



Escuela de Odontología

**EVALUACIÓN Y COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN
INMUNOHISTOQUÍMICA DE CCR7 EN TUMOR PRIMARIO Y
LINFONODOS METASTÁSICOS DE PACIENTES CON CARCINOMA
ESPINOCELULAR DE CABEZA Y CUELLO CON METÁSTASIS
LINFONODAL Y SIN METÁSTASIS LINFONODAL**

Trabajo de Investigación
Requisito para optar al
Título de Cirujano Dentista

Estudiantes: Felipe Castillo Jofré
Milton Pinto Vidal
Camila Vidal Palma

Docente Guía: Dr. Wilfredo González Arriagada
Cátedra de Patología y Diagnóstico Oral

Valparaíso – Chile
2016

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Jessie y a Patricio por ser una fuente inagotable de comprensión y cariño, mis logros les pertenecen a ellos tanto como a mí. A mis hermanos Patricio y Paulo por ser mi orgullo y en quienes puedo contar bajo cualquier circunstancia. A nuestro guía el Doctor Wilfredo por traspasarnos su conocimiento en investigación. A mis compañeros Milton y Camila, con quienes logramos trabajar en pos de nuestro último desafío en pregrado. Por último hago mención a Violeta Parra y a Víctor Jara quienes han estado presente siempre en mi formación como una persona de bien y de conciencia social. A todos, muchas gracias de corazón.

Agradezco en primer lugar a mis padres Milton y Marcia, que me han acompañado en este largo camino de Pregrado, sin ellos y sin su apoyo inagotable nada hubiera sido posible. También agradezco al Doctor Wilfredo González por el gran esfuerzo que dio forma a esta tesis, su pasión y rigor por el trabajo sin duda han contribuido en mi forma de ver la profesión. A mis compañeros y amigos de tesis Camila y Felipe, los cuales con su energía y cariño por este trabajo me han motivado en esos pequeños momentos de frustración que a veces hacen parecer todo muy distante, y a todos los que han contribuido tanto en forjar este camino, desde el apoyo más sutil, hasta el pilar más fuerte, muchas gracias.

A mis padres, Margarita y Luis, quienes creyeron en mí, me levantaron en cada caída y celebraron junto a mí cada éxito de este camino, muchas gracias por enseñarme sobre la perseverancia, y sobre el amor incondicional, gracias por confiar en mí y por mostrarme que con voluntad y esfuerzo todo es posible. A mi hermano Nicolás, que con sus locuras me alegraba en los momentos difíciles y me daba su mano para salir adelante, gracias por ser como eres. A todas aquellas personas que partieron pero que ocupan un lugar enorme en mi corazón, gracias por todas las alegrías que me regalaron. A todos aquellos quienes me acompañaron e hicieron posible terminar este desafío, familia, amigos y especialmente a mis compañeros de tesis, con el afecto de siempre, muchísimas gracias.

ÍNDICE

I. GLOSARIO DE ABREVIACIONES	
II. INTRODUCCIÓN.....	1
III. MARCO TEÓRICO.....	3
➤ CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO	
➤ FACTORES DE RIESGO DE CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO	
➤ FACTOR PRONÓSTICO DE CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO	
➤ MECANISMOS MOLECULARES DE CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO	
➤ AUTONOMÍA EN SEÑALES DE CRECIMIENTO	
➤ EVASIÓN DE LA APOPTOSIS	
➤ REPLICACIÓN ILIMITADA	
➤ NO RESPUESTA A SEÑALES INHIBIDORAS DE CRECIMIENTO	
➤ ANGIOGÉNESIS	
➤ INVASIÓN Y METÁSTASIS	
➤ SISTEMAS LIGANDO-RECEPTOR DE QUIMIOQUINAS INVOLUCRADOS EN LA METÁSTASIS REGIONAL LINFONODAL	
➤ SISTEMA LIGANDO CCL21/CCL19/CCR7	
➤ CCR7 Y CÁNCER	
➤ IDENTIFICACIÓN DE METÁSTASIS LINFONODAL Y ABORDAJE	
IV. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	20
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
➤ DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	
➤ IDENTIFICACIÓN DE LA POBLACIÓN Y UNIVERSO	
➤ DETERMINACIÓN Y SELECCIÓN DE LA MUESTRA	
➤ DEFINICIÓN DE VARIABLES	
➤ PLAN DE RECOLECCIÓN DE DATOS	
➤ ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	
➤ ASPECTOS ÉTICOS	
➤ LIMITACIONES	
➤ CONTROL DE SESGOS	
VI.RESULTADOS.....	28
VII.DISCUSIÓN.....	40
VIII.CONCLUSION.....	43
IX. SUGERENCIAS.....	44
IX. RESUMEN.....	45
IX.REFERENCIAS.....	46
ANEXOS.....	51

I. GLOSARIO DE ABREVIACIONES

- BM: Membrana basal.
- CEC: Carcinoma Espino-Celular.
- CECCyC: Carcinoma Espino-Celular de Cabeza y Cuello.
- CCL19: Ligando de quimioquina 19.
- CCL21: Ligando de quimioquina 21.
- CCR7: Receptor de quimioquina tipo 7.
- HCVB: Hospital Carlos Van Buren.
- IHQ: Inmunohistoquímica.
- IRS: Sistema de puntuación inmunoreactiva.
- MMPs: Metaloproteinasas de matriz.
- RNA: Ácido Ribonucleico.
- TNM: Clasificación de tumores malignos (Tamaño-Nódulo linfático-Metástasis).
- VEB: Virus Epstein-Barr.
- VPH: Virus Papiloma Humano.
- MAPK: Mitogen-activated protein kinases.

II. INTRODUCCIÓN

El cáncer de cabeza y cuello afecta aproximadamente al 3% de la población, siendo el carcinoma espinocelular (CEC) el más frecuente, abarcando un 90% de los casos de neoplasias malignas de la región. Este tipo de cáncer es el octavo más frecuente en hombres, presenta una alta incidencia con 300.000 nuevos casos por año y correspondiendo al 2% de todas las muertes por cáncer en el mundo. El diagnóstico es realizado frecuentemente en estadios avanzados, por lo que la supervivencia a 5 años no supera el 50%, a pesar de los avances en las terapias en las últimas décadas^{1,2}. El CEC de cabeza y cuello está asociado a un alto grado de invasión local y una alta incidencia de metástasis linfonodal regional, afectando directamente el pronóstico de los pacientes^{3,4}.

El TNM es el factor más relevante en los pacientes con cáncer de cabeza y cuello para la evaluación pronóstica y planificación del tratamiento, sin embargo, son necesarios mejores marcadores pronósticos, incluyendo aquellos que determinen la posibilidad de ocurrencia de metástasis linfonodal, que es un predictor del comportamiento tumoral y determinante para el pronóstico y manejo clínico⁵.

El enfoque para mejorar las terapias y pronóstico de los pacientes con CEC oral parte por entender la desregulación de los procesos moleculares de carcinogénesis y metástasis⁶. Los procesos fisiológicos en un tumor maligno tienen autonomía en señales de crecimiento, evasión de la apoptosis, replicación ilimitada, no respuesta a señales inhibitorias del crecimiento, angiogénesis, invasión y metástasis⁷.

Nuestra investigación pretende conocer de mejor manera el mecanismo de metástasis regional linfonodal, con el fin de poder identificar algunos blancos de terapias futuras complementarias a las actuales para prevenir la progresión del cáncer. Teniendo en cuenta que la metástasis regional linfonodal es un importante factor pronóstico en estos pacientes, el poder conocer los mecanismos que llevan a las células cancerígenas a alojarse en los linfonodos es importante para determinar nuevos marcadores que identifiquen el probable comportamiento de la enfermedad y establecer nuevas terapias que mejoren las tasas de supervivencia en los pacientes con CEC.

Un gran número de factores moleculares han sido considerados como marcadores predictivos para metástasis linfonodal, sin embargo, el mecanismo que lleva a las células cancerígenas a metastatizar a los linfonodos no está bien entendido⁸. Los efectos paracrinos entre células de CEC oral y fibroblastos/miofibroblastos han sido reportados, y son fundamentales para invasión tumoral y metástasis^{9,10}. Es probable que una comunicación paracrina entre las células del carcinoma y fibroblastos linfáticos sea también importante para la implantación de células metastásicas a linfonodos regionales. En este escenario, las

quimioquinas jugarían un papel fundamental para la atracción de células cancerígenas al sitio metastásico.

Las quimioquinas funcionan como moléculas reguladoras en la maduración de leucocitos y células dendríticas, tráfico y alojamiento de linfocitos T y B, y en el desarrollo de tejidos linfoides¹¹. Recientemente, las quimioquinas han sido involucradas en el crecimiento tumoral y metástasis de diferentes tumores, pero aún es confusa la información disponible acerca del papel de las quimioquinas en los linfonodos metastásicos^{8,12,13,14,15,16}.

Las quimioquinas CCL19 (ELC / MIP-3 β) y CCL21 (SLC / 6CKine), liberadas por las células endoteliales linfáticas y células T de los ganglios linfáticos, actúan como ligandos del CCR7¹⁷. Esta relación entre quimioquina y receptor se describe en ejes de quimioquina receptores que realizan su acción. Entre las diversas enfermedades malignas, incluyendo cáncer de mama, de páncreas y cáncer de cabeza y cuello, la expresión de CCR7 en las células cancerosas parece estar relacionada con la capacidad de las células tumorales para establecer metástasis en los ganglios linfáticos, por otra parte también se ha sugerido que el receptor CCR7, activado por CCL19 y CCL21, participa en otros eventos relacionados con génesis tumoral, como la proliferación de células tumorales, control de las células tumorales, la adhesión, la migración, la invasión, y la angiogénesis¹⁸.

El CCR7 es un receptor de quimioquina homeostática específico para linfocitos que se expresa en varios subtipos de células inmunes (células T, B, NK, entre otras) las cuales migran hacia los órganos linfoides. Generalmente un subconjunto de células T constitutivamente expresan CCR7, lo que les permite circular en el torrente sanguíneo, los vasos linfáticos y los órganos linfoides secundarios. Una asociación de CCR7 con cáncer fue reconocida en pacientes con leucemia, en donde las células T de pacientes adultos con infiltración linfonodal presentaron niveles significativamente altos de CCR7, en comparación con las células T normales o células de leucemia de pacientes sin compromiso linfoide. La expresión de CCR7 en células tumorales se ha reportado además en cáncer de mama, melanomas, cáncer de cabeza y cuello, entre otros⁵³¹⁹. Es por esto que su expresión ha sido estudiada y se ha relacionado con diferentes variables clínico epidemiológicas, que pueden guiarnos a una estrecha relación entre la expresión de la molécula y la progresión de la enfermedad^{16,20,21}.

El objetivo del presente trabajo es responder a la pregunta de investigación ¿Existe diferencia en la expresión inmunohistoquímica de la molécula CCR7 en tumor primario y en linfonodos en pacientes con metástasis linfonodal y sin metástasis linfonodal de carcinoma espinoceleular de cabeza y cuello?

III. MARCO TEÓRICO

1. CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

En total se registraron 2.515.458 muertes en Estados Unidos el año 2011, de los cuales 576.691 (23%) eran por cáncer. En general, el cáncer es la segunda causa de muerte después de las enfermedades del corazón, lo que representó el 24% del total de muertes. Sin embargo, se espera que el cáncer pueda superar a las enfermedades del corazón como la causa principal de muerte en los próximos años. En 2011, el cáncer fue la causa principal de muerte entre los adultos de 40 a 79 años y era la primera o segunda causa de muerte en cada grupo de edad entre las mujeres²².

Mundialmente se estiman en aproximadamente 650.000 nuevos casos de cáncer espinocelular de cabeza y cuello (CECyC) diagnosticados cada año, y 300.000 muertes, con dos tercios de estos casos originados en países en vías de desarrollo²³. La incidencia de CECyC es, en general, tres veces mayor en hombres que en mujeres, y en particular, varía de 2:1 hasta 15:1 dependiendo del sitio del cáncer²⁴. En los Estados Unidos de Norteamérica, el CECyC representa el 3,2% de la incidencia de todos los cánceres, y el 2,2% de la mortalidad por cáncer^{25,26}. En Europa, se estima en aproximadamente 130.000 nuevos casos cada año²⁷. A nivel mundial, el cáncer de cavidad oral y orofaringe corresponde al décimo cáncer más incidente, pero es la séptima causa de mortalidad producida por cáncer²⁴. Respecto a la histología, más del 90% de los CECyC son de tipo espinocelular²³.

El CECyC se divide de acuerdo al sub sitio afectado en carcinoma de cavidad oral, orofaringe, nasofaringe, hipofaringe y laringe²³. La cavidad oral incluye mucosa bucal, encía superior e inferior, triángulo retromolar, piso de la boca, paladar duro, 2/3 anteriores de lengua y labios; la orofaringe incluye base de lengua, amígdalas palatinas, paladar blando, úvula, pared faríngea posterior y pared faríngea lateral; la nasofaringe considera la coana, pared posterior y la pared lateral que incluye la fosita de Rosenmüller y el torus tubario; la hipofaringe incluye la pared posterior y lateral de la faringe, los senos piriformes y la zona retrocricóidea; y la laringe considera la supraglotis, glotis y subglotis²⁸.

A nivel mundial, los carcinomas de cavidad oral y faringe dan cuenta del 75% de los cánceres de cabeza y cuello²⁹. Durante la década de los noventa, la incidencia de cáncer de amígdala y de base de lengua aumentó en el mundo, sobretodo en personas menores de 45 años, cambio epidemiológico atribuido al aumento de la prevalencia de portación de virus papiloma humano en orofaringe²⁸.

En Chile la tasa bruta de incidencia de cáncer oral y faringe por 100.000 habitantes entre el año 2003-2007 corresponde a una tasa de 3,2 en hombres y 1,5 en mujeres, coincidiendo con los índices mundiales. Así mismo la tasa bruta de mortalidad asociada a cáncer de cavidad oral y faringe por 100.000 habitantes entre el año 2003-2007 corresponde a 1,7 en hombres y 0,7 en mujeres (Tablas I y II).

Incidencia estimada de cáncer según localizaciones en Hombres. Chile 2003-2007 (TAI por 100.000 Hab.)

Localización del Cáncer	Nº casos/año	IC95%	TBI	TAI	
Próstata	4098,1	3919,2	4284,2	50,9	61,3
Estómago	2388,4	2245,0	2520,9	29,7	34,1
Piel no melanoma	1577,1	1484,1	1681,0	19,6	25,4
Tráquea bronquios pulmón	1373,3	1276,6	1467,2	17,1	19,7
Colon	748,7	652,6	837,2	9,3	10,8
Testículos	641,2	527,2	664,8	8,0	7,8
Vesícula y vías biliares	599,4	519,0	649,2	7,5	8,7
Esófago	551,1	474,6	598,0	6,9	8,1
Riñones	544,9	465,8	607,6	6,8	7,6
Leucemia	489,3	420,0	569,0	6,1	6,5
Linfoma no Hodgkin	449,7	372,8	518,4	5,6	6,1
Recto y Ano	425,2	349,4	467,4	5,3	6,0
Páncreas	385,4	322,6	438,8	4,8	5,5
Hígado	368,7	285,0	400,0	4,6	5,2
Vejiga urinaria	340,8	297,0	381,8	4,2	5,1
Encéfalo y sistema nervioso	328,7	241,0	369,4	4,1	4,3
Cavidad oral y faringe	253,6	195,2	305,8	3,2	3,4
Mieloma múltiple	235,8	186,2	289,6	2,9	3,3
Melanoma de piel	220,4	168,0	277,2	2,7	3,0
Laringe	149,1	111,2	179,6	1,9	2,1
Tiroides	139,1	103,2	179,6	1,7	2,0
Linfoma de Hodgkin	81,4	60,4	104,4	1,0	1,1
TODAS	17456,4	16902,8	17673,5	216,9	252,1
TODAS excepto piel no mel.	15879,3	15344,0	16086,8	197,3	226,7

Tabla I. Incidencia estimada de cáncer según localizaciones en Hombres. Chile 2003-2007. (TAI por 100.000 hab). Fuente: Elaborado por Unidad VENT y Estudios, Depto. Epidemiología, DIPLAS, MINSAL y RPC Tarragona (España)³⁰.

Incidencia estimada de cáncer según localizaciones en Mujeres. Chile 2003-2007 (TAI por 100.000 Hab.)

Localización del Cáncer	Nº casos/año	IC 95%		TBI	TAI
Mama	3791,1	3587,1	4017,4	46,2	43,2
Piel no melanoma	1874,3	1748,8	1993,6	22,8	19,2
Vesícula y vías biliares	1531,8	1417,8	1647,2	18,7	17,2
Cuello uterino	1279,2	1167,6	1384,2	15,6	14,6
Estómago	1173,1	1072,4	1273,6	14,3	12,8
Colon	877,6	782,8	968,2	10,7	9,6
Tráquea bronquios pulmón	815,4	732,0	899,6	9,9	9,1
Ovario	553,1	473,6	619,0	6,7	6,4
Linfoma no Hodgkin	522,4	375,6	555,4	6,4	5,9
Tiroides	483,7	424,8	546,0	5,9	5,3
Páncreas	441,4	331,0	448,8	5,4	4,9
Leucemia	387,7	368,8	510,6	4,7	4,5
Cuerpo uterino	368,3	242,4	377,0	4,5	4,2
Recto y Ano	366,4	284,6	384,0	4,5	4,1
Riñones	366,5	302,2	418,2	4,5	4,2
Esófago	308,3	224,0	332,0	3,8	3,3
Hígado	302,3	184,0	287,6	3,7	3,4
Encéfalo y sistema nervioso	245,9	255,2	354,8	3,0	2,9
Melanoma de piel	213,2	147,6	244,4	2,6	2,4
Vejiga urinaria	205,0	155,4	246,8	2,5	2,2
Mieloma múltiple	203,4	170,0	236,2	2,5	2,3
Cavidad oral y faringe	119,4	69,4	124,2	1,5	1,3
Linfoma de Hodgkin	63,4	45,4	83,2	0,8	0,7
TODAS	17819,7	17123,0	17902,6	217,0	198,5
TODAS excepto piel no mel.	15945,4	15252,0	16037,0	194,2	179,3

Tabla II. Incidencia estimada de cáncer según localizaciones en Mujeres. Chile 2003-2007. (TAI por 100.000 hab). Fuente: Elaborado por Unidad VENT y Estudios, Depto. Epidemiología, DIPLAS, MINSAL y RPC Tarragona (España)³⁰.

1.2. FACTORES DE RIESGO DE CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

El tabaquismo y el consumo de alcohol son los principales factores de riesgo reconocidos, atribuyéndose un efecto en 75% de los casos, con un efecto sinérgico cuando son combinados^{31,32}.

La mutación de la proteína que codifica el gen p53, un gen supresor de tumores, se ha asociado con exposición a tabaco y alcohol²³. También existe una relación del cáncer oral y faríngeo con hábitos alimentarios, especialmente deficiencia de vitamina A. El Consorcio Internacional de Epidemiología del cáncer de Cabeza y Cuello (InHANCE por sus siglas en inglés) ha llevado a cabo estudios que confirman el rol de la predisposición genética, estimándose que una historia familiar de primer grado de CECyC se asocia a 1,7 veces más de posibilidad de desarrollar la enfermedad³³.

Con respecto a los virus, se ha descrito un vínculo entre el virus papiloma humano (VPH) y el virus Epstein-Barr (VEB) con el CECyC. Se estima que el VPH se encuentra presente en la cavidad oral hasta en un 60% de personas asintomáticas y en un 36% de lesiones benignas y precancerosas³⁴. Es posible detectar VPH en tumores de cavidad oral, orofaringe, hipofaringe y laringe³⁴. Se ha demostrado que el VPH está asociado con aproximadamente 25% de los CECyC, sobre todo a nivel de amígdalas palatinas y base de lengua, donde la asociación llega a un 60%³⁵. Se menciona incluso que la infección persistente por VPH está asociada en un 95% al CECyC, aunque no todos los casos expresan las proteínas E6 y E7, lo que sugiere que el VPH actuaría como carcinogénico en una proporción menor de casos³⁶.

Además, el CECyC se asocia al sexo masculino, a la exposición ocupacional a cromo, níquel, radio, gas mostaza y productos intermedios de la producción de cuero y de proceso de madera, índice de masa corporal bajo, comportamiento sexual, mala higiene dental y factores en la dieta como ingesta baja de frutas y vegetales³³.

1.3. FACTOR PRONÓSTICO DE CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

El factor pronóstico más importante para los pacientes con CECyC es el estadio clínico de la enfermedad (estadio TNM), sin embargo, para pacientes en el mismo estadio la sobrevida es variable y son necesarios mejores marcadores pronósticos. Adicionalmente, la metástasis linfonodal es un predictor del comportamiento tumoral y determinante para el pronóstico y manejo clínico⁵. De hecho, la metástasis linfonodal es considerada como el indicador pronóstico adverso más significativo en pacientes con CECyC³⁷.

El sistema TNM para describir la extensión anatómica de la enfermedad se basa en la evaluación de tres componentes:

T - El grado del tumor primario.

N - La ausencia o la presencia y extensión de la región metástasis ganglionares.

M - La ausencia o presencia de metástasis a distancia. (Tabla III).

Clasificación clínica de TNM		
T	Tx	El tumor primario no puede evaluarse.
	T0	No hay evidencia de tumor primario.
	Tis	Carcinoma in situ.
	T1	≤2cm.
	T2	>2-4 cm.
	T3	>4 cm.
	T4a	(Labio) Tumor que invade a través del hueso cortical, nervio alveolar inferior, piso de la boca o la piel. (Cavidad oral) Tumor invade a través del hueso cortical, piso exterior a músculos linguales (geniogloso, hiogloso, palatogloso, y estilogloso), seno maxilar, o la piel de la cara.
	T4b	(Labio y la cavidad oral) Tumor que invade el espacio masticatorio, las placas pterigoideas, o la base del cráneo, o encierra la arteria carótida interna.
N	Nx	Ganglios linfáticos regionales no pueden ser evaluados.
	N0	Sin metástasis en los ganglios linfáticos regionales.
	N1	Único ipsilateral ≤3 cm.
	N2	(a)Único ipsilateral >3-6 cm. (b)Múltiple ipsilateral ≤6 cm.
	N3	(c)Bilateral, contralateral ≤6 cm. >6 cm.
M	M0	No hay metástasis distante.
	M1	Metástasis a distancia.
	MX	No puede medirse la metástasis

Tabla III. TNM Clasificación de tumores malignos, capítulo de cabeza y cuello, editado por L.H Sobin, M.K. Gospodarowicz y Ch. Wittekind año 2009³⁸.

2. MECANISMOS MOLECULARES DEL CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

El enfoque para mejorar las terapias y pronóstico de los pacientes con CEC oral parte por entender la desregulación de los procesos moleculares en la carcinogénesis y metástasis⁶. Los procesos fisiológicos en un tumor maligno tienen autonomía en señales de crecimiento, evasión de la apoptosis, replicación ilimitada, no respuesta a señales inhibitoras del crecimiento, angiogénesis, invasión y metástasis⁷.

2.1. AUTONOMÍA EN SEÑALES DE CRECIMIENTO

Desde hace tiempo se ha reconocido que el cáncer surge como resultado de mutaciones somáticas, los protooncogenes celulares cuando mutan de forma desregulada o son anormalmente sobreexpresados, contribuyen a la formación de tumores. Muchos de estos genes codifican proteínas que regulan los procesos del

ciclo celular, las cuales inducen a mitosis o senescencia. Los tumores presentan autosuficiencia de crecimiento al adquirir la actividad de producir los factores de crecimiento a los cuales responden por medio de una estimulación autocrina y paracrina. Puede haber genes que codifiquen una sobreexpresión o mutación de los factores de crecimiento, sin embargo, en otros casos el gen del factor de crecimiento puede no estar alterado y un oncogen puede estimular la sobre expresión de éste.

Los oncogenes codifican proteínas llamadas oncoproteínas, similares a los productos normales de los protooncogenes, salvo que las oncoproteínas carecen de algunos elementos reguladores y su producción no depende de factores de crecimiento ni de otras señales externas. Los factores de crecimiento estimulan la proliferación de las células normales y se cree que muchos de ellos intervienen en las mutaciones.

Los receptores de crecimiento son proteínas transmembrana que sufren una activación transitoria cuando el receptor capta a su factor de crecimiento específico, a lo que sigue rápidamente la mitosis. Las versiones oncogénicas de estos receptores sufren activaciones persistentes sin necesidad de unirse al factor de crecimiento correspondiente. De esta forma, el receptor mutante libera hacia la célula continuas señales que estimulan la mitosis.

La expresión de receptores de factores de crecimiento codificados por protooncogenes c-erb B tienen un rol en el desarrollo de cáncer oral. Uno de estos receptores es el receptor para el Factor de Crecimiento Epidérmico, que se une a ErbB-1, mientras que el factor de diferenciación neural (NDF) es el ligando preferente para ErbB-3 y ErbB-4. Estos receptores están involucrados en la proliferación y diferenciación celular, y su activación aberrante o su sobre-expresión puede contribuir al desarrollo y progresión tumoral.

La progresión ordenada de las células a través de las distintas fases del ciclo celular depende de las ciclinas, de las quinasas dependientes de ciclinas (CDK) y de sus inhibidores. Las mutaciones que alteran la regulación de la actividad de las ciclinas y de las CDK favorecen la proliferación celular³⁹.

2.2. EVASIÓN DE LA APOPTOSIS

Además del ciclo celular, se altera también la apoptosis, en donde las células transformadas también adquieren la habilidad de entrar a ilimitados ciclos de mitosis (“inmortalización”) por diferentes mecanismos, como una actividad telomerasa aumentada⁴⁰.

La apoptosis ocurre debido a un estímulo nocivo, y la incapacidad de la célula de adaptarse (Fig. 1). Es un proceso importante que puede ser inducida por vías intrínsecas o extrínsecas (Fig. 2). Las vías extrínsecas son iniciadas por ligandos extracelulares unidos a receptores, tales como FAS (fatty acid synthase) o TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), mientras que la vía intrínseca es activada por la liberación del citocromo c desde la mitocondria⁴¹. Las caspasas propagan esta

vía cuando la apoptosis es activada. Proteínas pro-apoptóticas, incluyendo Bad y Bax, interactúan con la familia de genes antiapoptótica Bcl, y la transformación maligna ocurre cuando este equilibrio intracelular es alterado⁶. La expresión incrementada de bcl-2, p53, factor nuclear kappa B y vías AKT son mecanismos para la evasión de la apoptosis en tumores humanos, incluyendo CEC oral^{6,42}.

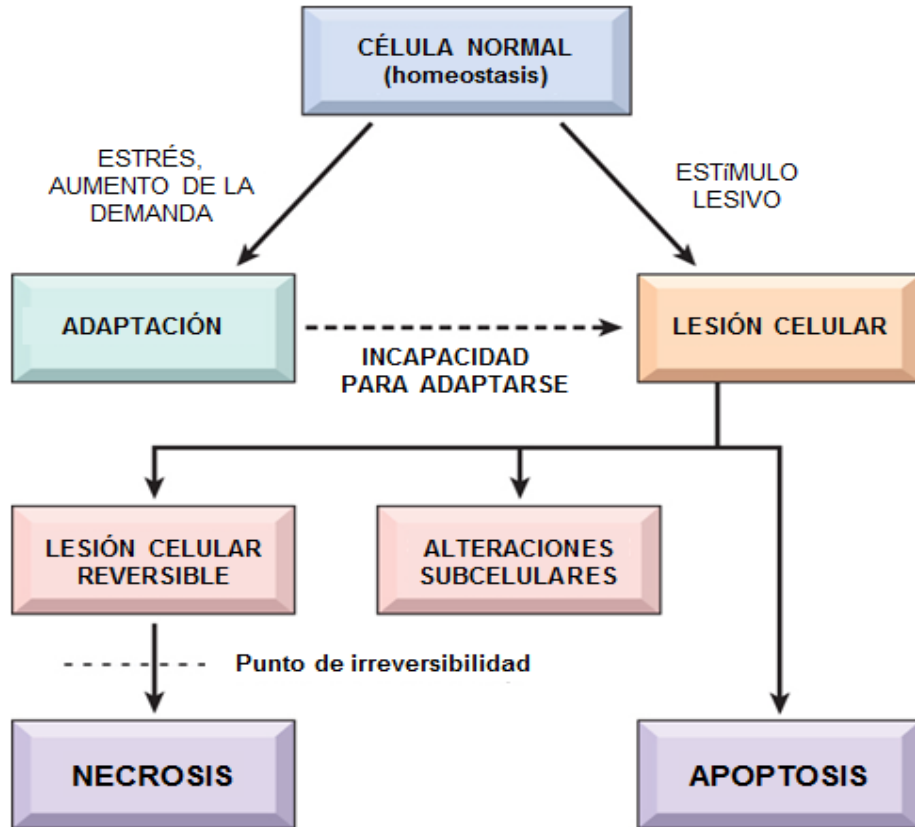


Figura 1. Estadios de la respuesta celular frente al estrés y los estímulos nocivos. Kumar et al: Robbins Basic Pathology 8va edición⁴³.

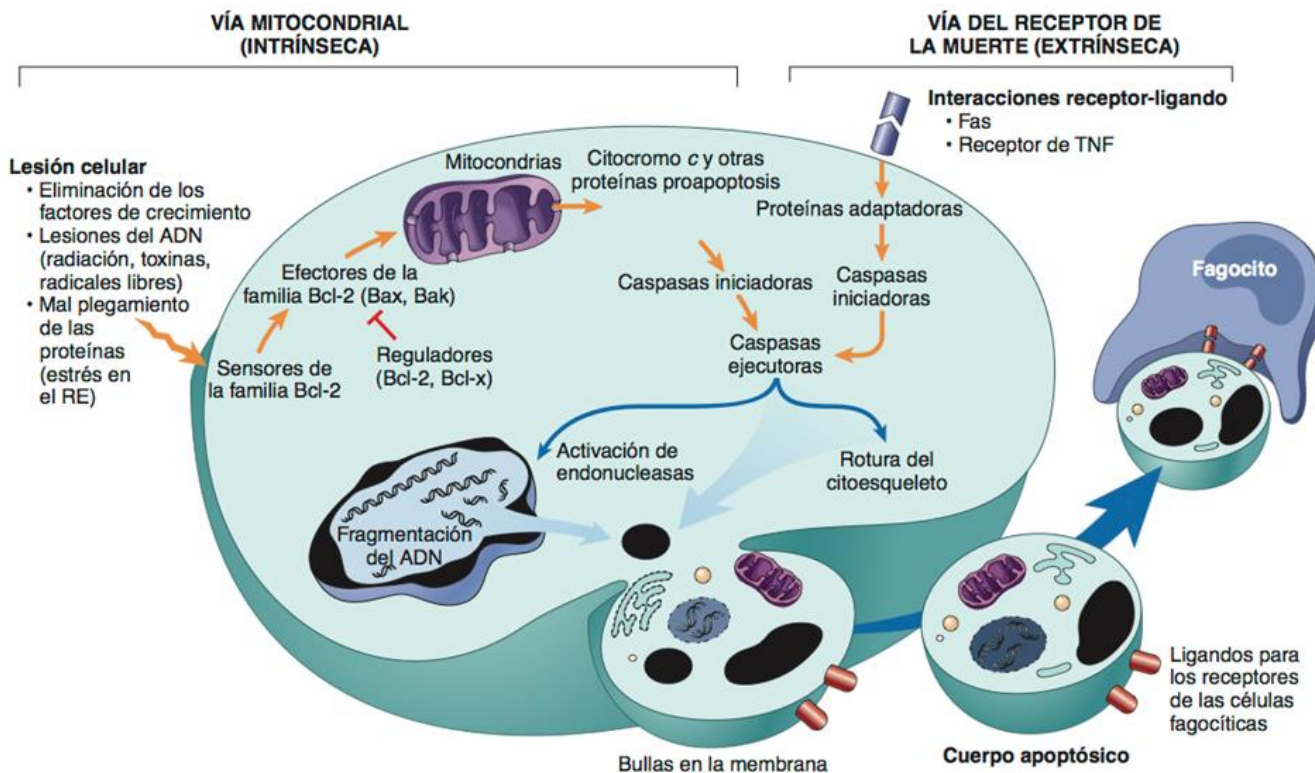


Figura 2. Mecanismos de la apoptosis. Las dos vías de la apoptosis se distinguen en su inducción y regulación, y ambas culminan en la activación de las caspasas <ejecutoras>. La inducción de la apoptosis por la vía mitocondrial implica la acción de los sensores y efectos de la familia de Bcl-2, que induce la extravasación de las proteínas mitocondriales. También se muestran en esta misma imagen algunas de las proteínas antiapoptosis (<reguladoras>) que inhiben la extravasación de las mitocondrias y la activación de las caspasas dependiente del citocromo c en la vía mitocondrial. En la vía del receptor de muerte, la participación de estos receptores determina de forma directa la activación de las caspasas. Los reguladores de la activación de las caspasas mediados por los receptores de muerte no se muestran. RE, retículo endoplásmico; TNF, factor de necrosis tumoral. Kumar et al: Robbins Basic Pathology 8va edición⁴³.

2.3. REPLICACIÓN ILIMITADA

La mayoría de las células humanas normales tienen la capacidad de dividirse entre 60 y 70 veces. Luego pierden la capacidad y entran en envejecimiento celular, por un fenómeno que se debe al acortamiento de los telómeros por función de la telomerasa, a través de la regulación del p53. Se ha visto que en los tumores una mala función de la telomerasa y el p53 derivan en un potencial de replicación ilimitado. Además, la acción de diversos oncogenes, aparece implicada en fenómenos de proliferación, diferenciación y supervivencia celular, así como en la capacidad de diseminación y metástasis de las células neoplásicas⁴⁴.

2.4. NO RESPUESTA A SEÑALES INHIBIDORAS DEL CRECIMIENTO

Los genes supresores tumorales están implicados en diversos procesos de división celular: la regulación de la expresión génica, control del ciclo celular, programación de la muerte celular y estabilidad del genoma. La pérdida de actividad

de estos genes provoca la incapacidad de respuesta a los mecanismos de control que regulan la división celular; de modo que se produce una proliferación más o menos incontrolada de la célula, lo cual conduce, en ocasiones, al desarrollo de neoplasias y a la evolución de las mismas hacia procesos tumorales más agresivos³⁹.

El gen del retinoblastoma produce la pRB que actúa como un freno al progreso de la célula desde la fase G1 a la fase S del ciclo celular. Cuando la célula recibe el estímulo de los factores de crecimiento, la proteína Rb se inactiva, por lo que el freno desaparece y la célula atraviesa el punto de control G1-S. Si falta la proteína Rb o si una mutación altera su capacidad, el freno molecular del ciclo celular desaparecerá y la célula avanzará despreocupadamente hacia la fase S⁴⁴.

La ciclina D1 es una proteína inestable fundamental para la progresión de G1 mediante la activación del complejo CDK4/6 que lleva a la fosforilación de la proteína pRB. La fosforilación de la proteína pRB es esencial para la continuación del ciclo celular. Si pRB no está fosforilada se bloquea el ciclo celular. Se ha encontrado sobreexpresión de Ciclina D en carcinomas orales, pRb fosforilada libera un factor de transcripción que induce la activación de los genes que regulan la síntesis de ciclina E y ciclina A³⁹.

La síntesis de ciclina E comienza en la fase G1 tardía. Esta ciclina se une a la CDK2, formando un complejo activo que induce la síntesis de las enzimas y proteínas necesarias para la producción de ADN. La ciclina A tiene la misión de activar a la CDK1 durante la fase S. El complejo ciclina A/CDK1 promueve, durante la fase G2, la síntesis de las proteínas implicadas en la mitosis. Estas proteínas conducen finalmente a la división de la célula en la fase M³⁹.

Las CDK también son reguladas por los llamados inhibidores de las CDK (CDKI), donde encontramos la p16, la cual se une al complejo CDK4/CDK6 impidiendo su asociación con la ciclina D1 dando como resultado la detención del ciclo celular en G1 mediante la no fosforilación de pRB. El CDKI p27 comparte secuencias homólogas con p21 y actúa como un regulador negativo del ciclo celular implicado en la detención en la fase G1 mediante un mecanismo independiente de p53³⁹.

El gen p53, en condiciones de normalidad, codifica una fosfoproteína nuclear (proteína natural o salvaje) que actúa como un regulador negativo de la proliferación celular mediante una acción compleja, puesto que al mismo tiempo actúa como factor de transcripción, interruptor del ciclo celular e inductor de apoptosis. Cuando ocurren mutaciones en p53, se produce una síntesis anormal de proteína, proteína p53 mutada, que tiende a estabilizarse y acumularse en el núcleo. Esta proteína mutada pierde su capacidad supresora del crecimiento celular. La regulación negativa del p53 sobre la replicación ocurre ante diferentes tipos de agresiones en el ADN, aumentando entonces la cantidad de proteína nuclear p53. La consecuencia inmediata del incremento de p53 es la detención del ciclo celular en G1, actuando mientras los mecanismos de reparación del ADN. El gen p53 bloquea también la

angiogénesis, posible favorecedora del desarrollo y la diseminación tumoral, a través de la secreción de trombospondina-1 (TSP-1) por parte de los fibroblastos; de esta forma, en las células transformadas, la ausencia de p53 favorecería la inducción de la angiogénesis mediante una disminución de la secreción de TSP-1⁴⁴.

2.5. ANGIOGÉNESIS

La angiogénesis es uno de los primeros requisitos necesarios, para iniciar la cascada metastásica; una alteración en el balance de mediadores proangiogénicos (VEGF, FGF, PDGF) y antiangiogénicos (trombospondinas, interferones, endostatina, y angiostatina) puede ser crucial para la transición al fenotipo maligno, llamado "switch angiogénico"⁴⁵. La expresión endógena de VEGF fue mostrada como aumentada en varios cánceres y ha sido asociada con pobre pronóstico y metástasis en CEC oral⁴⁶.

2.6. INVASIÓN Y METÁSTASIS

La lesión maligna tiene la habilidad de invadir tejidos locales, extenderse a linfonodos regionales, y metastatizar a órganos distantes por medio de diversos mecanismos, tales como alteraciones en las interacciones célula-célula, degradación de la matriz extracelular, y transición epitelial mesenquimal⁶. La pérdida de las adhesiones intercelulares es uno de los eventos más precoces en el proceso de metástasis (Fig. 3).

Ahora se sabe que la formación de una metástasis es un evento biológico extremadamente complejo, de múltiples etapas y multifuncional. Esto resulta de una cascada molecular complejo a través del cual las células cancerosas dejan el sitio del tumor primario y difunden a los sitios anatómicos distantes, donde pueden proliferar y formar focos tumorales secundarios. La metástasis surge a través de una cascada de eventos, todos los cuales están interconectados a través de una serie de interacciones adhesivas y procesos invasivos, así como las respuestas a los estímulos quimiotácticos. Esta cascada de acontecimientos que incluye: el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos; el "escape" de las células tumorales desde el tumor primario; y la invasión de la migración a través de la membrana basal (BM) y la matriz extracelular (ECM) que rodea el epitelio tumoral; la invasión de la BM apoyar el endotelio de sangre local y / o vasos linfáticos; la intravasación de las células tumorales en la sangre y / o vasos linfáticos; la adhesión de las células tumorales circulantes al endotelio de los capilares del sitio órgano diana; la invasión de las células tumorales a través de la capa de células endoteliales y la BM circundante (extravasación); el crecimiento de tumores secundarios en el sitio de órgano diana⁴⁷ (Fig. 4).

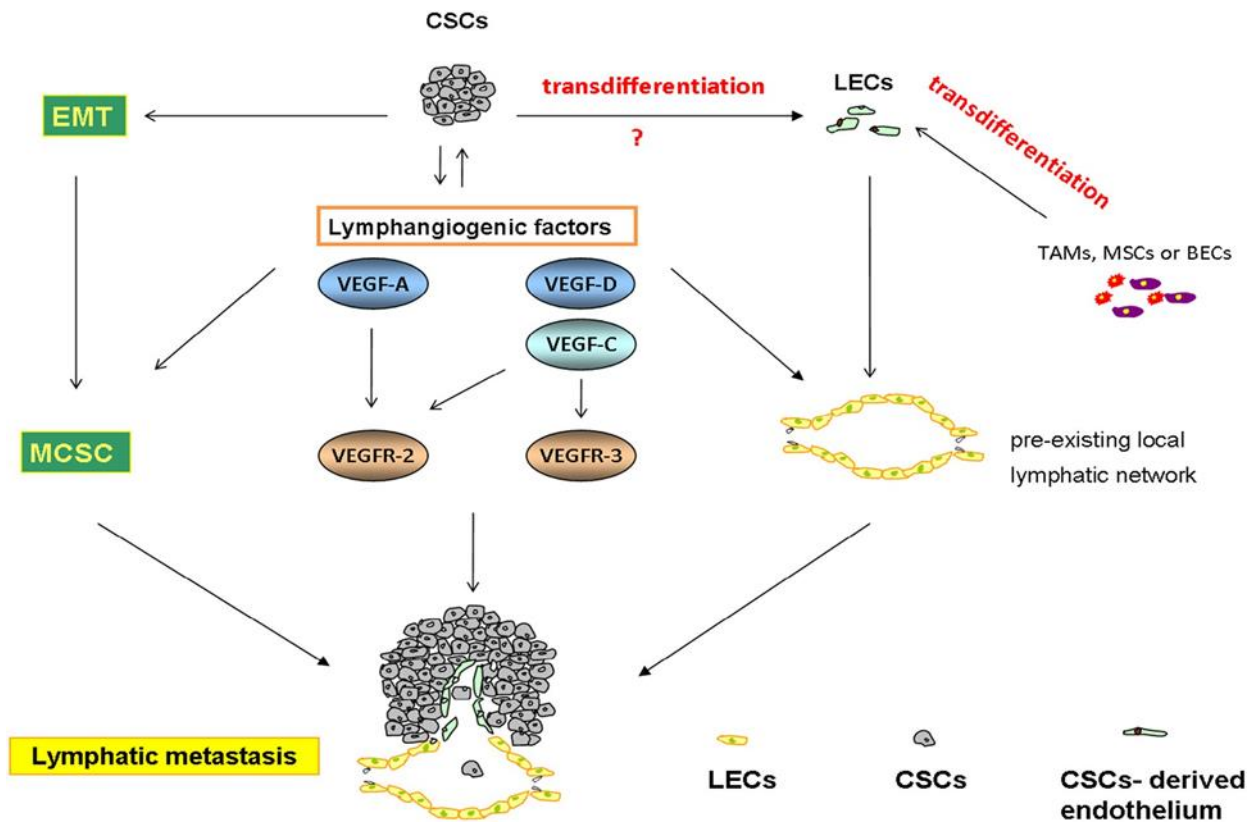


Figura 3. Esquema propuesto para la relación entre células madre cancerígenas y metástasis linfática. Células endoteliales linfáticas en linfangiogénesis se pueden derivar de diferentes células, incluyendo transdiferenciación directa de células madre de cáncer. Las células madre del cáncer también pueden participar en la linfangiogénesis a través de la generación de diversos factores linfangiogénicos. BEC: células endoteliales de la sangre; CSC: las células madre del cáncer; EMT: transición epitelio-mesenquimal; LEC: células endoteliales linfáticas; MCSC: la migración de las células madre del cáncer; MSCs: células madre mesenquimales; TAM: macrófagos asociados a tumores⁴⁸.

La Pérdida de la E-caderina ha sido mostrada para ocurrir temprano en la carcinogénesis epitelial, lo que se correlaciona con el desarrollo de metástasis linfonodal en CEC⁴⁹. La degradación de la membrana basal es otro proceso crucial para invasión y metástasis. La expresión aberrante de metaloproteinasas es considerada un evento precoz en la carcinogénesis epitelial y se correlaciona con un comportamiento tumoral agresivo⁵⁰. La transición epitelial-mesenquimal participa en la invasión de las células tumorales y metástasis. Las células epiteliales pierden su polaridad apical-basal, adhesión célula-célula, y estructura citoesqueletal, expresando proteínas de superficie que caracterizan a las células mesenquimales, siendo capaces de migrar a través de la membrana basal⁵¹.

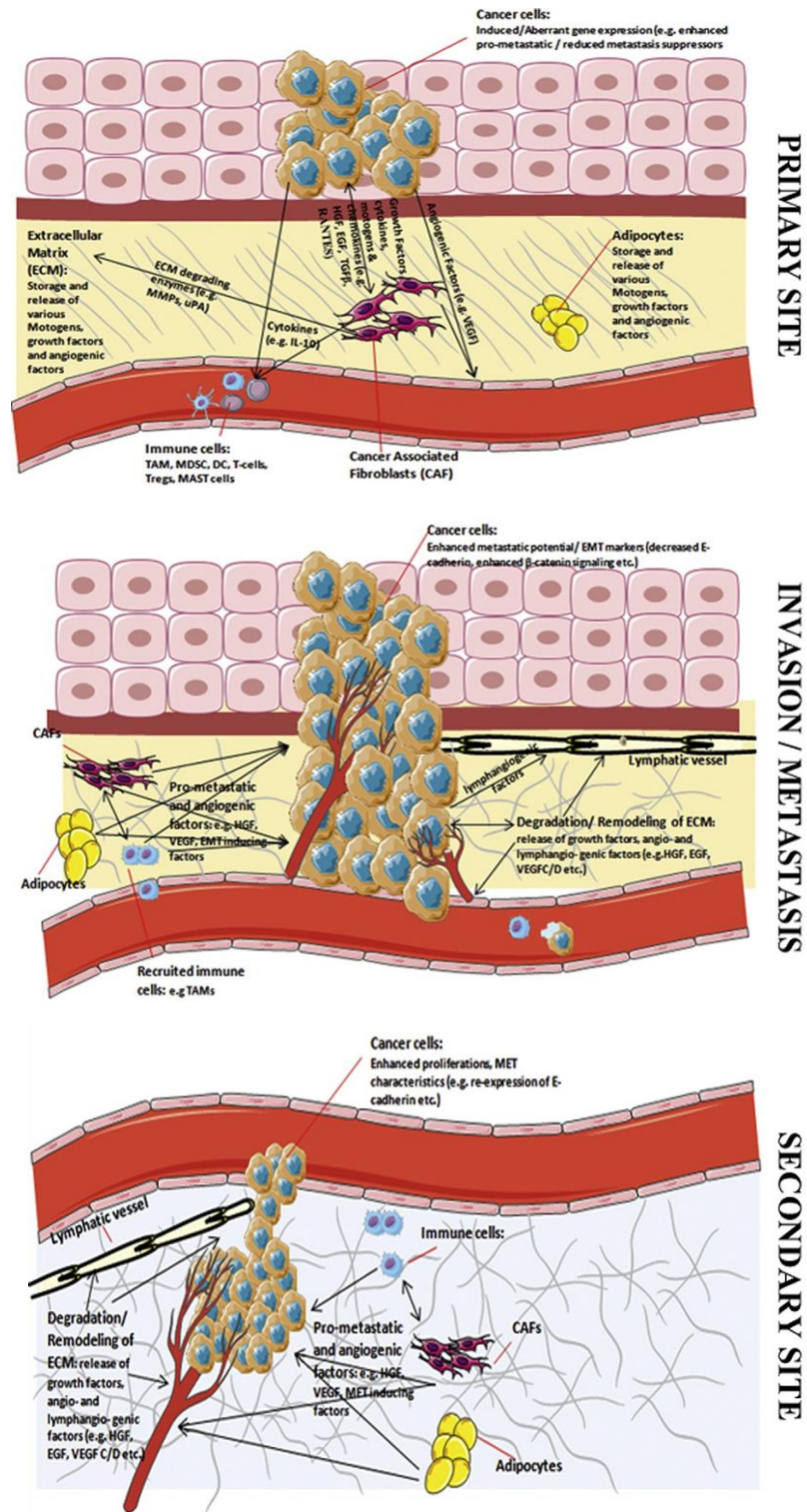


Figura 4. La cascada metastásica y potencial para la interrupción terapéutica. Los cambios en las

propiedades celulares son necesarios para permitir el desarrollo de un fenotipo invasivo y la progresión a través de la cascada metastásica. Se describen los principales acontecimientos de la cascada. Orientación de tales propiedades / eventos o las vías de señalización subyacentes utilizando medicamentos de baja toxicidad tiene un gran potencial para interrumpir la progresión de células de cáncer a través de esta cascada. Extraído de W.G. Jiang. Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives⁵².

El CEC tiene una alta propensión a metastatizar a linfonodos regionales debido a la presencia de una rica red linfática y un alto número de linfonodos en la región cervical⁴. Aun en pacientes sin evidencia clínica de compromiso linfonodal (N0), hay una alta incidencia de metástasis linfonodal oculta⁵. Las metástasis linfonodales subpatológicas ocultas presentan una incidencia promedio que va de 10% a 50%, siendo reportado hasta un 58% de incidencia⁵³, todo esto debido a que es difícil de determinar qué pacientes tienen un alto riesgo de enfermedad regional oculta³.

3. SISTEMAS LIGANDO-RECEPTOR DE QUIMIOQUINAS INVOLUCRADOS EN LA METÁSTASIS REGIONAL LINFONODAL

Un gran número de factores moleculares han sido considerados como marcadores predictivos para metástasis linfonodal en CEC; sin embargo, qué factores producidos por los linfonodos ayudan a las células cancerígenas a metastatizar a los linfonodos no está bien estudiado¹⁵. Los efectos paracrinos entre células de CEC y fibroblastos/miofibroblastos fueron estudiados; Es bien sabido que los miofibroblastos segregan moléculas de la matriz extracelular, enzimas degradantes, factores angiogénicos pro- y anti- inflamatorios, y estimulan la proliferación de células epiteliales y la invasión. Clásicamente cumplen un rol en la cicatrización de heridas, pero también están involucrados en el estroma tumoral reactivo. Siguiendo estos estudios se describe que una abundante presencia de miofibroblastos se correlaciona significativamente con el estadio N de la enfermedad, recurrencia regional y potencial proliferativo de las células tumorales, lo que afecta directamente la sobrevida del paciente; además se demostró que las células tumorales inducen transdiferenciación de los fibroblastos orales a miofibroblastos a través de la secreción de factor de crecimiento transformante- beta 1 (TGF-beta 1), lo que sugiere que esta transdiferenciación mediada por los miofibroblastos es fundamental para invasión tumoral y metástasis. Los miofibroblastos inducen la migración y la invasión mediante la secreción de MMPs, en especial MMP-2 y MMP-9 en CEC, lo que aumenta la metástasis a linfonodos^{9,10}; Es probable que la comunicación paracrina entre las células del CEC y fibroblastos linfáticos sea importante para la implantación de células metastásicas a linfonodos regionales como se menciona en la literatura. En este escenario, las quimioquinas jugarían un papel fundamental para la atracción de células cancerígenas al sitio metastásico.

Las Quimioquinas son una familia de proteínas ligadoras de heparina que actúan como atrayentes de leucocitos a los sitios de infección e inflamación¹¹. Ellas son producidas localmente en los tejidos y operan a través de GPCRs selectivas ligadas a membrana, tales como CCR y otros. Las quimioquinas también funcionan como moléculas reguladoras en la maduración de leucocitos y células dendríticas,

tráfico y alojamiento de linfocitos T y B, y en el desarrollo de tejidos linfoides¹¹. Recientemente, ellas han sido involucradas en el crecimiento tumoral y metástasis de diferentes tumores^{12,13,14,15,16}, pero hay poca información disponible acerca de la expresión de las quimioquinas en los linfonodos de pacientes con CEC.

3.1 SISTEMA LIGANDO CCL21/CCL19/CCR7:

Quimioquina	Nombre Alternativo	Tamaño (aa)	Receptor de quimioquina	Tipo de células controladoras	Funciones importantes	Uso clínico	Refs
CCL19	ELC, Exodus-3, Ck B11	96	CCR7	Célula dendrítica mieloide, Monocito, Linfocito T inmaduro, Linfocito T activado.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tráfico a los tejidos del timo y linfoides. ▪ Supresión de la proliferación de células madres hematopoyéticas. ▪ Formación de órganos terciarios linfoides. 	-	Broxmeyer, H.E. et al. (1999).
CCL21	SLC, 6Ckine, Ck B9, Exodus-2, TCA-4	134	CCR7	-	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Migración de monocitos. ▪ Supresión de la proliferación de células madres hematopoyéticas. ▪ Formación de órganos terciarios linfoides. 	-	Shields, J.D. et al. (2010)

Tabla IV. Extraído de la tabla I de la revisión de Hans-Joachim Anders et al., 2014⁵⁴.

CCL21/CCL19/CCR7 es un sistema receptor ligando de quimioquinas que fue recientemente asociado con metástasis linfonodal y pobre pronóstico^{17,18} (Tabla IV). El receptor es activado por sus ligandos CCL19 y CCL21, liberado por células endoteliales linfáticas y células T de los linfonodos¹⁶. El CCL21 promueve la migración y la invasión de las células cancerosas a través del CCR7. Cyclooxygenase2 (COX2) expresada en células tumorales genera prostaglandina E2 (PGE2) que amplifica la proliferación de células tumorales y la matriz extracelular (ECM) la degradación por metaloproteinasas 2 (MMP2) y MMP9. En respuesta al CCL21 las células tumorales polarizan, resultando en un borde delantero que sobresale hacia fuera, junto con las fuerzas contráctiles en la parte posterior y los lados de la célula que conduce a movimiento hacia la fuente de CCL21. Las células cancerosas migran a lo largo del gradiente de CCL21 hasta que alcanzan el sitio para la colonización secundaria, por ejemplo la zona de las células T de los ganglios linfáticos¹⁹ (Fig. 5).

No fue observada una asociación entre la expresión de CCL19, CCL21, y CCR7 con parámetros clínicos y microscópicos de los tumores primarios; sugiriendo que el eje CCR7/CCL21/CCL19 está menos comprometido en la metástasis linfonodal cervical de CEC oral que el eje CXCR4/CXCL12¹⁶, que ha sido propuesto como el principal sistema de quimioquinas que participa en la metástasis linfonodal de células de CEC oral^{55,56,57}.

Los resultados obtenidos por el estudio de Oliveira-Neto¹⁶ fueron pocos CCL19+ y CCL21+ en los ganglios linfáticos (con independencia de si era metastásico o no), la densidad de las células nodales CCL19+ ganglios fue mayor en los ganglios linfáticos no metastásicos que en los ganglios linfáticos metastásicos de diferentes pacientes. Paralelo a esos resultados, se demostró que los mismos ganglios linfáticos no metastásicos presentan una mayor densidad de linfocitos T citotóxicos activados (CD8+/perforina+) que los ganglios linfáticos metastásicos (datos no mostrados). En base a este hecho, se podría sugerir que la quimiocina CCL19 puede estar contribuyendo a la defensa del huésped contra la progresión del cáncer ya que los linfocitos T CD8+ expresan receptor CCR7.

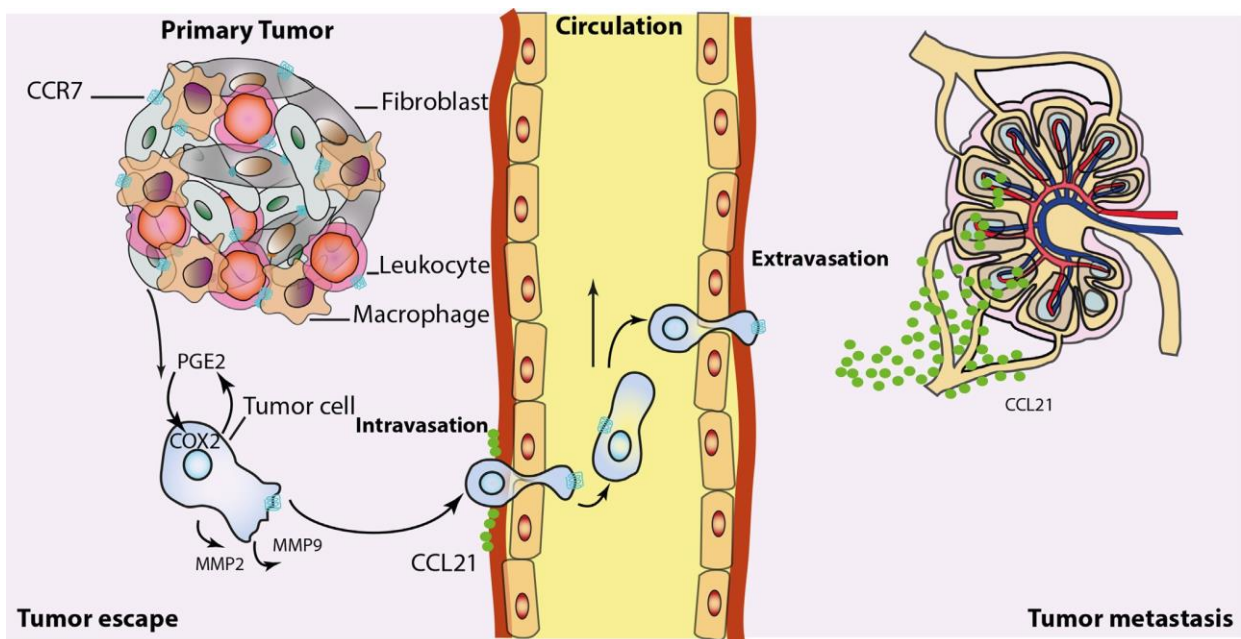


Figura 5. CCR7: un papel central en la difusión de las células tumorales, la migración y la formación de metástasis. La metástasis del cáncer es un proceso altamente dependiente de las interacciones entre las células tumorales y el estroma del huésped. Legler¹⁹.

4. CCR7 Y CÁNCER

El CCR7 es un receptor de quimioquina homeostática específico para linfocitos, miembro de la familia de receptores acoplados a proteína G el cual se encuentra en el cromosoma 17q12-q21.2 y tiene dos ligandos asociados (CCL19/CCL21)⁵⁸. Se ubica en los linfocitos y es expresado por varios subtipos de células inmunes (células T, B, NKs, células dendríticas semi maduras (DCs), entre otras) que migran hacia los órganos linfoides¹⁹. El CCR7 regula los mecanismos moleculares quimiotácticos responsables de dirigir las células T y DCs a los linfonodos⁵⁸. Generalmente un subconjunto de células T constitutivamente expresan CCR7, lo que les permite circular en el torrente sanguíneo, los vasos linfáticos y los órganos linfoides secundarios. En contraste las DCs adquieren expresión de CCR7 en la lucha contra patógenos, que permite el homing a los ganglios linfáticos y la presentación del antígeno a las células T, lo cual es crucial para una respuesta inmune adaptativa¹⁹. Al madurar las DCs, antes de presentar antígenos a las células T realizan una regulación baja de la mayoría de sus receptores y regulan de forma alta a CCR7. Después de la activación de las células T dentro del linfonodo la expresión de CCR7 disminuye⁵⁸.

Una asociación de CCR7 con cáncer fue reconocida en pacientes con leucemia, en donde las células T de pacientes adultos con infiltración linfonodal presentaron niveles significativamente altos de CCR7, en comparación con las células T normales o células de leucemia de pacientes sin compromiso linfoide. La expresión de CCR7 en células tumorales se ha reportado además en cáncer de mama, melanomas, cáncer de próstata, cáncer de estómago, cáncer de cabeza y cuello, entre otros¹⁹.

5. IDENTIFICACIÓN DE METÁSTASIS LINFONODAL Y ABORDAJE

El diagnóstico preciso de metástasis linfonodales continúa siendo desafiante, y muchos pacientes que no presentan diseminación del cáncer a linfonodos (N0) pueden ser sometidos a cirugía electiva innecesaria con la morbilidad asociada consecuente e impacto adverso en la calidad de vida^{21,59}. Actualmente, el gold standard para la identificación de metástasis linfonodales es el corte seriado y análisis histopatológico de los tejidos con tinción de H&E⁶⁰. Esta técnica se fundamenta en que la Eosina es un colorante ácido (predomina densidad de carga negativa), el cual se asocia y colorea a estructuras basófilas del citoplasma extracelular, tales como: filamentos citoplasmáticos, membranas intracelulares, fibras extracelulares; La Hematoxilina por otra parte se asocia actuando como un colorante básico asociándose a estructuras acidófilas como la heterocromatina, nucléolos, RNA ribosomal y matriz extracelular. La unión de ambas tinciones da una coloración violeta en los núcleos y una rojiza en el citoplasma. La detección de micrometástasis (0.2–2 mm) es aumentada por el corte seriado e inmunohistoquímica, detectando 5–58% (media de 20%) de metástasis⁵. Sin embargo, la inmunohistoquímica requiere de una inversión significativa de tiempo y dinero, y a menudo es realizada después

de la cirugía. Considerando la tasa de falsos negativos y el error del examen sólo con H&E, es necesario un test predictivo factible y rápido para determinar la metástasis linfonodal⁶¹.

Hoy en día, los linfonodos cervicales son estadiados por palpación y diferentes técnicas de imagen, incluyendo CT, MRI, PET/CT, y ecografía, las cuáles son más certeras que la palpación por sí sola⁶². La aplicación de nuevas tecnologías, incluyendo el perfil de la expresión génica y la biopsia de linfonodo centinela, muestra resultados promisorios^{63,64,65}. Además de las variables histológicas, muchos marcadores moleculares han sido estudiados para predecir la presencia de metástasis nodal, pero la complejidad del proceso metastásico lleva a correlaciones no consistentes ni clínicamente útiles para cualquier marcador^{5,66}. La linfangiogénesis ha sido involucrada en la progresión de la enfermedad del CEC y la formación reciente de vasos linfáticos sirve como un conducto primario para este propósito⁶⁷. Hay una evidencia aumentada de que varios factores de crecimiento están involucrados en las vías de señalización molecular, guiando al desarrollo de vasos linfáticos y diseminación de la malignidad a linfonodos regionales³⁷.

IV. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar y comparar la expresión inmunohistoquímica de CCR7 en tumores primarios y linfonodos metastásicos de pacientes con Carcinoma Espinocelular de cabeza y cuello con metástasis linfonodal y sin metástasis linfonodal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Asociar y comparar la expresión inmunohistoquímica de la molécula CCR7 en el tumor primario con la metástasis linfonodal.
2. Asociar la expresión inmunohistoquímica de la molécula CCR7 en tumor primario con la expresión de CCR7 en LN, en pacientes con metástasis.
3. Asociar la expresión inmunohistoquímica de CCR7 en el tumor primario con sobrevida, recidiva y estadio tumoral.

HIPÓTESIS COMPROBABLE

Hay una diferencia en la expresión inmunohistoquímica de CCR7 entre tumores primarios y linfonodos metastásicos de pacientes con Carcinoma Espinocelular de cabeza y cuello, con metástasis linfonodal y sin metástasis linfonodal.

V.MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Estudio Descriptivo Correlacional.

IDENTIFICACIÓN DE LA POBLACIÓN Y UNIVERSO

El Universo a estudiar fueron los informes histopatológicos correspondientes a cáncer realizados a pacientes del Hospital Carlos Van Buren de Valparaíso durante los años 2005 a 2015.

La población fueron aquellas muestras de disección cervical con diagnóstico de carcinoma espinocelular de cabeza y cuello con invasión a linfonodos y sin invasión a linfonodos.

DETERMINACIÓN Y SELECCIÓN DE LA MUESTRA

Se realizó un muestreo por conveniencia, disponiendo de un total de 84 pacientes divididos en pacientes con metástasis regional linfonodal (cT2-T3N0M0)⁴⁰ y pacientes sin metástasis regional linfonodal (cT2-T3N1-2M0)⁴⁸.

DEFINICIÓN DE VARIABLES

En la Tabla V se muestran y definen las variables a estudiar.

Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Tipo de Variable	Escala de Medición
Tumor primario	Es aquel tumor de carácter maligno que se presenta en el origen del cáncer previo a la metástasis.	Será el tumor que en la ficha médica haya sido considerado como el origen del cáncer.	Cualitativa nominal policotómica	Cavidad oral Labios Orofaringe Laringe
Edad	Tiempo que ha vivido una persona u otro ser vivo contando desde su nacimiento.	Tiempo que ha vivido una persona expresado en años según lo estipulado en las fichas seleccionadas	Cuantitativa continua	Años
Sexo	Condición orgánica que distingue masculino de femenino determinado por el cromosoma XY o XX respectivamente	Condición orgánica que distingue masculino de femenino según lo estipulado en las fichas seleccionadas	Cualitativa nominal dicotómica	Femenino Masculino
Fecha de defunción	Día, mes y año específico en que falleció una persona u otro ser vivo	Día, mes y año específico en que falleció una persona según lo estipulado en las fichas seleccionadas si corresponde.	Cuantitativa discreta	Día- mes- año en números
Localización del tumor	Sitio anatómico en que se encuentra una masa de tejido cuyas células sufren un crecimiento anormal y no tienen función fisiológica.	Sitio anatómico en que se encuentra el tumor según lo estipulado en las fichas seleccionadas	Cualitativa nominal independiente	Cavidad oral Labios Orofaringe Laringe
Tamaño tumor primario (T)	Estadificación de cáncer, que determina la gravedad de la enfermedad que aqueja a una persona según la extensión del tumor primario	Estadificación de cáncer, que determina la gravedad de la enfermedad que aqueja a una persona según la extensión del tumor primario medido en centímetros	Cualitativa continua	Tx: tumor primario no puede evaluarse. T0: no hay evidencia de tumor primario. Tis: Carcinoma in situ. T1-T4: Incremento del tamaño y/o la

				extensión local del tumor primario.
Estadio Tumoral	<p>Clasificación para cada subgrupo de la estadificación TNM.</p> <p>ESTADIO I: indica que el tumor es menor de 2 cm y no hay metástasis. El índice de supervivencia relativa a 5 años es del 98%.</p> <p>ESTADIO II: - No mide más de 2 cm pero los ganglios linfáticos de la axila están afectados. - Mide entre 2 y 5 cm y puede o no haberse extendido.- Mide más de 5 cm pero los ganglios linfáticos axilares no están afectados. El índice de supervivencia a 5 años es del 88-76%.</p> <p>ESTADIO III:El estadio III A:- El tumor mide menos de 5 centímetros y se ha diseminado a los ganglios linfáticos axilares y éstos están unidos entre sí o a otras estructuras.- El tumor mide más de 5 cm y los ganglios linfáticos axilares están afectados. El índice de supervivencia relativa a 5 años es del 56%.El estadio III B:- El cáncer se ha extendido a otros tejidos cerca de la mama (piel, pared torácica, incluyendo costillas y músculos del tórax).- El cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos dentro de la pared torácica cerca del esternón. El índice de supervivencia relativa a 5 años es del 46%.</p> <p>ESTADIO IV: se produce cuando el cáncer se ha diseminado a otras estructuras del cuerpo. El índice de supervivencia relativa a 5 años</p>	Estadio I, II, III o IV según lo determinado en las fichas seleccionadas	Cualitativa ordinal	Estadio I Estadio II Estadio III Estadio IV

	es del 16%.			
Metástasis linfonodal (N)	Penetración de células tumorales a un vaso linfático, que son transportadas por la linfa hasta el ganglio linfático regional, en donde proliferan e invaden el ganglio, constituyendo una metástasis linfonodal.	Presencia o ausencia de metástasis linfonodal según lo estipulado en las fichas seleccionadas	Cualitativa nominal dicotómica	Sí No

Metástasis a distancia (M)	Diseminación de las células cancerígenas desde el tumor primario hasta órganos o nódulos linfáticos lejanos	Presencia o ausencia de metástasis a distancia según lo estipulado en las fichas seleccionadas	Cualitativa nominal dicotómica	Si No
Fecha del diagnóstico	Día, mes y año específico en que se diagnostica enfermedad de la persona.	Día, mes y año específico en que se diagnostica enfermedad de la persona; Se buscará en los registros el día cuando fue realizado el examen histopatológico que corrobora el diagnóstico.	Cuantitativa discreta	Día-mes-año en números
Fecha de inicio de tratamiento	Día, mes y año específico en que se inicia un tratamiento independiente la índole de este.	Día, mes y año específico en que se inicia un tratamiento independiente la índole de este, en nuestro caso se clasificará en: -De inmediato: posterior al diagnóstico. -Avanzado: hasta 6 meses luego del diagnóstico. -Tardío: posterior a los 6 meses del diagnóstico.	Cuantitativa discreta	Día/mes/año expresado en números

Tabla V. Definición de variables del estudio.

PLAN DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Selección de los casos

Las muestras (84 tumores primarios y 15 linfonodos) fueron obtenidos de los archivos del Laboratorio de Anatomía Patológica de HCVB. Las muestras correspondientes a tejidos parafinizados de CECCyC fueron sometidas a estudio inmunohistoquímico. Dos placas serán teñidas con H&E para evaluar el tumor y la metástasis nodal. Los datos clínico-patológicos, tales como género, edad, tamaño del tumor, localización, tratamiento y sobrevida, fueron colectados desde las fichas de los pacientes.

Tissue Microarray

Los Tissue microarrays (TMA) fueron contruidos desde los tejidos parafinizados archivados (Fig. 6), usando un tissue arrayer manual (Quick-Ray Manual Tissue Micro-arrayer, Unitma Co, Ltd, Seoul, Korea). Las áreas ricas en células tumorales fueron identificadas por microscopía de luz de los cortes en hematoxilina & eosina de cada muestra. Las áreas de necrosis y/o gran infiltrado leucocítico fueron evitadas. Cilindros de tejido con un diámetro de 2 mm fueron obtenidos de cada bloque y luego transferidos a un taco recipiente de parafina, resultando en un array para 60 casos. Controles negativos y positivos serán incluidos en el TMA. El taco de parafina de TMA fue cortado en secciones de 5- μ m usando técnicas standard.



Figura 6. Fotografía mostrando el tejido parafinizado con los cortes realizados para el montaje del TMA.

Inmunohistoquímica

El anticuerpo analizado con inmunohistoquímica fue anti-CCR7 policlonal (Pierce, cod. PA533401). Secciones de 3- μ m de grosor fueron usadas para el análisis inmunohistoquímico. Posteriormente, las placas fueron tratadas con peróxido de hidrógeno al 3% en metanol para eliminar la peroxidasa endógena, incubada con suero de cabra al 100% a temperatura ambiente por 30 minutos y luego a 4°C overnight con la afinidad de los anticuerpos primarios purificados diluidos en suero de cabra al 100%. El kit Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories) conteniendo un apropiado anticuerpo secundario marcado con biotina fue usado de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El sistema EnVision fue usado para la detección del

anticuerpo (Dako, Copenhagen, Denmark). La tinción inmunohistoquímica fue visualizada por 3-diaminobenzidina tetrahidroclorida. Los cortes fueron contrateñidos con hematoxilina, deshidratados en xileno y montados en portaobjetos.

Sistema IRS:

El análisis de las secciones teñidas fue realizado por un observador con un microscopio óptico de luz el cual utilizó el análisis semi-cuantitativo basándose en el sistema de puntuación inmunorreactiva (IRS) hecha por Remmele y Stegner (Tabla VI).

Porcentaje de células positivas	X intensidad de tinción	=IRS (0-12)
0= Sin células positivas	0= Sin reacción de color	0-1= Negativo
1= <10% células positivas	1= Leve reacción	2-3= Leve
2= 10-50% células positivas	2= Moderada reacción	4-8= Moderado
3= 51-80% células positivas	3= Intensa reacción	9-12= Fuertemente positivo
4= >80% células positivas		
IRS - Puntos		IRS - Clasificación
0-1		0= Negativo
2-3		1= Positivo, expresión débil
4-8		2= Positivo, expresión leve
9-12		3= Positivo, expresión fuerte

Tabla VI. Clasificación de puntuación para el sistema IRS. (Daniel Kaemmerer, Luisa Peter, 2012).

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los grupos fueron comparados con el test Shapiro-Wilk, para determinar su distribución.

Se realizó un análisis descriptivo de las variables, dentro de los cuales se incluyeron:

a. Medidas de Localización

Media Aritmética: Corresponde al cálculo simple del promedio de un conjunto de datos x_1, x_2, \dots, x_n . Se obtiene al dividir la sumatoria del conjunto de datos de la variable sobre el número total de datos.

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Mediana: Corresponde al valor de la variable que deja sobre si y bajo si el 50% de los datos. La mediana corresponde también al percentil 50 (P50) y al cuartil 2 (Q2).

Mínimo: Corresponde al valor más pequeño de una variable en el conjunto de datos en estudio.

Máximo: Corresponde al mayor valor de una variable en el conjunto de datos en estudio.

b. Medidas de Dispersión

Si bien las medidas de tendencia central son importantes como medidas de resumen de un conjunto de datos, no siempre son exhaustivas, razón por la cual habitualmente ellas se complementan con las denominadas medidas de dispersión, que son aquellas que entregan información respecto de la variabilidad de los datos alrededor de una medida de centralidad dada. Una de las medidas de dispersión más conocidas es la desviación estándar, que es un indicador de la dispersión de un conjunto de datos alrededor de su promedio. Esta medida corresponde a la raíz cuadrada de la varianza.

Varianza: En vista de un conjunto de datos x_1, x_2, \dots, x_n , con media aritmética su varianza se calcula a través de la siguiente expresión:

$$S^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

Es evidente que al ser S^2 , varianza muestral, una suma de cuadrados tomará siempre valores positivos. Cuando $S^2 = 0$ indica que todos los x_i coinciden con la media, es decir, todas las observaciones están concentradas en un mismo punto, en cuyo caso se dice que la dispersión es nula. Cabe mencionar que la desviación estándar es la raíz cuadrada de la varianza y es la medida que se utilizará e interpretará.

El nivel de significancia usado será de 5% ($p=0.05$) en todas las pruebas. Los gráficos y tablas serán construidos con el programa EXCEL.

VI. RESULTADOS

En total, 84 biopsias de pacientes ingresados al hospital Carlos Van Buren con CECCyC fueron seleccionadas y estudiadas para evaluar la expresión Inmunohistoquímica de la molécula CCR7, tanto en tumor primario como en linfonodos, en pacientes con metástasis linfonodal y sin metástasis linfonodal.

La descripción de la población en estudio y las respectivas variables se muestran en la Tabla VII.

Variables	Grupo Sin Metástasis	Grupo Con Metástasis	Total
Edad			
<40	2	0	2
40-49	2	7	9
50-59	8	10	18
60-69	12	9	21
>70	22	12	34
Género			
Masculino	34	25	95
Femenino	12	13	25
Localización			
Cavidad Oral			
Lengua	11	6	17
Mucosa Labial superior	1	0	1
Mucosa yugal	1	1	2
Paladar Duro	2	1	3
Piso de boca	2	4	6
Reborde alveolar inferior	0	1	1
Reborde alveolar superior	2	0	2
Trígono retromolar	2	0	2
Labio			
Labio inferior	5	3	8
Laringe	14	8	22
Orofaringe			
Amígdala	2	8	10
Base de Lengua	1	3	4
Orofaringe	3	3	6
Radioterapia			
Sí	26	34	60
No	20	4	24
Quimioterapia			
Sí	12	26	38
No	34	12	46
Metástasis a distancia			
Sí	0	0	0
No	46	38	84

Recidiva			
Sí	7	6	13
No	39	32	71
T (TNM)			
1 (menor o igual a 2 cms)	4	3	7
2 (entre 2 y 4 cms)	12	10	22
3 (mayor a 4 cms)	16	12	28
4 (Invade estructuras vecinas)	14	13	27
N (TNM)			
0 (sin nódulos palpables)	46	4	50
1 (≥ 3 cms)	0	9	9
2 (entre 3 y 6 cms)			
2 ^a	0	15	15
2 ^b	0	3	3
2 ^c	0	2	2
3 (mayor a 6 cms)	0	5	5
M (TNM)			
0 (no hay metástasis a distancia)	46	38	84
1 (metástasis a distancia)	0	0	0
Estadío tumoral			
I	4	2	6
II	12	3	15
III	16	5	21
IV A	14	20	34
IV B	0	8	8
Tabaquismo			
Sí	30	32	62
No	12	6	18
Sin información	4	0	4
Alcoholismo			
Sí	26	21	47
No	16	17	33
Sin información	4	0	4
Fallecido			
Sí	22	20	42
No	24	18	42
Total	46	38	84

Tabla VII. Datos demográficos y clinicopatológicos de los pacientes.

Respecto a la expresión de la molécula en tumor primario y en linfonodo, se registró que el 48% de las muestras han tenido una expresión moderada de la molécula CCR7 en un tumor primario, siendo seguida por un 24% de las muestras que no han tenido expresión. Por otra parte, la expresión en linfonodos un 11% de ellas han tenido una expresión fuerte, y un 26% una expresión moderada. Gráfico N°1.

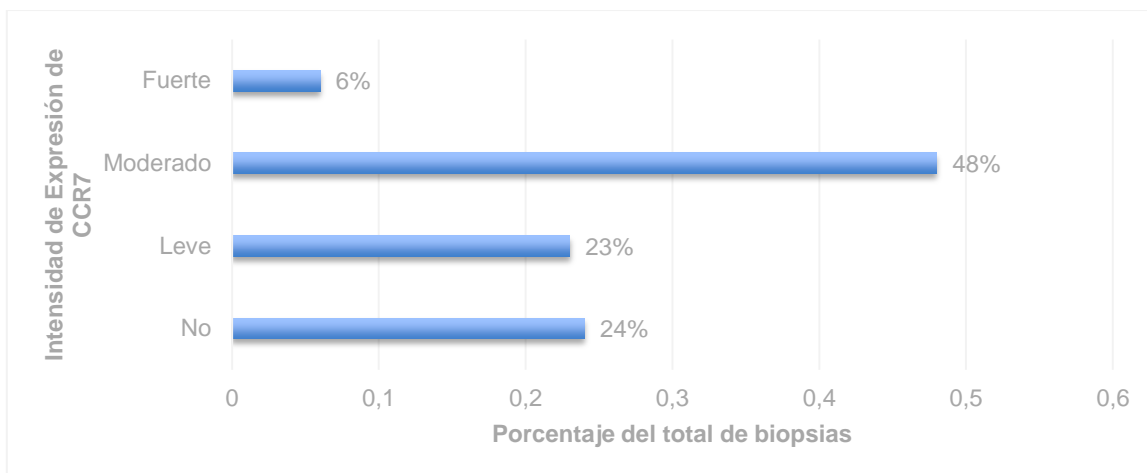


Gráfico N° 1. Porcentaje de pacientes según expresión CCR7 en tumor primario.

En la tabla VIII se muestra la distribución de las biopsias respecto a la localización del tumor primario, en donde el 40% del total de las biopsias corresponden a cavidad oral y el menor porcentaje (10%) se da en labio.

Localización del Tumor	N° de Biopsias	% de Biopsias
Cavidad Oral	34	40%
Laringe	22	26%
Orofaringe	20	24%
Labio	8	10%

Tabla VIII. Localización del tumor primario.

Al observar los tratamientos que recibieron los pacientes, del total de los casos un 71% tuvo radioterapia, mientras que el 55% de ellas tuvieron quimioterapia.

Del total de los casos analizados el 45% presentaron metástasis linfonodal. 0% de los casos presentó metástasis a distancia (M 0 del TNM). En los pacientes que presentan metástasis linfonodal, la mayoría de ellos tienen una expresión moderada de la molécula CCR7 en tumor primario, con un 47% de las muestras, seguidas por la expresión Leve con un 29%. En los pacientes que no presentan metástasis también la mayoría tiene una expresión moderada de la molécula CCR7 en tumor primario, pero el 33% de ellos no tiene expresión de la molécula. (Tabla IX).

Expresión CCR7 Tumor Primario	Presencia de Metástasis Linfonodal		
	No	Sí	Total
No	15(33%)	5(13%)	20
Leve	8(17%)	11(29%)	19
Moderado	22(48%)	18(47%)	40
Fuerte	1(2%)	4(11%)	5
Total	46	38	84
			valor-p = 0.073

Tabla IX. Distribución de Biopsias según presencia de metástasis linfonodal y expresión de molécula CCR7 en tumor primario.

De los 15 casos de metástasis linfonodal 8 presentaron una expresión de CCR7 linfonodal moderada cuando la expresión de CCR7 en el tumor primario fue moderada. (Tabla X)

CCR7 en tumor primario		CCR7 LN				Total
		No	Leve	Moderado	Fuerte	
CCR7 en tumor primario	No	20((24%)	-	-	-	20
	Leve	17(20%)	-	2(2%)	-	19
	Moderado	29(35%)	1(1%)	8(10%)	2(2%)	40
	Fuerte	3(4%)	-	-	2(2%)	5
Total		69	1	10	4	84
			valor-p = 0.007			

Tabla X. Relacion de la expresión de CCR7 en tumor primario y CCR7 linfonodal.

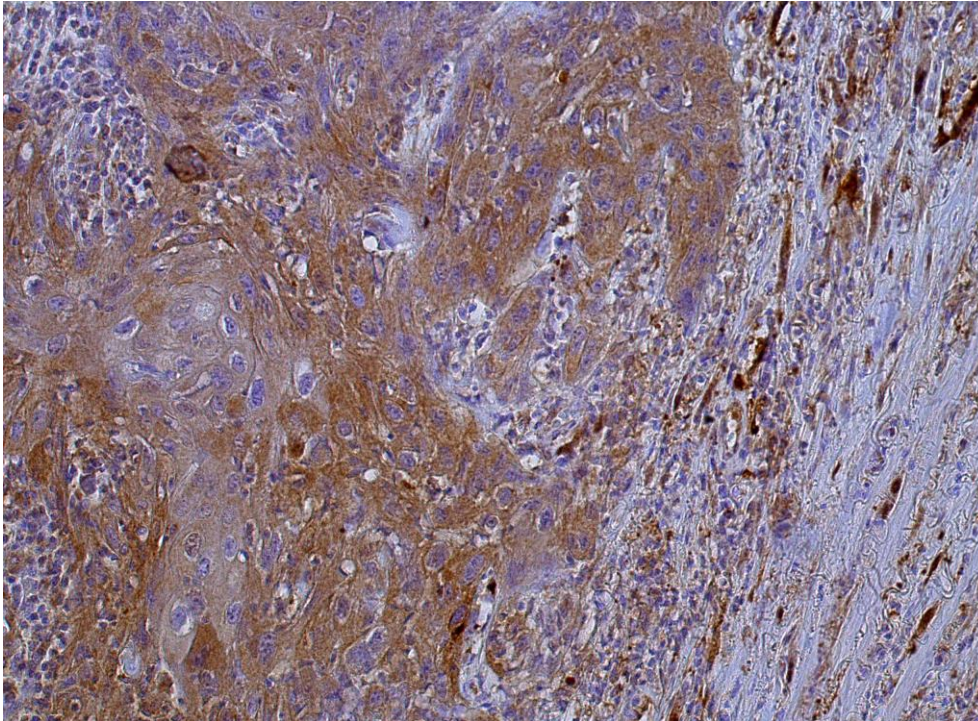


Figura 7. Caso 1844-10 primario sin metástasis linfo-nodal, mostrando marcación fuerte en un área del frente de invasión tumoral (200x).

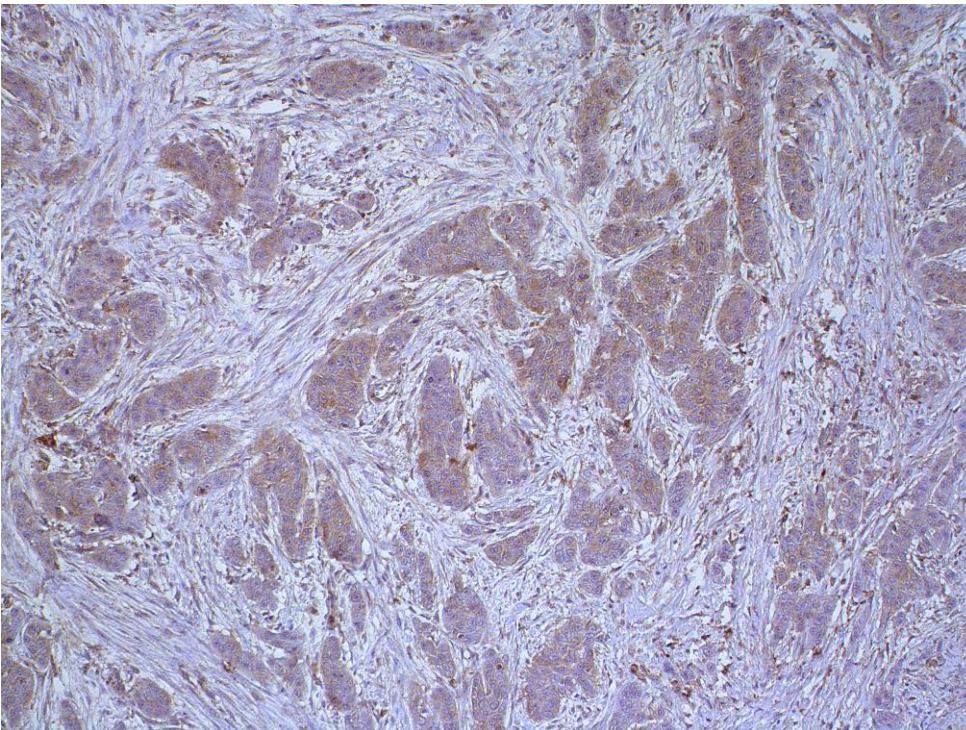


Figura 8. Caso 2097-10 primario sin metástasis, mostrando marcación leve en el frente de invasión en pequeñas islas (200x).

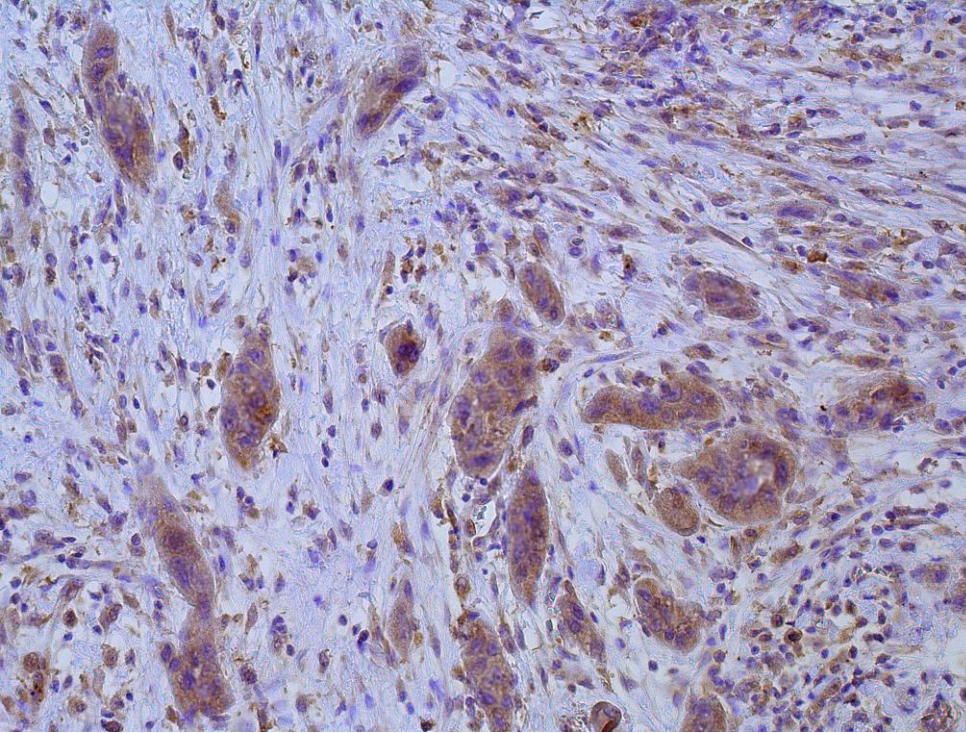


Figura 9. Caso 1240-07 primario con metástasis, mostrando una mayor marcación en el frente de invasión en pequeñas islas y células (200x).

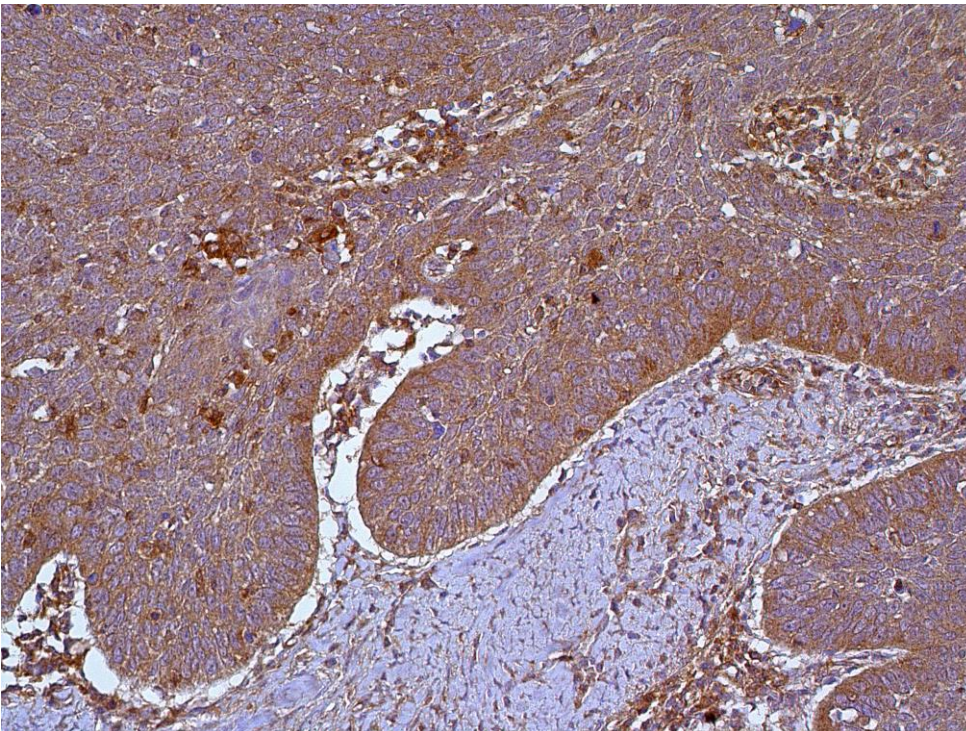


Figura 10. Caso 5214-14 primario sin metástasis, mostrando fuerte marcación en el frente de invasión en un patrón más cohesivo (200x).

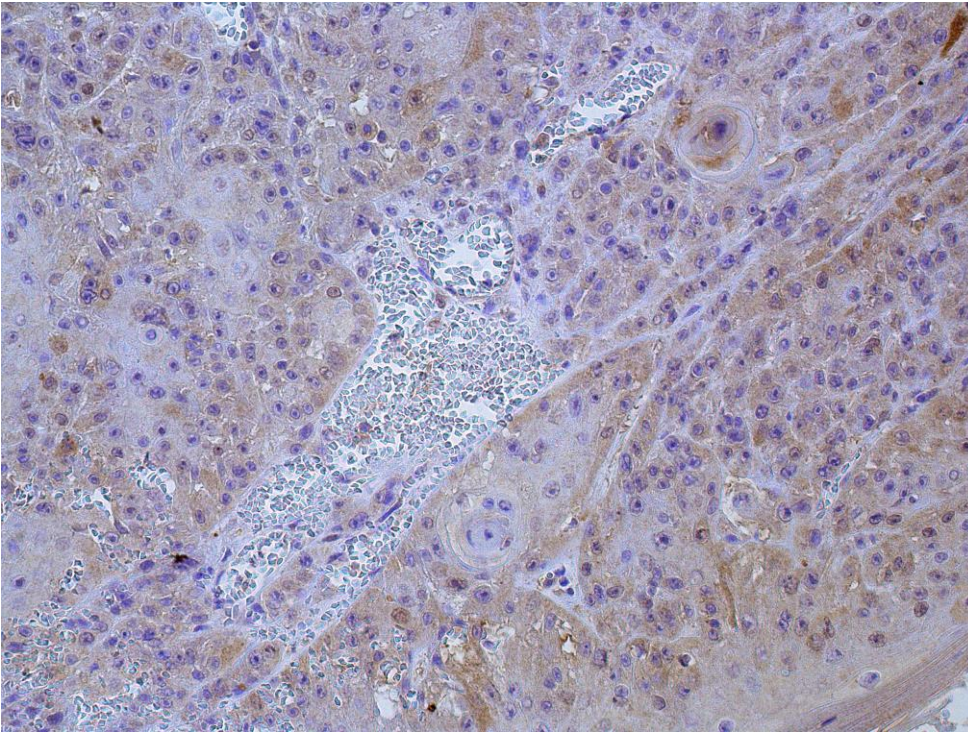


Figura 11. Caso 1240-07 linfonodo, mostrando marcación moderada en la metástasis (200x).

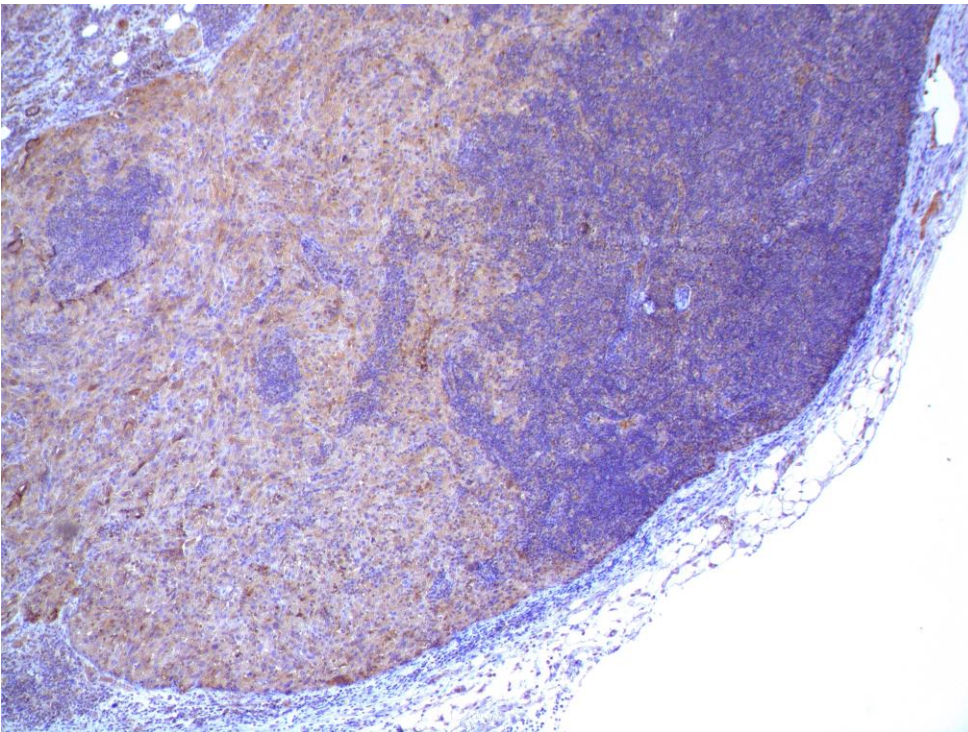


Figura 12. Caso 3898-13 linfonodo, mostrando marcación en todas las células metastásicas en imagen de bajo aumento (50x).

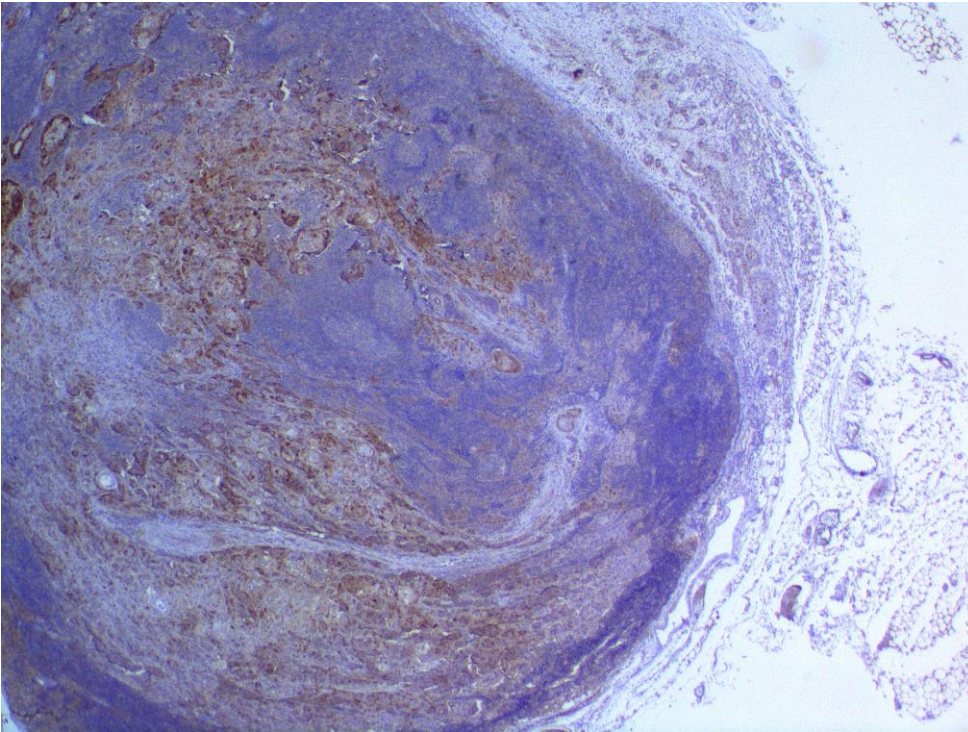


Figura 13. Caso 2875-07 linfonodo, mostrando fuerte marcación en imagen de bajo aumento de la metástasis infiltrando el linfonodo (5x).

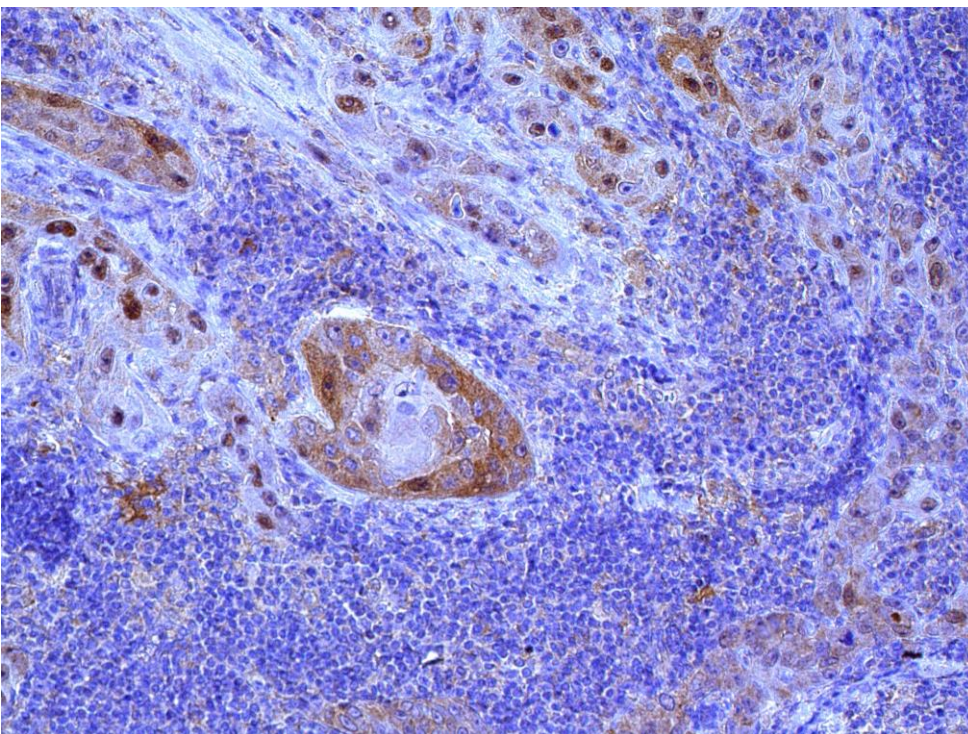


Figura 14. Caso 2875-07 linfonodo, mostrando las pequeñas islas entre los centros germinativos del linfonodo (200x).

Del total de los pacientes tratados, el 15% presentó recidiva, de estos pacientes un 23% se asoció con una expresión del CCR7 en tumor primario leve, mientras que el 69% se asoció con una expresión moderada. (Tabla XI). Además la expresión del CCR7 en Linfonodo en pacientes con recidiva, un 25% fue Fuerte, mientras que un 20 % moderado. (Tabla XII).

Expresión CCR7 Tumor primario					
Recidiva	No	Leve	Moderado	Fuerte	Total
Sí	1 (8%)	3 (23%)	9 (69%)	-	13
No	19 (27%)	16 (23%)	31 (44%)	5 (7%)	71
Total	20	19	40	5	84

valor-p = 0.251

Tabla XI. Expresión de CCR7 en tumor primario según presencia/ ausencia de recidiva.

Expresión CCR7 LN					
Recidiva	No	Leve	Moderado	Fuerte	Total
Sí	0 (0%)	0 (0%)	2 (20%)	1 (25%)	3
No	0 (0%)	1 (100%)	8 (80%)	3 (75%)	12
Total	0	1	10	4	15

valor-p = 0.736

Tabla XII. Expresión de CCR7 en linfonodo según presencia/ ausencia de recidiva.

La distribución de los pacientes según el diámetro del tumor (variable T (TNM)) se muestra en el gráfico N° 2.

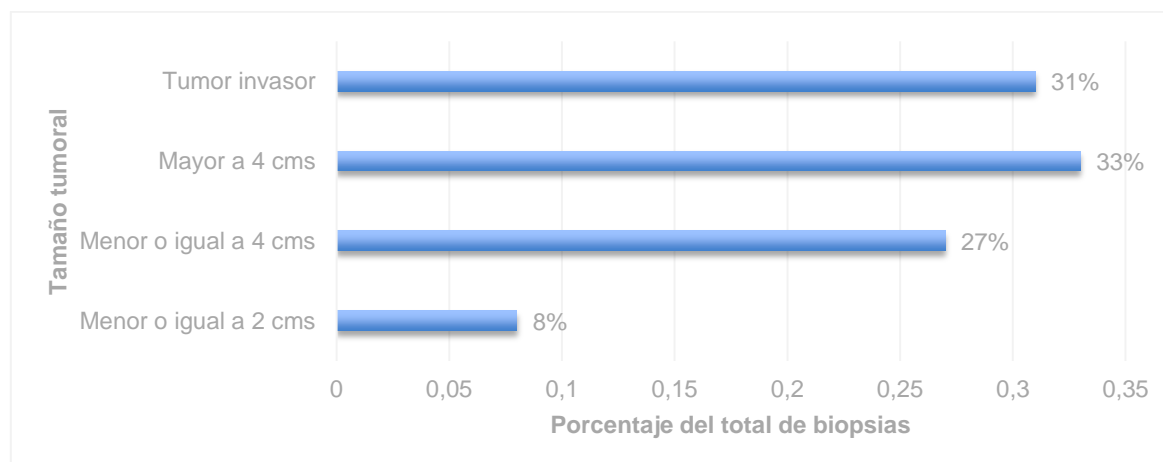


Gráfico N°2. Distribución según T (TNM).

Se aprecia que del total de 40 pacientes que tuvieron una expresión moderada de la molécula CCR7, un 38% de ellas pertenecen a un tumor mayor a 4 cm, un 33% a un tumor invasor y un 28% menor o igual a 4 cm pero mayor a 2 cm. En las muestras que presentaron una expresión Fuerte, el 60% de ellas pertenece a centímetros mayores a 4 cm. Además cabe mencionar que la mayoría de las muestras pertenecen a tumores mayores a 4 cm. De acuerdo a la expresión en linfonodos, de las 10 muestras que presentaron una expresión moderada, el 50% pertenece a tumores mayores a 4 cm. (Tabla XIII)

T(TNM)	Tumor Primario				Tumor LN			
	No	Leve	Moderado	Fuerte	No	Leve	Moderado	Fuerte
T1	3 (15%)	3 (16%)	1 (3%)	-	-	-	-	-
T2	6 (30%)	5 (26%)	11 (28%)	1 (20%)	-	-	4 (40%)	2 (50%)
T3	7 (35%)	3 (16%)	15 (38%)	3 (60%)	-	-	5 (50%)	-
T4	4 (20%)	8 (42%)	13 (33%)	1 (20%)	-	1 (100%)	1 (10%)	2 (50%)
Total	20	19	40	5	0	1	10	4
valor-p = 0.405					valor-p = 0.606			

Tabla XIII. Expresión de CCR7 en tumor primario y linfonodo según tamaño tumoral (T de TNM).

En lo que respecta a la distribución de los pacientes según el estadio del cáncer, del total de pacientes, un 50% de ellos presentan un estadio de cáncer IV (40% IVA, 10% IVB), y el 60% de los pacientes presenta un estadio avanzado (III/IV). Gráfico N° 3. Del 40% de los pacientes con Estadio IVA, un 53% de ellos ha presentado una expresión Moderada de la molécula CCR7 en tumor primario. Cabe mencionar que en los estadios primarios de cáncer la expresión es mayormente Leve o no se ha expresado. (Tabla XIV) Además para la expresión de la molécula CCR7 en linfonodos, en los casos que se ha obtenido expresión, la mayoría ocurre en los estadios avanzados del cáncer (Tabla XV).

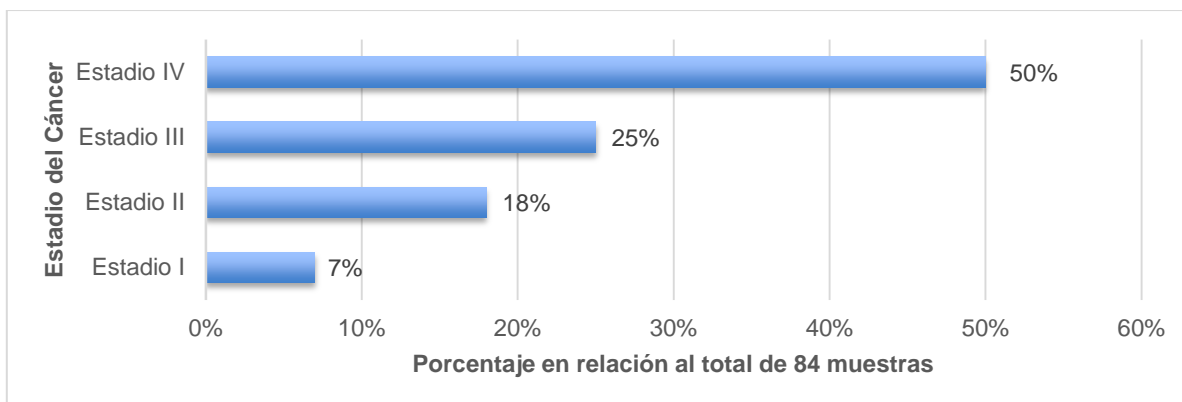


Gráfico N° 3. Distribución de pacientes según Estadio del Cáncer.

Expresión CCR7 Tumor primario			
Estadio	No- Leve	Moderado-Fuerte	Total
1 (I-II)	15 (18%)	6 (7%)	21
2 (III- IV)	24 (29%)	39 (46%)	63
Total	39	45	84

valor-p = 0.008

Tabla XIV. Expresión de CCR7 en tumor primario según estadio clínico.

Expresión CCR7 LN				
Estadio	No	Leve	Moderado-Fuerte	Total
1 (I-II)	20 (24%)	0 (0%)	1 (1%)	21
2 (III- IV)	49 (58%)	1 (1%)	13 (16%)	63
Total	69	1	14	84

valor-p = 0.192

Tabla XV. Expresión de CCR7 en linfonodo según estadio clínico

De los pacientes que han presentado metástasis linfonodal, un 64% de ellos son pacientes que son adictos al tabaco o presentan tabaquismo, un 55% de ellos son considerados pacientes con alcoholismo y un 53% de ellos tienen la condición de alcoholismo y tabaquismo a la vez.

Un 50% de los pacientes ha sobrevivido, de ellos un 53% ha presentado una expresión moderada. (Tabla XVI)

Expresion CCR7 Tumor primario	Sobrevida		Total
	Si	No	
No	11 (26%)	9 (21%)	20
Leve	8 (19%)	11 (26%)	19
Moderado	22 (53%)	18 (43%)	40
Fuerte	1 (2%)	4 (10%)	5
Total	42	42	84

valor-p = 0.347

Tabla XVI. Distribución de Pacientes según sobrevida y expresión de molécula CCR7 en tumor primario.

Para determinar la dependencia entre las variables, se realizaron tablas de contingencia. El criterio para decidir si existe dependencia o no, se realizó observando el valor-p que es la probabilidad mínima de equivocarse en tomar la decisión, se comparará con un nivel de significancia del 5%.

Al observar las posibles dependencias que pueda obtener la expresión de la molécula CCR7 en tumor primario, se puede observar en la Tabla XVII, un resumen con cuales variables existe independencia o no. La expresión de la molécula CCR7 en tumor primario muestra un comportamiento de dependencia con las siguientes variables: N (TNM), Estadio tumoral y la expresión de CCR7 en linfonodos.

Variable	CCR7 Primario
T (TNM)	No
N (TNM)	No
Sobrevida	No
Recidiva	No
Estadio	Sí
CCR7 LN	Sí

Tabla XVII. Resumen de independencia de variables de interés con la expresión de molécula CCR7 en tumor primario.

VII. DISCUSIÓN

La base molecular de la migración de células tumorales y la metástasis a ganglios linfáticos no se entiende completamente, y puede ser debido al resultado de la interacción entre las células tumorales y un microambiente de apoyo. Son varios los autores que sugieren que el CCR7 desempeña un papel importante en la migración, invasión y proliferación celular de la metástasis del CECCyC y que intentan explicar los mecanismos del proceso^{12,16,19,21,59,60}.

En nuestro estudio, del total de 84 biopsias seleccionadas de pacientes del Hospital Carlos Van Buren de Valparaíso durante los años 2005 a 2015, 38 muestras (45%) presentaron metástasis linfonodal, semejante a lo descrito en los estudios de Tsuzuki²⁰ (50%) y Shang¹⁷ (46%). Los datos clínico patológicos de nuestra población se condicen con el perfil clásico establecido por la literatura para CECCyC, siendo hombres entre 50-70 años, fumadores y bebedores^{2,31,33}. La población en estudio mostró la mayor incidencia sobre los 50 años de edad. Respecto a los factores de riesgo clásicos evaluados en el estudio, éstos se encontraron en la mayoría de la población. Los pacientes fumadores correspondieron al 73,8% y los pacientes alcohólicos fueron el 55,95%.

La localización más frecuente del tumor en cavidad oral fue lengua (50%) y en orofaringe fue amígdala (50%), lo cual también ha sido reportado en la literatura². La mayoría de los casos fueron diagnosticados en estadios avanzados, lo que también ha sido reportado en la literatura y ha sido directamente asociado a una menor supervivencia^{59,58}.

Dentro de los hallazgos principales, destacamos que en el total de muestras de tumor primario estudiadas, el 76% expresó la molécula CCR7, mientras que un 24% las muestras no tuvieron expresión, mostrando que el CCR7 puede tener una importancia en el comportamiento del cáncer y su patogenia. De los pacientes que tuvieron metástasis (n=38), un 13% no tuvo expresión, mientras que un 87% tuvo expresión positiva, sugiriendo que el posible papel de esta molécula sea en el proceso de invasión y metástasis, ya que incluso se observó una mayor marcación en varios tumores en el frente de invasión comparado con lo observado en el centro tumoral. Al medir la expresión de dicha molécula en linfonodos (n=15), hubo un 100% con expresión positiva. En la literatura se sugiere que la molécula CCR7 tiene un rol en el desarrollo de metástasis linfonodal^{12,16,20,17,19,68,69,70} a través de la quimio atracción de las células neoplásicas por las quimioquinas CCL19 y CCL21, cuyos niveles se encuentran elevados en los linfonodos metastásicos que presentan expresión positiva de CCR7¹⁶. La interacción de CCR7 y CCL19 promueve migración celular y adhesión en la metástasis del CECCyC vía ERK1/2 y JNK, miembros de MAPK, que no sólo induce la migración de células, sino también la velocidad de la invasión⁶⁹. Por lo tanto serían éstas células positivas para receptores de CCR7 las que tendrían una mayor facilidad de llegar al linfonodo al unirse a su ligando.

La expresión de CCR7 en tumor primario presenta asociaciones significativas con estadio del tumor, y la expresión de CCR7 en linfonodo^{20,17,70}. Por otra parte, en

nuestro estudio se vio que existe una leve asociación con metástasis linfonodal, pero no es significativa ni implica una dependencia entre la metástasis linfonodal y la expresión de CCR7 en tumor primario⁷⁰, poniendo en duda la hipótesis de que este receptor tendría un papel importante en el potencial metastásico del tumor. Respecto a esto último, algunos autores mencionan que el receptor de quimioquinas CXCR4 está altamente expresado en CECCyC^{16,17} y sugieren que la interacción entre CXCR4 y su ligando CXCL12 juega un rol importante en la metástasis linfonodal¹⁷ y que incluso podría estar aún más comprometido que el eje CCR7/CCL21/CCL19¹⁶. Por otro lado, Oliveira-Neto et al¹⁶, mostraron que la densidad de células nodales CCL19+ fue mayor en los ganglios linfáticos no metastásicos y que estos mismos ganglios linfáticos no metastásicos presentan una mayor densidad de linfocitos T citotóxicos activados (CD8+/perforina+) que los ganglios linfáticos metastásicos. En base a este hecho, se podría sugerir que la quimioquina CCL19 puede estar contribuyendo no sólo en la progresión del cáncer, sino también a la defensa del huésped contra la progresión del cáncer ya que los linfocitos T CD8+ expresan receptor CCR7. Enfocar una investigación en esta hipótesis podría significar un avance para la terapia del cáncer.

En nuestro estudio del total de pacientes, un 50% de ellos presentan un estadio IV y el 60% de los pacientes presenta un estadio avanzado (III/IV)^{20,17,70}. Cabe mencionar que en los estadios primarios de cáncer la expresión de CCR7 es mayormente leve o no se ha expresado, lo cual sugiere que existe una asociación lineal entre el estadio tumoral y la intensidad de la expresión de la molécula, situación comprobada de forma significativa en nuestro estudio, cuya relación además demostró dependencia, por lo que se puede proponer que un tumor al aumentar su agresividad, expresa en una mayor proporción receptores de factores quimiotácticos que los atraerán a lugares de metástasis.

Se aprecia que con T3 y T4 existe una mayor expresión de CCR7 en tumores primarios, pero que no tienen una asociación significativa, distinto a lo que ocurre en los estudios de Tzusuki²⁰, Shang¹⁷ y Oliveira-Neto¹⁶. Este último menciona una "relación entre el CCR7 y el tamaño del tumor en CECCyC, ya que este receptor puede estar involucrado en la proliferación celular tumoral y supervivencia de las células neoplásicas mediante la inhibición de la apoptosis"¹⁶, mecanismo que también se intenta dilucidar en otros estudios^{20,17,19,69,70}, en donde se describe la influencia de la expresión de CCL19 y CCL21 sobre el tamaño del tumor, demostrando que CCL19 ejerce un efecto antiapoptótico y CCL21 induce el crecimiento de las células tumorales mediante mecanismos paracrinos^{16,71}. Bajo estos descubrimientos el CCR7 ha sido reportado como un nuevo marcador de predicción de metástasis y de severidad en cáncer al estar asociado a factores clínicos severos como tamaño de tumor, invasión profunda, invasión linfática y estadio TNM^{16,20}. Toda esta literatura, es un apoyo para postular a los receptores de quimioquinas como el CCR7 como blanco de terapias futuras para el carcinoma espinocefálico de cabeza y cuello, y prevenir metástasis.

La sobrevida para los pacientes con CECCyC es sólo el 30-40%, debido principalmente a la presencia frecuente de metástasis en el momento del

diagnóstico⁷², por ello un objetivo urgente en oncología de cabeza y cuello es elaborar mejores herramientas para su terapéutica y uso clínico, además es necesario una mejor comprensión de las vías moleculares que median un patrón único de la invasión tumoral y metástasis para permitir el desarrollo de terapias diseñadas para prevenir la diseminación del tumor⁷³. Así es como en diversos estudios se relaciona la expresión de CCR7 en CECCyC con una menor sobrevida a causa de la enfermedad metastásica, dando a los niveles de CCR7 un cierto valor pronóstico para la metástasis ganglionar, así como otros factores tales como el comportamiento pro-invasivo, los que son importantes contribuyentes para que la expresión de CCR7 se relacione con la evolución de la enfermedad⁷⁴. En nuestro estudio se evaluó la variable de sobrevida con respecto a la expresión de CCR7 en tumor primario y linfonodal (CCR7 LN) la que sigue la distribución mostrada en las tablas de resultados (tablas sobrevida XIX, XX) con expresión en las categorías leve, moderado, fuerte y no expresión. La expresión de la molécula CCR7 en tumor primario y linfonodo con la variable sobrevida no muestran correlación significativa directa, sin embargo sí la demostró con presencia de metástasis linfonodal, lo que sí está asociado a sobrevida.

Tsuzuki¹⁶ estudió muestras de CEC bucal y orofaríngeo de 90 pacientes, encontrando asociación entre la expresión de CCR7 y factores clínico-patológicos como la tasa de sobrevida de los pacientes. La incidencia para la tasa de sobrevida fue estadísticamente significativa, asociando CCR7 y menor tasa de sobrevida en el tiempo. El riesgo relativo entre CCR7 y muerte fue de 2.872 comparando CCR7 negativo (-) y positivo (+), además la expresión de CCR7 también fue significativa como un indicador pronóstico independiente de la supervivencia global. El riesgo relativo de muerte fue la relación de 2.723 para CEC con CCR7 de expresión positiva comparada con la expresión negativa de CCR7. En nuestro estudio no se encontró asociación con sobrevida, sin embargo faltó realizar análisis estadísticos más adecuados.

En cuanto a la expresión de CCR7 y recidiva, se puede destacar que el 69% de los tumores primarios que recidivaron tuvieron una expresión moderada, por otro lado la expresión de CCR7 en linfonodos con recidiva fue 100% entre moderada y fuerte (33% y 66% respectivamente). CCR7 fu expresado tanto en tumores con recidiva y sin recidiva, por lo tanto se concluye que la recidiva no está asociada a la expresión de la proteína, sino a otros factores como pueden ser los bordes comprometidos y estadio tumoral.

VIII. CONCLUSIÓN

1. La expresión Inmunohistoquímica de CCR7 en tumor primario se asocia con la expresión de CCR7 en linfonodos de pacientes con metástasis.
2. La expresión Inmunohistoquímica de CCR7 en tumor primario presenta una asociación significativa con el estadio tumoral, lo que implica que mientras mayor es la expresión de CCR7 (moderado a fuerte), más avanzado es el estadio tumoral (III-IV).
3. Con los análisis realizados no se pudo comprobar una asociación significativa entre la expresión Inmunohistoquímica de CCR7 en tumor primario con sobrevida ni recidiva, así mismo no se pudo comprobar una asociación significativa con la expresión inmunohistoquímica de CCR7 LN con recidiva.
4. La expresión Inmunohistoquímica de la molécula CCR7 en tumor primario muestra leve asociación con metástasis linfonodal. Sin embargo estos resultados no son significativos estadísticamente.

IX. SUGERENCIAS

En los estudios analizados para el desarrollo de esta investigación, se ha indagado mediante diversos métodos, la expresión Inmunohistoquímica de CCR7 en tumor primario y linfonodos. Sin embargo, son pocos los que categorizan esta expresión en cuanto a intensidad, como lo realizamos en este estudio, lo cual nos entrega información más detallada de la relación que existe entre la expresión de la molécula con las variables clinicopatológicas de los pacientes. A pesar de ello, al ser una variable cualitativa, se ve dificultado el análisis estadístico posterior para establecer diferencias significativas. Se plantea la sugerencia de indagar no sólo en la expresión de la molécula CCR7 mediante variables cualitativas, sino también cuantificar estas variables. Además sería interesante estudiar una posible mutación en la estructura de CCR7 y que esto esté estrechamente relacionado con el rol que cumple en el desarrollo del cáncer, además de asociarlo con otras moléculas que estén relacionadas y las interacciones entre estas y el organismo en el desarrollo del cáncer, de modo de contribuir con las investigaciones existentes y lograr dilucidar nuevas formas de tratamiento.

X. RESÚMEN

Introducción: El CECCy C está asociado a un alto grado de invasión local y una alta incidencia de metástasis linfonodal regional. Las quimioquinas CCL19 y CCL21 actúan como ligandos del CCR7. La expresión de CCR7 en las células cancerosas parece estar relacionada con la capacidad de las células tumorales para establecer metástasis en los ganglios linfáticos.

Objetivo general: Evaluar y comparar la expresión inmunohistoquímica de CCR7 en tumores primarios y linfonodos metastásicos de pacientes con CECCyC con y sin metástasis linfonodal.

Hipótesis: Hay una diferencia en la expresión inmunohistoquímica de CCR7 entre tumores primarios y linfonodos metastásicos de pacientes con CECCyC, con y sin metástasis linfonodal.

Materiales y métodos: Se analizaron muestras de biopsias de 84 pacientes del Hospital Carlos Van Buren de Valparaíso con diagnóstico de CECCyC, con y sin metástasis a linfonodos, entre los años 2005 y 2015. Las muestras corresponden a tejidos parafinizados las cuales son teñidas con H&E y evaluadas en microscopio de luz para analizar zonas ricas en células tumorales, posteriormente se añade el anticuerpo anti-CCR7 policlonal el cual es detectado con el sistema EnVision.

Resultados: 48% de las muestras han tenido una expresión moderada de la molécula CCR7. 34 muestras (40%) con localización tumoral en cavidad oral. En las muestras de linfonodos, de los 15 casos, hubo 8 casos con expresión moderada de CCR7 cuando la expresión de CCR7 también es moderada en tumor primario.

Conclusiones: La expresión IHQ de CCR7 en tumor primario se asocia con la expresión de CCR7 en LN de pacientes con metástasis.

XII. REFERENCIAS

1. Cheng A, Schmidt B. Management of the N0 Neck in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*. 2008;20(3):477-497.
2. Siegel R, Miller K, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2015;65(1):5-29.
3. Thiele O, Seeberger R, Flechtenmacher C, Hofele C, Freier K. The role of elective supraomohyoidal neck dissection in the treatment of early, node-negative oral squamous cell carcinoma (OSCC): A retrospective analysis of 122 cases. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2012;40(1):67-70.
4. Dogan E, Cetinayak H, Sarioglu S, Erdag T, Ikiz A. Patterns of cervical lymph node metastases in oral tongue squamous cell carcinoma: implications for elective and therapeutic neck dissection. *The Journal of Laryngology & Otology*. 2014;128(03):268-273.
5. Leusink F, Van Es R, De Bree R, De Jong R, Van Hooff S, Holstege F et al. Novel diagnostic modalities for assessment of the clinically node-negative neck in oral squamous-cell carcinoma. *The Lancet Oncology*. 2012;13(12):e554-e561.
6. Kupferman Myers J. Molecular Biology of Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. *Otolaryngologic Clinics of North America*. 2006;39(2):229-247.
7. Hanahan D, Weinberg R. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
8. Uchida D, Kuribayashi N, Kinouchi M, Ohe G, Tamatani T, Nagai H et al. Expression and function of CXCR4 in human salivary gland cancers. *Clin Exp Metastasis*. 2012;30(2):133-142.
9. Kellermann M, Sobral L, Da Silva S, Zecchin K, Graner E, Lopes M et al. Mutual paracrine effects of oral squamous cell carcinoma cells and normal oral fibroblasts: Induction of fibroblast to myofibroblast transdifferentiation and modulation of tumor cell proliferation. *Oral Oncology*. 2008;44(5):509-517.
10. Sobral L, Bufalino A, Lopes M, Graner E, Salo T, Coletta R. Myofibroblasts in the stroma of oral cancer promote tumorigenesis via secretion of activin A. *Oral Oncology*. 2011;47(9):840-846.
11. Rossi D, Zlotnik A. The Biology of Chemokines and their Receptors. *Annual Review of Immunology*. 2000;18(1):217-242.
12. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E and Zlotnik. A Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis (2001). *Nature* 410: 50-6.
13. Kijima T, Maulik G, Ma P C, Tibaldi E V, Turner R E, Rollins B, et al. Regulation of cellular proliferation, cytoskeletal function, and signal transduction through CXCR4 and c-Kit in small cell lung cancer cells. *Cancer Res. AACR*; 2002;62(21):6304–11.
14. Taichman R S, Cooper C, Keller E T, Pienta K J, Taichman N S, McCauley L K. Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res. AACR*; 2002;62(6):1832–7.
15. Uchida D, Begum N, Almofti A, Nakashiro K, Kawamata H, Tateishi Y et al. Possible role of stromal-cell-derived factor-1/CXCR4 signaling on lymph node

metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Experimental Cell Research*. 2003;290(2):289-302.

16. Oliveira-Neto H, De Souza P, Da Silva M, Mendonça E, Silva T, Batista A. The expression of chemokines CCL19, CCL21 and their receptor CCR7 in oral squamous cell carcinoma and its relevance to cervical lymph node metastasis. *Tumor Biol*. 2012;34(1):65-70.

17. Shang Z, Liu K, Shao Z. Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with cervical lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*. 2009;45(6):480-485.

18. Oliveira-Neto H, De Souza P, Da Silva M, Mendonça E, Silva T, Batista A. The expression of chemokines CCL19, CCL21 and their receptor CCR7 in oral squamous cell carcinoma and its relevance to cervical lymph node metastasis. *Tumor Biol*. 2012;34(1):65-70.

19. Legler D, Uetz-von Allmen E, Hauser M. CCR7: Roles in cancer cell dissemination, migration and metastasis formation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2014;54:78-82.

20. Tsuzuki H, Takahashi N, Kojima A, Narita N, Sunaga H, Takabayashi T et al. Oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas expressing CCR7 have poor prognoses. *Auris Nasus Larynx*. 2006;33(1):37-42.

21. Bar Ad V, Chalian A. Management of clinically negative neck for the patients with head and neck squamous cell carcinomas in the modern era. *Oral Oncology*. 2008;44(9):817-822.

22. Siegel R, Miller K, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2015;65(1):5-29.

23. Marur S, Forastiere A. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings*. 2016;91(3):386-396.

24. Mathers, C., Fat, D. M., & Boerma, J. T. The global burden of disease: 2004 update. Geneva, Switzerland, World Health Organization. 2008.

25. Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari R, Ghafoor A et al. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2005;.

26. Sturgis E, Cinciripini P. Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence. *Cancer*. 2007;110(7):1429-1435.

27. Maasland D, van den Brandt P, Kremer B, Goldbohm R, Schouten L. Alcohol consumption, cigarette smoking and the risk of subtypes of head-neck cancer: results from the Netherlands Cohort Study. *BMC Cancer*. 2014;14(1).

28. Shiboski C, Schmidt B, Jordan R. Tongue and tonsil carcinoma. *Cancer*. 2005;103(9):1843-1849.

29. Périé S, Meyers M, Mazzaschi O, De Crouy Chanel O, Baujat B, Lacau St. Guily J. Epidemiology and anatomy of head and neck cancers. *Bull Cancer*. 2014;.

30. Ministerio de Salud. Primer informe de registros poblacionales de cáncer de Chile. *Guia MINSAL*. 2012;1-178.

31. Mehanna H, Paleri V, West C, Nutting C. Head and neck cancer--Part 1: Epidemiology, presentation, and prevention. *BMJ*. 2010;341(sep20 1):c4684-c4684.

32. Argiris A, Karamouzis M, Raben D, Ferris R. Head and neck cancer. *The Lancet*. 2008;371(9625):1695-1709.

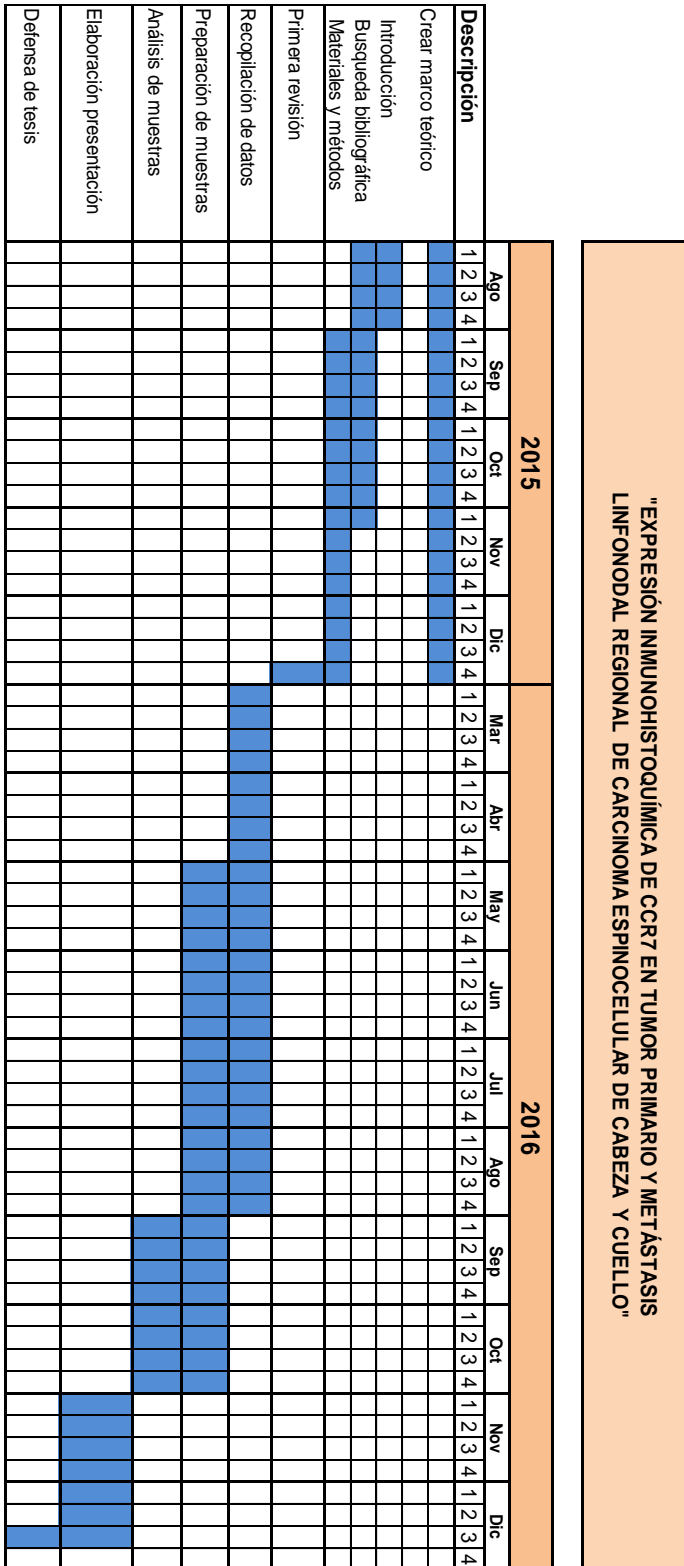
33. Conway D, Hashibe M, Boffetta P, Wunsch-Filho V, Muscat J, Vecchia C et al. Enhancing epidemiologic research on head and neck cancer: INHANCE – The international head and neck cancer epidemiology consortium. *Oral Oncology*. 2009;45(9):743-746.
34. McKaig R, Baric R, Olshan A. Human Papillomavirus and head and neck cancer: Epidemiology and molecular biology. *Head Neck*. 1998;20(3):250-265.
35. Gillison M. Human papillomavirus-associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical, and molecular entity. *Seminars in Oncology*. 2004;31(6):744-754.
34. Ragin C, Modugno F, Gollin S. The Epidemiology and Risk Factors of Head and Neck Cancer: a Focus on Human Papillomavirus. *Journal of Dental Research*. 2007;86(2):104-114.
37. Karatzanis A, Koudounarakis E, Papadakis I, Velegrakis G. Molecular pathways of lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2011;269(3):731-737.
38. Lewandowski C M. TNM Classification of Malignant Tumours. The effects of brief mindfulness intervention on acute pain experience: An examination of individual difference. 2015. 1689-1699 p.
39. Weinberg R. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. 1995;81(3):323-330.
40. Kim C, Kim K, Jik Kim H, Kook Kim J, Lee J, Yoon J. Expression and regulation of PLUNC in human nasal epithelium. *Acta Oto-Laryngologica*. 2006;126(10):1073-1078.
41. Hipfner D, Cohen S. Connecting proliferation and apoptosis in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2004;5(10):805-815.
42. Stoll C, Baretton G, Ahrens C, Löhrs U. Prognostic significance of apoptosis and associated factors in oral squamous cell carcinoma. *Virchows Archiv*. 2000;436(2):102-108.
43. Kumar V, Abbas A, Aster J, Robbins S. Robbins basic pathology. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders; 2013.
44. Sherr C. Principles of Tumor Suppression. *Cell*. 2004;116(2):235-246.
45. Hicklin D. Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis. *Journal of Clinical Oncology*. 2004;23(5):1011-1027.
46. Smith B, Carter D, Sasaki C, Haffty B. 2178 Vascular endothelial growth factor protein levels are an independent predictor of poor outcome in oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*. 1999;45(3):369-370.
47. Spano D, Heck C, De Antonellis P, Christofori G, Zollo M. Molecular networks that regulate cancer metastasis. *Seminars in Cancer Biology*. 2012;22(3):234-249.
48. Li S, Li Q. Cancer stem cells, lymphangiogenesis, and lymphatic metastasis. *Cancer Letters*. 2015;357(2):438-447.
49. Margulis A. E-cadherin Suppression Accelerates Squamous Cell Carcinoma Progression in Three-Dimensional, Human Tissue Constructs. *Cancer Research*. 2005;65(5):1783-1791.
50. Katayama A. Expressions of Matrix Metalloproteinases in Early-Stage Oral Squamous Cell Carcinoma as Predictive Indicators for Tumor Metastases and Prognosis. *Clinical Cancer Research*. 2004;10(2):634-640.49.

51. Kang Y, Massagué J. Epithelial-Mesenchymal Transitions. *Cell*. 2004;118(3):277-279.
52. Jiang WG, Sanders AJ, Katoh M, Ungefroren H, Gieseler F, Prince M, et al. Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives. 2015;.
53. Yoshida K, Kashima K, Suenaga S, Nomi N, Shuto J, Suzuki M. Immunohistochemical detection of cervical lymph node micrometastases from T2N0 tongue cancer. *Acta Oto-Laryngologica*. 2005;125(6):654-658.
54. Anders H, Romagnani P, Mantovani A. Pathomechanisms: homeostatic chemokines in health, tissue regeneration, and progressive diseases. *Trends in Molecular Medicine*. 2014;20(3):154-165.
55. Almofti A, Uchida D, Begum N, Tomizuka Y, Iga H, Yoshida H et al. The clinicopathological significance of the expression of CXCR4 protein in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2004;.
56. Uchida D, Begum N, Tomizuka Y, Bando T, Almofti A, Yoshida H et al. Acquisition of lymph node, but not distant metastatic potentials, by the overexpression of CXCR4 in human oral squamous cell carcinoma. *Lab Invest*. 2004;84(12):1538-1546.
57. Oliveira-Neto H, Silva E, Rodrigues Leles C, Mendonça E, de Cassia Goncalves Alencar R, Silva T et al. Involvement of CXCL12 and CXCR4 in Lymph Node Metastases and Development of Oral Squamous Cell Carcinomas. *Tumor Biology*. 2008;29(4):262-271.
58. Bielecki B, Mazurek A, Wolinski P, Glabinski A. Expression of chemokine receptor CCR7 and CCR8 in the CNS during ChREAE. *Scandinavian Journal of immunology* 2007; 66:383-392.
59. Fan S, Zeng Z, Peng H, Guo Z, Wang S, Zhang Q. Sentinel lymph node biopsy versus elective neck dissection in patients with cT1-2N0 oral tongue squamous cell carcinoma. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. 2014;117(2):186-190.
60. Broglie M, Haile S, Stoeckli S. Long-Term Experience in Sentinel Node Biopsy for Early Oral and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Annals of Surgical Oncology*. 2011;18(10):2732-2738.
61. Leong S, Zuber M, Ferris R, Kitagawa Y, Cabanas R, Levenback C et al. Impact of nodal status and tumor burden in sentinel lymph nodes on the clinical outcomes of cancer patients. *Journal of Surgical Oncology*. 2011;103(6):518-530.
62. De Bondt R, Nelemans P, Hofman P, Casselman J, Kremer B, van Engelshoven J et al. Detection of lymph node metastases in head and neck cancer: A meta-analysis comparing US, USgFNAC, CT and MR imaging. *European Journal of Radiology*. 2007;64(2):266-272.
63. Christensen A, Bilde A, Therkildsen M, Mortensen J, Charabi B, Kirkegaard J et al. The prevalence of occult metastases in nonsentinel lymph nodes after step-serial sectioning and immunohistochemistry in cN0 oral squamous cell carcinoma. *The Laryngoscope*. 2011;121(2):294-298.
64. Mendez E, Lohavanichbutr P, Fan W, Houck J, Rue T, Doody D et al. Can a Metastatic Gene Expression Profile Outperform Tumor Size as a Predictor of Occult Lymph Node Metastasis in Oral Cancer Patients?. *Clinical Cancer Research*. 2011;17(8):2466-2473.

65. Broglie M, Haerle S, Huber G, Haile S, Stoeckli S. Occult metastases detected by sentinel node biopsy in patients with early oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas: Impact on survival. *Head Neck*. 2012;35(5):660-666.
66. Takes R, Rinaldo A, Pablo Rodrigo J, Devaney K, Fagan J, Ferlito A. Can biomarkers play a role in the decision about treatment of the clinically negative neck in patients with head and neck cancer?. *Head Neck*. 2008;30(4):525-538.
67. Wissmann C, Detmar M. Pathways Targeting Tumor Lymphangiogenesis. *Clinical Cancer Research*. 2006;12(23):6865-6868.
68. Wang D, Liu D, Gao J, Liu M, Liu S, Jiang M et al. TRAIL-induced miR-146a expression suppresses CXCR4-mediated human breast cancer migration. *FEBS J*. 2013;280(14):3340-3353.
69. Liu F, Safdar J, Li Z, Fang Q, Zhang X, Xu Z et al. CCR7 regulates cell migration and invasion through MAPKs in metastatic squamous cell carcinoma of head and neck. *Int J Oncol*. 2014;.
70. Guo N, Liu F, Yang L, Huang J, Ding X, Sun C. Chemokine receptor 7 enhances cell chemotaxis and migration of metastatic squamous cell carcinoma of head and neck through activation of matrix metalloproteinase-9. *Oncology Reports*. 2014;.
71. Wang J, Seethala R, Zhang Q, Gooding W, van Waes C, Hasegawa H et al. Autocrine and Paracrine Chemokine Receptor 7 Activation in Head and Neck Cancer: Implications for Therapy. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 2008;100(7):502-512.
72. Greenlee R, Hill-Harmon M, Murray T, Thun M. *Cancer Statistics, 2001*. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2001;51(1):15-36.
73. Wang J, Zhang X, Thomas S, Grandis J, Wells A, Chen Z et al. Chemokine receptor 7 activates phosphoinositide-3 kinase-mediated invasive and prosurvival pathways in head and neck cancer cells independent of EGFR. *Oncogene*. 2005;24(38):5897-5904.
74. Mburu Y, Egloff A, Walker W, Wang L, Seethala R, van Waes C et al. Chemokine Receptor 7 (CCR7) Gene Expression Is Regulated by NF- B and Activator Protein 1 (AP1) in Metastatic Squamous Cell Carcinoma of Head and Neck (SCCHN). *Journal of Biological Chemistry*. 2011;287(5):3581-3590.

ANEXOS

Anexo 1: Carta Gantt



"EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE CCR7 EN TUMOR PRIMARIO Y METÁSTASIS LINFONODAL REGIONAL DE CARCINOMA ESPINOCELULAR DE CABEZA Y CUELLO"

