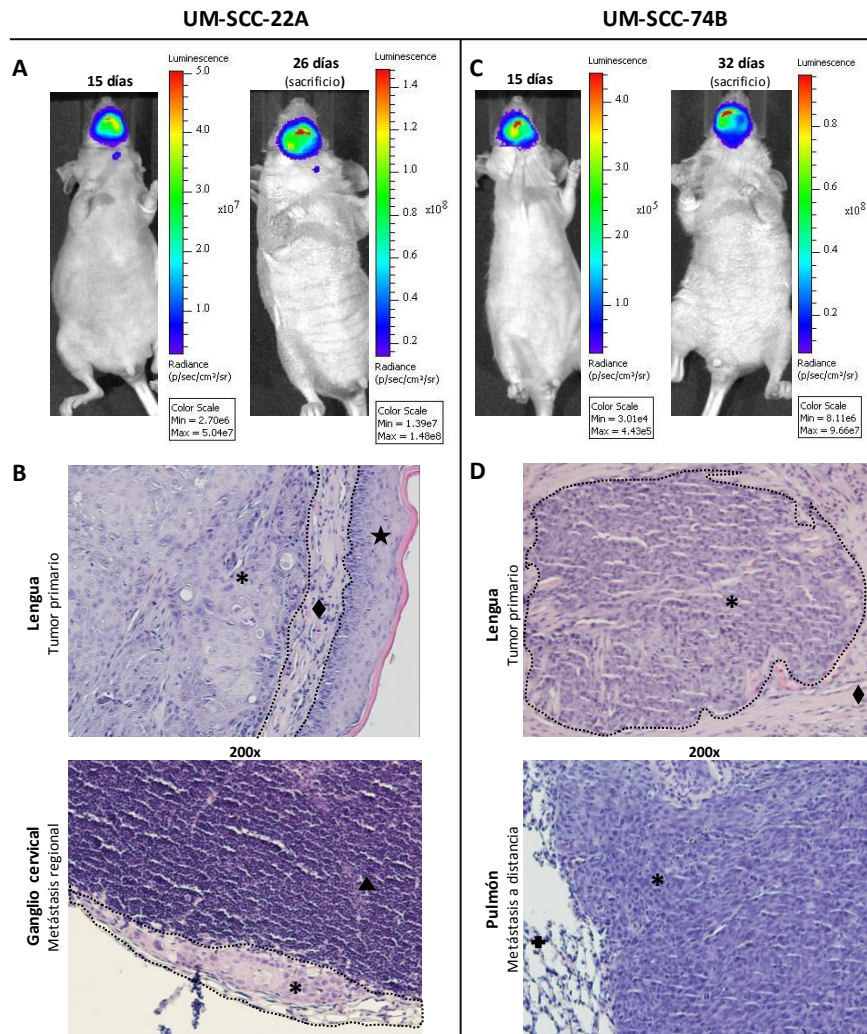
### 3.3. Estudio de la capacidad tumorigénica y el patrón de diseminación de diferentes líneas celulares de CECC a partir del modelo murino ortotópico en la cepa Swiss nude

Con el objetivo de estudiar la capacidad tumorigénica a nivel ortotópico y el patrón de diseminación metastático del CECC, se inyectaron  $1 \times 10^6$  células en la lengua de ratones atímicos Swiss nude. En este experimento ortotópico inicial, se implantaron 6 líneas celulares y se emplearon 3 ratones por línea. En el primer registro de luminiscencia, realizado el día 5 desde la inyección de las células tumorales, todos los ratones presentaron señal de luminiscencia localizada en la cavidad oral. Debido al crecimiento del tumor primario, para permitir que los ratones pudieran seguir alimentándose, se les realizó una resección de aproximadamente 1/4 de la lengua a los 8 días de la implantación con objeto de eliminar la mayor parte del tumor primario generado a los ratones implantados con las líneas UM-SCC-74B, 74BserpE1up, UM-SCC-22A y UM-SCC-22B. A los ratones implantados con las líneas SCC-9 y SCC-25 no se les practicó una resección parcial del tumor primario porque no se detectó crecimiento macroscópico del mismo en la lengua.

Tras dos semanas desde el momento de la inyección de las células tumorales, se realizó un registro de luminiscencia *in vivo* para comprobar la presencia o ausencia de células tumorales en la lengua así como de su diseminación a nivel local y/o a distancia. En este registro, todos los ratones presentaron señal de luminiscencia localizada en la cavidad oral y además, en uno de los ratones implantados con la línea UM-SCC-22A, se observó señal de luminiscencia en un punto que coincidió con la localización de los ganglios linfáticos cervicales (**Figura 53A**). En los ratones implantados con las otras líneas celulares, no se observó luminiscencia en ninguna otra localización, aparte de en la cavidad oral. En el caso de los ratones implantados con las líneas SCC-9 o SCC-25, la intensidad de luminiscencia localizada en la cavidad oral comenzó a descender a partir del día 20 de la implantación. En la **figura 53** se pueden observar los resultados obtenidos en un ratón representativo de la línea UM-SCC-22A y en otro ratón de la línea UM-SCC-74B.

A pesar de la resección parcial del tumor en los ratones implantados con las líneas UM-SCC-22A, UM-SCC-22B, UM-SCC-74B y 74BserpE1up, el crecimiento del tumor primario acabó dificultando que los ratones se alimentaran y provocando una pérdida de peso, motivo por el cual se tuvieron que sacrificar los ratones en base a los criterios de punto y final. Los ratones implantados con las líneas

SCC-9 y SCC-25 se sacrificaron a los 46 días debido a la pérdida progresiva de señal de luminiscencia y a la ausencia de tumor macroscópico en la lengua. Tras el sacrificio, se recogieron los órganos de interés, lengua, ganglios cervicales, pulmón e hígado para posteriormente realizar una tinción de hematoxilina-eosina. El análisis histopatológico permitió confirmar la presencia de células tumorales en aquellas muestras en las que previamente se observó señal de luminiscencia y detectar células tumorales en otras localizaciones no tan superficiales, como el pulmón (**Figura 53D**).



**Figura 53. Registro de luminiscencia en dos tiempos diferentes, a los 15 días desde el momento de la implantación y justo antes del sacrificio (28 y 23 días, respectivamente).** En los paneles A y C, se muestran los registros de un ratón Swiss nude implantado con la línea UM-SCC-22A y otro con la línea UM-SCC-74B, respectivamente. En los paneles B y C se observan tinciones de hematoxilina-eosina del tumor primario y de las metástasis encontradas en cada ratón en el momento del sacrificio, siguiendo la misma disposición que el panel anterior (los asteriscos marcan las células tumorales, el rombo el tejido muscular de la lengua, la estrella el epitelio de la lengua, el triángulo el tejido linfóide y la cruz el tejido pulmonar del ratón).

En la **tabla 23** se muestra el tiempo de vida medio de los ratones desde el momento de la inyección de las células tumorales hasta el día del sacrificio (leyenda: Sacrificio), para cada una de las líneas estudiadas así como el porcentaje de ratones que presentaron tumor primario, metástasis ganglionar y/o metástasis pulmonar en el momento del sacrificio tras el análisis histopatológico de los tejidos. Las líneas UM-SCC-22A, UM-SCC-22B, UM-SCC-74B y 74BserpE1up generaron tumor primario en el 100%

de los ratones inyectados, la línea SCC-25 generó tumor primario en el 66% de los ratones inyectados mientras que la línea SCC-9 no generó tumor primario en ninguno de los ratones. En relación con la metástasis ganglionar, las líneas UM-SCC-22A, UM-SCC-74B y 74BserpE1up generaron metástasis ganglionar en el 33% de los ratones implantados mientras que en el resto de líneas no se detectaron células tumorales en los ganglios cervicales. A nivel de metástasis a distancia, sólo la línea UM-SCC-74B y la línea 74BserpE1up generaron focos de células tumorales en pulmón.

**Tabla 23. Tiempo de vida medio y porcentaje de ratones con tumor primario, metástasis ganglionar y/o metástasis pulmonar de 3 ratones Swiss nude implantados con  $1 \times 10^6$  células de cada línea celular de CECC**

Línea celular	Sacrificio (días)	Tumor primario	Metástasis ganglionar	Metástasis pulmonar
UM-SCC-22A	28	100%	33%	0%
UM-SCC-22B	25	100%	0%	0%
UM-SCC-74B	23	100%	33%	33%
74B serpE1up	27	100%	33%	33%
SCC-9	46	0%	0%	0%
SCC-25	54	66%	0%	0%

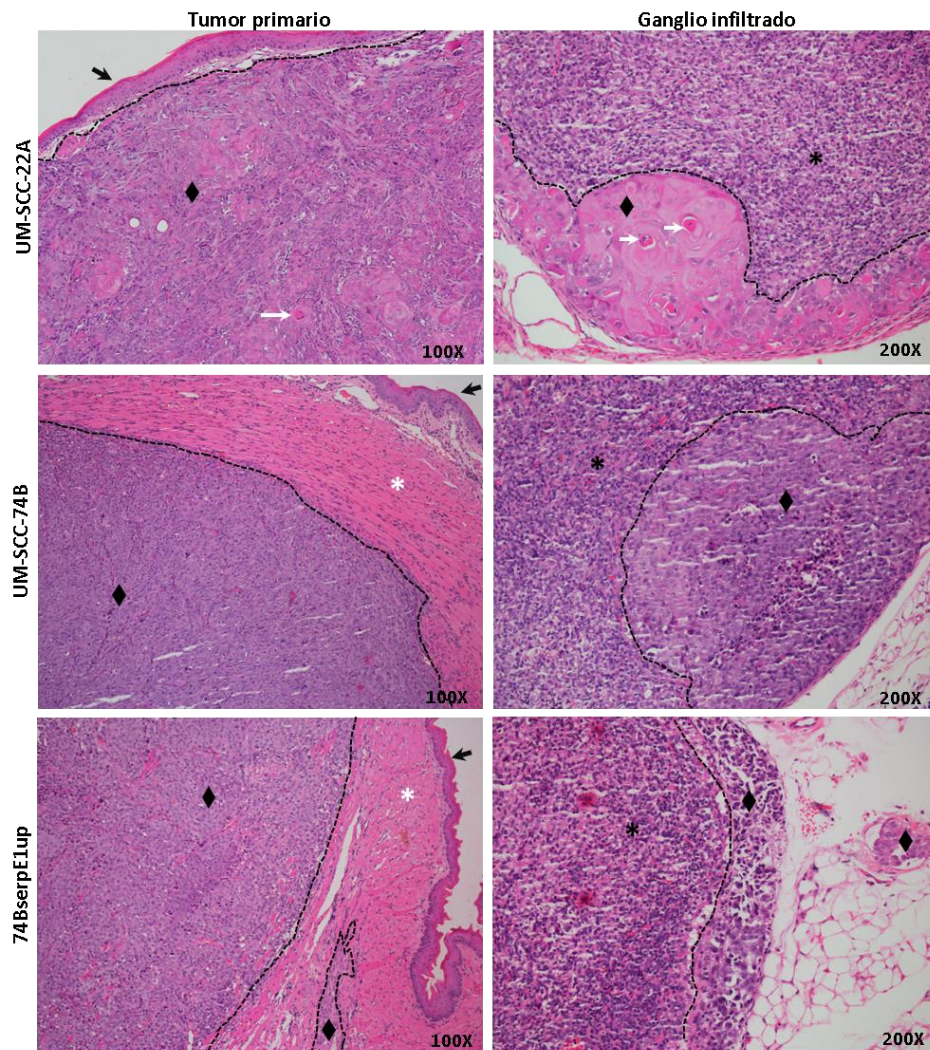
### 3.4. Estudio de la capacidad tumorigénica y el patrón de diseminación de diferentes líneas de CECC a partir de un modelo murino ortotópico en la cepa NOD/SCID

Con el objetivo de mejorar el modelo de diseminación de las células tumorales a nivel local y a distancia, se realizó un segundo experimento de implantación ortotópica, ampliando el número de ratones inyectados con las líneas que mostraron capacidad metastásica en el experimento anterior (UM-SCC-22A, UM-SCC-74B y 74BserpE1up) y se cambió la cepa de ratón utilizada (Swiss nude) por una cepa más inmunodeprimida (NOD/SCID). Se inyectaron  $1 \times 10^6$  células en la parte anterior de la lengua de 10 ratones con la línea UM-SCC-22A, 14 ratones con la línea UM-SCC-74B y 11 ratones de la línea 74BserpE1up. A los 4 días, se realizó un registro de luminiscencia de los 35 ratones inyectados, detectándose señal de luminiscencia en la lengua de todos los ratones. Los tumores derivados de las líneas UM-SCC-74B y 74BserpE1up alcanzaron un volumen tumoral detectable macroscópicamente a los 5 días de la inyección de las células tumorales, momento en el que se realizó la resección de la lengua, mientras que los tumores generados por la línea UM-SCC-22A alcanzaron dicho volumen a los 7 días, y fue en ese momento cuando se realizó la resección. En base a la lesión macroscópica presente en la lengua, se realizó una resección completa del tumor primario. A pesar de que el objetivo era realizar una resección completa del tumor primario localizado en la lengua, el registro posterior de luminiscencia y análisis histopatológico mostró la presencia de células tumorales post-resección en la lengua de los ratones. Aun así, la resección practicada eliminó la mayor parte del tumor primario, lo que alargó el tiempo de vida de los ratones al permitir que pudieran seguir alimentándose durante varios días más.

Todos los ratones, independientemente de la línea con la que fueron implantados, se sacrificaron cuando comenzaron a perder peso debido al crecimiento del tumor primario. La mayor parte de los ratones implantados con la línea 74BserpE1up se sacrificaron a los 34 días de la implantación, excepto dos de ellos que se sacrificaron a los 22 y 27 días. La mitad de ratones inyectados con la línea UM-SCC-74B se sacrificaron a los 22 días, y el resto a los 26, 34 y 42 días. Los ratones implantados con la línea UM-SCC-22A se sacrificaron a tiempos muy diferentes, encontrando un ratón que se sacrificó a los 16 días hasta otro ratón que se sacrificó a los 44 días. En la tabla 24 se muestran los resultados obtenidos con las tres líneas celulares tras el procesamiento histológico y posterior análisis de la lengua, los ganglios cervicales y el pulmón de cada ratón tras el sacrificio. En la **figura 54** se muestran preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina de tumor primario y ganglios cervicales infiltrados por células tumorales de la línea UM-SCC-22A, UM-SCC-74B y 74BserpE1up.

**Tabla 24. Porcentaje de ratones que presentaron tumor primario, metástasis ganglionar (en uno o más ganglios) o metástasis pulmonar, tras la inyección de  $1 \times 10^6$  células en lengua de ratones NOD/SCID con las líneas UM-SCC-22A, UM-SCC-74B y 74BserpE1up**

Línea celular	Sacrificio	Tumor primario	Metástasis en un ganglio	Metástasis en 2 o más ganglios	Metástasis pulmonar
UM-SCC-22A	29 días	100%	56%	44%	11%
UM-SCC-74B	26 días	100%	14%	7%	0%
74BserpE1up	32 días	100%	27%	27%	36%



**Figura 54.** Preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina de tumor primario y ganglios infiltrados de ratones NOD/SCID implantados en la lengua con  $1 \times 10^6$  células de las líneas UM-SCC-22A, UM-SCC-74B o 74BserpE1up. Las flechas negras indican el epitelio de la lengua del ratón, los rombos negros las células tumorales, las flechas blancas las perlas de queratina, los asteriscos blancos el tejido muscular de la lengua del ratón y los asteriscos negros el tejido linfático del ratón.

La comparación del número de ratones afectados con metástasis ganglionar en el experimento realizado con ratones Swiss nude o con ratones NOD/SCID, mostró un aumento en la proporción de ratones con metástasis ganglionar, tanto en los ratones NOD/SCID implantados con la línea UM-SCC-22A como en ratones NOD/SCID implantados con la línea 74BserpE1up. En el caso de la línea UM-SCC-74B, el uso de ratones NOD/SCID no aumentó el número de ratones con metástasis ganglionar (**Tabla 25**). No se comparó el número de ratones con metástasis pulmonar en los dos experimentos con diferente cepa de ratón debido a que el tamaño y el número de focos metastáticos en pulmón observados en ambas cepas de ratón fue muy reducido.



**Tabla 25. Porcentaje de ratones que presentaron tumor primario, metástasis ganglionar o metástasis pulmonar, tras la inyección de  $1 \times 10^6$  células de las líneas UM-SCC-22A, UM-SCC-74B o 74BserpE1up en la lengua de ratones Swiss Nude o NOD/SCID**

	Sacrificio* (días)		Tumor primario		Metástasis ganglios cervicales	
	Swiss nude	NOD/SCID	Swiss nude	NOD/SCID	Swiss nude	NOD/SCID
<b>UM-SCC-22A</b>	28	29	100%	100%	33%	100%
<b>UM-SCC-74B</b>	23	26	100%	100%	33%	21%
<b>74BserpE1up</b>	27	32	100%	100%	33%	55%

\*Sacrificio: representa el tiempo de vida medio de los ratones de cada grupo desde la implantación hasta el sacrificio.

#### 4. ESTUDIO *IN VIVO* DEL PAPEL DE SERPINA E1 A TRAVÉS DE UN MODELO ORTOTÓPICO DE CECC EN LA CEPA NSG

En los anteriores experimentos *in vivo* se estudió la capacidad de las líneas celulares de CECC de generar tumores subcutáneos, tumores primarios y/o metástasis locales o a distancia. El objetivo de este experimento fue estudiar la implicación de SERPINA E1 en el crecimiento y diseminación tumoral. Para ello, se implantó el mismo número de células ( $3 \times 10^5$  células) de la línea parental UM-SCC-74B y de la línea que sobre-expresaba SERPINA E1, 74BserpE1up, en la parte anterior de la lengua de ratones NSG. Con el objetivo de mejorar la diseminación local y a distancia de las células tumorales, en este experimento decidimos utilizar una cepa de ratones más inmunodeprimida (NSG) porque en los anteriores experimentos ortotópicos observamos un aumento en la proporción de ratones con metástasis ganglionar y pulmonar cuando pasamos a utilizar ratones con mayor grado de inmunodepresión (de Swiss nude a NOD/SCID). Cuando se detectó tumor en la lengua de los ratones a nivel macroscópico (aproximadamente de unos  $2 \times 3 \text{ mm}^2$  de superficie), que coincidió con los días 6 y 7 desde el momento de la implantación, los ratones fueron intervenidos quirúrgicamente con el objetivo de alcanzar una resección completa del tumor primario.

En relación con el tiempo de sacrificio, fue el mismo para los ratones de ambos grupos, 32 o 33 días desde el momento de la implantación de las células tumorales. Este tiempo se estableció debido a que un ratón implantado con la línea UM-SCC-74B y tres ratones implantados con la línea 74BserpE1up presentaron ganglios de gran volumen (superior a  $500 \text{ mm}^3$ ) causado por la infiltración de células tumorales. Tras haber sacrificado todos los ratones, se descartaron 3 ratones de los 13 implantados con la línea UM-SCC-74B, debido a que su resección resultó no ser completa y, por tanto, no eran comparables al resto de ratones de ambos grupos. En concreto, el ratón 14 tuvo que ser sacrificado el día 19 y el ratón 26 el día 22, debido al crecimiento del tumor primario (**Figura 55**). El ratón 18, aunque se sacrificó al día 32 junto al resto, al analizar microscópicamente la preparación de hematoxilina-eosina de la lengua residual tras la resección, se detectó un grupo de células tumorales en contacto con la zona de cicatrización (**Figura 56**), por lo que se consideró que tampoco había sido resecado de manera completa y también se descartó del experimento. Del grupo de la línea 74BserpE1up, no fue descartado ningún ratón de los implantados inicialmente ya que ninguno presentó tumor primario en el momento del sacrificio y por tanto, se consideró que la resección fue completa en los 14 ratones.

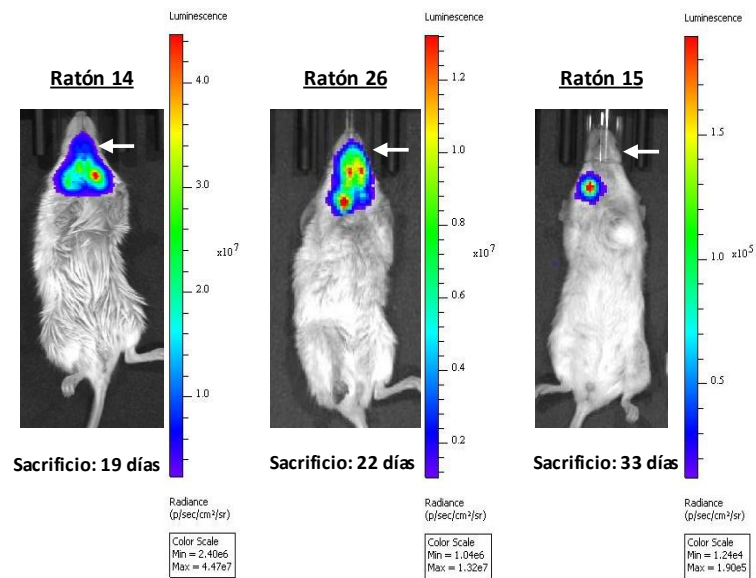


Figura 55. Registro de luminiscencia en el modelo NSG justo antes del sacrificio de dos ratones cuyos tumores primarios no se resecaron de manera completa (Ratón 14 y Ratón 26) y de otro ratón que si se reseco de manera completa (Ratón 15) e implantados con la línea UM-SCC-74B. Las flechas blancas señalan la zona donde se situaría la zona de implantación de las células tumorales en la lengua.

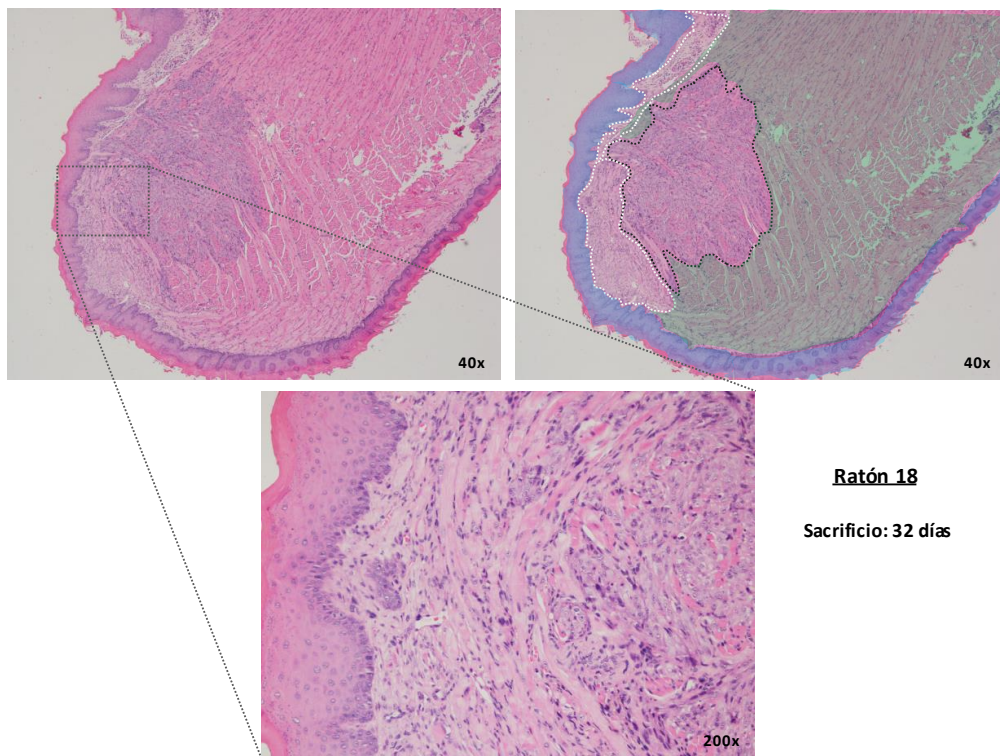
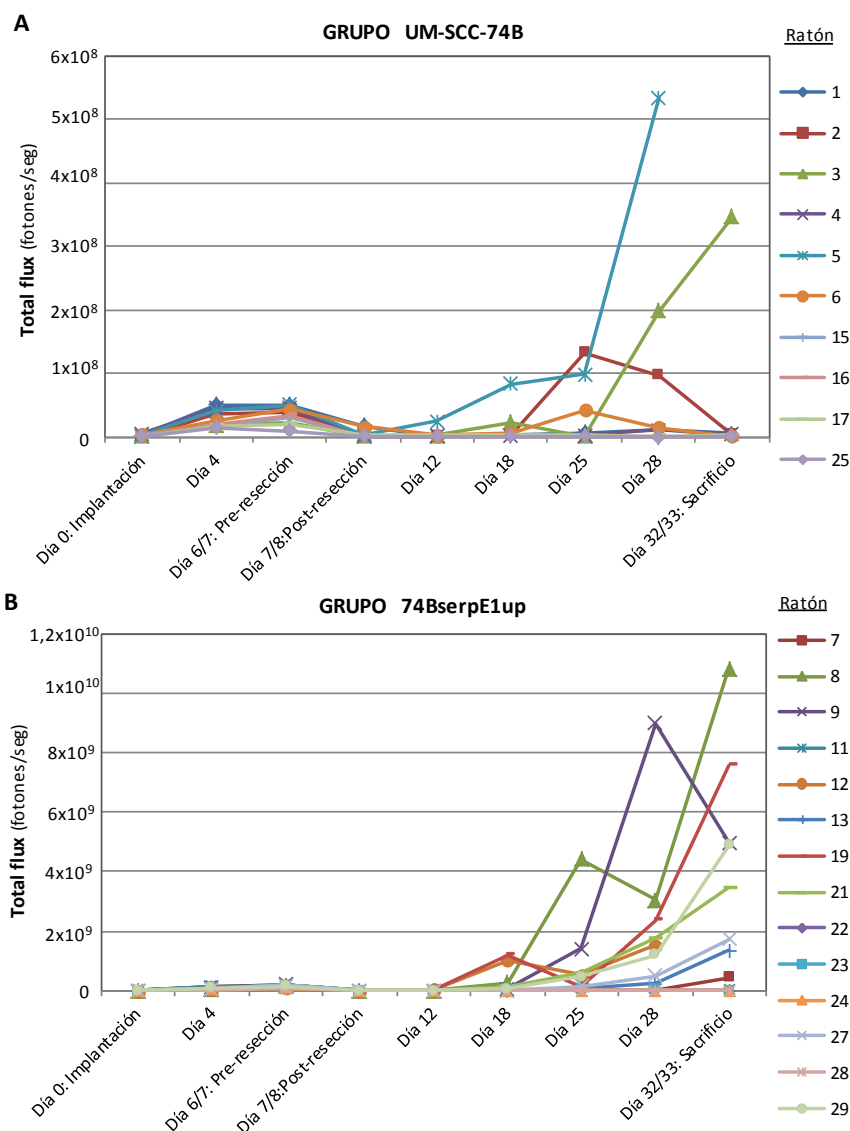


Figura 56. Tinción de hematoxilina-eosina de la lengua en el modelo NSG obtenida tras el sacrificio del ratón 18 en la que se muestra la presencia de células tumorales (borde negro discontinuo) muy próximas a la zona de cicatrización (borde blanco discontinuo) donde se cortó parte del tumor primario (resección incompleta). En sombreado verde y azul se señalan las fibras musculares y el epitelio del ratón, respectivamente.

El uso de células tumorales bioluminiscentes permitió realizar el seguimiento *in vivo* de su localización en cada uno de los ratones durante todo el experimento. Se realizaron registros de luminiscencia antes, después de la resección y hasta el momento del sacrificio, cada 2-5 días, para tener un seguimiento de las células tumorales *in vivo* en el ratón, y así poder analizar su crecimiento y

su localización antes del sacrificio. En la **figura 57** se muestra la evolución de la intensidad de luminiscencia de cada ratón desde el día de la inyección de las células tumorales (Día 0: Implantación) hasta el día del sacrificio (Día 32/33: Sacrificio), agrupados en función de la línea celular con la que fueron inyectados (GRUPO UM-SCC-74B o GRUPO 74BserpE1up). Como se puede observar, cada ratón presentó un perfil en el tiempo de intensidad de luminiscencia muy diferente. Destacar que la mitad de los ratones implantados con la línea 74BserpE1up (7 ratones) presentaron un aumento pronunciado de la intensidad de luminiscencia a partir del día 25, mientras que solo dos de los ratones implantados con la línea UM-SCC-74B presentó este aumento (ratón 3 y ratón 5). El día del sacrificio en varios ratones que presentaron metástasis ganglionar se registró una intensidad de luminiscencia muy baja, como era el caso de los ratones 11, 22, 23 y 24 implantados con la línea 74BserpE1up y de los ratones 2, 5 y 16 implantados con la línea UM-SCC-74B. Todos estos ratones presentaron infiltración ganglionar pero sus ganglios no alcanzaron tamaños superiores a 4mm, a diferencia del resto de ratones con infiltración ganglionar que si presentaron una intensidad de luminiscencia elevada. No se obtuvieron datos de intensidad de luminiscencia el día del sacrificio de los ratones 12 ni 5 debido a que el primero se sacrificó el día 28 y con el ratón 5 hubo un problema técnico el último día de registro.

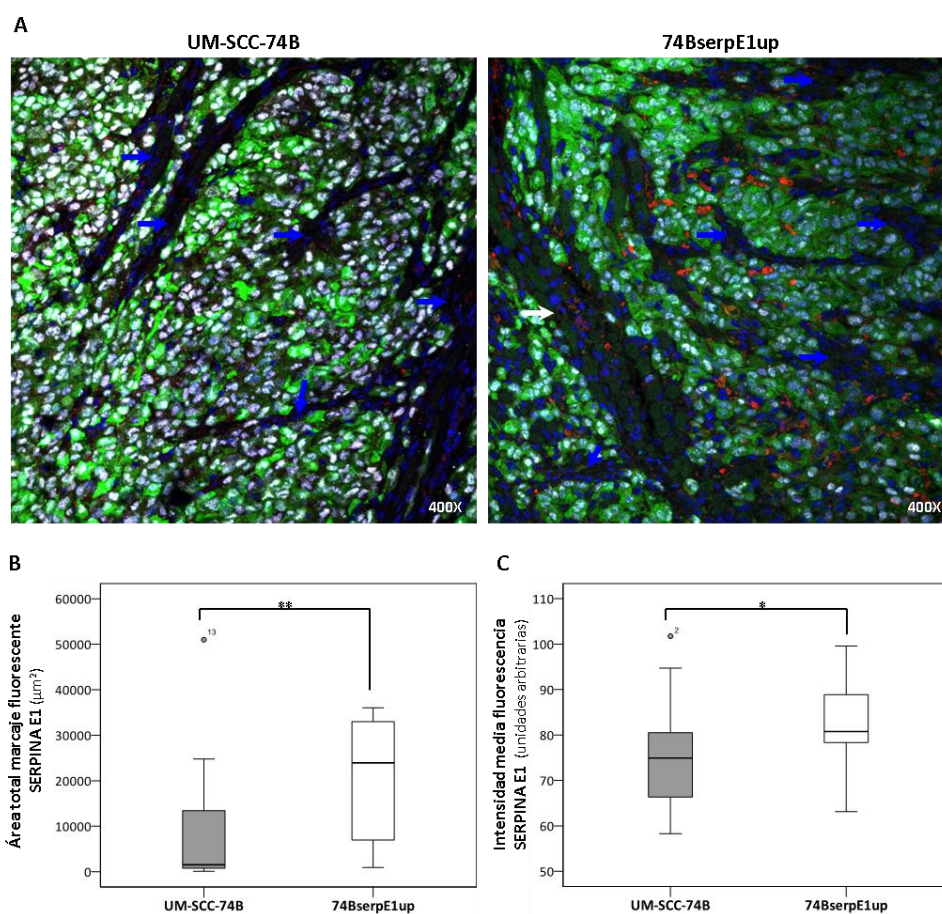


**Figura 57. Intensidad de luminiscencia de cada ratón en diferentes días de registro, desde el día de la implantación (día 0) hasta el día del sacrificio. (A) Ratones NSG implantados con la línea UM-SCC-74B. (B) Ratones NSG implantados con la línea 74BserpE1up.**

Aunque las intensidades de luminiscencia de los ratones implantados con una y otra línea fueron muy diferentes (UM-SCC-74B: orden de  $10^8$ , 74BserpE1up: orden de  $10^{10}$ ), estos valores no fueron comparables porque la intensidad específica de cada línea celular era diferente. La actividad luciferasa de la línea 74BserpE1up era unas 15 veces superior a la actividad de la línea UM-SCC-74B cuando se analizó en cultivo.

Tras la resección de la zona de las lenguas donde se encontraba el tumor primario, se recogieron los fragmentos resecados y se analizó, mediante inmunofluorescencia, si los tumores primarios generados por la línea 74BserpE1up sobre-expresaban la proteína SERPINA E1 en relación al nivel de SERPINA E1 en los generados por la línea UM-SCC-74B. Dicho análisis permitió detectar el citoplasma de las células tumorales (anticuerpo anti-GFP, marcaje verde), el núcleo de las células (marcaje DAPI, marcaje azul), el núcleo de las células humanas (anticuerpo anti HNA-Ku80, marcaje blanco-gris) y la SERPINA E1 (anticuerpo anti-serpinE1, marcaje rojo), en tumores primarios generados por la línea UM-

SCC-74B o por la línea 74BserpE1up (**Figura 58A**). Mediante su observación y toma de imágenes en un microscopio confocal, se cuantificó el área que ocupaba el marcaje fluorescente correspondiente a SERPINA E1 y la intensidad media de dicho marcaje en tumores primarios generados por la línea UM-SCC-74B o por la línea 74BserpE1up. En la **figura 58B** y **58C** se muestra un diagrama de cajas de cada variable analizada para el conjunto de valores correspondiente a tumores generados por la línea UM-SCC-74B o por la línea 74BserpE1up. Tanto el área ocupada por el marcaje fluorescente de SERPINA E1 como la intensidad media del marcaje, fue más elevada en los tumores generados por la línea 74BserpE1up. Dichas diferencias alcanzaron la significancia cuando se analizaron los datos mediante el test Mann Whitney ( $p=0.008$  para el área de marcaje fluorescente y  $p=0.035$  para la intensidad de marcaje).



**Figura 58. Análisis de la expresión de SERPINA E1 en tumores primarios generados por la línea UM-SCC-74B o por la línea 74BserpE1up en ratones NSG mediante inmunofluorescencia. (A)** Imágenes representativas de un tumor primario derivado de cada línea celular. Las estructuras marcadas se corresponden con los núcleos celulares humanos y de ratón (marcaje azul), la proteína SERPINA E1 (marcaje rojo), el citoplasma de las células tumorales (marcaje verde) y los núcleos de las células humanas (marcaje blanco-gris). La flecha azul señala el estroma del tumor primario y la flecha blanca el tejido muscular, ambos de origen murino, el resto representa las células tumorales. **(B)** Diagrama de cajas del área total correspondiente al marcaje fluorescente de SERPINA E1 y **(C)** de la intensidad media de dicho marcaje en las diferentes imágenes obtenidas de tumores primarios de una y otra línea celular (\*\* $p=0.008$  y \* $p=0.035$ , respectivamente, Test Mann Whitney).

El día del sacrificio se realizó un registro de luminiscencia del ratón justo antes (pre-sacrificio), un registro del ratón retirando la piel (post-sacrificio) y un registro de los órganos de interés *ex vivo* (Figura 59).

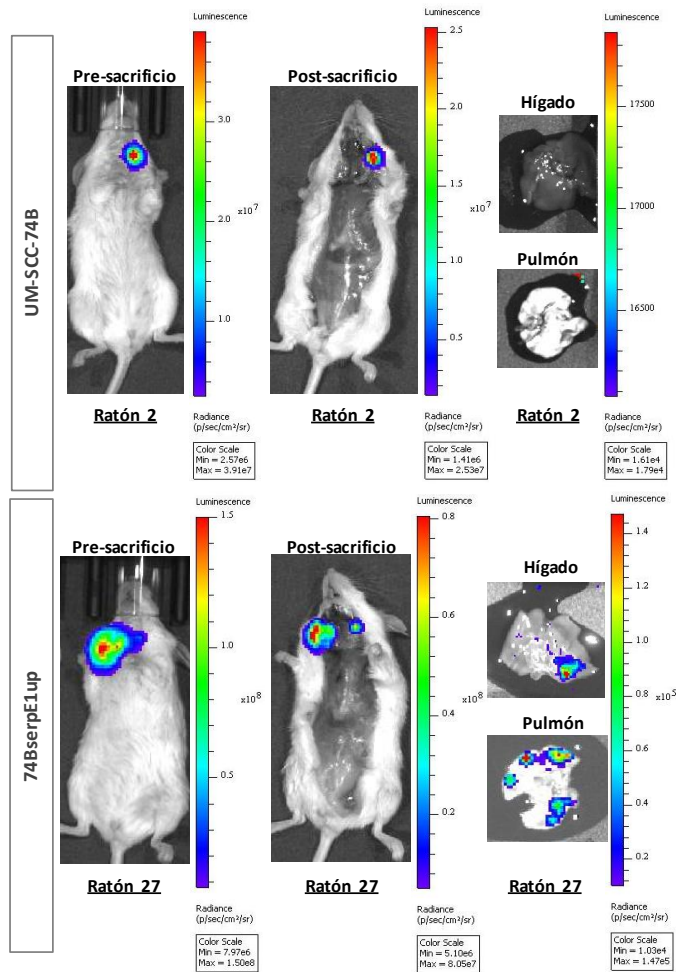


Figura 59. Registro de luminiscencia de un ratón NSG implantado con la línea UM-SCC-74B y de otro implantado con la línea 74BserpE1up, antes (pre-sacrificio) o después (post-sacrificio) del sacrificio y de los órganos de interés, el hígado y los pulmones *ex vivo*.

Tras el sacrificio de cada ratón, se recogieron los órganos y tejidos de interés para su fijación y posterior análisis histológico. La lengua residual que quedó en el ratón tras la resección, se recogió para confirmar la ausencia de células tumorales próximas a la zona de resección (resección completa). Los ganglios cervicales se recogieron en el caso de estar infiltrados por células tumorales ya que, en caso contrario, no fue posible su observación macroscópica. El pulmón y el hígado se recogieron por ser órganos diana donde diseminan las células tumorales de CECC. En la **tabla 28** se pueden observar los resultados obtenidos a partir del análisis histológico de los tejidos así como del registro de luminiscencia de los diferentes órganos de cada ratón tras el sacrificio (registro *ex vivo*). En la mayoría de estructuras u órganos la presencia de señal de luminiscencia coincidió con la detección de células tumorales tras el análisis histológico de cada tejido, exceptuando el hígado del ratón 27 y el hígado del ratón 29, donde no se detectaron las células tumorales en sus correspondientes preparaciones histológicas a pesar de presentar señal de luminiscencia *ex vivo*, y el pulmón del ratón 6 y del ratón 16, donde no se detectó señal de luminiscencia *ex vivo* pero, tras el análisis histológico, se detectaron focos de células tumorales.

**Tabla 28. Presencia/ausencia de células tumorales y número de focos en los órganos analizados de cada ratón de la cepa NSG tras el sacrificio.** Se analizó mediante registro de luminiscencia (IVIS) y mediante procesamiento histológico (HISTOLOGÍA), agrupando los ratones en función de la línea celular con la que fueron implantados

		IVIS				HISTOLOGÍA				
		Tumor primario	Gang cerv (nº_intensidad)	Pulmón (nº focos_intensidad)	Hígado	Tumor primario	Gang cerv (nº)	Pulmón 6niveles HE	Pulmón 6niveles vimentina	Hígado 1 nivel HE
UM-SCC-74B	r1	No	No	No	No	No	0	0	0	Neg
	r2	No	1_2,5E+07	No	No	No	1	0	0	Neg
	r3	No	1_5,8E+06	No	No	No	1	0	0	Neg
	r4	No	No	No	No	No	0	0	0	Neg
	r5	3,50E+07	2_1,7E+07	6f_9,9E+04	No	No	3	12 focos	48 focos	Neg
	r6	No	No	No	No	No	0	1 foco	1 foco	Neg
	r15	No	1_1,5E+06	No	No	No	1	0	0	Neg
	r16	No	No	No	No	No	1	25 focos	42 focos	Neg
	r17	No	No	No	No	No	0	0	0	Neg
r25	No	No	No	No	No	0	0	0	Neg	
74BserpE1up	r7	No	1_1,2E+08	No	No	No	1	0	0	Neg
	r8	No	2_2,6E+08	4f_1,2E+06	No	No	2	8 focos	53 focos	1 foco
	r9	No	2_1,6E+08	No	No	No	2	0	0	Neg
	r11	No	1_3,2E+06	No	No	No	1	0	0	Neg
	r12	No	4_1,3E+08	5f_1,4E+06	No	No	3	6 focos	32 focos	1 foco
	r13	No	2_5,2E+07	No	No	No	2	0	0	Neg
	r19	No	2_3E+08	3f_6,2E+05	No	No	2	7 focos	15 focos	Neg
	r21	No	2_1,1E+08	No	No	No	2	0	0	Neg
	r22	No	1_5E+05	1f_1,3E+07	No	No	1	11 focos	34 focos	Neg
	r23	No	1_1,2E+05	No	No	No	1	0	0	Neg
	r24	No	1_1,8E+06	No	No	No	1	0	0	Neg
	r27	No	2_8E+07	5f_1,6E+05	2f_4E+06	No	2	14focos	14 focos	Neg
	r28	No	No	No	No	No	0	0	0	Neg
r29	No	2_1E+08	5f_5E+07	1f_7E+04	No	2	16 focos	30 focos	Neg	

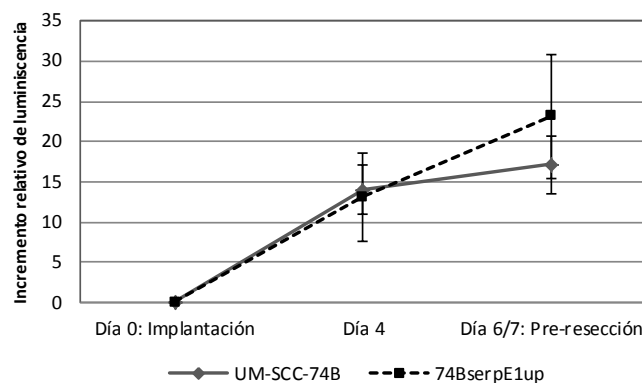
Hasta aquí se han expuesto los resultados obtenidos en el experimento de manera general en cada ratón implantado con una u otra línea celular. A continuación, se analizarán en detalle las características y el crecimiento de los tumores primarios generados por cada línea celular, posteriormente, se analizará la capacidad de diseminación local (a ganglios cervicales) de las células tumorales en los ratones implantados con líneas celulares con diferente nivel de expresión de SERPINA E1 y finalmente, se analizará la capacidad de diseminación y crecimiento a distancia (en pulmón e hígado) de las células tumorales en ambos grupos de ratones.

#### 4.1. Fenotipos asociados a agresividad tumoral en el tumor primario generado por la línea que sobre-expresa SERPINA E1 y su correspondiente línea parental

Se analizó, mediante la evolución de la intensidad de luminiscencia, el crecimiento del tumor primario en los ratones NSG implantados con la línea parental UM-SCC-74B o con la línea que sobre-expresa SERPINA E1. Para ello, se determinó el incremento relativo de intensidad de luminiscencia de cada ratón en los días de registro antes de la resección del tumor (Día 4 y Día 6/7), tomando como referencia el valor inicial de intensidad de luminiscencia (Día 0: implantación). Se obtuvieron los valores medios de incremento de luminiscencia agrupando los ratones implantados con la misma línea



celular. Como se puede observar en la **figura 60**, no se encontraron diferencias significativas en el incremento de luminiscencia en ninguno de los dos días de registro analizados, ni siquiera en el día 6/7, entre el grupo de ratones implantado con la línea UM-SCC-74B y el grupo implantado con la línea 74BserpE1up ( $p=0.907$ , Test Mann Whitney). Esto indica que no existen diferencias en cuanto al crecimiento de los tumores primarios generados por las líneas con diferente nivel de expresión de SERPINA E1.

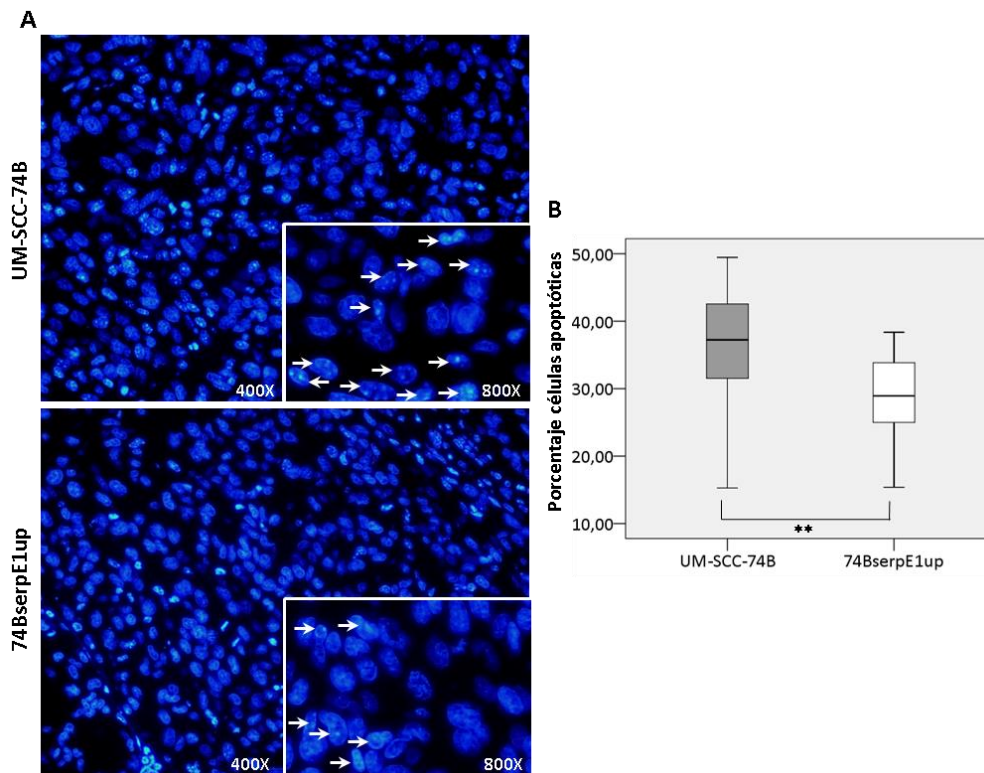


**Figura 60.** Incremento relativo de luminiscencia debido al crecimiento del tumor primario para el conjunto de ratones NSG implantados con la línea UM-SCC-74B o con la línea 74BserpE1up. La intensidad en cada punto se relativizó con respecto a la intensidad detectada el día de la implantación. Cada punto representa el valor medio de cada grupo de ratones  $\pm$  error estándar.

Además del crecimiento, se analizaron otros parámetros a nivel de tumor primario, como la apoptosis, el tipo de crecimiento (contaje de *tumour budding*) y la proporción de estroma.

#### 4.1.1. El aumento en la expresión de SERPINA E1 disminuye la apoptosis de las células a nivel de tumor primario

Se tomaron como muestras los tumores primarios presentes en las lenguas resecaadas (obtenidos a los 6 o 7 días desde el momento de la implantación) de ratones NSG pertenecientes al grupo de la línea UM-SCC-74B o de la línea 74BserpE1up. Se realizó un marcaje fluorescente de los núcleos celulares a través de la tinción con DAPI (**Figura 61A**). A partir de estas muestras, se determinó el porcentaje de células apoptóticas en ratones implantados con cada una de las líneas analizando en el microscopio de fluorescencia la proporción de células con núcleos apoptóticos con respecto a la del número total de células. El porcentaje de células apoptóticas fue significativamente más elevado en los tumores primarios de ratones implantados con la línea UM-SCC-74B en comparación con el porcentaje obtenido en los tumores generados por la línea 74BserpE1up ( $p=0.001$ ) (**Figura 61B**).

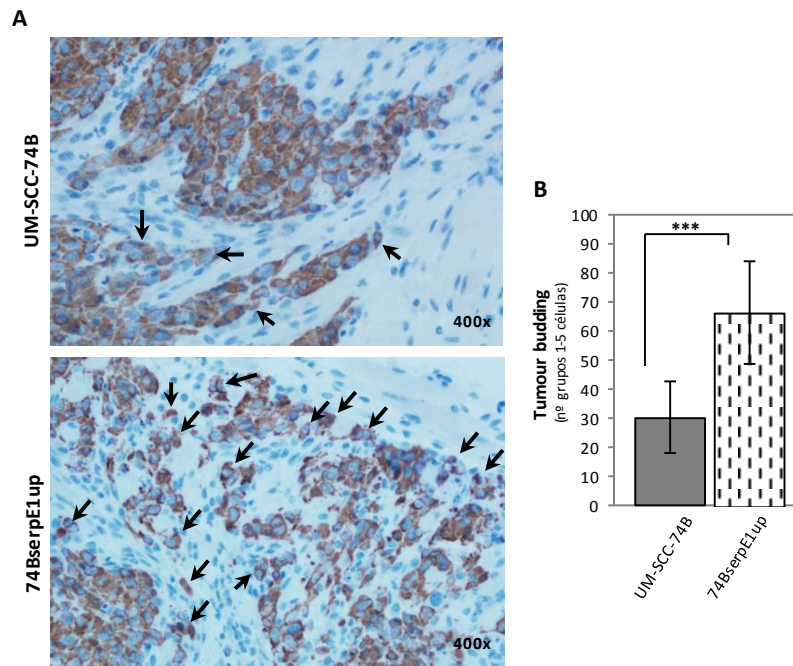


**Figura 61. Apoptosis analizada en tumores primarios generados por la línea UM-SCC-74B y por la línea 74BserpE1up en ratones NSG. (A)** Imágenes representativas de tumores primarios teñidos con DAPI y observados en el microscopio de fluorescencia (las células apoptóticas se señalan con flechas blancas en la imagen ampliada). **(B)** Diagrama de cajas donde se muestra la distribución de los valores de porcentaje de células apoptóticas en ambas líneas (\*\* $p=0.001$ , Test Mann Whitney).

#### 4.1.2. La sobre-expresión de SERPINA E1 cambia el patrón de invasión de las células en el margen del tumor primario

Se analizaron los márgenes en el tumor primario que delimitaban las células tumorales del tejido no tumoral contabilizando la presencia de *tumour budding*, un tipo de crecimiento invasivo que constituye un factor de mal pronóstico en pacientes con CECC (87,88).

Para determinar de un modo más preciso la presencia de células tumorales aisladas en el frente invasivo del tumor, se utilizó la tinción por inmunohistoquímica de vimentina. La tinción de vimentina mostraba una elevada especificidad por las células humanas de la línea UM-SCC-74B y de la línea 74BserpE1up, y no presentó reactividad cruzada ni tinción del resto de células estromales de origen murino. A partir de las preparaciones inmunohistoquímicas de vimentina, se determinó el número de grupos de células formados por 1-5 células en diferentes áreas del frente invasivo (**Figura 62A**). El número medio de grupos de 1-5 células en el frente invasivo (*tumor budding*) en los tumores primarios de ratones implantados con la línea 74BserpE1up fue significativamente más elevado que el encontrado en la línea UM-SCC-74B ( $p < 0.000$ ) (**Figura 62B**).

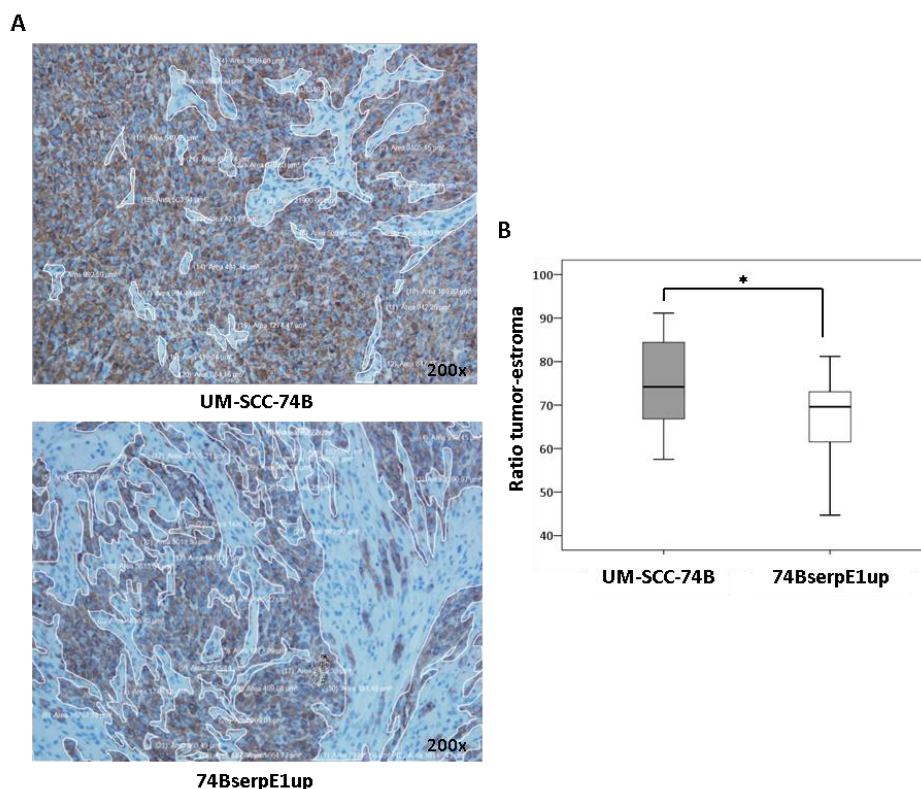


**Figura 62. Tumour budding** analizado en el frente invasivo de tumores primarios generados por la línea UM-SCC-74B y la línea 74BserpE1up en ratones de la cepa NSG. (A) Preparaciones de inmunohistoquímica de vimentina de tumores primarios generados por las dos líneas celulares donde se muestran las células tumorales en el frente invasivo (grupos de 1-5 células señalados con flechas negras). (B) Histograma que muestra la media  $\pm$  desviación estándar de grupos de 1-5 células encontrado en tumores primarios de ratones implantados con la línea UM-SCC-74B o con la línea 74BserpE1up (\*\*\*)  $p < 0.000$ , Test Mann Whitney).

#### 4.1.3. La sobre-expresión de SERPINA E1 aumenta la proporción de estroma en el tumor primario

De nuevo se hizo uso de la tinción por inmunohistoquímica de vimentina para distinguir las células tumorales del resto de células del ratón, en este caso, de las células estromales, ya que mediante esta tinción sólo se detectó la vimentina de origen humano y no la de origen murino.

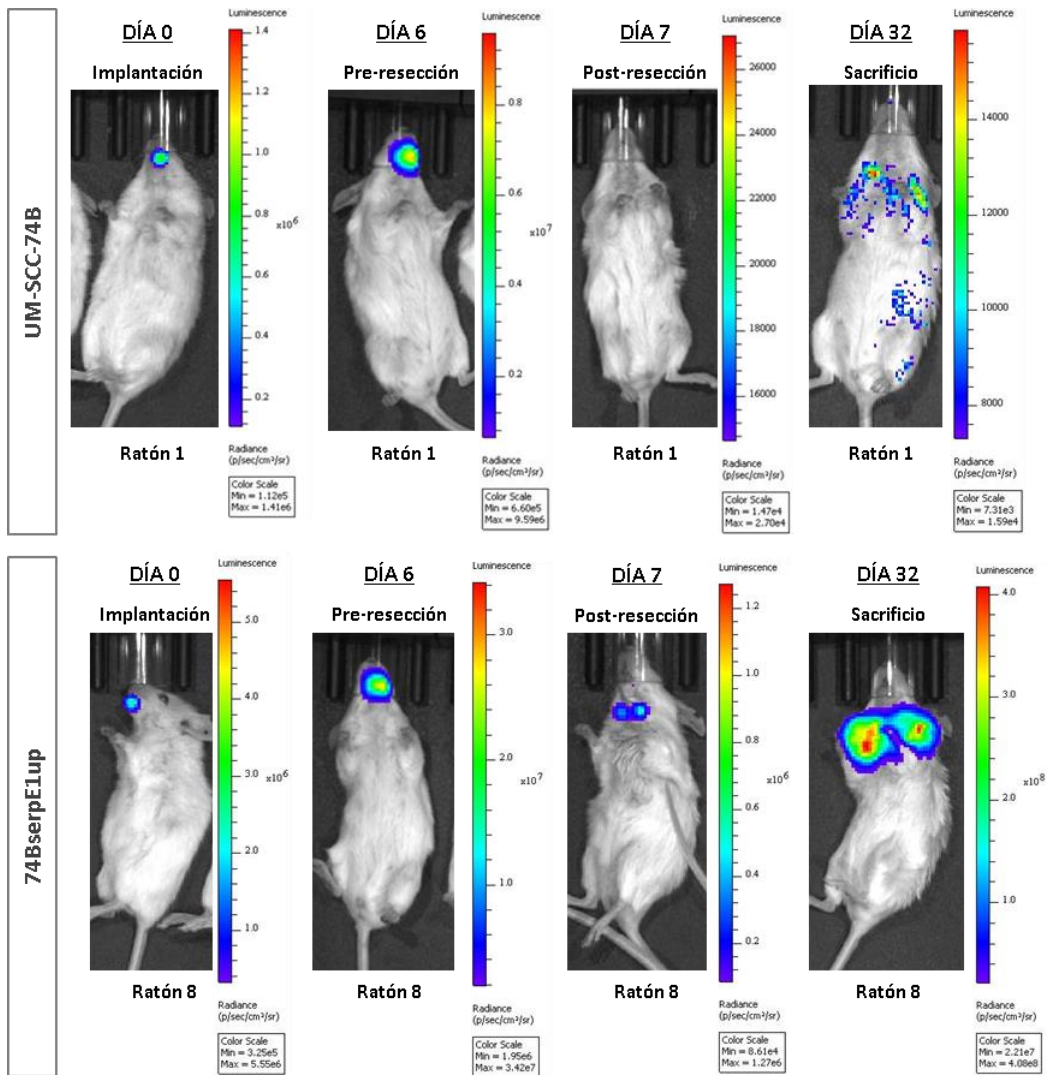
A partir de inmunohistoquímicas de vimentina de lenguas reseccionadas obtenidas de ratones implantados con la línea UM-SCC-74B o con la línea 74BserpE1up (**Figura 63A**), se seleccionaron las zonas con mayor proporción de estroma (evitando cuantificar las zonas situadas más allá del frente invasivo). De estas zonas, se cuantificó el área ocupada por el estroma (línea blanca) y se determinó el área ocupada por células tumorales, restándole al área total de la imagen el área de estroma previamente cuantificado. A partir del valor de área ocupado por células tumorales, se calculó el ratio tumor-estroma ( $\text{Área ocupada por células tumorales} \times 100 / \text{Área total imagen}$ ). Como se observa en la **figura 63B**, la proporción de tumor con respecto a estroma (ratio tumor-estroma) es significativamente inferior en los tumores de la línea 74BserpE1up en comparación con los de la línea UM-SCC-74B ( $p = 0.02$ , Test Mann Whitney). Por tanto, los resultados indican que la proporción de estroma es mayor en los tumores derivados de la línea 74BserpE1up que en los derivados de la línea UM-SCC-74B.



**Figura 63. Ratio tumor-estroma de tumores primarios generados por la línea UM-SCC-74B y la línea que sobre-expresa SERPINA E1, 74BserpE1up, en ratones de la cepa NSG. (A)** Inmunohistoquímicas de vimentina representativas de cada línea celular donde se ha cuantificado el área de estroma. Las líneas blancas delimitan el área ocupada por estroma. **(B)** Diagrama de cajas que muestra la distribución de los valores de ratio tumor-estroma (área tumoral x 100/área total) cuantificado en tumores primarios de ambas líneas (\* $p=0.02$ , Test Mann-Whitney).

## 4.2. Implicación de SERPINA E1 en el desarrollo de metástasis ganglionares

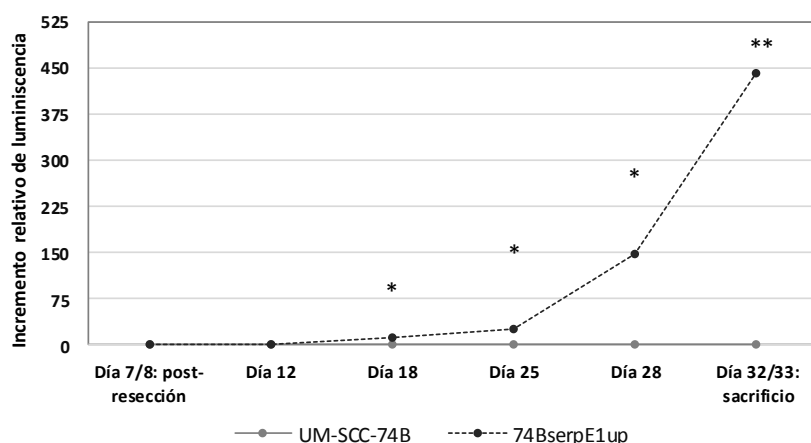
El uso de células tumorales bioluminiscentes permitió realizar el seguimiento *in vivo* de su localización en cada ratón durante todo el experimento (**Figura 64**). En nuestro modelo ortotópico de CECC en ratones NSG, comenzó a detectarse la señal de luminiscencia de células tumorales a nivel de ganglios cervicales tras la resección del tumor primario localizado en la lengua, que se correspondió con el día 7 u 8 desde el momento de la implantación. Esto fue así debido a que la intensidad de luminiscencia emitida por las células tumorales del tumor primario antes de la resección (Día 6/7: Intensidad media  $_{UM-SCC-74B} = 3.5 \times 10^7 \pm 4.4 \times 10^6$  p/s; Intensidad media  $_{74BserpE1up} = 1.5 \times 10^8 \pm 1.3 \times 10^7$  p/s) fue muy superior a la intensidad de luminiscencia emitida por las células que habían diseminado a los ganglios cervicales, registrada el día después de la resección (Día 7/8: Intensidad media  $_{UM-SCC-74B} = 5.1 \times 10^6 \pm 2.0 \times 10^6$  p/s; Intensidad media  $_{74BserpE1up} = 3.3 \times 10^6 \pm 6.8 \times 10^5$  p/s), apantallando la señal luminiscente emitida por los ganglios. Como se observa en la **figura 64**, a partir del momento de la resección (día 7/8: Post-resección), la mayor intensidad de luminiscencia se detectó en los ganglios cervicales, en aquellos ratones que presentaron diseminación de células tumorales en esta localización.



**Figura 64. Seguimiento por bioluminiscencia de un ratón inyectado con la línea UM-SCC-74B (fila superior) y otro con la línea 74BserpE1up (fila inferior).** La señal de luminiscencia desde el día 0 al día 6 antes de la resección es debida al tumor primario localizado en la lengua y, a partir de la resección del día 6, la señal se corresponde con células tumorales diseminadas a ganglios cervicales.

En primer lugar, tras la resección del tumor primario (día 7/8, día 12, día 18, día 25, día 28, día 32/33), se analizó la evolución de la intensidad de luminiscencia absoluta en el grupo de ratones implantados con la línea UM-SCC-74B, y por otro lado, la del grupo de ratones implantados con la línea 74BserpE1up. Se observó que la intensidad de luminiscencia proveniente de las células tumorales localizadas en los ganglios cervicales de los ratones implantados con la línea 74BserpE1up varió muy significativamente ( $p < 0.000$ ), aumentando a lo largo del tiempo, mientras los ratones implantados con la línea parental no presentaron dicha variación ( $p = 0.927$ ). Posteriormente, para poder comparar la evolución de la intensidad de luminiscencia entre los ratones implantados con la línea parental y los implantados con la línea que sobre-expresa SERPINA E1, se calculó el incremento relativo de intensidad de luminiscencia para cada ratón en cada día de registro con respecto al primer día que empezó a detectarse señal de luminiscencia proveniente de los ganglios cervicales (Día 7/8: Post-resección), aplicando la fórmula  $(\text{Intensidad luminiscencia día "problema"} - \text{Intensidad luminiscencia día 7/8}) /$

Intensidad luminiscencia día 7/8. En la Figura 65 se muestran las medianas de los datos obtenidos para el grupo de ratones implantados con la línea parental o con la línea con sobre-expresión de SERPINA E1. A partir del día 18 (incluido), se observó un mayor incremento en la intensidad de luminiscencia ganglionar en los ratones de la línea 74BserpE1up, que aumentó exponencialmente hasta el día del sacrificio, mientras que la detectada en los ratones de la línea UM-SCC-74B presentó un escaso incremento (**Figura 65**). Dichas diferencias se analizaron a través del Test Mann-Whitney siendo significativas a partir del día 18, 25, 28 y 32/33 ( $p=0.034$ ,  $0.025$ ,  $0.026$ ,  $0.005$ , respectivamente). Estos resultados indican que la sobre-expresión de SERPINA E1 aumenta la tasa de crecimiento de las células tumorales diseminadas a ganglios cervicales.



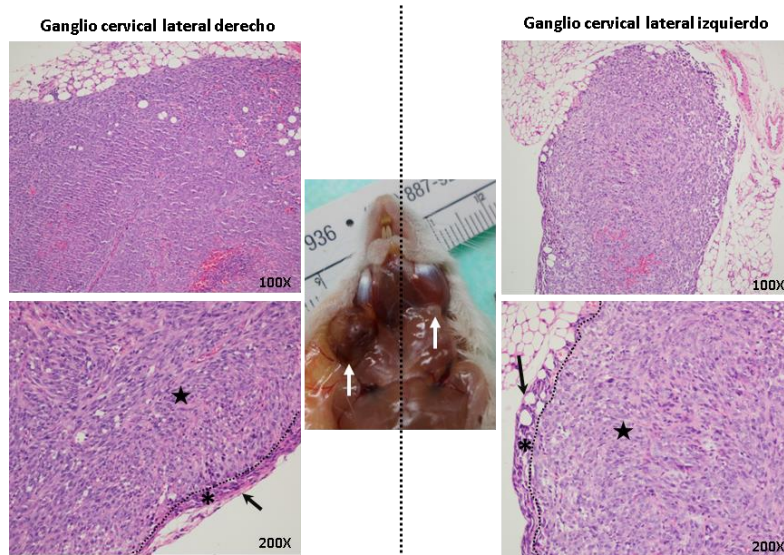
**Figura 65.** Incremento relativo de intensidad de luminiscencia con respecto al día después de la resección (Día 7/8: Post-resección) de todos los ratones NSG implantados con la línea UM-SCC-74B o con la línea 74BserpE1up. Cada punto representa la mediana del incremento relativo de todos los ratones de una misma línea (\*\* $p<0.01$ , \* $p<0.05$ ).

Además de la información obtenida a través del registro de luminiscencia, el día del sacrificio se recogieron los ganglios cervicales que se observaron macroscópicamente durante la necropsia de los ratones. En la **figura 66** se muestra un ratón con metástasis ganglionar macroscópica y otro sin metástasis ganglionar en el momento del sacrificio, antes y después de retirarles la piel para facilitar su observación.



**Figura 66.** Visión macroscópica de un ratón NSG con metástasis ganglionar en un único ganglio y de otro ratón sin metástasis ganglionar, antes y después de retirar la piel. Las flechas blancas señalan la localización de los ganglios cervicales superficiales.

La determinación y confirmación del número de ganglios infiltrados por ratón, se realizó mediante el análisis histológico de las preparaciones de hematoxilina-eosina de los ganglios recogidos (**Figura 38**). Los resultados definitivos de cada ratón se encuentran en la **tabla 28** mostrada anteriormente, en la columna de histología.



**Figura 67.** Imagen representativa de un ratón con infiltración ganglionar en ambos lados (flechas blancas) y las respectivas tinciones de hematoxilina-eosina de los ganglios infiltrados (la estrella representa las células tumorales, el asterisco el tejido linfático y las flechas negras la cápsula de los ganglios).

En la **tabla 29** se recoge el número de ratones que presentaron ganglios infiltrados (1 o más ganglios infiltrados) y aquellos que no presentaron infiltración ganglionar (0 ganglios infiltrados) en el grupo implantado con la línea UM-SCC-74B o en el grupo implantado con la línea 74BserpE1up. El análisis estadístico mediante test de Fisher de los resultados obtenidos, muestra que existen diferencias significativas en cuanto a la proporción de ratones con o sin infiltración ganglionar en función de la línea con la que fueron implantados ( $p = 0.009$ ). Existe una mayor proporción de ratones con infiltración ganglionar en el grupo de la línea 74BserpE1up cuando lo comparamos con el grupo de la línea UM-SCC-74B. Por tanto, SERPINA E1 favorece la diseminación de las células tumorales a los ganglios cervicales.

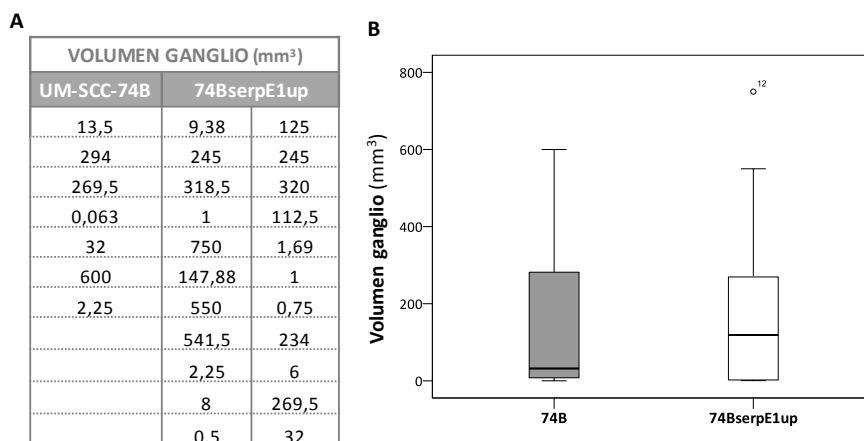
**Tabla 29.** Número de ratones NSG que presentaron (presencia) o no (ausencia) infiltración ganglionar en el momento del sacrificio

	Nº RATONES CON INFILTRACIÓN GANGLIONAR		TOTAL
	Ausencia	Presencia	
<b>UM-SCC-74B</b>	6	4	10
<b>74BserpE1up</b>	1	13	14

\*\* $p = 0.009$ , Test Fisher

En el conjunto de ratones que presentaron infiltración ganglionar, se comparó el volumen de los ganglios infiltrados por la línea UM-SCC-74B ( $n=7$ ) con el de los ganglios infiltrados por la línea 74BserpE1up ( $n=22$ ), para comprobar si la SERPINA E1 inducía el crecimiento de las metástasis ganglionares favoreciendo la generación de ganglios de mayor tamaño. En la **Figura 68A** se muestra el volumen de cada ganglio infiltrado, calculado a partir de su diámetro mayor y su diámetro menor según

la siguiente fórmula  $Volumen = (\text{diámetro}_{\text{mayor}} \times \text{diámetro}_{\text{menor}}^2) / 2$ , para el grupo de ratones implantado con la línea UM-SCC-74B y el grupo implantado con la línea 74BserpE1up. Como se muestra en el diagrama de la **figura 68B**, la mediana del volumen ganglionar fue mayor en el grupo implantado con la línea 74BserpE1up. No obstante, las diferencias no alcanzaron la significancia estadística debido al elevado grado de dispersión y heterogeneidad en el volumen de los ganglios analizados dentro de cada grupo de ratones ( $p=0.939$ , Test Mann-Whitney).



**Figura 68. Infiltración de los ganglios cervicales por células tumorales de la línea UM-SCC-74B y de la línea 74BserpE1up en ratones NSG. (A)** Volumen de los ganglios infiltrados calculado a partir del diámetro mayor (D) y menor (d) de cada ganglio ( $V_{\text{ganglio}} = D \times d^2 / 2$ ). **(B)** Diagrama de cajas que muestra la distribución de los valores del volumen ganglionar en el grupo de la línea UM-SCC-74B y en el grupo de la línea 74BserpE1up.

Con el objetivo de comparar el nivel de diseminación ganglionar entre células con diferente nivel de expresión de SERPINA E1, se analizó, en el conjunto de ratones con infiltración ganglionar, la proporción de ratones que presentaron un ganglio con respecto a los que presentaron dos o más ganglios infiltrados, en relación con la línea celular con la que fueron implantados (UM-SCC-74B o 74BserpE1up). En la **tabla 30** se muestran dichos resultados. Aunque se observó una mayor proporción de ratones con 2 o más ganglios infiltrados en el grupo de la línea 74BserpE1up en comparación con el grupo de la línea UM-SCC-74B, las diferencias no fueron significativas ( $p=0,294$ , Test de Fisher), posiblemente debido al tamaño muestral tan reducido de ratones con infiltración ganglionar implantados con la línea UM-SCC-74B ( $n=5$ ).

**Tabla 30. Número de ratones NSG que presentaron metástasis en uno o en varios ganglios en relación con la línea celular con la que fueron implantados (UM-SCC-74B o 74BserpE1up)**

	Nº DE RATONES CON METÁSTASIS GANGLIONAR (Porcentaje en cada línea)		TOTAL
	1 ganglio	2 o más ganglios	
<b>UM-SCC-74B</b>	4 (80%)	1 (20%)	5
<b>74BserpE1up</b>	5 (38%)	8 (62%)	13

$p = 0.294$ , Test de Fisher



### 4.3. Implicación de SERPINA E1 en el desarrollo de metástasis a distancia

Entre los órganos diana donde metastatizan con mayor frecuencia las células tumorales en pacientes con CECC, encontramos los pulmones y el hígado. Se estudió la capacidad de diseminar y colonizar estos órganos por parte de las líneas celulares con diferente nivel de expresión de SERPINA E1, UM-SCC-74B y 74BserpE1up.

#### 4.3.1. La sobre-expresión de SERPINA E1 aumenta la capacidad de dispersión durante la colonización del pulmón y estimula la generación de focos de mayor tamaño

Se analizó el patrón de diseminación y la capacidad de crecimiento de las células tumorales en los pulmones de los ratones implantados con la línea que sobre-expresa SERPINA E1, 74BserpE1up, o con la línea parental, UM-SCC-74B. La localización interna de los pulmones así como la presencia de otras señales de luminiscencia de mayor intensidad en otros tejidos del ratón, provenientes del tumor primario y/o los ganglios cervicales, impidió que se pudiera realizar un seguimiento *in vivo* de la presencia y crecimiento de las metástasis pulmonares durante el transcurso del experimento. Por ese motivo, se determinó el número de ratones con metástasis pulmonar así como el número y el tamaño de los focos presentes en cada pulmón, mediante el procesamiento histológico de los pulmones tras el sacrificio de los ratones. En el momento del sacrificio se realizó un registro de luminiscencia de todos los pulmones *ex vivo* (Figura 69).

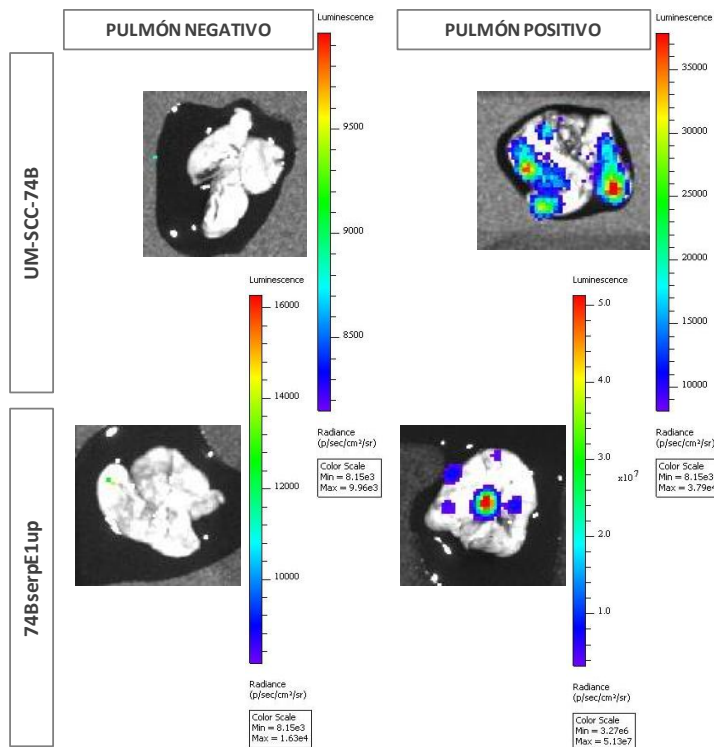
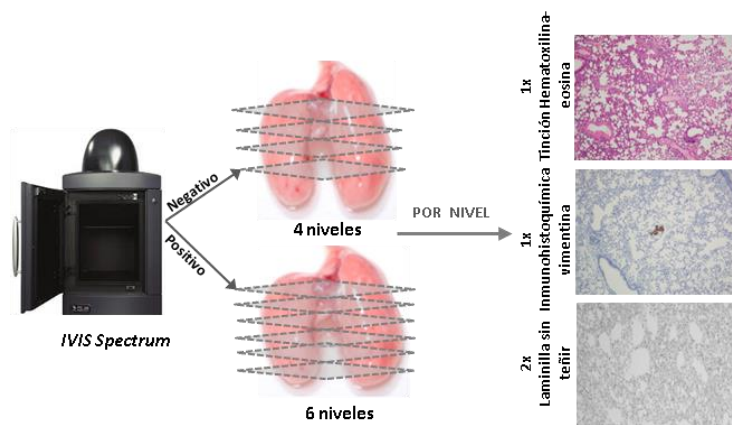


Figura 69. Registro de pulmones *ex vivo*, con (pulmón positivo) y sin (pulmón negativo) señal de luminiscencia, pertenecientes a ratones NSG implantados con la línea UM-SCC-74B o con la línea 74BserpE1up.

Para mejorar la detección de focos tumorales de pequeño tamaño y poder estudiar el patrón de diseminación de dichos focos en el pulmón, se analizaron diferentes zonas del tejido pulmonar, que se

definieron como niveles. Cada nivel estaba formado por 8 cortes sucesivos de tejido pulmonar que se recogieron en 4 preparaciones (2 cortes de pulmón por preparación). La primera preparación de cada nivel se empleó para realizar una tinción de hematoxilina-eosina y la segunda para realizar una inmunohistoquímica con vimentina. El número de niveles cortados por pulmón dependió de si el pulmón presentaba señal de luminiscencia *ex vivo*, a través del registro en el *IVIS Spectrum*, tras el sacrificio de cada ratón. Los pulmones positivos en señal de luminiscencia se cortaron en 6 niveles mientras que los negativos en 4 (**Figura 70**). Si tras esos 4 niveles se detectó algún foco en los pulmones negativos, se ampliaron los niveles hasta 6. Los 4 niveles iniciales se realizaron con el objetivo de realizar un cribaje en diferentes zonas de pulmón y así detectar todos los posibles pulmones positivos, mientras que la ampliación hasta 6 niveles se realizó para obtener más secciones de tejido y así poder estudiar más exhaustivamente el patrón de colonización del pulmón por las células tumorales.

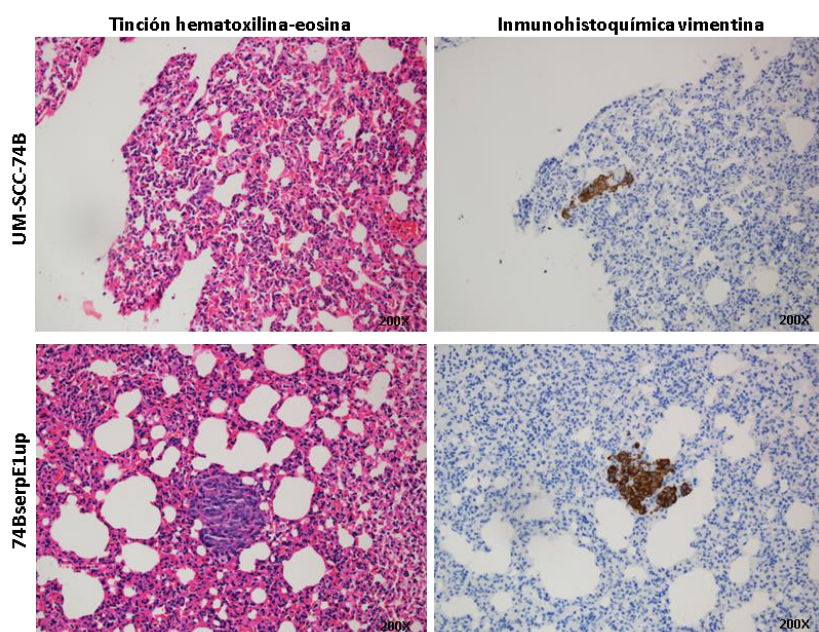


**Figura 70. Esquema del procesamiento de los pulmones *ex vivo*.** Tras el sacrificio del ratón el pulmón se registra en el *IVIS Spectrum*, después se fija y se analizan diferentes zonas de profundidad creciente del tejido pulmonar (niveles). En cada zona o nivel se realizan 8 cortes de tejido que se colocan sobre 4 laminillas (2 cortes por laminilla), la primera laminilla se tiñe con hematoxilina-eosina, con la segunda se hace una inmunohistoquímica de vimentina y las dos últimas se reservan sin teñir. Si el pulmón presentó señal de luminiscencia, se analizaron 6 niveles y si no presentó señal de luminiscencia se analizaron 4 niveles de tejido pulmonar.

En todos los pulmones se contabilizó el número de focos encontrado en las preparaciones de hematoxilina-eosina, así como el encontrado en las preparaciones de inmunohistoquímica de vimentina de los diferentes niveles realizados (más arriba, en la **tabla 28**, se muestra el número de focos totales encontrados en cada pulmón para los dos tipos de preparaciones).

En anteriores experimentos ortotópicos, tanto el número como el tamaño de los focos de células tumorales en pulmón generados por las líneas celulares UM-SCC-74B y 74BserpE1up alcanzaron valores reducidos. En preparaciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina sólo se podían detectar focos metastáticos de tamaño superior 5 células. Por este motivo, en este experimento cada pulmón se cortó en diferentes niveles y una de las preparaciones que se realizó en cada nivel fue una inmunohistoquímica de vimentina. La inmunohistoquímica de vimentina nos permitió aumentar la sensibilidad en la detección de los focos constituidos por un número pequeño de células tumorales, incluso de 1-5 células, de una manera específica, ya que el anticuerpo empleado reconoce únicamente

el marcador vimentina humano, con elevada expresión en las células tumorales de las líneas UM-SCC-74B y 74BserpE1up y no en las células del ratón (**Figura 71**).



**Figura 71.** Preparación de hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica de vimentina representativas de un foco en pulmón generado por la línea UM-SCC-74B o por la línea 74BserpE1up en ratones NSG.

Para la comparación de la capacidad de diseminación y colonización pulmonar entre ambas líneas tumorales, se tuvieron en cuenta los resultados contabilizados a partir de las preparaciones de inmunohistoquímica de vimentina, más específica y sensible que la tinción por hematoxilina-eosina. En primer lugar, se analizó el número de ratones que presentaron metástasis pulmonar del grupo implantado con la línea UM-SCC-74B (n=10) en comparación con el grupo implantado con la línea 74BserpE1up (n=14), considerando los ratones con metástasis pulmonar aquellos en los que se observó uno o más focos de células tumorales en el tejido analizado del pulmón (**Tabla 31**). No se encontraron diferencias significativas en el número de ratones con o sin metástasis pulmonar en relación con la línea celular con la que fueron implantados (p= 0,678, Test de Fisher).

**Tabla 31.** Número de ratones NSG que presentaron metástasis pulmonar (1 o más focos) frente a los que no presentaron metástasis pulmonar (0 focos), implantados con la línea UM-SCC-74B o con la línea 74BserpE1up

	Nº DE RATONES (Porcentaje en cada línea)		RATONES TOTALES
	Sin metástasis pulmonar	Con metástasis pulmonar	
<b>UM-SCC-74B</b>	7 (70%)	3 (30%)	10
<b>74BserpE1up</b>	8 (57%)	6 (43%)	14

p = 0,678, Test de Fisher

Con el objetivo de comparar el patrón de dispersión en el pulmón por parte de las células tumorales con o sin sobre-expresión de SERPINA E1, se analizó la presencia o ausencia de focos de células tumorales en cada nivel o zona de tejido pulmonar. Solo se incluyeron en este análisis los ratones que presentaron metástasis pulmonar, de cuyos pulmones se analizó la misma superficie de

tejido pulmonar. Para ello se emplearon las preparaciones de inmunohistoquímica de vimentina, 6 preparaciones por ratón (una por nivel), obtenidas de ratones NSG implantados con la línea UM-SCC-74B o con la línea 74BserpE1up. Los niveles donde no se encontró ningún foco tumoral se consideraron negativos mientras que cuando se encontraron uno o más focos tumorales, se consideró un nivel positivo. Como se puede observar en la **tabla 32**, se encontró una mayor proporción de niveles positivos en los pulmones con metástasis provenientes de ratones implantados con la línea 74BserpE1up en comparación con aquellos provenientes de ratones implantados con la línea UM-SCC-74B. Por tanto, la sobre-expresión de SERPINA E1 favorece la capacidad de colonizar de manera dispersa el tejido pulmonar por parte de las células tumorales.

**Tabla 32. Número de niveles que presentaron uno o más focos tumorales (Positivos) o ninguno (Negativos) en los niveles de tejido pulmonar analizado de los ratones NSG con metástasis pulmonar, implantados con la línea UM-SCC-74B o con la línea 74BserpE1up**

	Nº DE NIVELES (Porcentaje en cada línea)		NIVELES TOTALES ANALIZADOS
	Negativos	Positivos	
UM-SCC-74B	5 (28%)	13 (72%)	18
74BserpE1up	2 (6%)	34 (94%)	36

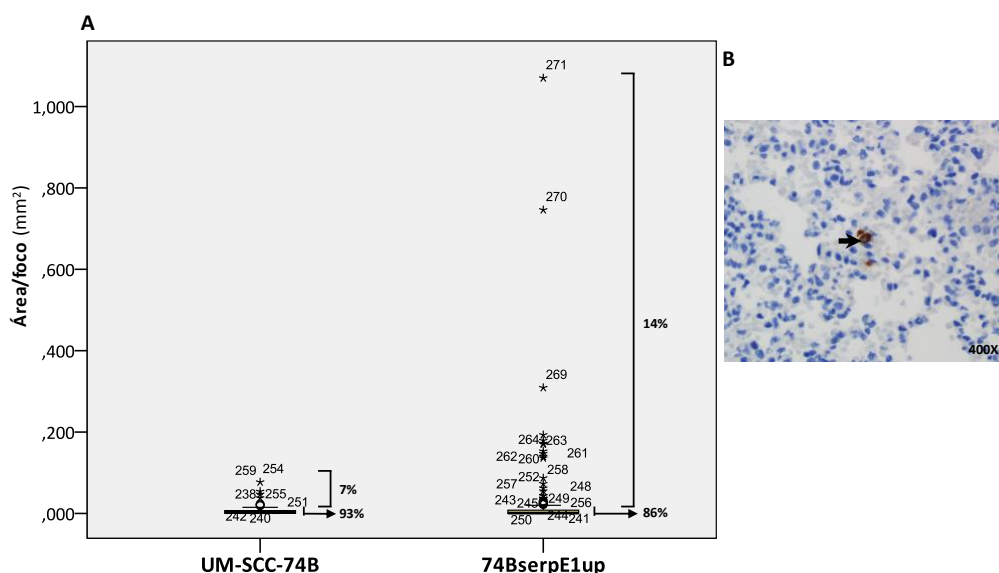
\*p = 0,034 Test de Fisher

Con el objetivo de analizar si la sobre-expresión de SERPINA E1 podía influir en la capacidad de colonización de las células tumorales en el pulmón, se contabilizó el número de focos totales por ratón encontrados en los diferentes niveles de tejido pulmonar analizado de todos los ratones que presentaron metástasis pulmonar y que fueron implantados con la línea UM-SCC-74B o con la línea 74BserpE1up. Los resultados para cada ratón implantado con una y otra línea celular en los 6 niveles analizados se muestran en la **tabla 33**, tanto el número de focos en cada nivel como el número total de focos encontrados en el tejido pulmonar analizado (el mismo para todos los ratones que presentaron metástasis pulmonar). No se encontraron diferencias en el número medio de focos por ratón entre el grupo implantado con la línea UM-SCC-74B (n=3) y el grupo de la línea 74BserpE1up (n=6) (p=0.796, Test Mann-Whitney).

**Tabla 33. Número de focos por nivel de pulmón en las 6 preparaciones de inmunohistoquímica de vimentina de cada ratón NSG con metástasis pulmonar implantado con la línea UM-SCC-74B o con la línea 74BserpE1up**

	RATÓN	FOCOS POR NIVEL						FOCOS TOTALES
		1	2	3	4	5	6	
UM-SCC-74B	5	8	6	12	10	5	7	48
	6	0	0	1	0	0	0	1
	16	5	11	10	11	7	7	42
74BserpE1up	8	1	5	3	3	17	18	53
	12	4	6	4	4	7	7	32
	13	2	4	0	6	4	2	15
	22	8	6	12	8	2	2	34
	27	4	1	6	1	1	1	14
	29	0	10	9	12	7	6	30

Además de contar el número de focos en cada nivel, se midió el área de cada foco. En la **Figura 72A** se muestra la distribución de todos los focos encontrados en los diferentes niveles en función de su área ( $\text{mm}^2$ ), agrupados según la línea celular con la que fue implantado el ratón donde se observó cada foco. El área de los focos encontrados presentó valores desde  $\leq 0.001$  hasta  $1.07 \text{ mm}^2$ . Destacar que los valores de área representados en el diagrama de cajas como 0.000 se corresponden con áreas inferiores a  $0.001 \text{ mm}^2$  (desde  $0.000236 \text{ mm}^2$ , lo equivalente al área ocupada por una célula tumoral, hasta  $0.000472 \text{ mm}^2$ , el área ocupada por un foco formado por dos células tumorales). Aunque en el diagrama no consigue apreciarse bien, el área de foco que presentó una mayor frecuencia de focos generados por ambas líneas celulares fue el de  $< 0.001 \text{ mm}^2$  (focos formados por una o dos células tumorales, **figura 72B**), con una frecuencia del 25% y 29%, de focos generados por la línea UM-SCC-74B y la línea 74BserpE1up, respectivamente. En el diagrama de cajas se muestra el porcentaje de focos que estadísticamente se consideran *outliers*, siendo el 7% y el 14% de los focos en el caso de la línea UM-SCC-74B y de la línea 74BserpE1up, respectivamente.

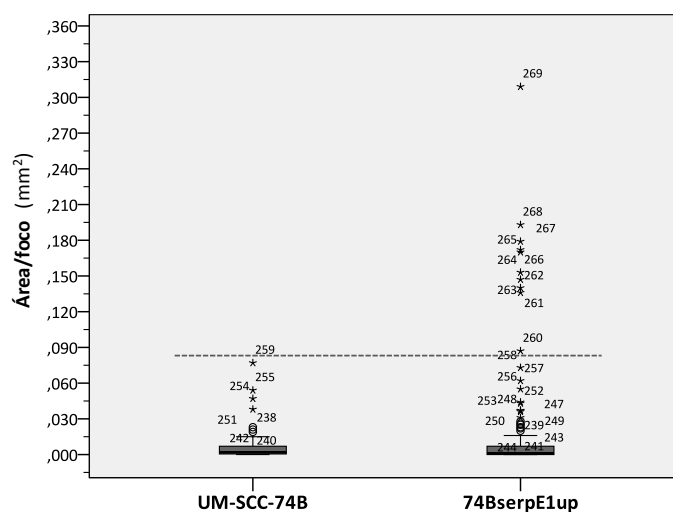


**Figura 72. Focos tumorales en pulmón generados por la línea UM-SCC-74B o por la línea 74BserpE1up en ratones NSG. (A)** Diagrama de cajas donde se muestra la distribución basada en el área ( $\text{mm}^2$ ) de cada foco encontrado en los 6 niveles de tejido pulmonar analizado por ratón implantado con cada línea. **(B)** Inmunohistoquímica de vimentina de pulmón donde se muestra un foco formado por 1 célula (flecha negra). El citoplasma de la célula tumoral se tiñe de color marrón, el núcleo no se tiñe y tampoco lo hace ningún elemento del tejido pulmonar del ratón.

Se analizó si existían diferencias entre el área de los focos pertenecientes al grupo de ratones implantado con la línea UM-SCC-74B o con la línea 74BserpE1up. No se encontraron diferencias significativas en el área media de foco generados por una u otra línea celular ( $p=0.641$ , Test Mann-Whitney).

Con el objetivo de tener un conocimiento más exhaustivo de la distribución del área de los focos en los dos grupos de ratones, se amplió el diagrama de la **figura 72**, eliminando los valores de área de foco más grandes (posiciones 270 y 271), y se obtuvo el diagrama que se muestra en la **figura 73**. Se observa cómo, a partir de un valor de área de  $0.08 \text{ mm}^2$  (incluida) (posición 260 en la figura 73), sólo se

encontraron focos generados por la línea 74BserpE1up y no por la línea UM-SCC-74B (marcado con una línea negra discontinua en el diagrama de la **figura 73**).



**Figura 73.** Diagrama de cajas donde se muestra la distribución basada en el área (mm<sup>2</sup>) de cada foco encontrado en los 6 niveles de tejido pulmonar analizado por ratón NSG implantado con la línea UM-SCC-74B o con la línea 74BserpE1up, eliminando los valores de área de foco extremos (posición 270 y 271). La línea negra discontinua marca el tamaño de área a partir del cual solo se encuentran focos generados por la línea 74BserpE1up (0.08mm<sup>2</sup>).

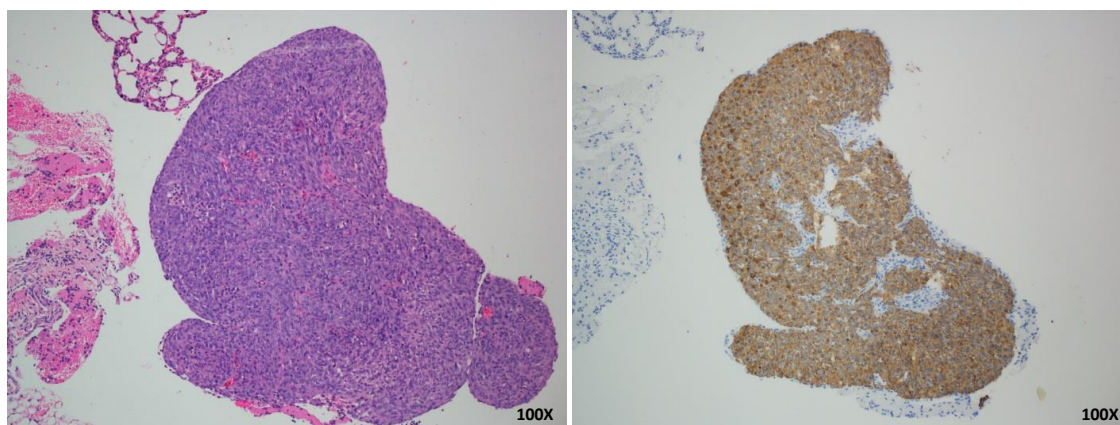
En base a estas observaciones, se analizó la distribución de los focos en función de su área categorizando dicha variable cuantitativa en dos, focos con un área inferior a 0.08mm<sup>2</sup> y focos con un área igual o superior a 0.08mm<sup>2</sup>, y se comparó la proporción de focos de una y otro categoría generados por la línea UM-SCC-74B o por la línea 74BserpE1up. Aplicando el test de Fisher, se encontraron diferencias significativas entre la distribución de las áreas de foco generadas por una y otra línea entre estas dos categorías (p = 0.01) (**Tabla 34**). Por tanto, la sobre-expresión de SERPINA E1 aumenta la proporción de focos de mayor tamaño (0.08 mm<sup>2</sup> o superior) en el tejido pulmonar de los ratones NSG.

**Tabla 34.** Distribución del número de focos que presentaron un área inferior e igual o superior a 0.08 mm<sup>2</sup> generados por la línea UM-SCC-74B o generados por la línea 74BserpE1up en ratones NSG

	Nº FOCOS		FOCOS TOTALES
	Área < 0.08	Área ≥ 0.08	
<b>UM-SCC-74B</b>	91	0	91
<b>74BserpE1up</b>	168	12	180

\* p = 0.01, Test de Fisher

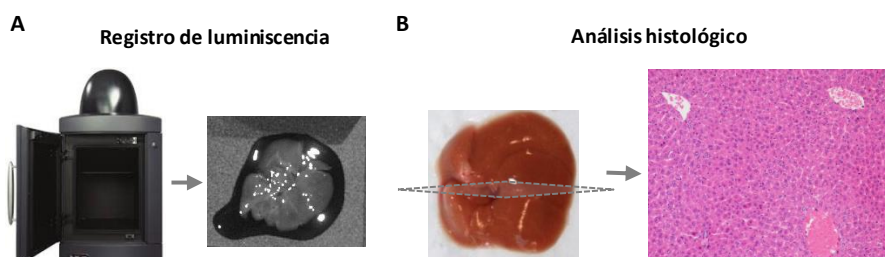
Como dato a destacar, sólo se encontró un foco macroscópico (de área mayor o igual a 1mm<sup>2</sup>) en todos los pulmones analizados y este fue generado por la línea 74BserpE1up (ratón 29) (**Figura 74**).



**Figura 74.** Foco macroscópico en pulmón de área superior a 1mm<sup>2</sup> generado por la línea 74BserpE1up en un ratón NSG, teñido con hematoxilina-eosina (izquierda) o mediante inmunohistoquímica de vimentina (derecha).

#### 4.3.2. Papel de SERPINA E1 en las metástasis hepáticas

Tras el sacrificio de cada ratón, los hígados se registraron *ex vivo* en el *IVIS Spectrum* para detectar posibles señales de luminiscencia (**Figura 75A**). Posteriormente, se recogieron en una solución de fijación y se incluyeron en parafina. Cada hígado se cortó longitudinalmente hasta llegar a la zona central del órgano y se preparó un portaobjetos con 2 cortes de esa zona que se tiñó con hematoxilina-eosina (**Figura 75B**).



**Figura 75.** Procesamiento al que se somete cada hígado tras sacrificar al ratón. **(A)** Registro de luminiscencia *ex vivo* en el *IVIS Spectrum*. **(B)** Tras el registro, el hígado se fija, se incluye en parafina y se corta longitudinalmente hasta llegar a la zona central, de esa zona central se recogen dos cortes y se tiñen con hematoxilina-eosina.

Los resultados obtenidos tras analizar cada hígado se muestran en la **tabla 28**, en la última columna del apartado de *IVIS* y del apartado de *HISTOLOGÍA*, expuesta anteriormente. Se detectó metástasis hepática en 4 ratones implantados con la línea 74BserpE1up y en ningún ratón implantado con la línea UM-SCC-74B. De estos 4 ratones, a dos ratones se les detectó un foco de células tumorales tras la observación en el microscopio de la preparación de hematoxilina-eosina (**Figura 76**) y a los otros dos, se les detectó uno y dos focos de luminiscencia, respectivamente, durante el registro *ex vivo* en el *Ivis Spectrum* (**Figura 77**), pero no se pudo confirmar la presencia de dichas células en el posterior análisis histológico.

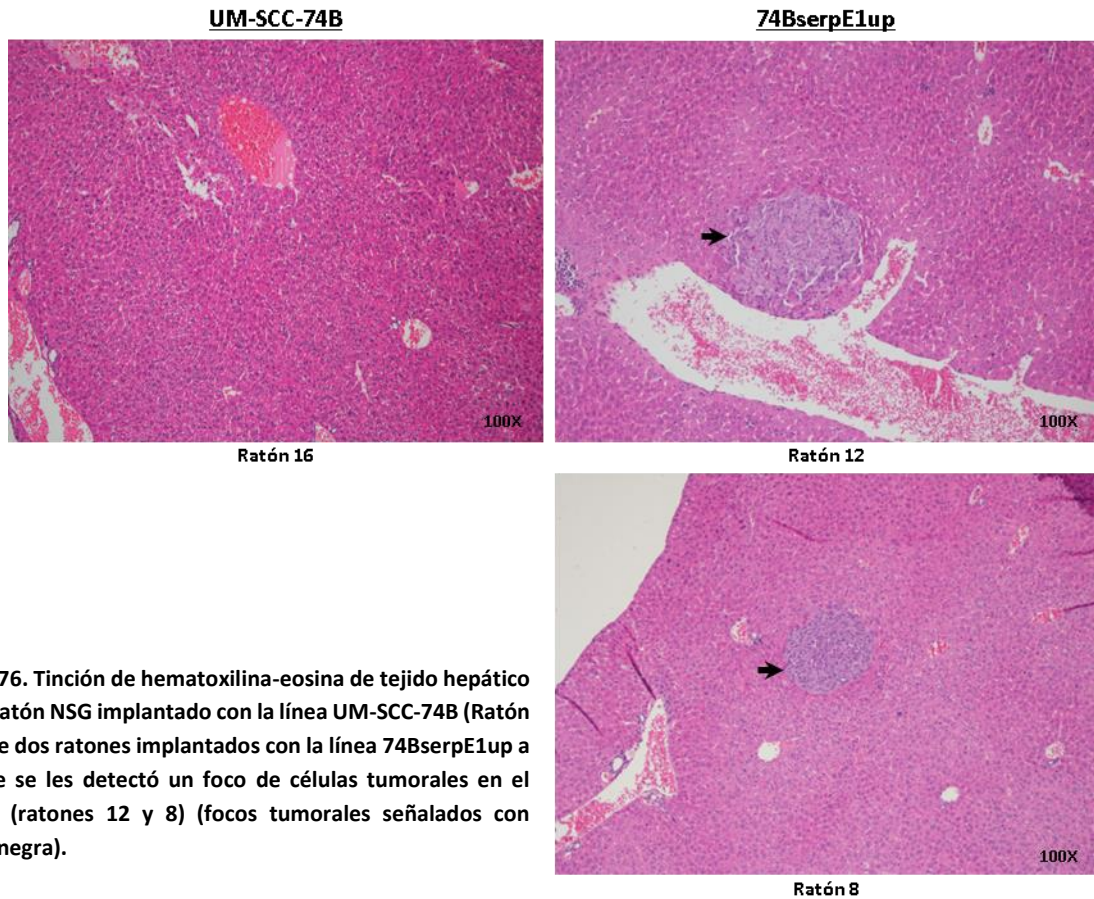


Figura 76. Tinción de hematoxilina-eosina de tejido hepático de un ratón NSG implantado con la línea UM-SCC-74B (Ratón 16) y de dos ratones implantados con la línea 74BserpE1up a los que se les detectó un foco de células tumorales en el hígado (ratones 12 y 8) (focos tumorales señalados con flecha negra).

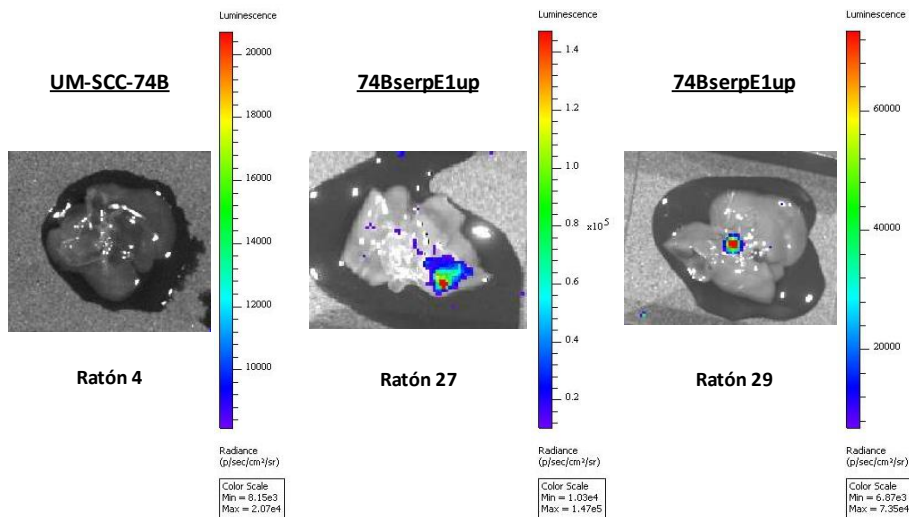


Figura 77. Registro de luminiscencia *ex vivo* en el *IVIS Spectrum* del hígado de un ratón NSG implantado con la línea UM-SCC-74B (Ratón 4) que no presentó señal de luminiscencia en el hígado y de dos ratones implantados con la línea 74BserpE1up (Ratón 27 y Ratón 29) cuyos hígados presentaron señal de luminiscencia.

Aunque sólo se detectaron metástasis hepáticas en ratones implantados con la línea que sobreexpresa SERPINA E1 (74BserpE1up), cuando se analizó estadísticamente se observó una tendencia pero estas diferencias no alcanzaron la significancia estadística ( $p=0.114$ , Test de Fisher) (Tabla 35).



**Tabla 35. Número de ratones NSG que presentaron o no metástasis hepática y que fueron implantados con la línea UM-SCC-74B o con la línea 74BserpE1up**

	Nº RATONES (Porcentaje en cada línea)		Nº RATONES TOTALES
	<i>Sin metástasis hepática</i>	<i>Con metástasis hepática</i>	
<b>UM-SCC-74B</b>	10 (100%)	0 (0%)	10
<b>74BserpE1up</b>	10 (71%)	4 (29%)	14

p = 0.114, Test de Fisher

## V. DISCUSIÓN

En esta tesis doctoral se ha establecido y validado el papel pronóstico de SERPINA E1 en pacientes con CECC mediante 3 estudios en los que se han empleado 3 metodologías diferentes y 3 cohortes independientes de pacientes. Posteriormente, con el objetivo de profundizar en el papel de SERPINA E1 a nivel funcional, se utilizaron líneas celulares de CECC en las que se modificaron los niveles de expresión de SERPINA E1. Tanto la sobre-expresión como la infra-expresión de SERPINA E1 provocaron cambios en las células tumorales a nivel de proliferación, capacidad de migración y resistencia a la apoptosis inducida por cisplatino. Por otro lado, se estableció un modelo ortotópico de CECC que permite estudiar la implicación a nivel funcional de diferentes proteínas en la tumorigénesis y el desarrollo de metástasis en CECC. Finalmente, el uso de este modelo animal permitió evaluar el efecto *in vivo* de SERPINA E1 en el crecimiento, invasividad tumoral y diseminación metastática.

A continuación, cada bloque de resultados se analizará y discutirá en detalle.

### 1. IDENTIFICACIÓN DE SERPINA E1 COMO MARCADOR INDEPENDIENTE DE MAL PRONÓSTICO EN PACIENTES CON CECC

En un estudio previo de microarrays basado en expresión génica y realizado en nuestro laboratorio con muestras pre-tratamiento de CECC, se identificaron 3 subtipos de tumores pertenecientes a pacientes con diferente evolución clínica. SERPINA E1 constituía uno de los genes que se encontraba sobre-expresado en el subgrupo de tumores pertenecientes a los pacientes con peor evolución clínica (menor supervivencia global, menor supervivencia libre de progresión y menor supervivencia libre de recidiva local) (41).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el estudio previo de microarrays, en este trabajo de tesis se planteó como objetivo estudiar la relación de los niveles de SERPINA E1 con la evolución clínica de los pacientes con CECC. Para ello, se determinó el nivel de SERPINA E1 en 2 cohortes independientes de pacientes (estudio retrospectivo y prospectivo) mediante dos metodologías diferentes (inmunohistoquímica y PCR cuantitativa), y se analizó la relación de los niveles de SERPINA E1 con determinadas variables clinicopatológicas de los pacientes y con diferentes tipos de supervivencia. Con el objetivo de validar los resultados obtenidos en estos estudios, se llevó a cabo un tercer análisis donde se evaluó la relación de los niveles de SERPINA E1 con la supervivencia global a partir de una base de datos de acceso libre que contiene información perteneciente a 520 pacientes con CECC (estudio basado en *The Cancer Genome Atlas* (TCGA)).

Nuestros resultados indican que las muestras tumorales de CECC expresan niveles más elevados de SERPINA E1 que las muestras sin lesiones tumorales aparentes de los mismos pacientes, tanto en el estudio prospectivo como en el estudio basado en TCGA. En múltiples estudios previos también se

observó una sobre-expresión de SERPINA E1 en muestras tumorales de CECC en comparación con muestras de epitelio normal (136,137,139–141,157,158), apoyando la idea de que el proceso de transformación neoplásica en CECC va acompañado de un aumento en los niveles de SERPINA E1.

A continuación, decidimos estudiar si existía alguna relación entre los niveles de expresión de SERPINA E1 en el tumor primario y la evolución clínica de los pacientes.

A partir de aquí, este apartado se estructurará en diferentes subapartados. En primer lugar estudiamos la relación entre el nivel de SERPINA E1 y la supervivencia de los pacientes con CECC a partir de los resultados obtenidos en el estudio retrospectivo y en el estudio prospectivo. En segundo lugar, nos centramos en estudiar la implicación del nivel de SERPINA E1 en relación con la respuesta al tratamiento de los pacientes. Finalmente, analizamos si la SERPINA E1 es un marcador pronóstico independiente de la supervivencia en los pacientes con CECC mediante el estudio prospectivo y en una cohorte independiente de pacientes incluida en la base de datos de TCGA.

### **1.1 El nivel elevado de SERPINA E1 se asocia con peor supervivencia en pacientes con CECC**

Observamos que los pacientes cuyos tumores expresaban elevados niveles de SERPINA E1 presentaron una supervivencia específica de cáncer significativamente menor que aquellos cuyos tumores expresaban niveles más bajos de SERPINA E1. Estos resultados se obtuvieron tanto en el estudio retrospectivo como en el estudio prospectivo. Además, los resultados obtenidos tras analizar la supervivencia global en los pacientes incluidos en TCGA en relación con el nivel de expresión de SERPINA E1 confirman estos hallazgos, al presentar una menor supervivencia global los pacientes con niveles elevados de SERPINA E1.

En estudios realizados a partir de dos grupos distintos de pacientes con CECC también encontraron una correlación entre mayores niveles de SERPINA E1 y menor supervivencia, si bien en ambos se analizaba la supervivencia global (137,159). Además, el tamaño muestral de uno de los estudios ( $n=46$ ) fue muy inferior al número de pacientes incluidos en nuestro estudio retrospectivo ( $n=80$ ), prospectivo ( $n=190$ ) o el basado en TCGA ( $n=520$ ). Sólo en otro estudio, además del nuestro, analizaron la supervivencia específica de cáncer en pacientes con CECC en relación con los niveles de SERPINA E1, pero su tamaño muestral fue de nuevo muy reducido, ya que sólo incluía 26 pacientes con CECC (141). Por otro lado, otros estudios sólo encontraron una asociación significativa entre menor supervivencia global y mayor nivel de SERPINA E1 en pacientes con CECC si incluían una o varias proteínas adicionales en el análisis de la supervivencia junto con SERPINA E1, como SMA (157), uPA y SPARC (140) o uPA (139).

Contrariamente, en otros dos estudios en pacientes con CECC no encontraron una asociación entre supervivencia global (160) o supervivencia específica de cáncer (161) con los niveles de expresión de

SERPINA E1. Cabe destacar que el tamaño muestral de ambos estudios ( $n=43$  y  $n=47$ , respectivamente) fue mucho más reducido que el número de pacientes incluidos en nuestro estudio retrospectivo ( $n=80$ ) o prospectivo ( $n=190$ ), por lo que sus resultados presentan menor poder estadístico.

En definitiva, nuestro estudio es el primero en el que se demuestra la asociación entre niveles de elevados de SERPINA E1 y menor supervivencia en pacientes con CECC con suficiente poder estadístico. Concretamente, a diferencia de los trabajos realizados hasta el momento, nosotros obtuvimos una asociación significativa en dos estudios con muestras independientes de pacientes con elevados tamaños muestrales ( $n=80$  y  $n=190$ ), analizamos la supervivencia específica de cáncer, y SERPINA E1 presentó una asociación significativa con la supervivencia sin necesidad de incluir otros marcadores.

Por otro lado, no encontramos una asociación entre el nivel de SERPINA E1 y ninguna de las variables clinicopatológicas incluidas en el estudio retrospectivo o prospectivo, como son el tamaño del tumor, la localización del tumor o el grado de diferenciación del tumor, exceptuando el grado de ingesta de alcohol. En relación con la presencia o no de afectación ganglionar, observamos una tendencia a que los pacientes con niveles elevados de SERPINA E1 presentaran afectación ganglionar, pero las diferencias no alcanzaron la significación estadística (estudio retrospectivo  $p=0.157$ ; estudio retrospectivo  $p=0.054$ ). De modo similar, otros estudios también mostraron una ausencia de correlación entre niveles de SERPINA E1 y las variables clinicopatológicas (134,139,160). Estos resultados serían consistentes con el hecho de que SERPINA E1 presentara un papel pronóstico en los pacientes con CECC independiente de otras variables clinicopatológicas. En este mismo tipo de análisis, el nivel de expresión de SERPINA E1 sí se asoció con el riesgo de los pacientes de sufrir recidivas, tanto locales como a distancia. Concretamente, los resultados de nuestro estudio prospectivo muestran que el nivel elevado de SERPINA E1 a nivel de tumor primario aumenta el riesgo de los pacientes con CECC de sufrir recidiva local ( $p=0.028$ ), que incluye la aparición del tumor en la misma localización donde se había originado el tumor primario. La misma tendencia se observa en el estudio retrospectivo aunque las diferencias no alcanzan la significancia ( $p=0.111$ ). También encontramos una correlación entre el nivel elevado de SERPINA E1 en tumor primario y una mayor recidiva metastásica en los pacientes con CECC, tanto en el estudio retrospectivo ( $p=0.045$ ) como en el estudio prospectivo ( $p=0.029$ ).

De manera adicional, confirmamos que el nivel de expresión de SERPINA E1 mantenía la asociación con la supervivencia libre de progresión (SLP) o la supervivencia global de los pacientes con CECC tras excluir a los pacientes con tumores VPH positivos en los tres estudios (retrospectivo, prospectivo y basado en TCGA). Dado que la incidencia de pacientes con tumores VPH positivos era muy baja en nuestras poblaciones de estudio, lo que es consistente con el área geográfica donde nos encontramos (162), no pudimos evaluar si el nivel de SERPINA E1 se asociaba o no con la supervivencia de los pacientes con tumores VPH positivos. En un futuro sería interesante analizar en una cohorte de

pacientes con tumores VPH positivos, la relación de SERPINA E1 con la evolución clínica de estos pacientes.

## 1.2. Niveles elevados de SERPINA E1 se asocian con peor respuesta al tratamiento en pacientes con CECC

A continuación nos centraremos en evaluar la asociación entre el nivel de SERPINA E1 en el tumor primario de pacientes con CECC y variables clínicas importantes para la toma de decisiones terapéuticas, como la supervivencia libre de recidiva local (SLRL) y la supervivencia libre de progresión (SLP).

Antes de empezar con la discusión en este apartado, queremos resaltar que los niveles de SERPINA E1 que se determinaron en esta tesis se obtuvieron de muestras de tumor primario de pacientes con CECC antes de iniciar el tratamiento. Además, no incluimos en nuestros estudios a los pacientes con metástasis a distancia en el momento del diagnóstico debido a que siguen una modalidad de tratamiento diferente.

Los resultados de nuestro estudio prospectivo muestran que mayores niveles de SERPINA E1 se asocian con una menor SLRL ( $p=0.022$ ). En el estudio retrospectivo observamos la misma tendencia aunque esta no alcanzó la significación estadística ( $p=0.108$ ). Estos hallazgos sugieren que SERPINA E1 podría estar relacionada con una menor respuesta de las células tumorales al tratamiento actual basado fundamentalmente en fármacos genotóxicos y radiación, lo que apoya la hipótesis de que SERPINA E1 podría, o bien conferir resistencia al tratamiento, o bien dotar de mayor capacidad proliferativa a las células tumorales.

Por otra parte, la SLP fue significativamente más corta en los pacientes con niveles elevados de SERPINA E1 en ambos estudios ( $p=0.022$  y  $p=0.002$ , respectivamente). Estos resultados relacionan los niveles de SERPINA E1 con el riesgo de desarrollar metástasis en los pacientes con CECC tras haber finalizado el tratamiento. Adicionalmente, la fuerte asociación del nivel de SERPINA E1 con el riesgo de sufrir metástasis también sugiere que SERPINA E1 podría estar implicada en la capacidad de diseminación-colonización de las células tumorales.

Otros estudios publicados anteriormente apoyan nuestros resultados en cuanto a la relación de SERPINA E1 con el riesgo de recidiva de los pacientes con CECC tras el tratamiento (137,139,140).

Nuestros hallazgos, indican en su conjunto que SERPINA E1 podría estar relacionada con una menor respuesta de las células a los tratamientos genotóxicos y radioterápicos y, por otro lado, favorecer la diseminación de las células tumorales. En este contexto SERPINA E1 podría conferir resistencia a las células tumorales frente al efecto citotóxico del tratamiento quimio/radio-terápico y contribuir a la progresión del cáncer, tanto a nivel de tumor primario como a nivel de metástasis, lo que sería

consistente con la menor supervivencia observada en los pacientes con niveles elevados de SERPINA E1.

### 1.3. Desarrollo del nivel de SERPINA E1 como marcador pronóstico

En el estudio prospectivo observamos una tendencia cercana a la significación que indicaba que el nivel de SERPINA E1 era un factor de riesgo independiente para la supervivencia ( $p=0.057$ ). Esta observación se confirmó al realizar el análisis en una cohorte mayor de pacientes incluidos en TCGA ( $n=507$ ), en el que el nivel de SERPINA E1 apareció como factor pronóstico independiente relacionado con la supervivencia global de los pacientes con CECC ( $p=0.027$ ). Estos resultados indican que el nivel de SERPINA E1 con independencia de otras variables clinicopatológicas, correlaciona con la supervivencia de los pacientes y por tanto, nos da información adicional sobre la probable evolución clínica del paciente.

Estudios previos de otros grupos identificaron el nivel de SERPINA E1 como factor pronóstico de la supervivencia en pacientes con CECC pero no de manera independiente a otras variables clínico-patológicas, ya que aplicaron un modelo de regresión univariado (137,140,141). En nuestros análisis, tanto en el estudio prospectivo como en el estudio basado en TCGA, aplicamos un modelo de regresión multivariado en el que se tuvo en cuenta la posible influencia de otras variables clínico-patológicas (tamaño del tumor primario, afectación ganglionar, sexo y edad) cuando analizamos la relación del nivel de SERPINA E1 con la supervivencia de los pacientes.

Nuestros resultados también indican que el nivel de SERPINA E1 es un factor pronóstico independiente relacionado con la SLP en los pacientes con CECC. Por tanto, la determinación del nivel de SERPINA E1 en tumor primario de los pacientes con CECC antes de iniciar el tratamiento, permitiría identificar a aquellos pacientes con mayor riesgo de sufrir una recidiva del tumor primario y/o aparición de metástasis. Además, el nivel de SERPINA E1 se mantuvo como factor pronóstico independiente de la SLP cuando se analizó en el subgrupo de pacientes con CECC tratados con radioterapia o con quimio-radioterapia en el estudio prospectivo ( $p=0.043$ ).

En base a estos resultados, el nivel de SERPINA E1 podría utilizarse no sólo como factor pronóstico sino también para tomar decisiones relacionadas con la selección del tratamiento más adecuado en pacientes con CECC tratados con radioterapia o con quimio-radioterapia. La determinación de los niveles de SERPINA E1 en biopsias tumorales pre-tratamiento, podría ayudar a identificar a aquellos pacientes que fueran a obtener un beneficio clínico del tratamiento genotóxico conservador (quimio-radioterapia o radioterapia) y distinguirlos de aquellos pacientes con escasa probabilidad de respuesta, de modo que estos últimos podrían ser tratados desde el inicio con cirugía, o bien ser candidatos a un tratamiento alternativo.

El nivel de SERPINA E1 también ha mostrado ser un factor pronóstico independiente de la supervivencia de los pacientes en otros tipos de cáncer como el colorectal (163), el de ovario (164) y el gástrico (165).

En cáncer de mama, diversos estudios retrospectivos y prospectivos muestran que niveles elevados de SERPINA E1 y uPA son potentes predictores, estadísticamente independientes, asociados a pronóstico desfavorable (166). Además, en pacientes con cáncer de mama sin metástasis ganglionar, las pacientes con un nivel elevado de uPA/SERPINA E1 en el tumor primario presentaron mayor beneficio de la quimioterapia adyuvante que las pacientes con niveles bajos. De esta manera, la determinación de los niveles de uPA y SERPINA E1 permitiría estratificar a las pacientes que serían candidatas a un tratamiento con quimioterapia adyuvante y terapia endocrina (pacientes con niveles elevados de uPA y SERPINA E1) de las que sólo se tratarían con terapia endocrina (pacientes con niveles bajos de uPA y SERPINA E1), evitando así los efectos secundarios perjudiciales de la quimioterapia adyuvante (167). A pesar de que todos estos resultados han sido validados clínicamente mediante diversos estudios prospectivos con muestras independientes de pacientes con elevados tamaños muestrales, el nivel de SERPINA E1 no está introducido actualmente en los protocolos de la práctica clínica, habiéndose realizado dos estudios clínicos basados en el nivel de evidencia tipo I (ensayos clínicos controlados y aleatorizados diseñados de forma apropiada) (166).

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo de tesis a partir de muestras de pacientes con CECC, junto con los descritos para otros tipos tumorales, indican que SERPINA E1 contribuye a la agresividad de las células tumorales durante el proceso de progresión tumoral y disminuye la respuesta frente a los tratamientos genotóxicos y de radiación. Por tanto, SERPINA E1 constituye una buena proteína candidata para ser introducida, tras las correspondientes validaciones, en la práctica clínica como factor pronóstico independiente en pacientes con CECC ya que aportaría información adicional sobre la evolución clínica del paciente. Además, el nivel de SERPINA E1 también permitiría identificar grupos de pacientes candidatos a un tratamiento alternativo a la quimioterapia actual, para mejorar su respuesta al tratamiento, o disminuir los efectos secundarios de toxicidad de la terapia en aquellos grupos de pacientes que no necesiten de un tratamiento adicional.

Antes de iniciar los estudios para comprobar la validez de SERPINA E1 como factor pronóstico en pacientes con CECC, sería necesario realizar más estudios prospectivos independientes para confirmar la utilidad clínica de SERPINA E1, así como determinar la sensibilidad y especificidad de dicha proteína como factor pronóstico independiente en pacientes con CECC. La realización de estudios independientes adicionales también sería necesaria para poder establecer un valor umbral optimizado, validado y estandarizado que permitiera distinguir entre aquellos pacientes con niveles elevados de SERPINA E1 de aquellos con niveles bajos, tanto a nivel de proteína como de RNA mensajero.

## 2. SERPINA E1 INFLUYE EN LA CAPACIDAD DE MIGRACIÓN, DE PROLIFERACIÓN Y DE RESISTENCIA A LA MUERTE INDUCIDA POR CISPLATINO EN CÉLULAS DE CECC

Tras haber analizado en muestras de pacientes con CECC el nivel de SERPINA E1 y encontrar una asociación con la evolución clínica de los pacientes (a mayor nivel de SERPINA E1, menor supervivencia libre de progresión y mayor riesgo de recidiva local y metastática), nuestro siguiente objetivo era determinar si SERPINA E1 estaba implicada causalmente en conferir mayor agresividad a las células tumorales de CECC, así como el posible mecanismo mediante el cual llevaría a cabo dicha función. Para ello, tras sobre-expresar o infra-expresar SERPINA E1 en líneas celulares de CECC, se realizaron diferentes ensayos funcionales *in vitro*. Además, se analizó el estado de activación de la vía PI3K/Akt en las líneas celulares con diferente nivel de expresión de SERPINA E1, así como su implicación en los diferentes ensayos funcionales.

Nuestros resultados *in vitro* muestran una relación directa entre niveles de SERPINA E1 y activación de Akt (medido como niveles de Akt fosforilado, p-Akt) en células de CECC. La sobre-expresión de SERPINA E1 aumenta los niveles de p-Akt, mientras que la infra-expresión provoca el efecto contrario. Además, el tratamiento de las células de CECC con un inhibidor de SERPINA E1 provoca un descenso en los niveles de p-Akt, confirmando la relación directa entre SERPINA E1 y activación de Akt.

No existen estudios previos al nuestro sobre la relación entre SERPINA E1 y Akt en células de CECC. En el mismo sentido que nuestros resultados *in vitro*, otros autores observaron en células de cáncer de pulmón no microcítico, una mayor activación de Akt tras irradiarlas y la mediación de esta activación por SERPINA E1, de manera que el nivel de p-Akt aumentaba cuando añadían SERPINA E1 exógena y disminuía si las células eran tratadas con un inhibidor de SERPINA E1. En ese estudio observaron también que la sobre-expresión de SERPINA E1 mediaba la transición epitelio-mesénquima (TEM) inducida por la radiación, aumentando la capacidad de migración de las células y la expresión de marcadores mesenquimales (168). En otro trabajo, detectaron *in vitro* una mayor activación de Akt en células de fibrosarcoma en comparación con células de fibrosarcoma deficientes en la expresión de SERPINA E1 (169). En ambos estudios se relaciona SERPINA E1 con mayor activación a Akt y con un fenotipo más mesenquimal, ya sea porque las células tumorales sufren una TEM tras la radiación (estudio con células de pulmón no microcíticas) o porque son de origen mesenquimal (estudio con células de fibrosarcoma).

En otro estudio de microarrays de proteínas en muestras de tumor primario de pacientes con cáncer de mama, se observó una asociación positiva entre niveles de SERPINA E1 y varias proteínas de la vía PI3K/Akt (170). De nuevo, en muestras de tumor primario en pacientes, se observa una relación entre la expresión de SERPINA E1 y la activación de la vía PI3K/Akt.



En cambio, en células no tumorales la expresión de SERPINA E1 correlaciona negativamente con la activación de Akt. Así, el bloqueo de SERPINA E1 en fibroblastos humanos en cultivo, induce una activación sostenida de la vía PI3K/Akt (171). También, la adición exógena de SERPINA E1 a células endoteliales deficientes en SERPINA E1, redujo la activación de la vía PI3K/Akt (172).

Estos resultados indican, en primer lugar que SERPINA E1 regula la vía PI3K/Akt, y en segundo lugar, que el efecto inductor o represor de SERPINA E1 sobre dicha vía depende de si se trata o no de células tumorales. De hecho, la vía PI3K/Akt se encuentra alterada en un gran número de tipos de cáncer (173), incluido el CECC donde se produce una ganancia de función de la vía que controla importantes procesos celulares como el metabolismo, la reorganización del citoesqueleto, la proliferación, la apoptosis, el crecimiento celular y la supervivencia (174).

En cualquier caso, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis muestran una relación causal entre el aumento de SERPINA E1 y el nivel de activación de la vía PI3K/Akt en células de CECC, que también se observa en otros tipos tumorales como cáncer de mama, cáncer de pulmón no microcítico y fibrosarcoma.

A continuación se desarrollará en cada apartado el efecto funcional que tiene SERPINA E1 sobre las células tumorales de CECC y la posible implicación de la vía PI3K/Akt en dichos procesos.

## 2.1. SERPINA E1 estimula la migración de las células de CECC a través de la activación de Akt

Nuestros resultados *in vitro* con células de CECC muestran que SERPINA E1 contribuye a la migración mediante la activación de la vía PI3K/Akt. La sobre-expresión de SERPINA E1 aumentó la capacidad de migración de las células de CECC mientras que su infra-expresión provocó el efecto contrario. Además, el bloqueo de la vía PI3K/Akt mediante un inhibidor de la activación de Akt, revirtió el efecto pro-migración inducido por SERPINA E1 en las células de CECC.

La implicación de SERPINA E1 en la migración ha sido estudiado *in vitro* en células de otros tipos tumorales pero no en células de CECC. De modo similar a nuestros resultados, en células de cáncer de mama, varios grupos mostraron que la reducción de los niveles de SERPINA E1 provoca una disminución en la migración de las células tumorales (175,176). En otros trabajos se observó que la exposición a SERPINA E1 exógena estimula la capacidad de migración de las células de cáncer de colon (177), y en células de cáncer de tiroides diferenciado, la infra-expresión de SERPINA E1 disminuye la migración celular (178). Por último, en células de melanoma, SERPINA E1 estimula la migración celular compitiendo con uPA/uPAR por la unión a vitronectina (179).

Por otro lado, en queratinocitos no transformados se observó que SERPINA E1 es uno de los principales genes cuya expresión aumenta cuando son estimulados con TGF- $\beta$  en ausencia de suero, sufriendo, en estas condiciones, una transición epitelio-mesénquima y un aumento de su motilidad

celular (180,181). De modo similar, la estimulación *in vitro* de queratinocitos transformados (mutados en p53 y con expresión de Ha-ras) con TGF- $\beta$ 1 + EGF en ausencia de suero, induce un aumento de la expresión de SERPINA E1, asociada a cambios morfológicos, aumento de motilidad, aumento de la expresión de marcadores mesenquimales y disminución de marcadores epiteliales (182,183). En cambio, la inhibición de la expresión de SERPINA E1 en estos mismos queratinocitos transformados, disminuye la migración inducida por TGF- $\beta$ 1 + EGF (182).

Por tanto, los estudios previos con células tumorales, que han sufrido un proceso de transformación neoplásica y cuya vía PI3K/Akt se encuentra probablemente alterada, así como los estudios con células no tumorales a las que se les ha inducido una TEM, son consistentes con nuestros hallazgos en células de CECC en los que sobre-expresamos SERPINA E1. En cualquier caso, el conjunto de estos resultados indica que el aumento en la expresión de SERPINA E1 contribuye a aumentar la motilidad de las células.

En relación con las vías de señalización a través de las cuales SERPINA E1 mediaría su efecto pro-migración, nuestros resultados muestran que SERPINA E1 estimula la migración de las células de CECC a través de la activación de Akt. El tratamiento de las células con un inhibidor de la activación de Akt revierte el efecto pro-migración inducido por SERPINA E1. En múltiples estudios con células tumorales se ha observado que la vía PI3K/Akt está implicada en procesos de migración e invasión, pero en ninguno relacionan la regulación de dicha vía con SERPINA E1 (184).

En varios estudios con células de CECC y con otros tipos tumorales *in vitro*, se ha descrito que factores inductores de la TEM provocan un aumento de la migración mediada por la activación de la vía PI3K/Akt. La señalización mediada por PI3K/Akt fue necesaria para aumentar la motilidad celular y activar una TEM en células de CECC estimuladas con TGF $\beta$ , TNF $\alpha$  y PDGF-D (185). Otros autores también han descrito que factores inductores de TEM, como Twist y Snail, provocan un aumento de la migración mediada por la activación de Akt en células de cáncer de mama (186) y de próstata (187).

Como se ha expuesto anteriormente, numerosos estudios relacionan la adquisición de un fenotipo mesenquimal en células tumorales, caracterizado por un tipo de migración individual, con la activación de la vía Akt. Por otro lado, otros estudios relacionan la adquisición de ese mismo fenotipo con el aumento en la expresión de SERPINA E1. En base a estos hechos y a los resultados obtenidos en nuestro trabajo, proponemos que el aumento de SERPINA E1 ya sea como consecuencia del proceso de transformación neoplásica o de la TEM, contribuye a aumentar la motilidad de las células, sean transformadas o no, a través de la activación de la vía PI3K/Akt.

En un futuro sería interesante evaluar dicha hipótesis estudiando las posibles interacciones y/o vías de señalización que conectaran, directa o indirectamente, SERPINA E1 con la estimulación de la migración mediada por la activación de Akt en las células de CECC.

## 2.2. SERPINA E1 reduce la proliferación en las células de CECC

Nuestros resultados muestran que SERPINA E1 disminuye la proliferación en células de CECC. Hasta ahora no se había descrito un efecto anti-proliferativo de SERPINA E1 en células de CECC pero diversos estudios en otros tipos celulares muestran una relación entre niveles de SERPINA E1 y disminución de la proliferación.

La estimulación de queratinocitos humanos con TGF- $\beta$  en ausencia de suero, produjo un aumento en la expresión de SERPINA E1 y una disminución de la proliferación asociados a la inducción de TEM (180). De la misma manera, la estimulación con TGF- $\beta$  y EGF de queratinocitos transformados con Haras y portadores de una mutación en p53, aumenta la expresión de SERPINA E1 y disminuye su proliferación (182). Por último, en células de melanoma observaron que las células menos proliferativas, asociadas a un fenotipo invasivo y con mayor capacidad de migración, sobre-expresan SERPINA E1 y otros genes asociados a la regulación mediada por TGF- $\beta$  (188).

Por otro lado, la exposición *in vitro* de células de cáncer de mama a SERPINA E1 exógena no produjo ningún efecto sobre su proliferación o migración (189). Una posible explicación de los resultados obtenidos en este estudio a diferencia de en el nuestro, podría deberse al uso de una exposición puntual y transitoria de las células de cáncer de mama a SERPINA E1 exógena, mientras que en nuestro modelo la sobre-expresión endógena de SERPINA E1 es constitutiva, lo que podría activar vías de señalización distintas.

De modo consistente con nuestros resultados, otros autores han descrito una relación funcional opuesta entre migración y proliferación, lo que se justifica debido a la incompatibilidad entre los cambios morfológicos que sufre una célula durante el proceso de migración, como la reorganización del citoesqueleto, y los relacionados con la proliferación y la división celular. Este concepto, que se ha definido "Go or Growth" (190,191), ha sido ya descrito en CECC pero mediado por otras proteínas diferentes a SERPINA E1 (191). También ha sido descrito en otros tipos tumorales como cáncer de mama (192), glioma (193–195) o glioblastoma (196).

En definitiva, nuestros resultados indican que el aumento de la expresión de SERPINA E1 disminuye la proliferación de las células de CECC, posiblemente como consecuencia de que las células adquieren un fenotipo más migratorio, y están de acuerdo con hallazgos previos en otros tipos tumorales.

## 2.3. SERPINA E1 inhibe la apoptosis inducida por cisplatino en células de CECC a través de la activación de la vía PI3K/Akt

Nuestros resultados muestran que SERPINA E1 disminuye la apoptosis inducida por cisplatino en células de CECC y que este efecto está mediado por la activación de Akt.

En este trabajo de tesis se describe por primera vez el efecto anti-apoptótico de SERPINA E1 en células de CECC, aunque ya había sido descrito para esta proteína en otros tipos tumorales. Estudios

publicados anteriormente muestran que la infra-expresión de SERPINA E1 endógena con siRNA en líneas celulares de cáncer de pulmón, de adenocarcinoma de mama, de fibrosarcoma y de carcinoma de colon, confiere una mayor sensibilidad a la apoptosis espontánea (197). De modo similar, se ha descrito que la adición de SERPINA E1 exógena a células de carcinoma de próstata, de mama o de leucemia disminuye la apoptosis espontánea y la inducida por camptotecina (198). En otro estudio *in vitro* con células de cáncer de pulmón no microcítico, SERPINA E1 fue identificada como el factor secretado responsable de conferir resistencia a la apoptosis inducida por la radiación (168). Por último, la infra-expresión de SERPINA E1 en células de fibrosarcoma murino confiere sensibilidad a la apoptosis inducida por etopósido, de modo que la resistencia inducida por SERPINA E1 se asocia con la activación de Akt (199).

En nuestros estudios *in vitro*, analizamos la apoptosis inducida por cisplatino, un compuesto quimioterápico que se utiliza como tratamiento de los pacientes con CECC. No estudiamos la apoptosis espontánea debido a que las células UM-SCC-74B y 74BserpE1up no entraban en apoptosis cuando se les privaba de nutrientes. Nuestros resultados con células de CECC muestran que el efecto anti-apoptótico estimulado por SERPINA E1 está mediado por la activación de Akt, ya que el menor porcentaje de células apoptóticas detectado en la línea que sobre-expresa SERPINA E1 en comparación con la línea parental cuando ambas son tratadas con cisplatino, se iguala al de la línea parental cuando la línea que sobre-expresa SERPINA E1 se trata con un inhibidor de Akt.

Apenas existen estudios que traten sobre los mecanismos que relacionen los niveles de SERPINA E1 con la apoptosis en células tumorales. En un trabajo realizado con células de fibrosarcoma, cáncer de pulmón, adenocarcinoma de mama y cáncer de colon, observaron que SERPINA E1 aumentaba la resistencia de las células a la apoptosis espontánea mediante el bloqueo de la vía Fas/FasL y mediante otros mecanismos independientes de Fas/FasL no identificados (197). En células de cáncer de pulmón no microcítico, SERPINA E1 dotaba de resistencia a la apoptosis inducida por la radiación a través de la activación de Akt, ERK1/2 y la inhibición de caspasa 3 (168). Finalmente, en células de fibrosarcoma murino, se observó que un nivel más elevado de SERPINA E1 reducía la apoptosis inducida por etopósido y que esta reducción disminuía cuando se trataban las células con un inhibidor de Akt (169).

En células no tumorales se han analizado los mecanismos que conectan SERPINA E1 y la apoptosis. En fibroblastos (200) y en neutrófilos (201), SERPINA E1 inhibió la apoptosis espontánea a través de la activación de Akt. En cambio, en células endoteliales, se observó tanto que SERPINA E1 protegía a las células de la apoptosis espontánea a través del bloqueo de la vía Fas/FasL (202), como que SERPINA E1 inducía la apoptosis espontánea al disminuir los niveles de Akt activado (172).

En su conjunto, todos estos resultados obtenidos tanto en células tumorales como no tumorales, indican que la modificación de los niveles de expresión de SERPINA E1 influye en la apoptosis celular, y que el efecto pro- o anti-apoptótico de SERPINA E1 varía en función del tipo celular y la presencia

previa de alteraciones en vías específicas (frecuentes en células tumorales, como consecuencia de la adquisición de mutaciones por su elevada inestabilidad genética). Concretamente, diferentes estudios en células tumorales así como nuestros resultados, indican que SERPINA E1 inhibe la apoptosis inducida por diferentes fármacos a través de la activación de Akt, mientras que otros estudios indican que SERPINA E1 inhibe la apoptosis espontánea a través del bloqueo de Fas/FasL y de otros mecanismos independientes. En este contexto, sería interesante analizar si el efecto anti-apoptótico de SERPINA E1 observado en células tumorales está regulado por diferentes vías en función de si se trata de apoptosis inducida por genotóxicos (mediada por PI3K/Akt) o apoptosis espontánea (mediada por Fas/FasL), o bien, si ambas vías participan en los dos tipos de apoptosis, en cuya regulación esta implicada SERPINA E1.

Además, la función anti-apoptótica de SERPINA E1 observada en nuestros estudios *in vitro* en células de CECC, así como en otros estudios con otros tipos tumorales, explicarían nuestros hallazgos en muestras de pacientes, en los que el mayor nivel de expresión de SERPINA E1 a nivel de tumor primario, se asoció con mayor probabilidad de recidiva local y metastática. En el mismo sentido, el mayor nivel de SERPINA E1 apareció como un factor pronóstico independiente relacionado con la menor supervivencia libre de progresión en el subgrupo de pacientes tratados con radioterapia o radio-quimioterapia en nuestro estudio prospectivo con muestras de pacientes con CECC. En este contexto, SERPINA E1 disminuiría el efecto de la quimio y/o radioterapia sobre las células tumorales, al inhibir la apoptosis inducida por los dos tipos de tratamiento, lo que contribuiría a la reaparición del tumor.

En definitiva, los resultados obtenidos de los estudios *in vitro* en este trabajo de tesis donde se ha analizado la implicación de SERPINA E1 a nivel funcional en células de CECC apuntan en el mismo sentido. SERPINA E1 estimula la migración y aumenta la resistencia a la apoptosis inducida por cisplatino en células de CECC mediante la activación de la vía PI3K/Akt. A su vez, SERPINA E1 disminuye la proliferación de las células, debido posiblemente a la incompatibilidad de que una célula se divida mientras está migrando (reorganización diferencial del citoesqueleto) (**Figura 78**). Estos resultados concuerdan con nuestros resultados obtenidos de los estudios con muestras de pacientes con CECC, en los que elevados niveles de expresión de SERPINA E1 se asocian con un pronóstico desfavorable y una peor respuesta al tratamiento de los pacientes, posiblemente debido a que SERPINA E1 dota de mayor agresividad a las células tumorales, por un lado al estimular la migración y por otro, al inhibir la apoptosis inducida por el tratamiento quimio-radioterápico.

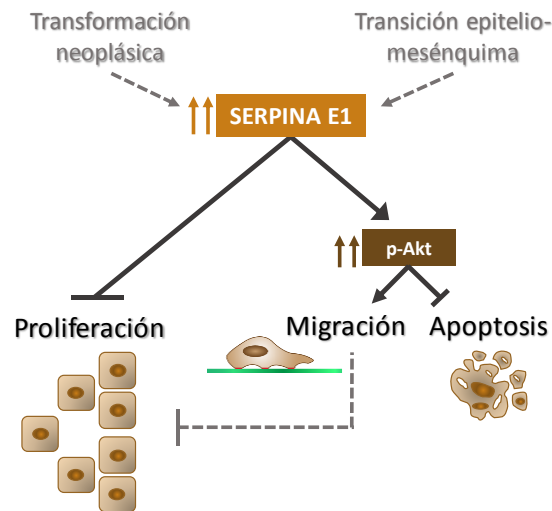


Figura 78. Esquema representativo de los resultados obtenidos en nuestros experimentos *in vitro* con líneas celulares de CECC (líneas continuas) y su posible relación con otros procesos (líneas discontinuas).

### 3. PAPEL DE SERPINA E1 EN LA AGRESIVIDAD TUMORAL EN UN MODELO ORTOTÓPICO DE CECC

Tras estudiar la asociación de SERPINA E1 con la agresividad tumoral y la respuesta de los pacientes con CECC al tratamiento, analizamos, en un modelo *in vitro* con células de CECC el efecto a nivel funcional de la sobre- o infra-expresión de SERPINA E1 con el objetivo de estudiar los mecanismos por los que SERPINA E1 podría contribuir a la mayor agresividad de las células tumorales. Como consecuencia de las limitaciones que presentan los modelos experimentales *in vitro* para estudiar procesos como invasión y diseminación metastática, desarrollamos un modelo murino ortotópico de CECC.

Durante el desarrollo del modelo murino de CECC, el uso inicial de un modelo de implantación subcutánea de las células tumorales nos permitió evaluar la capacidad tumorigénica *in vivo* de las líneas celulares así como las características histológicas de los tumores generados. Debido a las limitaciones de este modelo para estudiar la capacidad invasiva y metastática de las líneas celulares (149,151), decidimos desarrollar un modelo ortotópico de CECC.

El modelo ortotópico de CECC desarrollado durante la realización de esta tesis doctoral consistió en la inoculación de células de CECC en la lengua de ratones inmunodeprimidos, una de las localizaciones más frecuentes donde se origina el tumor en pacientes con cáncer oral (3). En otros estudios realizados previamente, el uso de este modelo ortotópico en lengua ha permitido estudiar el potencial invasivo y metastático de las células de CECC debido a que recapitula la progresión tumoral que tiene lugar en pacientes con CECC (203–206). Además, con el objetivo de mejorar nuestro modelo ortotópico, transducimos las células de CECC con una construcción lentiviral con actividad luciferasa,

lo que nos permitió el seguimiento, a través de la emisión de luminiscencia, de las células tumorales en los ratones durante el transcurso de cada experimento.

Durante el desarrollo del modelo ortotópico de CECC realizamos dos experimentos, cada uno con una cepa de ratón con diferente grado de inmunodepresión (Swiss nude y NOD/SCID). Cuando comparamos los resultados de ambos experimentos, observamos que el uso de una cepa más inmunodeprimida (NOD/SCID) aumentaba la capacidad de diseminación de las células tumorales a ganglios cervicales en dos de las tres líneas celulares analizadas, la localización en la que metastatizan con mayor frecuencia las células de CECC en pacientes (2).

Una vez desarrollado el modelo ortotópico de CECC, nos planteamos analizar la implicación de SERPINA E1 en el crecimiento y diseminación metastática de las células de CECC. En base a nuestros resultados obtenidos durante el desarrollo del modelo ortotópico con las dos cepas de ratón con diferente grado de inmunodepresión, y con el objetivo de mejorar el modelo ortotópico y poder comparar el crecimiento *in vivo* y la capacidad de diseminación metastática de dos líneas celulares con diferente nivel de expresión de SERPINA E1, se realizó un experimento utilizando una cepa de ratón más inmunodeprimida que las dos anteriores, la cepa NSG.

Aunque la cepa de ratón más utilizada en los modelos ortotópicos de CECC es la cepa Swiss nude (143), en los últimos años ha aumentado el uso de cepas de ratón más inmunodeprimidas (SCID, NOD/SCID y NSG) en los modelos ortotópicos de CECC (205–209).

El uso del modelo ortotópico de CECC con la cepa NSG en el que implantamos una línea de CECC con sobre-expresión de SERPINA E1 y su correspondiente línea parental, así como el establecimiento de las mismas condiciones experimentales (número de células inyectadas, localización, tipo y tiempo de la resección, tiempo de sacrificio) en el grupo de ratones implantados con una u otra línea celular, nos permitió poder comparar el crecimiento tumoral y la diseminación metastática de las células de CECC con diferente nivel de expresión de SERPINA E1. Durante el desarrollo del modelo ortotópico de CECC con las cepas Swiss nude y NOD/SCID, se incluyó también en los experimentos la línea con sobre-expresión de SERPINA E1 y su correspondiente línea parental. El objetivo de estos experimentos fue exploratorio, de manera que los resultados no fueron comparables debido a que las condiciones experimentales (tiempo de resección, tipo de resección, tiempo de sacrificio) fueron diferentes en el grupo de ratones implantados con una y otra línea.

A continuación se discutirá en detalle la implicación de SERPINA E1 en el crecimiento del tumor primario, en la capacidad de generar metástasis ganglionares y en la capacidad de generar metástasis a distancia, en base a los resultados obtenidos a partir del uso del modelo ortotópico de CECC con ratones NSG.

### 3.1. SERPINA E1 aumenta la invasividad, la proporción de estroma y la resistencia a apoptosis del tumor primario

Nuestros resultados obtenidos con biopsias de pacientes con CECC, muestran que el nivel de SERPINA E1 en las células tumorales a nivel de tumor primario tiene valor pronóstico y predictivo de la respuesta al tratamiento de los pacientes con CECC. Concretamente, observamos que los pacientes con tumores primarios con mayor nivel de expresión de SERPINA E1 presentaban mayor riesgo de sufrir recidivas locales y metastáticas. En este contexto, nos planteamos si SERPINA E1 podría alterar las características fenotípicas del tumor primario contribuyendo a la agresividad de las células tumorales, por lo que analizamos el fenotipo mostrado por los tumores primarios generados por la línea con sobre-expresión de SERPINA E1 o por la línea parental en el modelo ortotópico con ratones NSG. Los tumores generados por la línea con mayor expresión de SERPINA E1 presentaron un crecimiento más invasivo, mayor proporción de estroma y menor número de células apoptóticas cuando se comparó con los tumores generados por la línea con menor expresión de SERPINA E1.

Nuestros resultados muestran que las células que sobre-expresan SERPINA E1 generan tumores primarios con un crecimiento más invasivo. En concreto, SERPINA E1 aumenta la presencia de *tumor budding* en el frente invasivo de los tumores, un tipo de crecimiento invasivo que en pacientes con CECC se ha establecido como un factor pronóstico independiente, que se asocia con un aumento del riesgo de desarrollar metástasis ganglionar y a distancia (87,88).

Nuestros resultados son consistentes con los observados en tumores de pacientes con carcinoma oral, en los que la expresión de SERPINA E1 aumenta durante la progresión tumoral, relacionándose con el aumento del potencial invasivo de las células. Estudios previos muestran que en las áreas sin alteraciones histológicas, el nivel de expresión de SERPINA E1 es bajo en comparación con las áreas con displasia, en las que aumenta la expresión de SERPINA E1 que se concentra en islas de células situadas en el margen del tumor, y en el caso de los carcinomas invasivos, la expresión de SERPINA E1 se extiende también a las células de los bordes tumorales (135,138). En otro estudio con muestras de pacientes con carcinoma oral, el nivel de expresión de SERPINA E1 en el frente invasivo del tumor primario correlacionó con la presencia de metástasis ganglionar y la presencia de extensión extracapsular (157).

En estudios con pacientes de otros tipos tumorales también se han descrito resultados que apoyan nuestros hallazgos. En tumores primarios de pacientes con carcinoma de cérvix, el nivel de expresión de SERPINA E1 correlacionó con el grado de invasividad del tumor, de manera que los tumores con mayor grado de invasión expresaron mayores niveles de SERPINA E1 (210). En tumores de cáncer colorectal, SERPINA E1 era uno de los genes sobre-expresados en las células que formaban tumor budding en el frente invasivo del tumor cuando se comparaba con el perfil de expresión de las células localizadas en la zona central del tumor primario (211).



En el mismo sentido que los resultados que hemos obtenidos en el modelo *in vivo*, en estudios *in vitro* mediante ensayos de invasión en matrigel con diferentes tipos de células tumorales, se observó que SERPINA E1 estimulaba el fenotipo invasivo en las células tumorales. En células de carcinoma nasofaríngeo, la disminución de su capacidad invasiva estaba mediada por la infra-expresión de SERPINA E1 (159). En células de cáncer de pulmón, el bloqueo de SERPINA E1 mediante el tratamiento con un anticuerpo anti-SERPINA E1, redujo la invasión de las células tumorales de manera dosis-dependiente (212). De la misma manera que en el estudio anterior, en células de fibrosarcoma y de melanoma, el bloqueo de SERPINA E1 mediante anticuerpos específicos inhibió la capacidad invasiva de las células tumorales (213).

Además de nuestro estudio, no se han realizado estudios con modelos ortotópicos *in vivo* en relación con SERPINA E1 y la capacidad invasiva de las células tumorales a nivel de tumor primario. En estudios donde analizaron la invasividad de los tumores subcutáneos implantados en ratones inmunodeprimidos, observaron que el uso de ratones deficientes en la expresión de SERPINA E1 reducía la capacidad invasiva en células de carcinoma cutáneo (214) y en queratinocitos transformados (215). En otro modelo subcutáneo con queratinocitos transformados, la concentración de SERPINA E1 en el estroma del tumor fue crítica para el crecimiento y la invasividad tumoral, de manera que el uso de ratones transgénicos con sobre-expresión de SERPINA E1 así como de ratones deficientes en la expresión de SERPINA E1, disminuyó la capacidad invasiva de las células tumorales cuando se comparaba con la capacidad invasiva de los tumores subcutáneos generados en ratones con niveles de SERPINA E1 similares a los fisiológicos (216). En cualquier caso, los resultados de estos tres estudios no son estrictamente comparables a los nuestros ya que, además de estudiar la capacidad invasiva a nivel subcutáneo y no a nivel de tumor primario en un modelo ortotópico, la infra-expresión o la sobre-expresión de SERPINA E1 se produjo por manipulación genética de todas las células del ratón, a diferencia de en nuestro modelo ortotópico en el que la sobre-expresión sólo se produjo a nivel de células tumorales. En relación con esto último, diferentes estudios han mostrado que en pacientes con CECC el aumento de expresión de SERPINA E1 en el tumor primario se produce principalmente a nivel de células tumorales y no tanto en otras células del estroma (fibroblastos o células endoteliales) (134,135,138,217). En otros tipos tumorales el aumento de la expresión de SERPINA E1 se produce más comúnmente en células del estroma asociadas al tumor que en las propias células tumorales, como es el caso del cáncer de colon (218), de próstata (219) y de mama (220). En este sentido, nuestro modelo ortotópico se aproximaría más a la patología de los pacientes con CECC, por lo que sería más adecuado para estudiar los mecanismos mediante los cuales SERPINA E1 regula el crecimiento tumoral y la diseminación metastática durante la progresión del CECC.

Nuestros resultados del modelo ortotópico en NSG son consistentes con los obtenidos en este mismo trabajo de tesis en los estudios *in vitro* con células de CECC donde observamos que SERPINA E1

estimulaba la migración de las células tumorales, una capacidad esencial durante el proceso de invasión. Además, en estudios con tumores primarios de carcinoma de cavidad oral y de lengua se demostró una asociación entre la presencia de *tumor budding* con el hecho de que las células hubieran sufrido un proceso de TEM (221,222), lo que apoyaría el argumento planteado en el apartado de discusión sobre los resultados *in vitro*, en el que sugerimos que el efecto pro-migración de SERPINA E1 podría estar relacionado con la adquisición de un fenotipo mesenquimal.

Por tanto, el conjunto de nuestros resultados *in vitro* e *in vivo* indican que el aumento de la expresión de SERPINA E1, promueve la invasividad de las células tumorales y esto podría relacionarse con el peor pronóstico y el mayor riesgo de recidiva metastática observado en los pacientes con niveles elevados de SERPINA E1 a nivel de tumor primario.

Por otra parte, nuestros resultados muestran que la sobre-expresión de SERPINA E1 aumenta la proporción de estroma en el tumor primario. Estudios *in vitro*, *in vivo* y en muestras de pacientes con CECC, indican que el estroma puede contribuir a aumentar la invasividad y la resistencia a la apoptosis de las células tumorales (83–86,223). En uno de los estudios que se describen, el aumento en la proporción de fibroblastos asociados a tumor (CAF) se asoció con mayor riesgo de recidiva y una supervivencia más corta de los pacientes con CECC (83). En otro, la implantación de células de CECC junto con CAF extraídos de pacientes, aumentó las metástasis ganglionares y a pulmón en un modelo ortotópico de suelo de boca (223).

En pacientes con CECC no se ha estudiado el papel pronóstico del aumento de la proporción de estroma a nivel de tumor primario; no obstante, en otros tipos tumorales este factor, definido como ratio tumor-estroma, se asocia con la supervivencia de los pacientes. En concreto, en cáncer de mama (79), de colon (80), de cérvix (81) y de esófago (82) un ratio tumor-estroma reducido (mayor proporción de estroma en el tumor) se asocia con una menor supervivencia de los pacientes.

En base a nuestros resultados, proponemos que el aumento de la expresión de SERPINA E1 estimularía el aumento de estroma en el tumor primario, lo que contribuiría a aumentar el potencial invasivo y la agresividad de las células tumorales.

Por otro lado, nuestros resultados muestran que SERPINA E1 disminuye el número de células de CECC apoptóticas en el tumor primario.

A parte del nuestro, no existen estudios con modelos ortotópicos *in vivo* donde se analice la implicación de SERPINA E1 en la apoptosis de las células tumorales. Nuestros resultados son consistentes con los observados en modelos subcutáneos de otros tipos tumorales. En ratones deficientes en la expresión de SERPINA E1 aumentó el número de células apoptóticas en tumores subcutáneos, derivados de la implantación de células de fibrosarcoma murino (224). En el mismo sentido, en un modelo de tumor subcutáneo derivado de células tumorales no microcíticas de pulmón,

la administración de SERPINA E1 a los ratones aumentó la resistencia de los tumores subcutáneos a la radiación (168).

Además, diversos estudios en CECC y en otros tipos tumorales muestran que la interacción de las células tumorales con el estroma potencia la resistencia de las células tumorales a la apoptosis (225–229). En este sentido, el aumento de la proporción de estroma inducido por sobre-expresión de SERPINA E1 en nuestro modelo *in vivo* de CECC, podría explicar la menor apoptosis observada en las células tumorales del tumor primario.

Nuestros resultados *in vitro* con células de CECC así como múltiples *estudios in vitro* con células de otros tipos tumorales, apoyan nuestros hallazgos obtenidos a partir del modelo ortotópico en NSG y muestran que SERPINA E1 reduce la apoptosis de las células tumorales tanto espontánea como inducida (168,197–199), como se ha expuesto en un apartado anterior.

Por tanto, el conjunto de nuestros resultados tanto *in vitro* como *in vivo*, apuntan a que SERPINA E1 reduce la apoptosis de las células tumorales. Esto es consistente con los resultados que observamos en nuestros estudios con pacientes con CECC, en los que niveles elevados de SERPINA E1 a nivel de tumor primario se asocian con un mayor riesgo de recidiva local y metastática y una peor respuesta al tratamiento de los pacientes tratados con radioterapia o quimio-radioterapia. En este contexto, proponemos que SERPINA E1 podría disminuir la respuesta al tratamiento de los pacientes al inhibir la apoptosis inducida por la radioterapia y la quimioterapia.

### 3.2. SERPINA E1 aumenta la diseminación a ganglios cervicales y la tasa de crecimiento de las metástasis ganglionares

Como se ha expuesto anteriormente, los ganglios regionales es la localización donde metastatizan con mayor frecuencia los CECCs. Además, el número y extensión de ganglios infiltrados, así como la presencia de extensión extracapsular, se utilizan para determinar el estadio tumoral de los pacientes con CECC debido a que se asocian con la supervivencia de los pacientes.

El uso del modelo ortópico de CECC nos permitió comparar la capacidad de diseminación a ganglios de una línea con sobre-expresión de SERPINA E1 y de su correspondiente línea parental. Nuestros resultados muestran que SERPINA E1 aumenta la diseminación a ganglios cervicales, de manera que la proporción de ratones con metástasis ganglionar fue mayor en el grupo de ratones implantados con la línea que sobre-expresa SERPINA E1. En nuestros resultados del modelo *in vivo*, SERPINA E1 también aumentó la tasa de crecimiento de las metástasis ganglionares, desde el día 18 de la implantación hasta el día del sacrificio (día 32/33).

En el mismo sentido que nuestros resultados, en un estudio con muestras de pacientes, el nivel de expresión de SERPINA E1 en el frente invasivo de tumores de carcinoma oral correlacionó con la presencia de ganglios infiltrados y con el estadio N en los pacientes (157). En otro estudio en tumores

primarios de CECC, la SERPINA E1 constituyó uno de los genes con mayor capacidad predictiva de la presencia de metástasis ganglionar en pacientes (230). De manera similar, en otro estudio SERPINA E1 fue uno de los genes sobre-expresados en los tumores primarios de CECC que generaron metástasis ganglionar en los pacientes cuando se comparó con los tumores que no la generaron (231).

Tanto en nuestro estudio como en otros con pacientes con CECC, el nivel de expresión de SERPINA E1 no se asoció con el estadio N ni con la presencia de afectación ganglionar en los pacientes en el momento del diagnóstico. Uno de los motivos que justificarían estos resultados, aparentemente inconsistentes con los obtenidos en nuestro modelo ortotópico, es que la mayoría de los pacientes se encuentran en estadios avanzados en el momento del diagnóstico, por lo que independientemente de los niveles de expresión de SERPINA E1 a nivel de tumor primario, un porcentaje elevado de pacientes ya presentan metástasis ganglionar. El nivel de SERPINA E1, en cambio, se asoció con el riesgo de los pacientes de desarrollar metástasis, tanto en nuestro estudio retrospectivo como en el prospectivo, siendo un factor de riesgo independiente de la SLP de los pacientes. En este contexto, SERPINA E1 tendría un papel pronóstico adicional al que aportan otros factores clinicopatológicos utilizados en la práctica clínica que incorporaría información relacionada con el riesgo de recidiva metastática de los pacientes.

A favor de nuestros resultados en el modelo *in vivo* en relación con las metástasis ganglionares, en estudios con tumores primarios de carcinomas de lengua, suelo de boca, nasofaringe y cavida oral, un mayor grado de *tumor budding* en tumor primario se asocia con la presencia de metástasis ganglionar en pacientes (88,221,222,232,233). En este sentido, el aumento de *tumor budding* inducido por la sobre-expresión de SERPINA E1 en el frente invasivo del tumor primario, asociado a un patrón de crecimiento más invasivo, observado en nuestros resultados *in vivo*, podría explicar la mayor diseminación a ganglios mostrada por las células con sobre-expresión de SERPINA E1 también en nuestro modelo *in vivo*.

Nuestros resultados en el modelo *in vivo* también son consistentes con los obtenidos con muestras de pacientes con CECC, ya que los pacientes con niveles elevados de SERPINA E1 en tumor primario presentaron mayor riesgo de recidiva metastática y una menor supervivencia libre de progresión que los pacientes con niveles bajos. Por tanto, nuestros resultados *in vitro*, *in vivo* y en muestras de pacientes, van en el mismo sentido, y apuntan a que un mayor nivel de expresión de SERPINA E1 aumenta el potencial invasivo de las células tumorales lo que favorecería su diseminación a ganglios cervicales.

### 3.3. SERPINA E1 se asocia con un patrón de colonización metastática disperso y estimula el crecimiento de las células tumorales en pulmón

Durante el diagnóstico de CECC, sólo un 10% de los pacientes presentan metástasis a distancia, es decir, presencia de células tumorales en localizaciones alejadas del tumor primario, como el pulmón o el hígado (7). A pesar de su reducida frecuencia, la presencia de metástasis a distancia es un factor importante relacionado con la supervivencia de los pacientes, ya que el 88% no sobrevivirá más de doce meses (7). El uso de un modelo ortotópico metastático de CECC durante la realización de esta tesis doctoral, nos ha permitido estudiar la implicación de SERPINA E1 en el desarrollo de metástasis a distancia.

Nuestros resultados muestran que la sobre-expresión de SERPINA E1 aumenta la capacidad de generar focos metastáticos espacialmente dispersos durante la colonización del pulmón. En concreto, cuando se analizó el patrón de colonización de las células tumorales en el tejido pulmonar, el número de niveles o planos de tejido con células tumorales fue significativamente mayor en los ratones implantados con la línea con sobre-expresión de SERPINA E1 que en la parental. Por otra parte, la sobre-expresión de SERPINA E1 estimuló la generación de focos de un tamaño significativamente mayor en el pulmón (área de  $0.08\text{mm}^2$  o superior), que en un caso llegó a metástasis macroscópica (área superior a  $1\text{mm}^2$ ) lo que implica la capacidad de generar vasos sanguíneos. En relación con las metástasis hepáticas en nuestro modelo ortotópico de CECC, observamos que la sobre-expresión de SERPINA E1 tiende a aumentar las metástasis a hígado. Concretamente, la línea con sobre-expresión de SERPINA E1 generó focos tumorales en el hígado en el 30% de los ratones implantados, mientras que en ninguno de los ratones implantados con la línea parental se observó metástasis hepática.

A parte del nuestro, no existen estudios en modelos ortotópicos de CECC en los que se evalúe la implicación de SERPINA E1 en las metástasis a distancia. En el mismo sentido que nuestros resultados, en un modelo murino de metástasis espontánea a hígado con células de carcinoma nasofaríngeo, el bloqueo de la expresión de SERPINA E1 redujo el número de focos tumorales hepáticos (159). En estudios con otros tipos tumorales en modelos murinos también se muestran resultados que apoyan nuestros hallazgos. En un modelo ortotópico de cáncer de mama, la deficiencia de expresión de SERPINA E1 redujo la frecuencia y el número total de metástasis en pulmón (234). En otro estudio con células tumorales originadas a partir de células epiteliales de la retina, el uso de un modelo transgénico deficiente en la expresión de SERPINA E1 disminuyó el número y la diseminación de las metástasis a cerebro (235).

A diferencia de nuestros resultados en el modelo *in vivo* y en contra del papel de mal pronóstico atribuido a SERPINA E1 observado en múltiples tipos de cáncer, en otros estudios con modelos *in vivo* en tipos tumorales distintos observaron que el aumento de la expresión de SERPINA E1 reducía las metástasis a distancia. De este modo, en un modelo murino ortotópico de melanoma uveal, el

tratamiento de los ratones con un vector adenoviral portador de un cDNA de SERPINA E1 redujo la frecuencia de metástasis hepática en los ratones (236). En un modelo subcutáneo de carcinoma de próstata, el aumento de la expresión de SERPINA E1 en las células tumorales inhibió las metástasis hepáticas y pulmonares en los ratones (237). El hecho de que estos dos estudios se centran en tipos tumorales distintos al CECC, sugiere que SERPINA E1 podría regular de manera diferente la diseminación metastásica en otros tipos tumorales. Por otra parte, los modelos utilizados en ambos estudios para evaluar la implicación de SERPINA E1 en las metástasis a distancia no son comparables a nuestro modelo *in vivo* ortotópico. En el estudio del modelo *in vivo* de melanoma uveal, el aumento de expresión de SERPINA E1 no se localiza únicamente a nivel de células tumorales sino que también se produce en todas las células del ratón, incluido el estroma tumoral. Por otro lado, en el modelo de carcinoma de próstata, la inoculación de las células tumorales es subcutánea, siendo un tipo de modelo generalmente poco adecuado para el estudio de la diseminación y metástasis de las células tumorales, al no tener lugar los mismos procesos que a partir del crecimiento del tumor primario en el órgano en el que se genera en pacientes.

Los resultados que hemos obtenido en el modelo *in vivo* de CECC son consistentes con los obtenidos en nuestros ensayos *in vitro* con células de CECC, en los que la sobre-expresión de SERPINA E1 estimula la migración de las células tumorales, contribuyendo a su potencial invasivo. Este aumento del potencial invasivo también se observa a nivel de tumor primario en el modelo *in vivo*, y podría contribuir a generar la mayor dispersión de las células tumorales durante la colonización del pulmón que hemos observado. A favor de este argumento, en tumores primarios de pacientes con carcinoma laríngeo, la intensidad de *tumor budding* correlacionó con la presencia de metástasis a distancia en los pacientes (238). Además, tanto *in vitro* como *in vivo* a nivel de tumor primario, observamos que SERPINA E1 aumenta la resistencia a la apoptosis de las células tumorales. En este sentido, la inhibición de la apoptosis y el aumento de la invasividad en las células tumorales inducidos por SERPINA E1, podría explicar la generación de focos de mayor tamaño en pulmón que hemos observado en el modelo derivado de la línea que sobre-expresa SERPINA E1. En la **figura 79** se resumen los principales resultados obtenidos a partir del modelo ortotópico en ratones NSG y su posible relación con el efecto funcional causado por SERPINA E1 en las células de CECC a partir de nuestros estudios *in vitro*.

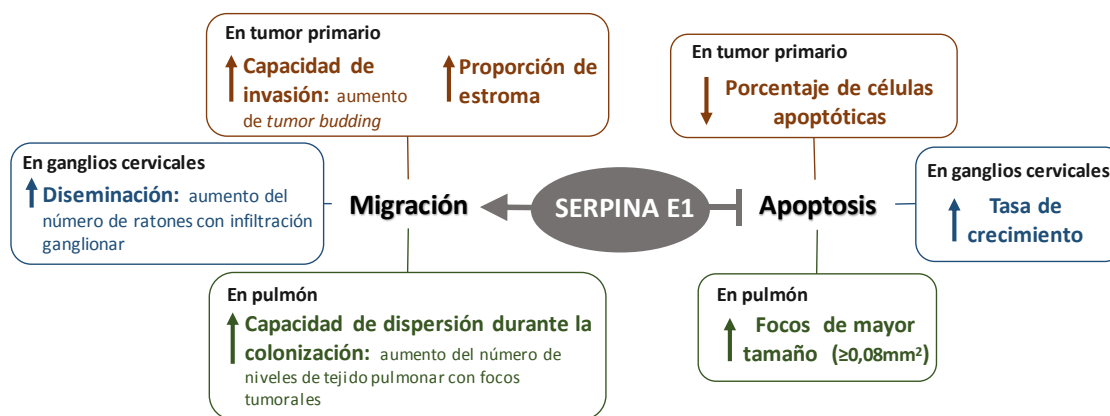


Figura 79. Esquema representativo de los resultados obtenidos en nuestros experimentos *in vivo* y su posible relación con el efecto de SERPINA E1 en células de CECC observados en nuestros estudios *in vitro* (Migración y Apoptosis).

Por último, nuestros resultados con muestras de pacientes con CECC son consistentes con los hallazgos obtenidos en nuestro modelo *in vivo*, ya que los pacientes con expresión elevada de SERPINA E1 a nivel de tumor primario, presentan más riesgo de recidiva metastásica y una SLP más corta que los pacientes con niveles bajos. En este sentido, el aumento de expresión de SERPINA E1 favorecería las metástasis a distancia al promover la dispersión de las células tumorales durante la colonización pulmonar y al estimular el crecimiento de los focos tumorales en pulmón.

En definitiva, el conjunto de resultados en este trabajo de tesis doctoral en muestras de pacientes con CECC, en líneas celulares de CECC y en el modelo ortotópico metastático de CECC, apuntan en el mismo sentido: SERPINA E1 es un factor asociado a mal pronóstico en pacientes con CECC que contribuiría a la agresividad tumoral, potenciando la invasividad e inhibiendo la apoptosis en las células tumorales. Además, SERPINA E1 también podría disminuir la respuesta de los pacientes con CECC a los tratamientos quimio- o radioterápicos, debido posiblemente a que aumentaría la resistencia de las células tumorales a la apoptosis inducida por agentes genotóxicos. Finalmente, se identificó SERPINA E1 como factor pronóstico independiente de las variables clinicopatológicas utilizadas en la práctica clínica en nuestro estudio con pacientes con CECC.

Por tanto, SERPINA E1 constituye una buena proteína candidata para ser introducida, tras los correspondientes estudios confirmatorios y de validación, en la práctica clínica como factor pronóstico independiente en pacientes con CECC, ya que aportaría información adicional sobre la evolución clínica del paciente. Asimismo, el nivel de SERPINA E1 también permitiría identificar grupos de pacientes candidatos a un tratamiento alternativo a la quimioterapia actual, para mejorar su respuesta al tratamiento, o disminuir los efectos secundarios de toxicidad de la terapia en aquellos grupos de pacientes que no necesiten de un tratamiento adicional.

## VI. CONCLUSIONES

1. La expresión de SERPINA E1 en tumor primario se asocia con un pronóstico desfavorable en pacientes con CECC. Los pacientes con niveles elevados de SERPINA E1 presentan una menor supervivencia y un mayor riesgo de recidiva local y metastática que los pacientes con niveles bajos.
2. SERPINA E1 es un marcador pronóstico independiente de la supervivencia libre de progresión en pacientes con CECC. El análisis de los niveles de SERPINA E1 permite identificar un subgrupo de pacientes tratados con radio o quimioradioterapia con escasa probabilidad de obtener beneficio de dichos tratamientos.
3. En los estudios *in vitro*, SERPINA E1 estimula la migración y aumenta la resistencia de las células de CECC a la muerte inducida por cisplatino a través de la activación de la vía PI3K/Akt.
4. El modelo murino ortópico establecido en ratones NSG permite estudiar el tipo de crecimiento y la capacidad de diseminación metastática de las células de CECC.
5. En el modelo ortotópico con ratones NSG, la implantación de una línea de CECC con sobre-expresión de SERPINA E1 o de su correspondiente línea parental, ha permitido obtener las siguientes conclusiones:
  - 5.1. SERPINA E1 estimula la capacidad invasiva, aumenta la proporción de estroma y disminuye la apoptosis en el tumor primario.
  - 5.2. SERPINA E1 aumenta el número de ratones con afectación ganglionar y la tasa de crecimiento de las metástasis ganglionares.
  - 5.3. La sobre-expresión de SERPINA E1 estimula la dispersión de las células tumorales durante la colonización y aumenta la generación de focos metastáticos de mayor tamaño en el pulmón.



## VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011 Jan;11(1):9–22.
2. Ridge JA, Ranee Mehra, Miriam N Lango, Thomas Galloway. Head and Neck Tumors | Cancer Network [Internet]. Cancer Network. 2016 [cited 2016 Dec 7]. Available from: <http://www.cancernetwork.com/cancer-management/head-and-neck-tumors>
3. Noguti J, De Moura CFG, De Jesus GPP, Da Silva VHP, Hossaka TA, Oshima CTF, et al. Metastasis from oral cancer: an overview. *Cancer Genomics Proteomics*. 2012 Oct;9(5):329–35.
4. Rothenberg SM, Ellisen LW. The molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Invest*. 2012 Jun;122(6):1951–7.
5. Head and Neck Cancers [Internet]. NCCN Clinical Practice Guidance in Oncology. 2015 [cited 2016 Dec 7]. Available from: <https://www.cancer.gov/types/head-and-neck/head-neck-fact-sheet>
6. Ridge, John Andrew, Mehra, Ranee, Lango, Miriam N, Galloway, Thomas. Head and Neck Tumors | Cancer Network [Internet]. Cancer Network. 2016 [cited 2017 Feb 13]. Available from: <http://www.cancernetwork.com/cancer-management/head-and-neck-tumors>
7. Takes RP, Rinaldo A, Silver CE, Haigentz M, Woolgar JA, Triantafyllou A, et al. Distant metastases from head and neck squamous cell carcinoma. Part I. Basic aspects. *Oral Oncol*. 2012 Sep;48(9):775–9.
8. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res*. 1988 Jun 1;48(11):3282–7.
9. Chaturvedi AK, Anderson WF, Lortet-Tieulent J, Curado MP, Ferlay J, Franceschi S, et al. Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2013 Dec 20;31(36):4550–9.
10. Jaber MA. Oral epithelial dysplasia in non-users of tobacco and alcohol: an analysis of clinicopathologic characteristics and treatment outcome. *J Oral Sci*. 2010 Mar;52(1):13–21.
11. Pelucchi C, Gallus S, Garavello W, Bosetti C, La Vecchia C. Alcohol and tobacco use, and cancer risk for upper aerodigestive tract and liver. *Eur J Cancer Prev Off J Eur Cancer Prev Organ ECP*. 2008 Aug;17(4):340–4.
12. Lambert R, Sauvaget C, de Camargo Cancela M, Sankaranarayanan R. Epidemiology of cancer from the oral cavity and oropharynx. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2011 Aug;23(8):633–41.
13. Thibaudeau E, Fortin B, Coutlée F, Nguyen-Tan P, Weng X, Audet M-L, et al. HPV Prevalence and Prognostic Value in a Prospective Cohort of 255 Patients with Locally Advanced HNSCC: A Single-Centre Experience. *Int J Otolaryngol*. 2013;2013:437815.
14. Lewis A, Kang R, Levine A, Maghami E. The New Face of Head and Neck Cancer: The HPV Epidemic. *Oncol Williston Park N*. 2015 Sep;29(9):616–26.
15. O'Rourke MA, Ellison MV, Murray LJ, Moran M, James J, Anderson LA. Human papillomavirus related head and neck cancer survival: a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol*. 2012 Dec;48(12):1191–201.
16. Barnes, L, Everson, JW, Reichart, P, Sidransky, D, editors. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. In: World Health Organization Classification of Tumors [Internet]. Lyon: IARC press; 2005 [cited 2017 Feb 14]. Available from: <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/pat-gen/bb9/>
17. Brennan M, Migliorati CA, Lockhart PB, Wray D, Al-Hashimi I, Axéll T, et al. Management of oral epithelial dysplasia: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2007 Mar;103, Supplement:S19.e1-S19.e12.
18. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *The Lancet*. 2008 May 23;371(9625):1695–709.
19. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer*. 1953 Sep;6(5):963–8.

20. Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res.* 1996 Jun 1;56(11):2488–92.
21. Langendijk JA, Psyrri A. The prognostic significance of p16 overexpression in oropharyngeal squamous cell carcinoma: implications for treatment strategies and future clinical studies. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2010 Oct;21(10):1931–4.
22. Miller DL, Puricelli MD, Stack MS. Virology and molecular pathogenesis of HPV (human papillomavirus)-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Biochem J.* 2012 Apr 15;443(2):339–53.
23. Kostareli E, Holzinger D, Hess J. New Concepts for Translational Head and Neck Oncology: Lessons from HPV-Related Oropharyngeal Squamous Cell Carcinomas. *Front Oncol.* 2012;2:36.
24. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature.* 2015 Jan 29;517(7536):576–82.
25. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646–74.
26. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2002 Jun;2(6):442–54.
27. Smith A, Teknos TN, Pan Q. Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2013 Apr;49(4):287–92.
28. Scanlon CS, Van Tubergen EA, Inglehart RC, D’Silva NJ. Biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma. *J Dent Res.* 2013 Feb;92(2):114–21.
29. Stransky N, Egloff AM, Tward AD, Kostic AD, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science.* 2011 Aug 26;333(6046):1157–60.
30. Kalyankrishna S, Grandis JR. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2006 Jun 10;24(17):2666–72.
31. Ramdas L, Giri U, Ashorn CL, Coombes KR, El-Naggar A, Ang KK, et al. miRNA expression profiles in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent normal tissue. *Head Neck.* 2009 May;31(5):642–54.
32. Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 Jul;7(7):505–16.
33. Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY, et al. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol.* 2001 Sep;3(9):802–8.
34. Takes RP, Baatenburg de Jong RJ, Schuurung E, Litvinov SV, Hermans J, Van Krieken JH. Differences in expression of oncogenes and tumor suppressor genes in different sites of head and neck squamous cell. *Anticancer Res.* 1998 Dec;18(6B):4793–800.
35. Mountzios G, Rampias T, Psyrri A. The mutational spectrum of squamous-cell carcinoma of the head and neck: targetable genetic events and clinical impact. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2014 Oct;25(10):1889–900.
36. Du L, Shen J, Weems A, Lu S-L. Role of Phosphatidylinositol-3-Kinase Pathway in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Oncol.* 2012 May 16;2012:e450179.
37. Courtney KD, Corcoran RB, Engelman JA. The PI3K pathway as drug target in human cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2010 Feb 20;28(6):1075–83.
38. Garcia-Echeverria C, Sellers WR. Drug discovery approaches targeting the PI3K/Akt pathway in cancer. *Oncogene.* 2008 Sep 18;27(41):5511–26.
39. Zhang PL, Pellitteri PK, Law A, Gilroy PA, Wood GC, Kennedy TL, et al. Overexpression of phosphorylated nuclear factor-kappa B in tonsillar squamous cell carcinoma and high-grade dysplasia is associated with poor prognosis. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* 2005 Jul;18(7):924–32.
40. 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 Oct;29(10):959–71.
41. Pavón MA, Parreño M, Téllez-Gabriel M, Sancho FJ, López M, Céspedes MV, et al. Gene expression signatures and molecular markers associated with clinical outcome in locally advanced head and neck carcinoma. *Carcinogenesis.* 2012 Sep;33(9):1707–16.

42. Thomas SJ, Snowden JA, Zeidler MP, Danson SJ. The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumours. *Br J Cancer*. 2015 Jul 28;113(3):365–71.
43. Molinolo AA, Amornphimoltham P, Squarize CH, Castilho RM, Patel V, Gutkind JS. Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. *Oral Oncol*. 2009 May;45(4–5):324–34.
44. Sriuranpong V, Park JI, Amornphimoltham P, Patel V, Nelkin BD, Gutkind JS. Epidermal growth factor receptor-independent constitutive activation of STAT3 in head and neck squamous cell carcinoma is mediated by the autocrine/paracrine stimulation of the interleukin 6/gp130 cytokine system. *Cancer Res*. 2003 Jun 1;63(11):2948–56.
45. Kidacki M, Lehman HL, Warrick JI, Stairs DB. Signaling Pathways Supporting Tumor Invasion in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Exp Pathol* [Internet]. 2015 May 21 [cited 2016 Dec 15]; Available from: <http://www.omicsonline.org/open-access/signaling-pathways-supporting-tumor-invasion-in-head-and-neck-squamous-cell-carcinoma-2161-0681-1000227.php?aid=52444>
46. White R, Malkoski S, Wang X-J. TGF $\beta$  signaling in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene*. 2010 Oct 7;29(40):5437–46.
47. Shah JP, Lydiatt W. Treatment of cancer of the head and neck. *CA Cancer J Clin*. 1995 Dec;45(6):352–68.
48. Carvalho AL, Nishimoto IN, Califano JA, Kowalski LP. Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: a site-specific analysis of the SEER database. *Int J Cancer*. 2005 May 1;114(5):806–16.
49. SEER Cancer Stat Facts: Oral Cavity and Pharynx Cancer. National Cancer Institute. Bethesda, MD [Internet]. [cited 2017 Feb 20]. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/oralcav.html>
50. Tímár J, Csuka O, Remenár E, Répássy G, Kásler M. Progression of head and neck squamous cell cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2005 Jan;24(1):107–27.
51. Moore C, Flynn MB, Greenberg RA. Evaluation of size in prognosis of oral cancer. *Cancer*. 1986 Jul 1;58(1):158–62.
52. Moe K, Wolf GT, Fisher SG, Hong WK. Regional metastases in patients with advanced laryngeal cancer. Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Study Group. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1996 Jun;122(6):644–8.
53. Jang JY, Kim MJ, Ryu G, Choi N, Ko Y-H, Jeong H-S. Prediction of Lymph Node Metastasis by Tumor Dimension Versus Tumor Biological Properties in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Cancer Res Treat Off J Korean Cancer Assoc*. 2016 Jan;48(1):54–62.
54. Moore C, Kuhns JG, Greenberg RA. Thickness as prognostic aid in upper aerodigestive tract cancer. *Arch Surg Chic Ill 1960*. 1986 Dec;121(12):1410–4.
55. Yuen AP, Lam KY, Wei WI, Lam KY, Ho CM, Chow TL, et al. A comparison of the prognostic significance of tumor diameter, length, width, thickness, area, volume, and clinicopathological features of oral tongue carcinoma. *Am J Surg*. 2000 Aug;180(2):139–43.
56. Clark JR, Naranjo N, Franklin JH, de Almeida J, Gullane PJ. Established prognostic variables in N0 oral carcinoma. *Otolaryngol--Head Neck Surg Off J Am Acad Otolaryngol-Head Neck Surg*. 2006 Nov;135(5):748–53.
57. Sparano A, Weinstein G, Chalian A, Yodul M, Weber R. Multivariate predictors of occult neck metastasis in early oral tongue cancer. *Otolaryngol--Head Neck Surg Off J Am Acad Otolaryngol-Head Neck Surg*. 2004 Oct;131(4):472–6.
58. Tomifuji M, Imanishi Y, Araki K, Yamashita T, Yamamoto S, Kameyama K, et al. Tumor depth as a predictor of lymph node metastasis of supraglottic and hypopharyngeal cancers. *Ann Surg Oncol*. 2011 Feb;18(2):490–6.
59. Hinni ML, Ferlito A, Brandwein-Gensler MS, Takes RP, Silver CE, Westra WH, et al. Surgical margins in head and neck cancer: a contemporary review. *Head Neck*. 2013 Sep;35(9):1362–70.
60. Chen TY, Emrich LJ, Driscoll DL. The clinical significance of pathological findings in surgically resected margins of the primary tumor in head and neck carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1987 Jun;13(6):833–7.

61. Loree TR, Strong EW. Significance of positive margins in oral cavity squamous carcinoma. *Am J Surg.* 1990 Oct;160(4):410–4.
62. Garzino-Demo P, Dell'Acqua A, Dalmaso P, Fasolis M, La Terra Maggiore GM, Ramieri G, et al. Clinicopathological parameters and outcome of 245 patients operated for oral squamous cell carcinoma. *J Cranio-Maxillo-fac Surg Off Publ Eur Assoc Cranio-Maxillo-fac Surg.* 2006 Sep;34(6):344–50.
63. Weijers M, Snow GB, Bezemer DP, van der Wal JE, van der Waal I. The status of the deep surgical margins in tongue and floor of mouth squamous cell carcinoma and risk of local recurrence; an analysis of 68 patients. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004 Mar;33(2):146–9.
64. Pimenta Amaral TM, Da Silva Freire AR, Carvalho AL, Pinto CAL, Kowalski LP. Predictive factors of occult metastasis and prognosis of clinical stages I and II squamous cell carcinoma of the tongue and floor of the mouth. *Oral Oncol.* 2004 Sep;40(8):780–6.
65. Brandwein-Gensler M, Smith RV. Prognostic indicators in head and neck oncology including the new 7th edition of the AJCC staging system. *Head Neck Pathol.* 2010 Mar;4(1):53–61.
66. Jones As. Prognosis in mouth cancer: tumour factors. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1994 Jan;30B(1):8–15.
67. Morales-Angulo C, Val-Bernal F, Buelta L, Fernandez F, García-Castrillo L, Rama J. Prognostic factors in supraglottic laryngeal carcinoma. *Otolaryngol--Head Neck Surg Off J Am Acad Otolaryngol-Head Neck Surg.* 1998 Nov;119(5):548–53.
68. Noguchi M, Kido Y, Kubota H, Kinjo H, Kohama G. Prognostic factors and relative risk for survival in N1-3 oral squamous cell carcinoma: a multivariate analysis using Cox's hazard model. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1999 Dec;37(6):433–7.
69. Olsen KD, Caruso M, Foote RL, Stanley RJ, Lewis JE, Buskirk SJ, et al. Primary head and neck cancer. Histopathologic predictors of recurrence after neck dissection in patients with lymph node involvement. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1994 Dec;120(12):1370–4.
70. Beenken SW, Krontiras H, Maddox WA, Peters GE, Soong S, Urist MM. T1 and T2 squamous cell carcinoma of the oral tongue: prognostic factors and the role of elective lymph node dissection. *Head Neck.* 1999 Mar;21(2):124–30.
71. Del Valle-Zapico A, Fernández FF, Suárez AR, Angulo CM, Quintela JR. Prognostic value of histopathologic parameters and DNA flow cytometry in squamous cell carcinoma of the pyriform sinus. *The Laryngoscope.* 1998 Feb;108(2):269–72.
72. Janot F, Klijanienko J, Russo A, Mamet JP, de Braud F, El-Naggar AK, et al. Prognostic value of clinicopathological parameters in head and neck squamous cell carcinoma: a prospective analysis. *Br J Cancer.* 1996 Feb;73(4):531–8.
73. Shingaki S, Suzuki I, Kobayashi T, Nakajima T. Predicting factors for distant metastases in head and neck carcinomas: an analysis of 103 patients with locoregional control. *J Oral Maxillofac Surg Off J Am Assoc Oral Maxillofac Surg.* 1996 Jul;54(7):853–7.
74. Jakobsson PA, Eneroth CM, Killander D, Moberger G, Mårtensson B. Histologic classification and grading of malignancy in carcinoma of the larynx. *Acta Radiol Ther Phys Biol.* 1973 Feb;12(1):1–8.
75. Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res.* 1987 Jun;95(3):229–49.
76. Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol.* 1989 Sep;18(8):432–7.
77. Brandwein-Gensler M, Teixeira MS, Lewis CM, Lee B, Rolnitzky L, Hille JJ, et al. Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. *Am J Surg Pathol.* 2005 Feb;29(2):167–78.
78. Connolly JL, Schnitt SJ, Wang HH, Longtine JA, Dvorak A, Dvorak HF. Tumor Structure and Tumor Stroma Generation. In: *Holland-Frei Cancer Medicine [Internet].* 6th ed. Hamilton: BC Decker; 2003 [cited 2017 Feb 20]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13447/>

79. de Kruijf EM, van Nes JGH, van de Velde CJH, Putter H, Smit VTHBM, Liefers GJ, et al. Tumor-stroma ratio in the primary tumor is a prognostic factor in early breast cancer patients, especially in triple-negative carcinoma patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2011 Feb;125(3):687–96.
80. Mesker WE, Junggeburst JMC, Szuhai K, de Heer P, Morreau H, Tanke HJ, et al. The carcinoma-stromal ratio of colon carcinoma is an independent factor for survival compared to lymph node status and tumor stage. *Cell Oncol Off J Int Soc Cell Oncol.* 2007;29(5):387–98.
81. Liu J, Liu J, Li J, Chen Y, Guan X, Wu X, et al. Tumor-stroma ratio is an independent predictor for survival in early cervical carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2014 Jan;132(1):81–6.
82. Wang K, Ma W, Wang J, Yu L, Zhang X, Wang Z, et al. Tumor-stroma ratio is an independent predictor for survival in esophageal squamous cell carcinoma. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* 2012 Sep;7(9):1457–61.
83. Wheeler SE, Shi H, Lin F, Dasari S, Bednash J, Thorne S, et al. Enhancement of head and neck squamous cell carcinoma proliferation, invasion, and metastasis by tumor-associated fibroblasts in preclinical models. *Head Neck.* 2014 Mar;36(3):385–92.
84. Thode C, Jørgensen TG, Dabelsteen E, Mackenzie I, Dabelsteen S. Significance of myofibroblasts in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol.* 2011 Mar;40(3):201–7.
85. Campos MS, Neiva KG, Meyers KA, Krishnamurthy S, Nör JE. Endothelial derived factors inhibit anoikis of head and neck cancer stem cells. *Oral Oncol.* 2012 Jan;48(1):26–32.
86. Li C, Shintani S, Terakado N, Nakashiro K-I, Hamakawa H. Infiltration of tumor-associated macrophages in human oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2002 Dec;9(6):1219–23.
87. Almagush A, Salo T, Hagström J, Leivo I. Tumour budding in head and neck squamous cell carcinoma - a systematic review. *Histopathology.* 2014 Nov;65(5):587–94.
88. Seki M, Sano T, Yokoo S, Oyama T. Histologic assessment of tumor budding in preoperative biopsies to predict nodal metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue and floor of the mouth. *Head Neck.* 2016 Apr;38 Suppl 1:E1582-1590.
89. Roh J, Muelleman T, Tawfik O, Thomas SM. Perineural growth in head and neck squamous cell carcinoma: a review. *Oral Oncol.* 2015 Jan;51(1):16–23.
90. Fagan JJ, Collins B, Barnes L, D'Amico F, Myers EN, Johnson JT. Perineural invasion in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998 Jun;124(6):637–40.
91. Magnano M, Bongioannini G, Lerda W, Canale G, Tondolo E, Bona M, et al. Lymphnode metastasis in head and neck squamous cells carcinoma: multivariate analysis of prognostic variables. *J Exp Clin Cancer Res CR.* 1999 Mar;18(1):79–83.
92. Tai S-K, Li W-Y, Yang M-H, Chu P-Y, Wang Y-F. Perineural invasion in T1 oral squamous cell carcinoma indicates the need for aggressive elective neck dissection. *Am J Surg Pathol.* 2013 Aug;37(8):1164–72.
93. Pinto FR, de Matos LL, Palermo FC, Kulcsar MAV, Cavalheiro BG, de Mello ES, et al. Tumor thickness as an independent risk factor of early recurrence in oral cavity squamous cell carcinoma. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol Off J Eur Fed Oto-Rhino-Laryngol Soc EUFOS Affil Ger Soc Oto-Rhino-Laryngol - Head Neck Surg.* 2014 Jun;271(6):1747–54.
94. Sinha P, Hackman T, Nussenbaum B, Wu N, Lewis JS, Haughey BH. Transoral laser microsurgery for oral squamous cell carcinoma: oncologic outcomes and prognostic factors. *Head Neck.* 2014 Mar;36(3):340–51.
95. Resnick JM, Uhlman D, Niehans GA, Gapany M, Adams G, Knapp D, et al. Cervical lymph node status and survival in laryngeal carcinoma: prognostic factors. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1995 Sep;104(9 Pt 1):685–94.
96. Goldson TM, Han Y, Knight KB, Weiss HL, Resto VA. Clinicopathological predictors of lymphatic metastasis in HNSCC: implications for molecular mechanisms of metastatic disease. *J Exp Ther Oncol.* 2010;8(3):211–21.
97. Yilmaz T, Hosal AS, Gedikoğlu G, Onerci M, Gürsel B. Prognostic significance of vascular and perineural invasion in cancer of the larynx. *Am J Otolaryngol.* 1998 Apr;19(2):83–8.

98. Close LG, Brown PM, Vuitch MF, Reisch J, Schaefer SD. Microvascular Invasion and Survival in Cancer of the Oral Cavity and Oropharynx. *Arch Otolaryngol Neck Surg.* 1989 Nov 1;115(11):1304–9.
99. Kurtz KA, Hoffman HT, Zimmerman MB, Robinson RA. Perineural and vascular invasion in oral cavity squamous carcinoma: increased incidence on re-review of slides and by using immunohistochemical enhancement. *Arch Pathol Lab Med.* 2005 Mar;129(3):354–9.
100. Hoang JK, Vanka J, Ludwig BJ, Glastonbury CM. Evaluation of cervical lymph nodes in head and neck cancer with CT and MRI: tips, traps, and a systematic approach. *AJR Am J Roentgenol.* 2013 Jan;200(1):W17-25.
101. Mamelle G, Pampurik J, Luboinski B, Lancar R, Lusinchi A, Bosq J. Lymph node prognostic factors in head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Surg.* 1994 Nov;168(5):494–8.
102. Leemans CR, Tiwari R, Nauta JJ, van der Waal I, Snow GB. Regional lymph node involvement and its significance in the development of distant metastases in head and neck carcinoma. *Cancer.* 1993 Jan 15;71(2):452–6.
103. Roberts TJ, Colevas AD, Hara W, Holsinger FC, Oakley-Girvan I, Divi V. Number of positive nodes is superior to the lymph node ratio and American Joint Committee on Cancer N staging for the prognosis of surgically treated head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer.* 2016 May 1;122(9):1388–97.
104. Ferlito A, Rinaldo A, Devaney KO, MacLennan K, Myers JN, Petruzzelli GJ, et al. Prognostic significance of microscopic and macroscopic extracapsular spread from metastatic tumor in the cervical lymph nodes. *Oral Oncol.* 2002 Dec;38(8):747–51.
105. Myers EN, Alvi A. Management of carcinoma of the supraglottic larynx: evolution, current concepts, and future trends. *The Laryngoscope.* 1996 May;106(5 Pt 1):559–67.
106. Myers JN, Greenberg JS, Mo V, Roberts D. Extracapsular spread. A significant predictor of treatment failure in patients with squamous cell carcinoma of the tongue. *Cancer.* 2001 Dec 15;92(12):3030–6.
107. Greenberg JS, Fowler R, Gomez J, Mo V, Roberts D, El Naggar AK, et al. Extent of extracapsular spread: a critical prognosticator in oral tongue cancer. *Cancer.* 2003 Mar 15;97(6):1464–70.
108. Carter RL, Bliss JM, Soo KC, O'Brien CJ. Radical neck dissections for squamous carcinomas: pathological findings and their clinical implications with particular reference to transcapsular spread. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1987 Jun;13(6):825–32.
109. Snow GB, Annyas AA, van Slooten EA, Bartelink H, Hart AA. Prognostic factors of neck node metastasis. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 1982 Jun;7(3):185–92.
110. Kowalski LP, Franco EL, de Andrade Sobrinho J, Oliveira BV, Pontes PL. Prognostic factors in laryngeal cancer patients submitted to surgical treatment. *J Surg Oncol.* 1991 Oct;48(2):87–95.
111. Brasilino de Carvalho M. Quantitative analysis of the extent of extracapsular invasion and its prognostic significance: a prospective study of 170 cases of carcinoma of the larynx and hypopharynx. *Head Neck.* 1998 Jan;20(1):16–21.
112. Kang H, Kiess A, Chung CH. Emerging biomarkers in head and neck cancer in the era of genomics. *Nat Rev Clin Oncol.* 2015 Jan;12(1):11–26.
113. Lothaire P, de Azambuja E, Dequanter D, Lalami Y, Sotiriou C, Andry G, et al. Molecular markers of head and neck squamous cell carcinoma: promising signs in need of prospective evaluation. *Head Neck.* 2006 Mar;28(3):256–69.
114. Thomas GR, Nadiminti H, Regalado J. Molecular predictors of clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Exp Pathol.* 2005 Dec;86(6):347–63.
115. Agrawal N, Frederick MJ, Pickering CR, Bettgowda C, Chang K, Li RJ, et al. Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science.* 2011 Aug 26;333(6046):1154–7.
116. Loyo M, Li RJ, Bettgowda C, Pickering CR, Frederick MJ, Myers JN, et al. Lessons learned from next-generation sequencing in head and neck cancer. *Head Neck.* 2013 Mar;35(3):454–63.
117. Diaz LA, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2014 Feb 20;32(6):579–86.

118. Lefebvre JL. Laryngeal preservation in head and neck cancer: multidisciplinary approach. *Lancet Oncol.* 2006 Sep 1;7(9):747–55.
119. Posner MR. Paradigm shift in the treatment of head and neck cancer: the role of neoadjuvant chemotherapy. *The Oncologist.* 2005;10 Suppl 3:11–9.
120. Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004;59(2 Suppl):21–6.
121. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 2006 Feb 9;354(6):567–78.
122. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene.* 2003;22(47):7265–79.
123. Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. Is Cisplatin-Induced Cell Death Always Produced by Apoptosis? *Mol Pharmacol.* 2001 Apr 1;59(4):657–63.
124. Rivelli TG, Mak MP, Martins RE, da Costa e Silva VT, de Castro G. Cisplatin based chemoradiation late toxicities in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Discov Med.* 2015 Aug;20(108):57–66.
125. Rijken DC, Lijnen HR. New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J Thromb Haemost JTH.* 2009 Jan;7(1):4–13.
126. Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PG, et al. The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem.* 2001 Sep 7;276(36):33293–6.
127. van Gent D, Sharp P, Morgan K, Kalsheker N. Serpins: structure, function and molecular evolution. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003 Nov;35(11):1536–47.
128. Simone TM, Higgins PJ. Inhibition of SERPINE1 Function Attenuates Wound Closure in Response to Tissue Injury: A Role for PAI-1 in Re-Epithelialization and Granulation Tissue Formation. *J Dev Biol.* 2015 Mar 2;3(1):11–24.
129. Lee C-C, Huang T-S. Plasminogen activator inhibitor-1: The expression, biological functions, and effects on tumorigenesis and tumor cell adhesion and migration. *J Cancer Mol.* 2005;1(1):25–36.
130. Law RH, Zhang Q, McGowan S, Buckle AM, Silverman GA, Wong W, et al. An overview of the serpin superfamily. *Genome Biol.* 2006;7(5):216.
131. Ghosh AK, Vaughan DE. PAI-1 in tissue fibrosis. *J Cell Physiol.* 2012 Feb;227(2):493–507.
132. Binder BR, Mihaly J. The plasminogen activator inhibitor “paradox” in cancer. *Immunol Lett.* 2008 Jun 30;118(2):116–24.
133. Kwaan HC, Mazar AP, McMahon BJ. The apparent uPA/PAI-1 paradox in cancer: more than meets the eye. *Semin Thromb Hemost.* 2013 Jun;39(4):382–91.
134. Nozaki S, Endo Y, Kawashiri S, Nakagawa K, Yamamoto E, Yonemura Y, et al. Immunohistochemical localization of a urokinase-type plasminogen activator system in squamous cell carcinoma of the oral cavity: association with mode of invasion and lymph node metastasis. *Oral Oncol.* 1998 Jan;34(1):58–62.
135. Lindberg P, Larsson A, Nielsen BS. Expression of plasminogen activator inhibitor-1, urokinase receptor and laminin gamma-2 chain is an early coordinated event in incipient oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2006 Jun 15;118(12):2948–56.
136. Pasini FS, Brentani MM, Kowalski LP, Federico MH. Transforming growth factor beta1, urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 mRNA expression in head and neck squamous carcinoma and normal adjacent mucosa. *Head Neck.* 2001 Sep;23(9):725–32.
137. Speleman L, Kerrebijn JDF, Look MP, Meeuwis CA, Foekens JA, Berns EMJJ. Prognostic value of plasminogen activator inhibitor-1 in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2007 Apr;29(4):341–50.
138. Yasuda T, Sakata Y, Kitamura K, Morita M, Ishida T. Localization of plasminogen activators and their inhibitor in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Head Neck.* 1997 Oct 1;19(7):611–6.

139. Hundsdorfer B, Zeilhofer H-F, Bock KP, Dettmar P, Schmitt M, Kolk A, et al. Tumour-associated urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1 in normal and neoplastic tissues of patients with squamous cell cancer of the oral cavity - clinical relevance and prognostic value. *J Cranio-Maxillo-fac Surg Off Publ Eur Assoc Cranio-Maxillo-fac Surg*. 2005 Jun;33(3):191–6.
140. Chin D, Boyle GM, Williams RM, Ferguson K, Pandeya N, Pedley J, et al. Novel markers for poor prognosis in head and neck cancer. *Int J Cancer*. 2005 Feb 20;113(5):789–97.
141. Magnussen S, Rikardsen OG, Hadler-Olsen E, Uhlin-Hansen L, Steigen SE, Svineng G. Urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) are potential predictive biomarkers in early stage oral squamous cell carcinomas (OSCC). *PloS One*. 2014;9(7):e101895.
142. Frese KK, Tuveson DA. Maximizing mouse cancer models. *Nat Rev Cancer*. 2007 Sep;7(9):645–58.
143. Lei Z, Ren X, Wang S, Liang X, Tang Y. Immunocompromised and immunocompetent mouse models for head and neck squamous cell carcinoma. *OncoTargets Ther*. 2016 Jan 27;9:545–55.
144. Caulin C, Nguyen T, Longley MA, Zhou Z, Wang X-J, Roop DR. Inducible activation of oncogenic K-ras results in tumor formation in the oral cavity. *Cancer Res*. 2004 Aug 1;64(15):5054–8.
145. Vitale-Cross L, Amornphimoltham P, Fisher G, Molinolo AA, Gutkind JS. Conditional Expression of K-ras in an Epithelial Compartment that Includes the Stem Cells Is Sufficient to Promote Squamous Cell Carcinogenesis. *Cancer Res*. 2004 Dec 15;64(24):8804–7.
146. Moral M, Segrelles C, Lara MF, Martínez-Cruz AB, Lorz C, Santos M, et al. Akt activation synergizes with Trp53 loss in oral epithelium to produce a novel mouse model for head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2009 Feb 1;69(3):1099–108.
147. Kim S. Animal Models of Cancer in the Head and Neck Region. *Clin Exp Otorhinolaryngol*. 2009 Jun;2(2):55–60.
148. Lin CJ, Grandis JR, Carey TE, Gollin SM, Whiteside TL, Koch WM, et al. Head and neck squamous cell carcinoma cell lines: established models and rationale for selection. *Head Neck*. 2007 Feb;29(2):163–88.
149. Smith LP, Thomas GR. Animal models for the study of squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: a historical perspective with review of their utility and limitations. Part A. Chemically-induced de novo cancer, syngeneic animal models of HNSCC, animal models of transplanted xenogeneic human tumors. *Int J Cancer*. 2006 May 1;118(9):2111–22.
150. Braakhuis BJ, Sneeuwloper G, Snow GB. The potential of the nude mouse xenograft model for the study of head and neck cancer. *Arch Otorhinolaryngol*. 1984;239(1):69–79.
151. Sano D, Myers JN. Xenograft models of head and neck cancers. *Head Neck Oncol*. 2009 Aug 13;1:32.
152. Dinesman A, Haughey B, Gates GA, Aufdemorte T, Von Hoff DD. Development of a new in vivo model for head and neck cancer. *Otolaryngol--Head Neck Surg Off J Am Acad Otolaryngol-Head Neck Surg*. 1990 Nov;103(5 ( Pt 1)):766–74.
153. Brenner JC, Graham MP, Kumar B, Saunders LM, Kupfer R, Lyons RH, et al. Genotyping of 73 UM-SCC head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Head Neck*. 2010 Apr;32(4):417–26.
154. Zhao M, Sano D, Pickering CR, Jasser SA, Henderson YC, Clayman GL, et al. Assembly and initial characterization of a panel of 85 genomically validated cell lines from diverse head and neck tumor sites. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2011 Dec 1;17(23):7248–64.
155. Téllez-Gabriel M. Identificación de marcadores pronóstico en Carcinoma Escamoso de Cabeza y Cuello localmente avanzado: papel de RAB25 y SERPINA-1. [Barcelona]: Universitat Autònoma de Barcelona; 2012.
156. Hegyi G, Kardos J, Kovács M, Málnási-Csizmadia A, Nyitray L, Pál G, et al. Introduction to Practical Biochemistry [Internet]. Introduction to Practical Biochemistry. 2013. Available from: [http://ttkamop.elte.hu/online-tananyagok/introduction\\_to\\_practical\\_biochemistry/](http://ttkamop.elte.hu/online-tananyagok/introduction_to_practical_biochemistry/)
157. Dhanda J, Triantafyllou A, Liloglou T, Kalirai H, Lloyd B, Hanlon R, et al. SERPINE1 and SMA expression at the invasive front predict extracapsular spread and survival in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2014 Nov 25;111(11):2114–21.



158. Strojan P, Budihna M, Smid L, Vrhovec I, Skrk J. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) in tissue and serum of head and neck squamous cell carcinoma patients. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 1998 Jul;34(8):1193–7.
159. Sang Y, Chen M, Luo D, Zhang R-H, Wang L, Li M, et al. TEL2 suppresses metastasis by down-regulating SERPINE1 in nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget*. 2015 Aug 13;6(30):29240–53.
160. Huang C-F, Yu G-T, Wang W-M, Liu B, Sun Z-J. Prognostic and predictive values of SPP1, PAI and caveolin-1 in patients with oral squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(9):6032–9.
161. Strojan P, Budihna M, Smid L, Vrhovec I, Skrk J. Urokinase-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor type 1 and cathepsin D: analysis of their prognostic significance in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res*. 2000 Oct;20(5C):3975–81.
162. Rodrigo JP, Heideman DAM, García-Pedrero JM, Fresno MF, Brakenhoff RH, Díaz Molina JP, et al. Time trends in the prevalence of HPV in oropharyngeal squamous cell carcinomas in northern Spain (1990–2009). *Int J Cancer*. 2014 Jan 15;134(2):487–92.
163. Sakakibara T, Hibi K, Kodera Y, Ito K, Akiyama S, Nakao A. Plasminogen activator inhibitor-1 as a potential marker for the malignancy of esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2004 Feb 15;10(4):1375–8.
164. Kuhn W, Schmalfeldt B, Reuning U, Pache L, Berger U, Ulm K, et al. Prognostic significance of urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 for survival in advanced ovarian carcinoma stage FIGO IIIc. *Br J Cancer*. 1999 Apr;79(11–12):1746–51.
165. Nekarda H, Schmitt M, Ulm K, Wenninger A, Vogelsang H, Becker K, et al. Prognostic Impact of Urokinase-type Plasminogen Activator and Its Inhibitor PAI-1 in Completely Resected Gastric Cancer. *Cancer Res*. 1994 Jun 1;54(11):2900–7.
166. Duffy MJ, McGowan PM, Harbeck N, Thomssen C, Schmitt M. uPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies. *Breast Cancer Res BCR*. 2014 Aug 22;16(4):428.
167. Harbeck N, Kates RE, Look MP, Meijer-Van Gelder ME, Klijn JGM, Krüger A, et al. Enhanced benefit from adjuvant chemotherapy in breast cancer patients classified high-risk according to urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor type 1 (n = 3424). *Cancer Res*. 2002 Aug 15;62(16):4617–22.
168. Kang J, Kim W, Kwon T, Youn H, Kim JS, Youn B. Plasminogen activator inhibitor-1 enhances radioresistance and aggressiveness of non-small cell lung cancer cells. *Oncotarget*. 2016 Apr 26;7(17):23961–74.
169. Rømer MU, Larsen L, Offenberg H, Brünner N, Lademann UA. Plasminogen Activator Inhibitor 1 Protects Fibrosarcoma Cells from Etoposide-Induced Apoptosis through Activation of the PI3K/Akt Cell Survival Pathway. *Neoplasia N Y N*. 2008 Oct;10(10):1083–91.
170. Wolff C, Malinowsky K, Berg D, Schragner K, Schuster T, Walch A, et al. Signalling networks associated with urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1 in breast cancer tissues: new insights from protein microarray analysis. *J Pathol*. 2011 Jan;223(1):54–63.
171. Kortlever RM, Higgins PJ, Bernardis R. Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nat Cell Biol*. 2006 Aug;8(8):877–84.
172. Balsara RD, Castellino FJ, Ploplis VA. A novel function of plasminogen activator inhibitor-1 in modulation of the AKT pathway in wild-type and plasminogen activator inhibitor-1-deficient endothelial cells. *J Biol Chem*. 2006 Aug 11;281(32):22527–36.
173. Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*. 2008 Sep 18;27(41):5497–510.
174. Moral M, Paramio JM. Akt pathway as a target for therapeutic intervention in HNSCC. *Histol Histopathol*. 2008;23(10):1269–78.
175. Fabre-Guillevin E, Malo M, Cartier-Michaud A, Peinado H, Moreno-Bueno G, Vallée B, et al. PAI-1 and functional blockade of SNAI1 in breast cancer cell migration. *Breast Cancer Res BCR*. 2008;10(6):R100.

176. Fortenberry YM, Brandal SM, Carpentier G, Hemani M, Pathak AP. Intracellular Expression of PAI-1 Specific Aptamers Alters Breast Cancer Cell Migration, Invasion and Angiogenesis. *PLoS One*. 2016;11(10):e0164288.
177. Hogan NM, Joyce MR, Murphy JM, Barry FP, O'Brien T, Kerin MJ, et al. Impact of mesenchymal stem cell secreted PAI-1 on colon cancer cell migration and proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Jun 14;435(4):574–9.
178. Yu X-M, Jaskula-Sztul R, Georgen MR, Aburjania Z, Somnay YR, Leveson G, et al. Notch1 Signaling Regulates the Aggressiveness of Differentiated Thyroid Cancer and Inhibits SERPINE1 Expression. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2016 Jul 15;22(14):3582–92.
179. Stahl A, Mueller BM. Melanoma cell migration on vitronectin: regulation by components of the plasminogen activation system. *Int J Cancer*. 1997 Mar 28;71(1):116–22.
180. Akiyoshi S, Ishii M, Nemoto N, Kawabata M, Aburatani H, Miyazono K. Targets of transcriptional regulation by transforming growth factor-beta: expression profile analysis using oligonucleotide arrays. *Jpn J Cancer Res Gann*. 2001 Mar;92(3):257–68.
181. Zavadil J, Bitzer M, Liang D, Yang Y-C, Massimi A, Kneitz S, et al. Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor- $\beta$ . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jun 5;98(12):6686–91.
182. Freytag J, Wilkins-Port CE, Higgins CE, Higgins SP, Samarakoon R, Higgins PJ. PAI-1 Mediates the TGF- $\beta$ 1+EGF-Induced “Scatter” Response in Transformed Human Keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2010 Sep;130(9):2179–90.
183. Wilkins-Port CE, Ye Q, Mazurkiewicz JE, Higgins PJ. TGF- $\beta$ 1 + EGF-Initiated Invasive Potential in Transformed Human Keratinocytes Is Coupled to a Plasmin/MMP-10/MMP-1–Dependent Collagen Remodeling Axis: Role for PAI-1. *Cancer Res*. 2009 May 1;69(9):4081–91.
184. Kim D, Kim S, Koh H, Yoon SO, Chung AS, Cho KS, et al. Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2001 Sep;15(11):1953–62.
185. Okui G, Tobiume K, Rizqiawan A, Yamamoto K, Shigeishi H, Ono S, et al. AKT primes snail-induced EMT concomitantly with the collective migration of squamous cell carcinoma cells. *J Cell Biochem*. 2013 Sep;114(9):2039–49.
186. Cheng GZ, Chan J, Wang Q, Zhang W, Sun CD, Wang L-H. Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel. *Cancer Res*. 2007 Mar 1;67(5):1979–87.
187. Henderson V, Smith B, Burton LJ, Randle D, Morris M, Odero-Marah VA. Snail promotes cell migration through PI3K/AKT-dependent Rac1 activation as well as PI3K/AKT-independent pathways during prostate cancer progression. *Cell Adhes Migr*. 2015;9(4):255–64.
188. Hoek KS, Eichhoff OM, Schlegel NC, Döbbeling U, Kobert N, Schaerer L, et al. In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer Res*. 2008 Feb 1;68(3):650–6.
189. Webb DJ, Thomas KS, Gonias SL. Plasminogen activator inhibitor 1 functions as a urokinase response modifier at the level of cell signaling and thereby promotes MCF-7 cell growth. *J Cell Biol*. 2001 Feb 19;152(4):741–52.
190. Fedotov S, Iomin A. Migration and proliferation dichotomy in tumor-cell invasion. *Phys Rev Lett*. 2007 Mar 16;98(11):118101.
191. Shiwarski DJ, Shao C, Bill A, Kim J, Xiao D, Bertrand CA, et al. To “grow” or “go”: TMEM16A expression as a switch between tumor growth and metastasis in SCCHN. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2014 Sep 1;20(17):4673–88.
192. Gil-Henn H, Patsialou A, Wang Y, Warren MS, Condeelis JS, Koleske AJ. Arg/Abl2 promotes invasion and attenuates proliferation of breast cancer in vivo. *Oncogene*. 2013 May 23;32(21):2622–30.
193. Giese A, Bjerkvig R, Berens ME, Westphal M. Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2003 Apr 15;21(8):1624–36.

194. Mariani L, Beaudry C, McDonough WS, Hoelzinger DB, Demuth T, Ross KR, et al. Glioma cell motility is associated with reduced transcription of proapoptotic and proliferation genes: a cDNA microarray analysis. *J Neurooncol.* 2001 Jun;53(2):161–76.
195. Schultz C, Lemke N, Ge S, Golembieski WA, Rempel SA. Secreted protein acidic and rich in cysteine promotes glioma invasion and delays tumor growth in vivo. *Cancer Res.* 2002 Nov 1;62(21):6270–7.
196. Wang SD, Rath P, Lal B, Richard J-P, Li Y, Goodwin CR, et al. EphB2 receptor controls proliferation/migration dichotomy of glioblastoma by interacting with focal adhesion kinase. *Oncogene.* 2012 Dec 13;31(50):5132–43.
197. Fang H, Placencio VR, DeClerck YA. Protumorigenic Activity of Plasminogen Activator Inhibitor-1 Through an Antiapoptotic Function. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2012 Oct 3;104(19):1470–84.
198. Kwaan HC, Wang J, Svoboda K, Declerck PJ. Plasminogen activator inhibitor 1 may promote tumour growth through inhibition of apoptosis. *Br J Cancer.* 2000 May;82(10):1702–8.
199. Rømer MU, Kirkebjerg Due A, Knud Larsen J, Hofland KF, Christensen IJ, Buhl-Jensen P, et al. Indication of a role of plasminogen activator inhibitor type I in protecting murine fibrosarcoma cells against apoptosis. *Thromb Haemost.* 2005 Oct;94(4):859–66.
200. Zhang Y-P, Wang W-L, Liu J, Li W-B, Bai L-L, Yuan Y-D, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 promotes the proliferation and inhibits the apoptosis of pulmonary fibroblasts by Ca(2+) signaling. *Thromb Res.* 2013 Jan;131(1):64–71.
201. Zmijewski JW, Bae H-B, Deshane JS, Peterson CB, Chaplin DD, Abraham E. Inhibition of neutrophil apoptosis by PAI-1. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol.* 2011 Aug;301(2):L247–54.
202. Bajou K, Peng H, Laug WE, Maillard C, Noel A, Foidart JM, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 protects endothelial cells from FasL-mediated apoptosis. *Cancer Cell.* 2008 Oct 7;14(4):324–34.
203. Myers JN, Holsinger FC, Jasser SA, Bekele BN, Fidler IJ. An orthotopic nude mouse model of oral tongue squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2002 Jan;8(1):293–8.
204. Umeda M, Yokoo S, Komori T, Nishimatsu N, Shibuya Y, Fujioka M. Experimental model of invasion and metastasis by orthotopic transplantation of oral squamous and adenoid cystic carcinomas into the tongue of nude mice. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2001 Oct;39(5):376–80.
205. Masood R, Hochstim C, Cervenka B, Zu S, Baniwal SK, Patel V, et al. A novel orthotopic mouse model of head and neck cancer and lymph node metastasis. *Oncogenesis.* 2013 Sep 9;2(9):e68.
206. Goldie SJ, Mulder KW, Tan DW-M, Lyons SK, Sims AH, Watt FM. FRMD4A upregulation in human squamous cell carcinoma promotes tumor growth and metastasis and is associated with poor prognosis. *Cancer Res.* 2012 Jul 1;72(13):3424–36.
207. Patel V, Marsh CA, Dorsam RT, Mikelis CM, Masedunskas A, Amornphimoltham P, et al. Decreased lymphangiogenesis and lymph node metastasis by mTOR inhibition in head and neck cancer. *Cancer Res.* 2011 Nov 15;71(22):7103–12.
208. Jung HM, Phillips BL, Patel RS, Cohen DM, Jakymiw A, Kong WW, et al. Keratinization-associated miR-7 and miR-21 Regulate Tumor Suppressor Reversion-inducing Cysteine-rich Protein with Kazal Motifs (RECK) in Oral Cancer. *J Biol Chem.* 2012 Aug 24;287(35):29261–72.
209. Yang M-H, Lin B-R, Chang C-H, Chen S-T, Lin S-K, Kuo MY-P, et al. Connective tissue growth factor modulates oral squamous cell carcinoma invasion by activating a miR-504/FOXP1 signalling. *Oncogene.* 2012 May 10;31(19):2401–11.
210. Daneri-Navarro A, Macias-Lopez G, Ocegüera-Villanueva A, Del Toro-Arreola S, Bravo-Cuellar A, Perez-Montfort R, et al. Urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitors (PAI-1 and PAI-2) in extracts of invasive cervical carcinoma and precursor lesions. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990.* 1998 Mar;34(4):566–9.
211. De Smedt L, Palmans S, Andel D, Govaere O, Boeckx B, Smeets D, et al. Expression profiling of budding cells in colorectal cancer reveals an EMT-like phenotype and molecular subtype switching. *Br J Cancer.* 2017 Jan 3;116(1):58–65.
212. Liu G, Shuman MA, Cohen RL. Co-expression of urokinase, urokinase receptor and PAI-1 is necessary for optimum invasiveness of cultured lung cancer cells. *Int J Cancer.* 1995 Feb 8;60(4):501–6.

213. Brooks TD, Slomp J, Quax PH, De Bart AC, Spencer MT, Verheijen JH, et al. Antibodies to PAI-1 alter the invasive and migratory properties of human tumour cells in vitro. *Clin Exp Metastasis*. 2000;18(6):445–53.
214. Maillard C, Jost M, Rømer MU, Brunner N, Houard X, Lejeune A, et al. Host plasminogen activator inhibitor-1 promotes human skin carcinoma progression in a stage-dependent manner. *Neoplasia N Y N*. 2005 Jan;7(1):57–66.
215. Bajou K, Noël A, Gerard RD, Masson V, Brunner N, Holst-Hansen C, et al. Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat Med*. 1998 Aug;4(8):923–8.
216. Bajou K, Maillard C, Jost M, Lijnen RH, Gils A, Declerck P, et al. Host-derived plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) concentration is critical for in vivo tumoral angiogenesis and growth. *Oncogene*. 2004 Sep 9;23(41):6986–90.
217. Gao S, Nielsen BS, Krogdahl A, Sørensen JA, Tagesen J, Dabelsteen S, et al. Epigenetic alterations of the SERPINE1 gene in oral squamous cell carcinomas and normal oral mucosa. *Genes Chromosomes Cancer*. 2010 Jun;49(6):526–38.
218. Illemann M, Hansen U, Nielsen HJ, Andreasen PA, Høyer-Hansen G, Lund LR, et al. Leading-edge myofibroblasts in human colon cancer express plasminogen activator inhibitor-1. *Am J Clin Pathol*. 2004 Aug;122(2):256–65.
219. Usher PA, Thomsen OF, Iversen P, Johnsen M, Brünner N, Høyer-Hansen G, et al. Expression of urokinase plasminogen activator, its receptor and type-1 inhibitor in malignant and benign prostate tissue. *Int J Cancer*. 2005 Mar 1;113(6):870–80.
220. Offersen BV, Nielsen BS, Høyer-Hansen G, Rank F, Hamilton-Dutoit S, Overgaard J, et al. The Myofibroblast Is the Predominant Plasminogen Activator Inhibitor-1-Expressing Cell Type in Human Breast Carcinomas. *Am J Pathol*. 2003 Nov;163(5):1887–99.
221. Attramadal CG, Kumar S, Boysen ME, Dhakal HP, Nesland JM, Bryne M. Tumor Budding, EMT and Cancer Stem Cells in T1-2/N0 Oral Squamous Cell Carcinomas. *Anticancer Res*. 2015 Nov;35(11):6111–20.
222. Wang C, Huang H, Huang Z, Wang A, Chen X, Huang L, et al. Tumor budding correlates with poor prognosis and epithelial-mesenchymal transition in tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol*. 2011 Aug;40(7):545–51.
223. Vered M, Dobriyan A, Dayan D, Yahalom R, Talmi YP, Bedrin L, et al. Tumor-host histopathologic variables, stromal myofibroblasts and risk score, are significantly associated with recurrent disease in tongue cancer. *Cancer Sci*. 2010 Jan;101(1):274–80.
224. Gutierrez LS, Schulman A, Brito-Robinson T, Noria F, Ploplis VA, Castellino FJ. Tumor development is retarded in mice lacking the gene for urokinase-type plasminogen activator or its inhibitor, plasminogen activator inhibitor-1. *Cancer Res*. 2000 Oct 15;60(20):5839–47.
225. Koontongkaew S. The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. *J Cancer*. 2013;4(1):66–83.
226. Markwell SM, Weed SA. Tumor and Stromal-Based Contributions to Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Invasion. *Cancers*. 2015 Feb 27;7(1):382–406.
227. Curry JM, Sprandio J, Cognetti D, Luginbuhl A, Bar-ad V, Pribitkin E, et al. Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma. *Semin Oncol*. 2014 Apr;41(2):217–34.
228. Castells M, Thibault B, Delord J-P, Couderc B. Implication of Tumor Microenvironment in Chemoresistance: Tumor-Associated Stromal Cells Protect Tumor Cells from Cell Death. *Int J Mol Sci*. 2012 Jul 30;13(8):9545–71.
229. Ayala GE, Dai H, Tahir SA, Li R, Timme T, Ittmann M, et al. Stromal antiapoptotic paracrine loop in perineural invasion of prostatic carcinoma. *Cancer Res*. 2006 May 15;66(10):5159–64.
230. Roepman P, Wessels LFA, Kettelarij N, Kemmeren P, Miles AJ, Lijnzaad P, et al. An expression profile for diagnosis of lymph node metastases from primary head and neck squamous cell carcinomas. *Nat Genet*. 2005 Feb;37(2):182–6.

231. Liu C-J, Liu T-Y, Kuo L-T, Cheng H-W, Chu T-H, Chang K-W, et al. Differential gene expression signature between primary and metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *J Pathol*. 2008 Mar;214(4):489–97.
232. Luo W-R, Gao F, Li S-Y, Yao K-T. Tumour budding and the expression of cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1 in nasopharyngeal carcinoma. *Histopathology*. 2012 Dec;61(6):1072–81.
233. Xie N, Wang C, Liu X, Li R, Hou J, Chen X, et al. Tumor budding correlates with occult cervical lymph node metastasis and poor prognosis in clinical early-stage tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol*. 2015 Apr;44(4):266–72.
234. Bugge TH, Lund LR, Kombrinck KK, Nielsen BS, Holmbäck K, Drew AF, et al. Reduced metastasis of Polyoma virus middle T antigen-induced mammary cancer in plasminogen-deficient mice. *Oncogene*. 1998 Jun 18;16(24):3097–104.
235. Maillard CM, Bouquet C, Petitjean MM, Mestdagt M, Frau E, Jost M, et al. Reduction of brain metastases in plasminogen activator inhibitor-1-deficient mice with transgenic ocular tumors. *Carcinogenesis*. 2008 Nov;29(11):2236–42.
236. Ma D, Gerard RD, Li XY, Alizadeh H, Niederkorn JY. Inhibition of metastasis of intraocular melanomas by adenovirus-mediated gene transfer of plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) in an athymic mouse model. *Blood*. 1997 Oct 1;90(7):2738–46.
237. Soff GA, Sanderowitz J, Gately S, Verrusio E, Weiss I, Brem S, et al. Expression of plasminogen activator inhibitor type 1 by human prostate carcinoma cells inhibits primary tumor growth, tumor-associated angiogenesis, and metastasis to lung and liver in an athymic mouse model. *J Clin Invest*. 1995 Dec;96(6):2593–600.
238. Sarioglu S, Acara C, Akman FC, Dag N, Ecevit C, Ikiz AO, et al. Tumor budding as a prognostic marker in laryngeal carcinoma. *Pathol Res Pract*. 2010 Feb 15;206(2):88–92.

## *VIII. ANEXOS*

**ANEXO 1:** Protocolo de supervisión, corrección y criterios de punto y final

**ANEXO 1.1:** Parámetros de evaluación de tumores subcutáneos

**ANEXO 1.2:** Parámetros de evaluación tumores localizados en la submucosa lingual

**ANEXO 2:** Trabajos publicados durante esta tesis doctoral

**ANEXO 3:** Resumen de la tesis doctoral

## ANEXO 1: Protocolo de supervisión, corrección y criterios de punto y final

Para el seguimiento y la supervisión de los ratones durante la realización de los experimentos *in vivo*, se utilizaron las plantillas incluidas en **Anexo 1.1** y **Anexo 1.2**. Si alguno de los parámetros establecidos en el protocolo de supervisión adjunto obtuvo una puntuación de más de 1 se incrementó la frecuencia de supervisión. Cuando se detectó mucho sufrimiento en el animal, no comía o presentaba cualquier parámetro cualitativo, como es el caso de las automutilaciones, que superara los criterios de bienestar que el resto de animales del grupo tenían, se eutanasió al ratón, aunque no alcanzara la puntuación máxima establecida en el procedimiento de supervisión.

Se adoptó como criterio de punto y final a nivel individual la aparición de indicios de sufrimiento en el animal utilizando los criterios de puntuación incluidos en el protocolo de supervisión adjunto. Si la puntuación era de 3 o inferior se aumentó la frecuencia de supervisión, si la puntuación era entre 4-5 se valoró el tratamiento analgésico. En el caso de que la puntuación alcanzara 6 o más de 6 o si cualquiera de los parámetros establecidos obtuvo una puntuación de 3, se sacrificó al animal independientemente de la puntuación global.

### ANEXO 1.1: Parámetros de evaluación de tumores subcutáneos

1. Observación animal.							
LESIONES EXTERNAS/VOCALIZACIÓN		ASPECTO GENERAL			VOL. TUMOR		
SÍ	NO	Secreciones		Postura Anormal	<5% peso	5% peso	>5 % peso
		oculares	nasales				
3	0	0/1	0/1	0/1	1	2	3
2. Conducta en respuesta a estímulos y peso del animal.							
AGRESIVIDAD		PASIVIDAD		PÉRDIDA PESO			
SÍ	NO	SÍ	NO	NORMAL	<10 %	10%-20%	> 20%
3	0	3	0	0	1	2	3
<b>Puntuación global:</b> 0-24				<b>Criterios del procedimiento:</b>			
<b>Puntuación:</b>				0-3 Normalidad aumentar frecuencia supervisión			
Lesiones externas/Vocalización: 0-3				4-5 Valorar tratamiento analgésico			
Vol. Tumor 0-3				>6 Retirada del animal y eutanasia			
Aspecto general: 0-3				- La supervisión se realizará diariamente.			
Secr. Ocular: 0-1				- Si alguno de los parámetros obtiene una puntuación de más de 1 se incrementará la frecuencia de supervisión.			
Secr. Nasal: 0-1				- Si cualquiera de los parámetros establecidos obtiene una puntuación de 3 se sacrificará el animal independientemente de la puntuación global			
Postura anormal: 0-1							
Agresividad: 0-3							
Pasividad: 0-3							
Pérdida de peso: 0-3							









## ANEXO 2: Trabajos publicados durante esta tesis doctoral

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral con muestras de pacientes y a partir de los ensayos funcionales *in vitro* han sido publicados en el siguiente artículo:

- Pavón MA\*, **Arroyo-Solera I\***, Tellez-Gabriel M, León X, Virós D, López M, Gallardo A, Céspedes MA, Casanova I, López A, Manges MA, Quer M, Barnadas A, Manges R. Enhanced cell migration and apoptosis resistance may underlie the association between high SERPINE1 expression and poor outcome in head and neck carcinoma patients. *Oncotarget*. 6 - 30, pp. 29016 - 29049. 06/10/2015. ISSN 1949-2553. \*Estos autores contribuyeron de manera equivalente en la realización de este manuscrito.

Durante este periodo también han sido publicados otros artículos:

- Tellez-Gabriel M, **Arroyo-Solera I**, León X, Gallardo A, López M, Céspedes MV, Casanova I, López-Pousa A, Quer M, Manges MA, Barnadas A, Manges R, Pavón MA. High RAB25 expression is associated with good clinical outcome in patients with locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Medicine*. 2013; 2 (6):950-63. A.
- Pavón MA, Parreño M, Tellez-Gabriel M, León X, **Arroyo-Solera I**, López M, Céspedes MV, Casanova I, Gallardo A, Lopez A, Manges MA, Quer M, Barnadas A, Manges R. CKMT1 and NCOA1 expression as a predictor of clinical outcome in patients with advanced-stage head and neck squamous cell carcinoma. *Head & neck*. 2016; 38 Suppl 1, pp. E1392. 04/2016. ISSN 1097-0347.
- Pavón MA, **Arroyo-Solera I**, Céspedes MV, Casanova I, León X, Manges R. uPA/uPAR and SERPINE1 in head and neck cancer: role in tumor resistance, metastasis, prognosis and therapy. *Oncotarget*. 30/06/2016

### ANEXO 3: Resumen de la tesis doctoral

#### **TÍTULO: Estudio del valor pronóstico de SERPINA E1 y su papel en el crecimiento y la diseminación metastática del carcinoma escamoso de cabeza y cuello**

#### **INTRODUCCIÓN:**

El carcinoma de cabeza y cuello engloba aquellos que se originan en el tracto aerodigestivo superior, siendo el de tipo escamoso el más frecuente con una prevalencia del 95% (1). El cáncer escamoso de cabeza y cuello (CECC) se origina a partir de células epiteliales que recubren diferentes zonas como son la cavidad oral, la faringe, la laringe y los senos paranasales (2). Constituye el sexto cáncer con mayor incidencia a nivel mundial y los principales factores etiológicos asociados a la enfermedad son el consumo de alcohol y tabaco. En los últimos años, la infección por el virus del papiloma humano (VPH) se ha considerado también como un importante agente causal de la enfermedad y se ha observado un aumento de la prevalencia de la fracción de tumores asociados a esta infección. El uso en clínica de nuevas estrategias de tratamiento que combinan cirugía, radiación y quimioterapia, ha mejorado la preservación de órgano y la calidad de vida de los pacientes (3). A pesar de esto, la supervivencia a los 5 años de los pacientes no ha cambiado desde hace 20 años debido a que los pacientes acaban sufriendo recidivas loco-regionales y desarrollan metástasis o tumores secundarios (1). El uso de variables clinicopatológicas es insuficiente para predecir la evolución clínica del paciente o para identificar subgrupos de pacientes que podrían beneficiarse de modalidades concretas de tratamiento, evitando los efectos secundarios asociados a los tratamientos más agresivos. En este contexto, la identificación, validación y establecimiento de nuevos biomarcadores pronóstico independientes con capacidad de predecir la respuesta al tratamiento de los pacientes, permitiría clasificar este grupo heterogéneo de tumores y mejorar la elección de tratamiento.

En un estudio previo de microarrays basado en la expresión génica y realizado en nuestro laboratorio con muestras pre-tratamiento de pacientes con CECC, se identificaron 3 subtipos de tumores pertenecientes a pacientes con diferente evolución clínica. SERPINA E1 constituía uno de los genes que se encontraba sobre-expresado en el subgrupo de tumores pertenecientes a los pacientes de peor evolución clínica (menor supervivencia global, menor supervivencia libre de progresión y menor supervivencia libre de recidiva local) (4).

#### **OBJETIVOS:**

5. Establecimiento y validación de SERPINA E1 como marcador pronóstico en pacientes con carcinoma escamoso de cabeza y cuello
6. Papel de SERPINA E1 en la proliferación, la migración y la citotoxicidad producida por cisplatino en líneas celulares de carcinoma escamoso de cabeza y cuello manipuladas genéticamente.

7. Establecimiento de un modelo murino ortotópico y metastático de carcinoma escamoso de cabeza y cuello que represente dicha patología en humanos.
8. Estudio *in vivo* del crecimiento tumoral y la diseminación metastática de líneas de CECC con diferente nivel de expresión de SERPINA E1.

## RESULTADOS:

### SERPINA E1 como marcador pronóstico en pacientes con CECC

Con el objetivo de establecer y validar el uso de SERPINA E1 como marcador asociado a la supervivencia de los pacientes con CECC, hemos analizado su expresión en biopsias pre-tratamiento obtenidas de pacientes pertenecientes a tres cohortes independientes. Una primera cohorte seleccionada de modo retrospectivo, en la que se analizaron la expresión de SERPINA E1 mediante técnicas inmunohistoquímicas; una segunda cohorte de pacientes seleccionada de modo prospectivo, en la que se analizaron los niveles de RNA mensajero de SERPINA E1 mediante PCR cuantitativa; y finalmente una tercera cohorte de pacientes incluidos en el proyecto *The Cancer Genome Atlas* (TCGA, <https://cancergenome.nih.gov/>), donde se analizaron los niveles de expresión de SERPINA E1 obtenidos mediante técnicas de secuenciación masiva de RNA.

En el estudio retrospectivo, se determinaron los niveles de expresión proteica de SERPINA en 80 biopsias tumorales parafinadas pertenecientes a pacientes con CECC localmente avanzado antes de que iniciasen el tratamiento y con un seguimiento medio de 68 meses. El porcentaje de células positivas en las preparaciones de inmunohistoquímica de SERPINA E1 fue muy similar en todas las muestras, entre el 80% y el 95% de células teñidas, mientras que la intensidad de tinción permitió clasificar los tumores en 3 subgrupos (Intensidad baja=26 biopsias; Intensidad intermedia= 25 biopsias; Intensidad elevada= 29 biopsias). Cuando se analizó si existía una correlación entre el nivel de expresión de SERPINA E1 y determinadas variables clinicopatológicas (sexo, edad, tamaño del tumor, localización del tumor, afectación ganglionar, grado de diferenciación del tumor, nivel de consumo de tabaco, grado de ingesta de alcohol, recidiva local y recidiva metastática), se observó una mayor proporción pacientes con niveles elevados de SERPINA E1 que sufrieron recidiva metastática una vez finalizado el tratamiento ( $p=0.045$ ). Ninguna otra variable correlacionó con el nivel de SERPINA E1. Además, los pacientes cuyos tumores presentaron niveles proteicos altos de SERPINA E1 tuvieron una supervivencia libre de progresión (SLP) ( $p=0.022$ ) y una supervivencia específica de cáncer (SEC) ( $p=0.040$ ) más corta que el grupo de pacientes con tumores cuya expresión proteica de SERPINA E1 fue intermedia o baja. Se observó una tendencia en el grupo de pacientes con niveles de expresión de SERPINA E1 intermedia y baja a presentar una mayor supervivencia libre de recidiva local (SLRL) que el grupo de expresión alta, pero las diferencias no alcanzaron la significancia ( $p=0.108$ ).

En el estudio prospectivo, se analizaron los niveles de expresión de RNA mensajero de SERPINA E1 en 190 biopsias tumorales pertenecientes a otra serie independiente de pacientes con CECC, con un seguimiento medio de 37 meses. También se analizaron los niveles de expresión en 24 muestras de mucosa normal obtenidas de pacientes con CECC a partir de áreas alejadas del tumor primario y sin lesiones macroscópicas visibles. La expresión de SERPINA E1 fue significativamente más elevada en muestras de tejido tumoral que en la mucosa normal ( $p < 0.001$ ). Mediante el uso de árboles de clasificación y regresión (CART), se estableció un valor umbral para separar dos grupos de pacientes en base al nivel de expresión de RNAm de SERPINA E1 en el tumor primario y la probabilidad de recidiva en estos pacientes (nivel de expresión de SERPINA E1  $< 0$  o  $> 0.8$ ). Setenta y seis pacientes presentaron tumores con una expresión baja de SERPINA E1 mientras que 114 pacientes presentaron tumores con una expresión elevada. Como en el estudio retrospectivo, se analizó si existía una correlación entre el nivel de SERPINA E1 y las variables clinicopatológicas incluidas. La tasa de recidiva metastásica así como la de recidiva local, fueron significativamente mayores en el grupo de pacientes con niveles elevados de expresión de RNAm de SERPINA E1 ( $p = 0.029$  y  $p = 0.028$ , respectivamente). El nivel de expresión de SERPINA E1 también se asoció significativamente con consumo de alcohol en estos pacientes, siendo superior en los pacientes con un historial de consumo de alcohol en comparación con los pacientes no bebedores ( $p = 0.037$ ). Los pacientes con niveles elevados de RNAm de SERPINA E1 mostraron una SLRL ( $p = 0.022$ ), una SLP ( $p = 0.002$ ) y una SEC (SEC) ( $p = 0.006$ ) más cortas que los pacientes del subgrupo con niveles bajos. Para estudiar la posible asociación de otras variables clínicas con la supervivencia, además de los niveles de expresión de SERPINA E1, se realizó un análisis multivariado basado en el modelo de Cox. La expresión de SERPINA E1 (HR 1.73, IC 95% 1.02-2.92,  $p = 0.042$ ), el tamaño del tumor (HR 2.18, IC 95% 1.29-3.70,  $p = 0.004$ ), y la afectación ganglionar (HR 1.88, IC 95% 1.13-3.16,  $p = 0.016$ ) se identificaron como factores de riesgo independientes en relación con la SLP, de manera que los pacientes con tumor primario de gran tamaño, mayor afectación ganglionar o mayores niveles de expresión RNAm de SERPINA E1 presentaron una SLP más corta. Además, el tamaño del tumor (HR 1.78, IC 95% 0.99-3.18,  $p = 0.050$ ) y la afectación ganglionar (HR 2.23, IC 95% 1.22-4.07,  $p = 0.009$ ) se identificaron como factores de riesgo independientes de la SEC de los pacientes. Aunque se observó una tendencia en relación con niveles altos de expresión de RNAm de SERPINA E1 y una supervivencia más corta, el resultado no alcanzó la significancia en el análisis multivariado (HR 1.78, IC 95% 0.98-3.23,  $p = 0.057$ ). Cuando se realizó el mismo análisis pero excluyendo los pacientes que habían estado sometidos a cirugía, el tamaño del tumor (HR 2.39, IC 95% 1.29-4.39,  $p = 0.005$ ) y el nivel de RNAm de SERPINA E1 (HR 1.92, IC 95% 1.03-3.59,  $p = 0.043$ ) se identificaron como factores de riesgo independiente en relación con la SLP, y sólo la afectación ganglionar apareció como factor de riesgo independiente de la SEC (HR 2.41, IC 95% 1.15-5.06,  $p = 0.020$ ) en los pacientes tratados con quimio-radioterapia como principal opción de tratamiento.

En el tercer estudio se utilizaron los datos de secuenciación de RNA obtenidos de 507 muestras de tumor primario de pacientes con CECC presentes en el repositorio *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). También se obtuvo la información correspondiente a la secuenciación de RNA de 44 muestras de mucosa normal. La expresión de SERPINA E1 fue significativamente más elevada en muestras de CECC que en muestras de mucosa normal ( $p < 0.001$ ). El análisis de la supervivencia global en los pacientes con CECC mostró que los pacientes con tumores que expresaban niveles elevados de RNA de SERPINA E1, tenían una supervivencia más corta que los que presentaban niveles bajos de SERPINA E1 a nivel tumoral ( $p < 0.001$ ). Además, la SERPINA E1 apareció como factor pronóstico de la supervivencia global de los pacientes (HR: 2.03, IC 95%:1.32-3.10,  $p = 0.010$ ) así como también la presencia o no de afectación ganglionar (HR: 1.62, IC 95%:1.11-2.35,  $p = 0.012$ ) cuando se analizó a través de un modelo de Cox univariado. En el análisis del modelo de Cox multivariado, se identificaron como factores de riesgo independientes de muerte, el nivel de expresión de SERPINA E1 (HR: 1.73, IC 95%: 1.05-2.79,  $p = 0.027$ ) y la presencia o no de afectación ganglionar (HR: 1.58, IC 95%: 1.09-2.31,  $p = 0.017$ ). Otras variables clínicas como el sexo, el tamaño del tumor y la edad no se asociaron significativamente con la supervivencia de los pacientes.

#### SERPINA E1 en la proliferación, migración y citotoxicidad de líneas celulares de CECC

Tras haber analizado en muestras de pacientes con CECC el nivel de SERPINA E1 y encontrar una asociación con la evolución clínica de los pacientes (a mayor nivel de SERPINA E1, menos supervivencia específica de cáncer, menor supervivencia libre de progresión y mayor riesgo de recidiva local y metastática), nuestro siguiente objetivo era determinar si SERPINA E1 estaba implicada causalmente en conferir mayor agresividad a las células tumorales de CECC, así como el posible mecanismo mediante el cual llevaría a cabo dicha función. Para ello, tras sobre-expresar o infra-expresar SERPINA E1 en líneas celulares de CECC, se realizaron diferentes ensayos funcionales *in vitro*. Además, se analizó el estado de activación de la vía PI3K/Akt en las líneas celulares con diferente nivel de expresión de SERPINA E1, así como su implicación en los diferentes ensayos funcionales.

El nivel de expresión de RNAm de SERPINA E1 fue similar en todas las líneas celulares de CECC analizadas, excepto la línea SCC-9 que presentó un nivel 15 veces superior de expresión que el resto de líneas. Debido a este motivo se seleccionó para ser transducida con un shRNA contra SERPINA E1. Los ensayos funcionales realizados con la línea parental en paralelo con las líneas donde se infra-expresó SERPINA E1 mostraron que el bloqueo de la expresión de SERPINA E1 aumentó la proliferación, disminuyó la migración y disminuyó la resistencia de las células a la apoptosis inducida por cisplatino. Por otro lado, la línea UM-SCC-74B, con un nivel similar al resto de líneas de CECC e inferior a la SCC-9, se transdujo con un vector que expresaba SERPINA E1 (74BserpE1up). Los ensayos funcionales con la línea que sobre-expresaba SERPINA E1 y con la línea parental mostraron que el aumento en la

expresión de SERPINA E1 disminuyó la proliferación, aumentó la migración y aumentó la resistencia de las células a la apoptosis inducida por cisplatino.

Además, se determinó el estado de activación la vía PI3K/Akt analizando el nivel de Akt fosforilado (p-Akt) en las líneas celulares parentales y las correspondientes líneas donde se había modificado el nivel de expresión de SERPINA E1. La línea en la que se sobre-expresó SERPINA E1, presentó mayor p-Akt en comparación con su línea parental, mientras que la línea donde se infra-expresó SERPINA E1 mostró un nivel más bajo de Akt activado que su línea parental. Cuando la línea que sobre-expresaba SERPINA E1 se trató con inhibidor funcional de SERPINA E1 (PAI-039), disminuyó el nivel de Akt activado en comparación con la misma línea sin tratar. Por último, el tratamiento de las células 74BserpE1up con un inhibidor de la activación de Akt (MK2206), redujo la migración de las células y aumentó el número de células apoptóticas tras el tratamiento con cisplatino, en relación a la misma línea sin tratar.

#### Desarrollo de un modelo murino ortotópico y metastático de CECC

Se generaron 6 líneas de CECC (SCC-9, SCC-25, UM-SCC-22A, UM-SCC-22B, UM-SCC-74B y 74BserpE1up) con actividad luciferasa mediante transducción lentiviral (pSIN-DUAL-GFP1-Luciferase) para realizar el seguimiento *in vivo* de las células tumorales en los ratones de una manera no invasiva. Las líneas UM-SCC-74B, 74BserpE1up, UM-SCC-22A y UM-SCC-22B generaron tumores subcutáneos en ratones inmunodeprimidos Swiss nude mientras que las líneas SCC-9 y SCC-25 no presentaron capacidad tumorigénica a nivel subcutáneo. El análisis histológico mostró que los tumores generados por las líneas UM-SCC-22A y UM-SCC-22B generaban tumores escamosos diferenciados queratinizantes mientras que las líneas UM-SCC-74B y 74BserpE1up generaban tumores escamosos moderadamente diferenciados no queratinizantes.

En el primer experimento ortotópico se inyectaron  $1 \times 10^6$  células en la lengua de 3 ratones de la cepa Swiss nude por cada una de las 6 líneas de CECC estudiadas. A los 8 días desde la implantación de las células tumorales, se realizó una resección quirúrgica de la mayor parte del tumor primario generado en la lengua de los ratones implantados con las líneas UM-SCC-22A, UM-SCC-22B, UM-SCC-74B y 74BserpE1up. El tipo de crecimiento y el patrón de diseminación fueron diferentes en cada línea celular. La línea SCC-9 no generó tumor primario. Las líneas UM-SCC-22A y UM-SCC-22B generaron tumor primario y metastatizaron localmente a ganglios cervicales, mientras que las líneas UM-SCC-74B y 74BserpE1up metastatizaron a distancia en pulmón. Y por último, la línea SCC-25 generó tumor primario pero no metastatizó. Para aumentar el número y el tamaño de los focos metastáticos y así mejorar el modelo ortotópico de CECC, en un segundo experimento se empleó una cepa más inmunodeprimida de ratón, la cepa NOD/SCID, y se descartaron las líneas que no metastatizaron en el experimento anterior. La línea UM-SCC-22A generó metastásis ganglionar en el 100% de los ratones,



la línea UM-SCC-74B generó metástasis ganglionar en el 21% de los ratones implantados y la línea 74BserpE1up en el 55% de los ratones.

#### Estudio *in vivo* del papel de SERPINA E1 a través de un modelo ortotópico de CECC

Se realizó un experimento *in vivo* con ratones NSG utilizando las líneas UM-SCC-74B y 74BserpE1up para comparar el tipo de crecimiento, la capacidad de invasión y de generar metástasis por parte de las células de CECC con diferente nivel de expresión de SERPINA E1. Los ratones implantados con las dos líneas celulares se trataron de la misma manera, el mismo número de células inyectadas en la lengua, mismo tiempo y tipo de resección y el mismo tiempo de sacrificio. A todos los ratones se les realizó una resección quirúrgica de todo el tumor primario generado en la lengua a los 6 o 7 días desde la implantación de las células tumorales y se sacrificaron a los 32 o 33 días.

El análisis histológico del tumor primario mostró que las células de la línea 74BserpE1up presentaron menor porcentaje de células apoptóticas ( $p=0.001$ ), un mayor porcentaje de estroma ( $p=0.02$ ) y patrón de invasión más infiltrativo ( $p<0.000$ ) que las células en los tumores generados por la línea UM-SCC-74B. A nivel de metástasis ganglionar, se encontraron diferencias significativas en el incremento relativo de luminiscencia debido al crecimiento de los ganglios infiltrados entre el grupo de ratones implantados con la línea que sobre-expresa SERPINA E1 con respecto al grupo de la línea parental a los 18, 25, 28 y 33 días desde el momento de la implantación de las células tumorales ( $p=0.034$ , 0.025, 0.026, 0.005, respectivamente). Además, el número de ratones con metástasis ganglionar fue superior en el grupo de ratones implantado con la línea 74BserpE1up en comparación con el grupo de la línea parental ( $p=0.009$ ). No se encontraron diferencias significativas en cuanto al tamaño de los ganglios infiltrados por cada línea celular. Por último, en relación con las metástasis en pulmón, la sobre-expresión de SERPINA E1 estimuló la dispersión de las células tumorales durante la colonización del pulmón ( $p=0.034$ ) y la generación de focos de mayor tamaño ( $p=0.01$ ). En el caso de la metástasis hepática, el 29% de los ratones implantados con la línea 74BserpE1up presentaron metástasis mientras que ningún ratón implantado con la línea UM-SCC-74B presentó metástasis hepática, aunque las diferencias no alcanzaron la significancia ( $p=0.114$ ).

## **DISCUSIÓN:**

A partir de los estudios con muestras de pacientes, en este trabajo hemos establecido y validado el uso de SERPINA E1 como factor pronóstico independiente. En estudios previos al nuestro pertenecientes a otros grupos con muestras de pacientes con CECC, el nivel de SERPINA E1 se identificó como factor pronóstico de la supervivencia en pacientes pero no de manera independiente a otras variables clínico-patológicas, ya que aplicaron un modelo de regresión univariado, así como tampoco con el suficiente poder estadístico, debido a sus reducidos tamaños muestrales ( $n=46$ ,  $n=26$  y  $n=55$ ) (5–7). Además, nuestros resultados muestran que el nivel de SERPINA E1 se asocia con la respuesta de los pacientes con CECC al tratamiento, de manera que los pacientes con mayores niveles de SERPINA

E1 presentaron más riesgo de desarrollar recidivas locales y metastáticas, así como una SLP y una SLRL más cortas que los pacientes con niveles bajos, una vez iniciado el tratamiento. Otros estudios muestran resultados que van a favor de los obtenidos en este trabajo en cuanto a la relación de SERPINA E1 con el riesgo de recidiva de los pacientes con CECC tras el tratamiento (quimioterapia de inducción seguida de radioterapia, radioterapia, o cirugía). En todos ellos, los pacientes con elevados niveles de SERPINA E1 presentaron mayor riesgo de reaparición del tumor tras el tratamiento, pero a diferencia de nuestro trabajo, no distinguen entre recidiva local y recidiva metastática, y además su tamaño muestral (n=46, n=79 y n=55) fue más reducido que el tamaño de cualquiera de nuestros dos estudios (n=80 y n=190)(5,7,8).

Por otro lado, el uso de un modelo murino ortotópico nos ha permitido estudiar la implicación de SERPINA E1 en el tipo de crecimiento, la invasividad y la capacidad de diseminación de las células tumorales. Al analizar el tumor primario de ratones implantados con una línea que sobre-expresaba SERPINA E1 y de su línea parental, observamos que SERPINA E1 aumentó la capacidad de las células de CECC para generar tumores primarios más invasivos y con mayor proporción de estroma, dos características que se asocian con mayor agresividad tumoral (9–11). Además, detectamos un menor número de células apoptóticas en los tumores generados por la línea que sobre-expresaba SERPINA E1. Estos resultados son consistentes con el hecho de que una mayor proporción de ratones implantados con la línea que sobre-expresaba SERPINA E1 presentaran afectación ganglionar y además, que la tasa de crecimiento de las metástasis ganglionares, medido por emisión de luminiscencia, fuera mayor cuando se comparó con la del grupo implantado con la línea parental. A nivel de metástasis a distancia, las células con sobre-expresión de SERPINA E1 presentaron mayor capacidad de dispersión en el pulmón (mayor número de niveles positivos con focos tumorales en el tejido pulmonar analizado) y generaron focos de mayor tamaño cuando se analizaron a tiempo final, en comparación con los ratones implantados con la línea parental.

Nuestros resultados obtenidos *in vitro* muestran que SERPINA E1 disminuye la apoptosis inducida por cisplatino y estimula la migración en células de CECC mediante la activación de la vía PI3K/Akt. A su vez, SERPINA E1 disminuye la proliferación de las células, debido posiblemente a la incompatibilidad de que una célula se divida mientras está migrando (reorganización diferencial del citoesqueleto). Diferentes estudios *in vitro* con otros tipos de células tumorales muestran una relación causal entre SERPINA E1 y mayor migración de las células tumorales (12–16). Por otro lado, otros estudios encontraron que la vía PI3K/Akt se activaba cuando las células tumorales adquirían un fenotipo mesenquimal con mayor capacidad de migración (17–19). Debido a que SERPINA E1 es uno de los principales mediadores de la transición epitelio-mesénquima inducida por TGF- $\beta$  (20), siendo un marcador asociado a fenotipo mesenquimal, proponemos que el aumento del nivel de SERPINA E1 en

células tumorales cuando adquieren un fenotipo más mesenquimal, estimularía una mayor capacidad de migración en las células a través de la activación de Akt .

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los estudios realizados con muestras de pacientes con CECC donde analizamos el nivel de SERPINA E1 en muestras de tumor primario y lo relacionamos con su evolución clínica, encontramos que un mayor nivel de SERPINA E1 se asociaba con una menor supervivencia específica de cáncer. En el mismo sentido, la sobre-expresión de SERPINA E1 aumentó la capacidad invasiva de las células tumorales a nivel de tumor primario en el modelo *in vivo* y favoreció su diseminación a ganglios cervicales, a pulmón y a hígado. Nuestros resultados *in vitro* con células de CECC indican que SERPINA E1 podría contribuir a la agresividad tumoral estimulando la motilidad celular, un aspecto esencial durante el proceso de invasión y el desarrollo de metástasis locales y a distancia.

Por otro lado, en el estudio que realizamos con muestras de pacientes con CECC, aquellos con mayores niveles de SERPINA E1 presentaron mayor riesgo de sufrir recidivas locales y metastáticas una vez iniciado el tratamiento, y además, el nivel de SERPINA E1 constituyó un factor pronóstico independiente de la supervivencia libre de progresión en pacientes con CECC tratados con radioterapia o radio/quimioterapia. Nuestros resultados obtenidos a partir de los estudios *in vitro* e *in vivo* indican que SERPINA E1 influye en la sensibilidad de las células de CECC a la apoptosis, dotándolas de mayor resistencia. En concreto, en los ensayos *in vitro*, el aumento de SERPINA E1 hace a las células de CECC más resistentes a la apoptosis inducida por cisplatino, un compuesto citotóxico utilizado para tratar a los pacientes con CECC, lo que podría explicar la peor respuesta al tratamiento de los pacientes con niveles elevados de SERPINA E1.

Nuestros resultados en su conjunto, indican que el aumento de la expresión de SERPINA E1 contribuye a la agresividad de células tumorales a través de la estimulación de la motilidad celular y el aumento de la resistencia a la apoptosis, lo que favorecería la generación de metástasis, la adquisición de resistencia a los tratamientos genotóxicos, y en último término, que los pacientes tuvieran una respuesta desfavorable al tratamiento y una peor evolución clínica.

En el futuro, la expresión de SERPINA E1 sería un buen factor candidato para ser incluido, junto con otras variables moleculares y clinicopatológicas, en los algoritmos diagnósticos y de tratamiento que se utilizan para predecir la evolución clínica de los pacientes con CECC. En este contexto, SERPINA E1 podría ayudar a mejorar la estratificación de los pacientes y a desarrollar enfoques terapéuticos personalizados, mejorando así la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes.

## **CONCLUSIONES:**

- SERPINA E1 es un marcador pronóstico independiente en pacientes con CECC. Los pacientes con tumores que expresan niveles elevados de SERPINA E1 presentan una supervivencia más corta que los pacientes con expresión baja.
- SERPINA E1 es un marcador pronóstico independiente de la supervivencia libre de progresión en pacientes con CECC. Además, el análisis de los niveles de SERPINA E1 permite identificar un subtipo de pacientes tratados con radio o quimioradioterapia que no se benefician de dichos tratamientos.
- En los estudios *in vitro*, SERPINA E1 estimula la migración y aumenta la resistencia de las células de CECC a la muerte inducida por cisplatino a través de la activación de Akt.
- El modelo murino ortópico establecido en ratones NSG permite estudiar el tipo de crecimiento y la capacidad de diseminación metastática de las células de CECC.
- En el modelo *in vivo*, la sobre-expresión de SERPINA E1 estimula la capacidad invasiva, aumenta la proporción de estroma y disminuye la apoptosis a nivel de tumor primario. A nivel de metástasis ganglionar, SERPINA E1 aumenta el número de ratones con afectación ganglionar y la tasa de crecimiento de las metástasis ganglionares. A nivel de metástasis en pulmón, la sobre-expresión de SERPINA E1 aumenta la dispersión de las células tumorales durante la colonización y favorece la generación de focos tumorales de mayor tamaño en el pulmón.

## BIBLIOGRAFÍA:

1. Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011 Jan;11(1):9–22.
2. Ridge, John Andrew, Mehra, Ranee, Lango, Miriam N, Galloway, Thomas. Head and Neck Tumors | Cancer Network [Internet]. Cancer Network. 2016 [cited 2017 Feb 13]. Available from: <http://www.cancernetwork.com/cancer-management/head-and-neck-tumors>
3. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet Lond Engl*. 2008 May 17;371(9625):1695–709.
4. Pavón MA, Parreño M, Téllez-Gabriel M, Sancho FJ, López M, Céspedes MV, et al. Gene expression signatures and molecular markers associated with clinical outcome in locally advanced head and neck carcinoma. *Carcinogenesis*. 2012 Sep;33(9):1707–16.
5. Speleman L, Kerrebijn JDF, Look MP, Meeuwis CA, Foekens JA, Berns EMJJ. Prognostic value of plasminogen activator inhibitor-1 in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2007 Apr;29(4):341–50.
6. Magnussen S, Rikardsen OG, Hadler-Olsen E, Uhlin-Hansen L, Steigen SE, Svineng G. Urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) are potential predictive biomarkers in early stage oral squamous cell carcinomas (OSCC). *PloS One*. 2014;9(7):e101895.
7. Chin D, Boyle GM, Williams RM, Ferguson K, Pandeya N, Pedley J, et al. Novel markers for poor prognosis in head and neck cancer. *Int J Cancer*. 2005 Feb 20;113(5):789–97.
8. Hundsdorfer B, Zeilhofer H-F, Bock KP, Dettmar P, Schmitt M, Kolk A, et al. Tumour-associated urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1 in normal and neoplastic tissues of patients with squamous cell cancer of the oral cavity - clinical relevance and prognostic value. *J Cranio-Maxillo-fac Surg Off Publ Eur Assoc Cranio-Maxillo-fac Surg*. 2005 Jun;33(3):191–6.

9. Almangush A, Salo T, Hagström J, Leivo I. Tumour budding in head and neck squamous cell carcinoma - a systematic review. *Histopathology*. 2014 Nov;65(5):587–94.
10. Wang K, Ma W, Wang J, Yu L, Zhang X, Wang Z, et al. Tumor-stroma ratio is an independent predictor for survival in esophageal squamous cell carcinoma. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. 2012 Sep;7(9):1457–61.
11. de Kruijf EM, van Nes JGH, van de Velde CJH, Putter H, Smit VTHBM, Liefers GJ, et al. Tumor-stroma ratio in the primary tumor is a prognostic factor in early breast cancer patients, especially in triple-negative carcinoma patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Feb;125(3):687–96.
12. Fabre-Guillevin E, Malo M, Cartier-Michaud A, Peinado H, Moreno-Bueno G, Vallée B, et al. PAI-1 and functional blockade of SNAI1 in breast cancer cell migration. *Breast Cancer Res BCR*. 2008;10(6):R100.
13. Fortenberry YM, Brandal SM, Carpentier G, Hemani M, Pathak AP. Intracellular Expression of PAI-1 Specific Aptamers Alters Breast Cancer Cell Migration, Invasion and Angiogenesis. *PloS One*. 2016;11(10):e0164288.
14. Hogan NM, Joyce MR, Murphy JM, Barry FP, O'Brien T, Kerin MJ, et al. Impact of mesenchymal stem cell secreted PAI-1 on colon cancer cell migration and proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Jun 14;435(4):574–9.
15. Yu X-M, Jaskula-Sztul R, Georgen MR, Aburjania Z, Somnay YR, Leverson G, et al. Notch1 Signaling Regulates the Aggressiveness of Differentiated Thyroid Cancer and Inhibits SERPINE1 Expression. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2016 Jul 15;22(14):3582–92.
16. Stahl A, Mueller BM. Melanoma cell migration on vitronectin: regulation by components of the plasminogen activation system. *Int J Cancer*. 1997 Mar 28;71(1):116–22.
17. Okui G, Tobiume K, Rizqiawan A, Yamamoto K, Shigeishi H, Ono S, et al. AKT primes snail-induced EMT concomitantly with the collective migration of squamous cell carcinoma cells. *J Cell Biochem*. 2013 Sep;114(9):2039–49.
18. Cheng GZ, Chan J, Wang Q, Zhang W, Sun CD, Wang L-H. Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel. *Cancer Res*. 2007 Mar 1;67(5):1979–87.
19. Henderson V, Smith B, Burton LJ, Randle D, Morris M, Odero-Marah VA. Snail promotes cell migration through PI3K/AKT-dependent Rac1 activation as well as PI3K/AKT-independent pathways during prostate cancer progression. *Cell Adhes Migr*. 2015;9(4):255–64.
20. Samarakoon R, Higgins CE, Higgins SP, Higgins PJ. TGF- $\beta$ 1-Induced Expression of the Poor Prognosis SERPINE1/PAI-1 Gene Requires EGFR Signaling: A New Target for Anti-EGFR Therapy. *Journal of Oncology*. 2009;2009:342391.