



IMPACTE D'ALTERACIONS METABÒLIQUES ASSOCIADES A L'OBESITAT SOBRE EL PAPER DE LA SURVIVINA EN CÀNCER

Ester Benaiges Moragrega

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

Impacte d'alteracions metabòliques associades a l'obesitat sobre el paper de la survivina en càncer

ESTER BENAIGES MORAGREGA

**Tesi Doctoral
2023**

Ester Benaiges Moragrega

Impacte d'alteracions metabòliques associades a l'obesitat sobre el paper de la survivina en càncer

TESI DOCTORAL

Dirigida per:

Dra. Sonia Fernández Veledo

Dr. Joan Vendrell Ortega

Dra. Victòria Ceperuelo Mallafré



UNIVERSITAT ROVIRA i VIRGILI

2023



FAIG CONSTAR que aquest treball, titulat “Impacte d’alteracions metabòliques associades a l’obesitat sobre el paper de la survivina en càncer”, que presenta Ester Benaiges Moragrega per a l’obtenció del títol de Doctora, ha estat realitzat sota la meua direcció al Departament de Medicina i Cirurgia d’aquesta Universitat.

HAGO CONSTAR que el presente trabajo, titulado “Impacto de alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad sobre el papel de la survivina en cáncer”, que presenta Ester Benaiges Moragrega para la obtención del título de Doctora, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Medicina y Cirugía de esta Universidad.

I STATE that the present study, entitled “Impact of metabolic alterations associated to obesity in the role of survivin in cancer”, presented by Ester Benaiges Moragrega for the award of the degree of Doctor, has been carried out under my supervision at the Department of Medicine and Surgery of this University.

Tarragona, 07 de febrer de 2023

Els directors de la tesi doctoral
Los directores de la tesis doctoral
Doctoral thesis supervisors

Dra. Sonia Fernández
Veledo

SONIA
FERNANDEZ
VELEDO -
DNI
53064774W

Firmado digitalmente por SONIA FERNANDEZ VELEDO - DNI 53064774W Fecha: 2023.02.07 11:55:41 +01'00'

Dr. Joan Vendrell
Ortega

JUAN JOSE
VENDRELL
ORTEGA -
DNI
39663032S

Firmado digitalmente por JUAN JOSE VENDRELL ORTEGA - DNI 39663032S Fecha: 2023.02.07 12:01:12 +01'00'

Dra. Victòria Ceperuelo
Mallafré

CEPERUELO
MALLAFRE
MARIA
VICTORIA -
39732857N

Firmado digitalmente por CEPERUELO MALLAFRE MARIA VICTORIA - 39732857N Fecha: 2023.02.07 09:43:03 +01'00'

“Les mateixes pors que ens ceguen són finestres plenes de llum.”

Oques Grasses

AGRAÏMENTS

Ja som al final, al cap del carrer després de 5 anys intensos, plens d'experiències, aprenentatge i moltes persones. Gent que ha estat poc però ha deixat empremta, gent que ha estat des del principi al final i gent que s'ha incorporat en els últims passos. Moltes gràcies a tots, sense vosaltres aquesta tesi no hagués estat possible.

En primer lloc, voldria expressar el meu agraïment a la Dra. Sonia Fernández i el Dr. Joan Vendrell per haver-me donat l'oportunitat de realitzar aquesta tesi doctoral i haver-me acollit a la família DIAMET. Gràcies també a la meva altra directora de tesi, la Dra. Vicky Ceperuelo, per haver-me guiat en els primers passos al laboratori i haver-me endinsat dins el món de la survivina.

Gràcies a tots els companys de DIAMET, per tots els moments, experiments i deadlines que hem passat junts. Especialment a l'Ana Madeira, per haver-me ajudat amb els experiments de la revisió de l'article, però també a l'Elsa, Brenno, Núria, Lúcia, Isabel, Cati, Erika i Mar, per haver-me donat suport i consell sempre que ho he necessitat i per compartir el vostre entusiasme per la ciència.

També a l'Enrique i la Carol, per totes les vegades que m'heu ajudat. I a la Míriam, per ser la meva referent, confident i amiga tots aquests anys, quina sort haver coincidit tots aquests anys!

Evidentment, a un dels pilars fonamentals d'aquests anys, gràcies Marga, Joan, Noe i Fran, per la gran amistat i equip que hem format, que encara que estiguem separats per centenars de quilòmetres sabem que sempre ens tindrem els uns als altres. A la Diandra, ara seràs la única representant de les Terres de l'Ebre al laboratori, gràcies per tot lo viscut i els concerts que ens queden. A la Teresa, pels dies interminables a l'estabulari, al final ens ho vam passar bé i tot. I a l'Antonio, gràcies per 10 anys de bons consells. També a les últimes incorporacions, Anna, Maria, Sergyi, Albert i Carme, ha estat un plaer coincidir en aquesta etapa.

Com no, a tota la gent de Londres. Thank you, Richard, for the opportunity to work in your lab and showing and transmitting me your passion for the research. Quiaoying, how could I forget you? Thanks for all the funny moments in the laboratory. Also, to all the people that made me feel like home, Lucía, Gabri, Fabrizio, Laura, Anastasia, Jesús, Lakshmi... thank you for these amazing three months! Y como no, a Alba y Ángela, por compartir todas las locuras, confesiones y viajes, y por muchas más tardes eternas en el BoxPark (¡cómo lo echo de menos!), sin vosotras no hubiera sido lo mismo.

Per acabar, també voldria donar les gràcies a tots els de fora del laboratori. Per tants “però de què treballes?”, “com ho portes?”, “això per a què serveix?”, “ànims que ja no queda res!”. Gràcies per ser-hi, per tots els ànims, per totes les vivències i les que han de venir, una forta abraçada a totes i tots. En especial a la Míriam, per haver aguantat tots els daltabaixos de la recta final, la muntanya russa està arribant al final del trajecte. Y a mi Vero, que lo que un casero acosador ha unido no lo separe la meseta. Ya sabes que eres como una hermana para mí, tens les portes dels Països sempre obertes.

Aquesta tesi però, va dedicada especialment als meus pares, al Roc i a l’Oriol. Perquè sense la vostra ajuda no hagués arribat tan lluny. Per tot. Perquè sí. Perquè us estimo més que a ningú. Mil gràcies.

ÍNDEX

ABREVIATURES	9
RESUM.....	11
ABSTRACT	12
INTRODUCCIÓ	13
1. SURVIVINA.....	14
1.1. Localització de la survivina	14
1.2. Funcions de la survivina.....	15
1.2.1. Divisió cel·lular.....	15
1.2.2. Inhibició de l'apoptosi	16
1.2.3. Modificacions posttraduccionals	17
1.3. Survivina en càncer	19
1.3.1. Mecanismes d'acció en el càncer	20
2. OBESITAT	22
2.1. Fisiopatologia de l'obesitat.....	26
2.2. Comorbiditats de l'obesitat	27
2.2.1. Obesitat, resistència a la insulina i diabetis tipus 2.....	27
2.2.2. Obesitat i càncer.....	29
2.3. Survivina i obesitat	30
3. TEIXIT ADIPÓS.....	32
3.1. Teixit adipós blanc	34
3.2. Composició del teixit adipós blanc.....	36
3.2.1. Cèl·lules mare	37
3.2.2. Macròfags.....	39
3.3. Funcions del teixit adipós blanc.....	42
3.3.1. Funció d'emmagatzematge d'energia	42
3.3.2. Funció endocrina	42
3.3.3. Funció immunomoduladora	43
3.4. El teixit adipós en obesitat.....	44
3.5. El teixit adipós en càncer	46
3.5.1. Macròfags associats a tumors	47

4. CÀNCER DE CAP I COLL	49
4.1. Factors de risc i prevenció	51
4.2. Tractament	52
4.3. Càncer de cap i coll i alteracions metabòliques	55
4.3.1. Reprogramació metabòlica.....	56
4.4. Survivina i càncer de cap i coll	57
4.4.1. Survivina i radioresistència	59
HIPÒTESI I OBJECTIUS.....	61
RESULTATS	65
Estudi 1.....	67
Estudi 2.....	88
DISCUSSIÓ	126
CONCLUSIONS	137
Conclusions en anglès.....	140
BIBLIOGRAFIA	142
PUBLICACIONS OBTINGUDES DURANT LA TESI DOCTORAL.....	174
Comunicacions a congressos	175
Articles científics.....	177

ABREVIATURES

ASC: cèl·lula mare mesenquimal derivada del teixit adipós, de l'anglès *adipose tissue-derived mesenchymal stromal cell*

ATP: trifosfat d'adenosina, de l'anglès *adenosine triphosphate*

BCL2: de l'anglès *B-cell lymphoma 2*

BIR: repetició de baculovirus IAP, de l'anglès *baculovirus IAP repeat*

BIRC5: de l'anglès *baculoviral IAP repeat-containing protein 5*

CBP: proteïna d'unió a CREB, de l'anglès *CREB-binding protein*

CCC: càncer de cap i coll

CCR2: receptor de quimiocines de tipus 2, de l'anglès *C-C chemokine receptor type 2*

CD: clúster de diferenciació

CDK1: proteïna cinasa dependent de la ciclina, de l'anglès *cyclin-dependent kinase 1*

C/EBP: proteïna d'unió al potenciador CCAAT, de l'anglès *CCAAT-enhancer-binding proteins*

CLS: estructura en forma de corona, de l'anglès *crown-like structure*

CPC: complex passatger dels cromosomes

CREB: proteïna d'unió a l'element de resposta cAMP, de l'anglès *cAMP response element-binding*

CRM1: manteniment de la regió cromosòmica 1, de l'anglès *chromosome region maintenance 1*

DEXA: absorciometria de raigs X de doble energia, de l'anglès *dual-energy X-ray absorptiometry*

DT2: diabetis de tipus 2

EGF: factor de creixement epidèrmic, de l'anglès *epidermal growth factor*

EGFR: receptor de EGF, de l'anglès *EGF Receptor*

EMT: transició epitelial-mesenquimal, de l'anglès *epithelial-mesenchymal transition*

FADD: proteïna del domini de la mort associada a FAS, de l'anglès *FAS-associated death domain protein*

GLUT: transportador de glucosa, de l'anglès *glucose transporter*

HDAC6: histona des-acetilasa 6, de l'anglès *histone deacetylase 6*

HIF-1: factor induïble per hipòxia, de l'anglès *hypoxia-inducible factor 1*

HOMA-IR: avaluació del model homeostàtic de resistència a la insulina, de l'anglès *homeostatic model assessment – insulin resistance*

HNSCC: càncer de cap i coll, de l'anglès *head and neck squamous cellular carcinoma*

IAP: proteïna inhibidora de l'apoptosi, de l'anglès *inhibitors of apoptosis proteins*

IMC: índex de massa corporal

IL: interleucina

LDH: lactat deshidrogenasa

LPS: lipopolisacàrid

Lys129: lisina 129

MAFLD: malaltia de fetge gras associada a disfunció metabòlica, de l'anglès *metabolic associated fatty liver disease*

MAT: macròfag associat a tumor

MCP-1: proteïna quimioattractant de monòcits 1, de l'anglès *monocyte chemoattractant protein-1*

MMP: metal·loproteasa matricial, de l'anglès *matrix metalloproteinases*

MSC: cèl·lula mare mesenquimal, MSCs, de l'anglès *mesenchymal stem cells*

Myf5: factor miogènic 5, de l'anglès *myogenic factor 5*

NADPH: fosfat de dinucleòtid de nicotinamida i adenina, de l'anglès *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

OMS: Organització Mundial de la Salut

PAI-1: inhibidor de l'activador del plasminogen, de l'anglès *plasminogen activator inhibitor-1*

PKA: proteïna cinasa A, de l'anglès *protein kinase A*

PLK1: proteïna cinasa semblant al polo 1, de l'anglès *polo-like kinase 1*

PPAR- γ : receptor gamma activat per proliferador de peroxisomes, de l'anglès *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*

RI: Resistència a la insulina

ROS: espècies reactives d'oxigen, de l'anglès *reactive oxygen specie*

SAT: teixit adipós subcutani, de l'anglès *subcutaneous adipose tissue*

Ser20: Serina 20

SMAC: segon activador de les caspases derivat del mitocondri, de l'anglès *second mitochondria-derived activator of caspases*

SNC: Sistema nerviós central

STAT: transductor de senyal i activador de la transcripció, de l'anglès *signal transducer and activator of transcription*

SVF: fracció estromal vascular, de l'anglès *stromal vascular fraction*

TA: teixit adipós

TAG: triacilglicerol

TGF β : factor de creixement transformador beta, de l'anglès *transforming growth factor beta*

Thr34: treonina 34

TNF: factor de necrosi tumoral, de l'anglès *tumor necrosis factor*

TNM: tumor, nòdul limfàtic, metàstasi

UCP1: proteïna desacobladora 1, de l'anglès *uncoupling protein 1*

VAT: teixit adipós visceral, de l'anglès *visceral adipose tissue*

VEGF: factor de creixement endotelial vascular, de l'anglès *vascular endothelial growth factor*

VPH: virus del papil·loma humà

XIAP: inhibidor de l'apoptosi unit al cromosoma X, de l'anglès *X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis*

RESUM

La survivina és una proteïna multifuncional, històricament associada a processos tumorals i al desenvolupament embrionari que regula la proliferació i l'apoptosi cel·lular. Tot i que la seva funció en càncer està àmpliament estudiada, la seva implicació en altres patologies relacionades no està tan ben definida. De fet, estudis recents suggereixen que la survivina podria tenir un paper important en la fisiopatologia de l'obesitat, patologia metabòlica d'elevada prevalença considerada avui en dia un factor de risc associat al desenvolupament de diversos tipus de càncer.

Aquesta tesi doctoral se centra en l'estudi del paper de la survivina en les relacions entre cèl·lules del microambient tumoral, cèl·lules mare derivades del teixit adipós (ASCs), macròfags i cèl·lules tumorals en el context de l'obesitat. També analitzem el paper que podria tenir la survivina en la progressió i resposta a la radioteràpia de pacients amb càncer de cap i coll (CCC) i la seva relació amb l'estat metabòlic.

Identifiquem que la survivina del secretoma de les ASCs de pacients amb obesitat promou la polarització protumoral dels macròfags i que aquests tenen la capacitat d'internalitzar-la i secretar-la. Trobem que la survivina activa un fenotip híbrid (tant pro com antiinflamatori) dels macròfags i els promou l'activitat protumoral amb dependència de la fosforilació en la Treonina 34. A més, establim la survivina com nexa molecular entre les ASCs, macròfags i cèl·lules tumorals, així com a possible nou marcador específic de macròfag associat a tumors. En el context del CCC, associem l'expressió de survivina en la mucosa tumoral amb el risc de recurrència, resposta al tractament i glucosa circulant de pacients amb CCC. En un model *in vitro* demostrem que en cèl·lules poc o mitjanament radioresistents la sobreexpressió de survivina està regulada per la radiació i s'associa a un fenotip protumoral. També trobem que els nivells elevats de glucosa inhibeixen la regulació de la survivina per la radiació i augmenten la sensibilitat a un agent citotòxic.

En resum, aquesta tesi revela dos nous papers de la survivina en el context del càncer. D'una banda en la promoció del fenotip protumoral dels macròfags i com a nexa d'unió entre els diferents components del microambient tumoral, i de l'altra com a potencial predictora del risc de recurrència i medidora de la reprogramació metabòlica induïda per la radioteràpia en el CCC.

ABSTRACT

Survivin is a multifunctional protein, historically associated with tumoral processes and embryonic development that regulates cellular proliferation and apoptosis. Although its function in cancer is widely studied, its implication with other pathologies is not well defined. In fact, recent studies suggest that survivin might have an important role in the physiopathology of obesity, a metabolic pathology with high prevalence and an acknowledged risk factor for development of different types of cancer.

This doctoral thesis is focused on identifying the role of survivin in the relationship between the cells from the tumor microenvironment, namely, adipose-derived stem cells (ASCs), macrophages and tumoral cells, in the context of obesity. We also analyze the role of survivin in the progression and response to radiotherapy of patients with head and neck squamous carcinoma (HNSCC) and its relationship with the metabolic state.

We show that survivin from ASCs' secretome of patients with obesity promotes protumoral polarization of macrophages, which are both capable of internalize and secrete survivin. We find that survivin activates a hybrid phenotype of macrophages (both pro and anti-inflammatory) and promotes their protumoral activity with dependence of the phosphorylation in Threonine 34. Importantly, we establish survivin as a new molecular link between ASCs, macrophages, and tumor cells, as well as a new specific marker of tumor-associated macrophages. In the context of HNSCC, we associate survivin expression in tumoral mucosa with recurrence risk, treatment response and circulating glucose in patients with HNSCC. In an *in vitro* model we demonstrate that survivin expression regulated by radiation in low-medium radioresistant cells is associated with a protumoral phenotype. We also find that high glucose levels inhibit survivin regulation by radiation and increase cells sensitivity to a cytotoxic agent.

To sum up, this thesis reveals two new roles of survivin in the context of cancer. First, in the promotion of the protumoral phenotype of macrophages and as a molecular link between the different components of tumor microenvironment. And second, as a potential predictor of recurrence risk and mediator in the metabolic reprogramming induced by radiotherapy in HNSCC.

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

1. SURVIVINA

La **survivina** és una proteïna descrita per Ambrosini *et. al.* l'any 1997¹. És una proteïna petita (16,5 kDa; 142 aminoàcids) que en humans està codificada pel gen *BIRC5* (de l'anglès *Baculoviral IAP Repeat-Containing Protein 5*) al cromosoma 17 (17q25), el qual està format per quatre exons i tres introns que porten a l'expressió de diferents isoformes de la survivina. Encara que la predominant i més estudiada és la forma salvatge (*wild type* en anglès), s'han trobat cinc isoformes que poden tenir importància biològica; survivina-2B, survivina-3B, survivina- Δ Ex3, survivina-2 α i survivina-3 α ; i unes altres cinc amb funció encara desconeguda; survivina- Δ ptEx2/3, survivina- Δ ptEx1/2, survivina- Δ ptEx1/2G/T i survivina- Δ ptEx2². Totes les isoformes de la survivina comparteixen la seqüència en la regió N-terminal, incloent una part o completament el domini BIR (de l'anglès *baculovirus IAP repeat*), però es diferencien en l'extrem carboxil³. La survivina és la proteïna més petita de la família de les proteïnes inhibidores de l'apoptosi (IAP, de l'anglès *inhibitors of apoptosis proteins*), les quals es caracteritzen per compartir la seva capacitat d'anul·lar l'apoptosi per diferents vies^{4,5}. S'han identificat vuit membres de la família dels IAP en humans (NAIP, c-IAP1, c-IAP2, XIAP, survivina, Apollon, ML-IAP i ILP-2) i estan codificades pels gens *BIRC1-8*⁶.

La survivina està altament expressada en teixits embrionaris i fetals. En els organismes adults, la survivina es troba al moll de l'os, ovaris, testicles, mucosa gastrointestinal, queratinòcits, neutròfils, cèl·lules T, cervell o cèl·lules mare embrionàries, mesenquimals o hematopoètiques, entre altres⁷. Està involucrada en diversos processos fisiològics com el creixement fetal, la generació de cèl·lules mare del moll de l'os, la supervivència i la proliferació de les cèl·lules de la sang, la maduració de limfòcits T i la integritat endotelial vascular^{8,9}.

1.1. LOCALITZACIÓ DE LA SURVIVINA

La survivina es pot localitzar intracel·lularment a les cèl·lules no tumorals al citoplasma i al nucli. En les cèl·lules tumorals es pot localitzar addicionalment al mitocondri.

La localització intracel·lular de la survivina està estretament relacionada amb les seves diverses funcions. Estudis han demostrat que la fracció nuclear de survivina està involucrada en la mitosi, mentre que la citoplasmàtica i la mitocondrial estan relacionades amb la funció antiapoptòtica^{10,11}. A més, la survivina es pot desplaçar del nucli al citoplasma a través de la proteïna de manteniment de la regió cromosòmica 1 (CRM1, de l'anglès *chromosome region maintenance 1*), i quan aquesta exportació està impossibilitada i la survivina s'acumula al nucli, tant la funció de divisió cel·lular com la d'inhibició de l'apoptosi es troben interrompudes^{12,13}.

La survivina també es pot detectar de manera extracel·lular, l'alliberament de la qual es fa mitjançant exosomes que són induïts per estímuls d'estrès. Tot i que el principal focus d'estudi de la survivina extracel·lular és en el càncer, també s'han trobat incrementats els nivells circulants de survivina en obesitat¹⁴ i en malalties autoimmunitàries com l'artritis reumatoide¹⁵, psoriasis¹⁶ i l'esclerosi múltiple¹⁷, on està correlacionada amb una reducció de l'apoptosi i un augment de la inflamació.

1.2. FUNCIONS DE LA SURVIVINA

La survivina té múltiples funcions, les principals són la d'inhibició de l'apoptosi i la de regulació de la divisió i el cicle cel·lular. Aquestes funcions, com ja s'ha comentat, estan estretament lligades a la seva localització intracel·lular (es pot trobar al nucli, citoplasma i mitocondri), però també depenen de modificacions posttraduccionals¹¹.

1.2.1. DIVISIÓ CEL·LULAR

La survivina localitzada al nucli es troba als centrosomes i microtúbuls durant la metafase i l'anafase, i té un rol essencial com a proteïna del complex passatger dels cromosomes (CPC)¹⁸. El CPC és un complex hetero-tetramèric que regula esdeveniments clau en la divisió cel·lular com la unió cromosoma-microtúbul, organització del fus i iniciació de la citocinesi. La survivina actua com a reguladora de la dinàmica dels microtúbuls, assegurant i estabilitzant la separació de les cromàtides germanes¹⁰. Estudis experimentals han demostrat que l'expressió de survivina està regulada durant el cicle cel·lular, amb un pic a la

fase G2/M que decreix ràpidament a la fase G1⁷. El fenotip dels ratolins *knockout* en survivina evidencia el paper que té la survivina en la mitosi, la qual és indispensable durant el desenvolupament embrionari¹¹. La deleció homozigòtica del gen *BIRC5* provoca una alteració fatídica en l'organització dels microtúbuls, amb absència de fusos mitòtics, formació de cèl·lules multinuclears i una letalitat embrionària del 100%¹⁹.

1.2.2. INHIBICIÓ DE L'APOPTOSI

Quan la survivina es localitza al citoplasma té un paper en la inhibició de l'apoptosi. L'activació de les vies apoptòtiques es pot iniciar a través d'unions a un receptor de la membrana cel·lular (via extrínseca) o mitjançant la senyalització mitocondrial directa (via intrínseca), les quals s'expliquen de manera esquemàtica a la Figura 1^{4,20}. La via mitocondrial s'inicia amb l'activació de la via BCL2 (de l'anglès *B-cell lymphoma 2*), que porta a l'alliberament del citocrom c al citoplasma. Aquesta alliberació permet la formació de l'apoptosoma, un complex format per citocrom-c/Apaf-1/caspasa-9 que activa les caspases 3 i 7, les quals són considerades executores de l'apoptosi. En la via extrínseca, els receptors de FAS i del factor de necrosi tumoral (TNF, de l'anglès *tumor necrosis factor*), a través de la proteïna del domini de la mort associada a FAS (FADD, de l'anglès *FAS-associated death domain protein*), activen les caspases 8 i 10 que posteriorment promouran l'acció de les caspases 3 i 7²⁰.

La survivina bloqueja les caspases de manera indirecta a través de l'inhibidor de l'apoptosi unit al cromosoma X (XIAP, de l'anglès *X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis*), una proteïna de la família IAP, degut al fet que li falta un domini per poder unir-se a les caspases. La survivina interactua amb XIAP i en promou la seva estabilitat, a més d'antagonitzar l'activitat del segon activador de les caspases derivat del mitocondri (SMAC, de l'anglès *second mitochondria-derived activator of caspases*) i prevenir la inhibició de XIAP per part d'aquest^{11,21}.

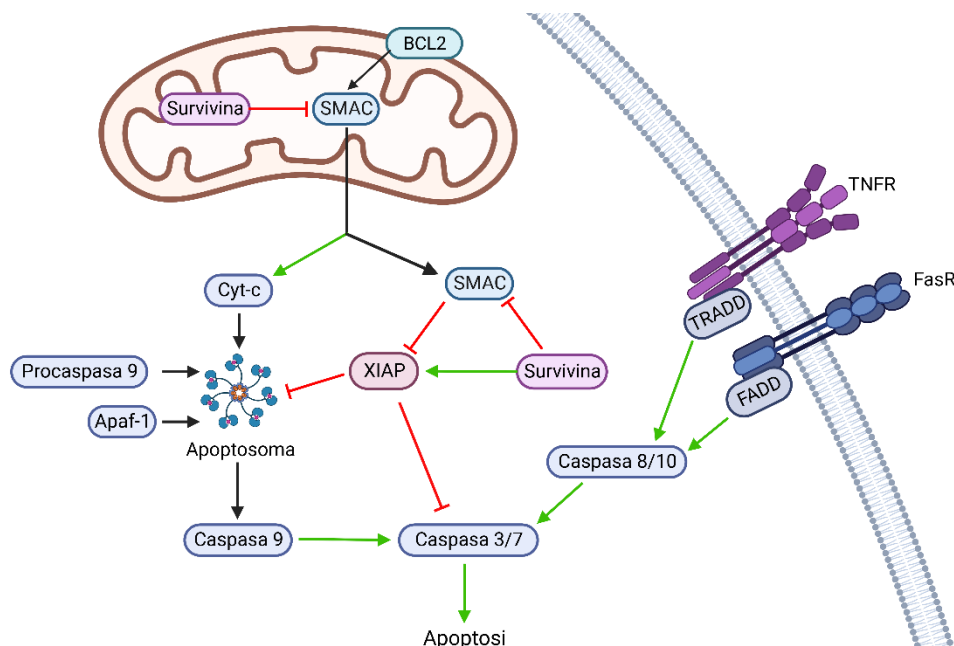


Figura 1. Vies apoptòtiques regulades per la survivina. Creada amb BioRender.com. BCL2: limfoma de cèl·lules B, de l'anglès B-cell lymphoma 2; SMAC: segon activador de les caspases derivat del mitocondri, de l'anglès second mitochondria-derived activator of caspases; XIAP: inhibidor de l'apoptosi unit al cromosoma X, de l'anglès X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis; TNFR: receptor del factor de necrosi tumoral; FasR: receptor de Fas; FADD: domini de la mort associada a FAS, de l'anglès FAS-associated death domain.

1.2.3. MODIFICACIONS POSTTRADUCCIONALS

La survivina també pateix modificacions posttraduccionals, on la **fosforilació** té un rol important en la funció que exercirà la proteïna²² (Figura 2). Estudis *in vitro* han demostrat que la fosforilació de la survivina en la treonina 34 (Thr34) per part de la proteïna cinasa dependent de la ciclina (CDK1, de l'anglès *cyclin-dependent kinase 1*) és necessària per a la interacció de la survivina amb les caspases. Aquesta fosforilació estabilitza les interaccions proteïna-proteïna a través del domini BIR de la survivina²³. S'ha observat que la mutació T34A, la qual impedeix la fosforilació de la survivina en la Thr34, porta a la dissociació del complex format entre la survivina i la caspasa-9 i una subseqüent apoptosi dependent de la caspasa-9^{24,25}, a més de promoure l'alliberació del citocrom c del mitocondri que també porta a l'apoptosi cel·lular²⁶.

D'altra banda, s'ha demostrat que la fosforilació en la serina 20 (Ser20) és necessària per a la divisió cel·lular²⁷. La fosforilació de la Ser20 per la proteïna cinasa semblant al polo 1 (PLK1, de l'anglès *polo-like kinase 1*) fa que s'augmenti l'afinitat pels microtúbuls, resultant en la correcta alineació dels cromosomes i la proliferació cel·lular. Tanmateix, la proteïna cinasa A (PKA, de l'anglès *protein kinase A*) també pot fosforilar la survivina a la Ser20, interferint en l'afinitat d'unió entre la survivina i XIAP al citoplasma²⁸. Es va observar com la

impossibilitat d'aquesta fosforilació per part de PKA augmentava l'estabilitat de XIAP i la inhibició de l'apoptosi. En conjunt, la fosforilació a la Ser20 regula tant la funció de la survivina en la mitosi com en l'apoptosi²⁹.

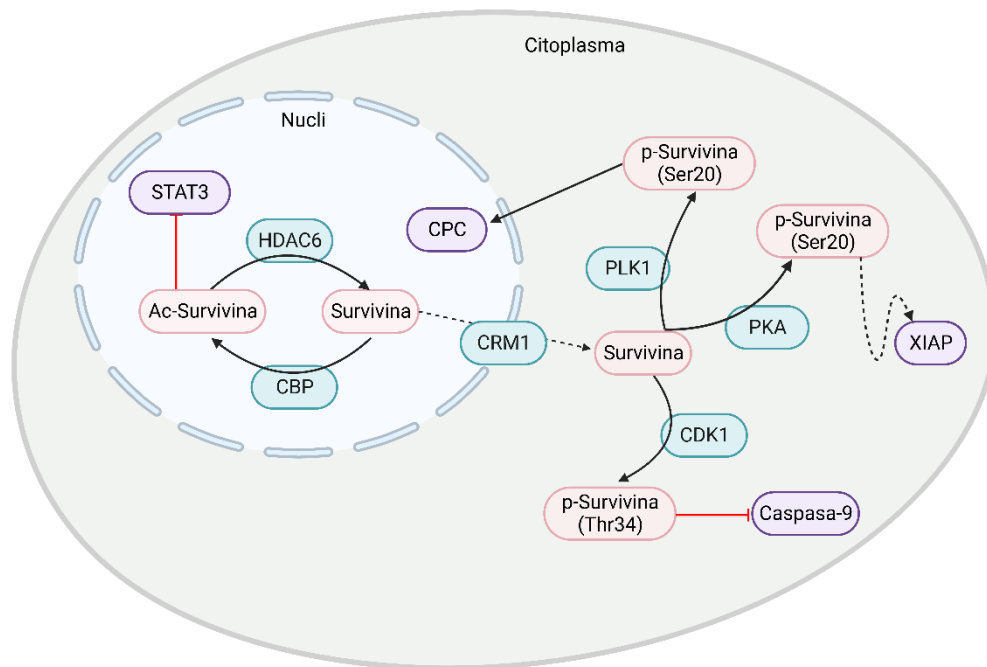


Figura 2. Modificacions posttraduccionals de la survivina. Creada amb Biorender.com, adaptada de Cheung et al., 2013²⁹. CPC: complex passatger dels cromosomes; HDAC6: la histona desacetilasa, de l'anglès histone deacetylase 6; CBP: proteïna d'unió a CREB, de l'anglès CREB-binding protein, STAT3: transductor de senyal i activador de la transcripció 3, de l'anglès signal transducer and activator of transcription; CRM1: manteniment de la regió cromosòmica 1, de l'anglès chromosome region maintenance 1; CDK1: cinasa dependent de la ciclina, de l'anglès cyclin-dependent kinase 1; PLK1: cinasa semblant al polo 1, de l'anglès polo-like kinase 1; PKA: proteïna cinasa A, de l'anglès protein kinase A; XIAP: inhibidor de l'apoptosi unit al cromosoma X, de l'anglès X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis.

Una altra modificació posttraduccionals de la survivina és l'acetilació de la lisina 129 (Lys129), que afecta a la seva exportació nuclear³⁰. La proteïna d'unió a CREB (CBP, de l'anglès *cAMP response element-binding protein (CREB)-binding protein*) acetila la survivina a la Lys129 per a promoure l'homodimerització de la survivina i la seva subseqüent acumulació nuclear, la qual es relaciona amb una inhibició de la supervivència cel·lular. La survivina acetilada s'uneix al transductor de senyal i activador de la transcripció 3 (STAT3, de l'anglès *signal transducer and activator of transcription*) i en reprimeix la seva activitat oncogènica, mentre que la desacetilació de la survivina per part de la histona desacetilasa 6 (HDAC6, de l'anglès *histone deacetylase 6*) inhibeix la seva homodimerització i promou la interacció de la survivina amb CRM1 i la seva exportació al citoplasma³¹.

1.3. SURVIVINA EN CÀNCER

Tot i que la survivina s'expressa en teixits normals i té un rol important en l'autorenovació i proliferació cel·lular, la seva expressió és significativament més baixa que en les cèl·lules transformades o canceroses, on hi ha una desregulació de la seva expressió que fa que augmentin els nivells. Els mecanismes intracel·lulars que activen la transcripció de la survivina o impedeixen que estigui inhibida estan més actius en els teixits malignes que en els normals⁷. Per exemple, la proteïna p53 o la del retinoblastoma, que en condicions normals poden reprimir la transcripció de la survivina, en les cèl·lules tumorals es troben majoritàriament mutades i inactivades^{32,33}.

El paper de la survivina en el càncer és el camp d'estudi més ampli d'aquesta proteïna, ja que és una de les proteïnes més expressades en teixits tumorals humans i la seva expressió, tant a nivell de mRNA com de proteïna, s'ha correlacionat amb la severitat tumoral i un pitjor pronòstic en més de seixanta tipus de càncers^{7,10}. Per exemple, l'expressió de survivina es relaciona amb l'estadiatge del tumor i amb la supervivència de pacients amb carcinoma de cèl·lules renals³⁴. La mateixa tendència es pot observar en càncer d'ovari, on l'expressió de survivina s'incrementa exponencialment als tumors de la paret ovàrica respecte a tumors benignes³⁵.

La localització intracel·lular de la survivina en els tumors també en condiciona la seva funció. En diversos tipus tumorals com el de pit, pàncrees o pròstata, la survivina nuclear s'ha identificat com a predictor favorable de la malaltia, mentre que la citoplasmàtica o mitocondrial es relaciona amb un pitjor pronòstic³⁶⁻³⁸. Tot i això, hi ha estudis contradictoris que associen la survivina nuclear amb una menor supervivència³⁹. Aquestes discrepàncies poden ser degudes al tipus tumoral o el tipus de biòpsia, així com el tipus de tractament utilitzat o els criteris de classificació per a cada localització^{40,41}.

A diferència de les cèl·lules normals, la survivina es pot trobar a la fracció mitocondrial de les cèl·lules transformades, on hi té un paper protector a través de la inhibició de l'apoptosi cel·lular. S'ha demostrat que estímuls d'estrès cel·lular i proapoptòtics augmenten l'expressió de survivina als mitocondris, conferint resistència i protecció enfront d'aquests desafiaments, i que una falta de survivina mitocondrial fa que les cèl·lules siguin

més sensibles a aquests estímuls⁴². A més, la survivina també pot interactuar amb la proteïna SMAC formant un complex per a evitar que s'alliberi al citoplasma i pugui exercir la seva funció proapoptòtica^{29,43,44}. La survivina localitzada als mitocondris també pot afectar al metabolisme cel·lular. Per exemple, en neuroblastoma, on les cèl·lules tumorals tenen una còpia més del cromosoma 17q que porta a una sobreexpressió de survivina, s'ha descrit que augmenta la glicòlisi aeròbica⁴⁵, o bloqueja la mitofàgia i promou la dependència de les cèl·lules tumorals per la glicòlisi⁴⁶.

Com s'ha comentat anteriorment, la survivina es pot trobar extracel·lularment en exosomes, on té un paper clau en la progressió tumoral^{47,48}. La survivina extracel·lular té un paper en la comunicació intercel·lular en el microambient tumoral, on és alliberada principalment per les cèl·lules canceroses. Quan aquestes la capten, augmenten la proliferació i baixen els nivells d'apoptosi, inclús en presència de radiació o quimioteràpia^{49,50}. En molts casos el propi tractament anticàncer pot promoure l'alliberament dels exosomes que contenen survivina per les cèl·lules tumorals. Aquests exosomes intervenen en la senyalització paracrina i autocrina quan s'acoblen a les cèl·lules tumorals veïnes i els transfereixen la survivina que contenen a l'interior, fent que es tornin més resistents a teràpia i incrementin el seu potencial invasiu i de proliferació^{51,52}. A més, els nivells de survivina tant en sèrum o plasma com en orina, es podrien considerar un biomarcador de diagnòstic i pronòstic de diversos tipus de càncers, com el de pròstata, bufeta, vesícula biliar o ovari^{47,53,54}.

1.3.1. MECANISMES D'ACCIÓ EN EL CÀNCER

La survivina està involucrada en la tumorigènesi per diversos mecanismes, incloent la inhibició de l'apoptosi, la regulació del cicle cel·lular, l'angiogènesi i la participació en diferents vies com la de senyalització de p53, hipòxia o Wnt/ β -catenina, entre altres²⁰.

La inhibició de l'apoptosi, explicada anteriorment, és un dels processos més importants en la carcinogènesi⁵⁵. En el càncer, la sobreexpressió de survivina està associada amb una inhibició de la mort cel·lular, tant per la via intrínseca com l'extrínseca (Figura 1)⁵⁶.

El cicle cel·lular és molt important per al desenvolupament cel·lular, i una disfunció pot portar a la tumorigènesi maligna. A les cèl·lules tumorals l'expressió de survivina en les

fases del cicle cel·lular també està alterada. Mentre que en les cèl·lules normals la survivina s'expressa a la fase G2/M seguida per un ràpid decreixement a la fase G1, en les cèl·lules tumorals la survivina està sobreexpressada durant totes les fases del cicle cel·lular i no només a la mitosi⁵⁷.

El microambient tumoral promou l'augment de survivina per diferents vies, com per exemple la hipòxia o els factors de creixement que angiogènesi. La hipòxia és una de les principals característiques en els tumors, i influencia en diferents processos protumorals com l'angiogènesi, la invasió i la metàstasi tant per la regulació de l'expressió gènica com per modificacions proteiques⁵⁸. Els canvis genètics s'inicien a partir d'un augment de l'expressió del factor induïble per hipòxia (HIF-1, de l'anglès *hypoxia-inducible factor 1*), el qual és capaç de regular l'expressió de survivina en el càncer⁵⁹.

En els tumors, l'expressió de survivina està lligada a la del factor de creixement endotelial vascular (VEGF, de l'anglès *vascular endothelial growth factor*) durant el creixement tumoral i angiogènesi, i es detecten conjuntament en diversos tipus de càncers, com el de bufeta, pulmó o tiroides. La sobreexpressió de survivina activa la senyalització de PI3K/AKT i la posterior transcripció de β -catenina-Tcf/Lef, que incrementa l'expressió de VEGF⁶⁰. La migració i invasió de cèl·lules endotelials vasculares són essencials per a la promoció de l'angiogènesi, per això necessiten l'expressió de factors com VEGF i metal·loproteases matricials (MMPs, de l'anglès *matrix metalloproteinases*) per a accelerar aquest procés. Hi ha diversos estudis que revelen que la survivina promou l'expressió de MMPs^{61,62}, així com la formació de tubs capil·lars. D'aquesta manera es relacionen directament els nivells de survivina amb un efecte angiogènic de les cèl·lules endotelials.

2. OBESITAT

L'Organització Mundial de la Salut (OMS) defineix l'**obesitat** com una acumulació anormal o excessiva de greix que és un risc per a la salut. La causa principal de l'obesitat és un balanç energètic positiu mantingut en el temps, promogut principalment per canvis en els patrons dietètics i d'activitat física. Aquests són resultat de canvis ambientals i socials associats al desenvolupament i la manca de polítiques de suport en sectors com la salut, agricultura, transport, planificació urbana, medi ambient i educació⁶³.

Amb les últimes dades obtingudes al 2016, l'OMS va estimar que un 39% dels adults (39% dels homes i 40% de les dones) tenia sobrepès, i un 13% (11% dels homes i 15% de les dones) tenia obesitat. La prevalença de l'obesitat s'ha gairebé triplicat des que es tenen dades, al 1975, fins al 2016 (

Figura 3). Encara que no hi ha xifres oficials, tot indica que aquestes han seguit augmentant en l'actualitat. No només són dades preocupants en la població adulta, sinó que el sobrepès també ha augmentat de manera dramàtica en la població jove d'entre 5 i 19 anys, passant d'un 4% al 1975 a més del 18% al 2016⁶³. L'obesitat infantil s'associa amb un augment del risc de fractures, dificultats per respirar, hipertensió, inici de malalties cardiovasculars, resistència a la insulina (RI) i efectes psicològics, a més de tenir un risc més elevat de tenir obesitat, mort prematura i discapacitat en l'edat adulta⁶⁴.

L'obesitat està associada a nombroses comorbilitats, com poden ser la hipertensió, diabetis de tipus 2 (DT2), dislipèmia, cardiopaties, artrosi o infertilitat. A més, també afecta en una reducció de l'esperança de vida, amb un excés de risc de 1,3 vegades més de mort prematura que les persones amb un pes saludable^{65,66}. De fet, l'obesitat està directament relacionada amb la majoria de les malalties no transmissibles que són les principals causes de mortalitat global⁶⁷, a més de relacionar-se amb una àmplia varietat de tipus de càncers⁶⁸ (Figura 4).

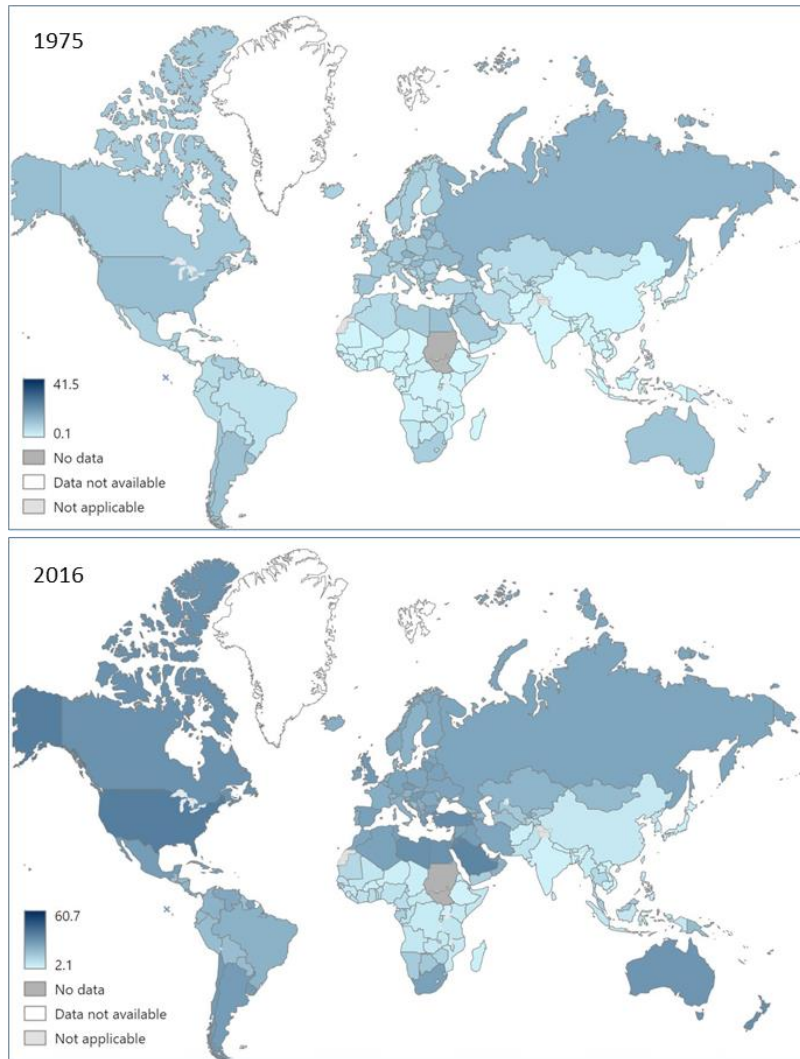


Figura 3. Mapa representatiu dels percentatges de població amb obesitat a l'any 1975 i a l'any 2016. Obtingut de who.int⁶³

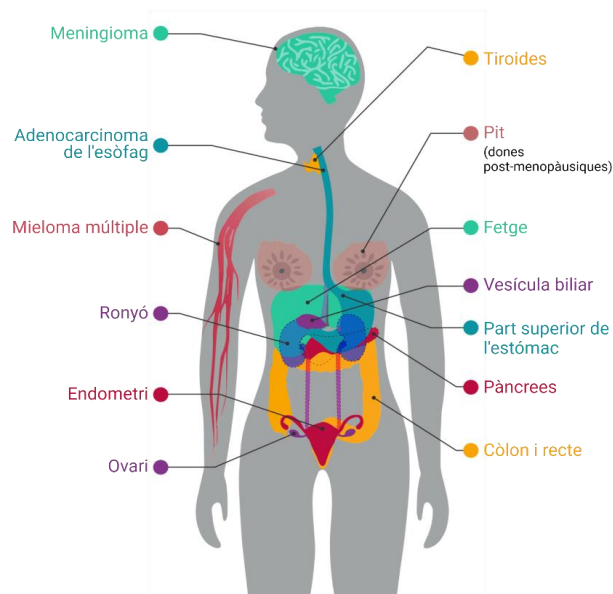


Figura 4. Càncers associats amb el sobrepès i l'obesitat. Adaptada de "Centers for Disease Control & Prevention".

L'obesitat es determina calculant l'índex de massa corporal (IMC), que és el quocient entre el pes i l'altura al quadrat (kg/m^2). D'aquesta manera es considera que una persona té obesitat si el seu IMC és igual o superior a $30\text{kg}/\text{m}^2$, amb sobrepès si està entre 25 i $29,9\text{kg}/\text{m}^2$, normal entre 18,5 i $24,9\text{kg}/\text{m}^2$, i amb baix pes si està per sota de $18,4\text{kg}/\text{m}^2$. Tanmateix, a la categoria d'obesitat es poden fer tres distincions, obesitat de tipus 1 o moderada si l'IMC està entre 30 i $34,9\text{kg}/\text{m}^2$, obesitat de tipus 2 o severa si està entre 35 i $39,9\text{kg}/\text{m}^2$, i obesitat de tipus 3 o mòrbida si és superior a $40\text{kg}/\text{m}^2$. A la Taula 1 es resumeix la classificació de l'IMC.

Taula 1. Classificació de l'IMC segons l'Organització Mundial de la Salut

Classificació	IMC (kg/m^2)
Baix pes	< 18,5
Primesa severa / Desnutrició	< 16,0
Primesa moderada	16,0 – 16,9
Primesa lleu	17,0 – 18,4
Normal	18,5 – 24,9
Sobrepès	25 – 29,9
Obesitat	≥ 30
Obesitat tipus 1 / moderada	30 – 34,9
Obesitat tipus 2 / severa	35 – 39,9
Obesitat tipus 3 / mòrbida	≥ 40

Tot i que l'IMC és la tècnica més usada per a diagnosticar l'obesitat, la precisió d'aquest índex com a determinant de la quantitat de greix corporal ha estat àmpliament qüestionat, ja que no té en consideració variables importants com el sexe, edat o grup ètnic^{69,70}. Per exemple, en estudis poblacionals les dones tenen un IMC més baix que els homes, tot i que la massa de greix relativa al pes corporal és més alta que en els homes (un 20% a un 45%). Una altra limitació que té l'IMC és que no té en compte la localització del greix, ja que és una variable important per avaluar les conseqüències metabòliques de

l'acumulació excessiva de greixⁱ. S'ha relacionat una acumulació de greix a la zona visceral amb un risc de patir DT2 o malalties coronàries incrementat respecte a acumular-lo a la zona subcutània^{71,72}. La determinació de la composició corporal es pot fer utilitzant mètodes indirectes, que proporcionen una composició corporal estimada o directes. El mètode directe més utilitzat és l'absorciometria de raigs X de doble energia (DEXA, de l'anglès *dual-energy X-ray absorptiometry*). Els mètodes indirectes solen portar a més errors predictius degut a que els criteris de mesura i la distribució corporal varia de manera interpersonal. Les metodologies indirectes més utilitzades són les mesures dels plec de la pell, l'IMC o la impedància bioelèctrica⁷³⁻⁷⁵. També hi ha estudis que han demostrat que la circumferència de la cintura abdominal o el ràtio cintura/maluc poden servir com a predictors de malalties associades a l'obesitat^{76,77}.

Els tractaments recomanats per al tractament de l'obesitat són les intervencions en l'estil de vida, la farmacoteràpia i la cirurgia bariàtrica. Les intervencions en l'estil de vida més efectives per a la pèrdua de pes són una dieta reduïda en calories, un augment en l'activitat física i estratègies de comportament per a promoure l'adherència a les recomanacions dietètiques i físiques⁷⁸. Respecte al tractament farmacològic, actualment hi ha 4 fàrmacs autoritzats per l'Agència Europea del Medicament i l'Agència Espanyola de Medicaments i Productes Sanitaris per al tractament de l'obesitat, però només són per a pacients amb un IMC major a 30 kg/m² o de 27 kg/m² que presenti comorbiditats associades i sempre que sigui com a complementació a la dieta i exercici físic^{79,80}. Per últim, la cirurgia bariàtrica, també coneguda com a cirurgia metabòlica, implica la reducció de la mida o la restricció de l'estómac per tal de reduir la quantitat d'aliments que consumeix una persona. Es considera aplicar-la a pacients amb un IMC igual o superior a 40 kg/m², o als que el tenen major o igual a 35 kg/m² que també tenen altres comorbiditats com hipertensió o dislipèmia⁸¹.

ⁱ Es profunditza en el teixit adipós a l'apartat 3

2.1. FISIOPATOLOGIA DE L'OBESITAT

L'obesitat és una de les malalties no transmissibles més comunes i comporta una gran preocupació de salut pública. És una malaltia multifactorial que inclou factors ambientals, socioeconòmics, genètics, psicològics i nutricionals. Aquests porten a un balanç positiu d'energia crònic que, juntament amb una desregulació de les interaccions entre teixits endocrins i el sistema nerviós central (SNC) acaba produint obesitat. La regulació del pes corporal es basa en la capacitat del cervell, específicament de l'hipotàlem, d'integrar respostes conductuals i endocrines des de i cap al tronc cerebral i els òrgans perifèrics, com poden ser el pàncrees, teixit adipós (TA), intestí, fetge o múscul. S'envien senyals neuronals i hormonals des d'aquests òrgans cap al cervell amb la informació sobre el consum i despesa d'energia pel cos, sacietat i el metabolisme dels nutrients⁸²⁻⁸⁵.

S'ha estimat que entre el 25 i el 75% de les variacions del pes corporal són degudes a factors genètics, però estudis de tot el genoma a gran escala han identificat més de 300 loci amb variants comunes a la població general que es correlacionen amb trets obesogènics però que només correspondrien al 5% de la variació de l'IMC⁸⁶. Les modificacions epigenètiques, juntament amb factors ambientals i la microbiota, poden influenciar en la programació dels gàmetes parentals sense produir-hi alteracions en la seqüència de nucleòtids i promocionar el desenvolupament d'obesitat⁸⁷.

L'obesitat no només afecta la funcionalitat del TAⁱⁱ, sinó també altres teixits. Segons la hipòtesi de l'expansibilitat del TA, aquest té la capacitat d'expansió limitada. Una vegada s'ha arribat al límit, hi ha un flux de lípids cap a òrgans no adiposos que promou una acumulació de greix a teixits ectòpics^{88,89} seguida per un reclutament de cèl·lules immunològiques que perpetuen la inflamació, l'estrès oxidatiu i la disfunció mitocondrial característiques de l'obesitat^{90,91}.

ⁱⁱ Es profunditza en la disfuncionalitat del TA en obesitat a l'apartat 3.4

2.2. COMORBIDITATS DE L'OBESITAT

L'obesitat està estretament relacionada amb altres patologies amb gran importància a nivell mundial per la morbimortalitat que generen, com la hipertensió, hipercolesterolèmia, hipertrigliceridèmia, DT2, afeccions cardíaques, malaltia de fetge gras associada a disfunció metabòlica (MAFLD, de l'anglès *metabolic associated fatty liver disease*), càncer i problemes respiratoris. S'ha calculat que per cada augment de 5 unitats de l'IMC per sobre de 25 kg/m², la mortalitat total augmenta un 30%, la mort per causes vasculars un 40%, i la relacionada amb la DT2 fins a un 120%^{66,92}.

Els principals mecanismes pels quals l'obesitat s'associa a altres malalties són la lipotoxicitat, la inflamació, la disfunció mitocondrial i la disbiosi. Tots aquests mecanismes estan interconnectats i acaben provocant, entre altres complicacions, la RI. Aquesta RI també podria estar involucrada en l'associació entre l'obesitat i el càncer, tot i que els mecanismes principals que els connecten són la inflamació crònica, la disfunció mitocondrial, la disbiosi de la microbiota i la remodelació de la matriu extracel·lular dels adipòcits⁹³. En els últims anys, la relació entre la RI i el càncer ha generat un ampli interès i, encara que està ben reconegut que la RI té un paper fonamental en el càncer, els models proposats fins ara no expliquen clarament l'associació causal entre ambdues malalties. Això és degut principalment al fet que les relacions entre càncer i RI depenen de diversos mecanismes que poden no ser els mateixos en tots els tipus de càncer que estan afectats per la RI⁹⁴.

2.2.1. OBESITAT, RESISTÈNCIA A LA INSULINA I DIABETIS TIPUS 2

La insulina s'encarrega de reduir els nivells de glucosa en sang a través de la inducció de la captació de glucosa per teixits sensibles a la insulina com el múscul, cor o TA, i d'inhibir la producció de glucosa al fetge, ronyons i intestí prim. També estimula la síntesi d'àcids grassos i glicogen, promou la funció mitocondrial i indueix la proliferació cel·lular. La RI és una desregulació de la captació de glucosa en sang per una pèrdua de la sensibilitat a la insulina dels teixits com a conseqüència de la inhibició de la via de senyalització de la insulina. Els factors que s'associen a la RI són la disfunció mitocondrial, inflamació, hiperinsulinèmia, hiperlipidèmia, genètica, edat, fetge gras, hipòxia o embaràs, tot i que l'obesitat és el factor de risc més alt que hi ha per a la població general⁹⁵.

Els adipòcits, sotmesos a un estrès cel·lular més elevat degut a un major estrès oxidatiu i de reticle endoplasmàtic, canvien la seva mida i funció com a resposta a la sobrenutrició. Aquest procés de remodelatge provoca que hi hagi zones amb hipòxia que fan que hi hagi més fibrosi i inflamació en el TA en expansió^{91,96}. El guany de pes en l'obesitat també porta canvis en l'alliberament de citocines i adipocines del TA que promouen efectes autocrins, paracrins i endocrins, com un augment de leptina, de l'inhibidor de l'activador del plasminogen (PAI-1, de l'anglès *plasminogen activator inhibitor-1*) o de citocines proinflamatòries (TNF o interleucina (IL)-1 β , entre altres) i una reducció de l'alliberament d'adiponectina⁹⁵. Aquestes alteracions porten a una resposta inflamatòria de baix grau generalitzada mediada per la infiltració de macròfags i altres cèl·lules immunològiques cap als òrgans metabòlics com el TA, múscul esquelètic, fetge i pàncrees⁹⁷. A més, els macròfags canvien cap a un perfil proinflamatori que indueix l'alliberació de citocines proinflamatòries amb efectes autocrins i paracrins que fan incrementar la RI⁹⁸. D'altra banda, els mitocondris utilitzen el greix per a produir energia, i una desregulació en la funció mitocondrial està associada amb un increment de greix ectòpic i la RI. El múscul és un dels teixits més afectats per la disfunció mitocondrial, promoguda per un increment de la concentració de lípids a les cèl·lules musculars, la reducció de la densitat mitocondrial, la producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS, de l'anglès *reactive oxygen specie*) i la disminució de la fosforilació mitocondrial en el múscul⁹⁹. A més, l'increment de ROS també promou l'estrès de reticle endoplasmàtic i la inflamació al fetge que pot portar a la RI al fetge i gluconeogènesi¹⁰⁰.

La RI inicialment indueix canvis compensatoris, de manera que la hipersecreció d'insulina manté la glucosa plasmàtica sota control durant un temps¹⁰¹. Aquesta alteració s'anomena hiperinsulinèmia compensatòria, i és una característica dels estadis prediabètics dels pacients que és difícil de detectar perquè els nivells de glucosa es mantenen normals. Tot i això, l'estrès cel·lular que es produeix acaba induint a la fallada pancreàtica, en la qual les cèl·lules beta són incapaces de mantenir la secreció augmentada d'insulina, de manera que es comencen a deteriorar i la secreció d'insulina disminueix. En aquest punt és quan es diagnostiquen la majoria de casos de DT2^{102,103}.

2.2.2. OBESITAT I CÀNCER

Estudis epidemiològics han demostrat que l'obesitat és un factor de risc de molts tipus de càncers, incloent el de fetge, colorectal, pancreàtic, d'ovari, tiroides, gàstric, esòfag o de pit⁶⁸. Tant l'obesitat com el càncer estan influenciats per patrons comuns en l'estil de vida com la dieta. Encara que hi ha antecedents que indiquen que les modificacions a la dieta afecten a la progressió tumoral, no està clar si és un efecte directe o secundari associat a l'IMC. Tot i així, la progressió tumoral està accelerada en els pacients amb obesitat respecte als que tenen normopès¹⁰⁴. Els mecanismes proposats pels quals l'obesitat afecta en el desenvolupament tumoral són la hiperinsulinèmia, els alts nivells de factors de creixement circulants, la inflamació i les adipocines secretades pel TAⁱⁱⁱ, canvis al microbioma, angiogènesi o un increment del nivell d'hormones¹⁰⁵.

Nombrosos tipus de tumors s'envolten de TA que fan servir com a font d'energia, especialment els de la cavitat abdominal i els d'òrgans reproductius. La presència de TA peritumoral s'ha associat amb la progressió tumoral i en que aquests siguin més agressius¹⁰⁶. Diversos estudis apunten que, en presència de cèl·lules tumorals, els adipòcits es desdiferencien alliberant els lípids que emmagatzemen al seu interior perquè les cèl·lules tumorals els puguin utilitzar com a substrat energètic¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. A més, hi ha una secreció alterada de citocines i factors de creixement pel TA que estan relacionats amb la progressió tumoral tant per vies de senyalització oncogèniques com per mecanismes indirectes com l'angiogènesi o la immunomodulació^{106,110}. A part d'afavorir la proliferació tumoral, les molècules secretades pel TA també poden contribuir en la resistència a la quimioteràpia^{111,112}.

A més dels adipòcits, altres components del TA com són els macròfags o les cèl·lules mare mesenquimals derivades del TA (ASCs, de l'anglès *adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells*), poden afectar al microambient tumoral¹¹³. Una vegada hi ha una comunicació intercel·lular del microambient tumoral, es produeixen una sèrie d'interaccions entre els múltiples tipus cel·lulars com les cèl·lules tumorals i les del TA i factors secretats tan localment com sistèmica, que influeixen en processos tan diversos com la promoció de la inflamació, la reprogramació metabòlica de les cèl·lules tumorals, la inhibició de la resposta

ⁱⁱⁱ Es profunditza més en el TA en càncer a l'apartat 3.5

immunitària i la promoció de la metàstasi i invasió tumoral^{114,115}. L'obesitat està associada amb una acumulació de macròfags al TA, els quals incrementen la seva població en proporció al pes corporal^{116–118}. Els macròfags de pacients amb obesitat tenen un fenotip més proinflamatori que contribueix a la inflamació crònica i un canvi en el seu metabolisme cap a la glicòlisi^{119,120}. Les citocines proinflamatòries alliberades pels macròfags, juntament amb un decreixement dels macròfags antiinflamatoris, contribueixen a la malignitat tumoral a través de la promoció del creixement i angiogènesi tumoral i de la degradació de la matriu extracel·lular que promouen la iniciació i progressió tumoral¹²¹.

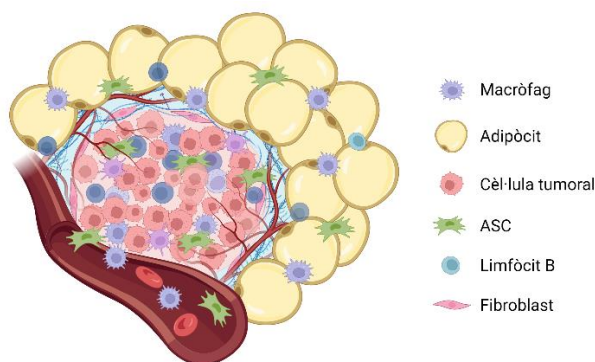


Figura 5. Composició del microambient tumoral. Creada amb Biorender.com

2.3. SURVIVINA I OBESITAT

Tal i com s'ha comentat prèviament, l'expressió i evidència d'una potencial funció de la survivina en teixits no tumorals està en augment, de manera que cada vegada es fa més evident que l'expressió de survivina en teixits adults no és específica de tumors, i una disrupció d'aquesta tindria conseqüències en altres teixits^{7,122}. Fins ara es considerava un gen oncofetal, ja que majoritàriament està sobreexpressada en la majoria de tumors i en estadis embrionaris primerencs, a més que com més madur és un teixit menys expressió de survivina té¹²³.

Tot i això, un estudi previ del nostre grup de recerca va evidenciar per primera vegada el paper de la survivina en TA en el context de l'obesitat¹²⁴. Aquest estudi demostra que els pacients amb obesitat tenen els nivells de survivina circulants i l'expressió de survivina en el TA més elevada que els dels pacients prims. Més específicament, posa de manifest que les ASCs de pacients amb obesitat tenen més expressió i secreció de survivina i

són més resistents a estímuls apoptòtics propis de l'obesitat com la leptina o la hipòxia. A més, els nivells de survivina en obesitat es troben més elevats al TA visceral que al subcutani, suggerint que poden ser resultat de la inflamació crònica més característica dels dipòsits de greix visceral que subcutani. No obstant, en un model animal s'ha comprovat que, després d'una llarga exposició a una dieta alta en greixos, l'expressió de survivina també augmenta en el SAT, proposant que la survivina està regulada per factors induïts pel TA disfuncional, com la inflamació i l'estrès oxidatiu, i que l'exposició a un ambient obesogènic durant llargs períodes de temps també pot alterar la funcionalitat del SAT, el qual secretarà els mateixos factors proinflamatoris i d'estrès oxidatiu que regulen l'expressió de survivina al VAT. A més, després d'una pèrdua de pes induïda per restricció calòrica, els nivells de survivina tant en el TA de models animals com en els leucòcits sanguinis en humans es redueixen, indicant que la survivina podria ser un marcador per a la identificació del microambient protumoral que es genera amb l'obesitat, i que es podria prevenir amb teràpia de pèrdua de pes¹²⁵.

També la hiperglucèmia, una de les principals disfuncions metabòliques associades a l'obesitat, incrementa l'expressió de survivina, la qual intervé en la viabilitat i proliferació de les cèl·lules endotelials¹²⁶. Els nivells de leptina, els quals estan elevats en obesitat, també fan augmentar l'expressió de survivina i promouen la carcinogènesi via un augment de la capacitat migratòria de les cèl·lules tumorals, la qual queda anul·lada si es silencia la survivina¹²⁷. En estudis recents també s'ha observat que tant l'obesitat com l'esteatohepatitis no alcohòlica fan augmentar els nivells de survivina al fetge¹²⁸, amb una expressió significativament diferent entre sexes en models ratolins però no en humans¹²⁹.

Un estudi recent ha revelat que l'expressió de survivina en els adipòcits és sensible als nutrients, de manera que es degrada quan hi ha absència de nutrients però es recupera ràpidament en resposta a l'alimentació. No només això, sinó també s'ha demostrat que la survivina present als adipòcits està implicada en la tolerància a la glucosa, l'activitat termogènica del TA i en la respiració mitocondrial¹³⁰. En concordança, també s'ha publicat un estudi on s'identifica la survivina com un regulador clau en l'emmagatzematge dels lípids i del metabolisme dels adipòcits¹³¹. Globalment indica que, més enllà del paper que la survivina té en el càncer, cada vegada hi ha més evidències del paper de la survivina en la fisiopatologia de malalties metabòliques.

3. TEIXIT ADIPÓS

El TA és un dels principals òrgans que regula l'homeòstasi energètica del cos mitjançant el control de l'emmagatzematge i l'alliberament de lípids. A més, també és un òrgan metabòlicament actiu i complex que secreta diverses hormones, citocines i metabòlits que controlen el balanç energètic sistèmic regulant senyals de gana del SNC, així com l'activitat metabòlica en els teixits perifèrics¹³². Està format per teixit connectiu que conté adipòcits com a tipus cel·lular majoritari, i la fracció estromal vascular (SVF, de l'anglès *stromal vascular fraction*). La SVF està composta per preadipòcits, ASCs, cèl·lules endotelials vasculars, fibroblasts i diferents tipus de cèl·lules immunològiques¹³³. Inicialment, en els mamífers es comptabilitzaven dos tipus de TA diferent en funció de la seva morfologia, localització i funció, anomenats teixit adipós blanc i teixit adipós marró¹³⁴. Actualment aquesta classificació s'ha ampliat amb el teixit adipós beix¹³⁵ (**Figura 6**).

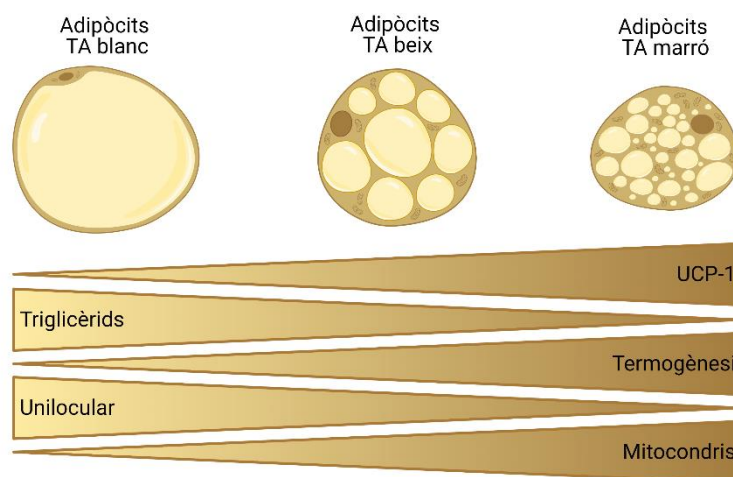


Figura 6. Diferències entre els adipòcits del TA blanc, TA beix i TA marró. Creada amb Biorender.com

El **TA blanc** està compost principalment per adipòcits blancs que són cèl·lules grans i rodones, amb una gran gota lipídica unilocular que ocupa un 90% del volum cel·lular envoltada per una capa fina de citoplasma amb diversos mitocondris. Històricament el TA era considerat un òrgan connectiu que estava especialitzat en emmagatzemar energia en forma de triglicèrids, crear una capa d'aïllament tèrmic i conferir protecció mecànica contra infeccions i lesions. Estudis de les últimes dues dècades han demostrat que el TA té un paper clau en la salut metabòlica sistèmica, ja que a més de ser el principal emmagatzematge d'energia també pot alliberar hormones específiques del TA, lípids i proteïnes que regulen tant el microambient del teixit amb efectes paracrins, com el metabolisme sistèmic a través

d'efectes endocrins¹³². A més, es considera un òrgan metabòlic clau per al manteniment de l'homeòstasi de la glucosa¹³⁶. També pot alliberar i respondre a citocines, exercint funcions immunomoduladores sobre teixits no adiposos¹³⁷. El TA blanc és l'òrgan adipós més gran en els mamífers i representa un 10% o més del pes corporal dels humans adults sans. Es troba de manera subcutània, visceral, inguinal, retroperitoneal o gonadal¹³⁸.

El **TA marró** està format principalment per adipòcits marrons, que en aquest cas són cèl·lules poligonals amb gotes lipídiques multiloculars al citoplasma, on també hi ha gran quantitat de mitocondris. La seva funció principal és la de termogènesi, un mecanisme adaptatiu que produeix calor per a mantenir la temperatura corporal, especialment en condicions de baixes temperatures ambientals¹³⁹. L'activitat termogènica dels adipòcits marrons ve donada per una alta densitat de mitocondris i a l'expressió de la proteïna desacobladora 1 (UCP1, de l'anglès *uncoupling protein 1*). UCP1 es troba a la membrana mitocondrial interna i transporta protons des de l'espai intermembrana mitocondrial cap a la matriu mitocondrial sense generar trifosfat d'adenosina (ATP, de l'anglès *adenosine triphosphate*). Aquest procés desacobla el metabolisme de la glucosa i els àcids grassos en la generació d'ATP i dona lloc a la dissipació d'energia en forma de calor¹⁴⁰. A causa de la seva elevada despesa energètica, els adipòcits marrons tenen una alta capacitat per absorbir i utilitzar combustibles i, per tant, funcionen com un dipòsit metabòlic de glucosa i àcids grassos lliures¹⁴¹. El TA marró també té un rol important en la regulació del metabolisme mitjançant la seva funció secretora, alliberant molècules que medien la comunicació entre diferents òrgans i teixits amb accions autocrines, paracrines i endocrines¹⁴² i és considerat un reservori de glucosa, lípids i aminoàcids¹⁴³. A més, l'acumulació de TA marró va lligada amb antiinflamació, antifibrosi i angiogènesi¹⁴⁴. En nounats, el TA marró es troba abundantment a la regió interescapular i el coll, on hi té la funció de prevenció de la hipotèrmia. Durant la infància hi ha una involució d'aquest teixit, i es creu que en adults només hi queden restes vestigials. Malgrat tot, diversos estudis han demostrat que els adults tenen TA marró actiu al coll, zona supraclavicular, paravertebral i suprarenal¹⁴⁴. Els adipòcits marrons es deriven de cèl·lules mare mesenquimals (MSCs, de l'anglès *mesenchymal stem cells*) que expressen el factor miogènic 5 (Myf5), mentre que els adipòcits blancs es deriven de MSCs que no expressen aquest factor de transcripció. Myf5 és un gen que s'expressa durant la miogènesi

embrionària, on és un factor transcripcional clau involucrat en el desenvolupament muscular¹⁴⁵.

El **TA beix** s'origina a partir de les cèl·lules del TA blanc endotelial i perivascular i té característiques tant del TA blanc com del TA marró¹⁴⁶. Normalment es desenvolupa dins del TA blanc a partir d'una subpoblació de preadipòcits¹³⁵ o via la transdiferenciació dels adipòcits blancs existents¹⁴⁷. Els adipòcits del TA beix tenen gotes lipídiques multiloculars i un alt contingut de mitocondris, però tot i això, l'expressió gènica d'aquests adipòcits indica que representen un tipus de cèl·lula de greix termogènica diferent als adipòcits marrons¹³⁵. Els adipòcits beix expressen baixos nivells de UCP1 en condicions basals, però tenen propietats termogèniques sota estimulació per l'exercici o l'exposició al fred degut a una alta expressió de UCP1¹⁴⁸. Tant els adipòcits beix com els marrons poden captar la glucosa i àcids grassos per a produir calor, per això tenen un paper clau en la regulació de la glucosa i el metabolisme lipídic¹⁴⁰. A més, hi ha diversos estudis que han identificat que la dieta, l'exercici, medicaments o inclús adipocines poden induir la formació dels adipòcits beix¹⁴⁷. Aquest fenomen es coneix com a "emmarronament del TA blanc" i es creu que pot protegir contra l'obesitat o disfuncions metabòliques associades.

3.1. TEIXIT ADIPÓS BLANC

Aquesta tesi es centrarà en el TA blanc, ja que és el principal reservori de greix i s'adapta ràpidament a les diferents condicions nutricionals, produint un alt nombre de molècules que causen els majors canvis metabòlics a nivell sistèmic¹³². El TA blanc és el tipus de TA més abundant al cos humà. Els principals dipòsits de greix es classifiquen segons la seva localització anatòmica i característiques endocrines i metabòliques i es cataloguen com a subcutanis o viscerals¹⁴⁹. El **TA subcutani** (SAT, de l'anglès *subcutaneous adipose tissue*) es troba sota la pell, principalment al voltant de l'abdomen, malucs i cuixes i representa aproximadament el 80% del pes total del greix corporal. El **TA visceral** (VAT, de l'anglès *visceral adipose tissue*) es localitza a la zona omental (al voltant de l'estómac), mesentèrica (associat amb l'intestí), epiploica (al llarg del còlon) i epicardíaca (al voltant del cor)¹⁵⁰ (Figura 7). A més d'aquests dos principals dipòsits de greix, també es poden trobar dipòsits més

petits d'adipòcits en localitzacions més diverses com al moll de l'os, múscul, pit, dermis, òrbita ocular, cara o peus¹⁴⁹.

La distribució del TA depèn del sexe, on les dones amb normopès tenen un 25-30% de greix corporal, mentre que els homes en tenen un 10-20%. A més, les dones premenopàusiques tenen menys VAT i més acumulació de SAT a la part inferior del cos, a la zona gluti-femoral, mentre que els homes acumulen més greix a la zona central del cos, tant a la zona abdominal subcutània com visceral¹⁵⁰.

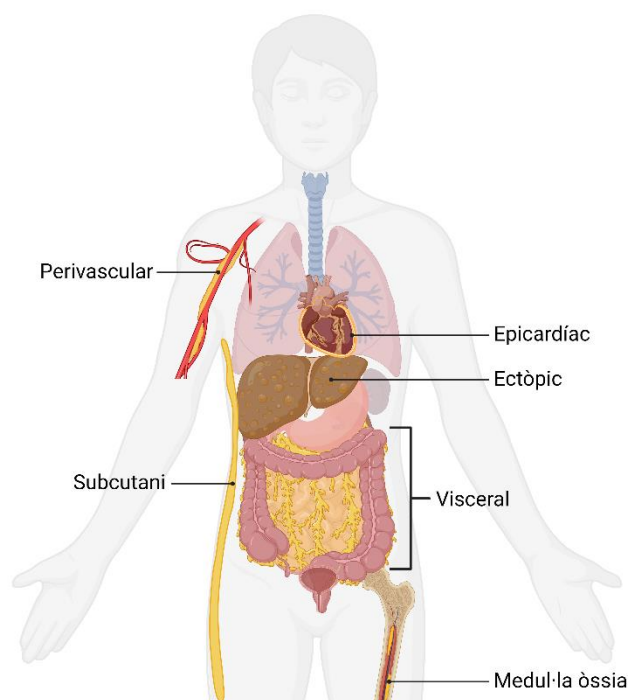


Figura 7. Localització del TA en el cos humà. . Creada amb Biorender.com, adaptada de Fuster et al., 2016¹⁵¹.

El VAT i el SAT no només es diferencien segons la seva localització, sinó que les cèl·lules precursoras que originen cada un dels teixits són diferents, conferint-los una funcionalitat i característiques diferents¹⁵². L'expressió de més de 500 gens humans varia entre els preadipòcits viscerals i subcutanis, i aproximadament una quarta part d'aquests són reguladors del desenvolupament¹⁵³. A més, els adipòcits del SAT es comencen a diferenciar en els estadis prenatals, mentre que els del VAT ho fan després de nàixer^{154,155}.

Són nombrosos els estudis que mostren que a nivell metabòlic, el VAT és més resistent a la insulina, té una major taxa de lipòlisi i una menor absorció dels àcids grassos circulants i triglicèrids. Aquestes diferències, com a conseqüència, provoquen que els adipòcits d'ambdós dipòsits de greix tinguin una morfologia diferent. Per exemple, la mida

dels adipòcits del VAT és major que la dels del SAT, ja que a mesura que es tornen hipertròfics, tenen una major RI i capacitat lipolítica, sent també un dels factors que uneix l'adipositat abdominal amb el risc cardiovascular^{152,156,157}. A més, en comparació amb el SAT, el VAT generalment es caracteritza per una major secreció de citocines proinflamatòries com IL-6 o TNF i una major infiltració de macròfags, mentre que el SAT secreta més adiponectina, una adipocina antiinflamatòria que té efectes metabòlics beneficiosos^{138,152,158}.

A més, el SAT està considerat un teixit metabòlicament sa, especialment quan es localitza a la zona gluti-femoral, on protegeix d'alteracions metabòliques, amb una millora de la tolerància a la glucosa i una correlació negativa amb la RI¹⁵⁹. D'altra banda, el VAT està associat amb la inflamació i un augment del risc de malalties metabòliques. Específicament, hi ha estudis clínics que relacionen el VAT amb marcadors de síndrome metabòlic, com l'índex HOMA-IR (avaluació del model homeostàtic, de l'anglès *homeostatic model assessment*, que quantifica la RI mitjançant el producte entre la concentració de glucosa i la d'insulina en mg/dl dividit per 405) o els triglicèrids en sang, i amb esteatosi hepàtica o malalties cardiovasculars, degut a un alliberament d'àcids grassos i citocines proinflamatòries cap als òrgans que envolta¹⁴⁵. En aquesta línia, estudis *in vivo* han demostrat que un transplantament de VAT a una localització típica del SAT no té efectes metabòlics significatius, però un transplantament de SAT al compartiment visceral porta a una millora de l'homeòstasi de la glucosa i menor adipositat, indicant que les diferències intrínseques entre els dipòsits de greix i, especialment les del SAT, poden tenir efectes beneficiosos per al metabolisme¹⁶⁰.

3.2. COMPOSICIÓ DEL TEIXIT ADIPÓS BLANC

El TA és un teixit connectiu format per adipòcits, els quals comprenen d'un 35 a un 70% de la massa total del TA, i altres tipus cel·lulars que formen la SVF com ASCs, preadipòcits, fibroblasts, cèl·lules endotelials i cèl·lules immunològiques com macròfags, limfòcits i eosinòfils, envoltades de xarxes d'innervació i capil·lars, que funcionen conjuntament com una unitat integrada¹⁶¹. Les proporcions de les poblacions cel·lulars de la SVF difereixen segons el tipus, localització i estat metabòlic del TA al qual pertanyen⁹⁶. La

majoria de les cèl·lules residents al teixit adipós produeixen i secreten hormones, proteïnes i citocines (el conjunt de les quals s'anomena secretoma), que poden exercir efectes autocrins, paracrins i/o endocrins en les cèl·lules veïnes o en teixits i òrgans allunyats¹⁶². De la mateixa manera, tant la composició del TA com del secretoma del TA és altament dependent del dipòsit de greix que es localitzi i es pot veure afectat per factors locals i sistèmics lligats a inflamació, RI o obesitat, entre altres¹⁶³.

El correcte funcionament dels teixits depèn, entre altres, de les seves interaccions cel·lulars, les quals es veuen afectades en un estat patològic. En el TA, els macròfags i les ASCs tenen un paper molt important en el manteniment del teixit. Els macròfags reben missatges del microambient del TA que fan que modulin la seva funció i fenotip, i un dels principals tipus cel·lulars que modifica els macròfags amb les seves propietats immunomoduladores són les ASCs¹⁶⁴⁻¹⁶⁶. El microambient que es genera entre els diversos tipus cel·lulars que componen el TA, concretament les ASCs i els macròfags i els efectes paracrins causats per la seva interacció ha centrat l'atenció d'aquest treball.

3.2.1. CÈL·LULES MARE

Les ASCs, així com altres tipus de MSCs com les de placenta, moll de l'os o polpa dental, són cèl·lules multipotents involucrades en el manteniment de l'homeòstasi tissular, la regulació de la resposta immune i la regeneració tissular^{167,168}. No només això, sinó que les ASCs són les cèl·lules precursors dels adipòcits que, a més, també tenen un alt potencial immunomodulador^{96,169,170}

Les ASCs tenen un extens potencial de proliferació i la capacitat de diferenciar-se a diferents llinatges *in vitro* com adipòcits, osteòcits i condrocits. En un estat saludable les ASCs es localitzen principalment de manera perivascular i es diferencien després de ser estimulades per diferents factors^{171,172}. Per tal de poder caracteritzar les ASCs, s'han descrit diversos clústers de diferenciació (CD) de la superfície cel·lular, la majoria dels quals són marcadors comuns de tots els tipus de MSCs. En general, una anàlisi dels antígens CD tant positius com negatius assegura que les cèl·lules aïllades són cèl·lules mare i que no hi ha altres llinatges que contaminin la preparació. Les ASCs expressen les molècules d'adhesió cel·lular CD29 i CD44, les molècules receptores CD90, CD105 i CD73, i no haurien d'expressar els antígens de superfície de llinatges de cèl·lules hematopoètiques com CD11b, CD14 o

CD45, ni marcadors endotelials com CD31 i HLA-DR¹⁷³. Tot i això, les poblacions de ASCs són heterogènies, tant a nivell d'expressió de marcadors com de funcionalitat, degut a diversos factors com l'edat, sexe, localització i condició clínica^{171,174,175}. Per exemple, les ASCs del SAT tenen una major capacitat proliferativa i de diferenciació a llinatge adipogènic que les ASCs del VAT¹⁷⁶, degut a que les ASCs subcutànies tenen una expressió més elevada de gens involucrats en l'angiogènesi i proliferació, mentre que les ASCs visceralen tenen sobreexpressats gens relacionats amb la biosíntesi lipídica i el metabolisme^{177,178}.

Les ASCs poden influenciar les propietats funcionals de les cèl·lules immunològiques, ja que el seu potencial immunosupressiu les permet inhibir les cèl·lules NK i reduir la capacitat de proliferació i de producció de citocines proinflamatòries dels limfòcits^{179–181}. Les ASCs coordinen i mantenen tant l'ambient local com el sistèmic amb la seva capacitat immunomodulatòria i de reparació dels danys a través de senyalització paracrina i interacció directa cèl·lula-cèl·lula¹⁸². Secreten mediadors solubles com citocines, factors de creixement i quimiocines que propicien la proliferació cel·lular, migració i diferenciació de les mateixes ASCs i cèl·lules epitelials, promovent la cicatrització, i alhora alliberant citocines antiinflamatòries que redueixen la inflamació en el microambient. Totes aquestes propietats mencionades, juntament amb la seva activitat antifibròtica, antiapoptòtica i proangiogènica tant *in vitro* com *in vivo*, fan que siguin àmpliament utilitzades en els camps de l'enginyeria de teixits i teràpia cel·lular en àmbits tant diversos com la regeneració de la pell, malaltia de Crohn, Alzheimer o accidents cerebrovasculars^{183,184}.

A més, les ASCs tenen un paper clau en l'expansió del TA, ja que són les cèl·lules precursors dels adipòcits i s'encarreguen de mantenir l'homeòstasi i la regeneració del TA a través de l'adipogènesi¹⁸⁵. El procés de diferenciació de les ASCs a adipòcits s'inicia per la interacció de diferents factors de transcripció i proteïnes al microambient del TA¹⁸⁶. Els principals factors clau involucrats són la família de les proteïnes d'unió al potenciador CCAAT (C/EBP, de l'anglès *CCAAT-enhancer-binding proteins*) i el receptor gamma activat per proliferador de peroxisomes (PPAR- γ , de l'anglès *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*). C/EBP β i C/EBP δ són els encarregats d'iniciar la diferenciació, i activen a C/EBP α i PPAR- γ , els quals són indispensables per a la captació de glucosa i regulació de la síntesi lipídica^{154,169}. Per al correcte desenvolupament i funció del TA, hi ha un balanç entre les

funcions immunomoduladora i adipogènica de les ASCs, que en processos patològics com l'obesitat o la síndrome metabòlica es veuen alterats. Més concretament, el nostre grup ha demostrat en diferents estudis com diferents alteracions metabòliques provoquen l'alteració de tant les funcions com el secretoma de les ASCs, de manera que afecten les cèl·lules que tenen al voltant i promouen l'expansió i disfuncionalitat del TA^{178,187-189}.

3.2.2. MACRÒFAGS

Els macròfags són components essencials de la immunitat innata amb capacitats fagocítiques. Tenen un paper important en la iniciació de la inflamació, ja que alliberen citocines i quimiocines que recluten altres cèl·lules immunològiques cap als llocs on hi ha inflamació. Són cèl·lules clau per al manteniment de l'homeòstasi i altres processos fisiològics a part de la immunitat innata, com poden ser la funció metabòlica, la reparació i remodelació tissular o l'eliminació de restes cel·lulars.

Els macròfags estan presents en tots els teixits, on s'adapten a cadascun d'ells i hi exerceixen funcions específiques que són essencials per a l'homeòstasi d'aquests¹⁹⁰. Per exemple, si es troben al SNC s'anomenen micròglia, els de l'os són osteoclasts, els del fetge són cèl·lules de Kupffer i els del teixit connectiu s'anomenen histiòcits¹⁹¹. El TA també té els seus propis macròfags residents que, en un estat saludable del TA, representen entre el 5 i el 10% del total de les cèl·lules de la SVF. D'altra banda, en situacions patològiques com pot ser l'obesitat es produeix un increment dràstic de les proporcions de la població de macròfags, els quals arriben a ser fins a un 50% de les cèl·lules estromals¹⁹².

Durant dècades es va assumir que els macròfags residents als teixits es derivaven del monòcits circulants, però estudis recents han revelat que l'àmplia majoria de poblacions de macròfags residents en teixits s'han desenvolupat durant estadis embrionaris i s'han mantingut fins l'edat adulta¹⁹³⁻¹⁹⁵. Per tant, els teixits contenen una població heterogènia de macròfags que són tant d'origen embrionari com derivats del moll de l'os. A més del desenvolupament, l'ambient local del teixit també té un paper important en la diversitat i plasticitat dels macròfags que s'hi troben^{196,197}.

Els macròfags són clau en la regulació del fenotip del TA en resposta a estímuls fisiològics i patològics. Tenen la capacitat d'adaptar-se ràpidament als canvis del

microambient, anomenada “commutació fenotípica” o “*phenotypic switching*” en anglès, de manera que poden adquirir una àmplia varietat de fenotips^{117,198,199}.

A nivell *in vivo*, els macròfags colonitzen el TA a diferents estadis de desenvolupament i diferents estats inflamatoris, i acaben localitzant-se en nínxols sub-tissulars que els confereixen un fenotip i funcions úniques^{196,200}. Els macròfags s'han classificat tradicionalment i especialment per als estudis *in vitro* en dos grups: els activats de manera clàssica, M1 o proinflamatoris i els activats de manera alternativa, M2 o antiinflamatoris²⁰¹ (Figura 8).

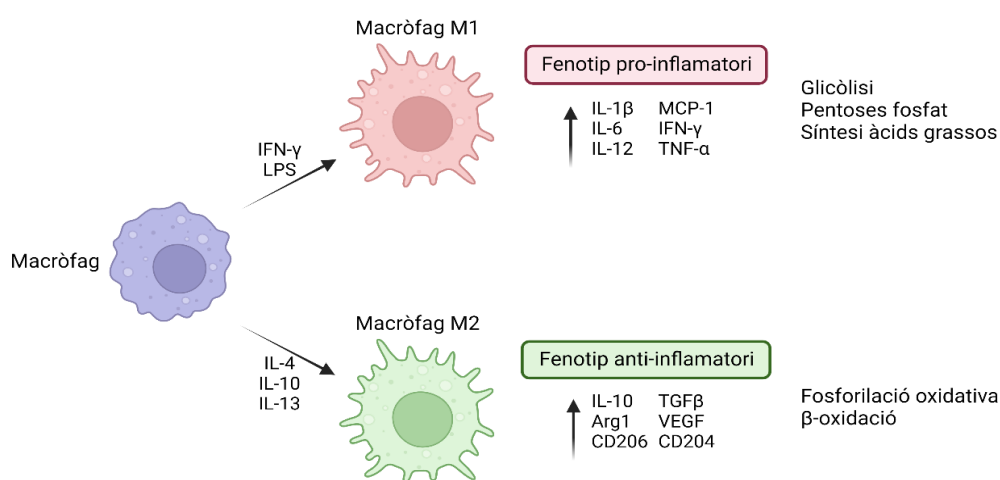


Figura 8. Polarització dels macròfags, fenotip i vies metabòliques associades. Creada amb Biorender.com

Els macròfags M1 es generen estimulants macròfags M0 amb interferó gamma (IFN- γ) o lipopolisacàrid (LPS) i secreten altes quantitats de citocines proinflamatòries com TNF, IL-6 o ROS que contribueixen al desenvolupament de la RI en activar vies de senyalització que inhibeixen la cascada de la insulina. Els M1 augmenten la captació de glucosa i la glicòlisi aeròbica es converteix en la seva via metabòlica principal. Es considera que aquest augment de la glicòlisi seria un mecanisme per a generar ATP ràpidament i produir ROS que faran servir com a bactericida^{202,203}. Es creu que els macròfags M1 estan involucrats en el manteniment de l'homeòstasi del cos humà a través de la defensa contra infeccions i efectes antitumorals, tot i que un excés de resposta immunològica pot portar a inflamació crònica o malalties inflamatòries^{204,205}.

Els macròfags M2 es polaritzen utilitzant l'estimulació amb IL-4, IL-10 o IL-13 i secreten citocines antiinflamatòries com arginasa-1, IL-10 o el factor de creixement

transformador beta (TGF β , de l'anglès *transforming growth factor beta*). Aquest tipus de macròfag ajuda a la preservació de la funció dels adipòcits promovent la reparació tissular i l'angiogènesi en el TA. També es caracteritzen per mantenir la sensibilitat a la insulina dels adipòcits amb la producció de IL-10 que contraresta els efectes negatius del TNF. Els M2 tenen el metabolisme mitocondrial oxidatiu augmentat i, a part de la glucosa també són capaços de metabolitzar els àcids grassos per a suplir l'increment de la fosforilació oxidativa^{201,206}. Depenent del context, el desenvolupament, els estímuls i els marcadors fenotípics que expressin, els macròfags M2 es poden subdividir en els subtipus M2a, M2b, M2c i M2d^{207,208}.

La diferència entre ambdós tipus de macròfags també es reflecteix en la seva localització, ja que els macròfags antiinflamatoris resideixen majoritàriament de manera intersticial entre els adipòcits, mentre que els macròfags proinflamatoris se solen trobar a les estructures en forma de corona (CLS, de l'anglès *crown-like structure*)¹¹³. A més, en condicions fisiològiques, aproximadament el 90% els macròfags del TA tenen un fenotip M2, i només entre un 1 i un 5% són M1. En condicions d'obesitat augmenta el nombre total de macròfags, però principalment s'incrementa el reclutament de macròfags M1, que redunda en un increment del ràtio M1/M2, principalment en el VAT²⁰⁹.

Tot i la utilitat de la classificació tradicional, és evident que els macròfags són una població cel·lular amb molta plasticitat i que el seu fenotip depèn dels estímuls externs. El nombre i funcions exactes dels macròfags en el TA està evolucionant constantment, i els mecanismes que defineixen la seva particular activació s'estan clarificant. No obstant, s'ha evidenciat que en el TA coexisteixen diferents poblacions de macròfags que no corresponen al fenotip M1 ni M2, sinó que més aviat depenen de l'activació metabòlica induïda per diversos estímuls metabòlics com la glucosa, insulina o àcids grassos lliures, anomenats macròfags metabòlicament activats^{113,118,210}.

L'alta plasticitat dels macròfags els permet reaccionar i adaptar-se als diferents senyals específics del TA, alhora que conserven la seva funció fagocítica. La funció principal dels macròfags del TA és fagocitar els adipòcits morts per ajudar en la renovació cel·lular d'aquests. Com els adipòcits són molt més grans que els macròfags, aquests no poden fagocitar-los sencers. Per a resoldre aquesta situació, els macròfags formen unes estructures

anomenades CLS al voltant d'adipòcits morts¹⁹⁹, on hi alliberen enzims lisosomals a través d'exocitosi que trenquen la membrana dels adipòcits. Com a resultat, els adipòcits alliberen àcids grassos lliures que són captats pels macròfags, de manera que poden evolucionar a cèl·lules multinucleades gegants o cèl·lules espumoses¹¹³.

3.3. FUNCIONS DEL TEIXIT ADIPÓS BLANC

3.3.1. FUNCIÓ D'EMMAGATZEMATGE D'ENERGIA

El TA és un òrgan metabòlic que té una funció clau en la regulació de l'homeòstasi de l'energia corporal. La funció principal del TA blanc és la d'actuar com a reservori d'energia per al correcte funcionament dels altres òrgans, mentre que la del TA marró és l'acumulació de lípids per a la termogènesi adaptativa quan fa fred. En una situació d'excés de nutrients el TA emmagatzema els nutrients excedents en forma de lípids, en canvi, quan hi ha un dèficit d'energia subministra energia a altres teixits mitjançant la lipòlisi dels lípids que emmagatzema. En resposta a variacions de l'estat energètic, el TA es remodela ràpidament i dinàmicament, promovent canvis en el nombre (hiperplàsia) i/o en la mida (hipertròfia) dels adipòcits²¹¹. De manera simultània, diverses cèl·lules de la SVF també pateixen canvis numèrics i/o funcionals, contribuint al manteniment de la funció de reservori d'energia del TA²¹². El balanç entre el nombre i mida dels components, fibrosi i lipòlisi al TA està associat amb diferent risc de progressió cap a una disfunció fisiològica¹³².

3.3.2. FUNCIÓ ENDOCRINA

El TA té la capacitat de secretar més de 600 substàncies bioquímiques com hormones, metabòlits, mediadors inflamatoris o factors de creixement que tenen gran importància a nivell sistèmic i metabòlic⁹⁶. Aquests factors són secretats tant pels adipòcits com pels components de la SVF, i tenen un paper important en diferents processos com la despesa energètica, el control de la gana, la sensibilitat a la insulina, l'homeòstasi de la glucosa, reparació tissular o inflamació. Les molècules secretades pel TA poden actuar com a hormones endocrines, afectant a parts del cos diferents de la d'origen, o de manera paracrina o autocrina, afectant les cèl·lules veïnes o les pròpies cèl·lules secretores en lloc d'entrar al torrent sanguini²¹³. La desregulació dels nivells d'aquestes molècules pot

contribuir a la disfunció metabòlica sistèmica, així com a patogènesi de malalties metabòliques cròniques i alguns tipus de càncers²¹⁴.

3.3.3. FUNCIÓ IMMUNOMODULADORA

Els components del TA secreten molècules que modulen la inflamació crònica i secreten proteïnes extracel·lulars que impacten en el metabolisme¹³⁷, alhora que tenen un paper immunomodulatori i de presentació d'antígens que activen o suprimeixen la resposta immunològica tant del TA com sistèmica²¹⁵.

Les ASCs tenen un alt poder supressor de la resposta immune, més que altres tipus de MSCs²¹⁶. Els efectes immunomodulatoris que se'ls atribueixen són principalment pels alts nivells de citocines que secreten. Les ASCs inhibeixen la proliferació dels limfòcits B i la seva diferenciació cap a cèl·lules plasmàtiques, incapaces de produir anticossos²¹⁷. Les cèl·lules B són cèl·lules presentadores d'antígens que produeixen citocines tant pro com antiinflamatòries. Quan les ASCs i les cèl·lules B estan en cocultiu, les ASCs tenen un efecte inhibitori de les propietats quimioattractives de les cèl·lules B via la desregulació dels seus receptors de quimiocines²¹⁸. D'altra banda, les ASCs poden induir la proliferació d'una subpoblació de cèl·lules B que secreta IL-10. Aquesta és una citocina immunosupressora que inhibeix la producció de citocines proinflamatòries de les cèl·lules T activades²¹⁹. Les ASCs també poden inhibir la maduració de les cèl·lules dendrítiques i induir una desdiferenciació dels macròfags cap a cèl·lules antiinflamatòries²²⁰.

Els adipòcits també tenen un paper important en la funció immunomoduladora del TA¹³⁷. Secreten una gran quantitat de factors que tenen funcions tant pro com antiinflamatòries que impacten al metabolisme sistèmic. Per exemple la leptina, una de les hormones més estudiades secretada pels adipòcits, a part de la seva funció metabòlica també actua com a molècula proinflamatòria activant les cèl·lules immunològiques²²¹. Els adipòcits també secreten vesícules extracel·lulars, les quals contenen microRNAs, proteïnes, mRNAs i lípids que són fagocitats per altres cèl·lules i els influeixen en el desenvolupament cel·lular, metabolisme i funcionalitat o en l'activació dels macròfags residents al TA²²². Els adipòcits poden actuar com a molècules presentadores d'antígens, contribuint a la immunitat innata al TA²²³.

A més, totes les funcions del TA es poden modular per cèl·lules immunitàries. El TA alberga una gran quantitat de cèl·lules immunitàries, tant de la immunitat innata com de l'adaptativa, que tenen efectes pro o antiinflamatoris depenent del microambient i de la readaptació metabòlica. La inflamació del TA pot alterar el fenotip i l'expressió gènica de les cèl·lules immunitàries del TA, principalment dels macròfags, promovent complicacions metabòliques²²⁴. Per exemple, en situacions d'estrès fisiològic hi ha una infiltració de macròfags al TA²²⁵, els quals canvien el seu fenotip antiinflamatori a un proinflamatori i, juntament amb els adipòcits, secreten molècules proinflamatòries que regulen els canvis patològics de l'obesitat, com la RI i la disfunció endotelial²²⁶. El TA també és un reservori de cèl·lules T de memòria amb una elevada capacitat proliferativa que tenen una resposta ràpida i àmplia contra els antígens²²⁷. Els adipòcits sobreexpressen gens relacionats amb la defensa antimicrobiana i produeixen pèptids en resposta a infeccions, de manera que contribueixen en la reacció en cadena de la resposta innata desencadenada per la resposta de memòria²²⁸.

3.4. EL TEIXIT ADIPÓS EN OBESITAT

En una situació de balanç positiu d'energia que perdura en el temps, el TA s'expandeix principalment per hipertròfia, però també amb hiperplàsia¹³². La hipertròfia es dona per un augment de la quantitat de triacilglicerols (TAG) que emmagatzemen els adipòcits del TA. La hiperplàsia està relacionada amb factors genètics involucrats en l'augment del nombre de preadipòcits i de la diferenciació d'aquests a adipòcits madurs. El correcte desenvolupament del TA depèn de l'equilibri entre la hiperplàsia i la hipertròfia dels adipòcits²¹². Aquestes respostes exigeixen que el TA reaccionï dinàmicament a l'entorn canviant dels nutrients, procés que fa referència generalment a la remodelació del TA¹⁴⁵.

S'ha demostrat que en una situació d'obesitat la producció de citocines pel TA expandit porta a un increment dels nivells de citocines proinflamatòries al sèrum, les quals al seu torn activen vies de senyalització que porten a la RI tant als adipòcits com a altres tipus cel·lulars com els hepatòcits²²⁹. Encara que els adipòcits són uns reguladors clau en la

remodelació i la inflamació del TA, els macròfags i les ASCs també tenen un paper important en aquests canvis a nivell local.

Un dels principals factors del TA alterats en l'obesitat són els canvis inflamatoris que es produeixen al microambient del TA, fonamentalment donats per un significatiu canvi en el nombre de macròfags en el TA. Els macròfags són reclutats per a crear un ambient permissiu per a la multitud d'efectes adversos que deriven de l'expansió del TA. Els factors que més influeixen en el reclutament de macròfags al TA són la necrosi dels adipòcits, la secreció augmentada de quimiocines i la hipòxia. La necrosi dels adipòcits provocada per la hipertròfia porta a la formació de CLS amb un gran nombre de macròfags envoltant l'adipòcit necròtic²³⁰. Quimiocines derivades tant dels adipòcits com dels macròfags, com la proteïna quimioattractant de monòcits 1 (MCP-1, de l'anglès *monocyte chemoattractant protein-1*), promouen la mobilització de macròfags de la medulla òssia als teixits²³¹. A més, els adipòcits secreten altes quantitats de TNF- α , el qual també estimula la producció de MCP-1 tant pels preadipòcits com per cèl·lules endotelials¹⁶⁴.

La necessitat d'expandir-se que té el TA per a poder emmagatzemar més triglicèrids fa que aquesta expansió depengui del subministrament. Quan augmenta el volum dels adipòcits l'oxigen ha de recórrer una distància més llarga abans d'arribar al mitocondri de l'adipòcit, fent que en ocasions es creïn àrees amb microhipòxia i s'activi HIF-1, un regulador clau de la hipòxia²³². El TA hipòxic augmenta l'expressió de gens profibròtics i porta a la fibrosi del teixit²³³. En estat de fibrosi s'incrementa el nivell d'estrès dels adipòcits hipertròfics així com de la necrosi, que alhora porta a un augment de la infiltració de macròfags i altres cèl·lules immunes²³². A més, hi ha una gran quantitat d'estudis que demostren que la inflamació crònica és una de les principals característiques de la disfunció del TA i de la desregulació metabòlica sistèmica²³⁴⁻²³⁶.

El microambient del TA dels individus amb obesitat també altera el fenotip i la funcionalitat de les ASCs. Tant en models animals com en humans s'ha trobat que el nombre de ASCs en el TA augmenta en una situació d'obesitat en comparació amb una sana²³⁷, a més d'haver-hi diferències en el secretoma i en el potencial angiogènic^{180,238}. Estudis previs del nostre grup de recerca han mostrat com les ASCs de pacients amb obesitat tenen una expressió augmentada dels marcadors inflamatoris, a més de major capacitat migratòria i

fagocítica que les ASCs de pacients primis¹⁷⁸. A més, també tenen la seva activitat immunosupressora i la capacitat de diferenciació a adipòcits reduïda¹⁸⁷.

3.5. EL TEIXIT ADIPÓS EN CÀNCER

Tal i com s'ha mencionat anteriorment, hi ha tumors com el de pit, ovari o pròstata, que envaeixen el TA adjacent. En aquests casos hi ha una interacció directa entre les cèl·lules del TA i les del tumor al front invasiu. Aquest contacte modifica tant fenotípicament com metabòlicament i genèticament, totes les cèl·lules que formen part del microambient tumoral, tant les que formen part del tumor com les que no, per a afavorir la supervivència i proliferació tumoral^{106,239,240}. Tant el TA sa alterat per les cèl·lules tumorals com el TA metabòlicament poc sa d'un individu amb obesitat comparteixen diverses característiques, incloent la infiltració de cèl·lules immunitàries, la secreció d'interleucines proinflamàtòries, un augment de la leptina i una disminució de l'adiponectina, entre altres, de manera que s'altera l'homeòstasi del TA^{232,241}. La secreció alterada de citocines, factors de creixement i hormones del TA disfuncional es considera un dels principals components en el desenvolupament tumoral i un mecanisme que connecta obesitat i càncer²⁴².

Els factors secretats pels tumors influeixen els adipòcits que estan al front invasiu del tumor a modificar el seu fenotip cap a un de més lipolític i amb una sobreexpressió de proteases i citocines proinflamàtòries^{111,243}. Tenen les gotes lipídiques més petites que els adipòcits que estan més allunyats del tumor perquè estan reprogramats per a incrementar la lipòlisi, de manera que els lípids secretats serveixin com a font d'energia per a les cèl·lules tumorals¹⁰⁶. Al microambient tumoral, els adipòcits són el reservori de lípids de les cèl·lules canceroses. Inicialment es pensava que les cèl·lules tumorals utilitzaven la lipogènesi *de novo* (fent servir glucosa i glutamina com a substrats) com a font de lípids, però estudis recents han mostrat que tenen preferència per la internalització d'àcids grassos lliures exògens alliberats pels adipòcits més que per la lipogènesi *de novo*^{244,245}. La reprogramació del metabolisme lipídic, tot i que és un camp menys estudiat que recentment s'ha observat que també contribueix en el desenvolupament de malalties metabòliques com l'obesitat, DT2. Recentment també s'ha relacionat amb el creixement tumoral ja que és una via de

subministrament de metabòlits important^{246–248}, a més d'estar associada a una major secreció de lactat, piruvat i cossos cetònics que afavoreixen la progressió tumoral^{111,249}.

Els tumors recluten ASCs del TA mitjançant la secreció de citocines quimioattractants. Una vegada les ASCs es troben al microambient tumoral promouen diversos trets característics dels càncers, principalment la vascularització, i es tornen més plàstiques fenotípicament en resposta als senyals del tumor^{113,250}. Les ASCs també secreten factors paracrins que porten a l'activació de senyals antiapoptòtics, mitogènics i immunosupressius que col·laboren en la progressió tumoral²⁵¹.

En un context d'obesitat hi ha un major reclutament de ASCs del TA cap al microambient tumoral que fa incrementar la proliferació cel·lular i l'angiogènesi tumoral degut a una maximització de la vasculatura tumoral que proporciona oxigen i nutrients essencials per al creixement del tumor, alhora que elimina metabòlits tòxic^{237,252}. Aquest reclutament de ASCs també provoca que el nombre de ASCs que es troben en la circulació en els pacients amb obesitat i càncer es vegi augmentat^{252,253}.

Les ASCs no només es desplacen als tumors, sinó que també es modifiquen per a promoure el creixement tumoral i la metàstasi. Una vegada al microambient tumoral, secreten nivells més elevats de quimiocines que, entre altres, a través del receptor de quimiocines de tipus 2 (CCR2, de l'anglès *C-C chemokine receptor type 2*), recluten macròfags cap al tumor i, a més, els polaritzen cap a un fenotip de **macròfag associat a tumor (MAT)**^{254,255}.

3.5.1. MACRÒFAGS ASSOCIATS A TUMORS

Els MAT són la població immunològica més abundant que hi ha al microambient tumoral i tenen propietats heterogènies, tant pro com antitumorigèniques²⁵⁶. Els MAT antitumorigènics tenen propietats de cèl·lules presentadores d'antígens, mentre que els MAT protumorigènics són immunosupressius. L'habilitat que tenen els MAT d'alterar les seves propietats pot causar canvis significatius en el microambient tumoral, resultant en subpoblacions de MAT amb diferents capacitats d'afavorir el creixement tumoral i la metàstasi²⁵⁷.

L'alta plasticitat dels macròfags fa que els MAT tinguin un fenotip mixt entre els macròfags M1 i els M2. Els marcadors de MAT més consolidats són CD68, CD14 o CD45, però el fet que també siguin marcadors establerts dels macròfags M1 o M2 i no siguin exclusius de la població de MAT, complica el seu estudi²⁵⁸. A més, també canvien el seu fenotip i funció depenent de la regió específica que es trobin²⁵⁹. Per exemple, les àrees del microambient tumoral hipòxiques i necròtiques estan majoritàriament poblades amb macròfags M2 amb una limitada capacitat de presentació d'antígens, una disminució de la mobilitat i una secreció abundant de factors protumorals. D'altra banda, a les àrees perivasculares es poden trobar poblacions de macròfags M1, amb funcions proangiogèniques que indueixen la iniciació tumoral creant un ambient mutagènic²⁶⁰. En tant que secreten diferents molècules com IL-1 β , VEGF, factor de creixement epidèrmic (EGF, de l'anglès *epidermal growth factor*) o TGF β i afecten a altres cèl·lules immunològiques, no només tenen un paper en la inflamació crònica, sinó que també inicien, promouen o suprimeixen el desenvolupament tumoral²⁶¹. S'ha demostrat que els macròfags estan involucrats directament o indirectament en distintius clau dels tumors malignes com l'angiogènesi, metàstasi, invasió, regulació del microambient tumoral i resistència terapèutica a través de la secreció i expressió de diferents factors²⁶². A més, nombrosos estudis relacionen que la localització i la densitat dels MAT està associada amb un pitjor pronòstic en diversos tipus de tumors²⁰⁸, ja que s'ha vist que poden influenciar les cèl·lules tumorals, promovent la transició epitelial-mesenquimal (EMT, de l'anglès *epithelial–mesenchymal transition*) i el seu potencial invasiu a través del seu secretoma^{263,264}.

Les alteracions metabòliques del TA, com pot ser l'obesitat, també contribueixen al desenvolupament del fenotip tumoral dels MAT. Les alteracions tant a nivell del microambient del TA i del tumor com a nivell sistèmic provocades per l'obesitat, faciliten el reclutament de macròfags cap al microambient tumoral i la supervivència i diferenciació dels MAT. Aquests canvis estan mediat, almenys en part, per canvis al flux de metabòlits o per factors de transcripció mediat per metabòlits²⁶⁵.

4. CÀNCER DE CAP I COLL

El **carcinoma de cèl·lules escamoses de cap i coll**, o càncer de cap i coll (CCC) és el setè tipus de càncer en incidència i en causa de mort a nivell mundial, amb 878.000 casos nous i 470.000 morts al 2020. A més, s'espera que la incidència augmenti un 30% al 2030²⁶⁶⁻²⁶⁸ (Figura 9).

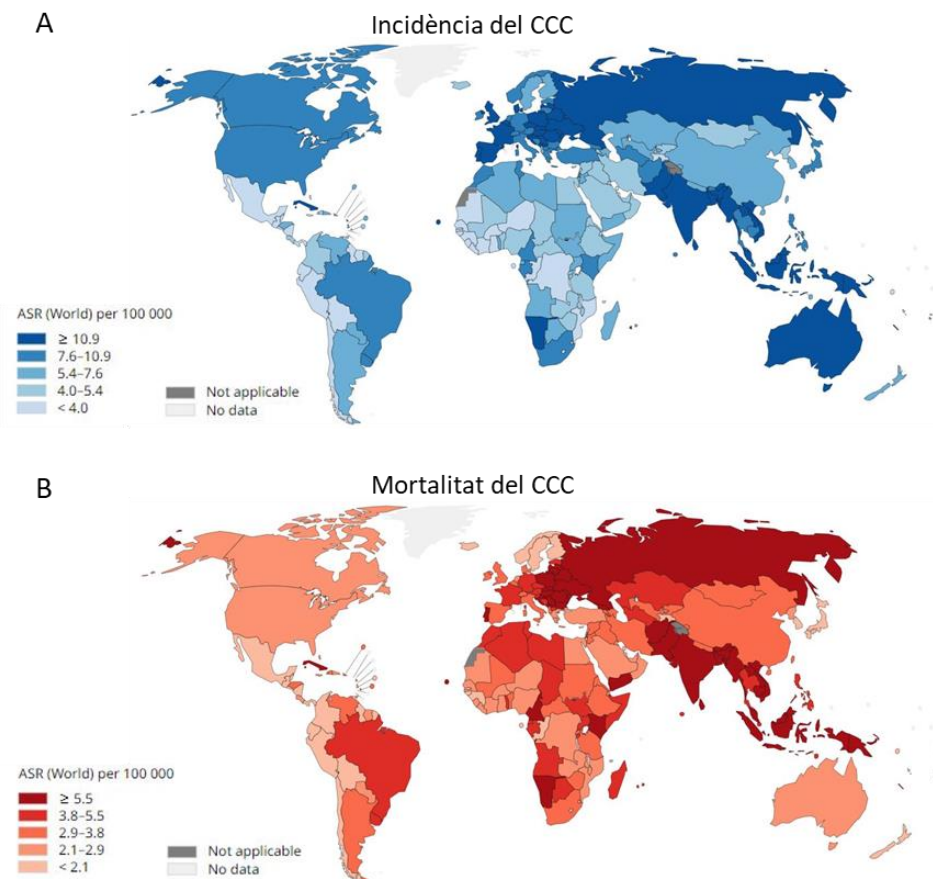


Figura 9. Incidència (A) i mortalitat (B) del càncer de cap i coll al món. Adaptada de gco.iarc.fr/today, seleccionant els càncers d'hipofaringe, laringe, llavis i cavitat oral, nasofaringe, orofaringe i glàndules salivals.

Els CCC són els que generalment es desenvolupen a les cèl·lules escamoses que recobreixen les superfícies mucoses del cap i del coll. Els CCC es poden formar a la cavitat oral (incloent els llavis, dos terços davanters de la llengua, genives, revestiment interior de les galtes i llavis, zona inferior de la llengua i paladar), faringe (incloent la nasofaringe, orofaringe i hipofaringe), laringe (a la zona de les cordes vocals i l'epiglòtis), cavitat nasal i glàndules salivals (a la part inferior de la boca i a la membrana mucosa de la gola)²⁶⁹ (Figura 10).

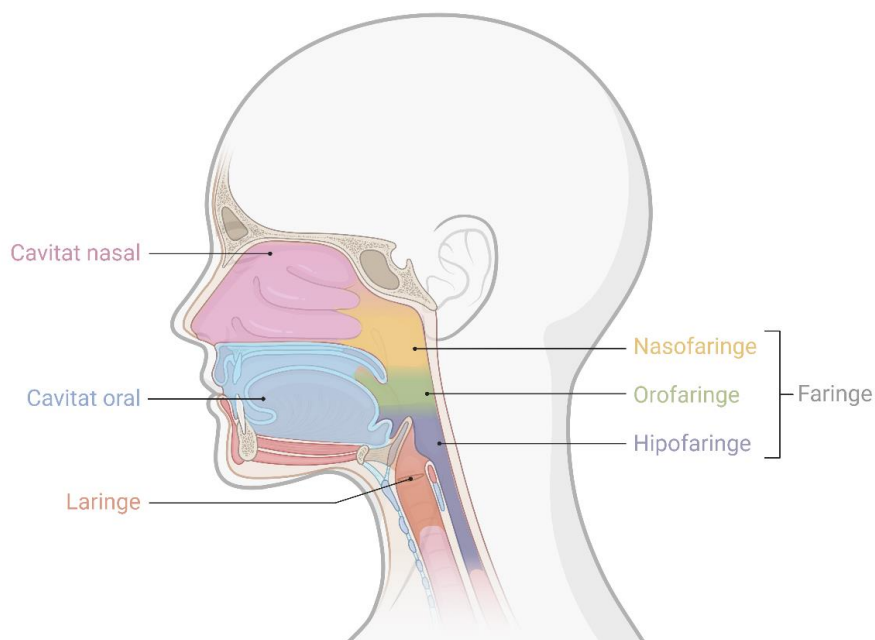


Figura 10. Regions del càncer de cap i coll. Adaptada de cancer.gov i "Types of Head and Neck Cancers", per Biorender.com.

El diagnòstic del CCC s'aconsegueix principalment a través de proves d'imatge radiogràfica, les quals són examinades per a proporcionar una comprensió completa de l'expansió del tumor. Després es fa una biòpsia per aspiració, tècnica altament sensible, específica i precisa per a fer un diagnòstic histològic inicial²⁷⁰. Com en tots els tipus de càncer, l'estadiatge del CCC es fa seguint el sistema TNM (tumor, nòdul limfàtic, metàstasi), on la "T" descriu l'extensió del tumor primari, la "N" es refereix a l'absència o presència i l'extensió de ganglis limfàtics oberts, i la "M" representa l'absència o presència de metàstasi distant^{271,272}. Donat que és un tipus de càncer molt divers i amb múltiples localitzacions, el sistema TNM té classificacions específiques per a cada un d'ells²⁷². A partir de la classificació patològica del TNM s'obté l'estadiatge del CCC, el qual va d'estadi I a estadi IV, sent aquest el més agressiu. Aproximadament el 30 – 40% dels pacients presenten un estadi I o II de la malaltia, la qual és curable amb cirurgia o radioteràpia i la taxa de supervivència és d'un 70 a un 90%. En canvi, més d'un 60% dels pacients amb CCC presenten un estadi III o IV, que es caracteritzen per tumors grans amb invasió local i/o metàstasi a nòduls regionals. Aquest tipus de tumors tenen una alta probabilitat de recurrència (15 a 40%) i metàstasi distant amb un pronòstic limitat, amb una supervivència als 5 anys de menys del 50%²⁶⁹.

Si bé el CCC no és un dels càncers més associats a l'obesitat, cada vegada hi ha més estudis que relacionen la progressió del CCC amb alteracions metabòliques com pot ser la

hiperglucèmia o la DT2²⁷³. Els nivells elevats de glucosa plasmàtica, tant sigui amb DT2 o sense, poden contribuir a reduir l'esperança de vida en diversos tipus de tumors, incloent el CCC²⁷⁴.

4.1. FACTORS DE RISC I PREVENCIÓ

Els estudis epidemiològics han determinat que els principals factors de risc per al desenvolupament del CCC són el tabac, l'alcohol, l'exposició a contaminants ambientals, la infecció pel virus del papil·loma humà (VPH) o pel virus d'Epstein-Barr²⁶⁹. També la falta d'higiene bucal, les dietes pobres en vegetals i l'edat^{275,276}. Fumar tabac augmenta el risc de CCC de 5 a 25 vegades amb una clara relació entre la quantitat i durada de l'hàbit de fumar i la incidència del CCC i és el principal factor de risc de desenvolupar CCC de la població VPH-negativa. El consum de tabac està associat amb la inflamació dels teixits exposats que, com s'ha explicat en el cas de l'obesitat, promou l'augment de citocines, quimiocines i factors de creixement que tenen un paper important en la proliferació, angiogènesi i carcinogènesi. El consum d'alcohol per si sol dobla el risc de patir CCC, però el consum elevat d'alcohol i tabac actua de manera sinèrgica, augmentant fins a més de 35 vegades el risc de patir CCC²⁷⁷. L'alcohol pot servir com a solvent dels carcinògens, promovent l'exposició de les cèl·lules epitelials a aquests compostos²⁶⁸. L'exposició a contaminants de l'aire cancerígens són un factor de risc emergent especialment a aquells països en desenvolupament que han empitjorat considerablement la contaminació de l'aire en els últims anys, com és la Xina o l'Índia²⁷⁸. La infecció amb VPH és un dels factors de risc més comú i que segueix en augment, especialment en aquelles poblacions que no s'han vacunat contra el VPH. Actualment la infecció amb VPH està associada amb més del 70% dels càncers d'orofaringe^{279,280}.

Les actuacions de prevenció primària són les que es focalitzen en reduir la incidència de la malaltia disminuint l'exposició, alterant factors modificables o incrementant la resistència de la població sana que està en risc. El principal factor modificable és el consum de tabac i, gràcies a les campanyes de salut pública, ha disminuït el consum de tabac i també els CCC associats a tabaquisme²⁸¹. Per contra, l'ús de cigarrets electrònics ha augmentat, i tot i que ja hi ha estudis que apunten que també causen dany al material genètic, encara no

se sap quin paper poden tenir en el desenvolupament de CCC a llarg termini²⁸². La infecció pel VPH és un altre factor de risc que es pot reduir mitjançant la prevenció amb vacunació. Actualment hi ha tres vacunes aprovades pel Sistema Nacional de Salut que cobreixen els serotips més comuns del VPH i a partir del 2022 a Catalunya s'ha ampliat la vacunació tant a nenes com a nens²⁸³.

4.2. TRACTAMENT

Aproximadament el 40% dels pacients amb CCC es diagnostiquen en un estadi inicial de la malaltia, el tractament de la qual és cirurgia o radioteràpia sola. Tot i això, la majoria dels pacients es diagnostiquen en estadis locoregionalment avançats, els quals s'han de tractar amb teràpies multidisciplinars que normalment comprenen cirurgia seguida de radioteràpia o quimioradioteràpia, o quimioradioteràpia definitiva²⁸⁴. Gairebé la meitat dels pacients diagnosticats en estadis avançats desenvolupen recurrència o metàstasi distant que, tot i l'avanç en el tractament del CCC, la supervivència d'aquests casos és molt baixa ja que la cirurgia ja no és viable o només és possible amb complicacions severes i una reduïda taxa d'èxit²⁸⁵.

La **quimioteràpia** és l'administració de medicaments citotòxics o anticàncer que ataquen ràpidament a les cèl·lules que estan en divisió interrompent el creixement de les cèl·lules tumorals i destruint-les. Els medicaments que s'utilitzen en la quimioteràpia afecten el cicle cel·lular de les cèl·lules tumorals, principalment afectant el seu material genètic perquè es puguin reproduir. El mètode d'administració més utilitzat és pel torrent sanguini, ja que d'aquesta manera s'actua de manera sistèmica i es pot aplicar en aquells tumors que tenen un risc més alt de metàstasi en altres parts del cos. En alguns casos es poden administrar diferents tipus d'agents quimioterapèutics que afecten a les cèl·lules tumorals a diferents estadis del seu cicle cel·lular i poden produir un efecte millor o més llarg que administrant només un tipus de medicament. Tot i això, la quimioteràpia va lligada a efectes secundaris associats amb la toxicitat dels medicaments administrats que es poden incrementar si s'utilitza juntament amb radioteràpia. Aquests efectes secundaris sovint són temporals però solen ser severes, ja que la quimioteràpia ataca aquelles cèl·lules que estan en

divisió, tant si són tumorals com normals. Els efectes adversos depenen del pacient i el tipus de tractament, però els més comuns són el cansament, anèmia, pèrdua de cabell, nàusees o vòmits, susceptibilitat a infeccions i diarrea²⁸⁶. El cisplatí és l'agent quimioterapèutic més utilitzat, tant per a CCC amb infecció per VPH com no, i se sol combinar amb radioteràpia si no cal cirurgia, o com a teràpia adjuvant postoperativa en el cas que en calgui. El cisplatí millora el control locoregional de la malaltia però segons estudis clínics no pot prevenir els casos de recaiguda metastàtica distant²⁸⁷. Es pot unir amb l'ADN i causar-ne dany, cosa que porta a la inhibició de la replicació i indueix la mort cel·lular. Això fa que tingui una alta toxicitat depenent de la dosi, que pot ser potencialment letal, i comporti efectes secundaris greus i de llarg termini^{288,289}.

La **radioteràpia** es basa en l'eliminació del tumor mitjançant radiació ionitzant, que és energia electromagnètica de suficient magnitud per a ionitzar directament àtoms o molècules que poden induir la mort cel·lular directament via estrès mitogènic o indirectament, via estrès oxidatiu²⁹⁰. Degut a que els CCC tenen múltiples localitzacions, cadascuna requereix un enfoc oncològic diferent. Per exemple, els tumors a la cavitat oral en estadis inicials es tracten amb cirurgia o radioteràpia, però els d'estadis avançats es tracten amb cirurgia seguida per radioteràpia amb o sense quimioradiació²⁹¹. Els tumors a la nasofaringe són especialment sensibles a la radioteràpia, i la quimioradioteràpia sol ser el tractament principal independentment de l'estadi de la malaltia²⁹². En canvi, com els carcinomes d'hipofaringe es detecten majoritàriament en estadis avançats, se solen tractar amb altes dosis de radioteràpia, no només a la lesió primària, sinó també als nòduls limfàtics cervicals que hi ha al voltant²⁹³. La dosi de radiació que s'administra a cada pacient depèn del risc que tingui cada regió afectada, variant des dels 45 Gy a les zones amb baix risc fins als 70 Gy a les més greus²⁹⁴. La toxicitat que comporta la radioteràpia és molt elevada, especialment a la cavitat oral²⁹⁵. Els principals efectes secundaris que provoca la radioteràpia són mucositis oral, que va associada a una sensació de cremor i inflamació a la boca que pot fer que els pacients no mengin, beguin ni parlin; una reducció dels nivells de salivació degut a l'atròfia de les glàndules salivals; osteonecrosi causada per la captació de radiació per part dels ossos i hipotiroïdisme²⁹⁶. A més, durant el tractament amb radioteràpia es poden produir canvis anatòmics, de posició i tumorals que poden fer que les següents dosi de radioteràpia no vagin dirigides al tumor i causin toxicitat a altres òrgans. La radioteràpia

adaptativa és una variació de la radioteràpia que replanifica les sessions de radioteràpia del pacient durant el tractament, ja sigui en resposta a la pèrdua de pes del pacient i la seva conseqüent variació de la localització o per contracció pròpia del teixit tumoral²⁹⁷. Tot i que hi ha una falta de consens en la implementació de la radioteràpia adaptativa, hi ha diversos estudis que demostren que els pacients als que se'ls aplica tenen un millor control locoregional i millora de la qualitat de vida, a més d'una millora de la supervivència sense recaigudes, especialment si es troben en un estadi avançat del CCC i estan tractats amb quimioradioteràpia definitiva^{298,299}.

El tractament amb **cirurgia** depèn, com els altres tipus de tractament, de la localització i estadiatge del tumor. En estadis inicials, la cirurgia transoral és el tractament recomanat per als tumors de cavitat oral, orofaringe i laringe, i es poden fer servir tractaments quirúrgics mínimament invasius com poden ser el làser de microcirurgia transoral o la cirurgia robòtica transoral, els quals poden preservar millor els òrgans afectats, no tenen tanta morbiditat funcional com la cirurgia oberta ni toxicitat a llarg termini com la radioteràpia³⁰⁰. Tot i això, gairebé sempre serà necessària la radioteràpia postoperació. A pacients en estadis avançats, la cirurgia primària és el tractament recomanat per als tumors de cavitat oral, laringe i hipofaringe. Tot i això, a l'estar en un estadi avançat és indispensable la radioteràpia o la quimioradioteràpia postoperatòria³⁰¹.

Tot i que els tractaments més utilitzats són la quimioteràpia, radioteràpia i cirurgia, la **immunoteràpia** està emergent com a nou mètode per al tractament del CCC. Una resposta immunològica efectiva pot perjudicar el fenotip i la funció de les cèl·lules tumorals, destruir les cèl·lules malignes i desencadenar una resposta immunològica adaptativa³⁰². Tot i això, el CCC té múltiples mecanismes per a escapar d'aquesta resposta immunològica que la limiten. Actualment hi ha diversos tractaments d'immunoteràpia per a combatre la progressió del CCC, com poden ser anticossos monoclonals, vacunes antigèniques, teràpia amb virus oncolítics, inhibidors del punt de control immunitari i teràpia dirigida al receptor de EGF (EGFR)³⁰³.

4.3. CÀNCER DE CAP I COLL I ALTERACIONS METABÒLIQUES

Tal i com s'ha descrit anteriorment, les persones amb obesitat i malalties metabòliques associades, com la DT2 o la hiperglucèmia, tenen un major risc de desenvolupar determinats càncers, com per exemple el de fetge o el colorectal, però no hi ha un consens en l'evidència epidemiològica referent al CCC. Diversos estudis han assenyalat que el CCC no està associat amb l'obesitat³⁰⁴ o que un IMC alt en disminueix la incidència³⁰⁵. També hi ha estudis que afirmen que les persones primes tenen un pitjor pronòstic de CCC, indicant que l'obesitat podria tenir efectes protectors contra la caquèxia, disfunció immunitària i malnutrició causades per la disfàgia i la pèrdua de la gana associades a aquest tipus de càncer, de manera que frenaria el creixement tumoral i inhibiria la metàstasi³⁰⁶. D'altra banda, també hi ha estudis que indiquen que l'obesitat redueix la supervivència i el temps de recaiguda del CCC³⁰⁷, assenyalant que la pèrdua de pes que normalment ocorre abans del diagnòstic de CCC en pacients en estadis avançats seria una conseqüència i no una causa de la presència de càncer³⁰⁸. A més, un altre estudi publicat apunta que en el carcinoma oral, a mesura que augmenta el BMI, la inflamació al TA de la llengua causada per una major acumulació de macròfags en les CLS es relaciona amb una pitjor evolució i supervivència³⁰⁹. Aquests resultats també s'han corroborat recentment, on un estudi amb models animals mostra que la inducció de carcinoma oral a ratolins és més severa al grup amb obesitat, amb un major nombre de lesions, carcinomes invasius i en estadis més greus i amb més proliferació de les lesions displàsiques, amb una accentuada acumulació de cèl·lules supressores derivades dels mieloides, que tenen funció immunosupressora que facilita el creixement tumoral³¹⁰.

Tot i que l'associació del CCC amb l'obesitat no està ben definida, existeixen clares evidències que relacionen la DT2 amb el seu desenvolupament. La DT2 augmenta el risc de patir càncer a través de la hiperinsulinèmia, la inflamació crònica i la hiperglucèmia. Són diversos els estudis amb cohorts que indiquen que la diabetis augmenta el risc de CCC i mortalitat^{311,312}. Més concretament, la **hiperglucèmia** promou la proliferació i la metàstasi i protegeix de l'apoptosi^{273,308,313}, alhora que redueix l'activitat bactericida de les cèl·lules immunològiques, incrementant la susceptibilitat a infeccions bacterianes^{314,315}. En un estudi on s'investiguen els efectes dels components del síndrome metabòlic en el risc de CCC, de tots els paràmetres analitzats, només la hiperglucèmia estava independentment

correlacionada amb un major risc de CCC³¹⁶. A més, la hiperglucèmia no només estimula la proliferació de les cèl·lules tumorals, sinó que també indueix resistència a la quimioteràpia a través de canvis metabòlics que s'indueixen a aquestes cèl·lules³¹⁷.

4.3.1. REPROGRAMACIÓ METABÒLICA

La reprogramació metabòlica és una de les característiques principals dels càncers, manifestada principalment per alteracions en el metabolisme de la glucosa, lípids i aminoàcids. Les cèl·lules tumorals estan en condicions d'estrès com la hipòxia, privació d'energia o un microambient acidificat, i s'han d'adaptar a aquestes situacions a través de la reprogramació metabòlica³¹⁸⁻³²⁰ (Figura 11). Una de les primeres troballes en aquest camp va ser que les cèl·lules tumorals prefereixen la glicòlisi inclús en presència d'oxigen, donant lloc a un estat que s'ha denominat glicòlisi aeròbica o efecte Warburg^{321,322}.

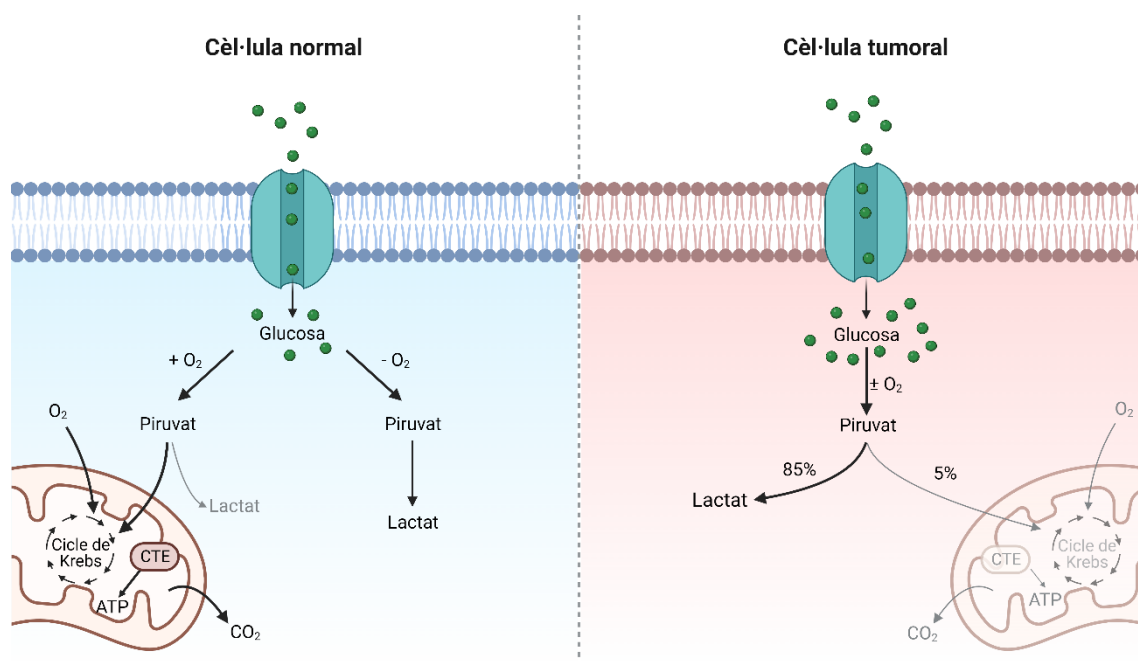


Figura 11. Representació esquemàtica de la reprogramació metabòlica de les cèl·lules tumorals. Creada amb Biorender.com. CTE: cadena transportadora d'electrons.

La preferència per la glicòlisi de les cèl·lules tumorals en el CCC s'evidencia per un augment de la captació de glucosa, principalment manifestada per una sobrerregulació de les proteïnes transportadores de glucosa (GLUT, de l'anglès *glucose transporter*)-1 i GLUT-3, l'expressió de les quals està correlacionada amb un pitjor pronòstic dels pacients de CCC³²³. L'increment de la glicòlisi també va acompanyat per un augment en la producció de lactat, elevat l'aciditat del microambient tumoral i actuant com a mecanisme

immunosupressor³²⁴. L'expressió de la proteïna lactat deshidrogenasa (LDH), que converteix el piruvat en lactat, s'ha correlacionat amb un decreixement de la supervivència en pacients amb CCC³²⁵. A més, hi ha diversos estudis que desenvolupen models basats en gens o metabòlits relacionats amb el metabolisme de la glucosa^{326,327}, aminoàcids³²⁸ o lipídic³⁰⁸ que permetrien una millor classificació i pronòstic dels pacients amb CCC.

Les cèl·lules tumorals utilitzen la glicòlisi per a la generació d'energia per diverses raons. D'una banda, per a facilitar la incorporació de precursors de biomassa mitjançant la utilització d'intermedis glicolítics de la via de les pentoses fosfat, ja que són necessaris per a les cèl·lules tumorals en proliferació³²⁹. També perquè la velocitat de la glicòlisi és molt més ràpida que la de l'oxidació fosforilativa i en una situació d'alta demanda energètica com quan les cèl·lules tumorals estan en EMT, aquesta rapidesa és necessària³³⁰.

Una altra raó és perquè quan les cèl·lules tumorals utilitzen el metabolisme glicolític, les cèl·lules estan protegides contra l'estrès oxidatiu. D'una banda perquè en no estar fent fosforilació oxidativa no es produeixen tantes ROS³²⁹, i de l'altra perquè es promou la generació de fosfat de dinucleòtid de nicotinamida i adenina (NADPH, de l'anglès *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) reduït, el qual dona lloc a la forma reduïda de glutatió, un compost que protegeix les cèl·lules del dany induït per ROS³³¹. D'aquesta manera, els metabòlits derivats de la glicòlisi tenen un paper important en la generació de radioresistència perquè, com bloquegen les ROS, aquestes no poden causar danys al material genètic amb la radiació. En aquesta línia, s'han publicat diversos estudis que tenen com a diana el metabolisme de la glucosa per a radiosensibilitzar els tumors. Per exemple, utilitzant un inhibidor glicolític s'ha aconseguit radiosensibilitzar cèl·lules tumorals de neuroblastoma i glioma *in vitro* i, combinant-ho amb el medicament antidiabètic metformina, es promou l'apoptosi cel·lular de les cèl·lules³³².

4.4. SURVIVINA I CÀNCER DE CAP I COLL

Els càncers humans es caracteritzen per una desregulació cel·lular i dels mecanismes involucrats en el cicle cel·lular i l'apoptosi. A més, una anòmala activació d'oncogens i vies de senyalització tumorals pot induir la reprogramació metabòlica dels tumors que, sumada a les

alteracions en el balanç entre proliferació i apoptosi cel·lular, porten a una inhibició de la mort cel·lular, tumorigènesi, resistència a tractaments i hiperglucèmia.

Tal i com s'ha mencionat anteriorment, la survivina està sobreexpressada en molts tipus de tumors, un d'ells és el CCC³³³⁻³³⁵. En aquest tipus de càncer la survivina també pot servir com a predictor de la progressió tumoral, ja que els nivells i percentatge de cèl·lules que expressen la survivina augmenten a mesura que avança la malaltia i les lesions i estadiatge TNM són més greus³³⁶⁻³³⁸. En un estudi centrat en el carcinoma oral, s'ha correlacionat l'alta expressió de survivina amb la presència de nòduls limfàtics metastàtics, un estadi més greu del tumor, un pitjor pronòstic i major quimioresistència, a més que els nivells de mRNA de survivina es poden considerar com un factor pronòstic independent per al carcinoma oral³³⁹. Aquests resultats també s'han confirmat en diverses metaanàlisis recentment publicades, on es demostra que els pacients amb expressió de survivina més elevada tenen més probabilitats de tenir un pitjor pronòstic del CCC tenint en compte totes les localitzacions del CCC, o específicament el de nasofaringe^{340,341}. Un dels mecanismes que propicia l'augment de survivina és l'acumulació de p53 mutada, la qual no pot inhibir la survivina. En aquesta línia, s'ha trobat una correlació entre l'expressió de survivina i p53 en lesions premalignes i malignes de CCC³⁴². La survivina no només se sobreexpressa a mesura que augmenta la gravetat, sinó que també s'ha detectat en gairebé la meitat de les lesions premalignes de CCC, suggerint que la survivina pot estar involucrada en els estadis primerencs de la tumorigènesi^{343,344}.

Tal com s'ha explicat prèviament, la localització subcel·lular de la survivina és important per a la determinació de la seva funció. En el context del CCC, hi ha estudis que han observat com una major expressió de survivina citoplasmàtica respecte de la nuclear, augmenta el risc de que la malaltia sigui més agressiva, suggerint que la survivina nuclear, que no té funció antiapoptòtica, podria ser un predictor favorable del tumor³⁴⁵. Malgrat tot, també hi ha estudis que no determinen que la localització subcel·lular de la survivina aportí cap diferència en el pronòstic dels pacients amb CCC³⁴⁶.

Una de les teràpies antisurvivina que més s'ha estudiat és l'inhibidor YM155, el qual inhibeix selectivament la survivina. Recentment s'han publicat estudis que demostren que pot revertir la resistència a la quimioteràpia, concretament a la cisplatina, que es produeix a

causa dels alts nivells de survivina²⁸⁹. També hi ha assajos clínics en fase I/II que estudien l'efecte del tractament amb YM155 a pacients amb tumors sòlids. En aquests casos han comprovat que una monoteràpia amb YM155 és segura perquè no té efectes secundaris greus però té pocs efectes positius, de manera que podria ser més beneficiós com a tractament adjuvant de quimioteràpia o radioteràpia, ja que es podrien fer servir dosis més baixes i menys perjudicials^{347,348}.

4.4.1. SURVIVINA I RADIORESISTÈNCIA

La radioteràpia és un dels tractaments més consolidats per al CCC. Encara que la radiació elimina la major part de la fracció de cèl·lules tumorals, hi ha algunes que aconseguen sobreviure i tornar a repoblar les zones irradiades. Això provoca que aproximadament una quarta part dels pacients tractats amb radioteràpia pateixin una recaiguda i que les opcions de tractament disminueixin³⁴⁹. Depenent del temps que hagin passat sense tumor abans de la recaiguda es determina si es torna a irradiar la zona, tot i que si la radiació falla el tractament que se sol fer és la cirurgia radical, la qual té una taxa de supervivència als 5 anys del 30%²⁹⁴.

Un dels factors involucrats en el desenvolupament de la radioresistència és la desregulació de l'apoptosi que es produeix per a eliminar les cèl·lules que han patit danys al material genètic a conseqüència de la radiació. L'acumulació de mutacions oncogèniques faciliten la transformació maligna i el desenvolupament del tumor. L'expressió proteica de survivina al teixit tumoral està associada a una pitjor resposta a la radioteràpia, i a una recaiguda més imminent del carcinoma de laringe^{289,350}. Estudis *in vitro* utilitzant línies cel·lulars de CCC han demostrat que la survivina protegeix les cèl·lules de l'apoptosi induïda per la radioteràpia i que, utilitzant tècniques de silenciament com shRNA, siRNA o lentivirus, es pot aconseguir una radiosensibilització i inhibició del creixement de les cèl·lules tumorals, tant en models de CCC^{351,352} com en altres tipus de tumors, com el d'esòfag o el cervical^{353,354}. A més, en carcinoma de cèl·lules escamoses de l'esòfag, l'apoptosi de les cèl·lules mostra un comportament sumatori quan les cèl·lules es tracten amb radioteràpia combinada amb el silenciament de la survivina no només a nivell *in vitro*, sinó també en models animals³⁵⁵. A més a més, en models cel·lulars de càncer colorectal s'ha observat com la inhibició de la survivina porta a una paralització de les cèl·lules a la fase G2/M del cicle cel·lular, que és la més radiosensible del cicle cel·lular, tot indicant que tant la seva funció

d'inhibició de l'apoptosi com la de regulació del cicle cel·lular contribueixen a la resistència a la radiació³⁵⁶.

Tot i que la gran majoria d'estudis relacionen l'expressió de survivina amb major radioresistència i pitjor pronòstic, hi ha estudis contradictoris que indiquen que l'expressió de survivina en les biòpsies tumorals està associada amb una millor resposta a la radioteràpia i una major supervivència i que un silenciament de la survivina resulta en un decreixement de la radiosensibilitat a models *in vitro*³⁵⁷.

HIPÒTESI I OBJECTIUS

HIPÒTESI I OBJECTIUS

La survivina és una proteïna intracel·lular associada històricament al desenvolupament embrionari i processos tumorals a causa de la seva funció dual i antagònica sobre la proliferació i la mort cel·lular. No obstant, estudis recents suggereixen que la survivina pot tenir funcions addicionals que podrien estar relacionades, en part, per la seva capacitat de ser secretada per les cèl·lules i actuar en la comunicació cel·lular. Encara que la seva funció en càncer és àmpliament coneguda, la seva implicació en altres patologies relacionades és un camp d'estudi molt poc explorat. Tot i això, estudis recents demostren que la survivina podria tenir un paper important en la fisiopatologia de l'obesitat. En aquest context, aquesta tesi doctoral es basa en l'estudi de la survivina des d'una perspectiva metabòlica. Així, l'objectiu general se centra en l'estudi de possibles funcions addicionals de la survivina, tant en l'obesitat com en el CCC, la progressió i el pronòstic del qual s'ha relacionat recentment amb l'estat metabòlic del pacient.

HIPÒTESI I OBJECTIUS ESPECÍFICS DE L'ESTUDI 1:

Considerant que:

- Un dels mecanismes claus subjacents al vincle entre obesitat i càncer és atribuït a la disfunció del TA i estudis recents suggereixen que les ASCs podrien tenir un paper clau.
- Les interaccions entre les ASCs i els macròfags dins del microambient tumoral contribueixen al desenvolupament tumoral.
- Els MAT són un dels principals promotors de la progressió del tumor en el microambient tumoral. Tot i això no hi ha un consens sobre el seu fenotip, es desconeixen els mecanismes subjacents a la seva reprogramació i no hi ha un marcador específic ben establert.
- L'ambient hostil d'inflamació crònica associat a l'obesitat altera les propietats funcionals i immunològiques de les ASCs.

- Els individus amb obesitat presenten nivells circulants de survivina elevats, els quals s'han relacionat a una major secreció d'aquesta per part de les ASCs.

Postulem que:

El secretoma de les ASCs de pacients amb obesitat, especialment la survivina, podria tenir un efecte en la reprogramació dels macròfags cap a un fenotip tumoral.

Objectius específics de l'estudi 1:

- Analitzar si el secretoma de les ASCs de pacients amb obesitat pot alterar el fenotip dels macròfags.
- Analitzar el perfil d'expressió, la localització intracel·lular i la secreció de la survivina en macròfags pro i antiinflamatoris.
- Estudiar el paper de la survivina en la plasticitat i l'activitat protumoral dels macròfags.
- Estudiar el paper de la survivina en les relacions entre cèl·lules del microambient tumoral, ASCs, macròfags i cèl·lules tumorals.
- Explorar si la survivina podria ser un marcador específic de macròfags associats a tumor.

HIPÒTESI I OBJECTIUS ESPECÍFICS DE L'ESTUDI 2:

Considerant que:

- Més enllà d'una alteració de la proliferació, els processos tumorals també són dependents d'importants canvis metabòlics a nivell cel·lular.
- Tot i que es desconeixen els efectors moleculars que determinen els canvis metabòlics de les cèl·lules tumorals, s'ha proposat que aquests podrien estar controlats per alguns oncogens i repressors tumorals.

- En el context del CCC, la survivina s'ha proposat com a factor predictiu de la progressió del tumor i una possible diana terapèutica. La seva implicació com a factor de radioresistència és, no obstant, controvertida.

- Malgrat les millores en radioteràpia, encara hi ha una alta taxa de radioresistència tumoral i recurrència en els pacients amb CCC, que podria estar relacionada amb la desregulació del metabolisme de la glucosa.

Postulem que:

La survivina podria tenir un paper clau en les alteracions del metabolisme associades al CCC, específicament en la reprogramació metabòlica de la glucosa i, per tant, en la progressió tumoral i la resposta a la radioteràpia.

Objectius específics de l'estudi 2:

- Analitzar el perfil d'expressió de survivina i de gens implicats en el metabolisme de la glucosa en teixit tumoral, peritumoral i sa de pacients amb CCC.

- Determinar l'impacte de l'expressió de survivina en teixit tumoral sobre l'estadiatge, el control locoregional i la supervivència en pacients amb CCC.

- Estudiar el paper de la survivina i del metabolisme de la glucosa en el context de la resposta a la radiació.

RESULTATS

RESULTATS

Estudi 1

Survivin drives tumor-associated macrophage reprogramming: a novel mechanism with potential impact for obesity

Benaiges E; Ceperuelo-Mallafré V; Madeira A; Bosch R; Núñez-Roa C; Ejarque M; Maymó-Masip E; Huber-Ruano I; Lejeune M; Vendrell J; Fernández-Veledo S.

Cell Oncol. 2021 Aug;44(4):777-792. doi: 10.1007/s13402-021-00597-x. Epub 2021 Mar 12.

Estudi 2

Survivin/BIRC5 as a novel molecular effector at the crossroads of glucose metabolism and radioresistance in head and neck squamous cell carcinoma

Benaiges E; Ceperuelo-Mallafré V; Guaita S; Maymó-Masip E; Madeira A; Gómez D; Hernández V; Vilaseca I; Merma C; León X; Terra X; Vendrell J; Avilés-Jurado FX; Fernández-Veledo S.

Enviat a JAMA Otolaryngology-Head & Neck Surgery. Referència OTO23-0084

ESTUDI 1

Survivin drives tumor-associated macrophage reprogramming: a novel mechanism with potential impact for obesity

Benaiges E; Ceperuelo-Mallafre V; Madeira A; Bosch R; Núñez-Roa C; Ejarque M; Maymó-Masip E; Huber-Ruano I; Lejeune M; Vendrell J; Fernández-Veledo S.

Cell Oncol. 2021 Aug;44(4):777-792. doi: 10.1007/s13402-021-00597-x. Epub 2021 Mar 12.

Resum:

Propòsit: Estudis recents assenyalen les ASCs com un vincle entre l'obesitat i el càncer. El nostre objectiu és determinar si la survivina, que és altament secretada per ASC de pacients amb obesitat, podria promoure el fenotip protumoral dels macròfags.


Metodologia: Es va estudiar l'efecte del medi condicionat de les ASCs sobre el fenotip dels macròfags mitjançant estudis d'expressió. La localització intracel·lular i la internalització de la survivina es van examinar mitjançant fraccionament subcel·lular i immunofluorescència, respectivament. Es van realitzar estudis de pèrdua i guany de funció mitjançant vectors adenovirals i es van examinar patrons d'expressió gènica i capacitat de migració i invasió de cèl·lules canceroses. Es van establir cultius heterotípics d'ASC, macròfags i cèl·lules canceroses per imitar el microambient del tumor. Es van utilitzar experiments de bloqueig de la survivina per determinar l'impacte de la survivina tant en els macròfags com en les cèl·lules canceroses. Es va realitzar un anàlisi immunohistoquímic de la survivina en macròfags de líquid ascític de pacients amb càncer i controls sans.

Resultats: Vam trobar que les ASCs derivades de pacients amb obesitat van induir un canvi fenotípic en els macròfags, caracteritzat per l'expressió de marcadors pro i antiinflamatoris. Vam trobar que els macròfags interioritzaven la survivina extracel·lular, generant macròfags híbrids amb un fenotip associat a tumors que incloïa la secreció de survivina. L'expressió exògena de la survivina en macròfags va generar un fenotip similar i va augmentar les característiques malignes de les cèl·lules canceroses per un mecanisme dependent de la fosforilació de la survivina a la treonina 34. La survivina secretada tant per ASCs de pacients amb obesitat i macròfags associats a tumors va augmentar sinèrgicament la malignitat de les cèl·lules canceroses. És important destacar que la survivina es va detectar principalment en macròfags associats a l'ascites de pacients amb un diagnòstic maligne.

Conclusió: Les nostres dades indiquen que la survivina pot servir com a vincle molecular entre l'obesitat i el càncer i com a nou marcador de macròfags associats a tumors.



Survivin drives tumor-associated macrophage reprogramming: a novel mechanism with potential impact for obesity

E. Benaiges^{1,2,3} · V. Ceperuelo-Mallafre^{1,2} · A. Madeira^{1,2} · R. Bosch⁴ · C. Núñez-Roa^{1,2} · M. Ejarque^{1,2} · E. Maymó-Masip^{1,2} · I. Huber-Ruano^{1,3} · M. Lejeune⁴ · J. Vendrell^{1,2,3} · S. Fernández-Veledo^{1,2} 

Accepted: 15 February 2021
© The Author(s) 2021

Abstract

Purpose Recent studies point to adipose-derived stem cells (ASCs) as a link between obesity and cancer. We aimed to determine whether survivin, which is highly secreted by ASCs from subjects with obesity, might drive a pro-tumoral phenotype in macrophages.

Methods The effect of ASC conditioned medium on the macrophage phenotype was assessed by expression studies. Survivin intracellular localization and internalization were examined by subcellular fractionation and immunofluorescence, respectively. Loss- and gain-of-function studies were performed using adenoviral vectors, and gene expression patterns, migration and invasion capacities of cancer cells were examined. Heterotypic cultures of ASCs, macrophages and cancer cells were established to mimic the tumor micro-environment. Survivin-blocking experiments were used to determine the impact of survivin on both macrophages and cancer cells. Immunohistochemical analysis of survivin was performed in macrophages from ascitic fluids of cancer patients and healthy controls.

Results We found that obese-derived ASCs induced a phenotypic switch in macrophages characterized by the expression of both pro- and anti-inflammatory markers. Macrophages were found to internalize extracellular survivin, generating hybrid macrophages with a tumor-associated phenotype that included secretion of survivin. Exogenous expression of survivin in macrophages generated a similar phenotype and enhanced the malignant characteristics of cancer cells by a mechanism dependent on survivin phosphorylation at threonine 34. Survivin secreted by both ASCs from subjects with obesity and tumor-associated macrophages synergistically boosted the malignancy of cancer cells. Importantly, survivin was mainly detected in ascites-associated macrophages from patients with a malignant diagnosis.

Conclusion Our data indicate that survivin may serve as a molecular link between obesity and cancer and as a novel marker for tumor-associated macrophages.

Keywords Survivin · Obesity · Cancer · Tumor-associated macrophages · Adipose-derived stem cells

1 Introduction

Abdominal obesity, specifically an increase in visceral adipose tissue (VAT) mass, is an established risk and progression

factor for many cancers [1]. Signatures of the insulin-resistant state, including obesity-related chronic low-grade inflammation and aberrant production of adipokines (leptin, adiponectin, visfatin, and plasminogen activator inhibitor-1)

E. Benaiges and V. Ceperuelo-Mallafre contributed equally to this work.
J. Vendrell and S. Fernández-Veledo contributed equally to this work

✉ J. Vendrell
jvo@comt.es

✉ S. Fernández-Veledo
sonia.fernandezveledo@gmail.com

¹ Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Endocrinology and Nutrition Service, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, 43007 Tarragona, Spain

² CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM)-Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), 28029 Madrid, Spain

³ Rovira i Virgili University, 43003 Tarragona, Spain

⁴ Grup de Recerca en Patologia Oncològica i Bioinformàtica, Molecular Biology and Research Section, Hospital de Tortosa Verge de la Cinta, IISPV, URV, 43500 Tortosa, Spain

and proinflammatory cytokines (interleukin [IL]-6, IL-8, monocyte chemoattractant protein-1 [MCP-1] and tumor necrosis factor- α (TNF- α), are established drivers of cancer development [2–4]. In this context, there is considerable interest in the role of adipose-derived stem cells (ASCs) in tumor development. ASCs are progenitor cells of mesenchymal origin that reside within the stromal vascular fraction of adipose tissue [5, 6]. Remarkably, ASCs have been reported to travel through the blood to distant tumor sites, where they differentiate into vascular pericytes and secrete growth factors that support the tumor microenvironment [7–9]. Accordingly, ASCs are believed to play a central role in tumor growth, development and aggressiveness [10–12].

In addition to tumor cells, the tumor microenvironment contains a complex network of immune cells, adipocytes, myofibroblasts and mesenchymal stem cells, including ASCs [13]. Some of these cells secrete chemokines (e.g., CCL2/MCP-1), cytokines (e.g., IL-4, IL-13) and growth factors (e.g., VEGF, CSF1/M-CSF and CSF2/GM-CSF) that trigger the recruitment of monocytes, and can promote cancer progression through the activation of tumor-associated macrophages (TAMs) [14, 15]. TAMs comprise 50–80% of the tumor mass, and their presence often correlates with a poor prognosis in most cancers [16–18]. It was long thought that TAMs present with an anti-inflammatory phenotype that is associated with their pro-tumoral activity. Now, however, it is generally accepted that they have a mixed polarization phenotype, sharing both anti-inflammatory/pro-fibrotic and pro-inflammatory properties [19–21].

Several factors of the tumor microenvironment are known to influence macrophage properties. For example, it has recently been shown that ASCs may skew the phenotype of macrophages from a pro-inflammatory to an anti-inflammatory state via soluble factors [18, 22–24]. While the molecular mechanisms underlying this crosstalk, particularly in the context of cancer, remain largely obscure, it has been described that ASCs isolated from subjects with obesity can foster tumor cell progression by inducing epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), enhancing invasion and migration capacities, and by triggering proliferation and metastasis [2, 10, 25, 26]. In this line, we recently demonstrated that the hostile environment of chronic inflammation associated with obesity may alter the functional and immunological properties of ASCs [27, 28]. More specifically, we showed that obese-derived ASCs (obASCs) secrete high levels of survivin [29], a member of the inhibitor of apoptosis family of proteins that is generally considered to be a tumor progression marker [30], and is involved in cell apoptosis, proliferation, division and senescence [31–34]. Survivin was initially believed to be absent in normal adult tissues and to be overexpressed in fetal and tumor cells [35, 36], but accumulating evidence suggests that it also plays critical roles in the survival, proliferation and differentiation of normal cells,

including activated lymphocytes, macrophages and ASCs [29, 37–40].

Here, we show that the obASC secretome – the collection of proteins secreted into the extracellular space – modulates macrophage plasticity and generates a mixed-polarization phenotype with tumor-promoting properties. Importantly, our findings suggest that survivin serves as a new molecular link in the interplay between ASCs and macrophages in the tumor microenvironment and shed light on a novel mechanism by which obesity may sustain cancer development and progression.

2 Materials and methods

2.1 Cell lines and culture conditions

The human monocyte leukemia cell line THP-1, and the embryonic kidney HEK-293, liver cancer HepG2 and colonic cancer Caco2 and HT29 cell lines were obtained from the ATCC (Rockville, MD, USA). To obtain macrophages, THP-1 cells were cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% antibiotics/antimycotics (penicillin, streptomycin and fungizone solution) and 0.1 $\mu\text{g/ml}$ phorbol myristate acetate (PMA; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) for 72 h at a density of 85,000 cells/ cm^2 . Adherent (non-stimulated) cells (M0) were subsequently cultured in the same medium without PMA for 24 h. HEK-293, Caco2 and HT29 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% FBS and 1% antibiotics/antimycotics at a density of 12,000, 6,600 and 20,000 cells/ cm^2 , respectively. HepG2 cells were propagated in DMEM/F12 supplemented with 1% L-glutamine (Sigma-Aldrich), 10% FBS, 1% antibiotics/antimycotics solution and 2% HEPES (HyClone, Logan, UT, USA) at a density of 40,000 cells/ cm^2 . All cells were culture in a humidified incubator at 37 °C with 5% CO_2 . Experiments using conditioned medium (CM) were performed using 24 h cultures.

2.2 Isolation and culture of ASCs

ASCs were isolated from VAT of subjects with or without obesity undergoing nonacute surgical interventions, such as hernia or cholecystectomy, in a scheduled routine surgery following published protocols [27–29]. Donors included 12 lean (body mass index [BMI] = 22.2 ± 2.3 , 66% female, age = 47.2 ± 7.3 years) and 11 obesity (BMI = 31.4 ± 1.8 , 55% female, age = 45.7 ± 6.7 years) individuals. Briefly, VAT was washed extensively with phosphate buffered saline (PBS) to remove debris and next treated with 0.2% collagenase type I (Sigma-Aldrich) in PBS and 1% bovine serum albumin for 1 h at 37 °C with gentle agitation. Digested samples were

centrifuged at 300×g at 4 °C for 5 min to separate adipocytes from stromal cells. The pellet containing the stromal cell fraction was resuspended in stromal culture medium consisting of DMEM/F12 with 10% FBS and 1% antibiotics/antimycotics solution and cultured at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO₂. To prevent spontaneous differentiation, primary cultures of ASCs at passage 0 (P0) were grown to 90% confluence and harvested with trypsin-EDTA. At P3, the minimal functional and quantitative criteria established by the International Society of Cell Therapy (ISCT) and the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) were determined by flow cytometry, as described before [27]. CM was collected at P3–7 after 24 h in culture using a minimum concentration of ASCs of 10,000 cells/cm² and centrifuged at 400×g for 5 min. See supplementary Fig. 1 for the different experimental designs.

2.3 Macrophage differentiation

To polarize THP-1 macrophages into pro- or anti-inflammatory macrophages, *Escherichia coli*-derived lipopolysaccharide (LPS) (250 ng/ml; serotype 0111:B4, number L4391, Sigma-Aldrich) or human recombinant IL-4 (50 ng/ml; PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) was added, respectively, to the cultures overnight.

2.4 Adenovirus infection

Adenoviruses expressing WT or T34A-mutant survivin were added to HEK-293 cells or M0-macrophages at a multiplicity of infection (MOI) of 50, followed by incubation for 2 h at 37 °C in Opti-MEMTM Medium (Gibco; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). An adenovirus expressing GFP was used as control. After incubation, adenovirus-containing medium was replaced with standard culture medium. Cells and CM for antibody neutralizing experiments were collected after 24 h of incubation.

2.5 Co-culture assays

Adenovirus-infected HEK-293 cells were cultured in DMEM in the upper compartment of a two-chamber Transwell system (#3412; Corning, Costar, Cambridge, MA, USA). THP-1 macrophages were differentiated in the bottom well of the chamber in complete RPMI-1640 medium (adherent). Cells were co-cultured for 24 h at 37 °C with 5% CO₂. In parallel, each cell type was grown individually at the same cell concentration as for co-culture, in similar plates.

For triple co-culture experiments, THP-1 cells were cultured in RPMI-1640 with PMA in the upper Transwell compartment. After adherence, THP-1 macrophages were activated with CM from lean (ln) ASCs or obASCs or co-cultured with lnASCs or obASCs overnight. Next, the medium was

replaced by RPMI-1640 and CM-activated macrophages were co-cultured with HepG2 cells in the bottom well of the chamber for 24 h at 37 °C with 5% CO₂. See supplementary Fig. 1 for the different experimental designs.

2.6 Transwell migration and invasion assays

The migratory capacity of cancer cells in response to 24 h application of CM from macrophages overexpressing survivin or co-culture with THP-1 macrophages and ASCs was determined using 24-well Transwells (#3422, Costar) as previously described [28]. In total, 2 × 10⁵ cancer cells were suspended in 200 µl CM and added to the upper chamber, and 500 µl culture medium was placed in the lower chamber. Invasion capacity was determined as for migration, except that the membrane was first coated with Matrigel® (0.7–0.9 mg/ml; Sigma-Aldrich) in PBS for 2 h at 37 °C. After 24 h incubation, the cells in the upper compartment were removed using cotton swabs after which the cells on the lower surface of the membrane were fixed in 4% glutaraldehyde, stained with 2% toluidine blue and counted.

2.7 Cell fractionation assay

THP-1 macrophages were lysed in homogenization buffer (20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1 mM PMSF, 10 mM 2-mercaptoethanol, 10 µg/ml aprotinin and 10 µg/ml leupeptin) followed by mechanical disruption using a Dounce homogenizer. Total lysates were centrifuged at 1300 rpm for 10 min after which the pellets containing nuclei were collected. Supernatants containing cytoplasmic fractions were centrifuged at 13,000 rpm for 1 h.

2.8 Survivin blocking experiments

Survivin neutralization was performed by adding 20 µg/ml of an anti-survivin antibody (ab76424; Abcam, Milton, Cambridge, UK) for 1 h at room temperature before adding the medium to THP-1 or HepG2 cells. A negative epitope control (Rabbit IgG Isotype Control, Invitrogen) was included in each experiment.

2.9 Gene expression analysis

Total RNA was extracted from cells using TRI Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA). Quantification was performed at 260 nm and purity was assessed by the OD260/OD280 ratio. For gene expression analysis, 1 µg RNA was reverse-transcribed with random primers using a Reverse Transcription System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) was conducted on a ProFlex PCR System using

TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) (Supplementary Table 1). Results were calculated using the comparative Ct method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) normalized to the expression of the housekeeping gene 18S (Hs 03928985_g1) and expressed relative to the control condition set to 1. Two technical duplicates were performed for each biological replicate.

2.10 Protein expression analysis

Cells were lysed in Mammalian Protein Extraction Reagent (M-PER™, Thermo Fisher Scientific) containing a protease and phosphatase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich), and equal amounts of protein were separated on SDS-PAGE gels, transferred to Immobilon membranes (Merck Millipore, Burlington MA, USA) and blocked. Immunoreactive bands were visualized using a SuperSignal West Femto chemiluminescent substrate (Pierce, Rockford, IL, USA) and images were captured on a VersaDoc imaging system equipped with Quantity One software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The following antibodies (diluted 1:1000) were used: anti-survivin (ab76424; Abcam, Milton, Cambridge, UK); anti-survivin, anti-IL-1 β , anti-CD14, anti-TGF- β , anti-Stat6 and anti-phospho-Stat6 (Tyr641) (#2808, #12703, #56082, #3711, #9362 and #56554, respectively; Cell Signaling Technologies, Danvers MA, USA); anti-HIF-1 α and anti-PPAR γ (sc-10,790 and sc-7196, respectively; Santa Cruz Biotechnology PaloAlto, CA, USA); anti-phospho-survivin (Ser20) (NB110-92717; Novus Biologicals, Littleton, CO, USA); anti-phospho-survivin (Thr34) and anti- β -tubulin (PA1-16853 and MA5-16308, respectively; Thermo Fisher Scientific); and anti-lamin A and anti-GAPDH (L1293 and MA5-15738, respectively; Sigma-Aldrich). Secondary peroxidase-conjugated antibodies used (diluted 1:2000) were as follows: anti-rabbit and anti-mouse (NA934 and NXA931, respectively; GE Healthcare, Chicago, IL, USA) and anti-chicken (ab131366; Abcam).

2.11 Immunofluorescence assay

THP-1 macrophages grown on coverslips were fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde, rehydrated with 2% (v/v) fish skin gelatin and permeabilized with 0.2% Triton X-100 prior to incubation with 5% (v/v) goat serum. Subsequently, cells were incubated overnight at 4 °C with an anti-survivin antibody (1:500 dilution; ab76424, Abcam) in PBS containing 1% goat serum. Next, the cells were washed with PBS and incubated for 1 h at room temperature with an Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibody (1:100 dilution; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) followed by mounting with ProLong Diamond Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen). Images were

acquired on a Leica DM 4000B fluorescence microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and captured with a Leica DFC 300 FX camera (Leica Microsystems). Fluorescence intensity was analyzed using ImageJ software (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>), as described before [41].

2.12 Immunohistochemistry

Paraffin-embedded cellular blocks from 16 ascitic fluid samples were selected from the Pathology Department of the Hospital Verge de la Cinta, Tortosa, Tarragona, Spain. Hematoxylin and eosin (HE)-stained slides for all cases were reviewed by a pathologist to confirm the diagnosis. To obtain homogeneity and reproducibility in staining, a tissue microarray (TMA) was generated with two representative cylinders from the original paraffin block of each case. Cylinders were carefully selected by the pathologist and transferred into ready-made holes in a paraffin block using the Arraymold tool. For immunohistochemistry, the TMA block was sectioned at a thickness of 4 μ m and each slide was deparaffinized in xylene for 20 min, rehydrated in a decreasing ethanol series and washed with PBS. The sections were heated at 96 °C for 20 min for antigen retrieval and then incubated with appropriate primary antibodies directed against survivin (Clone 12C4), Ber-Ep4 (Clone Ber-EP4), CD68 (Clone KP1) or calretinin (Clone DAK-Calret 1) (all from DAKO Corp., Carpinteria, CA, USA). Automatic immunodetection was performed by the ENDVISION™ FLEX method (DAKO) using 3,3'-diaminobenzidine chromogen as substrate and counter-staining with hematoxylin. The presence or absence of tumor cells was confirmed by positive Ber-Ep4 staining, the presence of macrophages was confirmed by positive CD68 staining, and the presence of mesothelial cells was confirmed by positive calretinin staining.

Immunostained cylinders were evaluated by two blinded observers and the subcellular localization of survivin detected in the tumor cells and macrophages was scored semi-quantitatively for staining intensity and percentage of positive cells. The staining intensity was defined as weak (1+), moderate (2+) or strong (3+).

2.13 Survivin concentration determination

Survivin concentrations were measured in the CM by ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

2.14 Statistical analysis

In vitro experiments were performed 3–4 times and pooled for statistical analysis. Data are presented as mean \pm S.E.M., and represents the number of biologically-independent samples. Differences between groups were determined using unpaired

Student's *t* test to compare two groups (two-tailed, 95% confidence interval) and one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's multiple comparisons tests to compare three groups. The analyses were performed using GraphPad Prism 8.0.2 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). A *p* value < 0.05 was considered statistically significant.

3 Results

3.1 Conditioned medium from obese-derived ASCs induces macrophage switching

To test whether an obese microenvironment, specifically the obASC secretome, can modulate macrophage phenotypes, we cultured differentiated human THP-1 macrophages for 24 h with conditioned medium (CM) from visceral-derived ASCs isolated from subjects without obesity (InASCs) or with obesity (obASCs) (Supplementary Fig. 1A), after which we surveyed the expression of a panel of genes related to immune regulation, TAM membrane receptors and cell invasion (Supplementary Table 1). We found that the expression of genes related to inflammation (IL-1 β , IL-6, TNF α , CCL2 and CCL3), immune suppression (IL-10, PPAR γ and KLF4), angiogenesis (HIF-1 α and VEGF α), invasiveness (MMP2 and MMP9), tumor growth and metastasis (TLR2, TLR4, VIM, FN1, TGF β 1 and EGF), and TAM membrane receptors (CD14, CD11 β , CX3CR1 and CD45) was significantly higher in macrophages cultured with CM-obASC than in those cultured with CM-InASC (Fig. 1a). Protein expression of several selected markers (TGF β 1, HIF-1 α , CD14 and PPAR γ) was in accordance with mRNA expression (Fig. 1b).

Given our previous results showing high levels of secreted survivin by obASCs, we next focused on its potential modulating effects on macrophages. We first evaluated whether CM from InASCs and obASCs differentially affect survivin expression in macrophages. We found that the survivin mRNA expression level was not significantly altered (1 ± 0.22 vs 1.90 ± 0.34 , *p* = 0.056), but that the protein expression level was higher in macrophages cultured with CM-obASC than in those cultured with CM-InASC (Fig. 1b-c), suggesting that extracellular survivin of the obASC secretome is internalized by macrophages. Indeed, it has previously been described that survivin is packaged into exosomes and can be released into the extracellular compartment [42, 43]. Thus, to test whether macrophages are able to take up survivin, we infected HEK-293 cells with adenoviruses expressing green fluorescent protein (GFP) or GFP-tagged survivin, and co-cultured these cells with THP-1-derived macrophages for 24 h using a Transwell system that physically separates the two cell types (Supplementary Fig. 1B). Subsequent immunofluorescence analysis showed that the survivin levels were elevated in THP-1-differentiated macrophages co-cultured with HEK-293 cells expressing GFP-

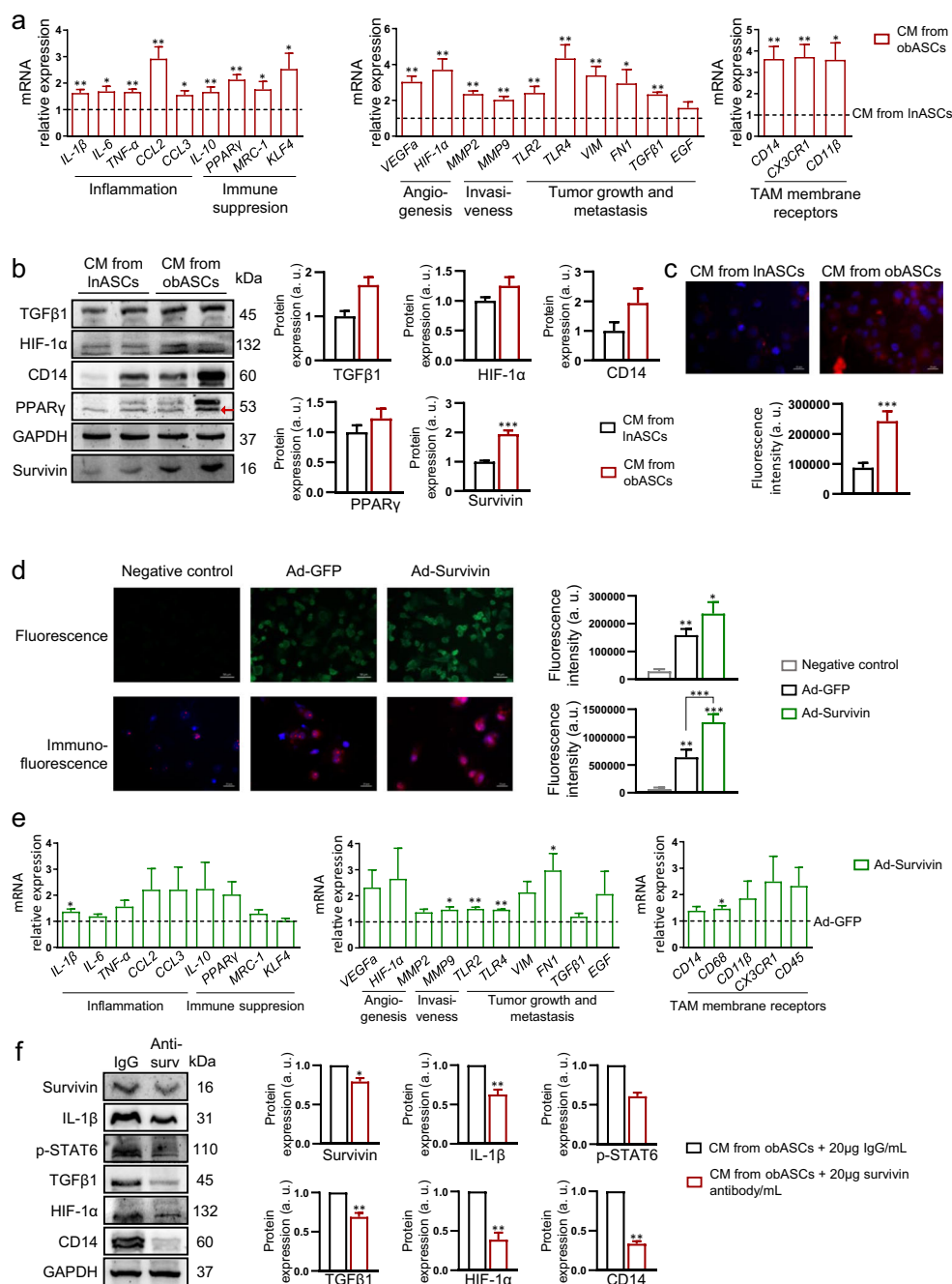
tagged survivin relative to the GFP control (Fig. 1d). Consistent with the results of the CM-obASC analysis (Fig. 1a), internalization of survivin by THP-1 macrophages was accompanied by an increase in the expression of immune regulatory genes, both pro- and anti-inflammatory (IL-1 β), genes related to angiogenesis, invasiveness, tumor growth and metastasis (MMP9, TLR2, TLR4 and FN1) and to TAM membrane receptors (CD68) (Fig. 1e). To test whether the effect of obASCs on the macrophage phenotype is dependent on secreted survivin, we neutralized survivin using a specific anti-survivin antibody (Supplementary Fig. 1C). We found that the expression of survivin, IL-1 β , p-STAT6, TGF β 1, HIF-1 α and CD14 in macrophages cultured with CM-obASC was significantly lower when the conditioned medium was first treated with the antibody (Fig. 1f).

Overall, these data indicate that an obese microenvironment generates "hybrid" macrophages that exhibit characteristics of both pro- and anti-inflammatory activation states, suggestive of a pro-tumoral phenotype, likely mediated by a survivin-dependent mechanism.

3.2 Expression and intracellular localization of survivin in macrophages

To further explore the potential role of survivin in macrophage plasticity, we first tested whether survivin expression was regulated in THP-1 macrophages under pro- and anti-inflammatory stimuli, i.e., LPS and IL-4, respectively. We found that survivin mRNA (Fig. 2a) and protein (Fig. 2b) expression were significantly higher in LPS (classically)-activated macrophages than in IL-4 (alternatively)-activated macrophages. Successful polarization of activated macrophages was confirmed by measuring the expression of IL-1 β (a pro-inflammatory protein) and phosphorylated-STAT6 (an anti-inflammatory signaling marker) (Fig. 2b). This result is consistent with published transcriptome data (GEO GSE27792 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), showing that survivin expression is higher in human pro-inflammatory macrophages polarized by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) than in anti-inflammatory macrophages polarized by macrophage colony-stimulating factor (M-CSF).

Because the multiple functions of survivin have been closely tied to its subcellular localization and post-translational modification [44, 45], we next analyzed protein expression of total and phosphorylated survivin (at Ser20 and Thr34) in both nuclear and cytoplasmic fractions. Using subcellular fractionation experiments, we found that total survivin was predominantly expressed in the nucleus of macrophages and increased in macrophages activated with LPS and IL-4 relative to M0-macrophages (control) (Fig. 2c). We also detected increased survivin phosphorylation on Ser20 and on Thr34 in the nucleus of activated macrophages (LPS and IL-4) relative to controls,



and increased expression of phosphorylated survivin at Thr34 in the cytoplasm of activated macrophages versus controls (Fig. 2c). Immunofluorescence analysis further confirmed the increased survivin expression in activated macrophages (Fig. 2d).

Subcellular fractionation experiments also showed that when macrophages sequestered survivin from the extracellular medium – in this case THP-1 macrophages co-cultured with HEK-293 cells overexpressing survivin – the nuclear localization of survivin was maintained (Fig. 2e and Supplementary 1B).

Taken together, these results point to nuclear survivin as a potential key factor for macrophage phenotype and functionality.

3.3 Survivin alters the macrophage phenotype and enhances pro-tumoral activity

To test whether survivin plays a role in macrophage phenotype and functionality, we compared adenoviral overexpression of wild-type (WT) survivin with a non-phosphorylatable mutant (T34A) (Supplementary Fig. 1D), which has been

Fig. 1 An obese environment changes the macrophage phenotype in a survivin-dependent manner. **a** Gene expression analysis of THP-1-derived macrophages cultured with conditioned medium (CM) from visceral ASCs of lean donors (lnASCs) or subjects with obesity (obASCs). mRNA CM lnASC values are arbitrarily set to 1.0 (dotted line). $n = 5$ in each group. $*p < 0.05$; $**p < 0.01$ versus CM from lnASCs. **b** Western blotting of TGF β 1, HIF-1 α , CD14, PPAR γ and survivin in THP-1-derived macrophages cultured with CM from lnASCs or obASCs. GAPDH was used as a loading control. Shown is a representative image and densitometry analysis (arbitrary units), $n = 8$ for survivin and $n = 2-4$ for other proteins. $***p < 0.001$ versus CM from lnASCs. **c** Immunofluorescence of survivin in THP-1-derived macrophages cultured with CM from lnASCs or obASCs. Survivin is marked in red and the cell nucleus is marked in blue (DAPI). Shown is a representative image and fluorescence quantification. $***p < 0.001$ versus CM from lnASCs. **d** Fluorescence and immunofluorescence analysis of internalized survivin in THP-1-derived macrophages co-cultured with HEK-293 cells. In the fluorescence images green denotes the GFP-tag of the adenovirus. In the immunofluorescence images, survivin is marked in red and the cell nucleus is marked in blue (DAPI). Shown is a representative image and fluorescence quantification. $**p < 0.01$ versus negative control; $***p < 0.001$ versus negative control and ad-GFP. **e** Gene expression analysis in THP-1-derived macrophages co-cultured with HEK-293 cells overexpressing control adenovirus (ad-GFP) or survivin (ad-survivin). mRNA ad-GFP values are arbitrarily set to 1.0. $n = 3$, $*p < 0.05$; $**p < 0.01$ versus co-culture with ad-GFP. **f** Immunoblotting analysis of THP-1-derived macrophages cultured with CM-obASC with or without an anti-survivin neutralizing antibody. Shown is a representative image and densitometry analysis (arbitrary units). $n = 3-4$, $*p < 0.05$; $**p < 0.01$ versus CM-obASC without anti-survivin antibody (IgG). Data information: All values are expressed as mean \pm S.E.M. Statistical analyses: unpaired Student's t test or ANOVA with Tukey's multiple comparisons test

reported to act as a dominant-negative protein by competing with endogenous survivin for access to kinases, thereby preventing the phosphorylation of WT protein [29, 46]. Transduction of WT survivin into THP-1 macrophages (M0) led to its expression in both the nucleus and the cytoplasm (Supplementary Fig. 2), concomitant with a significant increase in the expression of genes related to inflammation (e.g., IL-1 β , IL-6, TNF α , CCL2 and CCL3), immune suppression (e.g., IL-10 and PPAR γ), angiogenesis (e.g., HIF-1 α and VEGF α), invasiveness (e.g., MMP9), tumor growth and metastasis (e.g., TLR2, TLR4, VIM, FN1, TGF β 1 and EGF) and TAM membrane receptors (e.g., CD14, CD11 β and CD45) (Fig. 3a), again reflecting a mixed pro/anti-inflammatory phenotype with potential pro-tumoral activity. These results are consistent with those of the impact of CM-obASC on the same cells (Fig. 1a). By contrast, we found that overexpression of T34A survivin had no effect on the macrophage phenotype (Fig. 3a), suggesting that the effect of survivin on macrophage phenotype regulation is dependent on its phosphorylation at Thr34.

To further assess whether survivin-overexpressing macrophages may have pro-tumoral activity, we repeated the CM experiments on cancer cells (Supplementary Fig. 1E). We found that CM from survivin-overexpressing THP-1

macrophages significantly modulated gene expression patterns in both human liver carcinoma cells (HepG2) and human colorectal cells (HT29 and Caco2), specifically of those involved in inflammation, angiogenesis, EMT and invasiveness (Fig. 3b). In line with these observations, we found that the migratory and invasive capacities of HepG2 and Caco2 cells were increased when they were cultured in CM from survivin-overexpressing macrophages compared to those from GFP-overexpressing control cells (Fig. 3c and d).

Overall, these data indicate that survivin may skew the phenotype and functionality of macrophages towards a TAM-type profile.

3.4 Macrophages are a source of survivin in the tumor microenvironment

To gain further insight into the role of the different cell types in the tumor microenvironment, we first investigated macrophage-secreted survivin. To this end, THP-1 macrophages were cultured with either CM-obASC or CM-lnASC, or co-cultured with either lean or obese ASCs. We observed that "obesity" potentiated the release of survivin by macrophages (Fig. 4a). To test whether the survivin released by macrophages can modulate their phenotype, we incubated THP-1 macrophages with CM from survivin-overexpressing macrophages treated with a survivin-neutralizing antibody (Supplementary Fig. 1F). We found that neutralizing extracellular survivin aggravated macrophage inflammation (as measured by the expression of its associated genes), but significantly decreased the expression of genes related to immune suppression (e.g., IL-10, PPAR γ , MRC1 and KLF4), invasiveness (e.g., MMP2), tumor growth and metastasis (e.g. VIM, FN1, TGF β 1 and EGF) and TAM-specific markers (e.g., CD68) (Fig. 4b), suggesting that an autocrine survivin loop reprograms the TAM phenotype. To test the paracrine effect of macrophage-secreted survivin, HepG2 cells were cultured with CM of survivin-overexpressing macrophages treated with a survivin-neutralizing antibody (Supplementary Fig. 1F). Blocking survivin reversed the tumoral phenotype induced by macrophage-derived survivin (Fig. 3b) and significantly down-regulated the expression of inflammation-, angiogenesis- and EMT-related genes (Fig. 4c).

To better understand the role of survivin in the complex relationship between ASCs, macrophages and tumor cells, we performed triple co-culture experiments (Supplementary Fig. 1G-H). HepG2 cells co-cultured with macrophages and ASCs showed greater migration and invasion abilities than cells cultured with ASCs or macrophages alone, and this was more pronounced when obASCs were used (Fig. 4d and e). These effects were observed both in cancer cells co-cultured with obASC CM-polarized THP-1 cells (Fig. 4d, Supplementary Fig. 1G) and in cancer cells in triple co-culture (Fig. 4e, Supplementary Fig. 1H).

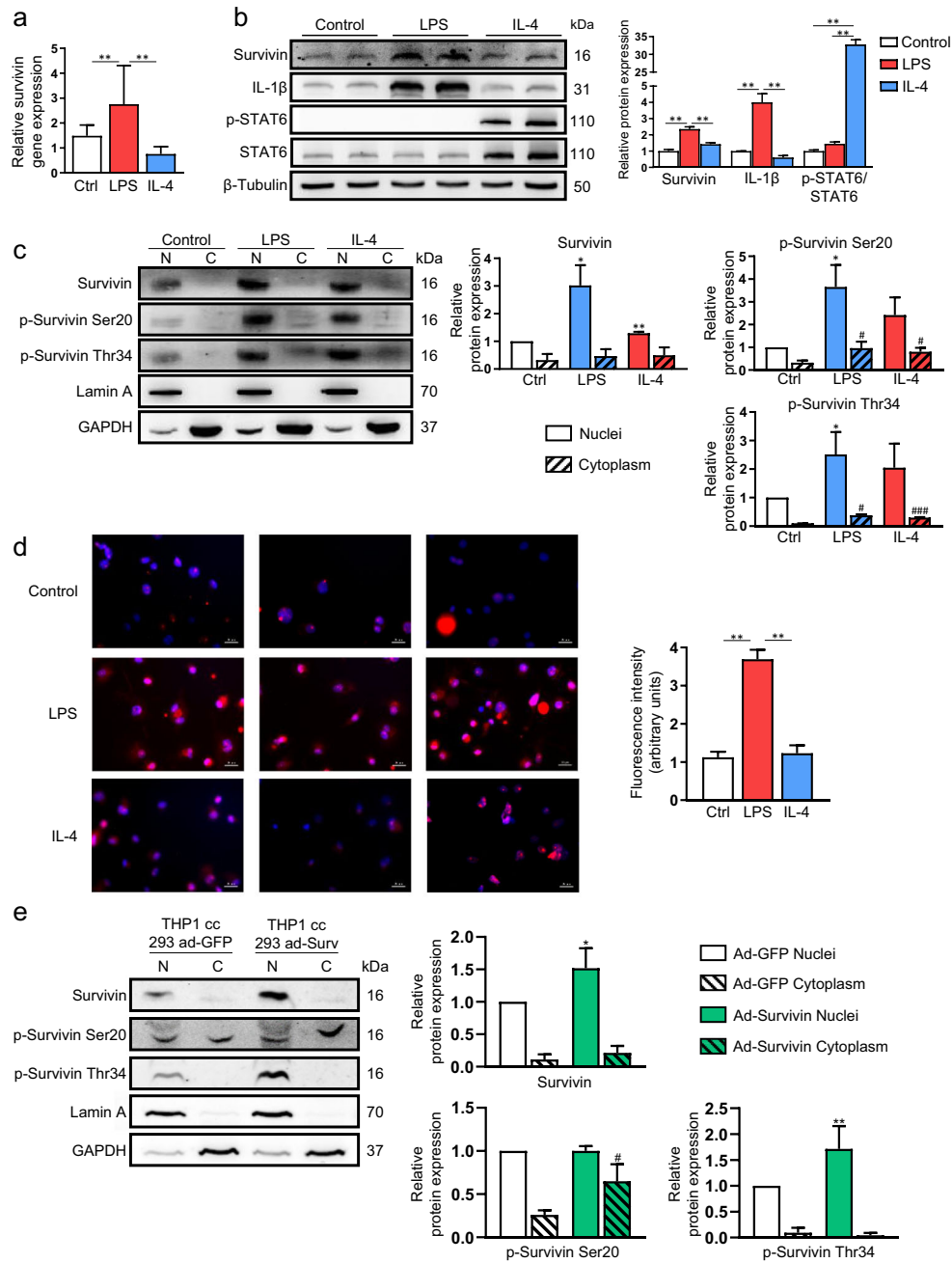
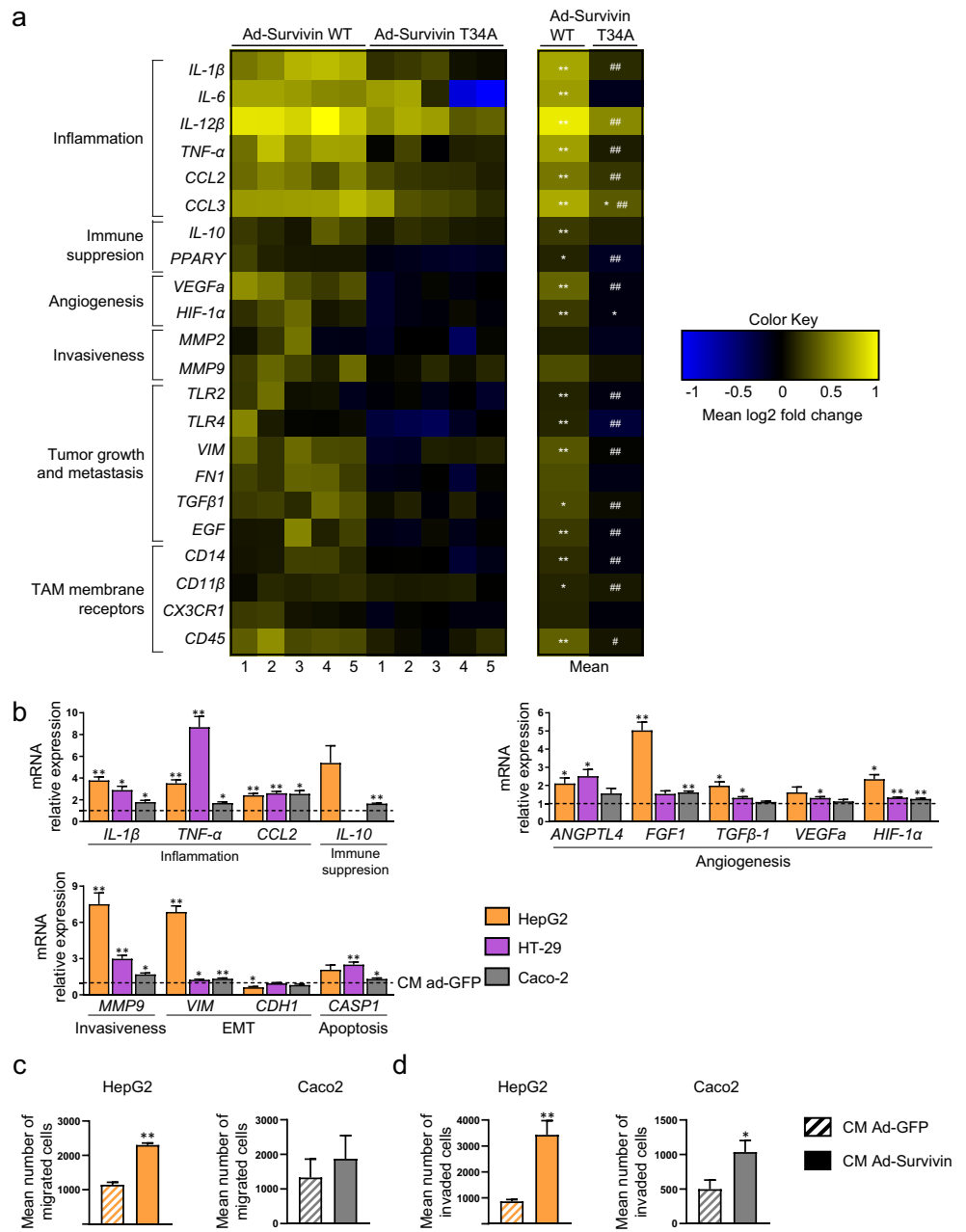


Fig. 2 Survivin expression is elevated in activated macrophages. **a** Survivin gene expression in THP-1-derived macrophages treated with LPS or IL-4. $n = 4$ in each group. **b** Survivin protein expression in THP-1-derived macrophages polarized with LPS or IL-4. IL-1 β and p-STAT6 were used to confirm polarization and β -tubulin was used as a loading control. Representative image and densitometry analysis (arbitrary units). $n = 4$ in each group. **c** Survivin localization by immunoblotting of THP-1-derived macrophages polarized with LPS or IL-4. Lamin A and GAPDH were used as nuclear (N) and cytoplasmic (C) markers, respectively. Representative image and densitometry analysis (arbitrary units). $n = 3$. **d** Immunofluorescence staining of survivin (red) and DAPI (blue) in control THP-1-derived macrophages and in LPS- or IL-4-

polarized macrophages. Representative image and densitometry analysis (arbitrary units). $n = 6$. **e** Western blotting of THP-1-derived macrophages co-cultured with HEK-293 cells overexpressing GFP or survivin. Representative image and densitometry analysis (arbitrary units). $n = 3$. Data information: All values are expressed as mean \pm S.E.M. In **(a-d)**, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ versus inactivated macrophages (control), versus LPS-activated macrophages or versus nuclei of inactivated macrophages; # $p < 0.05$; ### $p < 0.001$ versus cytoplasm of inactivated macrophages. In **e**, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ versus ad-GFP nuclei; # $p < 0.05$ versus ad-GFP cytoplasm. Statistical analyses: unpaired Student's t test

Fig. 3 Survivin overexpression in macrophages promotes a tumor-associated macrophage phenotype and alters gene expression patterns and migratory and invasive capacities of cancer cells. **a** Heatmap of gene expression in THP-1-derived macrophages infected with a recombinant adenovirus expressing GFP (ad-GFP), wild-type (WT) survivin or mutated (T34A) survivin. mRNA ad-GFP values are arbitrarily set to 1.0. $n = 5$, one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons, $*p < 0.05$; $**p < 0.01$ versus ad-GFP; $\#p < 0.05$; $\#\#p < 0.01$ versus ad-survivin WT. **b** Gene expression in HepG2, HT-29 and Caco2 cells cultured with conditioned medium (CM) from ad-GFP- or ad-survivin-infected THP-1-derived macrophages. mRNA ad-GFP values are arbitrarily set to 1.0. $n = 4$ in each group. **c, d** Transwell cell migration (c) and invasion (d) assays of cancer cells cultured with CM from ad-GFP- and ad-survivin-infected THP-1-derived macrophages. Striped columns are cells cultured with CM from ad-GFP-infected macrophages, plain columns are cells cultured with CM from ad-survivin-infected macrophages. $n = 3$ in each group. Data information: In (b–d), data are presented as mean \pm SEM. $*p < 0.05$; $**p < 0.01$ versus CM from ad-GFP-infected macrophages (paired Student's t test)

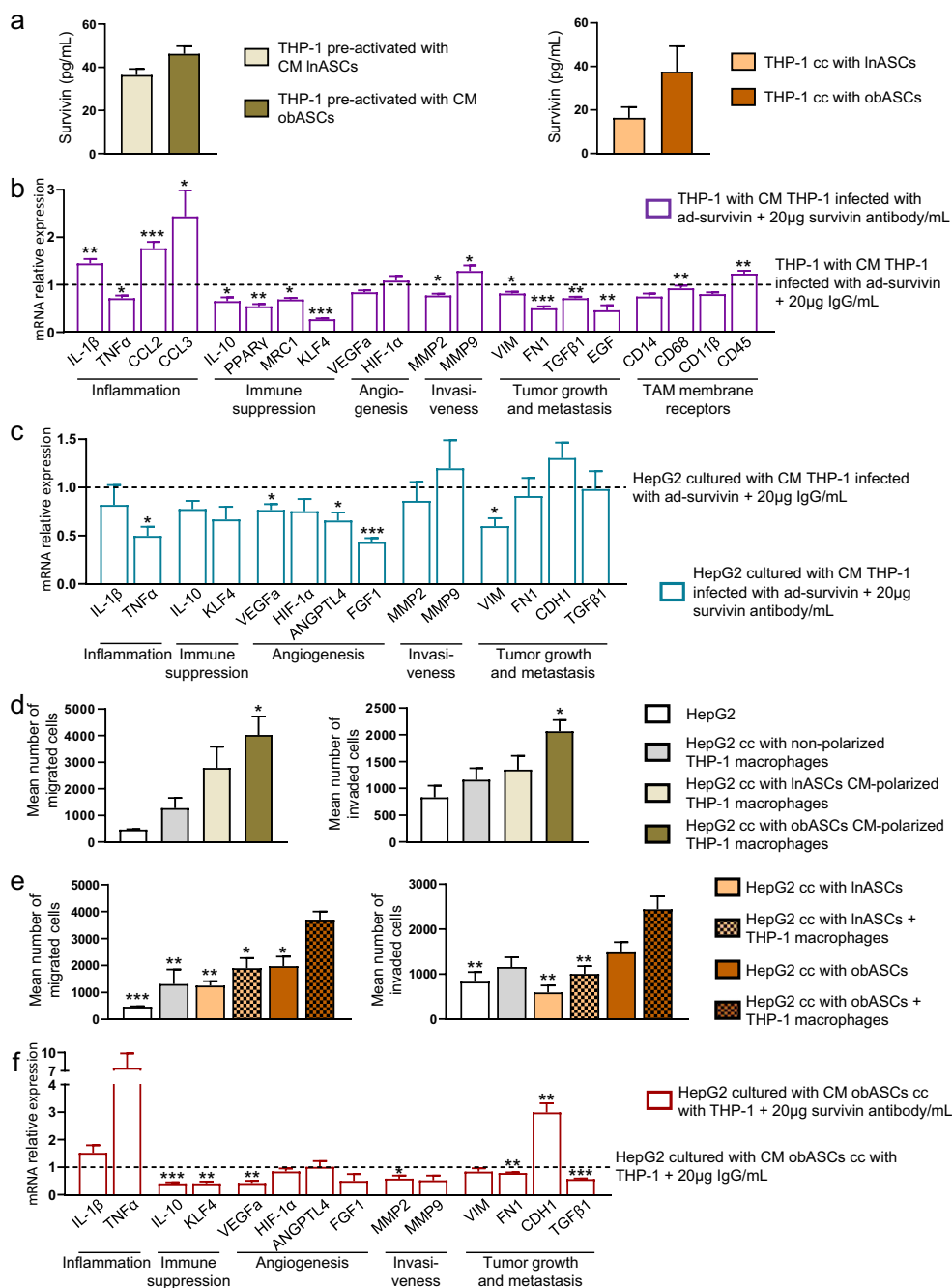


To confirm that these effects are survivin-dependent, we cultured cancer cells in survivin-neutralized CM collected from obASC/macrophage co-cultures and from pre-activated-macrophages cultured in CM-obASC (Fig. 4f, Supplementary Fig. 11). Blocking survivin potentiated the inflammatory status of cancer cells (as indicated by an increase in IL-1 β and TNF α expression), but significantly reduced the expression of immune suppression, angiogenesis, invasiveness and tumor growth-related markers, indicating that tumor microenvironment survivin (secreted by both obese ASCs and macrophages) promotes a pro-tumorigenic gene expression profile in HepG2 cells.

Overall, our data show synergistic actions of obASCs- and macrophage-derived survivin in enhancing the malignancy of cancer cells.

3.5 Survivin is overexpressed in ascites-associated macrophages from patients with a malignant diagnosis

Although a variety of macrophage subsets has been reported to coexist in human tumors, their phenotypes are still not fully defined [47], highlighting the need to uncover unique biomarkers for this specific macrophage population. Based on our results on survivin as a possible regulator of the TAM



phenotype, we hypothesized that it could also serve as a TAM biomarker. To test this, we analyzed survivin expression by immunochemistry in ascites from 11 patients without obesity but with different tumors (stomach, serous ovarian carcinoma, ovarian clear cell, rectum, bile duct, colon and pleural mesothelioma) and from 5 patients without obesity and without tumors (cirrhosis, congestive heart failure and ovarian cystadenoma with mesothelial hyperplasia). Ascites is defined as a pathological fluid accumulation within the abdominal cavity, which may be a complication associated with a number

of different diseases, including cancer [48]. Cancer-associated ascites may contain tumor cells and immune cells, including macrophages. These peritoneal macrophages play an indispensable role in cancer progression [49] and, therefore, ascites may be a rich source of TAMs. We classified our patient cohort into three groups: 6 patients with a malignant diagnosis with ascites containing tumor cells, 5 patients with a malignant diagnosis with ascites without tumor cells and 5 patients without a malignant diagnosis (Table 1). As expected, we found a high abundance of macrophages (CD68+) in ascitic

Fig. 4 Macrophages are a source of survivin in the tumor microenvironment. **a** Survivin secretion in THP-1-derived macrophages cultured in conditioned medium (CM) of obese or lean ASCs (left) and co-cultured with lean or obese ASCs (right). $n = 3$. **b** Gene expression analysis in THP-1-derived macrophages cultured in CM of survivin-overexpressing macrophages treated with a specific survivin-neutralizing antibody or an IgG (control). Control values are arbitrarily set to 1.0 (dotted line). $n = 6$. **c** Gene expression analysis of HepG2 cells cultured in CM of survivin-overexpressing macrophages treated with a specific survivin-neutralizing antibody or an IgG (control). Control values are arbitrarily set to 1.0 (dotted line). $n = 4$. **d** Transwell cell migration and invasion assays of HepG2 cells cultured in (i) control media, or co-cultured with THP1-macrophages (ii) non-activated, pre-activated with (iii) CM of lnASCs and (iv) CM of obASCs. $n = 2$ for control HepG2 and co-cultured with non-activated THP1-macrophages, $n = 5$ for HepG2 co-cultured with pre-activated THP1-macrophages with CM from ASCs. **e** Transwell cell migration and invasion assays of HepG2 cells (i) cultured in control media, co-cultured with (ii) THP1-macrophages, (iii) lean ASCs (lnASCs), (iv) lnASCs and THP1-macrophages, (v) obese ASCs (obASCs) and (vi) obASCs and THP1-macrophages. $n = 2$ for control HepG2 and co-cultured with non-activated THP1-macrophages, $n = 5$ for HepG2 co-cultured with ASCs and THP1-macrophages with ASCs. **f** Gene expression analysis in HepG2 cells cultured in CM of THP-1 macrophages pre-activated with CM-obASCs and treated with a survivin-neutralizing antibody or IgG (control). Control values are arbitrarily set to 1.0 (dotted line). $n = 4$. Data information: All values are expressed as mean \pm S.E.M. Statistical analyses: unpaired Student's t test or ANOVA. In (b, c, f) $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$ versus CM + 20 $\mu\text{g/ml}$ IgG. In (d) $*p < 0.05$ versus HepG2. In (e) $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$ versus HepG2 with obASCs + THP-1 macrophages

fluid in all groups (Fig. 5a, shown is a representative image for each group).

Survivin expression was detected in virtually 100% of the tumor cells, which were only present in patients with a malignant diagnosis. Of the tumor cells positive for survivin, 92% showed survivin staining with a moderate-strong intensity in the cytoplasm, whereas 23% also showed survivin expression in the nucleus, with a strong intensity (Table 1, Fig. 5a and b). Remarkably, survivin was also detected in the cytoplasm of ascites-associated macrophages from patients with tumors (Fig. 5a). Specifically, the percentage of macrophages positive for survivin staining was similar between ascites with and without tumor cells (85% vs 86%), but the staining intensity was stronger in ascites containing tumor cells (Table 1 and Fig. 5). The absence of survivin in macrophages without a malignant diagnosis (Table 1 and Fig. 5) strongly indicates that survivin may serve as a specific biomarker of TAMs in ascites.

4 Discussion

In the present study we provide evidence that survivin may play a role in reprogramming human macrophages towards a pro-tumoral phenotype. We found that, in the context of an obese environment, an enhanced secretion of survivin by

ASCs provokes phenotypic and functional alterations in macrophages and, ultimately, enhances the malignancy of cancer cells (graphical abstract, Fig. 6).

A link between obesity and cancer has mostly been attributed to dysfunctional adipose tissue [50] and recent studies point to a potential role for ASCs in cancer progression [10, 51, 52]. Our findings implicate survivin as a new link between obesity and cancer, and lead us to propose a new survivin-dependent mechanism through which ASCs, specifically from patients with obesity, contribute to the pro-tumoral activation of TAMs. An obese environment increases tumor-recruitment of ASCs [10, 25, 51], which promote cancer cell growth, possibly via leptin secretion [10, 25]. However, indirect interactions, such as crosstalk between ASCs and other cells present in the tumor microenvironment, including TAMs, may also contribute to the complex network of processes at work within a tumor. Here, we uncovered survivin as a novel player in the ASC-TAM-cancer-cell crosstalk. It is well established now that TAMs orchestrate several critical processes related to tumor progression [53, 54], although several different TAM subsets have been described and there is currently no consensus regarding their phenotype [47, 55, 56]. Indeed, recent studies suggest that macrophages infiltrating the tumor microenvironment have a hybrid phenotype. TAMs can be considered as a unique in vivo macrophage population that shares some phenotypic characteristics with in vitro generated anti-inflammatory cells [19, 20] and metabolic similarities with in vitro produced pro-inflammatory macrophages [21]. Clearly, a better understanding of TAM function and phenotype will be necessary to fully comprehend their role in cancer progression.

Since macrophage diversity and plasticity are dependent on external stimuli, we focused on the impact of ASCs from patients with and without obesity in the programming of macrophages, in an attempt to further our understanding of the mechanisms by which obesity enhances tumorigenesis. We found that the secretome of ASCs alters the gene expression profile of macrophages by a mechanism that involves survivin. We previously demonstrated that obASCs can produce aberrant amounts of survivin [29]. Here we show that the effect of obASCs on establishing the macrophage phenotype is at least partially dependent on secreted survivin, but we cannot rule out the possibility that other factors from the ASC secretome also play a role. Survivin is an inhibitor of apoptosis highly expressed in most cancers and is associated with a more aggressive disease and a poor clinical outcome [57, 58]. In addition to its intracellular pro-cancer functions, extracellular survivin can be internalized and enhance cell aggressiveness by promoting proliferation while decreasing apoptosis [59]. Consistent with these findings, we here show that extracellular survivin within the tumor microenvironment

Table 1 Survivin expression in tumor cells and macrophages of ascites from patients with different tumors and patients without tumors

Diagnosis	Tumor cells		Macrophages	
	Staining intensity Nucleus / cytoplasm	% Labeled cells Nucleus / cytoplasm	Staining intensity Nucleus / cytoplasm	% Labeled cells Nucleus / cytoplasm
Patients with a malignant diagnosis with ascites containing tumor cells				
ADC/Stomach	3+ / 2+	10% / 100%	0 / 2+	0% / 100%
ADC/Serous ovarian carcinoma	2+ / 2+	20% / 100%	0 / 1+	0% / 50%
ADC/Serous ovarian carcinoma	3+ / 2+	40% / 100%	0 / 2+	0% / 100%
ADC/Ovarian clear cell	2+ / 1+	8% / 50%	0 / 1+	0% / 60%
ADC/Rectum	2+ / 2+	50% / 100%	0 / 3+	0% / 100%
ADC/Bile duct	3+ / 3+	8% / 100%	0 / 3+	0% / 100%
Patients with a malignant diagnosis with ascites without tumor cells				
ADC/Rectum	–	–	0 / 2+	0% / 100%
ADC/Serous ovarian carcinoma	–	–	0 / 1+	0% / 50%
ADC/Colon	–	–	0 / 1+	0% / 100%
ADC/Rectum	–	–	0 / 1+	0% / 100%
Pleural mesothelioma	–	–	0 / 1+	0% / 80%
Patients without a malignant diagnosis				
Cirrhosis	–	–	0 / 1+	0% / 100%
Cirrhosis	–	–	0 / 1+	0% / 30%
Cirrhosis	–	–	0 / 0	0% / 0%
Congestive heart failure	–	–	0 / 0	0% / 0%
Ovarian cystadenoma with mesothelial hyperplasia	–	–	0 / 0	0% / 0%

Data are presented as the percentage of positive cells by survivin (labeled cells) and scored semi-quantitatively for staining intensity. The staining intensity was defined as weak (1+), moderate (2+) or strong (3+)

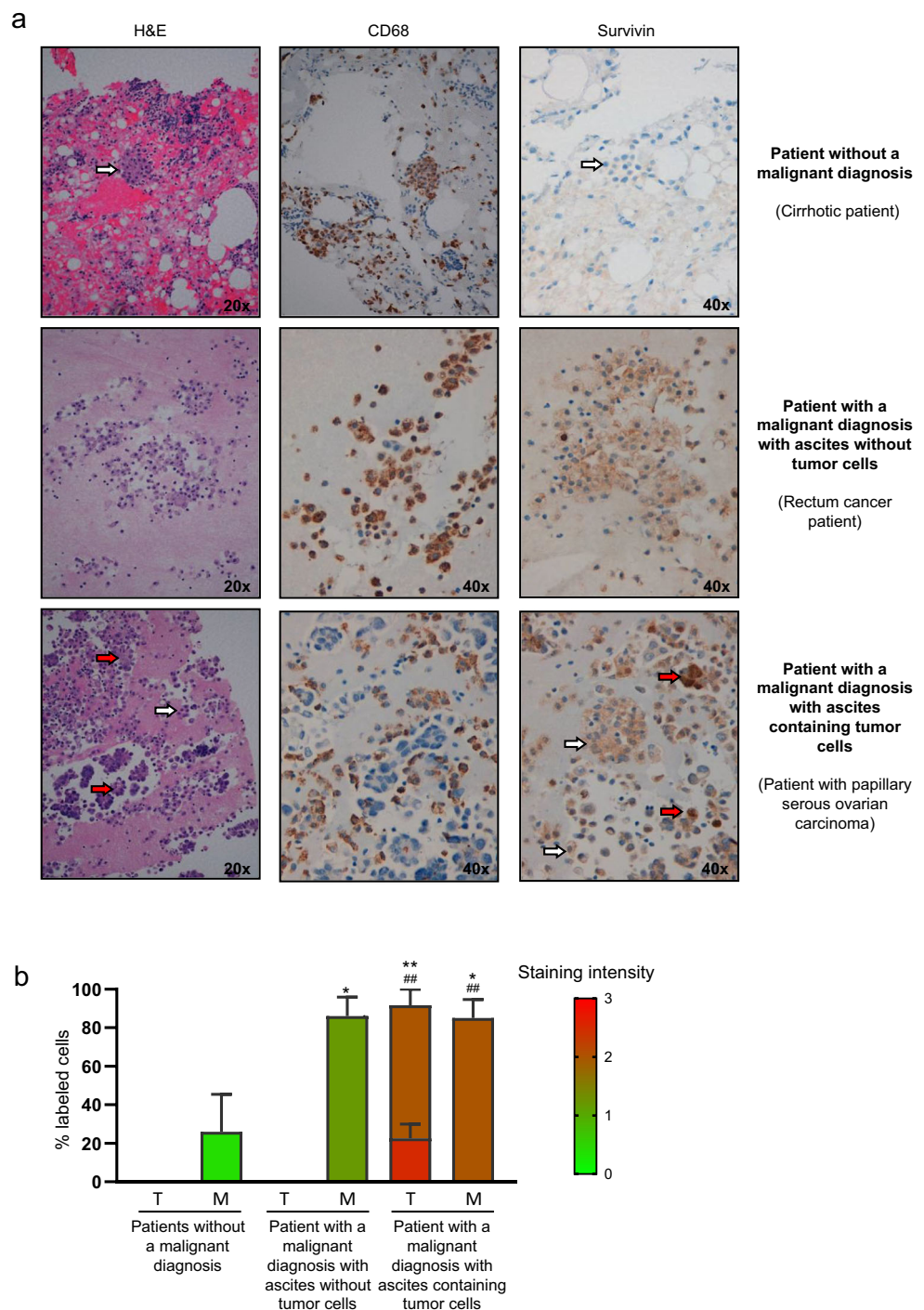
increases the expression of inflammatory-, angiogenesis-, EMT- and invasiveness-related genes in cancer cells.

Beyond its role in proliferation and apoptosis, emerging data suggest that extracellular survivin may possess immunomodulatory properties in leukocytes [60]. Here, we show that macrophages are able to sequester extracellular survivin, which triggers a mixed phenotype with both pro- and anti-inflammatory properties. This internalization alters the expression of genes involved in angiogenesis, invasion, tumor growth and metastasis, and increases the expression of membrane receptors associated with the TAM phenotype. Consistent with these findings, we found that activated macrophages with both pro- and anti-inflammatory phenotypes exhibit elevated nuclear survivin levels and a higher phosphorylation on Thr34 (in the nucleus and cytoplasm). These data suggest that functional survivin may play an important role in macrophage activation. Indeed, we found that survivin-overexpressing macrophages have a gene expression profile similar to that of macrophages cultured with CM-obASCs. In addition, our results point to an autocrine survivin loop in macrophages to sustain their pro-tumoral phenotype. IL-4, which is abundant in the tumor microenvironment [61], increases survivin protein

expression in human macrophages, which is in agreement with a recent report describing that survivin expression and location are regulated by IL-4 in colon cancer stem cells through a STAT6-dependent pathway [62]. Nonetheless, further studies are needed to comprehend the molecular mechanism by which survivin regulates macrophage polarization. Along this line, the multiple functions of survivin have been closely tied to its subcellular localization. It is widely acknowledged that nuclear survivin is involved in mitosis, whereas cytoplasmic survivin is related to apoptosis [63]. The finding that overexpression of mutated Thr34-survivin failed to impact macrophage gene expression indicates that the role of survivin in macrophage plasticity may be dependent on its phosphorylation on Thr34, which is usually linked to its anti-apoptotic function [46, 64, 65]. Nonetheless, no significant differences in apoptosis were detected when survivin was overexpressed or when macrophages were cultured with CM from obese ASCs. These data lead us to propose a new role for this post-translational modification in modulating the macrophage phenotype, specifically boosting a TAM profile.

The phenotype and function of TAMs in humans remain enigmatic. Access to human TAMs is limited, and most

Fig. 5 Survivin is overexpressed in ascites-associated macrophages from patients with a malignant diagnosis. **a** Representative images of ascitic fluid from patients without a malignant diagnosis (liver cirrhosis), patients with a malignant diagnosis with ascites without tumor cells (rectal cancer) and patients with a malignant diagnosis with ascites containing tumor cells (papillary serous ovarian carcinoma). Hematoxylin and eosin (H&E) staining was performed to verify the diagnosis. CD68 immunostaining confirmed macrophage accumulation in ascitic fluid. Survivin immunostaining is mainly present in patients with a malignant diagnosis. Red arrows point to cancer cells, white arrows point to macrophages. **b** Percentage of cells labeled with survivin in tumoral cells (T) and macrophages (M) in each group of patients. The colour of the bars reflects the staining intensity, with 0 null intensity and 3 the highest intensity. Bars represent the localization of survivin in the cytoplasm, except tumoral cells, which also show a percentage of survivin in the nucleus. Data information: $n = 6$ in malignant ascites and $n = 5$ in benign ascites. All values are expressed as mean \pm S.E.M. Statistical analyses: ANOVA and Tukey's multiple comparisons tests, $*p < 0.05$; $**p < 0.01$ for % labeled cells; $##p < 0.01$ for staining intensity versus cytoplasmic staining (percentage and intensity) of patients without a malignant diagnosis



studies are restricted to using in vitro differentiated macrophages [66]. Moreover, the dearth of phenotypic markers for TAMs limits the potential of functional studies. The present study shows that obASCs may control a pro-tumoral program in macrophages in the tumor microenvironment through a survivin-dependent mechanism. Moreover, it identifies survivin as a specific biomarker of macrophages associated with malignant tumors, turning this protein into a potentially

interesting clinical tool to identify malignancy, which may guide clinical decision-making.

In conclusion, the present study provides evidence for survivin as a stimulator of pro-tumorigenic polarization of TAMs. In addition, we uncover survivin as a key player in autocrine and paracrine loops between ASCs, macrophages and cancer cells that sustain tumorigenicity. We postulate that in an obesity setting, survivin secreted by ASCs may be

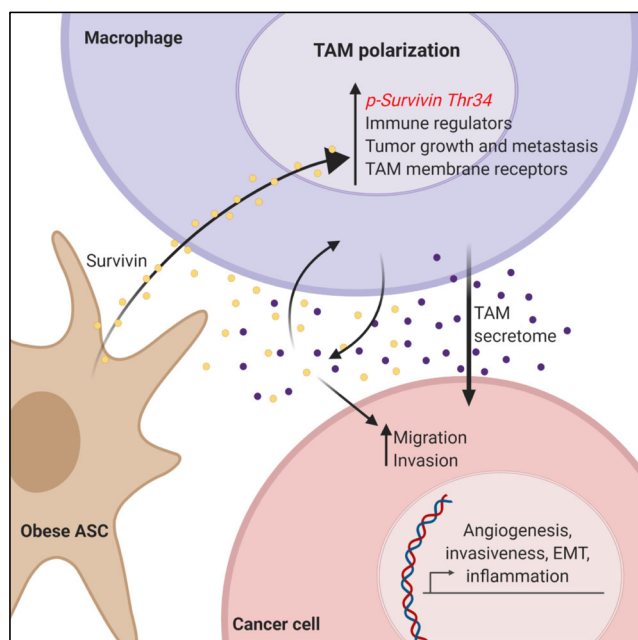


Fig. 6 Graphical abstract. Obese adipose-derived stem cells modulate macrophage plasticity, promoting a mixed phenotype dependent on survivin. In the tumor microenvironment, obese adipose-derived stem cells induce pro-tumoral reprogramming of macrophages by a survivin-dependent mechanism. Macrophages internalize extracellular survivin, which drives macrophages towards a pro-tumor phenotype. Survivin-mediated polarization of macrophages is both dependent on its nuclear location and phosphorylation at Thr34. Pro-tumoral macrophages, also a source of survivin, further reinforce the malignant characteristics of cancer cells including epithelial-mesenchymal transition, migration and invasion

internalized by macrophages, altering their function and phenotype and promoting tumor progression. Indeed, pro-tumoral macrophages may also contribute to higher levels of extracellular survivin in the tumor microenvironment, which may boost both migratory and invasive capacities of cancer cells (Fig. 6). While survivin is already a well-established target in experimental cancer therapy, our study offers a fresh perspective on its role in the interplay between cellular components of the tumor microenvironment. Further preclinical studies are warranted to confirm that targeting survivin *in vivo* can modulate the TAM phenotype and prevent cancer progression.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s13402-021-00597-x>.

Abbreviations ASCs, adipose-derived stem cells; CM, conditioned medium; CC, co-culture; EMT, epithelial-to-mesenchymal transition; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; GFP, green fluorescent protein; IL, interleukin; InASCs, lean-derived ASCs; M-CSF, macrophage colony-stimulating factor; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; obASCs, obese-derived ASCs; TAMs, tumor-associated macrophages; VEGF, vascular endothelial growth factor; VAT, visceral adipose tissue; WT, wild-type

Acknowledgements We want to particularly acknowledge the patients and the BioBank IISPV (PT17/0015/0029) integrated in the Spanish National Biobanks Network for their collaboration. We thank Dr. Altieri from the Wistar Institute for kindly providing adenoviruses expressing wild type or dominant-negative survivin.

Availability of data and material All data generated or analyzed during this study are included in this article and its supplementary files. Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the corresponding author, Sonia Fernández-Veledo (sonia.fernandezveledo@gmail.com; sonia.fernandez@iispv.cat).

Code availability Not applicable.

Authors' contributions E.B., V.C.-M. and A.M. participated in the conception and design of the study, conducted the experiments and statistical analyses and wrote the manuscript. R.B. and M.L. conducted immunohistochemistry analyses. C.N.-R. and E.M.-M. performed the isolation and culture of ASCs. M.E. and I.H.-R. participated in scientific discussions and revised the manuscript. J.V. and S.F.-V. conceived, designed, and supervised the research project and wrote the manuscript. J.V. and S.F.-V. are the guarantors of this work and, as such, had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Funding This study was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (PI14/00228 and PI17/0153 to J.V.) and the Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (SAF2015–65019-R and RTI2018–093919 to S.F.-V.), and was co-financed by the European Regional Development Fund. The Spanish CIBERDEM (CB07708/0012) is an initiative of Instituto de Salud Carlos III. S.F.-V. was recipient of the Miguel Servet tenure-track program (CP10/00438 and CPII16/00008) from the Fondo de Investigación Sanitaria, co-financed by the European Regional Development Fund. E.B. is recipient of a predoctoral fellowship from the Rovira i Virgili University (PMF-PIPF-SGR-2019). A.M. is a recipient of a postdoctoral fellowship from IJCI-2016-30572. M.E. is recipient of a Generalitat de Catalunya grant for the incorporation of scientists PERIS (SLT002/16/00120).

Declarations

Ethics approval and consent to participate ASCs were isolated from the VAT of patients with or without obesity. These cells are stored in a tissue biobank registered at the National Register of Biobanks (C.0003609). All participants gave their informed consent, and the study was reviewed and approved by the ethics and research committee of University Hospital Joan XXIII from Tarragona, Spain.

Consent for publication Not applicable.

Competing interests The authors declare that they have no competing interests.

References

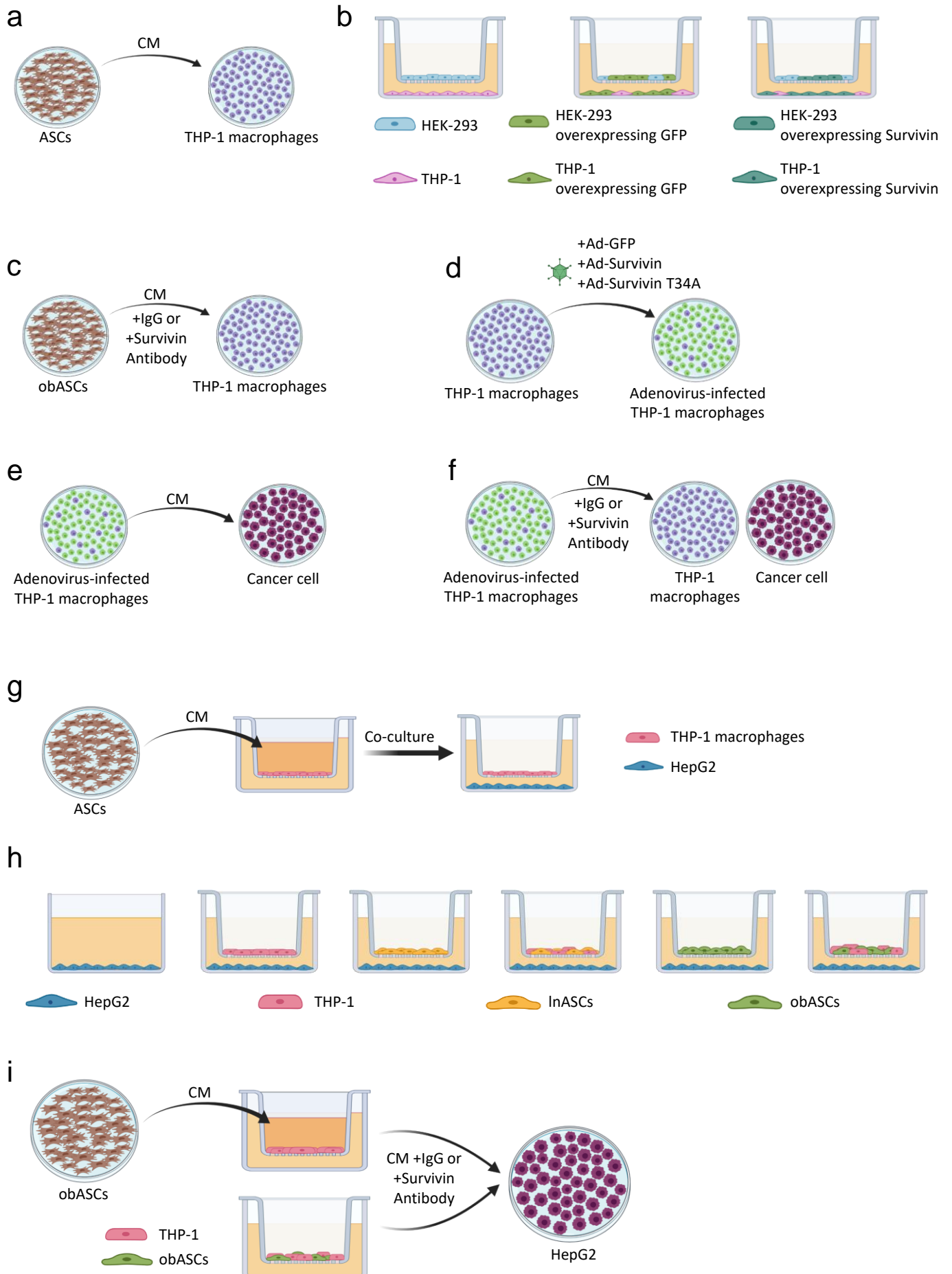
1. E.H. Allott, E.M. Masko, S.J. Freedland, Obesity and prostate Cancer: Weighing the evidence. *Eur. Urol.* **63**, 800–809 (2013)
2. C. Himbert, M. Delphan, D. Scherer, L.W. Bowers, S. Hursting, C.M. Ulrich, Signals from the adipose microenvironment and the obesity–cancer link — A systematic review. *Cancer Prev. Res.* **10**, 494–506 (2017)

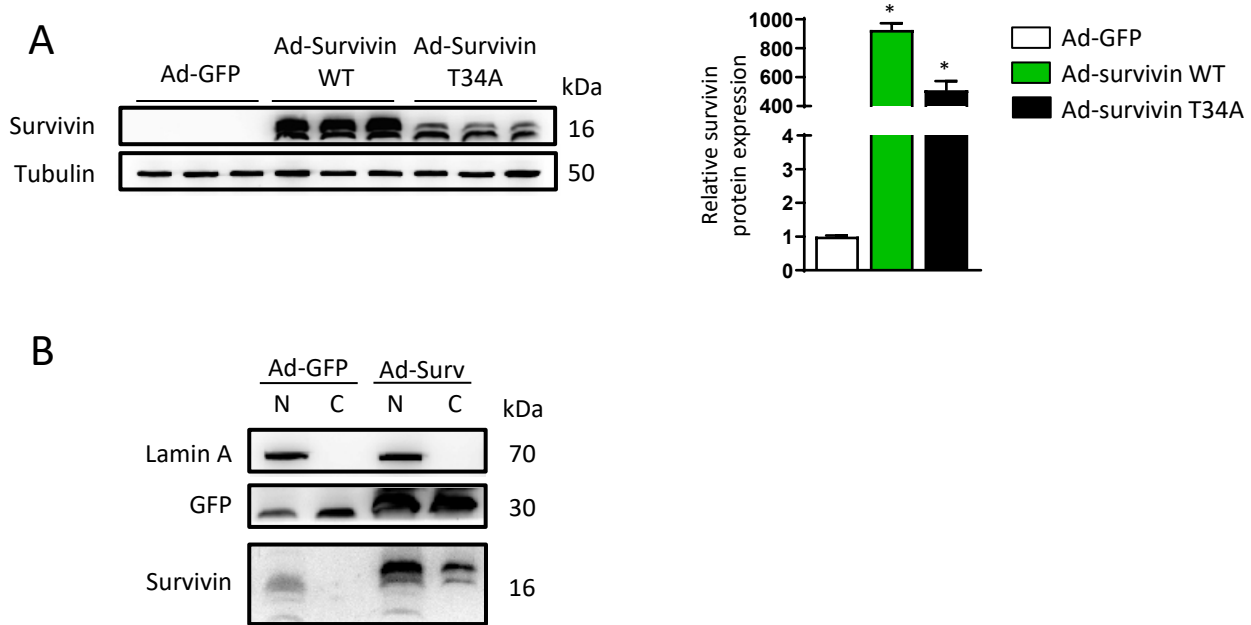
3. P. Tiwari, A. Blank, C. Cui, K.Q. Schoenfelt, G. Zhou, Y. Xu, G. Khramtsova, F. Olopade, A.M. Shah, S.A. Khan, M.R. Rosner, L. Becker, Metabolically activated adipose tissue macrophages link obesity to triple-negative breast cancer. *J. Exp. Med.* **216**, 1345–1358 (2019)
4. T.H. Mayi, M. Daoudi, B. Derudas, B. Gross, G. Bories, K. Wouters, J. Brozek, R. Caiazzo, V. Raverdi, M. Pigeyre, P. Allavena, A. Mantovani, F. Pattou, B. Staels, G. Chinetti-Gbaguidi, Human adipose tissue macrophages display activation of cancer-related pathways. *J. Biol. Chem.* **287**, 21904–21913 (2012)
5. M.N. Helder, M. Knippenberg, J. Klein-Nulend, P.I.J.M. Wuisman, Stem cells from adipose tissue allow challenging new concepts for regenerative medicine. *Tissue Eng.* **13**, 1799–1808 (2007)
6. J.M. Gimble, A.J. Katz, B.A. Bunnell, Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ. Res.* **11**, 1249–1260 (2007)
7. S. Guo, C.X. Deng, Effect of stromal cells in tumor microenvironment on metastasis initiation. *Int. J. Biol. Sci.* **14**, 2083–2093 (2018)
8. W. Li, H. Xu, C. Qian, c-Kit-positive adipose tissue-derived mesenchymal stem cells promote the growth and angiogenesis of breast cancer. *Biomed. Res. Int.* **2017**, 7407168 (2017)
9. S. Salha, S. Gehmert, V. Brébant, A. Anker, M. Loibl, L. Prantl, S. Gehmert, PDGF regulated migration of mesenchymal stem cells towards malignancy acts via the PI3K signaling pathway. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **70**, 543–551 (2018)
10. A.L. Strong, A.C. Bowles, C.P. MacCrimmon, T.P. Frazier, S.J. Lee, X. Wu, A.J. Katz, B. Gawronska-Kozak, B.A. Bunnell, J.M. Gimble, Adipose stromal cells repair pressure ulcers in both young and elderly mice: Potential role of adipogenesis in skin repair. *Stem Cells Transl. Med.* **4**, 632–642 (2015)
11. P. Gentile, S. Garcovich, Concise review: Adipose-derived stem cells (ASCs) and adipocyte-secreted exosomal microRNA (A-SE-miR) modulate cancer growth and promote wound repair. *J. Clin. Med.* **8**, E855 (2019)
12. M.G. Scioli, G. Storti, F. D'amico, P. Gentile, B.S. Kim, V. Cervelli, A. Orlandi, Adipose-derived stem cells in cancer progression: New perspectives and opportunities. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, E3296 (2019)
13. B. Ameth, Tumor microenvironment. *Med.* **56**, 15 (2019)
14. E. Lengyel, L. Makowski, J. DiGiovanni, M.G. Kolonin, Cancer as a matter of fat: The crosstalk between adipose tissue and tumors. *Trends Cancer* **4**, 374–384 (2018)
15. K. Zhou, T. Cheng, J. Zhan, X. Peng, Y. Zhang, J. Wen, X. Chen, M. Ying, Targeting tumor-associated macrophages in the tumor microenvironment (review). *Oncol. Lett.* **20**, 1 (2020)
16. P. Allavena, A. Sica, G. Solinas, C. Porta, A. Mantovani, The inflammatory micro-environment in tumor progression: The role of tumor-associated macrophages. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **66**, 1–9 (2008)
17. A.M. Santander, O. Lopez-Ocejo, O. Casas, T. Agostini, L. Sanchez, E. Lamas-Basulto, R. Carrio, M.P. Cleary, R.R. Gonzalez-Perez, M. Torroella-Kouri, Paracrine interactions between adipocytes and tumor cells recruit and modify macrophages to the mammary tumor microenvironment: The role of obesity and inflammation in breast adipose tissue. *Cancers (Basel)* **7**(143–178), 143–178 (2015)
18. X. Zhao, J. Qu, Y. Sun, J. Wang, X. Liu, F. Wang, H. Zhang, W. Wang, X. Ma, X. Gao, S. Zhang, Prognostic significance of tumor-associated macrophages in breast cancer: A meta-analysis of the literature. *Oncotarget* **8**, 30576–30586 (2017)
19. E. Bolli, K. Movahedi, D. Laoui, J.A. Van Ginderachter, Novel insights in the regulation and function of macrophages in the tumor microenvironment. *Curr. Opin. Oncol.* **29**, 55–61 (2017)
20. K. Movahedi, J.A. Van Ginderachter, The ontogeny and microenvironmental regulation of tumor-associated macrophages. *Antioxid. Redox Signal* **25**, 775–791 (2016)
21. Y. Na, S. Je, S. Seok, Metabolic features of macrophages in inflammatory diseases and cancer. *Cancer Lett.* **413**, 46–58 (2018)
22. S. Malekghasemi, J. Majidi, A. Baghbanzadeh, J. Abdolalizadeh, B. Baradaran, L. Aghebati-Maleki, Tumor-associated macrophages: Protumoral macrophages in inflammatory tumor microenvironment. *Adv. Pharm. Bull.* **10**, 556–565 (2020)
23. Q. Shang, Y. Bai, G. Wang, Q. Song, C. Guo, L. Zhang, Q. Wang, Delivery of adipose-derived stem cells attenuates adipose tissue inflammation and insulin resistance in obese mice through remodeling macrophage phenotypes. *Stem Cells Dev.* **24**, 2052–2064 (2015)
24. C. Lo Sicco, D. Reverberi, C. Balbi, V. Ulivi, E. Principi, L. Pascucci, P. Becherini, M.C. Bosco, L. Varesio, C. Franzin, M. Pozzobon, R. Cancedda, R. Tasso, Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles as mediators of anti-inflammatory effects: Endorsement of macrophage polarization. *Stem Cells Transl. Med.* **6**, 1018–1028 (2017)
25. A. L. Strong, T. A. Strong, L. V Rhodes, J. A. Semon, X. Zhang, Z. Shi, S. Zhang, J. M. Gimble, M. E. Burow, and B. A. Bunnell, Obesity associated alterations in the biology of adipose stem cells mediate enhanced tumorigenesis by estrogen dependent pathways. *Breast Cancer Res.* **15**, R102 (2013), R102
26. L.E. Hillers, J.V. D'Amato, T. Chamberlin, G. Paderta, L.M. Arendt, Obesity-activated adipose-derived stromal cells promote breast cancer growth and invasion. *Neoplasia* **20**, 1161–1174 (2018)
27. G. Pachón-Peña, C. Serena, M. Ejarque, J. Petriz, X. Duran, W. Oliva-Olivera, R. Simó, F.J. Tinahones, S. Fernández-Veledo, J. Vendrell, Obesity determines the immunophenotypic profile and functional characteristics of human mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Stem Cells Transl. Med.* **5**, 464–475 (2016)
28. C. Serena, N. Keiran, V. Ceperuelo-Mallafre, M. Ejarque, R. Fradera, K. Roche, C. Nuñez-Roa, J. Vendrell, S. Fernández-Veledo, Obesity and type 2 diabetes alters the immune properties of human adipose derived stem cells. *Stem Cells* **34**, 2559–2573 (2016)
29. M. Ejarque, V. Ceperuelo-Mallafre, C. Serena, G. Pachón, Y. Núñez-Álvarez, M. Terrón-Puig, E. Calvo, C. Núñez-Roa, W. Oliva-Olivera, F.J. Tinahones, M.A. Peinado, J. Vendrell, S. Fernández-Veledo, Survivin, a key player in cancer progression, increases in obesity and protects adipose tissue stem cells from apoptosis. *Cell. Death Dis.* **8**, e2802 (2017)
30. X. Chen, N. Duan, C. Zhang, W. Zhang, Survivin and tumorigenesis: Molecular mechanisms and therapeutic strategies. *J. Cancer* **7**, 314–323 (2016)
31. G. Ambrosini, C. Adida, D.C. Altieri, A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat. Med.* **3**, 917–921 (1997)
32. J. Chen, W. Wu, S.K. Tahir, P.E. Kroeger, S.H. Rosenberg, L.M. Cowsert, F. Bennett, S. Krajewski, M. Krajewska, K. Welsh, J.C. Reed, S.-C. Ng, Down-regulation of survivin by antisense oligonucleotides increases apoptosis, inhibits cytokinesis and anchorage-independent growth. *Neoplasia* **2**, 235–241 (2000)
33. F. Li, E.J. Ackermann, C.F. Bennett, A.L. Rothmel, J. Plescia, S. Tognin, A. Villa, P.C. Marchisio, D.C. Altieri, Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nat. Cell. Biol.* **1**, 461–466 (1999)
34. A. Temme, P. Diestelkoetter-Bachert, M. Schmitz, A. Morgenroth, B. Weigle, M.A. Rieger, A. Kiessling, E.P. Rieber, Increased p21ras activity in human fibroblasts transduced with survivin enhances cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **327**, 765–773 (2005)
35. C. Adida, P.L. Crotty, J. McGrath, D. Berrebi, J. Diebold, D.C. Altieri, Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *Am. J. Pathol.* **152**, 43–49 (1998)

36. S. Fukuda, L.M. Pelus, Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol. Cancer Ther.* **5**, 1087–1098 (2006)
37. S. Gurbuxani, Y. Xu, G. Keerthivasan, A. Wickrema, J.D. Crispino, Differential requirements for survivin in hematopoietic cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 11480–11485 (2005)
38. C.G. Leung, Y. Xu, B. Mularski, H. Liu, S. Gurbuxani, J.D. Crispino, Requirements for survivin in terminal differentiation of erythroid cells and maintenance of hematopoietic stem and progenitor cells. *J. Exp. Med.* **204**, 1603–1611 (2007)
39. O.P. Blanc-Brude, E. Teissier, Y. Castier, G. Lesèche, A.-P. Bijmens, M. Daemen, B. Staels, Z. Mallat, A. Tedgui, IAP Survivin regulates atherosclerotic macrophage survival. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 901–907 (2007)
40. S. Kalla Singh, D. Moretta, F. Almaguel, N.R. Wall, M. De León, D. De León, Differential effect of proIGF-II and IGF-II on resveratrol induced cell death by regulating survivin cellular localization and mitochondrial depolarization in breast cancer cells. *Growth Factors* **25**, 363–372 (2007)
41. S.M. Hartig, Basic image analysis and manipulation in imageJ. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **102**, 14.15.1–14.15.12 (2013)
42. S. Khan, J.M.S. Jutzy, J.R. Aspe, D.W. McGregor, J.W. Neidigh, N.R. Wall, Survivin is released from cancer cells via exosomes. *Apoptosis* **16**, 1–12 (2011)
43. P.M. Galbo, M.J. Ciesielski, S. Figel, O. Maguire, J. Qiu, L. Wiltsie, H. Minderman, R.A. Fenstermaker, Circulating CD9+/GFAP+/survivin+ exosomes in malignant glioma patients following survivin vaccination. *Oncotarget* **8**, 114722–114735 (2017)
44. K. Dallaglio, A. Marconi, C. Pincelli, Survivin: A dual player in healthy and diseased skin. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 18–27 (2012)
45. C.H.A. Cheung, C.-C. Huang, F.-Y. Tsai, J.Y.-C. Lee, S.M. Cheng, Y.-C. Chang, Y.-C. Huang, S.-H. Chen, J.-Y. Chang, Survivin - biology and potential as a therapeutic target in oncology. *Onco. Targets Ther.* **6**, 1453–1462 (2013)
46. M. Mesri, N.R. Wall, J. Li, R.W. Kim, D.C. Altieri, Cancer gene therapy using survivin mutant adenovirus. *J. Clin. Invest.* **108**, 981–990 (2001)
47. L. Cassetta, S. Fragkogianni, A.H. Sims, A. Swierczak, L.M. Forrester, H. Zhang, D.Y.H. Soong, T. Cotechini, P. Anur, E.Y. Lin, A. Fidanza, M. Lopez-Yrigoyen, M.R. Millar, A. Urman, Z. Ai, P.T. Spellman, E.S. Hwang, J.M. Dixon, L. Wiechmann, L.M. Coussens, H.O. Smith, J.W. Pollard, Human tumor-associated macrophage and monocyte transcriptional landscapes reveal cancer-specific reprogramming, biomarkers, and therapeutic targets. *Cancer Cell* **35**, 588–602.e10 (2019)
48. L.-L. Huang, H.H.-X. Xia, S.-L. Zhu, Ascitic fluid analysis in the differential diagnosis of ascites: Focus on cirrhotic ascites. *J. Clin. Transl. Hepatol.* **2**, 58 (2014)
49. K. Takaishi, Y. Komohara, H. Tashiro, H. Ohtake, T. Nakagawa, H. Katabuchi, M. Takeya, Involvement of M2-polarized macrophages in the ascites from advanced epithelial ovarian carcinoma in tumor progression via Stat3 activation. *Cancer Sci.* **101**, 2128–2136 (2010)
50. Y. Wang, N. Zhu, C. Zhang, Y. Wang, H. Wu, Q. Li, K. Du, D. Liao, L. Qin, Friend or foe: Multiple roles of adipose tissue in cancer formation and progression. *J. Cell. Physiol.* **234**, 21436–21449 (2019)
51. J. Zhang, E. Nuebel, G.Q. Daley, C.M. Koehler, M.A. Teitell, Metabolic regulation in pluripotent stem cells during reprogramming and self-renewal. *Cell. Stem Cell.* **11**, 589–595 (2012)
52. S.M. Louie, L.S. Roberts, D.K. Nomura, Mechanisms linking obesity and cancer. *Biochim. Biophys. Acta.- Mol. Cell. Biol. Lipids* **1831**, 1499–1508 (2013)
53. I. Larionova, N. Cherdyntseva, T. Liu, M. Patysheva, M. Rakina, J. Kzhyshkowska, Interaction of tumor-associated macrophages and cancer chemotherapy. *Oncoimmunology* **8**, e1596004 (2019)
54. D.H. Madsen, H.J. Jürgensen, M.S. Siersbæk, D.E. Kuczek, L. Grey Cloud, S. Liu, N. Behrendt, L. Grøntved, R. Weigert, T.H. Bugge, Tumor-associated macrophages derived from circulating inflammatory monocytes degrade collagen through cellular uptake. *Cell. Rep.* **21**, 3662–3671 (2017)
55. J.G. Quatromoni, E. Eruslanov, Tumor-associated macrophages: Function, phenotype, and link to prognosis in human lung cancer. *Am. J. Transl. Res.* **4**, 376–389 (2012)
56. L. Yang, Y. Zhang, Tumor-associated macrophages: From basic research to clinical application. *J. Hematol. Oncol.* **10**, 58 (2017)
57. D.C. Altieri, Targeting survivin in cancer. *Cancer Lett.* **332**, 225–228 (2013)
58. P.K. Jaiswal, A. Goel, R.D. Mittal, Survivin: A molecular biomarker in cancer. *Indian J. Med. Res.* **141**, 389–397 (2015)
59. S. Khan, J.R. Aspe, M.G. Asumen, F. Almaguel, O. Odumosu, S. Acevedo-Martinez, M. De Leon, W.H.R. Langridge, N.R. Wall, Extracellular, cell-permeable survivin inhibits apoptosis while promoting proliferative and metastatic potential. *Br. J. Cancer* **100**, 1073–1086 (2009)
60. S. Mera, M. Magnusson, A. Tarkowski, M. Bokarewa, Extracellular survivin up-regulates adhesion molecules on the surface of leukocytes changing their reactivity pattern. *J. Leukoc. Biol.* **83**, 149–155 (2008)
61. K.V. Bankaitis, B. Fingleton, Targeting IL4/IL4R for the treatment of epithelial cancer metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* **32**, 847–856 (2015)
62. A.B. Di Stefano, F. Iovino, Y. Lombardo, V. Eterno, T. Höger, F. Dieli, G. Stassi, M. Todaro, Survivin is regulated by interleukin-4 in colon cancer stem cells. *J. Cell. Physiol.* **225**, 555–561 (2010)
63. P.S. Bernardo, L.G.T. Lemos, G.N. de Moraes, R.C. Maia, Unraveling survivin expression in chronic myeloid leukemia: Molecular interactions and clinical implications. *Blood Rev.* **43**, 100671 (2020)
64. J.R. Aspe, N.R. Wall, Survivin-T34A: Molecular mechanism and therapeutic potential. *Onco. Targets Ther.* **3**, 247–254 (2010)
65. N.R. Wall, D.S. O'Connor, J. Plescia, Y. Pommier, D.C. Altieri, Suppression of survivin phosphorylation on Thr34 by flavopiridol enhances tumor cell apoptosis. *Cancer Res.* **63**, 230–235 (2003)
66. B. Benner, L. Scarberry, L.P. Suarez-Kelly, M.C. Duggan, A.R. Campbell, E. Smith, G. Lapurga, K. Jiang, J.P. Butchar, S. Tridandapani, J.H. Howard, R.A. Baiocchi, T.A. Mace, W.E. Carson, Generation of monocyte-derived tumor-associated macrophages using tumor-conditioned media provides a novel method to study tumor-associated macrophages in vitro. *J. Immunother. Cancer* **7**, 140 (2019)

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Supplementary Figure 1





Supplementary Figure 2. THP1-derived macrophages infected with a recombinant adenovirus expressing GFP (ad-GFP), wild-type survivin (WT) or mutated survivin (T34A).

A Survivin protein expression. N=3: * $p < 0.05$ versus ad-GFP. Tubulin was used as a loading control.

B GFP and survivin protein expression. Lamin A was used as nucleus marker.

Supplementary Table 1. Human gene expression Taqman probes. Results were calculated using the comparative Ct method and expressed relative to the expression of the housekeeping gene 18S.

Detector	Taqman probes	Gene probes
BIRC5 (survivin)	Hs04194392_s1	Baculoviral IAP Repeat Containing 5
Immune regulators		
IL1b	Hs01555410_m1	Interleukin 1 Beta
IL6	Hs00985639_m1	Interleukin 6
TNF- α	Hs00174128_m1	Tumor necrosis factor alpha
CCL2	Hs00234140_m1	C-C Motif Chemokine Ligand 2
CCL3	Hs00234142_m1	C-C Motif Chemokine Ligand 3
IL10	Hs00961622_m1	Interleukin 10
PPAR γ	Hs01115513_m1	Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma
KLF4	Hs00358836_m1	Kruppel-like factor
Tumor associated macrophages membrane receptors		
CD14	Hs02621496_s1	CD14
CD68	Hs02836816_g1	CD68
CD11b	Hs00167304_m1	Integrin Subunit Alpha M
CX3CR1	Hs01922583_s1	C-X3-C Motif Chemokine Receptor 1
CD45	Hs04189704_m1	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
Invasiveness		
MMP2	Hs01548727_m1	Matrix Metalloproteinase-2
MMP9	Hs00234579_m1	Matrix Metalloproteinase-9
TLR2	Hs01872448_s1	Toll Like Receptor 2
TLR4	Hs00152939_m1	Toll Like Receptor 4
VIM	Hs00958111_m1	Vimentin
FN1	Hs01549976_m1	Fibronectin
CDH1	Hs01023895_m1	Cadherin 1
ANGPTL4	Hs01101123_g1	Angiopoietin Like 4
VEGFa	Hs00900054_m1	Vascular Endothelial Growth Factor A
HIF-1 α	Hs00153153_m1	Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha
TGF- β 1	Hs00998133_m1	Transforming Growth Factor Beta 1
EGF	Hs01099990_m1	Epidermal Growth Factor
CASP1	Hs00354836_m1	Caspase 1
Housekeeping		
18S rRNA	Hs03928985_g1	18S ribosomal RNA

ESTUDI 2

Survivin/BIRC5 as a novel molecular effector at the crossroads of glucose metabolism and radioresistance in head and neck squamous cell carcinoma

Benaiges E; Ceperuelo-Mallafré V; Guaita S; Maymó-Masip E; Madeira A; Gómez D; Hernández V; Vilaseca I; Merma C; León X; Terra X; Vendrell J; Avilés-Jurado FX; Fernández-Veledo S.

Enviat a JAMA Otolaryngology-Head & Neck Surgery. Referència OTO23-0084

Resum:

Importància: La reprogramació metabòlica i el metabolisme anormal de la glucosa són característiques distintives del carcinoma de cèl·lules escamoses de cap i coll (CCC). Hi ha oncogenes que poden actuar com a iniciadors de canvis metabòlics relacionats amb el càncer, però és essencial una comprensió completa de la seva interacció en la biologia i el tractament del CCC per tal d'identificar biomarcadors predictius i dissenyar teràpies específiques i menys tòxiques.

Objectiu: Explorar la importància del proto-oncogen survivina/BIRC5 com a factor de radioresistència potencialment modulada per la glucosa per a predir la sensibilitat terapèutica i el pronòstic del CCC. Explorar la implicació de la survivina/BIRC5 en la progressió, resposta al tractament i estat metabòlic en una cohort de pacients amb CCC, i avaluar el seu paper com a factor de radioresistència potencialment modulada pels nivells de glucosa *in vitro*.

Disseny: Aquest estudi prospectiu examina la relació entre la survivina/BIRC5 i el pronòstic del CCC tant clínicament com *in vitro*.

Participants: Trenta-dos pacients amb CCC patològicament confirmat i no tractat.

Resultats: Vam trobar que l'expressió tumoral de *BIRC5*, que s'associa amb els nivells de glucosa sèrica, prediu la supervivència sense malaltia locoregional. També vam determinar un valor de tall òptim, i els nivells inferiors d'aquest punt d'ARNm de *BIRC5* estaven associats amb millors resultats. A més, vam demostrar *in vitro* que la regulació transcripcional de *BIRC5* a cèl·lules de CCC per la radiació depèn dels nivells de glucosa i provoca un fenotip protumoral i radioresistent a les cèl·lules supervivents.

Conclusions i rellevància: Els nostres resultats suggereixen que la survivina/BIRC5 podria estar associada de manera independent amb el risc de recurrència en pacients amb CCC. Es necessitarien més estudis per poder avaluar el potencial paper de la survivina/BIRC5 com a mediador de la reprogramació metabòlica com a nova diana terapèutica per millorar la resposta al tractament en pacients amb CCC.

Detailed Manuscript Information

Manuscript #	OTO23-0084
Title	Survivin/BIRC5 as a novel molecular effector at the crossroads of glucose metabolism and radioresistance in head and neck squamous cell carcinoma
Manuscript Type	Original Investigation
Study Type	Diagnostic/Prognostic Study
Theme Issue	N/A
Corresponding Author	Sonia Fernández-Veledo (Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili)
Coauthors	Ester Benaiges , Victoria Ceperuelo-Mallafre , Sandra Guaita , Elsa Maymó-Masip , Ana Madeira , David Gómez , Victor Hernández , Isabel Vilaseca , Carla Merma , Xavier León , Ximena Terra , Joan Vendrell , Francesc Xavier Avilés-Jurado , Sonia Fernández-Veledo (corr_auth)
Visual Abstract Required?	
Abstract	<p>Importance: Metabolic reprogramming and abnormal glucose metabolism is a hallmark of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). Certain oncogenes can act as drivers of cancer-related metabolic changes, but a comprehensive understanding of their crosstalk in HNSCC biology and treatment is essential to identify predictive biomarkers and design specific and less toxic therapies.</p> <p>Objective: To explore the value of the proto-oncogene survivin/BIRC5 as a radioresistance factor potentially modulated by glucose for predicting therapeutic sensitivity and prognosis of HNSCC.</p> <p>Design: This prospective study examines the link between survivin/BIRC5 and HNSCC prognosis both clinically and in vitro.</p> <p>Setting: Referral oncology center</p> <p>Participants: Thirty-two consecutive patients with pathologically confirmed, untreated HNSCC.</p> <p>Main Outcome(s) and Measure(s): To explore the involvement of survivin/BIRC5 in the progression, treatment response, and metabolic status in a cohort of patients with HNSCC, and to assess its role as a radioresistance factor potentially modulated by glucose levels in vitro.</p> <p>Results: We found that tumoral BIRC5 expression, which is associated with serum glucose levels, predicts locoregional disease-free survival. We also determined an optimal cut-off value and lower BIRC5 mRNA levels associated with better outcomes. Additionally, we demonstrate in vitro that the transcriptional upregulation of BIRC5 in HNSCC cells by radiation is dependent on glucose levels and provokes a pro-tumoral and radioresistant phenotype in surviving cells.</p> <p>Conclusions and Relevance: Our results suggest that survivin/BIRC5 might be independently associated with the risk of recurrence in patients with HNSCC. The potential role</p>

	of survivin/BIRC5 as a mediator of metabolic reprogramming should be further evaluated as a novel therapeutic target to improve the treatment response in patients with HNSCC.
Network Referral	No
Reviewing Editor	N/A
Subject Areas	Primary Subject Area: Oncology/Head and neck cancer Secondary Subject Areas: Oncology/Tumor biology, General otolaryngology-head and neck surgery/Pathology of head and neck, Oncology/Endocrine disease of head and neck
Conflicts of Interest	No, the author(s) have no potential conflicts of interest to disclose
Funding Organization(s) and Funding Support	MEC Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) ✓ : Francesc Xavier Avilés-Jurado FIS PI15/02047 MEC Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) ✓ : Isabel Vilaseca FIS PI18/0844 MEC Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) ✓ : Xavier León FIS PI19/01661 Fundación Científica Asociación Española Contra el Cáncer (AECC) ✓ : Francesc Xavier Avilés-Jurado LABAE18025AVIL Universitat Rovira i Virgili (Rovira i Virgili University) ✓ : Ester Benaiges PMF-PIPF-SGR-2019 Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) ✓ : Victoria Ceperuelo-Mallafre RYC2019-02649-I MEC Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) ✓ : Sonia Fernández-Veledo CP116/00008 MEC Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) ✓ : Victoria Ceperuelo-Mallafre FIS PI20/00095 MEC Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) ✓ : Joan Vendrell FIS PI20/00338 Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) ✓ : Sonia Fernández-Veledo PID2021-122480OB-100
Data Sharing Statement	View Data Sharing Statement Response

Survivin/BIRC5 as a novel molecular effector at the crossroads of glucose metabolism and radioresistance in head and neck squamous cell carcinoma

Ester Benaiges, MS^{1,2,3,*}; Victòria Ceperuelo-Mallafre, PhD^{1,2,3,*}; Sandra Guaita, PhD^{3,4}; Elsa Maymó-Masip, PhD^{1,2}; Ana Madeira, PhD^{1,2}; David Gómez, MD, PhD⁵; Victor Hernández, MD, PhD⁵; Isabel Vilaseca, MD, PhD⁶; Carla Merma, MD, PhD^{3,7,8}; Xavier León, MD, PhD^{9,10}; Ximena Terra, PhD¹¹; Joan Vendrell, MD, PhD^{1,2,3}; Francesc Xavier Avilés-Jurado, MD, PhD^{2,3,7,8,†}; Sonia Fernández-Veledo, PhD^{1,2,†}

¹Department of Endocrinology and Nutrition, Research Unit, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV) – Diabetes and Metabolic Associated Diseases Research Group - Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, 43005, Tarragona, Spain.

²CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM) - Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), 28029, Madrid, Spain.

³Department of Medicine and Surgery, Universitat Rovira i Virgili (URV), 43201, Reus, Spain.

⁴ Vascular Medicine and Metabolism Unit, Research Unit on Lipids and Atherosclerosis, Hospital Universitari Sant Joan, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, 43201, Reus, Spain

⁵ Department of Radiation Oncology – Radiotherapeutic Oncology Research Group, IISPV - Hospital Universitari Sant Joan, IISPV, 43201, Reus, Spain

⁶ Functional Unit of Head and Neck Tumors, Hospital Clínic, Barcelona, Spain; Otorhinolaryngology Department, Hospital Clínic, Barcelona, Spain; Surgery and Medical-Surgical Specialties Department, Faculty of Medicine and Health Sciences, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; Translational Genomics and Target Therapies in Solid Tumors Group, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, IDIBAPS, Barcelona, Spain; Head Neck Clínic, Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca, AGAUR 2017-SGR-01581, Barcelona, Spain

⁷ Otorhinolaryngology Department. Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, 43005, Tarragona, Spain

⁸ Research group in head Neck Oncology - Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), 43005, Tarragona, Spain.

⁹ Otorhinolaryngology Head-Neck Surgery Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN, MICINN, ISCIII), Universitat Autònoma de Barcelona, 08041 Barcelona, Spain.

¹⁰ UVIC-Universitat Central de Catalunya, Vic, Spain.

¹¹ MoBioFood Research Group, Biochemistry and Biotechnology Department, Universitat Rovira i Virgili, Campus Sescelades, 43007 Tarragona, Spain.

*These two authors contributed equally to this work

† Senior and Corresponding authors. sonia.fernandez@iispv.cat (S.F.-V.); faviles.hj23.ics@gencat.cat (F.X.A.-J.)

Complete contact information for corresponding authors: Unitat de Recerca, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, C/Mallafré Guasch 4, 43007 Tarragona, Spain.

Manuscript word count: 3540

KEY POINTS

Question: Does survivin/BIRC5 play a role in glucose metabolic reprogramming and treatment response in head and neck squamous cell carcinoma?

Findings: In a prospective study of 32 patients with HNSCC, elevated tumoral expression of *BIRC5* was significantly associated with greater serum glucose levels, a higher expression of genes related to glucose metabolism, and with advanced tumor stage and poor patient outcome. Surviving cells after irradiation showed greater expression of *BIRC5* in a radiation- and glucose-dependent manner, which was related to changes in the pro-tumoral phenotype and to the sensitivity to radiotherapy and a cytotoxic agent.

Meaning: This study suggests that the proto-oncogene survivin/BIRC5, which is potentially involved in metabolic reprogramming, is an independent prediction factor of disease recurrence in patients with HNSCC.

ABSTRACT

Importance: Metabolic reprogramming and abnormal glucose metabolism is a hallmark of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). Certain oncogenes can act as drivers of cancer-related metabolic changes, but a comprehensive understanding of their crosstalk in HNSCC biology and treatment is essential to identify predictive biomarkers and design specific and less toxic therapies.

Objective: To explore the value of the proto-oncogene survivin/BIRC5 as a radioresistance factor potentially modulated by glucose for predicting therapeutic sensitivity and prognosis of HNSCC.

Design: This prospective study examines the link between survivin/BIRC5 and HNSCC prognosis both clinically and *in vitro*.

Setting: Referral oncology center

Participants: Thirty-two consecutive patients with pathologically confirmed, untreated HNSCC.

Main Outcome(s) and Measure(s): To explore the involvement of survivin/BIRC5 in the progression, treatment response, and metabolic status in a cohort of patients with HNSCC, and to assess its role as a radioresistance factor potentially modulated by glucose levels *in vitro*.

Results: We found that tumoral *BIRC5* expression, which is associated with serum glucose levels, predicts locoregional disease-free survival. We also determined an optimal cut-off value and lower *BIRC5* mRNA levels associated with better outcomes. Additionally, we demonstrate *in vitro* that the transcriptional upregulation of *BIRC5* in HNSCC cells by radiation is dependent on glucose levels and provokes a pro-tumoral and radioresistant phenotype in surviving cells.

Conclusions and Relevance: Our results suggest that survivin/BIRC5 might be independently associated with the risk of recurrence in patients with HNSCC. The potential role of

survivin/BIRC5 as a mediator of metabolic reprogramming should be further evaluated as a novel therapeutic target to improve the treatment response in patients with HNSCC.

INTRODUCTION

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) accounts for ~4% of all cancers worldwide and is the sixth most common malignancy. Approximately half of all patients with HNSCC have advanced-stage disease at the time of diagnosis, and have an expected 5-year survival rate of ~50%¹. Despite current treatments, which may consist of a combination of mutilating surgery, radiotherapy, and/or chemotherapy, overall long-term survival remains low due to disease persistence or recurrence. The low survival rate of patients with locoregional and distant recurrences drives the need for new clinical tools for diagnosis and treatment. Prognostic factors that can efficiently predict the outcome after treatment are not yet available². The identification of a specific deregulated gene/protein network—for example a metabolic pathway—may provide tools for early detection, for therapeutic intervention, or for monitoring HNSCC disease progression. It could also be used to explore disease mechanisms and to develop personalized treatments that maximize survival while minimizing morbidity.

Glucose metabolic reprogramming is a hallmark of tumor progression and treatment resistance^{3,4}. In the context of HNSCC, hyperglycemia has been reported to promote pro-tumoral phenotypes and chemoresistance⁵, to increase lactate production, leading to an acidification of the tumor microenvironment^{6,7}, and to reduce patient survival rates^{8,9}. Although tumorigenesis has historically been viewed as a disorder of proliferation, accumulating evidence indicates that it can also be considered as a metabolic disease¹⁰. Indeed, many oncogenes and tumor suppressors are known play key roles in the cancer-associated changes in metabolism. In this context, survivin, encoded by *BIRC5* (Baculoviral IAP Repeat Containing 5) gene, a proto-oncogene associated with both inhibition of apoptosis and activation of cell proliferation^{11,12}, has been proposed as a diagnostic tumor marker because of its elevated expression in tumoral tissues^{13,14}. It is unclear, however, whether there is a relationship between survivin/*BIRC5* and glucose metabolism. Some studies have reported that survivin/*BIRC5* is regulated by glucose in mature adipocytes¹⁵ and in neuroblastoma¹⁶. It also appears necessary for glucose uptake and for restoring normal metabolism in CD4+T cells¹⁷, and it also suppresses mitochondrial oxidative phosphorylation and enhances glycolysis in cancer cells¹⁸. In the context of HNSCC, survivin/*BIRC5* has been proposed as a predictive factor of tumor progression^{19–22}, and as a potential therapeutic target²³. By

contrast, its relationship with radioresponse is more controversial²⁴⁻²⁶. It has been previously described that hyperglycemia might induce tumor resistance to chemotherapy²⁷; however, whether this could also apply in the context of radiotherapy is unknown. In the present study, we aimed to explore the involvement of survivin/BIRC5 in the progression, treatment and metabolic status of patients with HNSCC. Additionally, we investigated survivin/BIRC5 as a radioresistance factor potentially modulated by glucose.

MATERIALS AND METHODS

Study design and patients

Thirty-two consecutive patients with pathologically-confirmed HNSCC including patients with untreated advanced tumors (stage III–IV) from the Hospital Universitari Joan XXIII, Tarragona, Spain, were included in the study. Tumor boards evaluated all patients, and the decision to treat with radiotherapy, chemoradiotherapy or surgery was made according to the standard protocols and guidelines of the hospital. In general, the patients were treated with chemoradiotherapy. Human papillomavirus (HPV) status was available for those patients that presented with an oropharyngeal carcinoma (n=5). HPV status was detected by a multiplex polymerase chain reaction assay.

Regarding treatment, external-beam radiotherapy was administered by continuous-course radiotherapy five days a week, using 2 Gy per session in normo-fractionated treatments, and using 1.2 Gy twice daily in hyper-fractionated treatments. Treatment was administered in a total dose of 65 to 74 Gy to the primary site, 50 Gy to the neck in all patients with N0 node, and 70 Gy to the neck in patients with clinical metastatic neck nodes (N+). Chemoradiotherapy consisted of radiotherapy at the same doses plus 3 cycles of cisplatin at a dose of 100 mg/m² on day 1 every 3 weeks.

Routine follow-up was done at 2-month intervals during the first year, 3-month intervals in the second year, and 4-month intervals over years 3–5, consisting of an evaluation of symptoms and locoregional examinations. The mean follow-up of the patients included in the study was 43.6 months (SD 34.8, median 35.9).

The research study was reviewed and approved by the Institutional Review Board (code 15/04057). The investigation conformed to the principles outlined in the Declaration of Helsinki, and all patients gave written informed consent. Peripheral blood was collected from all patients at the diagnostic visit after an overnight fast, before any treatment was instituted. Blood was drawn in 10-mL vacutainer tubes from an antecubital vein. Plasma was separated within 1 hour of drawing (1500 × g for 15 minutes at 4°C) and samples were stored at -80°C until analytical measurements were performed.

Cell culture and treatments

The human Pharynx Squamous Cell Carcinoma (FaDu) cell line was purchased from the ATCC (Rockville, MD). Cells were routinely maintained in glucose-free Dubelcco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (11966-025, Gibco; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin, 0.1 mM non-essential amino acids, 1 mM sodium pyruvate and three distinct glucose concentrations (3.5, 6 and 10 mM). To obtain each working concentration, filtered glucose was added to culture media. Once FaDu cells reached 80% confluence, they were treated with 3 Gy radiation every 2–3 days in a medical linear accelerator (Varian 2100 CD; Varian Medical Systems Inc., Palo Alto, CA) until an accumulative dose of 60 Gy (after 20 cycles) had been delivered.

Gene expression analysis

Tissue specimens were taken from the primary site, and adjacent and distal to the tumor. Adjacent mucosa was macroscopically healthy tissue taken 1-cm from the tumor lesion. Part of the sample was used for the pathologic diagnosis of the malignancy, and another part was immediately stabilized by inclusion in RNAlater preservative (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and stored at -80°C until processing. Total RNA was isolated from 30 mg of tissue using the RNeasy Mini Kit (Qiagen).

For cell culture experiments, RNA was extracted from FaDu cells using TRI Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH). Quantification of nucleic acid was performed at 260 nm and purity was assessed using the OD260/OD280 ratio. cDNA was prepared by reverse transcribing 2 µg RNA from tissue samples and 1 µg RNA from cell samples using the High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Quantitative real-time PCR was performed in duplicate on a 7900 HT Fast Real-Time PCR platform using commercial TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) (Supplementary Table 1). Cycle threshold (Ct) values for each sample were normalized against the reference gene *RPLP0* (Hs99999902_m1) in tissue samples and against *18S* (Hs03928985_g1) in cell samples. Results were calculated using

the comparative Ct method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) and expressed relative to a calibrator (a mix of 9 samples from normal, adjacent and tumoral mucosa) in tissue samples, and expressed relative to the control condition set to 1 in cell samples. Two technical duplicates were performed for each biological replicate.

Apoptosis assessment

The Cell Death Detection ELISA Plus kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) was used to evaluate apoptosis. Briefly, FaDu cells were seeded at 10,000/well in a 96-well microplate and were incubated for 48 hours with or without the cytotoxic agent AZD5582 (Ref 5141/10; R&D Systems, Minneapolis, MN) used at a previously reported IC_{50} concentration²⁸. After incubation, cells were lysed in 200 μ l of lysis buffer for 30 minutes at room temperature and centrifuged at $200 \times g$ for 10 minutes. Supernatants were collected and incubated in a streptavidin-coated microplate along with an immunoreagent containing anti-histone-biotin and anti-DNA-peroxidase, for 2 hours. The DNA fragments of histones in the cytoplasm were detected photometrically at a wavelength of 405nm.

Statistical analysis

In vitro experiments were performed three times and pooled for statistical analysis. Data are presented as mean \pm S.E.M. and represent the number of biologically-independent samples. Differences between groups were determined using unpaired Student's t test to compare two groups (two-tailed, 95% confidence interval) and one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's multiple comparisons tests to compare three groups. Analyses were performed using GraphPad Prism 8.0.2 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). A p-value < 0.05 was considered statistically significant. The Chi-squared test was used to analyze the relationship between categorical variables.

In patients, we evaluated the outcome in terms of locoregional control with a follow-up of at least 2 years. Disease-free survival was defined as the period of time from the completion of

the primary treatment of the tumor to any local, regional or distant recurrence. The survivin/*BIRC5* categories were defined according to the control of the disease (local-regional-distant recurrence) using the Classification and Regression Tree (CRT) method. Considering the number of subjects presenting the event, and in order not to incur overfitting errors, two clinically relevant variables were chosen to build the multivariate model (Cox proportional hazards models): the presence of lymph node disease and local extension as well as the profile according to *BIRC5* mRNA levels in the tumor mucosa. The disease-free survival according to the survivin/*BIRC5* profile was calculated using the Kaplan-Meier method. Differences in survival rates were compared using the log-rank test. All statistical analyses were made using SPSS software v. 20.0 (IBM, Madrid, Spain).

RESULTS

Characteristics of the patients included in the study

A total of 32 patients with HNSCC were included in a follow-up prospective study. At the end of the study, 11 patients (34%) presented with locoregional recurrence. The main clinical and pathological characteristics of the patients, as well as the locoregional disease-free survival rate stratified by each variable, are summarized in **Table 1**. HPV status was evaluated in five patients with oropharyngeal carcinoma, of whom four (80%) presented with HPV-negative tumors.

Survivin/BIRC5 is predominantly expressed in tumoral mucosa and positively associates with glucose metabolism in HNSCC

We assessed the gene expression profile of *BIRC5* in tumoral, non-tumoral adjacent tissue and normal mucosa from same patient. Results of the analysis revealed that *BIRC5* mRNA levels were significantly higher in tumoral mucosa than in peri-tumoral and healthy tissue (adjacent and normal mucosa) (**Figure 1A**), with differences between the latter two also significant. We found that high *BIRC5* expression in tumor tissue was associated with high expression in healthy tissue (**Figure 1B**). Further analysis of tumor tissue revealed a positive association between the expression of *BIRC5* and hypoxia-inducible factor 1 alpha (*HIF1A*) (**Figure 1C**), a transcription factor that regulates hypoxic stress and glucose metabolism in tumor tissues and is involved in cancer progression and resistance to chemotherapy and radiotherapy²⁹⁻³¹. Of note, *BIRC5* expression in tumoral tissue positively correlated with the expression of several genes involved in glucose metabolism, including glucose transport (GLUT1 [*SLC2A1*] and GLUT3 [*SLC2A3*]), glycolysis (hexokinase [*HK2*] and phosphofructokinase [*PFK*]), lactate metabolism (lactate dehydrogenase [*LDHA*], monocarboxylate transporters MCT1 [*SCL16A1*] and MCT3 [*SCL16A8*]) and with the tricarboxylic acid cycle (pyruvate dehydrogenase kinase 1 [*PDK1*], pyruvate dehydrogenase catalytic subunit 1 [*PDH*], succinate dehydrogenase A and B [*SDHA* and *SDHB*] and alpha-ketoglutarate dehydrogenase [*OGDH*]) (**Figure 1D**). *BIRC5* expression also positively correlated with serum glucose levels in patients (**Figure 1E**).

Survivin/BIRC5 expression in tumoral mucosa is associated with tumor stage and patient outcome

We next analyzed the expression of *BIRC5* according to tumor stage and to locoregional control. Tumoral *BIRC5* expression was significantly higher in patients with advanced stage disease (stage III–IV) than in patients with early stage disease (I–II) (**Figure 2A**), and was also higher in patients with poor locoregional control (**Figure 2B**). To evaluate the discriminating potential of *BIRC5* expression in tumoral tissue for locoregional disease-free survival, we used the CRT method, which revealed a cut-off value of 2.547 for *BIRC5* for discriminating disease-free survival. Using this method, we generated a categorized variable "profile" that classified the patients according to their expression of *BIRC5* in tumoral tissue (Low *BIRC5* < 2.547; High *BIRC5* > 2.547). Table 2 shows the results of the multivariate analysis study considering disease-free survival as the dependent variable. The survivin/*BIRC5* profile was significantly related to the control of the disease. Considering patients with "Low *BIRC5*" as the reference category, those with "High *BIRC5*" had a greater risk of poor outcome after treatment (**Table 2**) even when the profile was adjusted for nodal disease and T-stage. Specifically, patients with "High *BIRC5*" had a 13 times higher risk of recurrence of the tumor (95% confidence interval [CI]: 2.52–67.3, P=0.002).

We next analyzed the prognosis of locoregional disease-free survival using the Kaplan–Meier method. The locoregional recurrence-free survival curves according to the *BIRC5* expression profile in tumoral tissue are shown in **Figure 2C**. The disease-free survival rate was 72.5% (95% CI: 56.4–88.5%) for patients classified as "Low *BIRC5*", and 30.9% (95% CI: 9.7–52%) for those classified as "High *BIRC5*", indicating a lower locoregional recurrence-free survival rate for the latter patients. We also found significant differences in the disease-free survival as a function of the *BIRC5* profile (P=0.021).

Radiation-induced survivin/BIRC5 expression is dependent on glucose concentration and is associated with a pro-tumoral phenotype

To investigate the role of survivin/BIRC5 in glucose metabolism in the context of radiation response, we cultured the HNSCC cell line FaDu in low (3.5 mM), normal (6 mM) and high (10 mM) levels of glucose and exposed them to a fractionated irradiation cycle of 3 Gy until reaching a total irradiation dose of 60 Gy in 20 cycles. We collected the irradiated cells after 1 cycle (3 Gy), 3 cycles (9 Gy), 5 cycles (15 Gy), 10 cycles (30 Gy) and 20 cycles (60 Gy). Cells were classified as "low/medium-resistant" and "high-resistant" populations based on the irradiation protocol (1–5 cycles and 10–20 cycles, respectively) (**Figure 3A**). Expression analysis of the cells revealed that *BIRC5* expression significantly increased with radiation and glucose concentration in the surviving cells after irradiation (Figure 3B, left panel). Nonetheless, when we compared the *BIRC5* expression in irradiated cells *versus* non-irradiated (control) cells in each condition, we found a significant increase in *BIRC5* fold-change in irradiated cells only with 15 Gy, and this upregulation was suppressed when cells were cultured in high glucose (**Figure 3B**, right panel). No transcriptional regulation of *BIRC5* by radiation was detected in the "high-resistant populations", which could be related to the upregulation of *BIRC5* during long-term culture under basal conditions (**Supplementary Figure 1A**). We also assessed the potential influence of oxygen levels on the transcriptional regulation of *BIRC5* by radiation, as it is well known that hypoxia reduces the response to radiotherapy³². As shown in **Supplementary Figure 1B**, we found a similar behavior when cells were cultured in hypoxic conditions. Likewise, high glucose attenuated the upregulation of genes related to glucose and energy metabolism (e.g., *GLUT3* and *LDHA*) induced by radiation alone (**Figure 3C**, left panel). We next studied the phenotype of surviving cells after medium-dose ionizing-irradiation. Specifically, we assessed the mRNA expression of genes involved in invasiveness (matrix metalloproteinase-2 and 9 [*MMP2* and *MMP9*]), epithelial-to-mesenchymal transition (vimentin [*VIM*] and fibronectin [*FN1*]), and radioresistance (interleukin-6 [*IL6*], laminin subunit gamma-2 [*LAMC2*], parathyroid hormone-like hormone [*PTH1H*] and prostaglandin-endoperoxide synthase-2 [*PTGS2*]). We found that expression of all the studied genes was increased by radiation, and this effect was hindered in a glucose dose-dependent manner (**Figure 3C**, middle and right panels). Finally, we evaluated whether glucose levels could modulate the apoptosis sensitivity of "low/medium resistant" populations treated with

AZD5582, an antagonist of the inhibitor of apoptosis family proteins (IAP), which have been previously described as candidates for combination therapy with irradiation²⁸. We observed that radiation suppressed the sensitivity of surviving FaDu cells to AZD5582-induced apoptosis, in accord with a previous study³³. However, high glucose counteracted this effect (**Figure 3D**). Overall, these data indicate that high-glucose levels impair the upregulation of *BIRC5* induced by radiation, and increase the sensitivity of irradiated cells to cytotoxic agents.

DISCUSSION

The present study reveals that the high tumoral expression of survivin/BIRC5, a proto-oncogene associated with cellular sensitivity to radiotherapy, is related to glucose metabolism in HNSCC. We found that high tumoral *BIRC5* expression predicts poor locoregional disease-free survival in patients. Moreover, we establish that the transcriptional regulation of *BIRC5* by radiation in HNSCC cells is dependent on glucose levels, and provokes a pro-tumoral and radioresistant phenotype in surviving cells.

HNSCC is one of the most frequent types of cancer and is characterized by poor prognosis and a high relapse rate². Despite improvements in radiotherapy, there remains a high rate of tumor radioresistance and recurrence in patients with HNSCC^{34,35}, which might be related to dysregulated glucose metabolism⁹. Indeed, it has been proposed that glucose homeostasis in HNSCC might be targeted to improve the prognosis of patients^{9,36}. Nonetheless, the molecular drivers involved in the metabolic shift of cancer cells, and how glucose levels might affect the sensitivity of cancer cells to radiotherapy or cytotoxic molecules, are not known.

Survivin/BIRC5 expression is associated with the aggressiveness and grade of metastasis, and with reduced survival^{11,37}. Overexpression of survivin/BIRC5 in a wide variety of cancers, including HNSCC, promotes cell proliferation, invasion, and metastatic spread, and protects tumor cells from cell death^{20,38–41}. Similar to previous studies^{13,42}, we show that *BIRC5* expression is higher in tumoral tissue than in adjacent tissue. Interestingly, we also demonstrate, for the first time to our knowledge, that *BIRC5* expression is higher in peritumoral tissue than in healthy tissue, and we found a positive association between the three tissues types from the same patient. Several clinical studies have proven the relationship between increased survivin/BIRC5 expression and tumor aggressiveness in HNSCC^{20,43}, and it is also well documented that survivin/BIRC5 overexpression promotes chemo- and radiotherapy resistance in a wide type of cancers^{26,44,45}. Although contentious²⁴, it is generally accepted that survivin/BIRC5 acts as a radioresistance factor in many cancers^{46,47}, and its downregulation correlates with lower radioresistance and a better outcome^{44,48}. Indeed, we show here that patients with higher levels of *BIRC5* in tumoral tissue have worse locoregional control after radiotherapy, and that higher *BIRC5* tumoral expression is observed in advanced-stage HNSCC. We also found that *BIRC5* tumoral expression was positively associated with

serum glucose levels and with the expression of several genes related to glucose metabolism in tumoral tissue, pointing to a potential role for survivin/BIRC5 in reprogramming cancer metabolism.

At the cellular level, our data demonstrate that radiation exposure induces *BIRC5* expression in an HNSCC cell line, which is in line with previous research²⁶. However, this regulation seems to be dependent on the dose of irradiation, as the expression of *BIRC5* was not affected by high irradiation doses (>30 Gy), which might explain the polemic about survivin/BIRC5 as a radioresistance factor^{19,24}. Notably, high glucose levels *in vitro* inhibited radiation-induced *BIRC5* expression, suggesting that in terms of radiotherapy, a hyperglycemic environment might favor a better outcome. This glucose-dependent effect was also observed at the metabolic gene level. Metabolic switching from oxidative phosphorylation to aerobic glycolysis, also known as the Warburg effect, is the main feature of metabolic reprogramming and is one of the hallmarks of cancer⁴⁹. It is also a major factor contributing to radioresistance^{3,50}. Our data suggest that radiation might promote glucose uptake *via* the upregulation of GLUT3, which has been described to be elevated in many types of cancer including triple-negative breast cancer⁵¹ and lung cancer⁵². However, similar to our findings for survivin/BIRC5, GLUT3 upregulation was blocked by high glucose levels. LDHA expression, which is associated with lactate production, behaved similarly. It is well known that lactate-induced acidification of the tumor microenvironment triggers resistance to apoptosis, induces epithelial-to-mesenchymal transition, promotes a greater invasive capacity of cells, and stimulates radioresistance^{6,53}. Accordingly, radiation induced the upregulation of both pro-tumoral and radioresistance markers, but in a glucose-dependent manner. The possibility that survivin/BIRC5 might be involved in reprogramming cancer cells towards a pro-tumoral phenotype after radiation fits with our previous research in an obesity-related tumor microenvironment, in which high survivin/BIRC5 levels promoted a tumor-associated macrophage phenotype and enhances the malignancy of cancer cells⁵⁴. Consistent with these results, hyperglycemia increases the sensitivity of irradiated cells to the cytotoxic agent AZD5582, described as a potential candidate for combination therapies²⁸. Thus, while abnormal glucose metabolism has been related to tumor progression^{8,9,27}, hyperglycemia might increase the sensitivity to radiation and cytotoxic agents once malignant cells are established.

In conclusion, our results suggest that survivin/BIRC5 is independently associated with the risk of recurrence in patients with HNSCC. Moreover, we found that there is an optimal cut-off value of survivin/BIRC5 expression, and lower levels were associated with a better outcome. Notably, our findings support the modulation of glucose levels as a potential therapeutic approach to improve treatment response in patients with HNSCC. Our study has, however, some limitations that should be mentioned including the relatively small number of patients, together with the heterogeneity of the sample, which limits the statistical power of our analysis. However, we were able to collect data from a prospective cohort of patients. We obtained similar results after adjustment, which strengthen our findings. Regarding HPV, immunohistochemistry in oropharyngeal cases did not show an association with disease-free survival. Regarding the *in vitro* analysis, the presence of different subclones (radioresistant or radiosensitive phenotype) after irradiation is a limitation; however, it has previously been shown that a dose per fraction ranging from 2 to 6 Gy with 48 hours recovery is sufficient to select for radioresistant clones²⁸. Finally, although our data demonstrate a link between *BIRC5* expression and glucose metabolism in the context of HNSCC, it does not allow us to determine causality. Nonetheless, our work might guide future molecular studies to facilitate a better diagnosis and treatment for HNSCC.

ACKNOWLEDGEMENT

We want to acknowledge all the patients and volunteers involved in this study for their collaboration. We also acknowledge the BioBank IISPV (PT17/0015/0029) integrated into the Spanish National Biobanks Network. We thank Dr. Kenneth McCreath for helpful comments on the manuscript.

Study concept and design: FXA-J. and SF-V. Acquisition of data, analysis, and interpretation of data: EB, VC-M, FXA-J and SF-V. Administrative, technical, or material support: SG, EM-M, AM, DG, VH, IV, CM, XL, JV. and FXA-J. Drafting of the manuscript: EB, VC-M, FXA-J and SF-V. Critical revision of the manuscript for important intellectual content: all authors. Statistical analysis: EB, VC-M, XT and FXA-J. Obtained funding: VC-M, XL, IV, JV, FXA-J and SF-V. Study supervision: FXA-J and SF-V.

All data generated or analyzed during this study are included in this article and its supplementary files. Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the corresponding author, Sonia Fernández-Veledo (sonia.fernandezveledo@gmail.com; sonia.fernandez@iispv.cat).

The authors declare that they have no competing interests.

This research was funded by grants from Plan Estatal de I+D+I of the Instituto de Salud Carlos III (FIS PI20/00095 to VC-M, FIS PI15/02047 and FIS PI18/0844 to FXA-J and IV, FIS PI19/01661 to XL and FIS PI20/00338 to JV) Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), A Way to Build Europe, from a grant from Asociación Española contra el Cáncer (LABAE18025AVIL to FXA-J), and by grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (MCIN) (SAF2015-65019-R, RTI2018-093919-B-100 and PID2021-122480OB-100 to SF-V). EB is recipient of a predoctoral fellowship from the Rovira i Virgili University (PMF-PIPF-SGR-2019). VC-M acknowledges support from the Ramón y Cajal program (RYC2019-02649-I), from MCIN/AEI/10.13039/501100011033/ and the European Social Fund (ESF), "Investing in your future". XT is a Serra-Hünter fellow. SF-V acknowledges support from the Miguel Servet tenure-track program (CP10/00438 and CPII16/00008) from the Fondo de Investigación Sanitaria, co-financed by the ERDF.

REFERENCES

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/CAAC.21660
2. Chow LQM. Head and Neck Cancer. Longo DL, ed. *New England Journal of Medicine.* 2020;382(1):60-72. doi:10.1056/NEJMRA1715715
3. Lin J, Xia L, Liang J, et al. The roles of glucose metabolic reprogramming in chemo- and radio-resistance. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.* 2019;38(218). doi:10.1186/S13046-019-1214-Z
4. Hay N. Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? *Nat Rev Cancer.* 2016;16(10):635-649. doi:10.1038/NRC.2016.77
5. Liu CJ, Chang WJ, Chen CY, et al. Dynamic cellular and molecular modulations of diabetes mediated head and neck carcinogenesis. *Oncotarget.* 2015;6(30):29268. doi:10.18632/ONCOTARGET.4922
6. Cai H, Li J, Zhang Y, et al. LDHA Promotes Oral Squamous Cell Carcinoma Progression Through Facilitating Glycolysis and Epithelial–Mesenchymal Transition. *Front Oncol.* 2019;9:1446. doi:10.3389/FONC.2019.01446
7. Flores A, Sandoval-Gonzalez S, Takahashi R, et al. Increased lactate dehydrogenase activity is dispensable in squamous carcinoma cells of origin. *Nat Commun.* 2019;10(91). doi:10.1038/s41467-018-07857-9
8. Jiang H, Zhou L, He Q, Jiang K, Yuan J, Huang X. The effect of metabolic syndrome on head and neck cancer incidence risk: a population-based prospective cohort study. *Cancer Metab.* 2021;9(1):25. doi:10.1186/S40170-021-00261-W
9. Vilaseca I, Fuster G, Avilés-Jurado FX. The impact of diabetes in head and neck cancer. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2020;28(2):107-111. doi:10.1097/MOO.0000000000000606
10. Collier HA. Is Cancer a Metabolic Disease? *Am J Pathol.* 2014;184(1):4-17. doi:10.1016/J.AJP.2013.07.035
11. Wheatley SP, Altieri DC. Survivin at a glance. *J Cell Sci.* 2019;132:7. doi:10.1242/JCS.223826

12. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*. 1997;3(8):917-921. doi:10.1038/NM0897-917
13. Khan Z, Tiwari RP, Mulherkar R, et al. Detection of survivin and p53 in human oral cancer: Correlation with clinicopathologic findings. *Head Neck*. 2009;31(8):1039-1048. doi:10.1002/HED.21071
14. Gasowska-Bajger B, Gasowska-Bodnar A, Knapp P, Bodnar L. Prognostic Significance of Survivin Expression in Patients with Ovarian Carcinoma: A Meta-Analysis. *J Clin Med*. 2021;10:879. doi:10.3390/JCM10040879
15. Alimujiang M, Sun J, Chen S, et al. Survivin is essential for thermogenic program and metabolic homeostasis in mice. *Mol Metab*. 2022;58:101446. doi:10.1016/J.MOLMET.2022.101446
16. Hagenbuchner J, Kiechl-Kohlendorfer U, Obexer P, Ausserlechner MJ. BIRC5/Survivin as a target for glycolysis inhibition in high-stage neuroblastoma. *Oncogene*. 2016;35(16):2052-2061. doi:10.1038/onc.2015.264
17. Erlandsson MC, Andersson KME, Oparina NY, et al. Chromatin binding of survivin regulates glucose metabolism in the IFN- γ producing CD4⁺ T cells. *bioRxiv*. Published online October 5, 2021:2021.10.05.463166. doi:10.1101/2021.10.05.463166
18. Townley AR, Wheatley SP. Mitochondrial survivin reduces oxidative phosphorylation in cancer cells by inhibiting mitophagy. *J Cell Sci*. 2020;133(21):jcs247379. doi:10.1242/JCS.247379
19. Münscher A, Prochnow S, Gulati A, et al. Survivin expression in head and neck squamous cell carcinomas is frequent and correlates with clinical parameters and treatment outcomes. *Clin Oral Investig*. 2019;23(1):361-367. doi:10.1007/s00784-018-2444-8
20. Zhou L qing, Hu Y, Xiao H jun. The prognostic significance of survivin expression in patients with HNSCC: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*. 2021;21:424. doi:10.1186/S12885-021-08170-3
21. Xie S, Xu H, Shan X, Liu B, Wang K, Cai Z. Clinicopathological and prognostic significance of survivin expression in patients with oral squamous cell carcinoma: evidence from a meta-analysis. *PLoS One*. 2015;10(2). doi:10.1371/journal.pone.0116517
22. Su L, Wang Y, Xiao M, Lin Y, Yu L. Up-regulation of survivin in oral squamous cell carcinoma correlates with poor prognosis and chemoresistance. *Oral Surgery, Oral*

- Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. 2010;110(4):484-491.
doi:10.1016/j.tripleo.2010.04.009
23. Frassanito MA, Saltarella I, Vinella A, et al. Survivin overexpression in head and neck squamous cell carcinomas as a new therapeutic target. *Oncol Rep*. 2019;41(5):2615-2624. doi:10.3892/OR.2019.7082
 24. Farnebo L, Tiefenböck K, Ansell A, Thunell LK, Garvin S, Roberg K. Strong expression of survivin is associated with positive response to radiotherapy and improved overall survival in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Int J Cancer*. 2013;133(8):1994-2003. doi:10.1002/IJC.28200
 25. Mikulandra M, Kobescak A, Verillaud B, Busson P, Matijevic Glavan T. Radiosensitization of head and neck cancer cells by a combination of poly(I:C) and cisplatin through downregulation of survivin and c-IAP2. *Cellular Oncology*. 2019;42(1):29-40. doi:10.1007/s13402-018-0403-7
 26. Liu X, Zhao Y, Zhang W, et al. Inhibition of survivin enhances radiosensitivity of esophageal cancer cells by switching radiation-induced senescence to apoptosis. *Oncotargets Ther*. 2018;11:3087. doi:10.2147/OTT.S166798
 27. Wang X, Wang H, Zhang T, Cai L, Dai E, He J. Diabetes and its Potential Impact on Head and Neck Oncogenesis. *J Cancer*. 2020;11(3):583-591. doi:10.7150/JCA.35607
 28. Kadletz L, Enzenhofer E, Kotowski U, Altorjai G, Heiduschka G. AZD5582, an IAP antagonist that leads to apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma cell lines and is eligible for combination with irradiation. *Acta Otolaryngol*. 2017;137(3):320-325. doi:10.1080/00016489.2016.1242776
 29. Begg K, Tavassoli M. Inside the hypoxic tumour: reprogramming of the DDR and radioresistance. *Cell Death Discov*. 2020;6(77). doi:10.1038/s41420-020-00311-0
 30. Wozny AS, Lauret A, Battiston-Montagne P, et al. Differential pattern of HIF-1 α expression in HNSCC cancer stem cells after carbon ion or photon irradiation: one molecular explanation of the oxygen effect. *Br J Cancer*. 2017;116(10):1340-1349. doi:10.1038/BJC.2017.100
 31. Wu K, Mao Y yuan, Chen Q, et al. Hypoxia-induced ROS promotes mitochondrial fission and cisplatin chemosensitivity via HIF-1 α /Mff regulation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cellular oncology*. 2021;44(5):1167-1181. doi:10.1007/S13402-021-00629-6

32. Hill RM, Rocha S, Parsons JL. Overcoming the Impact of Hypoxia in Driving Radiotherapy Resistance in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2022;14(17):4130. doi:10.3390/CANCERS14174130
33. Todorovic V, Prevc A, Zakelj MN, et al. Mechanisms of different response to ionizing irradiation in isogenic head and neck cancer cell lines. *Radiation Oncology*. 2019;14(1):1-20. doi:10.1186/s13014-019-1418-6
34. Li Y, Jiang Y, Qiu B, Sun H, Wang J. Current radiotherapy for recurrent head and neck cancer in the modern era: a state-of-the-art review. *J Transl Med*. 2022;20:566. doi:10.1186/s12967-022-03774-0
35. Hutchinson MKND, Mierzwa M, D'Silva NJ. Radiation resistance in head and neck squamous cell carcinoma: dire need for an appropriate sensitizer. *Oncogene*. 2020;39(18):3638. doi:10.1038/S41388-020-1250-3
36. Tsou YA, Chang WD, Lu JJ, et al. The effect of metformin use on hypopharyngeal squamous cell carcinoma in diabetes mellitus patients. *BMC Cancer*. 2019;19:862. doi:10.1186/S12885-019-6083-5/TABLES/3
37. Fäldt Beding A, Larsson P, Helou K, Einbeigi Z, Parris TZ. Pan-cancer analysis identifies BIRC5 as a prognostic biomarker. *BMC Cancer*. 2022;22(322). doi:10.1186/s12885-022-09371-0
38. Garlapati C, Joshi S, Bhattarai S, et al. PLK1 and AURKB phosphorylate survivin differentially to affect proliferation in racially distinct triple-negative breast cancer. *Cell Death Dis*. 2023;14(12). doi:10.1038/s41419-022-05539-5
39. Xie Y, Ma X, Gu L, et al. Prognostic and Clinicopathological Significance of Survivin Expression in Renal Cell Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sci Rep*. 2016;6(29794). doi:10.1038/srep29794
40. Khan SA, Burke M, Zhu F, et al. Survivin expression and impact on head and neck cancer outcomes. *Oral Oncol*. 2021;112. doi:10.1016/j.oraloncology.2020.105049
41. Xu L, Yu W, Xiao H, Lin K. BIRC5 is a prognostic biomarker associated with tumor immune cell infiltration. *Sci Rep*. 2021;11(1):390. doi:10.1038/s41598-020-79736-7
42. Uemura N, Kodama S, Nomi N, Okamoto T, Suzuki M. Correlation between anti-survivin antibody and survivin mRNA expression in head and neck cancer patients. *Acta Otolaryngol*. 2010;130(8):959-965. doi:10.3109/00016480903555416

43. Pansini PF, do Valle IB, Damasceno TCD, et al. Differential Expression of Potential Biomarkers of Oral Squamous Cell Carcinoma Development. *Head Neck Pathol.* 2021;15(4):1127-1136. doi:10.1007/s12105-021-01322-8
44. Zhou J, Guo X, Chen W, Wang L, Jin Y. Targeting survivin sensitizes cervical cancer cells to radiation treatment. *Bioengineered.* 2020;11(1):130. doi:10.1080/21655979.2020.1717297
45. Shen X, Zheng JY, Shi H, Zhang Z, Wang WZ. Survivin Knockdown Enhances Gastric Cancer Cell Sensitivity to Radiation and Chemotherapy In Vitro and in Nude Mice. *Am J Med Sci.* 2012;344(1):52-58. doi:10.1097/MAJ.0b013e318239c4ee
46. Rödel F, Hoffmann J, Distel L, et al. Survivin as a Radioresistance Factor, and Prognostic and Therapeutic Target for Radiotherapy in Rectal Cancer. *Cancer Res.* 2005;65(11):4881-4887. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3028
47. Lu B, Mu Y, Cao C, et al. Survivin As a Therapeutic Target for Radiation Sensitization in Lung Cancer. *Cancer Res.* 2004;64:2840-2845. doi:10.1158/0008-5472.can-03-3547
48. Zhou C, Zhang L, Xu P. Growth inhibition and chemo-radiosensitization of esophageal squamous cell carcinoma by survivin-shRNA lentivirus transfection. *Oncol Lett.* 2018;16(4):4813. doi:10.3892/OL.2018.9280
49. Yoshida GJ. Metabolic reprogramming: the emerging concept and associated therapeutic strategies. *Journal of experimental & clinical cancer research.* 2015;34(111). doi:10.1186/S13046-015-0221-Y
50. Tang L, Wei F, Wu Y, et al. Role of metabolism in cancer cell radioresistance and radiosensitization methods. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.* 2018;37(87). doi:10.1186/S13046-018-0758-7
51. Tsai TH, Yang CC, Kou TC, et al. Overexpression of GLUT3 promotes metastasis of triple-negative breast cancer by modulating the inflammatory tumor microenvironment. *J Cell Physiol.* 2021;236(6):4669-4680. doi:10.1002/JCP.30189
52. Masin M, Vazquez J, Rossi S, et al. GLUT3 is induced during epithelial-mesenchymal transition and promotes tumor cell proliferation in non-small cell lung cancer. *Cancer Metab.* 2014;2(11). doi:10.1186/2049-3002-2-11
53. Wang ZH, Peng WB, Zhang P, Yang XP, Zhou Q. Lactate in the tumour microenvironment: From immune modulation to therapy. *EBioMedicine.* 2021;73:103627. doi:10.1016/J.EBIOM.2021.103627

54. Benaiges E, Ceperuelo-Mallafré V, Madeira A, et al. Survivin drives tumor-associated macrophage reprogramming: a novel mechanism with potential impact for obesity. *Cellular Oncology*. 2021;44(4):777-792. doi:10.1007/S13402-021-00597-X

FIGURE LEGENDS

Figure 1. *BIRC5* gene levels are increased in tumoral tissue and are associated with serum glucose and with glucose-related metabolism genes. (A) *BIRC5* mRNA expression in normal (N), adjacent (A), and tumoral mucosa (T). Gene expression differences between tissue samples were calculated using one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. ** $P \leq 0.01$, **** $P < 0.0001$ between tissues. **(B).** Correlations between *BIRC5* expression in normal, adjacent and tumoral mucosa. **(C)** Correlation between gene expression of *HIF1A* and *BIRC5* in tumoral tissue. **(D)** Correlations between gene expression of metabolic markers and *BIRC5* in tumoral tissue. **(E)** Correlation between *BIRC5* expression in tumoral mucosa and serum glucose. All associations between variables were calculated using Pearson's rank-order correlation test. Rho coefficients were considered statistically significant at $P < 0.05$.

Figure 2. Higher *BIRC5* expression in tumoral tissue is related to a worse tumor stage and locoregional control, and poor survival. (A) *BIRC5* mRNA expression in tumoral mucosa classified according to the tumoral stage of patients. **(B)** *BIRC5* mRNA expression in tumoral mucosa of patients treated with radiotherapy, classified according to the achievement of locoregional control. In (A) and (B), an unpaired t test was performed to determine significant statistical differences between both groups. * $P < 0.05$. **(C)** Kaplan-Meier survival analysis showing locoregional recurrence-free survival according to *BIRC5* expression in tumoral tissue. Low *BIRC5* profile: *BIRC5* mRNA expression in tumoral tissue < 2.547 . High *BIRC5* profile: *BIRC5* mRNA expression in tumoral tissue > 2.547 .

Figure 3. *BIRC5* expression induced by radiation is dependent on extrinsic glucose levels and is associated with a pro-tumoral phenotype. (A) Schematic representation of the workflow performed with HNSCC FaDu cells. Both control and irradiated cells were cultured at the same time and under the same conditions, except that the treated group was irradiated three times weekly with doses of 3 Gy. Cells were collected at a cumulative dose of 3, 9, 15, 30 and 60 Gy. **(B)** *BIRC5* mRNA expression in FaDu cells cultured with 3.5, 6 or 10 mM glucose in the medium

and treated with 3, 9, 15, 30 or 60 Gy of radiation. Results are expressed in arbitrary units of irradiated cells (left panel) or as logarithmic expression *versus* control cells (right panel). For statistical analysis, one-way ANOVA was performed. * shows statistical differences between glucose concentrations at the same radiation dose. # shows statistical differences between radiation doses cultured at the same glucose concentration. * or # $P \leq 0.05$; ** or ## $P \leq 0.01$; *** or ### $P \leq 0.001$; **** or #### $P \leq 0.0001$. **(C)** Heatmaps of the logarithmic expression of markers related to metabolism (left), pro-tumoral phenotype (middle) or radioresistance (right) in FaDu cells cultured with 3.5, 6 or 10 mM of glucose in the medium and treated with 15 Gy of radiation *versus* their control condition. For statistical analysis, an unpaired t test was performed. * shows statistical differences between glucose concentration. # shows statistical differences *versus* each control condition. * or # $P \leq 0.05$; ** or ## $P \leq 0.01$; *** or ### $P \leq 0.001$; **** or #### $P \leq 0.0001$. **(D)** Logarithmic expression of relative apoptosis of FaDu cells cultured with low- or high-glucose, irradiated with 3, 9 or 15 Gy and exposed to the cytotoxic agent AZD5582 *versus* non-exposure to AZD5582. * shows statistical differences between different glucose concentrations. # shows statistical differences between doses of radiation at the same glucose concentration. * or # $P \leq 0.05$; ** or ## $P \leq 0.01$; **** or #### $P \leq 0.0001$.

TABLES

Table 1. Characteristics of the patients and the locoregional disease-free survival rate stratified by each variable. Abbreviations: CI, confidence interval; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group. ChRT: chemoradiotherapy.

Characteristics	Num. Patients (%)	Disease-free survival % (95 CI%)	P-value
Age (years)			
<50	2 (6.3)	50.0 (9.4-98.7)	0.690
50-60	11 (34.4)	54.5 (28-78.7)	
60-70	12 (37.5)	33.3 (13.8-60.9)	
>70	7 (21.9)	57.1 (25-84.1)	
Sex			
Male	30 (93.8)	43.3 (27.3-60.8)	0.212
Female	2 (6.3)	100 (34.2-100)	
Tobacco consumption			
Never	7 (21.9)	71.4 (35.8-91.7)	0.209
<20 cigarettes per day	0 (0)	0 (0-100)	
>20 cigarettes per day	25 (78.1)	40 (23.4-59.2)	
Alcohol consumption			
Never	14 (43.8)	42.8 (21.3-67.4)	0.458
Mild-moderate	2 (6.2)	0 (0-65.7)	
Severe	16 (50)	56.2 (33.1-76.9)	
ECOG Index			
0	16 (50)	31.2 (12.1-55.5)	0.431
>0	16 (50)	62.5 (38.6-81.5)	
Tumor location			
Oral cavity–oropharynx	7 (34.4)	71.4 (35.8-91.7)	0.149
Larynx–hypopharynx	25 (78.1)	40 (23.4-59.2)	
T category			
1–2	11 (34.4)	54.5 (28-78.7)	0.398
3–4	21 (68.8)	42.8 (24.4-63.4)	
N category			
N0	20 (62.5)	35 (18.1-56.7)	0.085
N+	12 (37.5)	66.6 (39-86.1)	

Table 2. Prognostic Factors of disease-free survival in multivariate Cox regression analyses.

Abbreviations: HR, hazard ratio; CI, confidence interval.

Variables	Categories	HR	95%CI	P-value
Multivariate analysis				
T-stage	T3-T4 vs T1-T2	22.16	2.61-187.9	0.004
Nodal disease	N+ vs N0	2.04	0.55-7.56	0.285
Survivin/BIRC5	High vs Low	13.04	2.526-67.35	0.002

Figure 1

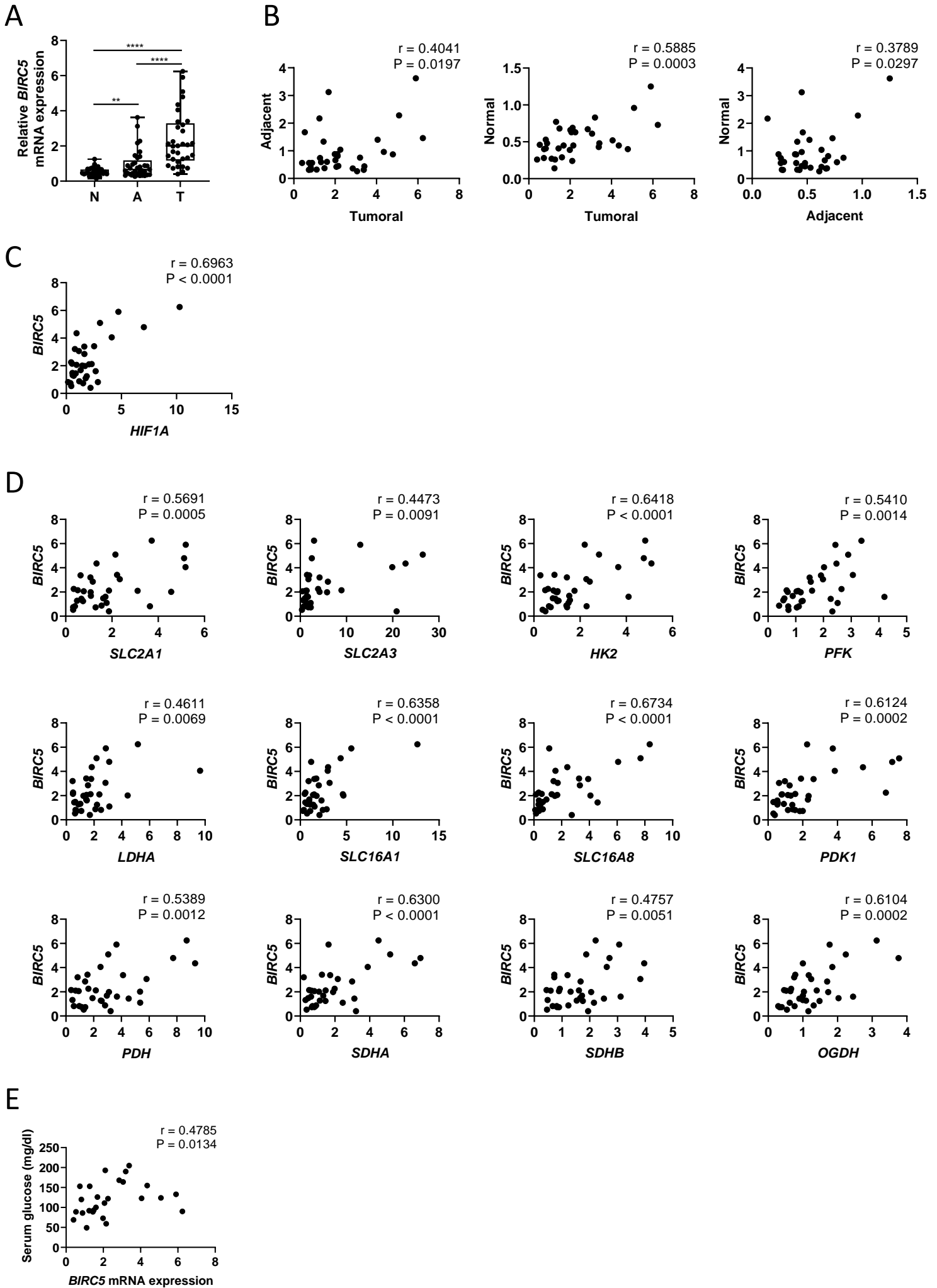


Figure 2

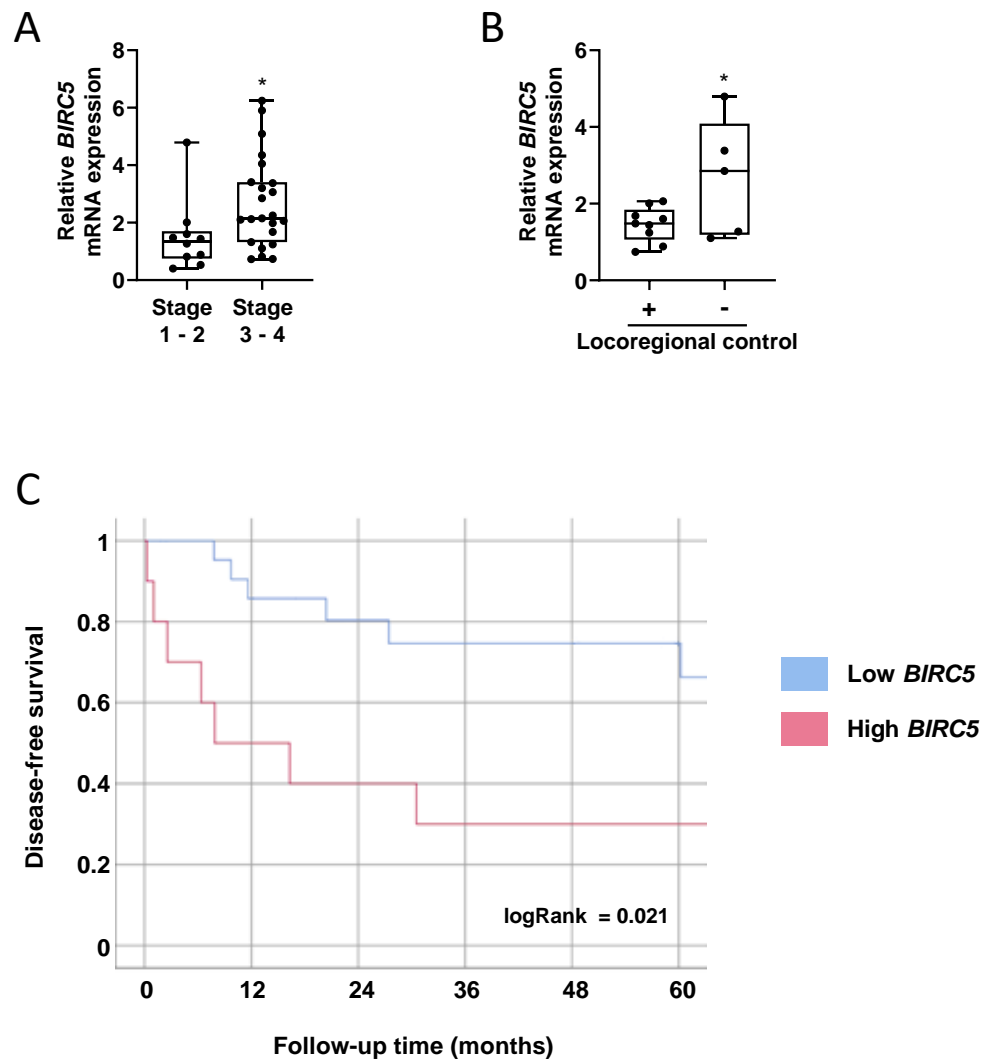
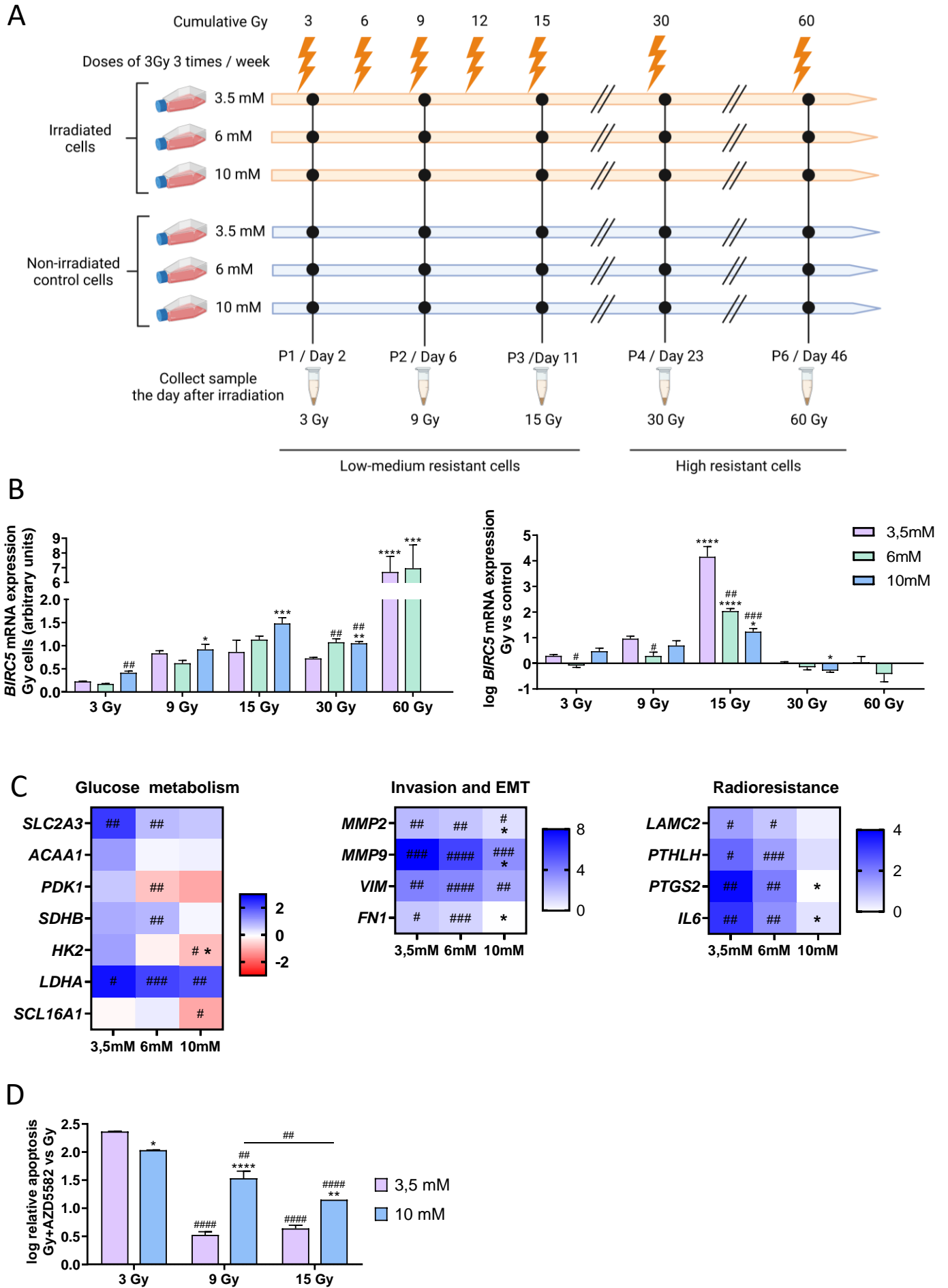
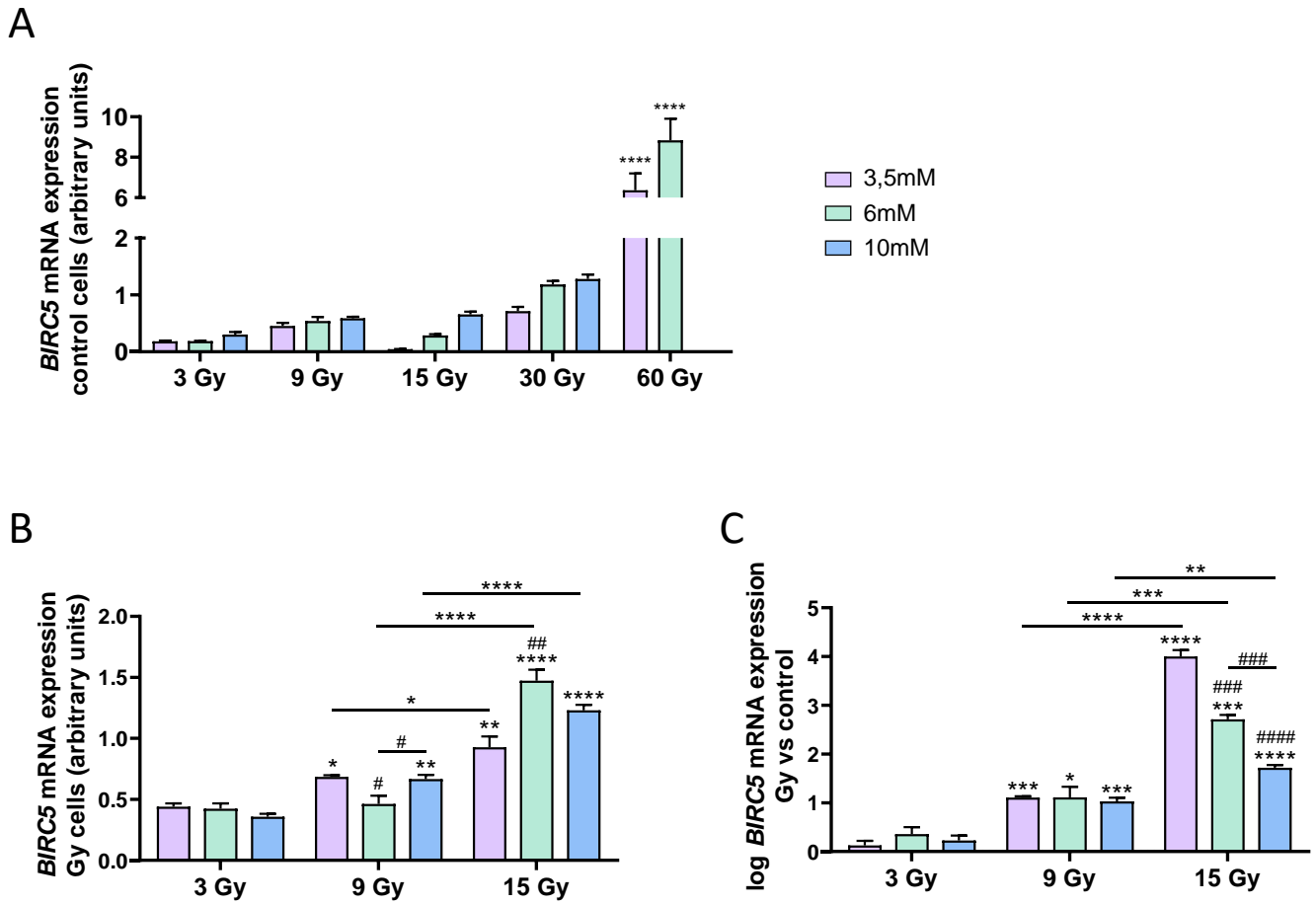


Figure 3



Supplementary Figure 1



Supplementary Table 1. Human gene expression Taqman probes. Results were calculated using the comparative Ct method and values for each sample were normalized against the reference gene RPLP0 in tissue samples and 18S in cell samples.

Detector	Taqman probes	Gene probes
BIRC5 (survivin)	Hs04194392_s1	Baculoviral IAP Repeat Containing 5
Hypoxic stress marker		
HIF1A	Hs00153153_m1	Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha
Glucose metabolism markers		
SLC2A1 (GLUT1)	Hs00892681_m1	Solute Carrier Family 2 Member 1
SLC2A3 (GLUT3)	Hs00359840_m1	Solute Carrier Family 2 Member 3
HK2	Hs00606086_m1	Hexokinase 2
PFK	Hs00175997_m1	Phosphofructokinase
LDHA	Hs01378790_g1	Lactate Dehydrogenase A
SCL16A1 (MCT1)	Hs01560299_m1	Solute Carrier Family 16 Member 1
SCL16A8 (MCT3)	Hs00358829_m1	Solute Carrier Family 16 Member 1
PDK1	Hs00176853_m1	Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1
PDH	Hs01081518_s1	Pyruvate Dehydrogenase Phosphatase Catalytic Subunit 1
SDHA	Hs00417200_m1	Succinate Dehydrogenase Complex Flavoprotein Subunit A
SDHB	Hs01042482_m1	Succinate Dehydrogenase Complex Iron Sulfur Subunit B
OGDH	Hs01081865_m1	Oxoglutarate Dehydrogenase
ACAA1	Hs01576064_g1	Acetyl-CoA Acyltransferase 1
Pro-tumoral markers		
MMP2	Hs01548727_m1	Matrix Metalloproteinase-2
MMP9	Hs00234579_m1	Matrix Metalloproteinase-9
VIM	Hs00958111_m1	Vimentin
FN1	Hs01549976_m1	Fibronectin
Radioresistance markers		
LAMC2	Hs01043717_m1	Laminin Subunit Gamma 2
PTH1H	Hs00174969_m1	Parathyroid Hormone Like Hormone
PTGS2	Hs01573469_m1	Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2
IL6	Hs00985639_m1	Interleukin 6
Housekeeping		
RPLP0	Hs99999902_m1	Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0
18S rRNA	Hs03928985_g1	18S ribosomal RNA

DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

El treball presentat en aquesta tesi se centra en l'estudi de la survivina, un membre de la família de les proteïnes inhibidores de l'apoptosi. Tot i que les funcions principals de la survivina són la divisió cel·lular i la inhibició de l'apoptosi¹¹, es considera una proteïna multifuncional amb nous papers emergents. El camp d'estudi més ampli de la survivina és el càncer, on s'associa principalment amb la progressió tumoral i quimioresistència a través de diverses vies; per contra, el paper que té en la radioteràpia no està ben establert. Tot i que antigament es pensava que la survivina només s'expressava en cèl·lules canceroses i en teixits embrionaris i fetals, avui en dia se sap que molts teixits i tipus cel·lulars adults expressen survivina, encara que a nivells inferiors, i hi podria tenir papers fisiològics³⁵⁸. En la present tesi identifiquem possibles funcions addicionals de la survivina en el context de l'obesitat i del CCC.

1. La survivina indueix la reprogramació dels macròfags humans cap a un fenotip protumoral

Considerant un estudi previ del nostre grup, on es va demostrar que la proteïna inhibidora de l'apoptosi survivina era més secretada per les ASCs de pacients amb obesitat que pels que no en tenien¹⁴, ens vam plantejar si l'ambient que generaven aquestes ASCs, especialment la survivina secretada, podria contribuir en el microambient tumoral, especialment en el fenotip i en les funcions dels macròfags. Els resultats del primer estudi de la present tesi ens indiquen que la survivina podria tenir un paper en la reprogramació dels macròfags humans cap a un fenotip protumoral. Més concretament, vam mostrar que en un context d'obesitat l'augment de survivina promogut per les ASCs induïa un canvi fenotípic dels macròfags, els quals estimulaven la malignitat de les cèl·lules tumorals.

L'obesitat, considerada l'epidèmia del segle XXI, és una malaltia dinàmica, complexa i multifactorial que està associada amb el desenvolupament de DT2, malalties cardiovasculars, diversos tipus de càncer i altres condicions patològiques adverses. L'augment de la morbiditat i mortalitat dels càncers relacionats amb l'obesitat es deu principalment a la disfuncionalitat del TA, i cada vegada hi ha més estudis que apunten a un potencial paper de les ASCs en la progressió tumoral^{105,359,360}. Dins del microambient

tumoral, els macròfags (MATs) poden arribar a comprendre un 50% de la població cel·lular degut a l'alta infiltració que hi ha d'aquests²⁵⁷. A més, el seu reclutament cap al microambient tumoral, diversitat i plasticitat depèn d'estímuls externs^{197,361}, així com de quimiocines secretades per les ASCs³⁶². És per això que ens vam centrar en estudiar l'efecte que tenien les ASCs dels pacients amb obesitat en la reprogramació dels macròfags per a intentar entendre els mecanismes pels quals l'obesitat promou la tumorigènesi. El secretoma de les ASCs està considerat un dels principals efectors de la seva funció immunomoduladora i angiogènica^{363,364}. Vam observar com el secretoma de les ASCs de pacients amb obesitat modificava el fenotip dels macròfags cap a un de protumoral, tant a nivell d'expressió gènica com de proteïna. A més, tenint en compte que prèviament havíem demostrat que les ASCs de pacients amb obesitat secretaven més survivina¹⁴ i que aquesta promou la malignitat tumoral¹⁰, en aquest estudi vam demostrar que el fenotip protumoral que adquirien els macròfags en contacte amb el secretoma de les ASCs de pacients amb obesitat era, en part, dependent de la survivina secretada per aquestes.

Sorprenentment, el secretoma de les ASCs de pacients amb obesitat no modulava l'expressió gènica de la survivina a nivell de mRNA però sí de proteïna, suggerint un possible mecanisme basat en que la survivina secretada per les ASCs era captada pels macròfags, el qual concordaria amb el paper determinant que té la survivina extracel·lular en la progressió tumoral^{48,50}. Per a poder estudiar aquesta hipòtesi vam realitzar experiments de cocultiu amb cèl·lules que sobreexpressaven i secretaven survivina unida a un marcador fluorescent. D'aquesta manera vam poder demostrar no només que els macròfags eren capaços d'internalitzar la survivina extracel·lular, sinó que aquesta internalització els conferia un fenotip molt similar al que s'obtenia quan es cultivaven amb el secretoma de les ASCs de pacients amb obesitat. És per això que, tot i que no es poden descartar altres factors solubles, els resultats obtinguts indicaven que el secretoma de les ASCs de pacients amb obesitat genera uns macròfags híbrids, amb característiques tant pro com antiinflamatòries i una potencial activitat protumoral, mediatas per un mecanisme dependent de la internalització de survivina.

Els macròfags són cèl·lules molt plàstiques que es poden activar de manera heterogènia en resposta a diferents senyals. En el càncer, els senyals que orquestren la

plasticitat dels macròfags varien considerablement entre els diferents tipus de tumors o en diferents localitzacions i estadis d'un mateix tumor, resultant en un fenotip de MAT molt divers^{236,365}. A més, tot i que és un camp d'estudi que genera molt interès, no hi ha un clar consens sobre el fenotip que tenen²⁵⁷. Per a poder avaluar si la survivina estava involucrada en la plasticitat dels macròfags, primer vam analitzar el perfil d'expressió de la survivina tant en macròfags polaritzats cap a un fenotip pro com antiinflamatori. En la mateixa direcció que estudis publicats a bases de dades de transcriptòmica³⁶⁶, vam observar com la survivina s'expressava principalment en els macròfags proinflamatoris. Tenint en compte que les funcions de la survivina depenen tant de la seva localització^{7,367} com de les modificacions posttraduccionals²², vam observar com l'expressió de survivina estava localitzada principalment al nucli dels macròfags activats tant cap a un fenotip pro com antiinflamatori, així com un augment de la forma fosforilada en la Thr34 tant al nucli com al citoplasma. En consonància, en els macròfags que internalitzaven la survivina del medi, aquesta es localitzava principalment al nucli, suggerint que la survivina nuclear podria tenir un paper en la polarització dels macròfags.

La fosforilació de la survivina és un mecanisme important per al manteniment de la seva activitat biològica i funcionalitat, i els mecanismes pels quals la survivina guanya o perd la seva funció a través de la fosforilació estan àmpliament estudiats^{22,368}. Més concretament, la fosforilació de la survivina en la Thr34 és necessària per a preservar la viabilitat cel·lular mitjançant la inhibició de l'apoptosi²⁴. En aquest estudi vam observar que la sobreexpressió de survivina amb una mutació a la Thr34 que no permetia que es fosforilés, li impedia la promoció del fenotip protumoral dels macròfags. Aquest resultat ens va indicar que el paper de la survivina en la polarització dels macròfags era dependent de la fosforilació en la Thr34, la qual fins ara només s'havia relacionat amb la funció antiapoptòtica de la survivina^{369,370}. Aquestes dades, juntament a que no vam observar diferències en l'apoptosi quan vam sobreexpressar survivina als macròfags o els vam cultivar amb medi condicionat de ASCs de pacients amb obesitat, suggerien un nou rol de la survivina fosforilada en la Thr34 en la plasticitat dels macròfags cap a un fenotip protumoral.

Les cèl·lules tumorals secreten factors quimioatracients que provoquen un reclutament de ASCs cap als tumors^{167,359}. En una situació d'obesitat la mobilització de les

ASCs cap als tumors es veu incrementada, i aquestes es transformen pels estímuls del microambient per tal d'afavorir la progressió tumoral³⁷¹. La relació que s'estableix entre les ASCs, les cèl·lules tumorals i els MAT és indispensable per a la progressió tumoral. És una comunicació multilateral que es pot donar de manera indirecta a través de les seves secrecions^{164,372}. Estudis recents apunten que les ASCs són clau en la regulació de la invasió tumoral i el potencial metastàtic a través de la secreció de citocines i molècules prooncogèniques que promouen el microambient inflamatori, alhora que transformen el comportament de les cèl·lules tumorals, tornant-les més agressives i amb més capacitat proliferativa i migradora^{113,373–375}. Tenint-ho en consideració, ens vam plantejar si la survivina alliberada per les ASCs i macròfags contribuïa en el manteniment del microambient tumoral. Mitjançant diferents estudis de cocultiu, funcionals i de neutralització de la survivina vam poder demostrar que les interaccions indirectes que es produeixen en el microambient tumoral entre ASCs, macròfags i cèl·lules tumorals i que promouen la progressió tumoral són, en part, dependents de la survivina alliberada extracel·lularment. D'aquesta manera vam poder determinar l'efecte paracrí de la survivina alliberada tant per les ASCs com pels macròfags envers les cèl·lules tumorals, com l'efecte autocrí de manteniment del fenotip protumoral sobre els propis macròfags.

Basant-nos en els resultats obtinguts *in vitro* i confirmant la nostra hipòtesi, la survivina regula la polarització dels macròfags. D'altra banda, tot i que s'ha descrit una coexistència de diferents subpoblacions de macròfags en els tumors humans, el seu fenotip no està ben definit³⁷⁶. A més, el fet que els diversos marcadors de MAT descrits com CD68, CD14 o CD45^{260,377}, siguin marcadors compartits amb macròfags no tumorals, ens va portar a plantejar-nos si la survivina podria ser un marcador específic de MAT i si estava correlacionada amb l'estat clínic del pacient. Una manera fàcil d'obtenir macròfags sense la necessitat de biòpsies tissulars és de l'ascites de pacients. L'ascites és una acumulació de líquid sèric a la cavitat peritoneal que conté cèl·lules immunològiques, principalment macròfags, que es presenta en pacients amb complicacions patològiques, incloent el càncer³⁷⁸. A més, els macròfags residents a l'ascites són indispensables per a la progressió tumoral³⁷⁹. Tots els estudis publicats que demostren que els nivells de survivina augmenten en relació a la malignitat de la malaltia se centren en l'expressió de survivina a les cèl·lules tumorals de biòpsies de pacients^{34,35}, les quals necessiten metodologies invasives per a la

seva obtenció. En el primer estudi d'aquesta tesi vam observar com, a més de les cèl·lules tumorals, els macròfags de l'ascites incrementaven exponencialment l'expressió de survivina a mesura que el diagnòstic del pacient era més virulent, tant el percentatge dels macròfags que l'expressaven com la intensitat en la que es manifestava. A més, l'absència de survivina en els macròfags de pacients que no tenien un diagnòstic maligne, indicava que la survivina podria ser un marcador específic de MAT en les ascites.

En conjunt, els resultats del primer estudi ens van demostrar que les ASCs dels pacients amb obesitat secretaven survivina que era captada pels macròfags i els induïa el fenotip protumoral dependent de la fosforilació en la Thr34. Alhora, aquests macròfags també secretaven survivina que actuava tant de manera autocrina, per a mantenir el fenotip protumoral, com paracrina, amb les cèl·lules tumorals, augmentant-los la capacitat metastàsica i invasiva, tal i com es resumeix a la Figura 12. D'aquesta manera vam poder atribuir una nova funció a la survivina en la polarització dels macròfags cap a un perfil tipus MAT.

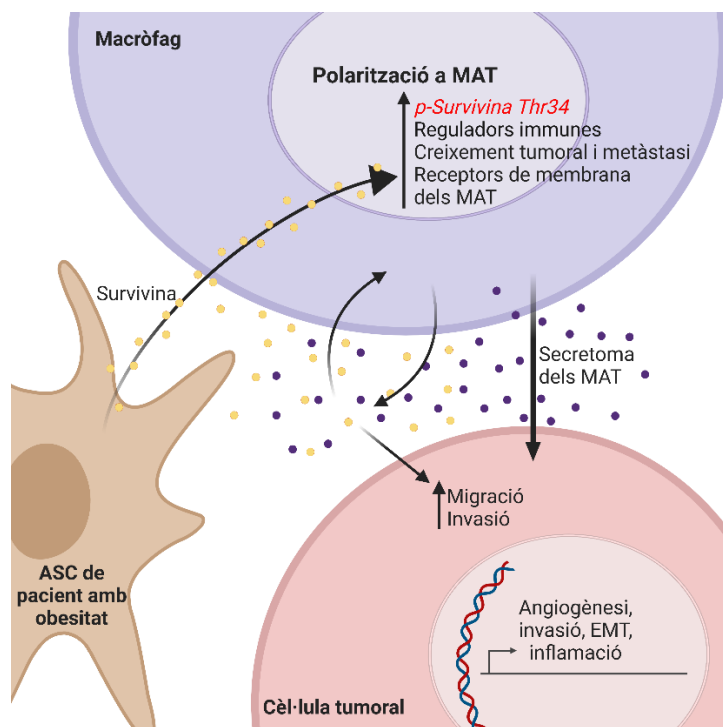


Figura 12. Esquema resum del paper de la survivina en el microambient tumoral. Les ASCs de pacients amb obesitat modulen la plasticitat dels macròfags, promovent un fenotip protumoral dependent de la survivina. Els macròfags internalitzen la survivina extracel·lular i aquesta els polaritza a un fenotip protumoral. La transformació dels macròfags depèn de la fosforilació de la survivina en la Thr34. Els macròfags protumorals, que també secreten survivina, intensifiquen les propietats malignes de les cèl·lules tumorals. Creada amb Biorender.com

2. Possible paper de la survivina en la reprogramació metabòlica de la glucosa i en la resposta a la radioteràpia en el càncer de cap i coll

En el segon estudi presentat en aquesta tesi ens vam centrar en la investigació de la survivina com un possible factor de radioresistència potencialment modulada per la glucosa per a ajudar en la predicció de l'eficàcia terapèutica i el pronòstic dels pacients amb CCC. Els resultats presentats ens van mostrar que l'expressió de survivina en el teixit tumoral de pacients amb CCC predia una pitjor supervivència i estava associada amb els nivells circulants de glucosa. A més, també vam trobar un punt de tall de l'expressió tumoral de survivina que associava l'expressió de survivina amb el desenllaç de la malaltia. També, a nivell *in vitro*, vam demostrar que en cèl·lules de CCC la sobreexpressió de survivina estava regulada per la radiació i era dependent dels nivells de glucosa, de manera que promovia un fenotip protumoral i radioresistent a les cèl·lules que sobreviuen a la radiació.

El CCC és un dels tipus de càncer més freqüent al món; es desenvolupa a les cèl·lules epitelials de les vies respiratòries superiors i al revestiment de la mucosa dels passos alimentaris, com ara la cavitat oral, l'orofaringe, la laringe o la hipofaringe. La majoria dels CCC estan associats al consum de tabac i alcohol i es diagnostiquen en estadis localment avançats, fet que encara que es tractin amb cirurgia, radioteràpia, quimioteràpia o immunoteràpia o amb combinacions d'aquests, el pronòstic és molt pobre i la taxa de recaiguda és molt elevada²⁶⁹.

Malgrat els avenços i millores en la radioteràpia, la proporció de pacients amb CCC que pateixen radioresistència és molt elevada³⁸⁰. Les cèl·lules tumorals irradiades poden modificar el seu metabolisme i alhora influenciar en les característiques metabòliques dels altres components del microambient tumoral per a alleujar el dany cel·lular i evadir la mort cel·lular induïda per la radiació³⁸¹. Aquests canvis metabòlics porten a la radioresistència de les cèl·lules tumorals i són potencials dianes terapèutiques^{382,383}. En el context del CCC, estudis emergents apunten que la radioresistència podria estar relacionada amb una desregulació del metabolisme de la glucosa^{273,316,317}. A més, també hi ha evidències que mostren que millorant l'homeòstasi de la glucosa es podria afavorir el pronòstic dels pacients amb CCC^{384,385}. Tot i això, els mecanismes pels quals s'afavoreix aquest canvi

metabòlic i com la glucosa pot afectar a la radioresistència de les cèl·lules tumorals no estan ben definits.

La sobreexpressió de la survivina en el CCC s'ha relacionat amb un pitjor pronòstic dels pacients^{337,340}. A més també està associada amb la promoció de la proliferació cel·lular, invasió i metàstasi, així com també amb la conferència de protecció de les cèl·lules tumorals envers l'apoptosi^{7,346}. Utilitzant una cohort de 32 pacients amb CCC diagnosticat, als quals se'ls ha fet un seguiment de 5 anys, i en línia amb estudis publicats^{336,338,342}, vam demostrar per primera vegada que l'expressió de survivina era més alta en el teixit tumoral i peritumoral que en el teixit sa i, a més, també vam trobar associacions positives entre els tres teixits del mateix pacient. Altrament, també vam determinar associacions positives entre l'expressió de survivina i la de HIF1A al teixit tumoral, el qual és el factor clau regulador de la resposta cel·lular a la hipòxia i que també està relacionat amb la radioresistència i el metabolisme de la glucosa^{386,387}.

Degut a que la survivina podria estar regulada per la glucosa en altres contextos com en neuroblastoma⁴⁵ o en adipòcits madurs¹³⁰, i considerant que la hiperglucèmia és una de les alteracions metabòliques que promouen el CCC; vam estudiar la possible relació que s'establiria entre elles. Vam poder comprovar com l'expressió de survivina es correlacionava de manera positiva amb gens involucrats en el metabolisme de la glucosa en el teixit tumoral, així com amb els nivells circulants de glucosa dels pacients. En aquest context, hi ha estudis en altres tipus cel·lulars que indiquen que en situació d'hiperglucèmia la survivina està sobreexpressada, i que inhibint la survivina es redueix la captació de glucosa per les cèl·lules tumorals, amb una conseqüent reducció de la glicòlisi i del rendiment d'aquestes cèl·lules¹²⁶. També s'ha descobert que la survivina és necessària per a la captació de glucosa, ja que quan s'inhibeix la survivina es redueix l'expressió dels transportadors de glucosa³⁸⁸.

Són diversos els estudis que relacionen nivells més elevats de survivina amb una major agressivitat tumoral en el CCC^{341,389,390}. En aquesta línia, i d'acord amb els estudis publicats, vam comprovar com els pacients que tenien diagnosticat un estadi més avançat de la malaltia tenien més expressió de survivina en el teixit tumoral. Tot i que hi ha controvèrsia, la majoria dels estudis apunten que la survivina promou la resistència a la radioteràpia de les cèl·lules tumorals i que una desregulació de la survivina millora la

sensibilitat a la radioteràpia amb un conseqüent millor pronòstic^{353,355,391}. En aquest sentit, vam determinar que els pacients tractats amb radioteràpia i que tenien un pitjor control locoregional del tumor després de la radioteràpia eren aquells que tenien una major expressió de survivina al teixit tumoral. En concordança amb els resultats obtinguts, també vam poder establir un punt de tall dels nivells d'expressió de survivina que predeia el risc de pitjor pronòstic després del tractament. D'aquesta manera, els pacients que tenien l'expressió de survivina per sobre del punt de tall tenien fins a tretze vegades més risc de recurrència tumoral i de menor supervivència a llarg termini que els que tenien l'expressió per sota. D'aquesta manera vam poder corroborar que els nivells d'expressió de survivina elevats en el teixit tumoral són un indicador de pitjor pronòstic i major recurrència.

Seguint amb l'exploració del paper de la survivina en la radioresistència del CCC i, tenint en compte que amb les mostres humanes vam veure que els nivells de survivina en el teixit tumoral podrien estar relacionats amb la radioresistència que desenvolupaven els pacients i amb l'estat metabòlic d'aquests, vam realitzar experiments *in vitro*. Primer vam estudiar si l'expressió de survivina es veia afectada tant per la radiació com per la glucosa. Les dades obtingudes ens van mostrar que l'exposició a la radiació induïa l'expressió de survivina a les cèl·lules tumorals de CCC, en consonància amb estudis publicats anteriorment^{355,392}. A més, quan vam comparar l'expressió de survivina envers les cèl·lules control, vam observar un increment significatiu només en les cèl·lules amb 15 Gy, les quals encara les consideràvem "mitjanament resistents", i aquesta sobreexpressió es reduïa quan estaven cultivades amb alta glucosa. No només això, sinó que a les cèl·lules tractades amb més de 30 Gy, considerades "altament resistents", l'expressió de survivina induïda per la radiació estava inhibida, fent pensar que la survivina potser no s'hauria de considerar com un marcador de radioresistència.

En concordança amb la survivina, les cèl·lules que van sobreviure a la radiació després de 15 Gy eren més protumorals i expressaven de manera més elevada els marcadors de radioresistència. A més, els gens relacionats amb el metabolisme de la glucosa també es regulaven de manera similar a la survivina, inhibint-se en dosis altes de glucosa. Aquesta dada podria indicar que, a l'hora d'administrar radioteràpia als pacients, un ambient hiperglucèmic podria afavorir una millor resposta al tractament. La reprogramació

metabòlica de fosforilació oxidativa cap a glicòlisi aeròbica, coneguda també com a efecte Warburg, és un dels distintius principals dels càncers que també s'ha demostrat que promou la radioresistència^{322,393}. Els resultats obtinguts ens van indicar que la radiació podria promoure la captació de glucosa pel transportador de glucosa GLUT3, el qual estava significativament més expressat amb la radiació. La sobreexpressió d'aquest transportador en els tumors s'ha associat amb una major agressivitat d'aquests i una pitjor supervivència dels pacients afectats^{394,395}. No obstant, vam observar un patró d'expressió similar al de la survivina, ja que la regulació de GLUT3 induïda per la radiació, així com d'altres gens metabòlics que vam analitzar, es veia bloquejada per un augment de la concentració de glucosa. Un dels altres marcadors estudiats va ser LDHA, l'expressió del qual tenia un comportament similar als prèviament descrits. L'expressió de LDHA induïx a una major producció de lactat que promou l'acidificació del microambient tumoral, la qual porta a la resistència a l'apoptosi. A més, també incrementa la capacitat invasiva de les cèl·lules tumorals i els confereix una major resistència a la radioteràpia^{324,396}. Tot i que alteracions en el metabolisme de la glucosa s'han relacionat en la progressió tumoral^{319,320}, en les cèl·lules tumorals irradiades vam observar que la hiperglucèmia reduïa el fenotip radioresistent i la sensibilitat a l'apoptosi induïda per un agent citotòxic.

En conclusió, els resultats obtinguts en aquest segon estudi suggereixen que la survivina està associada amb el risc de recurrència en pacients amb CCC. A més, vam trobar un punt de tall de l'expressió de survivina que podria servir de pronòstic de major supervivència i menor recurrència, així com també vam relacionar l'expressió de survivina amb els nivells de glucosa i l'expressió de gens clau del seu metabolisme. Amb els resultats obtinguts *in vitro*, tot i que no vam demostrar una causalitat de la survivina, vam confirmar la nostra hipòtesi de que la survivina estava regulada per la radiació, de la mateixa manera que els gens protumorals i del metabolisme de la glucosa. A més, els nivells elevats de glucosa disminuïen el fenotip radioresistent i augmentaven la sensibilitat a l'apoptosi de les cèl·lules tumorals, de manera que la modulació de la glucosa podria servir per a millorar la resposta al tractament dels pacients amb CCC. No obstant, aquest treball pot servir com a base per a posteriors estudis moleculars per a poder facilitar el diagnòstic i tractament dels pacients amb CCC.

En resum, els dos estudis presentats en aquesta tesi ens presenten dos nous papers de la survivina, d'una banda en la reprogramació protumoral dels macròfags en un context d'obesitat, establint la survivina com un nou marcador específic de MAT; i de l'altra amb la recurrència del CCC, així com en la resposta a la radioteràpia dels pacients amb CCC amb dependència del seu estat metabòlic.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. El secretoma de les ASCs de pacients amb obesitat afavoreix la reprogramació dels macròfags cap a un fenotip protumoral per un mecanisme dependent de la survivina.
2. La survivina s'expressa principalment en macròfags activats (tan pro com antiinflamatoris), en els quals es localitza principalment al nucli i es troba majoritàriament fosforilada a la Thr34.
3. La survivina pot actuar com a proteïna extracel·lular, i els macròfags són capaços tant de secretar-la com de captar-la.
4. La survivina altera el fenotip i l'activitat dels macròfags, promovent un fenotip híbrid i una activitat protumoral. Aquesta regulació depèn de la fosforilació a la Thr34.
5. La survivina extracel·lular té un paper clau en el microambient tumoral com a vincle molecular entre ASCs, MATs i cèl·lules tumorals.
6. La survivina podria ser un marcador específic de MATs.
7. En pacients amb CCC, els nivells d'expressió de survivina són més alts en mucosa tumoral que en peritumoral i sana. A més, una alta expressió de survivina tumoral s'associa amb nivells alts en teixit sa.
8. En el teixit tumoral, els nivells d'expressió de survivina elevats s'associen amb nivells alts de diversos gens implicats en el metabolisme de la glucosa en pacients amb CCC. A més, els nivells de survivina tumoral s'associen positivament amb els nivells circulants de glucosa.
9. Els pacients amb CCC en estadis més avançats i els que tenen un pitjor control locoregional de la malaltia tenen nivells més alts de survivina en la mucosa tumoral.
10. Els pacients amb CCC que tenen l'expressió de survivina per sobre de 2,547 tenen fins a 13 vegades més risc de recurrència del tumor.

11. En cèl·lules tumorals de CCC amb fenotip resistent entre baix i mitjà, l'expressió de survivina augmenta després de la radiació i s'associa amb un fenotip protumoral. Altes concentracions de glucosa inhibeixen aquesta regulació de la survivina per la radiació i augmenten la sensibilitat de les cèl·lules irradiades a un agent citotòxic.

CONCLUSIONS EN ANGLÈS

1. ASCs' secretome from patients with obesity favors macrophage polarization towards a protumoral phenotype through a survivin-dependent mechanism.
2. Survivin is mainly expressed in activated macrophages (in both pro and anti-inflammatory phenotypes) and is mostly localized in the nucleus and phosphorylated at Thr34.
3. Survivin can act as an extracellular protein and macrophages can regulate its secretion and internalization.
4. Survivin alters the phenotype and function of macrophages, promoting a hybrid phenotype and a protumoral activity. This regulation is dependent on the phosphorylation at Thr34.
5. Extracellular survivin has a key role in the tumor microenvironment and serves as a molecular link between ASCs, macrophages, and tumor cells.
6. Survivin might be a specific marker of tumor-associated macrophages.
7. In patients with HNSCC, survivin expression levels are upregulated in tumoral mucosa when compared with both peritumoral and healthy mucosa. Furthermore, higher tumoral survivin expression is associated with higher survivin levels in healthy mucosa.
8. Tumor tissue survivin expression levels are associated with glucose metabolism-related genes in patients with HNSCC. Besides, survivin expression in tumoral tissue positively correlates to circulating glucose levels.
9. HNSCC patients with higher tumor stages and with worse locoregional control have an overexpression of tumor tissue survivin compared with patients with less aggressive cancer stages and recurrence.
10. HNSCC patients with survivin expression in tumoral tissue over 2,547 have 13 times higher risk of tumor recurrence.

11. In HNSCC cells with a low-medium radioresistant phenotype, survivin expression increases with radiation and is associated with a protumoral phenotype. High glucose concentration in the medium inhibits survivin regulation by radiation and increases the sensitivity of irradiated cells to a cytotoxic agent.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Ambrosini, G., Adida, C. & Altieri, D. C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* **3**, 917–921 (1997).
2. Sah, N. K. & Seniya, C. Survivin splice variants and their diagnostic significance. *Tumor Biology* **36**, 6623–6631 (2015).
3. Necochea-Campion, R. de, Chen, C. S., Mirshahidi, S., Howard, F. D. & Wall, N. R. Clinico-pathologic relevance of Survivin splice variant expression in cancer. *Cancer Lett* **339**, 167–174 (2013).
4. Fulda, S. & Debatin, K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* **25**, 4798–4811 (2006).
5. Silke, J. & Meier, P. Inhibitor of Apoptosis (IAP) Proteins—Modulators of Cell Death and Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, a008730 (2013).
6. Kumar, S., Fairmichael, C., Longley, D. B. & Turkington, R. C. The Multiple Roles of the IAP Super-family in cancer. *Pharmacol Ther* **214**, 107610 (2020).
7. Rafatmanesh, A. *et al.* The survivin molecule as a double-edged sword in cellular physiologic and pathologic conditions and its role as a potential biomarker and therapeutic target in cancer. *J Cell Physiol* **235**, 725–744 (2019).
8. Martini, E. *et al.* Loss of Survivin in Intestinal Epithelial Progenitor Cells Leads to Mitotic Catastrophe and Breakdown of Gut Immune Homeostasis. *Cell Rep* **14**, 1062–1073 (2016).
9. Warriar, N. M., Agarwal, P. & Kumar, P. Emerging Importance of Survivin in Stem Cells and Cancer: the Development of New Cancer Therapeutics. *Stem Cell Rev Rep* **16**, 828 (2020).
10. Garg, H., Suri, P., Gupta, J. C., Talwar, G. P. & Dubey, S. Survivin: a unique target for tumor therapy. *Cancer Cell Int* **16**, 49 (2016).
11. Wheatley, S. P. & Altieri, D. C. Survivin at a glance. *J Cell Sci* **132**, 7 (2019).
12. Knauer, S. K. *et al.* Nuclear export is essential for the tumor-promoting activity of survivin. *The FASEB Journal* **21**, 207–216 (2007).
13. Meiners, A. *et al.* Specific inhibition of the Survivin–CRM1 interaction by peptide-modified molecular tweezers. *Nat Commun* **12**, 1505 (2021).

14. Ejarque, M. *et al.* Survivin, a key player in cancer progression, increases in obesity and protects adipose tissue stem cells from apoptosis. *Cell Death Dis* **8**, e2802 (2017).
15. Ahn, J. K. *et al.* Increased extracellular survivin in the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients: Fibroblast-like synoviocytes as a potential source of extracellular survivin. *Inflammation* **33**, 381–388 (2010).
16. Akpınar, U., Gur Aksoy, G., Hayran, Y., Firat Oguz, E. & Yalcın, B. Serum levels of survivin in patients with psoriasis and their relation to disease characteristics. *J Cosmet Dermatol* **21**, 1721–1726 (2022).
17. Hebb, A. L. O. *et al.* Expression of the inhibitor of apoptosis protein family in multiple sclerosis reveals a potential immunomodulatory role during autoimmune mediated demyelination. *Multiple sclerosis* **14**, 577–594 (2008).
18. Jeyaprakash, A. A. *et al.* Structure of a Survivin-Borealin-INCENP Core Complex Reveals How Chromosomal Passengers Travel Together. *Cell* **131**, 271–285 (2007).
19. Uren, A. G. *et al.* Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype. *Current Biology* **10**, 1319–1328 (2000).
20. Chen, X., Duan, N., Zhang, C. & Zhang, W. Survivin and Tumorigenesis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. *J Cancer* **7**, 314 (2016).
21. Brentnall, M., Rodriguez-Menocal, L., de Guevara, R. L., Cepero, E. & Boise, L. H. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biol* **14**, 32 (2013).
22. Nogueira-Ferreira, R., Vitorino, R., Ferreira-Pinto, M. J., Ferreira, R. & Henriques-Coelho, T. Exploring the role of post-translational modifications on protein–protein interactions with survivin. *Arch Biochem Biophys* **538**, 64–70 (2013).
23. Verdecia, M. A. *et al.* Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nat Struct Biol* **7**, 602–608 (2000).
24. O'Connor, D. S., Wall, N. R., Porter, A. C. G. & Altieri, D. C. A p34cdc2 survival checkpoint in cancer. *Cancer Cell* **2**, 43–54 (2002).
25. O'Connor, D. S. *et al.* Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13103–13107 (2000).

26. Liu, T., Brouha, B. & Grossman, D. Rapid induction of mitochondrial events and caspase-independent apoptosis in Survivin-targeted melanoma cells. *Oncogene* **23**, 39 (2004).
27. Colnaghi, R. & Wheatley, S. P. Liaisons between survivin and Plk1 during cell division and cell death. *J Biol Chem* **285**, 22592–22604 (2010).
28. Dohi, T., Xia, F. & Altieri, D. C. Compartmentalized phosphorylation of IAP by protein kinase A regulates cytoprotection. *Mol Cell* **27**, 17–28 (2007).
29. Cheung, C. H. A. *et al.* Survivin – biology and potential as a therapeutic target in oncology. *Onco Targets Ther* **6**, 1453 (2013).
30. Wang, H. *et al.* Acetylation Directs Survivin Nuclear Localization to Repress STAT3 Oncogenic Activity. *J Biol Chem* **285**, 36129 (2010).
31. Riolo, M. T. *et al.* Histone deacetylase 6 (HDAC6) deacetylates survivin for its nuclear export in breast cancer. *J Biol Chem* **287**, 10885–10893 (2012).
32. Chen, X. *et al.* Mutant p53 in cancer: from molecular mechanism to therapeutic modulation. *Cell Death & Disease* **2022 13:11** **13**, 1–14 (2022).
33. Knudsen, E. S. *et al.* Pan-cancer molecular analysis of the RB tumor suppressor pathway. *Commun Biol* **3**, 158 (2020).
34. Pu, Z., Wu, G. Z. & Wang, Q. F. Clinicalpathological and prognostic significance of survivin expression in renal cell carcinoma: a meta-analysis. *Oncotarget* **8**, 19825–19833 (2017).
35. Gasowska-Bajger, B., Gasowska-Bodnar, A., Knapp, P. & Bodnar, L. Prognostic Significance of Survivin Expression in Patients with Ovarian Carcinoma: A Meta-Analysis. *J Clin Med* **10**, 879 (2021).
36. Rexhepaj, E. *et al.* Validation of cytoplasmic-to-nuclear ratio of survivin as an indicator of improved prognosis in breast cancer. *BMC Cancer* **10**, 639 (2010).
37. Vay, C. *et al.* Clinicopathological and Prognostic Value of Survivin Expression in Surgically Resected Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancers (Basel)* **14**, 3494 (2022).
38. Zhang, M. *et al.* Prognostic value of survivin in locally advanced prostate cancer: study based on RTOG 8610. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **73**, 1033–1042 (2009).
39. Zhou, L. *et al.* High nuclear Survivin expression as a poor prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Surg Oncol* **118**, 1115–1121 (2018).

40. Li, F., Yang, J., Ramnath, N., Javle, M. M. & Tan, D. Nuclear or cytoplasmic expression of survivin: What is the significance? *Int J Cancer* **114**, 509–512 (2005).
41. Khan, S. *et al.* Localization and upregulation of survivin in cancer health disparities: a clinical perspective. *Biologics* **9**, 57–67 (2015).
42. Huang, Y. H. & Yeh, C. T. Functional Compartmentalization of HSP60-Survivin Interaction between Mitochondria and Cytosol in Cancer Cells. *Cells* **9**, 23 (2019).
43. Song, Z., Yao, X. & Wu, M. Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis. *J Biol Chem* **278**, 23130–23140 (2003).
44. Park, S. H., Shin, I., Park, S. H., Kim, N. D. & Shin, I. An Inhibitor of the Interaction of Survivin with Smac in Mitochondria Promotes Apoptosis. *Chem Asian J* **14**, 4035–4041 (2019).
45. Hagenbuchner, J., Kiechl-Kohlendorfer, U., Obexer, P. & Ausserlechner, M. J. BIRC5/Survivin as a target for glycolysis inhibition in high-stage neuroblastoma. *Oncogene* **35**, 2052–2061 (2016).
46. Townley, A. R. & Wheatley, S. P. Mitochondrial survivin reduces oxidative phosphorylation in cancer cells by inhibiting mitophagy. *J Cell Sci* **133**, jcs247379 (2020).
47. Khan, S. *et al.* Plasma-derived exosomal survivin, a plausible biomarker for early detection of prostate cancer. *PLoS One* **7**, e46737 (2012).
48. Chang, W. H. *et al.* KRAS-dependent cancer cells promote survival by producing exosomes enriched in Survivin. *Cancer Lett* **517**, 66–77 (2021).
49. Gonda, A. *et al.* Exosomal survivin facilitates vesicle internalization. *Oncotarget* **9**, 34919–34934 (2018).
50. Kreger, B. T., Johansen, E. R., Cerione, R. A. & Antonyak, M. A. The Enrichment of Survivin in Exosomes from Breast Cancer Cells Treated with Paclitaxel Promotes Cell Survival and Chemoresistance. *Cancers (Basel)* **8**, 111 (2016).
51. Khan, S. *et al.* Survivin is released from cancer cells via exosomes. *Apoptosis* **16**, 12 (2011).
52. Bennit, H. R. F. *et al.* Natural Killer Cell Phenotype and Functionality Affected by Exposure to Extracellular Survivin and Lymphoma-Derived Exosomes. *Int J Mol Sci* **22**, 1–18 (2021).

53. Nigam, J. *et al.* Expression of serum survivin protein in diagnosis and prognosis of gallbladder cancer: a comparative study. *Medical Oncology* **31**, 167 (2014).
54. No, J. H., Jeon, Y. T., Kim, Y. B. & Song, Y. S. Quantitative Detection of Serum Survivin and Its Relationship with Prognostic Factors in Ovarian Cancer. *Gynecol Obstet Invest* **71**, 136–140 (2011).
55. Fernald, K. & Kurokawa, M. Evading apoptosis in cancer. *Trends Cell Biol* **23**, 620 (2013).
56. Wong, R. S. Y. Apoptosis in cancer: From pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* **30**, 87 (2011).
57. Siffoi-Fernandez, S. *et al.* Functional genomics identify Birc5/survivin as a candidate gene involved in the chromotoxicity of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Cell cycle* **13**, 984–991 (2014).
58. Wilson, W. R. & Hay, M. P. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **11**, 393–410 (2011).
59. Li, W. *et al.* HIF-1 α knockdown by miRNA decreases survivin expression and inhibits A549 cell growth in vitro and in vivo. *Int J Mol Med* **32**, 271–280 (2013).
60. Fernández, J. G. *et al.* Survivin expression promotes VEGF-induced tumor angiogenesis via PI3K/Akt enhanced β -catenin/Tcf-Lef dependent transcription. *Mol Cancer* **13**, 209 (2014).
61. Gao, F. *et al.* Survivin promotes the invasion of human colon carcinoma cells by regulating the expression of MMP-7. *Mol Med Rep* **9**, 825–830 (2014).
62. Li, Z. *et al.* Effects of survivin on angiogenesis in vivo and in vitro. *Am J Transl Res* **8**, 270 (2016).
63. World Health Organization. Obesity. <https://www.who.int/health-topics/obesity> (2021).
64. Centers for Disease Control and Prevention. Childhood Overweight & Obesity. <https://www.cdc.gov/obesity/childhood/index.html> (2022).
65. Nyberg, S. T. *et al.* Obesity and loss of disease-free years owing to major non-communicable diseases: a multicohort study. *Lancet Public Health* **3**, e490–e497 (2018).

66. di Angelantonio, E. *et al.* Body-mass index and all-cause mortality: individual-participant-data meta-analysis of 239 prospective studies in four continents. *Lancet* **388**, 776–786 (2016).
67. World Health Organization. The top 10 causes of death. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (2020).
68. Lauby-Secretan, B. *et al.* Body Fatness and Cancer - Viewpoint of the IARC Working Group. *N Engl J Med* **375**, 794–798 (2016).
69. Romero-Corral, A. *et al.* Accuracy of Body Mass Index to Diagnose Obesity In the US Adult Population. *Int J Obes* **32**, 959–966 (2008).
70. Lear, S. A., Kohli, S., Bondy, G. P., Tchernof, A. & Sniderman, A. D. Ethnic variation in fat and lean body mass and the association with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* **94**, 4696–4702 (2009).
71. Fox, K. A. A., Després, J. P., Richard, A. J., Brette, S. & Deanfield, J. E. Does abdominal obesity have a similar impact on cardiovascular disease and diabetes? A study of 91,246 ambulant patients in 27 European countries. *Eur Heart J* **30**, 3055–3063 (2009).
72. Kissebah, A. H. *et al.* Relation of body fat distribution to metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* **54**, 254–260 (1982).
73. Nuttall, F. Q. Body Mass Index: Obesity, BMI, and Health: A Critical Review. *Nutr Today* **50**, 117–128 (2015).
74. Han, T. S., Sattar, N. & Lean, M. ABC of obesity: Assessment of obesity and its clinical implications. *Br Med J* **333**, 695–698 (2006).
75. Yumani, D. F. J., de Jongh, D., Ket, J. C. F., Lafeber, H. N. & van Weissenbruch, M. M. Body composition in preterm infants: a systematic review on measurement methods. *Pediatr Res* (2022).
76. Perona, J. S. *et al.* Waist Circumference and Abdominal Volume Index Can Predict Metabolic Syndrome in Adolescents, but only When the Criteria of the International Diabetes Federation are Employed for the Diagnosis. *Nutrients* **11**, 1370 (2019).
77. de Nicola, L. & Conte, G. Waist:hip ratio is a better predictor of cardiovascular risk than BMI in patients with moderate CKD. *Nat Clin Pract Nephrol* **4**, 592–593 (2008).
78. Semlitsch, T., Stigler, F. L., Jeitler, K., Horvath, K. & Siebenhofer, A. Management of overweight and obesity in primary care-A systematic overview of international evidence-based guidelines. *Obesity reviews* **20**, 1218–1230 (2019).

79. Navarro-Falcón, M. & Jáuregui-Lobera, I. Tratamiento farmacológico de la obesidad. *Journal of Negative and No Positive Results* **5**, 1464–1469 (2020).
80. Lecube Torelló, A., Freitas, P., Morereo, S., Souto, S. & Tinahones, F. J. Consenso ibérico sobre el tratamiento farmacológico de la obesidad en el paciente adulto: Posicionamiento de las Sociedades Española y Portuguesa para el Estudio de la Obesidad (SEEDO-SPEO) 2018. *BMI-journal* **8**, 2325–2343 (2018).
81. Rubino, F. *et al.* Metabolic Surgery in the Treatment Algorithm for Type 2 Diabetes: A Joint Statement by International Diabetes Organizations. *Diabetes Care* **39**, 861–877 (2016).
82. Gjermeni, E. *et al.* Obesity—An Update on the Basic Pathophysiology and Review of Recent Therapeutic Advances. *Biomolecules* **11**, 1426 (2021).
83. Heymsfield, S. B. & Wadden, T. A. Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity. *New England Journal of Medicine* **376**, 254–266 (2017).
84. González-Muniesa, P. *et al.* Obesity. *Nat Rev Dis Primers* **3**, 17034 (2017).
85. Flier, J. S. Obesity Wars: Molecular Progress Confronts an Expanding Epidemic. *Cell* **116**, 337–350 (2004).
86. Locke, A. E. *et al.* Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature* **518**, 197–206 (2015).
87. Ling, C. & Rönn, T. Epigenetics in Human Obesity and Type 2 Diabetes. *Cell Metab* **29**, 1028–1044 (2019).
88. de Munck, T. J. I., Soeters, P. B. & Koek, G. H. The role of ectopic adipose tissue: benefit or deleterious overflow? *Eur J Clin Nutr* **75**, 38–48 (2020).
89. Virtue, S. & Vidal-Puig, A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome - An allostatic perspective. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* **1801**, 338–349 (2010).
90. Carobbio, S., Pellegrinelli, V. & Vidal-Puig, A. Adipose tissue function and expandability as determinants of lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Adv Exp Med Biol* **960**, 161–196 (2017).
91. Rosen, E. D. & Spiegelman, B. M. What We Talk About When We Talk About Fat. *Cell* **156**, 20–44 (2014).
92. MacMahon, S. *et al.* Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet* **373**, 1083–1096 (2009).

93. Barber, T. M., Kyrou, I., Randeve, H. S. & Weickert, M. O. Mechanisms of Insulin Resistance at the Crossroad of Obesity with Associated Metabolic Abnormalities and Cognitive Dysfunction. *Int J Mol Sci* **22**, 546 (2021).
94. Chiefari, E. *et al.* Insulin Resistance and Cancer: In Search for a Causal Link. *Int J Mol Sci* **22**, 11137 (2021).
95. Rohm, T. v., Meier, D. T., Olefsky, J. M. & Donath, M. Y. Inflammation in obesity, diabetes, and related disorders. *Immunity* **55**, 31–55 (2022).
96. Sakers, A., de Siqueira, M. K., Seale, P. & Villanueva, C. J. Adipose-tissue plasticity in health and disease. *Cell* **185**, 419–446 (2022).
97. Orliaguet, L., Dalmas, E., Drareni, K., Venteclef, N. & Alzaid, F. Mechanisms of Macrophage Polarization in Insulin Signaling and Sensitivity. *Front Endocrinol (Lausanne)* **11**, 62 (2020).
98. Klein, S., Gastaldelli, A., Yki-Järvinen, H. & Scherer, P. E. Why does obesity cause diabetes? *Cell Metab* **34**, 11–20 (2022).
99. Sangwung, P., Petersen, K. F., Shulman, G. I. & Knowles, J. W. Mitochondrial Dysfunction, Insulin Resistance, and Potential Genetic Implications: Potential Role of Alterations in Mitochondrial Function in the Pathogenesis of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Endocrinology* **161**, 1–10 (2020).
100. Besse-Patin, A. & Estall, J. L. An Intimate Relationship between ROS and Insulin Signalling: Implications for Antioxidant Treatment of Fatty Liver Disease. *Int J Cell Biol* **2014**, 519153 (2014).
101. Fryk, E. *et al.* Hyperinsulinemia and insulin resistance in the obese may develop as part of a homeostatic response to elevated free fatty acids: A mechanistic case-control and a population-based cohort study. *EBioMedicine* **65**, 103264 (2021).
102. Cerf, M. E. Beta cell dysfunction and insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)* **4**, 37 (2013).
103. Wondmkun, Y. T. Obesity, Insulin Resistance, and Type 2 Diabetes: Associations and Therapeutic Implications. *Diabetes Metab Syndr Obes* **13**, 3611–3616 (2020).
104. Pierce, J. P. *et al.* Influence of a diet very high in vegetables, fruit, and fiber and low in fat on prognosis following treatment for breast cancer. *JAMA* **298**, 289–298 (2007).
105. Harris, B. H. L. *et al.* Obesity: a perfect storm for carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev* **41**, 491–515 (2022).

106. Lengyel, E., Makowski, L., DiGiovanni, J. & Kolonin, M. G. Cancer as a Matter of Fat: The Crosstalk between Adipose Tissue and Tumors. *Trends Cancer* **4**, 374–384 (2018).
107. Bochet, L. *et al.* Adipocyte-derived fibroblasts promote tumor progression and contribute to the desmoplastic reaction in breast cancer. *Cancer Res* **73**, 5657–5668 (2013).
108. Zoico, E. *et al.* Adipocytes WNT5a mediated dedifferentiation: a possible target in pancreatic cancer microenvironment. *Oncotarget* **7**, 20223–20235 (2016).
109. Ishay-Ronen, D. *et al.* Gain Fat-Lose Metastasis: Converting Invasive Breast Cancer Cells into Adipocytes Inhibits Cancer Metastasis. *Cancer Cell* **35**, 17-32.e6 (2019).
110. Park, J., Euhus, D. M. & Scherer, P. E. Paracrine and endocrine effects of adipose tissue on cancer development and progression. *Endocr Rev* **32**, 550–570 (2011).
111. Dumas, J. F. & Brisson, L. Interaction between adipose tissue and cancer cells: role for cancer progression. *Cancer and Metastasis Reviews* **40**, 31–46 (2020).
112. Zhang, F. & Liu, S. Mechanistic insights of adipocyte metabolism in regulating breast cancer progression. *Pharmacol Res* **155**, 104741 (2020).
113. Quail, D. F. & Dannenberg, A. J. The obese adipose tissue microenvironment in cancer development and progression. *Nat Rev Endocrinol* **15**, 139 (2019).
114. Xia, L. *et al.* The cancer metabolic reprogramming and immune response. *Mol Cancer* **20**, 28 (2021).
115. Ringel, A. E. *et al.* Obesity shapes metabolism in the tumor microenvironment to suppress anti-tumor immunity. *Cell* **183**, 1848 (2020).
116. Singh, A., Mayengbam, S. Singh., Yaduvanshi, H., Wani, M. R. & Bhat, M. Kumar. Obesity Programs Macrophages to Support Cancer Progression. *Cancer Res* **82**, 4303–4312 (2022).
117. Caslin, H. L., Bhanot, M., Bolus, W. R. & Hasty, A. H. Adipose tissue macrophages: Unique polarization and bioenergetics in obesity. *Immunol Rev* **295**, 101–113 (2020).
118. Russo, L. & Lumeng, C. N. Properties and functions of adipose tissue macrophages in obesity. *Immunology* **155**, 407–417 (2018).
119. Himbert, C. *et al.* Signals from the Adipose Microenvironment and the Obesity–Cancer Link—A Systematic Review. *Cancer Prevention Research* **10**, 494–506 (2017).

120. Geeraerts, X., Bolli, E., Fendt, S. M. & van Ginderachter, J. A. Macrophage metabolism as therapeutic target for cancer, atherosclerosis, and obesity. *Front Immunol* **8**, 289 (2017).
121. Zimta, A. A. *et al.* Molecular Links between Central Obesity and Breast Cancer. *Int J Mol Sci* **20**, 5364 (2019).
122. Fukuda, S. & Pelus, L. M. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol Cancer Ther* **5**, 1087–1098 (2006).
123. Gil-Kulik, P. *et al.* Potential involvement of BIRC5 in maintaining pluripotency and cell differentiation of human stem cells. *Oxid Med Cell Longev* **2019**, 8727925 (2019).
124. Ejarque, M. *et al.* Survivin, a key player in cancer progression, increases in obesity and protects adipose tissue stem cells from apoptosis. *Cell Death Dis* **8**, e2802 (2017).
125. Izquierdo, A. G. *et al.* Weight loss normalizes enhanced expression of the oncogene survivin in visceral adipose tissue and blood leukocytes from individuals with obesity. *Int J Obes* **45**, 206–216 (2021).
126. Xu, Y. X. *et al.* Survivin regulated by autophagy mediates hyperglycemia-induced vascular endothelial cell dysfunction. *Exp Cell Res* **364**, 152–159 (2018).
127. Knight, B. B. *et al.* Survivin upregulation, dependent on leptin-EGFR-Notch1 axis, is essential for leptin induced migration of breast carcinoma cells. *Endocr Relat Cancer* **18**, 413–428 (2011).
128. Udoh, U. A. S. *et al.* Tumor-Suppressor Role of the α 1-Na/K-ATPase Signalosome in NASH Related Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci* **23**, 7359 (2022).
129. Izquierdo, A. G. *et al.* Gender Dimorphism in Hepatic Carcinogenesis-Related Gene Expression Associated with Obesity as a Low-Grade Chronic Inflammatory Disease. *Int J Mol Sci* **23**, 15002 (2022).
130. Alimujiang, M. *et al.* Survivin is essential for thermogenic program and metabolic homeostasis in mice. *Mol Metab* **58**, 101446 (2022).
131. Ju, L. *et al.* Enhanced expression of Survivin has distinct roles in adipocyte homeostasis. *Cell Death Dis* **8**, e2533 (2017).
132. Cypess, A. M. Reassessing Human Adipose Tissue. *New England Journal of Medicine* **386**, 768–779 (2022).

133. Bora, P. & Majumdar, A. S. Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: a brief review on biology and translation. *Stem Cell Res Ther* **8**, 145 (2017).
134. Frühbeck, G., Gómez-Ambrosi, J., Muruzábal, F. J. & Burrell, M. A. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280**, E827–E847 (2001).
135. Wu, J. *et al.* Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* **150**, 366–376 (2012).
136. Rosen, E. D. & Spiegelman, B. M. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* **444**, 847–853 (2006).
137. Bradley, D., Xu, A. & Hsueh, W. A. The Immunomodulatory Roles of Adipocytes. *Front Immunol* **12**, 827281 (2021).
138. Schoettl, T., Fischer, I. P. & Ussar, S. Heterogeneity of adipose tissue in development and metabolic function. *J Exp Biol* **221**, jeb162958 (2018).
139. Scheele, C. & Wolfrum, C. Brown Adipose Crosstalk in Tissue Plasticity and Human Metabolism. *Endocr Rev* **41**, 53–65 (2020).
140. Shamsi, F., Wang, C. H. & Tseng, Y. H. The evolving view of thermogenic adipocytes — ontogeny, niche and function. *Nat Rev Endocrinol* **17**, 726–744 (2021).
141. Bartelt, A. *et al.* Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med* **17**, 200–205 (2011).
142. Gavaldà-Navarro, A., Villarroya, J., Cereijo, R., Giralt, M. & Villarroya, F. The endocrine role of brown adipose tissue: An update on actors and actions. *Rev Endocr Metab Disord* **23**, 31–41 (2022).
143. Verkerke, A. R. P. & Kajimura, S. Oil does more than light the lamp: The multifaceted role of lipids in thermogenic fat. *Dev Cell* **56**, 1408–1416 (2021).
144. Yin, X. *et al.* The evolving view of thermogenic fat and its implications in cancer and metabolic diseases. *Signal Transduct Target Ther* **7**, 324 (2022).
145. Ghaben, A. L. & Scherer, P. E. Adipogenesis and metabolic health. *Nat Rev Mol Cell Biol* **20**, 242–258 (2019).
146. Shao, M. *et al.* Cellular Origins of Beige Fat Cells Revisited. *Diabetes* **68**, 1874–1885 (2019).

147. Kaisanlahti, A. & Glumoff, T. Browning of white fat: agents and implications for beige adipose tissue to type 2 diabetes. *J Physiol Biochem* **75**, 1–10 (2019).
148. Park, J. *et al.* Progenitor-like characteristics in a subgroup of UCP1+ cells within white adipose tissue. *Dev Cell* **56**, 985-999.e4 (2021).
149. Zwick, R. K., Guerrero-Juarez, C. F., Horsley, V. & Plikus, M. v. Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue. *Cell Metab* **27**, 68–83 (2018).
150. Karastergiou, K. & Fried, S. K. Cellular mechanisms driving sex differences in adipose tissue biology and body shape in humans and mouse models. *Adv Exp Med Biol* **1043**, 29–51 (2017).
151. Fuster, J. J., Ouchi, N., Gokce, N. & Walsh, K. Obesity-Induced Changes in Adipose Tissue Microenvironment and Their Impact on Cardiovascular Disease. *Circ Res* **118**, 1786–1807 (2016).
152. Tchkonja, T. *et al.* Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots. *Cell Metab* **17**, 644–656 (2013).
153. Karastergiou, K. *et al.* Distinct developmental signatures of human abdominal and gluteal subcutaneous adipose tissue depots. *J Clin Endocrinol Metab* **98**, 362–371 (2013).
154. Wang, Q. A., Tao, C., Gupta, R. K. & Scherer, P. E. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat Med* **19**, 1338–1344 (2013).
155. Jeffery, E., Church, C. D., Holtrup, B., Colman, L. & Rodeheffer, M. S. Rapid depot-specific activation of adipocyte precursor cells at the onset of obesity. *Nat Cell Biol* **17**, 376–385 (2015).
156. Frank, A. P., de Souza Santos, R., Palmer, B. F. & Clegg, D. J. Determinants of body fat distribution in humans may provide insight about obesity-related health risks. *J Lipid Res* **60**, 1710 (2019).
157. Kwok, K. H. M., Lam, K. S. L. & Xu, A. Heterogeneity of white adipose tissue: molecular basis and clinical implications. *Exp Mol Med* **48**, e215 (2016).
158. Altintas, M. M. *et al.* Mast cells, macrophages, and crown-like structures distinguish subcutaneous from visceral fat in mice. *J Lipid Res* **52**, 480–488 (2011).

159. Zhang, M., Hu, T., Zhang, S. & Zhou, L. Associations of Different Adipose Tissue Depots with Insulin Resistance: A Systematic Review and Meta-analysis of Observational Studies. *Sci Rep* **5**, 18495 (2015).
160. Dani, V., Yao, X. & Dani, C. Transplantation of fat tissues and iPSC-derived energy expenditure adipocytes to counteract obesity-driven metabolic disorders: Current strategies and future perspectives. *Rev Endocr Metab Disord* **23**, 103–110 (2022).
161. Huh, J. Y., Park, Y. J., Ham, M. & Kim, J. B. Crosstalk between adipocytes and immune cells in adipose tissue inflammation and metabolic dysregulation in obesity. *Mol Cells* **37**, 365–371 (2014).
162. Tilg, H. & Moschen, A. R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* **6**, 772–783 (2006).
163. Antonopoulos, A. S. *et al.* Reciprocal effects of systemic inflammation and brain natriuretic peptide on adiponectin biosynthesis in adipose tissue of patients with ischemic heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **34**, 2151–2159 (2014).
164. Li, X. *et al.* Mesenchymal/stromal stem cells: necessary factors in tumour progression. *Cell Death Discov* **8**, 333 (2022).
165. Wang, K. *et al.* Paracrine Regulation of Adipose Tissue Macrophages by Their Neighbors in the Microenvironment of Obese Adipose Tissue. *Endocrinology* **163**, 1–8 (2022).
166. Zhao, H. *et al.* Exosomes From Adipose-Derived Stem Cells Attenuate Adipose Inflammation and Obesity Through Polarizing M2 Macrophages and Beiging in White Adipose Tissue. *Diabetes* **67**, 235–247 (2018).
167. Galland, S. & Stamenkovic, I. Mesenchymal stromal cells in cancer: a review of their immunomodulatory functions and dual effects on tumor progression. *J Pathol* **250**, 555–572 (2020).
168. Naji, A. *et al.* Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Cellular and molecular life sciences* **76**, 3323–3348 (2019).
169. Sebo, Z. L. & Rodeheffer, M. S. Assembling the adipose organ: adipocyte lineage segregation and adipogenesis in vivo. *Development* **146**, dev172098 (2019).
170. Bunnell, B. A. *et al.* The effect of obesity on adipose-derived stromal cells and adipose tissue and their impact on cancer. *Cancer Metastasis Rev* **41**, (2022).

171. Ritter, A. *et al.* Subcutaneous and Visceral Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: Commonality and Diversity. *Cells* **8**, 1288 (2019).
172. Wang, Z. *et al.* Single-cell transcriptome atlas of human mesenchymal stem cells exploring cellular heterogeneity. *Clin Transl Med* **11**, e650 (2021).
173. Bourin, P. *et al.* Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: A joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy* **15**, 641–648 (2013).
174. Pachón-Peña, G. *et al.* Stromal Stem Cells From Adipose Tissue and Bone Marrow of Age-Matched Female Donors Display Distinct Immunophenotypic Profiles. *J Cell Physiol* **226**, 843–851 (2011).
175. Nahmgoong, H. *et al.* Distinct properties of adipose stem cell subpopulations determine fat depot-specific characteristics. *Cell Metab* **34**, 458-472.e6 (2022).
176. Cantini, G. *et al.* The Role of Metabolic Changes in Shaping the Fate of Cancer-Associated Adipose Stem Cells. *Front Cell Dev Biol* **8**, 332 (2020).
177. Kim, J. H., Jo, C. H., Kim, H. R. & Hwang, Y. il. Comparison of Immunological Characteristics of Mesenchymal Stem Cells from the Periodontal Ligament, Umbilical Cord, and Adipose Tissue. *Stem Cells Int* **2018**, 8429042 (2018).
178. Serena, C. *et al.* Obesity and Type 2 Diabetes Alters the Immune Properties of Human Adipose Derived Stem Cells. *Stem Cells* **34**, 2559–2573 (2016).
179. Wang, Y., Chen, X., Cao, W. & Shi, Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol* **15**, 1009–1016 (2014).
180. Strong, A. L., Burow, M. E., Gimble, J. M. & Bunnell, B. A. Concise Review: The Obesity Cancer Paradigm: Exploration of the interactions and cross-talk between adipose stem cells and solid tumors. *Stem Cells* **33**, 318 (2015).
181. Song, N., Scholtemeijer, M. & Shah, K. Mesenchymal Stem Cell Immunomodulation: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Trends Pharmacol Sci* **41**, 653–664 (2020).
182. Louwen, F., Ritter, A., Kreis, N. N. & Yuan, J. Insight into the development of obesity: functional alterations of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Obesity Reviews* **19**, 888–904 (2018).

183. Sabol, R. A. *et al.* Therapeutic Potential of Adipose Stem Cells. in *Cell Biology and Translational Medicine, Volume 13: Stem Cells in Development and Disease* (ed. Turksen, K.) vol. 1341 15–25 (Springer International Publishing, 2018).
184. Hoang, D. M. *et al.* Stem cell-based therapy for human diseases. *Signal Transduct Target Ther* **7**, 272 (2022).
185. Gray, S. L. & Vidal-Puig, A. J. Adipose Tissue Expandability in the Maintenance of Metabolic Homeostasis. *Nutr Rev* **65**, S7–S12 (2007).
186. Tang, Q. Q. & Lane, M. D. Adipogenesis: From stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem* **81**, 715–736 (2012).
187. Pachón-Peña, G. *et al.* Obesity Determines the Immunophenotypic Profile and Functional Characteristics of Human Mesenchymal Stem Cells From Adipose Tissue. *Stem Cells Transl Med* **5**, 464–475 (2016).
188. Ejarque, M. *et al.* Diabetes alters the protein secretome of human adipose-derived stem cells and promotes tumorigenesis in hepatic cancer cells. *Clin Transl Med* **12**, e823 (2022).
189. Terrón-Puig, M. *et al.* Glycogen accumulation in adipocyte precursors from elderly and obese subjects triggers inflammation via SIRT1/6 signaling. *Aging Cell* **21**, (2022).
190. Davies, L. C. & Taylor, P. R. Tissue-resident macrophages: then and now. *Immunology* **144**, 541–548 (2015).
191. Nobs, S. P. & Kopf, M. Tissue-resident macrophages: guardians of organ homeostasis. *Trends Immunol* **42**, 495–507 (2021).
192. Chakarov, S., Blériot, C. & Ginhoux, F. Role of adipose tissue macrophages in obesity-related disorders. *J Exp Med* **219**, e20211948 (2022).
193. Epelman, S., Lavine, K. J. & Randolph, G. J. Origin and Functions of Tissue Macrophages. *Immunity* **41**, 21–35 (2014).
194. Hoeffel, G. *et al.* C-Myb+ Erythro-Myeloid Progenitor-Derived Fetal Monocytes Give Rise to Adult Tissue-Resident Macrophages. *Immunity* **42**, 665–678 (2015).
195. Schulz, C. *et al.* A lineage of myeloid cells independent of myb and hematopoietic stem cells. *Science (1979)* **335**, 86–90 (2012).
196. Blériot, C., Chakarov, S. & Ginhoux, F. Determinants of Resident Tissue Macrophage Identity and Function. *Immunity* **52**, 957–970 (2020).

197. Guilliams, M. & Svedberg, F. R. Does tissue imprinting restrict macrophage plasticity? *Nat Immunol* **22**, 118–127 (2021).
198. Lumeng, C. N., Bodzin, J. L. & Saltiel, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* **117**, 175–184 (2007).
199. Nance, S. A., Muir, L. & Lumeng, C. Adipose tissue macrophages: Regulators of adipose tissue immunometabolism during obesity. *Mol Metab* **66**, 101642 (2022).
200. Guilliams, M., Thierry, G. R., Bonnardel, J. & Bajenoff, M. Establishment and Maintenance of the Macrophage Niche. *Immunity* **52**, 434–451 (2020).
201. Wculek, S. K., Dunphy, G., Heras-Murillo, I., Mastrangelo, A. & Sancho, D. Metabolism of tissue macrophages in homeostasis and pathology. *Cell Mol Immunol* **19**, 384–408 (2021).
202. Liu, Y. *et al.* Metabolic reprogramming in macrophage responses. *Biomark Res* **9**, 1–17 (2021).
203. West, A. P. *et al.* TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature* **472**, 476–480 (2011).
204. Li, C. *et al.* Macrophage polarization and Metainflammation. *Translational research* **191**, 29–44 (2018).
205. Kadomoto, S., Izumi, K. & Mizokami, A. Macrophage Polarity and Disease Control. *Int J Mol Sci* **23**, 144 (2022).
206. Xu, L. *et al.* Macrophage Polarization Mediated by Mitochondrial Dysfunction Induces Adipose Tissue Inflammation in Obesity. *Int J Mol Sci* **23**, 9252 (2022).
207. Gundra, U. M. *et al.* Alternatively activated macrophages derived from monocytes and tissue macrophages are phenotypically and functionally distinct. *Blood* **123**, e110–e122 (2014).
208. Qian, B. Z. & Pollard, J. W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* **141**, 39–51 (2010).
209. Catrysse, L. & van Loo, G. Adipose tissue macrophages and their polarization in health and obesity. *Cell Immunol* **330**, 114–119 (2018).
210. Guerreiro, V. A., Carvalho, D. & Freitas, P. Obesity, Adipose Tissue, and Inflammation Answered in Questions. *J Obes* **2022**, 2252516 (2022).
211. Grabner, G. F., Xie, H., Schweiger, M. & Zechner, R. Lipolysis: cellular mechanisms for lipid mobilization from fat stores. *Nat Metab* **3**, 1445–1465 (2021).

212. Spalding, K. L. *et al.* Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* **453**, 783–787 (2008).
213. Kahn, C. R., Wang, G. & Lee, K. Y. Altered adipose tissue and adipocyte function in the pathogenesis of metabolic syndrome. *J Clin Invest* **129**, 3990 (2019).
214. Scheja, L. & Heeren, J. The endocrine function of adipose tissues in health and cardiometabolic disease. *Nat Rev Endocrinol* **15**, 507–524 (2019).
215. Xiao, L. *et al.* Large adipocytes function as antigen-presenting cells to activate CD4(+) T cells via upregulating MHCII in obesity. *Int J Obes* **40**, 112–120 (2016).
216. Ceccarelli, S., Pontecorvi, P., Anastasiadou, E., Napoli, C. & Marchese, C. Immunomodulatory Effect of Adipose-Derived Stem Cells: The Cutting Edge of Clinical Application. *Front Cell Dev Biol* **8**, 236 (2020).
217. Franquesa, M. *et al.* Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells abrogate plasmablast formation and induce regulatory B cells independently of T helper cells. *Stem Cells* **33**, 880–891 (2015).
218. Corcione, A. *et al.* Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* **107**, 367–372 (2006).
219. Peng, Y. *et al.* Mesenchymal stromal cells infusions improve refractory chronic graft versus host disease through an increase of CD5+ regulatory B cells producing interleukin 10. *Leukemia* **29**, 636–646 (2015).
220. Sun, M., Sun, L., Huang, C., Chen, B. C. & Zhou, Z. Induction of Macrophage M2b/c Polarization by Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. *J Immunol Res* **2019**, (2019).
221. Kiernan, K. & MacIver, N. J. The Role of the Adipokine Leptin in Immune Cell Function in Health and Disease. *Front Immunol* **11**, 622468 (2021).
222. Flaherty, S. E. *et al.* A lipase-independent pathway of lipid release and immune modulation by adipocytes. *Science (1979)* **363**, 989–993 (2019).
223. Song, J. & Deng, T. The Adipocyte and Adaptive Immunity. *Front Immunol* **11**, (2020).
224. Alzaim, I. *et al.* Adipose tissue immunomodulation: A novel therapeutic approach in cardiovascular and metabolic diseases. *Front Cardiovasc Med* **7**, 277 (2020).
225. Strissel, K. J. *et al.* Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes* **56**, 2910–2918 (2007).

226. Karastergiou, K. & Mohamed-Ali, V. The autocrine and paracrine roles of adipokines. *Mol Cell Endocrinol* **318**, 69–78 (2010).
227. Han, S. J. *et al.* The white adipose tissue is a reservoir for memory T cells that promotes protective memory responses to infection. *Immunity* **47**, 1168 (2017).
228. Zhang, L. J. *et al.* Dermal adipocytes protect against invasive *Staphylococcus aureus* skin infection. *Science (1979)* **347**, 71 (2015).
229. Lackey, D. E. & Olefsky, J. M. Regulation of metabolism by the innate immune system. *Nat Rev Endocrinol* **12**, 15–28 (2016).
230. Thomas, D. & Apovian, C. Macrophage functions in lean and obese adipose tissue. *Metabolism* **72**, 120 (2017).
231. Chan, P. C. & Hsieh, P. S. The Chemokine Systems at the Crossroads of Inflammation and Energy Metabolism in the Development of Obesity. *Int J Mol Sci* **22**, 13528 (2021).
232. Crewe, C., An, Y. A. & Scherer, P. E. The ominous triad of adipose tissue dysfunction: inflammation, fibrosis, and impaired angiogenesis. *J Clin Invest* **127**, 74–82 (2017).
233. Halberg, N. *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 α induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue. *Mol Cell Biol* **29**, 4467–4483 (2009).
234. Lu, J., Zhao, J., Meng, H. & Zhang, X. Adipose tissue-resident immune cells in obesity and type 2 diabetes. *Front Immunol* **10**, 1173 (2019).
235. Thapa, B. & Lee, K. Metabolic influence on macrophage polarization and pathogenesis. *BMB Rep* **52**, 360 (2019).
236. Park, M. D., Silvin, A., Ginhoux, F. & Merad, M. Macrophages in health and disease. *Cell* **185**, 4259–4279 (2022).
237. Zhang, Y. *et al.* Stromal Progenitor Cells from Endogenous Adipose Tissue Contribute to Pericytes and Adipocytes That Populate the Tumor Microenvironment. *Cancer Res* **72**, 5198–5208 (2012).
238. Juntunen, M. *et al.* Evaluation of the effect of donor weight on adipose stromal/stem cell characteristics by using weight-discordant monozygotic twin pairs. *Stem Cell Res Ther* **12**, 516 (2021).
239. Wang, Y. X. *et al.* Friend or foe: Multiple roles of adipose tissue in cancer formation and progression. *J Cell Physiol* **234**, 21436–21449 (2019).
240. Laurent, V. *et al.* Periprostatic adipocytes act as a driving force for prostate cancer progression in obesity. *Nat Commun* **7**, 10230 (2016).

241. Zhao, C. *et al.* Cancer-associated adipocytes: emerging supporters in breast cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* **39**, 156 (2020).
242. Khandekar, M. J., Cohen, P. & Spiegelman, B. M. Molecular mechanisms of cancer development in obesity. *Nat Rev Cancer* **11**, 886–895 (2011).
243. Attané, C. & Muller, C. Drilling for Oil: Tumor-Surrounding Adipocytes Fueling Cancer. *Trends Cancer* **6**, 593–604 (2020).
244. Balaban, S. *et al.* Adipocyte lipolysis links obesity to breast cancer growth: adipocyte-derived fatty acids drive breast cancer cell proliferation and migration. *Cancer Metab* **5**, 2017 (2017).
245. Balaban, S. *et al.* Extracellular fatty acids are the major contributor to lipid synthesis in prostate cancer. *Molecular Cancer Research* **17**, 949–962 (2019).
246. Cheng, C., Geng, F., Cheng, X. & Guo, D. Lipid metabolism reprogramming and its potential targets in cancer. *Cancer Commun* **38**, 27 (2018).
247. Gyamfi, J., Kim, J. & Choi, J. Cancer as a Metabolic Disorder. *Int J Mol Sci* **23**, 1155 (2022).
248. Koundouros, N. & Pouligiannis, G. Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer. *Br J Cancer* **122**, 4–22 (2019).
249. Ghosh-Choudhary, S., Liu, J. & Finkel, T. Metabolic Regulation of Cell Fate and Function. *Trends Cell Biol* **30**, 201–212 (2020).
250. Sabol, R. A., Giacomelli, P., Beighley, A. & Bunnell, B. A. Adipose Stem Cells and Cancer: Concise Review. *Stem Cells* **37**, 1261–1266 (2019).
251. Ridge, S. M., Sullivan, F. J. & Glynn, S. A. Mesenchymal stem cells: key players in cancer progression. *Mol Cancer* **16**, 31 (2017).
252. Zhang, Y. *et al.* White Adipose Tissue Cells Are Recruited by Experimental Tumors and Promote Cancer Progression in Mouse Models. *Cancer Res* **69**, 5259–5266 (2009).
253. Bellows, C. F., Zhang, Y., Chen, J., Frazier, M. L. & Kolonin, M. G. Circulation of progenitor cells in obese and lean colorectal cancer patients. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* **20**, 2461–2468 (2011).
254. Han, Y. *et al.* The secretion profile of mesenchymal stem cells and potential applications in treating human diseases. *Signal Transduct Target Ther* **7**, 92 (2022).

255. Ren, G. *et al.* CCR2-dependent recruitment of macrophages by tumor-educated mesenchymal stromal cells promotes tumor development and is mimicked by TNF α . *Cell Stem Cell* **11**, 812–824 (2012).
256. Robinson, A., Han, C. Z., Glass, C. K. & Pollard, J. W. Monocyte Regulation in Homeostasis and Malignancy. *Trends Immunol* **42**, 104–119 (2021).
257. Christofides, A. *et al.* The complex role of tumor-infiltrating macrophages. *Nat Immunol* **23**, 1148–1156 (2022).
258. Müller, S. *et al.* Single-cell profiling of human gliomas reveals macrophage ontogeny as a basis for regional differences in macrophage activation in the tumor microenvironment. *Genome Biol* **18**, 234 (2017).
259. Vitale, I., Manic, G., Coussens, L. M., Kroemer, G. & Galluzzi, L. Macrophages and Metabolism in the Tumor Microenvironment. *Cell Metab* **30**, 36–50 (2019).
260. Mantovani, A., Marchesi, F., Malesci, A., Laghi, L. & Allavena, P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol* **14**, 399–416 (2017).
261. Lin, Y., Xu, J. & Lan, H. Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: biological roles and clinical therapeutic applications. *J Hematol Oncol* **12**, 76 (2019).
262. Duan, Z. & Luo, Y. Targeting macrophages in cancer immunotherapy. *Signal Transduct Target Ther* **6**, 127 (2021).
263. Radharani, N. N. V. *et al.* Tumor-associated macrophage derived IL-6 enriches cancer stem cell population and promotes breast tumor progression via Stat-3 pathway. *Cancer Cell Int* **22**, 122 (2022).
264. Wei, C. *et al.* Crosstalk between cancer cells and tumor associated macrophages is required for mesenchymal circulating tumor cell-mediated colorectal cancer metastasis. *Mol Cancer* **18**, 64 (2019).
265. Mehla, K. & Singh, P. K. Metabolic Regulation of Macrophage Polarization in Cancer. *Trends Cancer* **5**, 822–834 (2019).
266. Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* **71**, 209–249 (2021).
267. International Agency for Research on Cancer. Cancer Today. <https://gco.iarc.fr/today/home> (2020).

268. Johnson, D. E. *et al.* Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* **6**, 92 (2020).
269. Chow, L. Q. M. Head and Neck Cancer. *New England Journal of Medicine* **382**, 60–72 (2020).
270. Tandon, S. *et al.* Fine-needle aspiration cytology in a regional head and neck cancer center: comparison with a systematic review and meta-analysis. *Head Neck* **30**, 1246–1252 (2008).
271. Huang, S. H. & O'Sullivan, B. Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. *Curr Treat Options Oncol* **18**, 1–13 (2017).
272. Zanoni, D. K., Patel, S. G. & Shah, J. P. Changes in the 8th Edition of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) Staging of Head and Neck Cancer: Rationale and Implications. *Curr Oncol Rep* **21**, 52 (2019).
273. Vilaseca, I., Fuster, G. & Avilés-Jurado, F. X. The impact of diabetes in head and neck cancer. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* **28**, 107–111 (2020).
274. Gormley, A. *et al.* Metabolic disorders and the risk of head and neck cancer: a protocol for a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* **12**, e058392 (2022).
275. Li, W. Q. *et al.* Index-based dietary patterns and risk of head and neck cancer in a large prospective study. *Am J Clin Nutr* **99**, 559–566 (2014).
276. Zhu, L. *et al.* Association between the frequency of tooth brushing and esophageal carcinoma risk: an update systematic review and meta-analysis. *J Gastrointest Oncol* **13**, 499–509 (2022).
277. Kawakita, D. & Matsuo, K. Alcohol and head and neck cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* **36**, 425–434 (2017).
278. Patterson, R. H. *et al.* Global Burden of Head and Neck Cancer: Economic Consequences, Health, and the Role of Surgery. *Otolaryngol Head Neck Surg* **162**, 296–303 (2020).
279. Gillison, M. L., Chaturvedi, A. K., Anderson, W. F. & Fakhry, C. Epidemiology of Human Papillomavirus–Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology* **33**, 3235 (2015).
280. Sharkey Ochoa, I. *et al.* The Role of HPV in Determining Treatment, Survival, and Prognosis of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancers (Basel)* **14**, 4321 (2022).

281. Nam, I.-C. *et al.* Association of smoking status, duration and amount with the risk of head and neck cancer subtypes: a national population-based study. *Am J Cancer Res* **12**, 4815 (2022).
282. Szukalska, M. *et al.* Electronic Cigarettes and Head and Neck Cancer Risk—Current State of Art. *Cancers (Basel)* **12**, 3274 (2020).
283. Agència de Salut Pública de Catalunya. Salut vacunarà contra el virus del papil·loma humà també als nois d'11-12 anys a partir del pròxim curs. <https://salutpublica.gencat.cat/ca/detalls/Article/Salut-vacunara-contra-el-virus-del-papilloma-huma-tambe-als-nois-d11-12-anys-a-partir-del-proxim-curs> (2022).
284. Lee, Y. G. *et al.* Treatment strategy and outcomes in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma: A nationwide retrospective cohort study (KCSG HN13-01). *BMC Cancer* **20**, 813 (2020).
285. Li, Y., Jiang, Y., Qiu, B., Sun, H. & Wang, J. Current radiotherapy for recurrent head and neck cancer in the modern era: a state-of-the-art review. *J Transl Med* **20**, 566 (2022).
286. Parmar, A. *et al.* Interventions for the treatment of oral cavity and oropharyngeal cancer: chemotherapy. *Cochrane Database of Systematic Reviews* CD006386 (2021).
287. Chen, L. *et al.* Concurrent chemoradiotherapy plus adjuvant chemotherapy versus concurrent chemoradiotherapy alone in patients with locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma: a phase 3 multicentre randomised controlled trial. *Lancet Oncol* **13**, 163–171 (2012).
288. Vermorken, J. B. *et al.* Cisplatin, fluorouracil, and docetaxel in unresectable head and neck cancer. *N Engl J Med* **357**, 1695–1704 (2007).
289. Bos, T., Ratti, J. A. & Harada, H. Targeting Stress-Response Pathways and Therapeutic Resistance in Head and Neck Cancer. *Frontiers in Oral Health* **2**, 676643 (2021).
290. Baumann, M. *et al.* Radiation oncology in the era of precision medicine. *Nat Rev Cancer* **16**, 234–249 (2016).
291. Rosenthal, D. I. *et al.* Final Report of a Prospective Randomized Trial to Evaluate the Dose-Response Relationship for Postoperative Radiation Therapy and Pathologic Risk Groups in Patients with Head and Neck Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **98**, 1002 (2017).

292. Ahn, Y. C. Less is more: role of additional chemotherapy to concurrent chemoradiotherapy in locoregionally advanced nasopharyngeal cancer management. *Radiat Oncol J* **37**, 67 (2019).
293. Nishimura, H. *et al.* Radiotherapy for Stage I or II hypopharyngeal carcinoma. *J Radiat Res* **53**, 892 (2012).
294. Anderson, G. *et al.* An Updated Review on Head and Neck Cancer Treatment with Radiation Therapy. *Cancers (Basel)* **13**, (2021).
295. de Ruyscher, D. *et al.* Radiotherapy toxicity. *Nat Rev Dis Primers* **5**, 13 (2019).
296. Brook, I. Late side effects of radiation treatment for head and neck cancer. *Radiat Oncol J* **38**, 84 (2020).
297. Lee, H. *et al.* Tumor Volume Reduction Rate during Adaptive Radiation Therapy as a Prognosticator for Nasopharyngeal Cancer. *Cancer Res Treat* **48**, 537–545 (2016).
298. Yang, H. *et al.* Replanning during intensity modulated radiation therapy improved quality of life in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **85**, e47–e54 (2013).
299. Figen, M. *et al.* Radiotherapy for Head and Neck Cancer: Evaluation of Triggered Adaptive Replanning in Routine Practice. *Front Oncol* **10**, 2427 (2020).
300. Golusiński, W. Functional organ preservation surgery in head and neck cancer: Transoral robotic surgery and beyond. *Front Oncol* **9**, 293 (2019).
301. Machiels, J. P. *et al.* Squamous cell carcinoma of the oral cavity, larynx, oropharynx and hypopharynx: EHNS–ESMO–ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Annals of Oncology* **31**, 1462–1475 (2020).
302. Ghosh, S., Shah, P. A. & Johnson, F. M. Novel Systemic Treatment Modalities Including Immunotherapy and Molecular Targeted Therapy for Recurrent and Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci* **23**, 7889 (2022).
303. Pereira, D., Martins, D. & Mendes, F. Immunotherapy in Head and Neck Cancer When, How, and Why? *Biomedicines* **10**, 2151 (2022).
304. Hashibe, M. *et al.* Tobacco, alcohol, body mass index, physical activity, and the risk of head and neck cancer in the prostate, lung, colorectal, and ovarian (PLCO) cohort. *Head Neck* **35**, 914–922 (2013).

305. Grossberg, A. J. *et al.* Association of Body Composition With Survival and Locoregional Control of Radiotherapy-Treated Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *JAMA Oncol* **2**, 782–789 (2016).
306. Hicks, D. F. *et al.* Impact of obesity on outcomes for patients with head and neck cancer. *Oral Oncol* **83**, 11–17 (2018).
307. Iyengar, N. M. *et al.* Impact of obesity on the survival of patients with early-stage squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Cancer* **120**, 983–991 (2014).
308. Hu, Q. *et al.* Obesity and genes related to lipid metabolism predict poor survival in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* **89**, 14–22 (2019).
309. Iyengar, N. M. *et al.* White Adipose Tissue Inflammation and Cancer Specific Survival in Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Oral Tongue. *Cancer* **122**, 3794 (2016).
310. Peng, J. *et al.* Diet-induced obesity accelerates oral carcinogenesis by recruitment and functional enhancement of myeloid-derived suppressor cells. *Cell Death Dis* **12**, 946 (2021).
311. Choi, S. Y. *et al.* Metabolic Diseases and Risk of Head and Neck Cancer: A Cohort Study Analyzing Nationwide Population-Based Data. *Cancers (Basel)* **14**, 3277 (2022).
312. Kuo, H. C., Chang, P. H. & Wang, C. H. Impact of Diabetes Mellitus on Head and Neck Cancer Patients Undergoing Concurrent Chemoradiotherapy. *Sci Rep* **10**, 7702 (2020).
313. Hsieh, Y. T., Chen, Y. F., Lin, S. C., Chang, K. W. & Li, W. C. Targeting Cellular Metabolism Modulates Head and Neck Oncogenesis. *Int J Mol Sci* **20**, 3960 (2019).
314. Kamat, R. D., Dhupar, V., Akkara, F. & Shetye, O. A comparative analysis of odontogenic maxillofacial infections in diabetic and nondiabetic patients: an institutional study. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg* **41**, 176 (2015).
315. Alexander, M., Krishnan, B. & Shenoy, N. Diabetes mellitus and odontogenic infections--an exaggerated risk? *Oral Maxillofac Surg* **12**, 129–130 (2008).
316. Jiang, H. *et al.* The effect of metabolic syndrome on head and neck cancer incidence risk: a population-based prospective cohort study. *Cancer Metab* **9**, 25 (2021).
317. Griso, A. B., Acero-Riaguas, L., Castelo, B., Cebrián-Carretero, J. L. & Sastre-Perona, A. Mechanisms of Cisplatin Resistance in HPV Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Cells* **11**, 561 (2022).

318. Senga, S. S. & Grose, R. P. Hallmarks of cancer-the new testament. *Open Biol* **11**, 200358 (2021).
319. Hay, N. Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? *Nat Rev Cancer* **16**, 635–649 (2016).
320. Soga, T. Cancer metabolism: key players in metabolic reprogramming. *Cancer Sci* **104**, 275–281 (2013).
321. Warburg, O., Wind, F. & Negelein, E. The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol* **8**, 519–530 (1927).
322. Pascale, R. M., Calvisi, D. F., Simile, M. M., Feo, C. F. & Feo, F. The Warburg Effect 97 Years after Its Discovery. *Cancers (Basel)* **12**, 2819 (2020).
323. Wang, Y. *et al.* Identification of Metabolism-Associated Biomarkers for Early and Precise Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Biomolecules* **12**, 400 (2022).
324. Worsley, C. M., Veale, R. B. & Mayne, E. S. The acidic tumour microenvironment: Manipulating the immune response to elicit escape. *Hum Immunol* **83**, 399–408 (2022).
325. Bagué, S. *et al.* Prognostic capacity of the transcriptional expression of lactate dehydrogenase A in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* **44**, 2505–2512 (2022).
326. Chen, L. X. *et al.* Six Glycolysis-Related Genes as Prognostic Risk Markers Can Predict the Prognosis of Patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Biomed Res Int* **2021**, 8824195 (2021).
327. Terra, X. *et al.* Succinate Pathway in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Potential as a Diagnostic and Prognostic Marker. *Cancers (Basel)* **13**, 1653 (2021).
328. Li, Z. & Zhang, H. Reprogramming of glucose, fatty acid and amino acid metabolism for cancer progression. *Cellular and molecular life sciences* **73**, 377–392 (2016).
329. Heiden, M. G. V., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science (1979)* **324**, 1029–1033 (2009).
330. Marcucci, F., Stassi, G. & de Maria, R. Epithelial–mesenchymal transition: a new target in anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **15**, 311–325 (2016).
331. Snezhkina, A. *v et al.* ROS Generation and Antioxidant Defense Systems in Normal and Malignant Cells. *Oxid Med Cell Longev* **2019**, 6175804 (2019).

332. Nile, D. L. *et al.* Inhibition of glycolysis and mitochondrial respiration promotes radiosensitisation of neuroblastoma and glioma cells. *Cancer Metab* **9**, 24 (2021).
333. Pizem, J., Cör, A. & Gale, N. Survivin expression is a negative prognostic marker in laryngeal squamous cell carcinoma and is associated with p53 accumulation. *Histopathology* **45**, 180–186 (2004).
334. Io Muzio, L. *et al.* Survivin as prognostic factor in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer Lett* **225**, 27–33 (2005).
335. Io Muzio, L. *et al.* Expression of the apoptosis inhibitor survivin in aggressive squamous cell carcinoma. *Exp Mol Pathol* **70**, 249–254 (2001).
336. Angelin, D. & Nair, B. Comparative evaluation of survivin expression in leukoplakia, lichen planus, and oral squamous cell carcinoma: An immunohistochemical study. *J Cancer Res Ther* **16**, 569 (2020).
337. Münscher, A. *et al.* Survivin expression in head and neck squamous cell carcinomas is frequent and correlates with clinical parameters and treatment outcomes. *Clin Oral Investig* **23**, 361–367 (2019).
338. Pansini, P. F. *et al.* Differential Expression of Potential Biomarkers of Oral Squamous Cell Carcinoma Development. *Head Neck Pathol* **15**, 1127–1136 (2021).
339. Su, L., Wang, Y., Xiao, M., Lin, Y. & Yu, L. Up-regulation of survivin in oral squamous cell carcinoma correlates with poor prognosis and chemoresistance. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology* **110**, 484–491 (2010).
340. Zhou, L. qing, Hu, Y. & Xiao, H. jun. The prognostic significance of survivin expression in patients with HNSCC: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* **21**, 424 (2021).
341. Xie, W., Yan, O., Liu, F., Han, Y. & Wang, H. Prognostic Value of Survivin in Nasopharyngeal Carcinoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Cancer* **12**, 4399 (2021).
342. Khan, Z. *et al.* Detection of survivin and p53 in human oral cancer: Correlation with clinicopathologic findings. *Head Neck* **31**, 1039–1048 (2009).
343. Marioni, G., D'Alessandro, E., Bertolin, A. & Staffieri, A. Survivin multifaceted activity in head and neck carcinoma: Current evidence and future therapeutic challenges. *Acta Otolaryngol* **130**, 4–9 (2010).

344. Khan, Z., Khan, A. A., Yadav, H., Prasad, G. B. K. S. & Bisen, P. S. Survivin, a molecular target for therapeutic interventions in squamous cell carcinoma. *Cell Mol Biol Lett* **22**, 8 (2017).
345. Engels, K. *et al.* Dynamic intracellular survivin in oral squamous cell carcinoma: Underlying molecular mechanism and potential as an early prognostic marker. *Journal of Pathology* **211**, 532–540 (2007).
346. Khan, S. A. *et al.* Survivin expression and impact on head and neck cancer outcomes. *Oral Oncol* **112**, (2021).
347. Kelly, R. J., Lopez-Chavez, A., Citrin, D., Janik, J. E. & Morris, J. C. Impacting tumor cell-fate by targeting the inhibitor of apoptosis protein survivin. *Mol Cancer* **10**, 35 (2011).
348. Satoh, T. *et al.* Phase I study of YM155, a novel survivin suppressant, in patients with advanced solid tumors. *Clinical Cancer Research* **15**, 3872–3880 (2009).
349. Perri, F. *et al.* Radioresistance in head and neck squamous cell carcinoma: Biological bases and therapeutic implications. *Head Neck* **37**, 763–770 (2015).
350. Marioni, G. *et al.* Relationship between anti-apoptotic proteins survivin and Bcl-2, and response to treatment in patients undergoing post-operative RT for laryngeal cancer: A pilot study. *Journal of Oral Pathology and Medicine* **42**, 339–344 (2013).
351. Khan, Z. *et al.* Growth inhibition and chemo-radiosensitization of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) by survivin-siRNA lentivirus. *Radiotherapy and Oncology* **118**, 359–368 (2015).
352. Hu, J., Pan, J., Luo, Z. & Tao, Z. Downregulation of Survivin by shRNA Inhibits Invasion and Enhances the Radiosensitivity of Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Cell Biochem Biophys* **72**, 251–257 (2015).
353. Zhou, C., Zhang, L. & Xu, P. Growth inhibition and chemo-radiosensitization of esophageal squamous cell carcinoma by survivin-shRNA lentivirus transfection. *Oncol Lett* **16**, 4813 (2018).
354. Zhou, J., Guo, X., Chen, W., Wang, L. & Jin, Y. Targeting survivin sensitizes cervical cancer cells to radiation treatment. *Bioengineered* **11**, 130 (2020).
355. Liu, X. *et al.* Inhibition of survivin enhances radiosensitivity of esophageal cancer cells by switching radiation-induced senescence to apoptosis. *Oncotargets Ther* **11**, 3087 (2018).

356. Rödel, F. *et al.* The Role of Survivin for Radiation Oncology: Moving Beyond Apoptosis Inhibition. *Curr Med Chem* **18**, 191–199 (2011).
357. Farnebo, L. *et al.* Strong expression of survivin is associated with positive response to radiotherapy and improved overall survival in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Int J Cancer* **133**, 1994–2003 (2013).
358. Fukuda, S. & Pelus, L. M. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol Cancer Ther* **5**, 1087–1098 (2006).
359. Freese, K. E. *et al.* Adipose-derived stems cells and their role in human cancer development, growth, progression, and metastasis: A systematic review. *Cancer Res* **75**, 1161–1168 (2015).
360. Donohoe, C. L., Lysaght, J., O'Sullivan, J. & Reynolds, J. v. Emerging Concepts Linking Obesity with the Hallmarks of Cancer. *Trends in Endocrinology and Metabolism* vol. 28 46–62 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.08.004> (2017).
361. Smith, T. D., Tse, M. J., Read, E. L. & Liu, W. F. Regulation of macrophage polarization and plasticity by complex activation signals. *Integrative Biology* **8**, 946–955 (2016).
362. Raggi, C., Mousa, H. S., Correnti, M., Sica, A. & Invernizzi, P. Cancer stem cells and tumor-associated macrophages: A roadmap for multitargeting strategies. *Oncogene* vol. 35 671–682 Preprint at <https://doi.org/10.1038/onc.2015.132> (2016).
363. Guilloton, F. *et al.* Mesenchymal stromal cells orchestrate follicular lymphoma cell niche through the CCL2-dependent recruitment and polarization of monocytes. *Blood* **119**, 2556–2567 (2012).
364. Liang, W. *et al.* Mesenchymal stem cells as a double-edged sword in tumor growth: focusing on MSC-derived cytokines. *Cell Mol Biol Lett* **26**, 3 (2021).
365. Mantovani, A., Allavena, P., Marchesi, F. & Garlanda, C. Macrophages as tools and targets in cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* **21**, 799–820 (2022).
366. National Center for Biotechnology Information. Gene Expression Omnibus. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE27792> (2015).
367. Stauber, R. H., Mann, W. & Knauer, S. K. Nuclear and Cytoplasmic Survivin: Molecular Mechanism, Prognostic, and Therapeutic Potential. *Cancer Res* **67**, 5999–6002 (2007).
368. Zhang, M., Yang, J. & Li, F. Transcriptional and posttranscriptional controls of survivin in cancer cells: Essential interfaces for developing novel approaches for cancer treatment. *Journal of experimental & clinical cancer research* **25**, 391 (2006).

369. Wall, N. R., O'connor, D. S., Plescia, J., Pommier, Y. & Altieri, D. C. Suppression of Survivin Phosphorylation on Thr 34 by Flavopiridol Enhances Tumor Cell Apoptosis 1. *Cancer Res* **63**, 230–235 (2003).
370. Altieri, D. C. Survivin and apoptosis control. *Adv Cancer Res* **88**, 31–52 (2003).
371. Chen, F. *et al.* New horizons in tumor microenvironment biology: Challenges and opportunities. *BMC Med* **13**, 45 (2015).
372. Mantovani, A. MSCs, Macrophages, and cancer: A dangerous Ménage-à-Trois. *Cell Stem Cell* **11**, 730–732 (2012).
373. Guillaume, V. G. J., Ruhl, T., Boos, A. M. & Beier, J. P. The Crosstalk Between Adipose-Derived Stem or Stromal Cells (ASC) and Cancer Cells and ASC-Mediated Effects on Cancer Formation and Progression-ASCs: Safety Hazard or Harmless Source of Tropism? *Stem Cells Transl Med* **11**, 394–406 (2022).
374. Hillers, L. E., D'Amato, J. v., Chamberlin, T., Paderta, G. & Arendt, L. M. Obesity-Activated Adipose-Derived Stromal Cells Promote Breast Cancer Growth and Invasion. *Neoplasia* **20**, 1161 (2018).
375. di Franco, S. *et al.* Adipose stem cell niche reprograms the colorectal cancer stem cell metastatic machinery. *Nature Communications* 2021 12:1 **12**, 5006 (2021).
376. Cassetta, L. *et al.* Human Tumor-Associated Macrophage and Monocyte Transcriptional Landscapes Reveal Cancer-Specific Reprogramming, Biomarkers, and Therapeutic Targets. *Cancer Cell* **35**, 588-602.e10 (2019).
377. Cook, J. & Hagemann, T. Tumour-associated macrophages and cancer. *Current Opinion in Pharmacology* vol. 13 595–601 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.coph.2013.05.017> (2013).
378. Huang, L. L., Xia, H. H. X. & Zhu, S. L. Ascitic Fluid Analysis in the Differential Diagnosis of Ascites: Focus on Cirrhotic Ascites. *J Clin Transl Hepatol* **2**, 58 (2014).
379. Almeida-Nunes, D. L., Mendes-Frias, A., Silvestre, R., Dinis-Oliveira, R. J. & Ricardo, S. Immune Tumor Microenvironment in Ovarian Cancer Ascites. *Int J Mol Sci* **23**, 10692 (2022).
380. Hutchinson, M. K. N. D., Mierzwa, M. & D'Silva, N. J. Radiation resistance in head and neck squamous cell carcinoma: dire need for an appropriate sensitizer. *Oncogene* **39**, 3638–3649 (2020).

381. Mittal, A. *et al.* Radiotherapy-induced metabolic hallmarks in the tumor microenvironment. *Trends in Cancer* vol. 8 855–869 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2022.05.005> (2022).
382. Tang, L. *et al.* Role of metabolism in cancer cell radioresistance and radiosensitization methods. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* **37**, 1–15 (2018).
383. van Gisbergen, M. W., Zwilling, E. & Dubois, L. J. Metabolic Rewiring in Radiation Oncology Toward Improving the Therapeutic Ratio. *Front Oncol* **11**, (2021).
384. Figueiredo, R. A. de O. *et al.* Diabetes mellitus, metformin and head and neck cancer. *Oral Oncol* **61**, 47–54 (2016).
385. Alshehri, A. A., Thomas, R. A., Wen, S. & Monga, M. Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), diabetes mellitus (DM), and metformin. *Journal of Clinical Oncology* **32**, (2014).
386. Wozny, A. S. *et al.* Differential pattern of HIF-1 α expression in HNSCC cancer stem cells after carbon ion or photon irradiation: one molecular explanation of the oxygen effect. *Br J Cancer* **116**, 1340–1349 (2017).
387. Meijer, T. W. H., Kaanders, J. H. A. M., Span, P. N. & Bussink, J. Targeting hypoxia, HIF-1, and tumor glucose metabolism to improve radiotherapy efficacy. *Clinical cancer research* **18**, 5585–5594 (2012).
388. Erlandsson, M. C. *et al.* Chromatin binding of survivin regulates glucose metabolism in the IFN- γ producing CD4⁺ T cells. *bioRxiv* 2021.10.05.463166 (2021) doi:10.1101/2021.10.05.463166.
389. Jin, P. Y. *et al.* Roles of β -catenin, TCF-4, and survivin in nasopharyngeal carcinoma: correlation with clinicopathological features and prognostic significance. *Cancer Cell Int* **19**, 48 (2019).
390. Liu, S. *et al.* Nuclear survivin promoted by acetylation is associated with the aggressive phenotype of oral squamous cell carcinoma. *Cell cycle* **16**, 894–902 (2017).
391. Santarelli, A. *et al.* Survivin-based treatment strategies for squamous cell carcinoma. *Int J Mol Sci* **19**, (2018).
392. Fu, S. M., Xu, M. X., Lin, S. M., Liang, Z. & Cai, J. H. Association of cyclin D1 and survivin expression with sensitivity to radiotherapy in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Genetics and Molecular Research* **13**, 3502–3509 (2014).

393. Bian, C. *et al.* Targeting Mitochondrial Metabolism to Reverse Radioresistance: An Alternative to Glucose Metabolism. *Antioxidants* **11**, 2202 (2022).
394. Dai, W. *et al.* GLUT3 induced by AMPK/CREB1 axis is key for withstanding energy stress and augments the efficacy of current colorectal cancer therapies. *Signal Transduct Target Ther* **5**, 177 (2020).
395. Tsai, T. H. *et al.* Overexpression of GLUT3 promotes metastasis of triple-negative breast cancer by modulating the inflammatory tumor microenvironment. *J Cell Physiol* **236**, 4669–4680 (2021).
396. Cai, H. *et al.* LDHA Promotes Oral Squamous Cell Carcinoma Progression Through Facilitating Glycolysis and Epithelial–Mesenchymal Transition. *Front Oncol* **9**, 1446 (2019).

PUBLICACIONS OBTINGUDES DURANT LA TESI DOCTORAL

COMUNICACIONS A CONGRESSOS

Títol: Role of survivin on radioresistance and metabolism in the context of head and neck squamous cell carcinoma

Autors: Ester Benaiges, Victoria Ceperuelo-Mallafré, Sandra Guaita, Ana Madeira, Joan Vendrell, Francesc Xavier Avilés, Sonia Fernández-Veledo

Tipus de participació: Pòster

Congrés: The biochemistry Global Summit: 25th IUBMB – 46th FEBS – 15th PABMB Congress. Lisboa 09/07/2022 - 14/07/2022

Títol: Obesity induces protumoral programming of macrophages by a survivin dependent mechanism

Autors: Ester Benaiges, Victoria Ceperuelo-Mallafré, Ana Madeira, Ramon Bosch, Cati Núñez, Míriam Ejarque, Elsa Maymó, Isabel Huber, Marylene Lejeune, Joan Vendrell, Sonia Fernández-Veledo

Tipus de participació: Pòster

Congrés: FEBS 2021, the 45th FEBS Congress. Ljubljana (online) 03/07/2021 - 08/07/2021

Títol: Adipose-derived survivin as molecular link between obesity and cancer

Autors: Ester Benaiges, Victoria Ceperuelo-Mallafré, Míriam Ejarque, Elsa Maymó, Ana Madeira, Joan Vendrell, Sonia Fernández-Veledo

Tipus de participació: Comunicació oral. Premi a millor comunicació oral de l'àrea bàsica i translacional

Congrés: XV Congreso Nacional de la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO). Vigo 13/03/2019 – 15/03/2019

Títol: Adipose-derived survivin as molecular link between obesity and cancer

Autors: Ester Benaiges, Victoria Ceperuelo-Mallafre, Míriam Ejarque, Elsa Maymó-Masip, Joan Vendrell, Sonia Fernández-Veledo

Tipus de participació: Pòster

Congrés: 6th DZD Diabetes Research School of the German Center of Diabetes Research (DZD). Berlin 29/09/2018 - 01/10/2018

ARTICLES CIENTÍFICS

Articles derivats de la tesi doctoral:

Títol: Survivin drives tumor-associated macrophage reprogramming: a novel mechanism with potential impact for obesity

Autors: **Benaiges E**; Ceperuelo-Mallafré V; Madeira A; Bosch R; Núñez-Roa C; Ejarque M; Maymó-Masip E; Huber-Ruano I; Lejeune M; Vendrell J; Fernández-Veledo S.

Revista científica: Cellular Oncology

doi: 10.1007/s13402-021-00597-x.

Posició autoria: 1/11

Estat: publicat online 12/03/2021

Índex d'impacte: Patologia 9/77 (Q1) - Factor d'impacte: 7,051

Títol: Survivin/BIRC5 as a novel molecular effector at the crossroads of glucose metabolism and radioresistance in head and neck squamous cell carcinoma

Autors: **Benaiges E**; Ceperuelo-Mallafré V; Guaita S; Maymó-Masip E; Madeira A; Gómez D; Hernández V; Vilaseca I; Merma C; León X; Terra X; Vendrell J; Avilés-Jurado FX; Fernández-Veledo S.

Revista científica: JAMA Otolaryngology-Head & Neck Surgery

Posició autoria: 1/14

Estat: enviat

Índex d'impacte: Otorrinolaringologia - 1/43 (D1) - Factor d'impacte: 8,961

Altres col·laboracions durant la tesi doctoral

Títol: Diabetes alters the protein secretome of human adipose-derived stem cells and promotes tumorigenesis in hepatic cancer cells

Autors: Ejarque M; Sabadell-Basallote J; **Benaiges E**; Núñez-Roa C; Sabido E; Borrás E; Llacer E; Zorzano A; Vendrell J; Fernández-Veledo S.

Revista científica: Clinical and Translational Medicine

doi: 10.1002/ctm2.823

Posició autoria: 2/9

Estat: publicat online 02/06/2022

Índex d'impacte: Oncologia - 41/245 (Q1) - Factor d'impacte 2021: 8,554

Títol: Stem cells from inducible brown adipose tissue as an anti-obesity therapy

Autors: Calvo E; Keiran N; Núñez-Roa C; Maymó-Masip E; Ejarque M; Sabadell-Basallote J; Rodríguez M; Ceperuelo-Mallafré V; **Benaiges E**; Michalopoulou T; Jorba J; Vendrell J; Fernández-Veledo S.

Referència: Scientific Reports 2021, 11:13923

doi: 10.1038/s41598-021-93224-6

Posició autoria: 9/13

Estat: publicat online 06/07/2021

Índex d'impacte: Ciències Multidisciplinars - 19/74 (Q2) - Factor d'impacte: 4,997

Títol: Succinate pathway in head and neck squamous cell carcinoma: Potential as a diagnostic and prognostic marker

Autors: Terra X; Ceperuelo-Mallafre V; Merma C; **Benaiges E**; Bosch R; Castillo P; Flores JC; León X; Valduvico I; Basté N; Cámara M; Lejeune M; Gumà J; Vendrell J; Vilaseca I; Fernández-Veledo S; Avilés-Jurado FX

Referència: Cancers 2021, 13(7):1653

doi: 10.3390/cancers13071653

Posició autoria: 3/17

Estat: publicat online 01/04/2021

Índex d'impacte: Oncologia – 60/245 (Q1) - Factor d'impacte: 6,575

Títol: Circulating microRNAs modulating glycolysis as non-invasive prognostic biomarkers of HNSCC

Autors: Avilés-Jurado FX; Muñoz C; Meler C; Flores JC; Gumà J; **Benaiges E**; Mora J; Camacho M; León X; Vilaseca I; Terra X

Revista científica: European Archives of Oto-Rhino-Laryngology

doi: 10.1007/s00405-020-06240-z

Posició autoria: 6/11

Estat: publicat online 31/07/2020

Índex d'impacte: Otorrinolaringologia – 12/43 (Q2) - Factor d'impacte: 3,236

Títol: Preoperative circulating succinate levels as a biomarker for diabetes remission after bariatric surgery

Autors: Ceperuelo-Mallafre V; Llauradó G; Keiran N; **Benaiges E**; Astiarraga B; Martínez L; Pellitero S; González-Clemente JM; Rodríguez A; Fernández-Real JM; Lecube A; Megía A; Vilarrasa N; Vendrell J; Fernández-Veledo S.

Revista científica: Diabetes Care

doi: 10.2337/dc19-0114

Posició autoria: 3/15

Estat: publicat online 02/08/2019

Índex d'impacte: Endocrinologia i metabolisme – 6/146 (D1) - Factor d'impacte: 17,155

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

IMPACTE D'ALTERACIONS METABÒLIQUES ASSOCIADES A L'OBESITAT SOBRE EL PAPER DE LA SURVIVINA EN CÀNCER

Ester Benaiges Moragrega