

VNIVERSIDAD D SALAMANCA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

“ALTERACIONES MOLECULARES DETECTADAS
POR INMUNOHISTOQUÍMICA EN CARCINOMAS
EPIDERMOIDES DE CABEZA Y CUELLO”.

Carlos Cruz Rodríguez

Directores:

Prof. Dr. D. Juan Jesús Cruz Hernández

Prof. Dra. D^a. M^a Dolores Ludeña de la Cruz

Dedicatoria:

A mis padres, por estar siempre.

A Yamilka, por nuestra vida juntos.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar en estas primeras líneas, mi agradecimiento al Profesor y Doctor D. Juan Jesús Cruz Hernández, Catedrático de Medicina de la Universidad de Salamanca. Gracias por su inestimable ayuda, no solo en este trabajo de tesis doctoral, sino a lo largo de estos treinta años. Para mi es como un segundo padre que he tenido la suerte de tener siempre cerca.

Mis agradecimientos también a la Profesora y Doctora D^a. M^a Dolores Ludeña de la Cruz, por su trabajo y horas de laboratorio a mi lado en esta tesis, enseñándome lo interesante que es la anatomía patológica.

Quiero Agradecer al Doctor D. Javier Fernández Mateos por su gran predisposición y ayuda en el área de estadística, y por su apoyo.

A mis padres por haberme siempre impulsado a trabajar en esta tesis doctoral y por su apoyo en todos los proyectos personales y profesionales de mi vida. Siempre agradecido.

A mi mujer, Yamilka, por el día a día, por el apoyo y la paciencia para todos nuestros proyectos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. DEFINICIÓN DE CANCER DE CABEZA Y CUELLO	2
1.2. EPIDEMIOLOGÍA	2
1.3. FACTORES DE RIESGO	6
1.3.1. Tabaco	6
1.3.2. Alcohol	6
1.3.3. Infecciones víricas	7
1.3.4. Factores dietéticos	8
1.3.5. Factores ocupacionales	9
1.3.6. Exposición a radiaciones	9
1.3.7. Susceptibilidad genética	10
1.4. CANCERIZACIÓN EN EL CARCINOMA EPIDERMOIDE	10
1.5. RUTAS DE SEÑALIZACIÓN PROTEICA MÁS COMUNES EN CARCINOMA EPIDERMOIDE DE CABEZA Y CUELLO	16
1.5.1. LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN PI3K/AKT/MTOR	16
1.5.2. LA VÍA RAS/RAF	20
1.6. PROTEÍNAS QUE PARTICIPAN EN LOS PROCESOS CANCERÍGENOS DE LAS VÍAS TIROSINQUINASA	22
1.6.1. Proteína EGFR1	22
1.6.2. Proteína HER-2	24
1.6.3. Proteína HER-3	24
1.6.4. Proteína IGF-1R	25
1.6.5. Proteína PI3K	27
1.6.6. Proteína AKT 1, 2 y 3	29
1.6.7. Proteína MTOR	34
1.6.8. Proteína PTEN	37
1.6.9. Proteína VEGFR1	39
1.6.10. Proteína FGFR1	41
1.6.11. Proteína FGFR3	43

1.6.12. Proteína HRAS	45
1.6.13. Proteína NRAS	46
1.6.14. Proteína KRAS	48
1.6.15. Proteína BRAF	49
1.6.16. Proteína ECADH	49
1.6.17. Proteína P16	50
1.6.18. Proteína p53	51
1.6.19. Proteína CKIT	54
1.6.20. Proteína NESPRIN1	56
2. HIPÓTESIS	58
3. OBJETIVOS	60
3.1. Objetivo principal	61
3.2. Objetivos secundarios	61
4. MATERIAL Y MÉTODOS	62
4.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN	63
4.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	63
4.3. RECOGIDA DE DATOS DE LAS HISTORIAS CLÍNICAS	64
4.4. ANÁLISIS DE LABORATORIO	65
4.5. ELABORACIÓN DE LOS TISSUE MICROARRAY (TMA)	66
4.6. TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA	67
5. RESULTADOS	71
5.1. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA MUESTRA:	72
5.2. RESULTADOS CONCRETOS DE LA MUESTRA:	73
5.2.1. Sexo	73
5.2.2. Edad	74
5.2.3. Etiología	75
5.3. EXPRESIÓN PROTEICA GENERAL DE LA MUESTRA	78
5.4. RESULTADOS DE EXPRESIÓN PROTEICA POR GRUPOS:	79
5.5. RESULTADOS DE LAS DIFERENTES PROTEÍNAS ANALIZADAS	85

5.5.1.	Proteína EGFR1	85
5.5.2.	Proteína HER-2	87
5.5.3.	Proteína HER-3	87
5.5.4.	Proteína IGF-1R	89
5.5.5.	Proteína PI3K	90
5.5.6.	Proteína AKT 1,2 y 3	92
5.5.7.	Proteína MTOR:	96
5.5.8.	Proteína PTEN	97
5.5.9.	Proteína VEGFR1	98
5.5.10.	Proteína FGFR1	99
5.5.11.	Proteína FGFR3	99
5.5.12.	Proteína HRAS:	100
5.5.13.	Proteína NRAS:	101
5.5.14.	Proteína KRAS:	101
5.5.15.	Proteína BRAF:	102
5.5.16.	Proteína ECADH:	102
5.5.17.	Proteína p16:	102
5.5.18.	Proteína p53:	103
5.5.19.	Proteína CKIT:	103
5.5.20.	Proteína NESPRIN1:	103
6.	DISCUSIÓN	104
7.	CONCLUSIONES	120
8.	BIBLIOGRAFÍA	123

1. INTRODUCCIÓN

1.1. DEFINICIÓN DE CANCER DE CABEZA Y CUELLO

El término cáncer de cabeza y cuello (CCC) agrupa un conjunto de neoplasias localizadas en el tracto aerodigestivo superior. Incluye los senos maxilares, cavidad nasal, nasofaringe, orofaringe (amígdala, paladar blando y base de la lengua), hipofaringe, laringe (supraglotis, glotis y subglotis), cavidad oral (mucosa oral, encía, paladar duro, lengua móvil y suelo de boca), labio y glándulas salivares. No están incluidos el resto de tumores de la vía aerodigestiva superior, neoplasias cutáneas, del sistema nervioso y tiroides (1). Aproximadamente un 90% de estos tumores tienen una clasificación histopatológica de carcinoma escamosos de cabeza y cuello (1,2).

1.2. EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer de cabeza y cuello es el sexto cáncer más común en todo el mundo, habiéndose producido un aumento significativo de su incidencia global en la última década. En Europa se estima que se producen 143.000 nuevos casos y más de 68.000 muertes cada año (3,4).

Hay 600000 nuevos pacientes por año diagnosticados en el mundo, de los cuales solo sobreviven a los 5 años el 40/50 % (5,6).

En el estudio Eurocare 4 la supervivencia a 5 años aumentó del primer periodo, 1990-94, al segundo periodo, 1995-99, para todos los tipos de cáncer de cabeza y cuello. Además, se han reducido las diferencias en este aspecto entre los distintos países de Europa, lo que implica una reducción de las desigualdades sociales, de la calidad y del acceso al tratamiento. La distribución por sexos nos indica una proporción de 4 varones por cada mujer en Europa, que en España llega a ser de 10 a 1 (7).

En el estudio Eurocare 5, el porcentaje de supervivencia relativa a cinco años es más bajo en hipofaringe (25%) y el más alto para la laringe (59%) en los años 2005-2007. El resultado fue significativamente mejor en mujeres que en varones. En Europa, la supervivencia a 5 años estandarizada por edad, se mantuvo estable entre 1999-2001 y 2005-2007 para el cáncer laríngeo, mientras que aumentó para todos los otros cánceres de cabeza y cuello. Esta fue baja en los países del Este, 47% para la laringe y 28% para todos los otros cánceres de cabeza y cuello combinados y alta en Irlanda y el Reino Unido (Reino Unido) y Norte de Europa (62% y 46%). Más del 50% de los pacientes fueron

diagnosticados en estadio avanzado (regional o metastásico). La supervivencia relativa a cinco años para los casos localizados osciló entre el 42% (hipofaringe) y el 74% (laringe) (8).

TIPO DE CÁNCER	Nº CASOS	95 % CI	CR	95 % CI	ASIRw	95 % CI	ASIRE	95 % CI
Cérvix	2.399	1.985-2.874	10,2	8,4-12,2	6,3	5,2-7,6	8,2	6,7-9,9
Colon	11.927	10.733-13.216	50,5	45,4-56	19,9	18,0-22,0	29,7	26,8-32,8
Colorrecto	16.677	15.090-18.521	70,6	63,9-78,4	28,3	25,6-31,5	42,0	38,1-46,7
Esófago	379	293-483	1,6	1,2-2,0	0,7	0,5-0,9	1,0	0,8-1,3
Estómago	3.306	2.968-3.672	14,0	12,6-15,5	5,4	4,8-5,9	8,0	7,2-8,8
Hígado	1.610	1.337-1.917	6,8	5,7-8,1	2,4	2,0-2,8	3,7	3,1-4,4
Labios, cavidad oral y faringe	1.690	1.489-1.908	7,2	6,3-8,1	3,3	2,9-3,8	4,7	4,2-5,3
Laringe	299	113-764	1,3	0,5-3,2	0,7	0,3-1,9	1,0	0,4-2,6
Leucemia	2.736	2.292-3.242	11,6	9,7-13,7	5,8	4,9-6,8	7,5	6,3-8,8
Linfoma de Hodgkin	646	562-739	2,7	2,4-3,1	2,5	2,1-2,8	2,6	2,3-3,0
Linfoma no Hodgkin	3.480	3.089-3.903	14,7	13,1-16,5	7,0	6,2-7,8	9,7	8,6-10,8
Mama	27.747	24.027-31.957	117,5	101,7-135,3	65,2	56,1-75,5	88,3	76,1-102,1
Melanoma	2.313	2.003-2.652	9,8	8,5-11,2	5,6	4,8-6,4	7,3	6,3-8,4
Mieloma	1.240	824-1.848	5,3	3,5-7,8	1,9	1,3-2,9	3,0	2,0-4,4
Ovario	3.228	2.861-3.627	13,7	12,1-15,4	7,2	6,3-8,1	9,9	8,7-11,2
Páncreas	3.401	3.030-3.805	14,4	12,8-16,1	5,1	4,6-5,7	7,9	7,0-8,8
Pulmón	5.917	5.301-6.591	25,1	22,4-27,9	12,7	11,4-14,3	17,9	16,0-20,0
Recto	4.750	3.705-6.069	20,1	15,7-25,7	8,4	6,5-10,7	12,4	9,6-15,8
Riñón	1.989	1.716-2.296	8,4	7,3-9,7	4,1	3,5-4,8	5,7	4,9-6,6
Sistema Nervioso Central	1.710	1.500-1.939	7,2	6,4-8,2	4,0	3,5-4,6	5,2	4,6-6,0
Tiroides	2.442	2.276-2.617	10,3	9,6-11,1	6,6	6,1-7,0	8,8	8,2-9,5
Útero	6.160	5.405-6.984	26,1	22,9-29,6	13,1	11,4-15,0	18,7	16,3-21,3
Vejiga	3.654	3.114-4.249	15,5	13,2-18,0	6,0	5,2-7,0	9,0	7,7-10,5
Vesícula biliar	1.009	850-1.189	4,3	3,6-5,0	1,4	1,1-1,6	2,1	1,8-2,5
Otros cánceres	4.913	4.175-5.716	20,8	17,7-24,2	8,7	7,5-9,9	12,2	10,6-14,0
Todos los tumores (excl. tumores cutáneos no melanoma)	98.944	94.512-103.989	419,0	400,2-440,3	204,1	193,9-215,7	284,5	270,7-300,2

ILUSTRACIÓN 1. ESTIMACIONES DE LA PRESENCIA DE CÁNCER EN MUJERES (2015). LAS TASAS SE PRESENTAN POR 100.000 PERSONAS-AÑOS. N CASOS, 95% CI INTERVALO DE CONFIANZA; CR TASA CRUDA, ASIRw TASA DE INCIDENCIA ESTANDARIZADA POR EDAD (MUNDO) ASIRE TASA DE INCIDENCIA ESTANDARIZADA POR EDAD (EUROPA) (9).

TIPO DE CÁNCER	Nº CASOS	95 % CI	CR	95 % CI	ASIRw	95 % CI	ASIRE	95 % CI
Colon	15.808	13.436-18.500	69,4	59,0-81,2	32,1	27,3-37,6	49,0	41,6-57,3
Colorrecto	24.764	22.194-27.661	108,7	97,4-121,4	51,5	46,2-57,4	77,8	69,8-86,8
Esófago	1.979	1.746-2.238	8,7	7,7-9,8	4,7	4,1-5,3	6,7	5,9-7,6
Estómago	5.150	4.681-5.660	22,6	20,5-24,8	10,8	9,8-11,9	16,2	14,7-17,8
Hígado	4.252	3.645-4.911	18,7	16,0-21,6	9,7	8,3-11,2	14,1	12,1-16,3
Labios, cavidad oral y faringe	4.980	3.896-6.225	21,9	17,1-27,3	12,4	9,6-15,6	17,4	13,5-21,9
Laringe	3.426	2.988-3.899	15,0	13,1-17,1	8,6	7,4-9,8	12,1	10,5-13,9
Leucemia	3.782	3.161-4.494	16,6	13,9-19,7	9,5	8,1-11,2	12,6	10,6-14,8
Linfoma de Hodgkin	943	837-1.057	4,1	3,7-4,6	3,7	3,3-4,2	4,0	3,5-4,5
Linfoma no Hodgkin	4.190	3.667-4.760	18,4	16,1-20,9	10,6	9,3-12,0	14,3	12,5-16,2
Melanoma	2.577	2.211-2.976	11,3	9,7-13,1	6,1	5,3-7,1	8,6	7,4-10,0
Mieloma	1.489	984-2.248	6,5	4,3-9,9	3,0	2,0-4,5	4,6	3,0-6,9
Páncreas	3.513	3.156-3.901	15,4	13,9-17,1	7,5	6,8-8,4	11,3	10,1-12,5
Próstata	33.370	27.439-40.101	146,4	120,4-176,0	67,6	55,2-81,6	103,4	84,8-124,5
Pulmón	22.430	19.740-25.420	98,4	86,6-111,5	50,5	44,4-57,4	74,1	65,2-84,1
Recto	8.956	7.968-10.026	39,3	35,0-44,0	19,4	17,2-21,7	28,8	25,6-32,3
Riñón	3.590	3.188-4.027	15,8	14,0-17,7	8,5	7,5-9,6	12,2	10,8-13,7
Sistema Nervioso Central	2.332	2.091-2.596	10,2	9,2-11,4	6,4	5,7-7,1	8,3	7,4-9,2
Testículo	974	871-1.084	4,3	3,8-4,8	4,2	3,7-4,7	4,3	3,9-4,8
Tiroides	865	767-973	3,8	3,4-4,3	2,4	2,1-2,7	3,2	2,8-3,6
Vejiga	17.439	15.695-19.304	76,5	68,9-84,7	37,2	33,3-41,2	55,7	50,1-61,7
Vesícula biliar	1.104	876-1.369	4,8	3,8-6,0	2,1	1,7-2,6	3,3	2,6-4,1
Otros cánceres	5.678	4.857-6.578	24,9	21,3-28,9	13,2	11,4-15,2	18,6	15,9-21,5
Todos los tumores (excl. tumores cutáneos no melanoma)	148.827	141.329-157.285	653,1	620,2-690,2	330,1	314,0-348,2	482,7	458,8-509,6

ILUSTRACIÓN 2. ESTIMACIONES DE LA PRESENCIA DE CÁNCER EN HOMBRES (2015). LAS TASAS SE PRESENTAN POR 100.000 PERSONAS-AÑOS. N CASOS, 95% CI INTERVALO DE CONFIANZA; CR TASA CRUDA, ASIRw TASA DE INCIDENCIA ESTANDARIZADA POR EDAD (MUNDO) ASIRE TASA DE INCIDENCIA ESTANDARIZADA POR EDAD (EUROPA) (9).

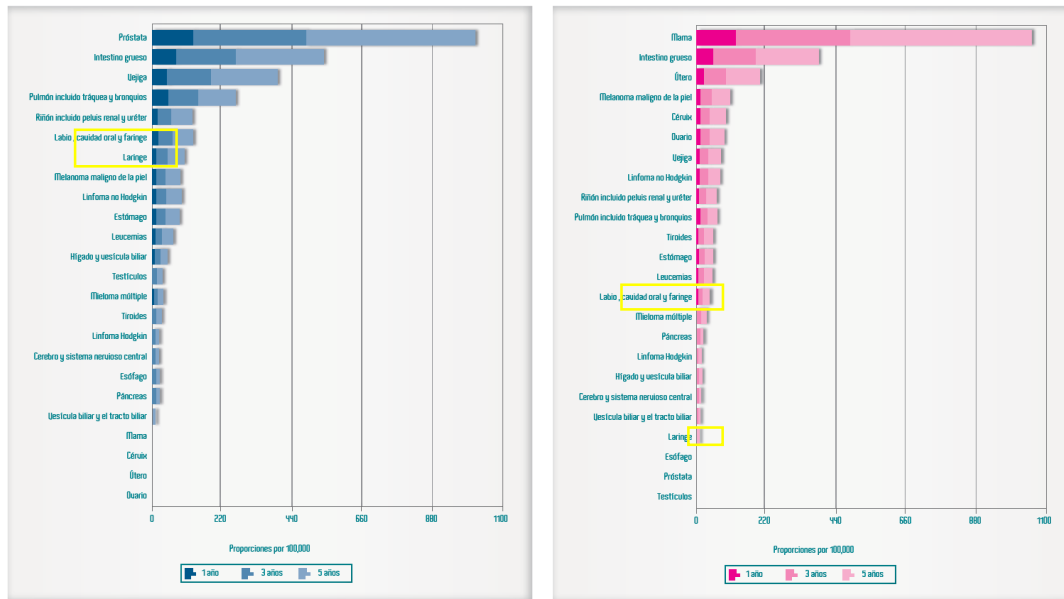


ILUSTRACIÓN 3. DIFERENCIAS ENTRE SEXOS EN LA ESTIMACIÓN DE LA PREVALENCIA DE TUMORES EN ESPAÑA PARA EL AÑO 2012 (9).

La edad media de inicio de la patología es de 60 años, siendo más baja en los tumores de nasofaringe y glándulas salivares. Los pacientes que presentan la enfermedad en edades tempranas no suelen presentar los clásicos agentes causales (tabaco, alcohol) sino que la etiología radica en infecciones víricas (VPH y virus Epstein Barr) y estos desarrollan la enfermedad en edades más tempranas (9,10). La incidencia en adultos jóvenes europeos (menores de 40 años) está aumentando como consecuencia de un mayor número de tumores causados por el aumento de estos virus en países desarrollados 11.

La incidencia en Europa en 2002 de casos de cavidad oral y faringe (exceptuando la nasofaringe) fue de 93500 casos. Siendo las tres cuartas partes hombres. Con relación a otros países de Europa, en el año 2002, España era el tercer país en incidencia en cáncer de cavidad oral (9,10).

El cáncer de laringe, con 45500 nuevos casos en Europa en 2002, es el más común en los hombres, en una proporción de 7 a 1 contra las mujeres. España es el tercer país de Europa con mayor incidencia por cáncer de laringe en hombres. La mortalidad es a su vez muy grande. Sin embargo, la incidencia y mortalidad en mujeres es de las menores de toda la Unión Europea (9,10).

El cáncer oral y el de orofaringe suelen aparecer en edad más temprana que el de laringe que es característico de edades más avanzadas (12).

1.3. FACTORES DE RIESGO DEL CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

Los principales factores de riesgo en esta patología son el tabaco y el consumo de alcohol. A su vez tenemos como factor causal el virus del papiloma humano, que suele manifestarse en la base de la lengua y amígdala, y el virus de Epstein Barr, que se manifiesta en nasofaringe.

1.3.1. Tabaco

El consumo de tabaco es uno de los factores etiológicos más establecidos en el desarrollo tumoral 13. Hay una gran cantidad de estudios que relacionan el consumo de tabaco en todas sus formas con el carcinoma de cabeza y cuello, así como la disminución paulatina del riesgo cuando se abandona el hábito. La capacidad carcinogénica reside en las partículas del humo que actúan como iniciadores, promotores o co-carcinogénicos (nitrosaminas e hidrocarburos aromáticos policíclicos) (3,14). El efecto carcinogénico del tabaco puede relacionarse con varios procesos biológicos, incluyendo la reparación del DNA, la saturación de la activación de vías de señalización, y un incremento en la activación de las enzimas detoxificadoras 14. El riesgo de padecer cáncer de cabeza y cuello en pacientes fumadores es entre 3 a 12 veces mayor que en los no fumadores, estando directamente relacionado con la dosis y duración del consumo. La localización en la que más incide es la laringe, con un riesgo relativo 10 veces mayor, seguido por los tumores de orofaringe e hipofaringe con un riesgo 4 veces mayor 14 15 16. De forma más débil existe un aumento del riesgo en cáncer de nasofaringe y senos paranasales. A su vez, se ha demostrado el aumento del riesgo en fumadores pasivos (3).

1.3.2. Alcohol

Es un importante factor promotor de la carcinogénesis en el cáncer de cabeza y cuello (16). El tabaco y el alcohol son responsables de más del 75 % de los cánceres de cavidad oral, de la orofaringe y de hipofaringe. El riesgo asociado depende directamente del contenido en alcohol de la bebida, pero cuando se produce un mayor efecto de este factor es en conjunción con el tabaco. De hecho, en ausencia de tabaco la asociación a carcinoma de cabeza y cuello solo aparece en dosis muy altas (17). Además de en las bebidas, encontramos este factor de riesgo en los colutorios de higiene oral (3).

El etanol actúa como iniciador carcinogénico y como promotor, ya que incrementa la permeabilidad de las células a otros carcinógenos (15). Este efecto dual se desarrolla en

un mayor porcentaje a hombres que a mujeres debido a los hábitos del sexo masculino (18).

1.3.3. Infecciones víricas

En los últimos años se ha evidenciado la implicación de la etiología vírica en el desarrollo de los carcinomas epidermoide de cabeza y cuello. Los dos agentes infecciosos conocidos que influyen en la aparición del cáncer de vías aerofaríngeas son el virus de Epstein-Barr y el del papiloma humano, subtipo (1, 19).

El HPV-16 se relaciona especialmente con las neoplasias de orofaringe y en ausencia de consumo de tabaco. Este produce modificaciones en la expresión de p16 a través del gen E6 y E7 que actúan inhibiendo pRb. pRb es una fosfoproteína que en su forma fosforilada es necesaria para limitar la proliferación celular y suprimir las propiedades neoplásicas de algunos tipos de VPH. Por otro lado, conlleva un comportamiento diferente de los tumores a nivel molecular y con respecto al tratamiento, ya que responden más favorablemente (20).

Suele relacionarse con pacientes de edad menos avanzada y prácticas sexuales de riesgo, principal modo de transmisión del virus (21). Su aumento es más acusado en EEUU, donde el 60% de los tumores de orofaringe son HPV-16 positivos (22). En España los casos son inferiores al 20% (22, 23).

En lo que se refiere al virus de Epstein-Barr, ha sido identificado como un factor predisponente para el cáncer de nasofaringe y ha sido identificado en los pacientes afectados en mucosa y en sangre periférica. Su incidencia es variable, siendo la tasa de aparición en Occidente menor de 0,5 casos cada 100000 habitantes, mientras en África, Asia y Alaska es una entidad más común. Llega a presentarse hasta en 25 de cada 100000 en Hong Kong (24).

Se han estudiado dos tipos de tumores, el carcinoma espinocelular escamosos y el no queratinizado. De este último hay un subtipo que es el indiferenciado y es la forma más asociada con el virus (24,25). La asociación del virus con el carcinoma no queratinizado indiferenciado se encuentra en casi todos los casos. En los carcinomas espinocelulares de la nasofarínge se ha detectado el virus en las células descamativas (24).

1.3.4. Factores dietéticos

Existe una relación inversamente proporcional entre el consumo de frutas, verduras, productos frescos y el aceite de oliva con la incidencia de carcinoma de cabeza y cuello. La incidencia aumenta en individuos con una dieta rica en grasa animal, pescados ahumados y salados, así como alimentos fritos, o aquellos que poseen contenido alto en nitrosaminas (1).

El consumo de frutas y verduras protege frente al desarrollo de varios tipos de tumores (26). Su efecto parece deberse a las propiedades anticarcinogénicas y antioxidantes de numerosos compuestos presentes en frutas y verduras, como pueden ser vitaminas, carotenoides, fibra, ácido fólico, flavoretinoides, esteroides y ácido fenólico, que desempeñan un papel importante en diversos procesos, como la protección al estrés oxidativo y la reparación del DNA.

Así mismo, el consumo de dietas ricas en carne roja o carnes procesadas ha sido relacionado con un aumento en el riesgo de desarrollar carcinoma epidermoide pero no se ha demostrado OMS 2015. 38

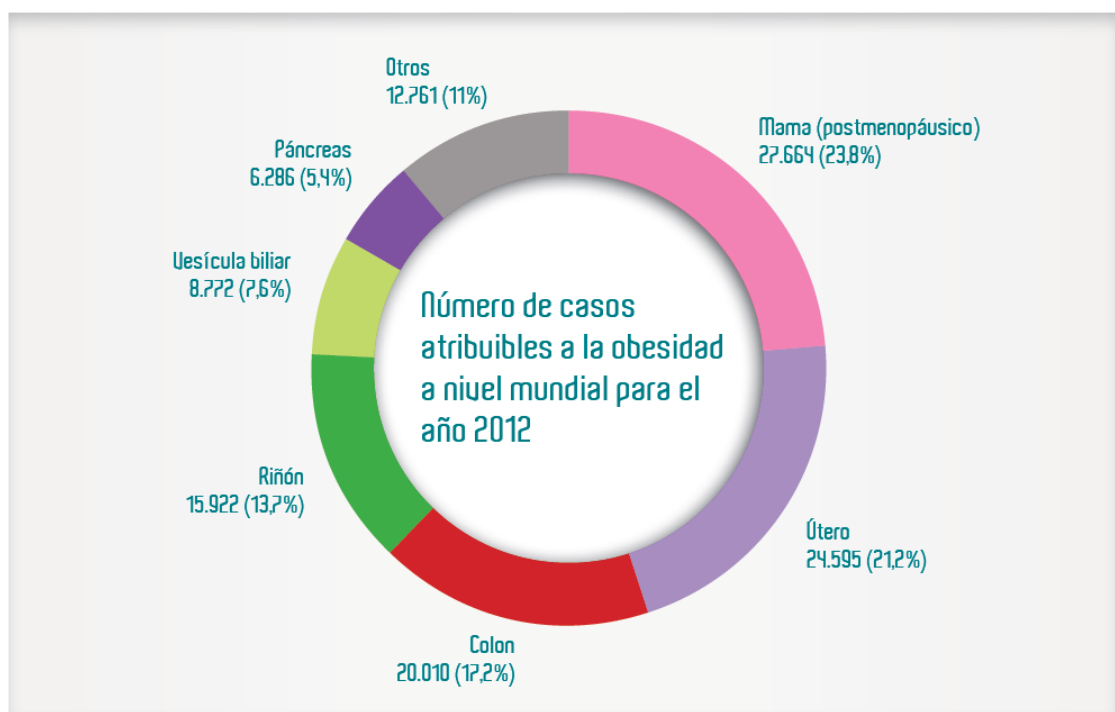


ILUSTRACIÓN 4 NÚMERO DE CASOS DE CÁNCER ATRIBUIBLES A MALA ALIMENTACIÓN A NIVEL MUNDIAL EN 2012, DISTRIBUIDO POR LOCALIZACIÓN TUMORAL (10).

1.3.5. Factores Ocupacionales

Aunque la exposición a factores ocupacionales tiene un papel limitado en la manifestación del cáncer de cabeza y cuello, en algunos casos concretos constituye un aspecto relevante. En este sentido se conoce el incremento del riesgo de cáncer de senos paranasal en trabajadores de la metalurgia, madera, industria textil y del cuero, así como en las refinerías. La exposición a asbesto está implicada en estudios de cáncer de laringe, aunque esta asociación es controvertida (27).

1.3.6. Exposición a radiaciones

Las radiaciones ultravioletas se asocian a un aumento del riesgo del cáncer de labio inferior en trabajadores al aire libre y más claramente en personas de piel clara. La exposición a rayos gamma está relacionada con el aumento del riesgo de cáncer de glándulas salivares, senos paranasales y sarcomas de cabeza y cuello.

La radioterapia no se ha relacionado con mayor riesgo de desarrollar neoplasias epiteliales en las vías aerodigestivas, pero sí con la aparición de sarcomas. En cuanto a las radiaciones ionizantes para fines diagnósticos solo han sido relacionadas con cáncer de las glándulas salivares (1).

1.3.7. Susceptibilidad genética

La aparición de agregaciones familiares de carcinoma epidermoide de cabeza y cuello sugiere la existencia de factores genéticos de predisposición 28. Varios estudios de población han mostrado un riesgo mayor (de 3 a 8 veces) de sufrir un cáncer de cabeza y cuello en personas con antecedentes familiares de primer grado, implicándose una susceptibilidad genética en su aparición. Este proceso está determinado por diferencias genotípicas y fenotípicas que afectan al metabolismo de los carcinógenos, mecanismos de reparación de DNA, control del ciclo celular, etc (28).

La prevención se está enfocando hacia la identificación de estos individuos mediante biomarcadores, diagnosticando así la enfermedad de manera precoz.

1.4. CANCERIZACIÓN EN EL CARCINOMA EPIDERMOIDE

En nuestro estudio nos vamos a centrar en el carcinoma epidermoide, aunque en cabeza y cuello hay varios tipos de tumores, debido a la cantidad de estructuras contenidas en

esta área. El carcinoma epidermoide es de los más comunes en odontología, y los factores de riesgo que suelen desencadenar el proceso en esta área suelen ser ingeridos o inhalados. Histológicamente son tumores que evolucionan desde el epitelio estratificado celular, la epidermis y algunas áreas del tracto digestivo y respiratorio. Puede encontrarse en localizaciones como la piel, el esófago, laringe, cérvix y cavidad oral. Además, aparecen asociados a alteraciones de la diferenciación o metaplasia en pulmón y mama (29).

El epitelio estratificado está compuesto por varias capas de células, llamadas queratinocitos, los cuales forman una estructura altamente organizada. Las capas que forman la epidermis son cuatro: la basal, la espinosa, la granular y la córnea. La capa basal está compuesta de células con un gran potencial proliferativo que da lugar al resto de las capas (29).

El estrato espinoso descansa sobre la capa basal y está compuesto de varias capas de células poliédricas, fuertemente unidas por medio de desmosomas. Estas células participan en un proceso de diferenciación altamente regulado. En la capa granulosa las células están caracterizadas por sus gránulos citoplasmáticos. Finalmente, la capa córnea está compuesta de células muertas, aplanadas, sin núcleo, que gradualmente se van descamando. Este estrato está ausente en algunos epitelios estratificados (no queratinizados) (29).

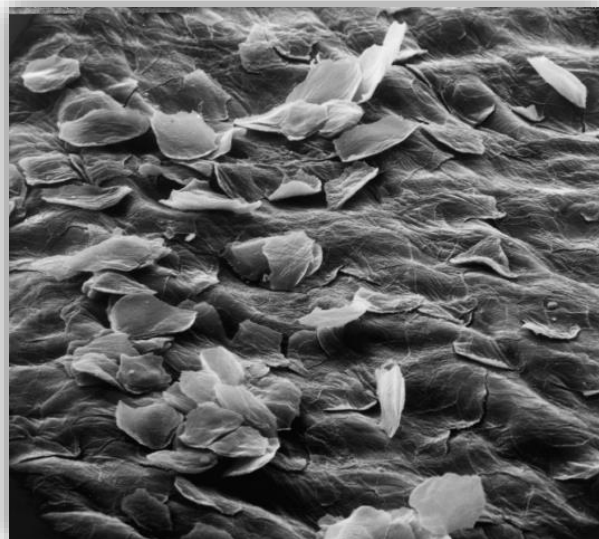


ILUSTRACIÓN 5. IMAGEN AL MICROSCÓPIO DE LA ESCAMACIÓN NATURAL DE UN EPILETIO ESTRATIFICADO NORMAL (30).

Cada capa epitelial se caracteriza por la expresión de proteínas específicas, que son también indicativas y distintivas del estado de diferenciación. Entre ellos, son remarcables los diferentes patrones de expresión de las queratinas y citoqueratinas. Estos son miembros de la superfamilia de filamentos intermedios y confieren una resistencia mecánica a las células epiteliales (29).

El patrón de expresión de la queratina parece afectar a la función esencial de las células, incluyendo la proliferación, la apoptosis y la transducción de señales (Yamamoto et al., 1986; Paramio and Jorcano, 2002; Coulombe et al., 2004). En epidermis, otras características proteicas están involucradas, las cuales son expresadas en las capas más altas del estrato espinoso, y loricrin y filaggrin, los cuales son expresados en la capa granular (29).

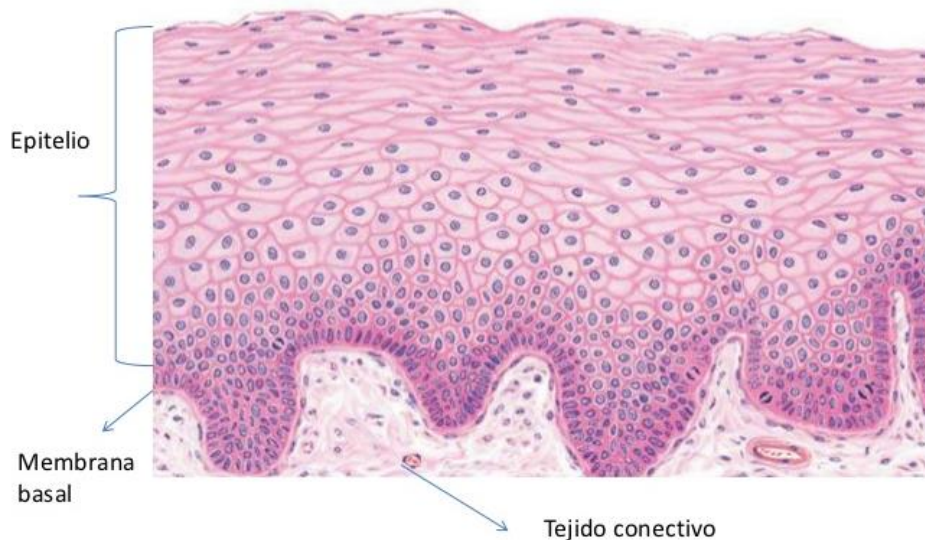


ILUSTRACIÓN 6. EPITELIO PLANO ESTRATIFICADO NO QUERATIZADO (31).

Las características del cáncer comprenden seis capacidades biológicas adquiridas durante el desarrollo de múltiples etapas de tumores humanos. Las características constituyen un principio organizador para racionalizar las complejidades de las enfermedades neoplásicas. Incluyen el mantenimiento de la señalización proliferativa, eludir los supresores del crecimiento, resistir la muerte celular, permitir la inmortalidad replicativa, inducir la angiogénesis, y la activación de la invasión y la metástasis. Subyacentes a estas características son la inestabilidad del genoma, que genera la diversidad genética que acelera su adquisición, y la inflamación, que fomenta múltiples funciones. El progreso

conceptual en la última década ha añadido dos marcas emergentes de potencial a esta lista: la reprogramación del metabolismo energético y eludir la destrucción inmune (32).

Los genes controlan la proliferación celular, la diferenciación celular y la muerte programada de la misma. Las células pueden adquirir mutaciones en tres tipos de genes: protooncogenes, genes supresores de tumores y genes reparadores del ADN (Vogelstein and Kinzler, 2004). Las alteraciones de estos genes dan como resultado un aumento del crecimiento y la proliferación y/o un descenso de la apoptosis (29).

Para que una célula humana se convierta en cancerosa, deben ocurrir un mínimo de 5 o 6 mutaciones, que, en conjunto, pueden llevar a: autoinsuficiencia en las señales de crecimiento, insensibilidad a las señales anticrecimiento, capacidad de evasión de la apoptosis, ilimitado potencial replicativo, angiogénesis sostenida e invasión y metástasis (Hanahan and Weinberg, 2000) (29).

Algunas células son más propensas que otras a sufrir estos cambios, por ejemplo, los queratinocitos. Estos forman parte de tejidos que están en constante renovación y están más expuestos a la constante renovación y a agentes cancerígenos que otros tipos celulares (29).

Durante la progresión del tumor, varias alteraciones pueden distinguirse de manera histológica: hiperplasia, displasia, carcinoma in situ, carcinoma invasivo y metástasis.

En epitelios hiperplásicos las células son hiperproliferativas, pero estas son morfológicamente normales y la estructura tisular está preservada, con un número aumentado de células (29).

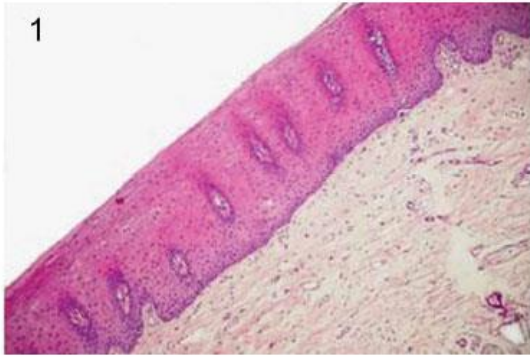


ILUSTRACIÓN 7. HISTOLOGÍA DE UNA MUCOSA ORAL NORMAL (33).

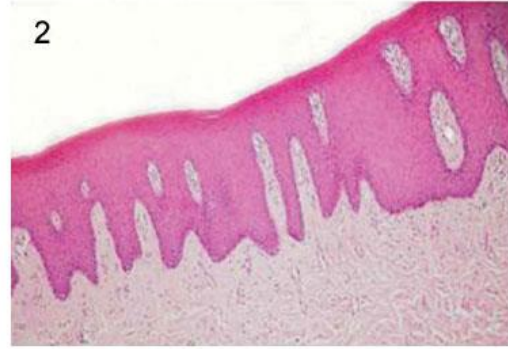


ILUSTRACIÓN 8. HISTOLOGÍA DE UNA HIPERPLASIA FIBROEPITELIAL INFLAMATORIAL ORAL (33).

Cuando el epitelio se convierte en displásico, las células empiezan a mostrar alteraciones morfológicas y la estructura tisular se ve claramente interrumpida. En estos casos existe una pérdida de heterocigosidad en 9p21. En esta región se encuentra el locus génico de CDKN2A, que codifica p16 y p14^{ARF}, responsables de la regulación del ciclo celular en G1 y la degradación de p53 mediada por MDM2. Además, se ha observado en etapas tempranas un aumento en la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico EGFR1, presente en más del 90% de los casos de carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (34, 35, 36). Otro evento temprano común es la pérdida de la región cromosómica 3p, donde se encuentran varios genes supresores de tumores. La pérdida de heterocigosidad en 17p, así como las mutaciones de TP53 aparecen en más del 50% de los carcinomas de cabeza y cuello en estadios avanzados.

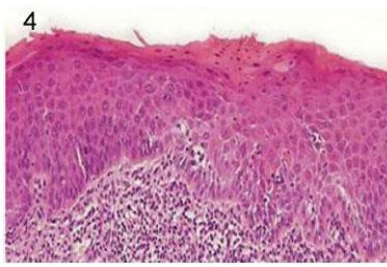


ILUSTRACIÓN 9. HISTOLOGÍA DE UNA DISPLASIA ORAL LEVE (33).

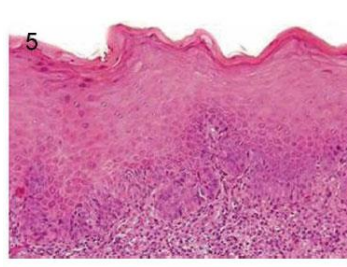


ILUSTRACIÓN 10. HISTOLOGÍA DE UNA DISPLASIA ORAL MODERADA (33).

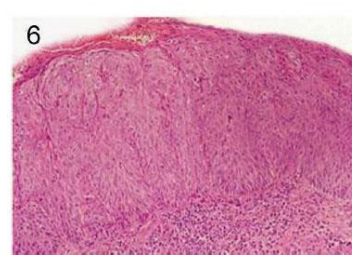


ILUSTRACIÓN 11. HISTOLOGÍA DE UNA DISPLASIA EPITELIAL ORAL INTENSA (33).

En carcinomas in situ, las células ya tienen una alta proliferación y están desorganizadas, pero estas están confinadas a su localización original. La amplificación de la región 11q13 y la sobreexpresión de la ciclina D1 (CCND1) son eventos asociados a los carcinomas in situ (29).

Los carcinomas invasivos son aquellos en los que las células rompen la membrana basal y empieza a invadir el tejido subyacente. Finalmente, estas metástasis ocurren cuando las células tumorales alcanzan la sangre o vasos linfáticos, viajando a otros órganos y formando así tumores secundarios (29).

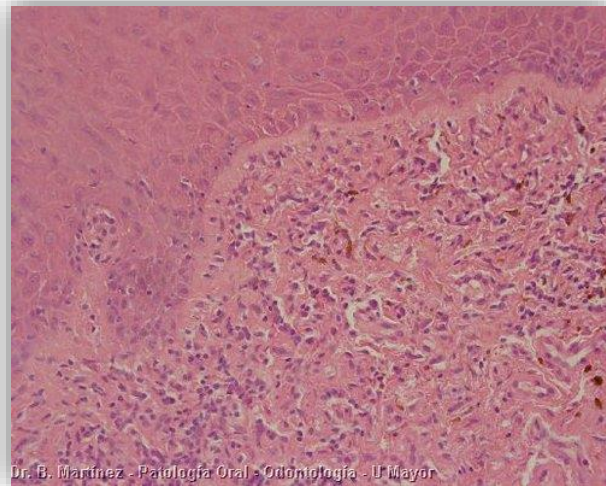


ILUSTRACIÓN 12. HISTOLOGÍA DE UN CARCINOMA INVASIVO (37).

Las alteraciones que se producen los procesos conductores de la proliferación, la diferenciación y la muerte celular, son las que llevan al desarrollo de tumores. Sin embargo, esas vías, que pueden ser comunes, no dan prototipos similares de cáncer, pues

a lo largo de la vida del tumor se acumulan una serie de aberraciones estocásticas, que hacen que un tumor de origen y características similares tenga acumuladas anomalías que hacen que tumores clínicamente iguales varíen genómicamente uno de otro. Estas diferencias influyen en el diferente comportamiento y respuesta a tratamientos entre tumores clínicamente iguales (Kumar 2011).

Las nuevas tecnologías han permitido conocer algunas de estas diferencias, que han sido publicadas en el catálogo de mutaciones somáticas en cáncer (COSMIC) por el instituto Sanger (<http://www.sanger.ac.uk/genetica/CGP/censo>), y en el cual se enumeran más de 100.000 mutaciones somáticas en 400.000 muestras de tumores. Sin embargo, se sabe que solo una pequeña proporción de ellas son mutaciones conductoras, que contribuyen a la patogenia de los tumores. La separación de estas alteraciones conductoras de las meramente espectadoras es el desafío actual.

En estos momentos se sabe que hay una serie de aberraciones que son comunes a una serie de tumores.

Las vías de transducción de señales desde los receptores de membrana hasta el núcleo son sendas fisiológicas. A través de ellas, el núcleo es informado de que un factor de crecimiento ha interactuado con un receptor de membrana de la misma célula. Estas vías, son verdaderas rutas de transmisión química en las que una serie de moléculas y mensajeros sufren cambios conformacionales que los hacen pasar de un estado de reposo a un estado activo y, al mismo tiempo, les otorgan la capacidad de activar, a su vez, la molécula consecutiva. Así, a modo de efecto dominó, el receptor activa su tirosina-kinasa intracitoplasmática, la cual, activa la primera molécula de la vía de transducción, que, a su vez, activa la segunda y así, sucesivamente, hasta que la señal llega al núcleo.

Por ello, es de vital importancia que toda vía de señalización tenga mecanismos de frenado, que permiten a los componentes volver de nuevo a un estado de reposo. La activación constitutiva de alguna de estas vías de señalización, sea por una mutación que mantiene la vía activada a cada momento o sea por un error en sus sistemas de frenado, produce en la célula una insensibilidad a las señales antiproliferativas.

Las dos vías de señalización intracelular más importantes son la vía RAS y la vía PI3K-AKT-MTOR. Ambas son vías dependientes de activación tirosin-kinasas. En nuestro estudio vamos a describir el funcionamiento de estas vías y sus proteínas, y su actuación

en el cáncer de cabeza y cuello, para posteriormente describir y analizar los datos de expresión hallados en los pacientes del Hospital Clínico Universitario de Salamanca.

1.5. RUTAS DE SEÑALIZACIÓN PROTEICA MÁS COMUNES EN CARCINOMA EPIDERMOIDE DE CABEZA Y CUELLO

1.5.1. La vía de señalización PI3K/AKT/MTOR

La ruta de señalización de PI3K juega un papel fundamental en el desarrollo del cáncer, bien contribuyendo a la progresión del ciclo celular o disminuyendo la apoptosis e incrementando las capacidades metastásicas de las células cancerígenas. La activación descontrolada de la ruta de PI3K contribuye a la transformación celular y a la progresión tumoral en varios tipos de tumores incluyendo los de cerebro, mama, ovario y carcinomas renales. La activación de PI3K puede ocurrir a través de Ras activado o directamente por algunos receptores tirosin quinasa, que responden a varios factores de crecimiento y citoquinas como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, factor de crecimiento tipo insulina (IGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento de insulina (IGF-1 e IGF-2) y el factor estimulador de colonias (CSF). La activación de estos receptores tirosina quinasa conduce a la autofosforilación de la porción intracelular de los mismos, lo que sirve como punto de arranque para otras proteínas intracelulares (38).

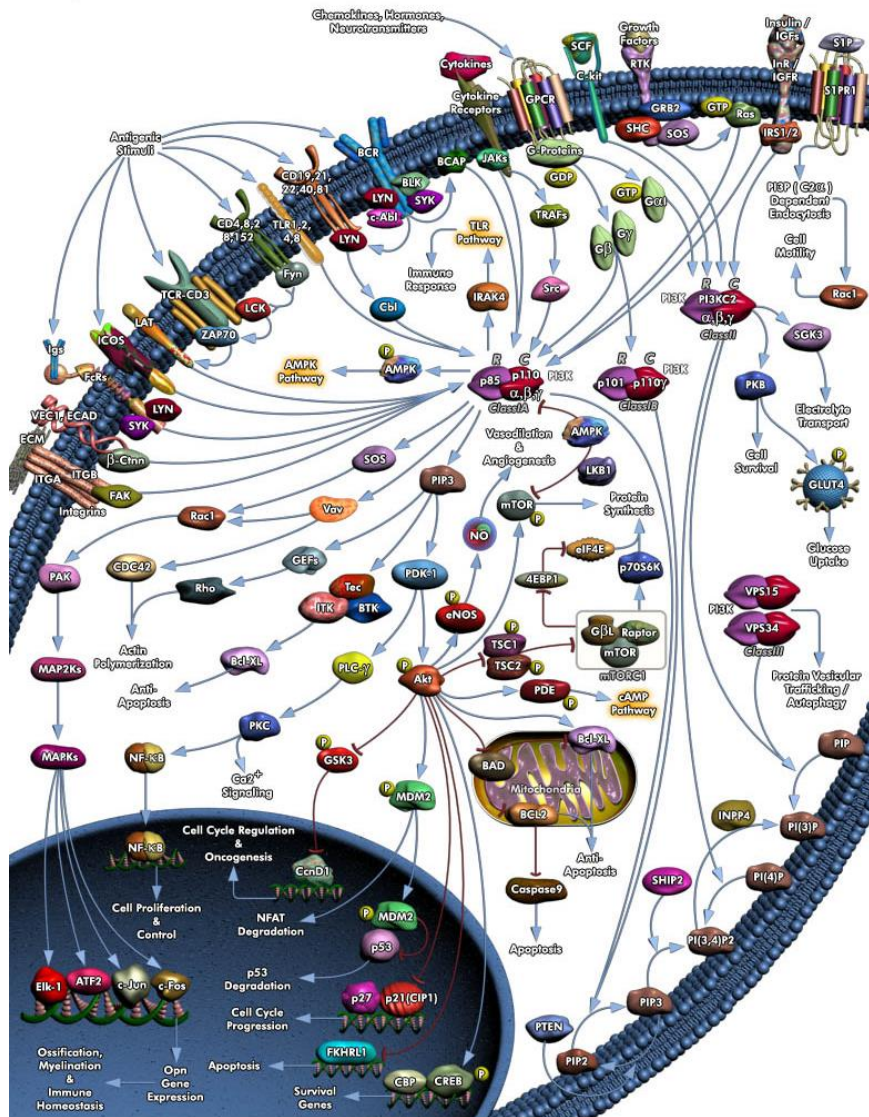


ILUSTRACIÓN 13. ESQUEMA DEL FUNCIONAMIENTO DE LA SEÑALIZACIÓN PROTEICA EN LA VÍA PI3K Y DE LAS PROTEÍNAS RELACIONADAS. SE PUEDE APRECIAR LA GRAN CANTIDAD DE PROTEÍNAS QUE PARTICIPAN Y LA GRAN COMPLEJIDAD DE ESTE SISTEMA DE TRANSMISIÓN (39).

La ruta PI3K/AKT activada se inicia a través del reclutamiento de PI3K a la membrana plasmática a través de la unión de su dominio SH2 a proteínas tirosina fosforiladas. En concreto, los residuos de tirosina fosforilados de los receptores tirosina quinasa interaccionan con la subunidad reguladora de PI3K, p85 (38).

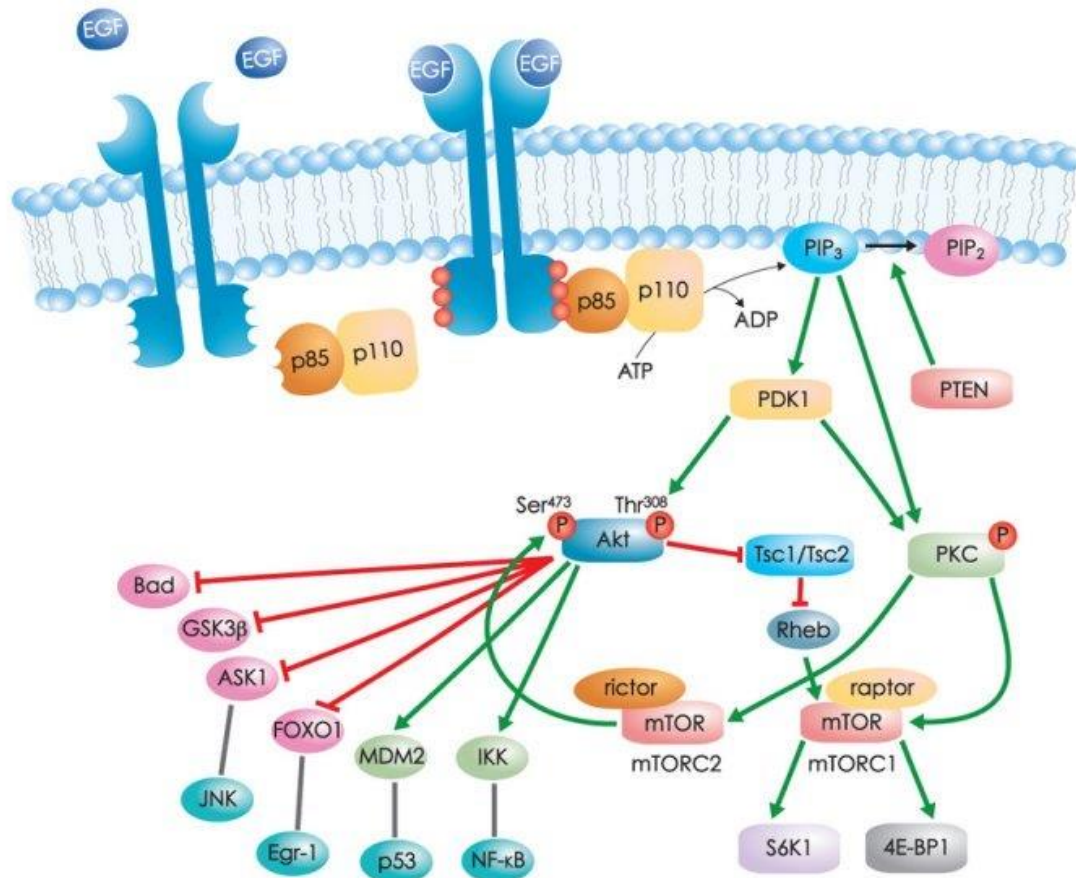


ILUSTRACIÓN 14. REPRESENTACIÓN DEL INICIO DE LA VÍA A TRAVÉS DE P85 (40).

Las actividades quinasas son reguladas por las fosfatasas que actúan eliminando los fosfatos de las proteínas diana. Existen evidencias de que PTEN desfosforila PIP₃, actuando por tanto como regulador de la ruta de señalización de PI3K. PTEN tiene un dominio proteína-tirosina fosfatasa y un dominio de homología a la tensina, lo que sugiere que PTEN suprime el crecimiento celular tumoral ejerciendo un efecto antagonista al de las proteínas tirosina quinasas, regulando la invasión de las células tumorales y la metástasis a través de las interacciones con las adhesiones focales (38).

PIP₃ sirve como ligando para reclutar la serina/treonina quinasa AKT (*c-AKT*, también llamada proteína-quinasa B, *PKB*) a la membrana plasmática a través de la interacción directa con el dominio con homología a plecstrina (*PH*) de AKT. Una vez en la cara interna de la membrana, AKT es fosforilado por una serina/treonina quinasa, la quinasa 1, dependiente de fosfatidil inositol-3 (PKD1), resultando en la activación de AKT.

La activación de AKT controla la supervivencia celular a través de la fosforilación de las dianas que dependen de ella, con el resultado neto del incremento en la supervivencia celular, proliferación, crecimiento y metabolismo. Las dianas para la activación de AKT pueden ser clasificadas en tres grupos distintos: proteínas apoptóticas, factores de transcripción y proteína-quinasas.

AKT fosforila directamente dos proteínas apoptóticas, BAD y caspasa 9, inhibiendo su actividad apoptótica y promoviendo por tanto la supervivencia celular.

Los factores de transcripción pueden bien ser activados o inhibidos tras la fosforilación de AKT. AKT activa el factor de transcripción NF- κ B, HIF-1 α y CREB, lo que tiene como consecuencia un incremento en la transcripción de genes anti-apoptóticos (38).

El factor de transcripción NF- κ B es el mediador central de la respuesta inmune, de la respuesta inflamatoria y la respuesta de supervivencia celular. NF- κ B es activado por AKT a través de la fosforilación de la quinasa inhibidora (*IKK α*). Tras su activación, IKK fosforila I κ B, marcándolo para la ubiquitinación y degradación en el proteosoma. Esto expone los lugares de localización nuclear de NF- κ B y le permite la traslocación al núcleo donde induce la expresión de genes anti-apoptóticos. Los factores de crecimiento como EGF activan NF- κ B y protegen contra la apoptosis y, por el contrario, la inhibición de NF- κ B sensibiliza a la célula a una amplia variedad de estímulos pro-apoptóticos (38).

Además, la activación de HIF-1 inducida por EGF y mediada por AKT conduce a una mayor expresión del factor de crecimiento endotelial (*VEGF*), que protege a las células de la apoptosis. AKT también fosforila directamente CREB activando su actividad transcripcional y sobreexpresando genes antiapoptóticos como Mcl-1 (12). Por el contrario, AKT inactiva factores de transcripción FOXO (familia Forkhead) y p53, bien directamente fosforilando proteínas FOXO o por fosforilación y activación de MDM2, regulador negativo de p53 (13,14). En ambos casos, la expresión de genes proapoptóticos disminuyen causando un aumento de la supervivencia celular (41).

Específicamente, la fosforilación de MTOR por AKT ocurre a través de la inactivación del complejo de esclerosis tuberosa (*TSC*). El complejo TSC es un heterodímero que consiste en tuberina (*TSC2*) no fosforilada y hamartina (*TSC1*), que actúa como proteína GTPasa activadora (*GAP*), inhibiendo a la pequeña proteína G-Rheb. Por fosforilación de

TSC2, AKT interrumpe el complejo, permitiendo a Rheb, unirse a ATP y pasar desde el estado GDP inactivo al estado activo. Rheb, unido a GTP, activa a MTOR (41).

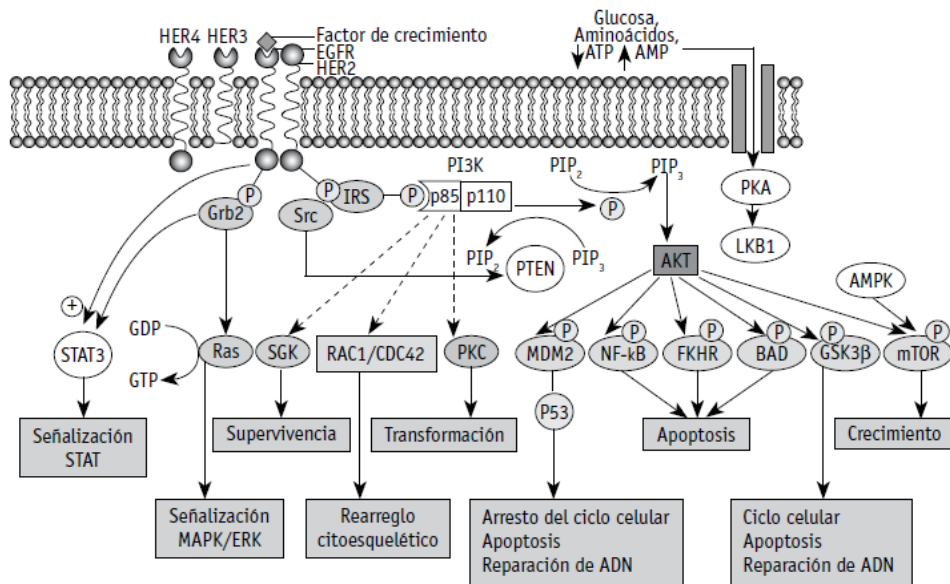


ILUSTRACIÓN 15. ESQUEMA REPRESENTATIVO DE LAS FUNCIONES CELULARES QUE ACTIVAN LA EXPRESIÓN PROTEICA DE LOS DIFERENTES FACTORES QUE ACTÚAN EN LA VÍA PI3K (19).

En una ruta paralela la proteína AMPK fosforila, aunque en este caso activa TSC2, inhibiendo así la activación de MTOR en respuesta a cambios intracelulares de la relación ATP/AMP (41).

1.5.2. La vía RAS/RAF

Ras es una proteína de unión a nucleótidos de guanina asociada a membrana que normalmente se activa en respuesta a la unión de señales extracelulares, tales como factores de crecimiento, RTKs (Tirosina Quinasas Receptoras), TCR (Receptores de Células T) y PMA (Phorbol-12 Myristate -13 acetato). La señalización RAS afecta a muchas funciones celulares, que incluye la proliferación celular, la apoptosis, la migración, la especificación de destino, y la diferenciación. Ras actúa como un interruptor de señal binaria, que se caracterizan en términos de una molécula pequeña, un nucleótido guanino unido a la proteína. En la célula en reposo, Ras está estrechamente unido al PIB (Guanosina difosfato), que se intercambia por GTP (trifosfato de guanosina) al unir los estímulos extracelulares a los receptores de la membrana celular. En la forma unida a GTP, Ras interactúa específicamente con las llamadas proteínas efectoras, iniciando así

cascadas de interacciones proteína-proteína que pueden conducir finalmente a la proliferación celular.

Se cree que RAS activa una serie de vías de señalización, incluyendo la vía RAF / MEK / ERK (quinasas reguladas por señal extracelular), la vía MEKK / SEK / JNK (Jun N-terminal quinasas), una PI3K (fosfatidilinositol 3-quinasa) / AKT / NF-KappaB (Nuclear Factor-Kappa B), una ruta p120-GAP / p190-B / RAC / NF-KappaB, y una vía RAF / MEKK1 / IKK (I-KappaB Kinase) / I-KappaB / NF -KappaB vía (42).

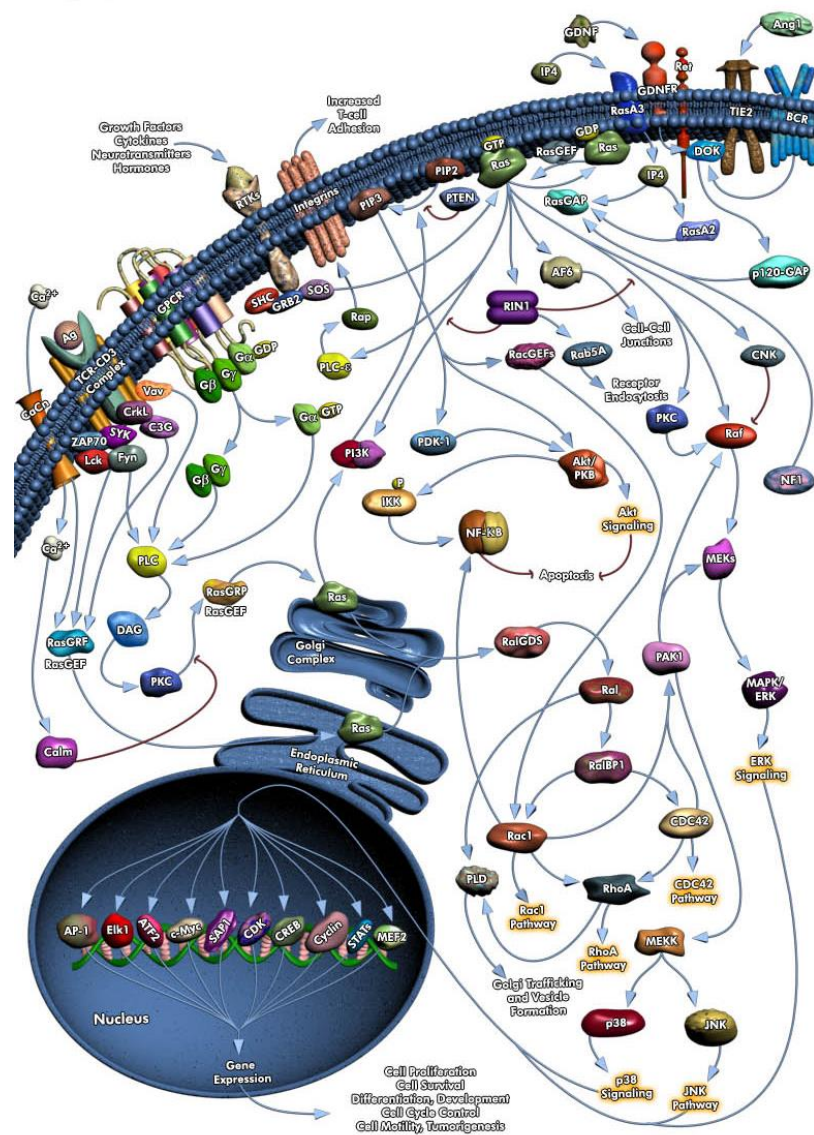


ILUSTRACIÓN 16. ESQUEMA DEL FUNCIONAMIENTO DE LA SEÑALIZACIÓN PROTEICA EN LA VÍA RAS Y DE LAS PROTEÍNAS RELACIONADAS (43).

A continuación, vamos a describir las proteínas que intervienen en ambas vías, seleccionadas para nuestro estudio, su función y su relación con los cánceres más comunes en los que participan y con el carcinoma epidermoide de vías aerofaríngeas.

1.6. PROTEÍNAS QUE PARTICIPAN EN LOS PROCESOS CANCERÍGENOS DE LAS VÍAS TIROSINQUINASA

1.6.1. Proteína EGFR1 1

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR1; ErbB-1; HER-1 en los seres humanos) es una glicoproteína transmembrana que constituye uno de los cuatro miembros de la familia erbB de receptores tirosinquinasa: EGFR1 (ErbB-1), HER-2 / c-neu (ErbB-2), HER-3 (ErbB-3) y HER-4 (ErbB-4). (44).

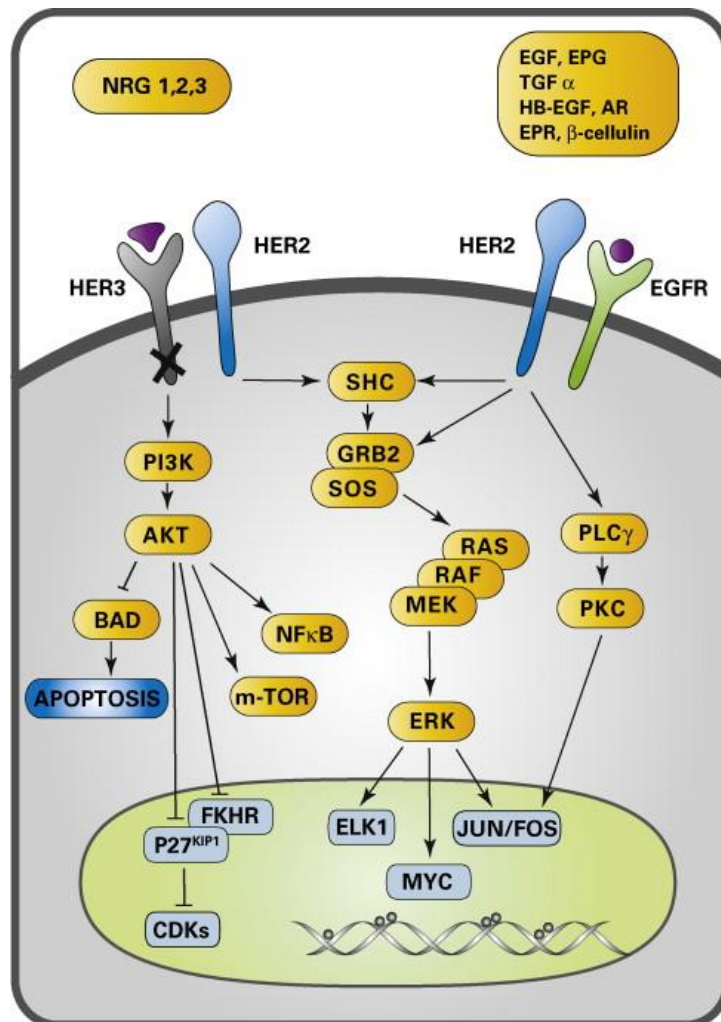


ILUSTRACIÓN 17. ESQUEMA DE TRANSMISIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN PROTEICA POR LOS DIFERENTES RECEPTORES DE LA FAMILIA HER (45).

Su activación desencadena varias cascadas de transducción de señales, principalmente la MAPK/AKT y las vías de JNK, por las cuales se modulan fenotipos tales como la migración celular, la adhesión, la diferenciación y la proliferación (44).

EGFR1 regula la proliferación de células tumorales y la supervivencia aguas abajo a través de la Ras-Raf- Mek-Erk (RAS-MAPK) y la vía fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K-AKT). Las mutaciones en RAS, RAF, PI3K, y PTEN están fuertemente asociadas con la iniciación y progresión del tumor y se han identificado con alta frecuencia en diversos tumores malignos (46).

Varios informes sugieren que las mutaciones de EGFR1 confieren beneficio de supervivencia celular, independientemente del tratamiento y de la terapia con inhibidores de la tirosinaquinasa (34, 47).

La expresión de EGFR1 en cáncer de mama ha sido inversamente correlacionada con la supervivencia libre de recaída y se asocia con la falta de respuesta a la terapia hormonal (46). Se ha demostrado la sobreexpresión de EGFR1 en el 90% de los casos de carcinomas espinocelulares en cabeza y cuello y que esto lleva a un peor pronóstico (34, 48, 49). La activación de EGFR1 en carcinomas de cabeza y cuello viene regulada por la activación de PIK3CA. La sobreexpresión de esta vía y de EGFR1 también está influida por AKT2 y las mutaciones en PTEN (34).

En cuanto al tratamiento, los inhibidores de los dominios internos de EGFR1 han tenido resultados pobres en cabeza y cuello (48, 50, 51). En los dominios externos los resultados con anticuerpos tipo Cetuximab han tenido aportaciones interesantes. En enfermedad metastásica los primeros resultados en monoterapia después de tratamiento con cisplatino fueron pobres (Baselga, J. Trigo, J.M. Bourhis, J. 2005) (52). Pero sus resultados mejoraron cuando se combinaron con quimioterapia. El principal estudio fue EXTREME (Vermorken J.B. 2007) (53) que demostraron un aumento de la supervivencia combinando con quimioterapia vs solo quimioterapia.

Combinaciones con otros fármacos tipo taxanos han demostrado también eficacia, como pasó en el estudio del grupo español ERBITUX (Hitt, R. 2012) (54). Sin embargo, sus mejores resultados han sido en enfermedad locorregional combinado con quimioterapia (Bonner, M.D. 2006) (55).

1.6.2. Proteína HER-2

El receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER-2), es un biomarcador pronóstico importante para el cáncer de mama y otros tipos de tumores y para la toma de decisiones en el tratamiento del paciente. HER-2 es un miembro de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR1) que se asocia con aumento de la proliferación de las células tumorales. Según lo determinado por diversos estudios, entre el 6 y el 35% de los pacientes con cánceres gástricos y unión gastroesofágica exhiben amplificación del gen HER-2 y sobreexpresión de la proteína (56).

Los estudios sugieren que los tumores HER2 positivos son en su mayoría resistentes a la terapia y tienen un alto potencial metastásico, sin embargo, los mecanismos subyacentes siguen siendo desconocidos.

HER-2 se amplifica en el 10-30% de los cánceres de mama humano, de ovario y gástrico. Allgayer et al. han confirmado a HER-2 como un parámetro pronóstico funcional independiente para la supervivencia global en el cáncer gástrico y algunos estudios observan una correlación significativa de HER-2 con la invasión y la metástasis (56).

Uno de los cambios de tratamiento más importantes de los tumores de mama ha sido el tratamiento con trastuzumab, que añadido a quimioterapia aumentó la supervivencia en tumores metastásicos (Slamon 2001) (57). Pero su gran repercusión fue en enfermedad locorregional, disminuyendo las recurrencias más del 50% y por lo tanto aumentando claramente la supervivencia (Piccart-Gebhart, M.J. 2005) (58).

En carcinoma de cabeza y cuello HER-2 se expresa entre un 2 y un 5% (49,59). Otros estudios encuentran una expresión cercana al 9% (60). No hay mucha literatura al respecto sobre su influencia en la patología.

1.6.3. Proteína HER-3

HER-3 está estrechamente relacionado con HER-2. Desempeña un papel esencial en la transformación mediada por HER-2, la progresión tumoral, metástasis y resistencia a los medicamentos (61).

HER-3 une varios factores de crecimiento, pero no transmite la señal en la célula a través de la fosforilación de proteínas por sí mismo. Esto es debido a que es una proteína de unión a membrana con un dominio de unión neurregulina pero no un dominio de quinasa activa (61, 62).

Para la transmisión de señales, HER-2 y HER-3 deben heterodimerizarse. Los heterodímeros que contienen HER-2 son los complejos más potentes, siendo el heterodímero HER-2-HER-3 el más mitogénico y transformador de todos ellos. Cuando uno de estos complejos está disminuido, la mitosis y el efecto transformador son bloqueados. La evidencia que apoya esta teoría incluye la disminución de la actividad de AKT cuando la expresión de HER-3 es bloqueada, sin embargo, no hay cambios significativos en la actividad y la expresión de HER-2 (61).

HER-3 sigue siendo esencial para la señalización de la transducción y la actividad quinasa aguas abajo que puede resultar en la proliferación o diferenciación celular. La sobreexpresión de HER-3 se ha reportado en diferentes tipos de cáncer, incluyendo el de próstata, vejiga, cáncer de mama, colorectal, gástrico, pulmón y ovario. (60, 61).

En la literatura se expone que HER-3 se asocia con características del cáncer, como la proliferación, la supervivencia y la metástasis a través de señalización PI3K / AKT. También parece que la sobreexpresión de HERRB3 está fuertemente asociada con pobres resultados clínicos y disminución de la supervivencia de los pacientes con cáncer gástrico, sobre todo cuando se expresa en membrana (60,61).

HER-3 es necesario en el mantenimiento de la señalización de PI3K / AKT que contribuye a la proliferación incontrolada de la célula. Es interesante que casi la totalidad de estas proteínas reguladoras del ciclo celular pueden ser moduladas por la señalización de PI3K (61).

En el carcinoma de cabeza y cuello la literatura nos reporta un porcentaje de sobreexpresión aproximada al 77% (60).

1.6.4. Proteína IGF-1R

El IGF-1R es un receptor de tirosina quinasa conservado filogenéticamente, expresado en los tejidos. El IGF-1R es importante en la regulación del crecimiento tisular, predominantemente a través de la hormona del crecimiento (GH). Este receptor está implicado en la regulación de motilidad celular (63).

Los niveles séricos de IGF-1R (receptor) son más bajos y los de IGF-proteínas 1 y 2 son más altos en todos los tumores de cabeza y cuello que en pacientes con carcinomas de la cavidad oral. Por otro lado, IGF-1R se expresa en los tejidos de cáncer oral. La

focalización del IGF-1R actualmente es un tema de mucha importancia en el cáncer oral (63).

Existe una amplia expresión de IGF-1R en carcinomas indiferenciados de la región orofaríngea y nasofaríngea, tanto ganglios linfáticos primarios como regionales.

La expresión de IGF-1R en estos tumores es capaz de transmitir señales mitogénicas a las células neoplásicas. Se sabe que la señalización de IGF-1R desempeña un papel crucial en el desarrollo y la progresión del cáncer (63).

Se demostró recientemente que la señalización de IGF-1R en células SCC de la cabeza y el cuello induce la señalización del factor de crecimiento endotelial vascular (63).

Los IGF e IGF-IR funcionan para promover la proliferación, inhibir la muerte y estimular la transformación en células cancerígenas. Además de su capacidad mitogénica,

IGFs también promueven otras respuestas como son protegen las células de la apoptosis y promueven la supervivencia (Rubin & Baserga 1995). Los IGFs proporcionan radioprotección y resistencia de las células de cáncer de mama a agentes quimioterapéuticos (Dunn et al., 1997, Gooch et al., 1999) (63).

Tanto la vía AKT y la MAPK son utilizadas por IGF para promover la supervivencia celular (Parrizas et al., 1997).

En carcinoma de cabeza y cuello, la expresión e IGF-R1 es similar a la encontrada en células normales, esto es alrededor del 50% de las biopsias (139, 140).

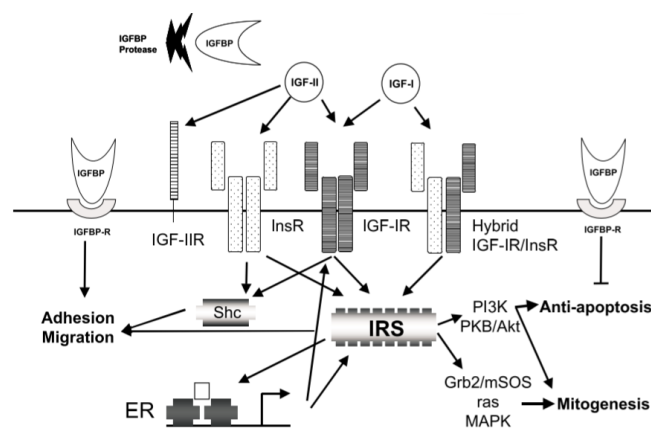


ILUSTRACIÓN 18. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA PROMOCIÓN DE LA SUPERVIVENCIA CELULAR POR IGF-I E IGF-II A TRAVÉS DE LAS VÍAS PI3K (ANTI-APOPTOSIS) Y RAS (MITOGÉNESIS) (64).

1.6.5. Proteína PI3K

El gen PIK3CA proporciona instrucciones para hacer la proteína P110 alfa (p110 α), que es una pieza (subunidad) de una enzima llamada fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K). La proteína p110 α se llama la subunidad catalítica, ya que realiza la acción de PI3K, mientras que la otra subunidad (producida por un gen diferente) regula la actividad de la enzima (65).

La señalización de PI3KCA es importante para muchas actividades celulares, incluyendo el crecimiento y la división celular (proliferación), el movimiento (migración) de las células, la producción de nuevas proteínas, el transporte de materiales dentro de las células y la supervivencia celular. Los estudios sugieren que la señalización de PI3K puede estar implicada en la regulación de varias hormonas y puede jugar un papel en la maduración de las células grasas (adipocitos) (65).

PI3K juega un rol muy importante en una amplia variedad de patologías tumorales en los seres humanos y su vía de señalización es por lo tanto un objetivo terapéutico muy atractivo (66). La activación aberrante de la vía de señalización de PI3K da lugar a una proliferación no regulada, evitando la apoptosis y alterando el metabolismo por medio del efecto Warburg. Esta actividad dependiente de PI3K se ve frecuentemente elevada por la amplificación o mutaciones del gen PIK3CA, así como por la pérdida de función del gen de la fosfatasa y tensina homóloga supresora de tumores (PTEN), un regulador negativo crítico en la vía. Además, el aumento de la actividad de la vía ha sido asociado con la resistencia a terapia anticancerígena (66).

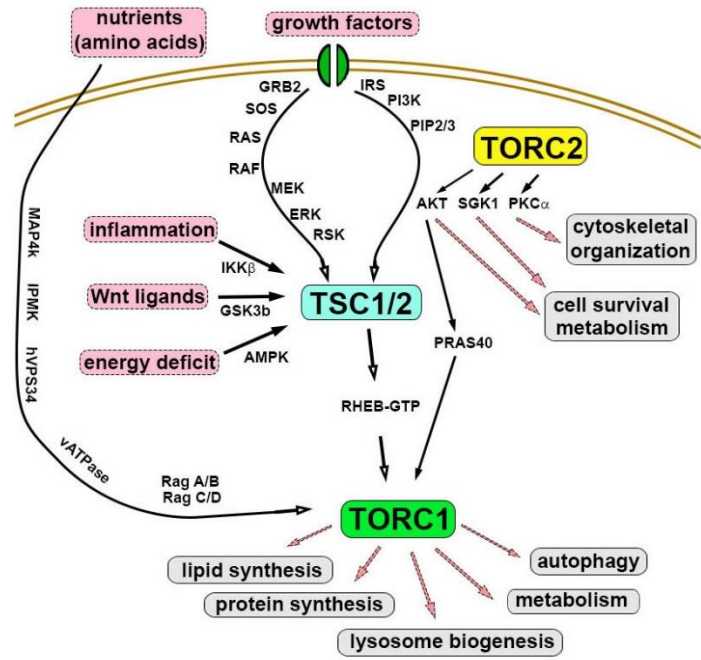


ILUSTRACIÓN 19. EL AUMENTO DE LA ACTIVIDAD DE PI3K Y AKT EN LAS CÉLULAS CANCERÍGENAS LLEVA A LA DESREGULACIÓN DE LAS FUNCIONES REPRESENTADAS EN EL ESQUEMA (67).

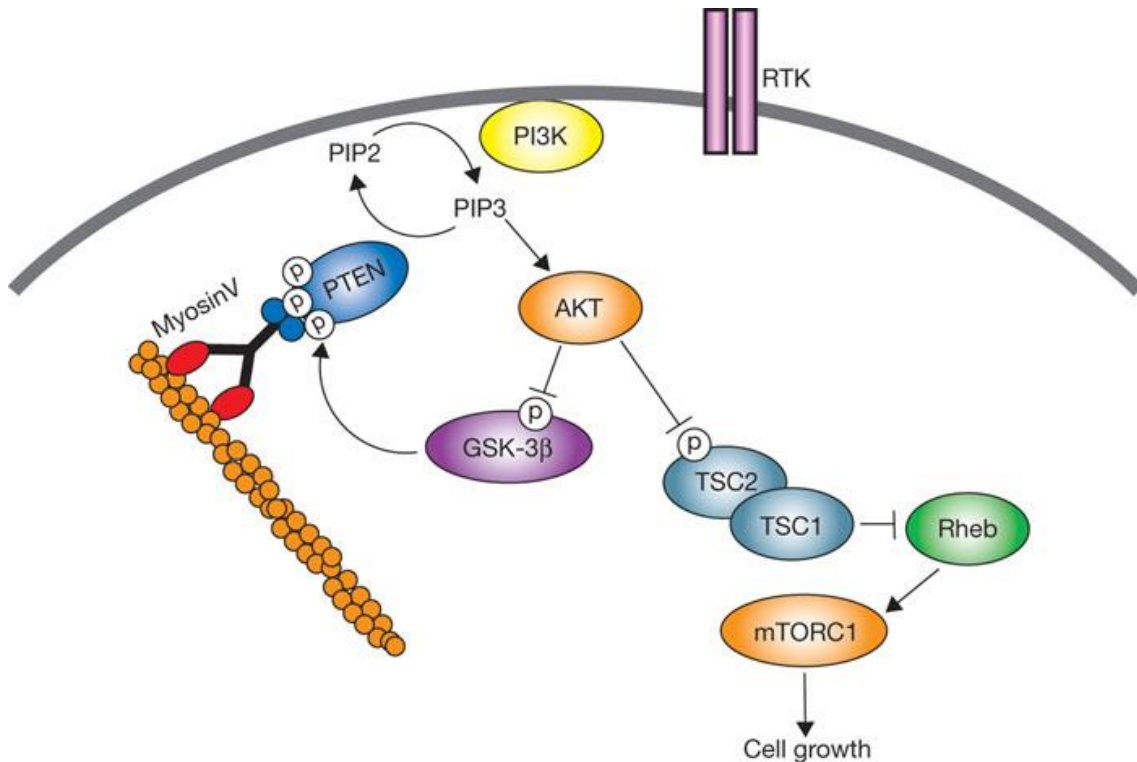


ILUSTRACIÓN 20. INTERACCIÓN DE PIP2 Y PIP3 EN EL PROCESO DE REGULACIÓN PI3K Y AKT (68).

La evidencia definitiva para la oncogenicidad de PI3K fue proporcionado por el aislamiento de una isoforma p110 α constitutivamente activa a partir del genoma del retrovirus aviar oncogénico ASV 16 (38).

Lo más importante es que las mutaciones somáticas en el cáncer humano se dirigen específicamente hacia p110 α y PTEN con una frecuencia muy alta, lo que resulta en el aumento de la actividad de la vía de señalización de PI3K y proporcionan evidencia genética clara del papel central de PI3K en el cáncer humano (38).

En cuanto a la mutación genómica de PIK3CA, en los carcinomas escamosos de cabeza y cuello, la encontramos en el 21% en el estudio ATLAS y en el 8% en COSMIC (69).

PI3K participa en la génesis de muchos tumores diferentes como son el hepatocelular, gástrico, endocrinos, renales, glioblastomas, pulmón (70, 71, 72, 73, 74, 75).

En el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello lo encontramos sobreexpresado alrededor del 40% de los casos (76).

1.6.6. Proteínas AKT 1, 2, 3

AKT es una proteína de la familia de las serinas treoninas quinasas formada por tres miembros (AKT1/PKB α , AKT2/PKB β and AKT3/PKB γ) que comparten una secuencia homóloga muy amplia, pero que se expresan de manera diferente tanto en su ARNm como en sus niveles proteicos (Bellacosa et al., 1993); Altomare et al., 1995; Brodbeck et al., 1999) (77).

El gen **AKT1** proporciona instrucciones para hacer una proteína llamada quinasa AKT1. Esta proteína se encuentra en diversos tipos de células en todo el cuerpo, donde juega un papel crítico en muchas vías de señalización. Por ejemplo, AKT1 quinasa ayuda a regular el crecimiento y la división celular (proliferación), el proceso por el cual las células maduran para llevar a cabo funciones específicas (diferenciación), y la supervivencia celular. AKT1 quinasa también ayuda a la apoptosis de control, que es la autodestrucción de las células cuando se dañan o que ya no son necesarias (77).

La señalización que implica AKT1 quinasa parece ser esencial para el normal desarrollo y función del sistema nervioso. Los estudios han sugerido un papel para AKT1 quinasa

en la comunicación de célula a célula entre las neuronas, la supervivencia neuronal, y la formación de recuerdos.

El gen AKT1 pertenece a una clase de genes conocidos como oncogenes. Cuando está mutado, los oncogenes tienen el potencial de causar que las células normales se vuelvan cancerosas (77).

AKT2 es un oncogén putativo que codifica una proteína que pertenece a una subfamilia de quinasas de serina / treonina que contienen (2-como Src de homología) dominios SH2-similares. El gen se ve amplificado y sobreexpresado en 2 de 8 líneas de células en carcinoma de ovario y 2 de 15 tumores primarios de ovario. La sobreexpresión contribuye al fenotipo maligno del subconjunto de los cánceres pancreáticos ductales humanos. La proteína codificada es una proteína quinasa en general capaz de fosforilar varias proteínas conocidas (78).

AKT3 es una proteína estrechamente relacionada con AKT1 y AKT2, y que regulan muchos procesos incluyendo el metabolismo, la proliferación, la supervivencia celular, el crecimiento y la angiogénesis. Esto es mediado a través de serina y / o treonina de una gama de sustratos aguas abajo. Más de 100 sustratos diferentes se han reportado hasta el momento. AKT3 es la isoforma AKT menos estudiada. Desempeña un papel importante en el desarrollo del cerebro y es crucial para la viabilidad de las células del glioma maligno. La isoforma AKT3 también puede ser la molécula clave en la regulación y baja regulación de MMP13 a través de IL13. Estas son necesarias para la coordinación de la biogénesis mitocondrial. El descenso de la regulación por el ARN reduce la expresión de la forma fosforilada de BAD, lo que resulta en la inducción de apoptosis dependiente de caspasa (79).

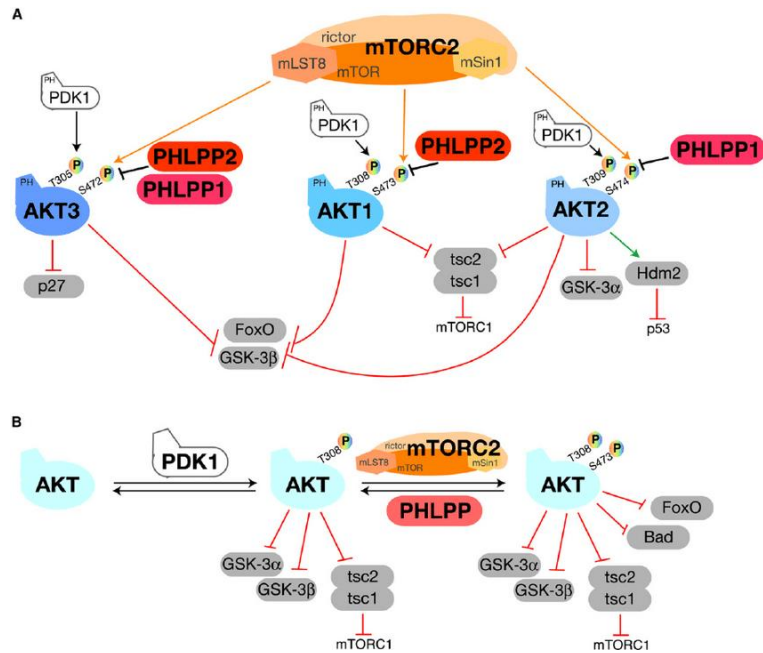


ILUSTRACIÓN 21. REPRESENTACIÓN DE LAS DIFERENTES INTERACCIONES DE AKT 1 2 Y 3 EN LA VÍA (80).

El anticuerpo se hizo contra la forma fosforilada de AKT1 en T308, pero debido a un alto grado de homología reacciona con AKT2 y AKT3, si estos están fosforilados el anticuerpo reacciona contra las 3 formas (más adelante veremos que nuestro estudio fue realizado con un anticuerpo para tinción de las tres proteínas de manera simultánea) (76).

Una de las alteraciones frecuentemente encontradas en el carcinoma epidermoide es la superactivación de la vía PI3k/PTEN/MTOR, de la cual AKT es el elemento central, que controla los procesos celulares tales como el metabolismo, tamaño celular, proliferación y apoptosis, por lo que regula el crecimiento y la supervivencia celular.

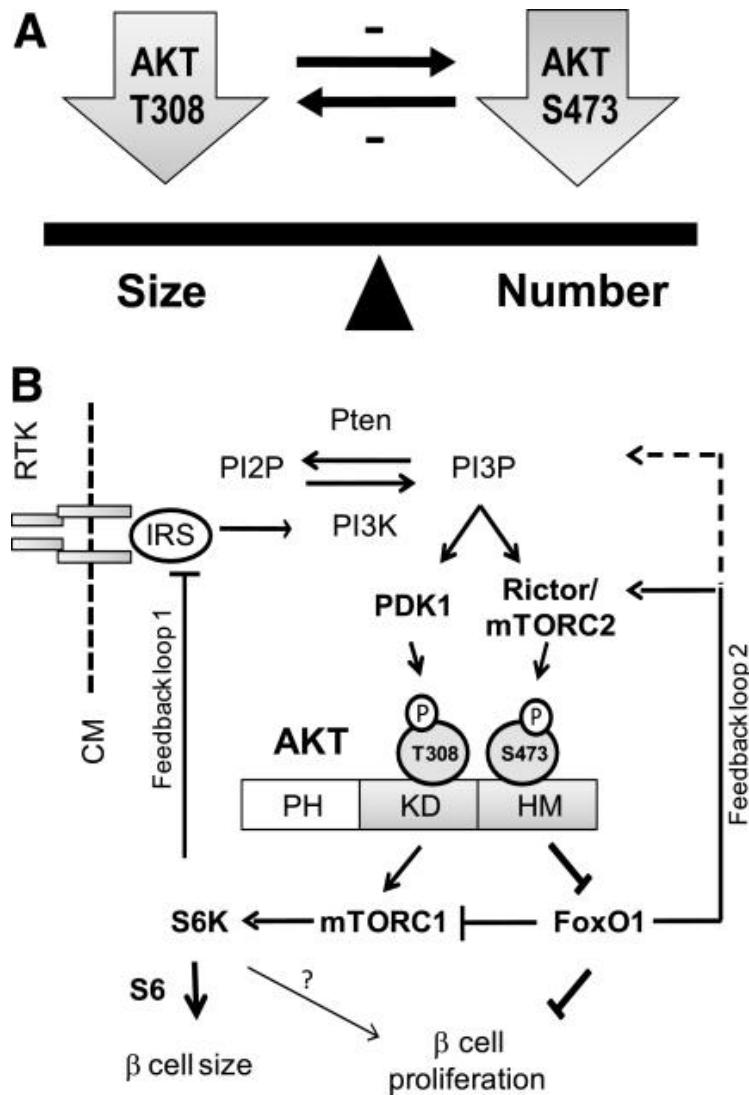


ILUSTRACIÓN 22. ESQUEMA QUE MUESTRA LA INTERACCIÓN DE AKT CON PIP2 Y PIP3 (81).

Una vez que AKT está fosforilada y completamente activada, es capaz de fosforilar múltiples substratos, produciendo también su activación funcional o inhibición. Los substratos de AKT participan en diversos procesos celulares, así como en el metabolismo (GSK3β, GLUT4), proliferación (p27, CycD1, Foxo3a), supervivencia (Bad, caspase 9) y crecimiento celular (MTOR, PDE3B). Algunos de los activadores de AKT conducen a una mayor proliferación y descenso de la apoptosis, y por ello AKT está considerado un protooncogen. De todas formas, para que AKT sea totalmente oncogénico debe haber una elevada o muy desregulada actividad quinasa (Altomare and Testa, 2005; Bellacosa et al., 2005; Song et al., 2005; Manning and Cantley, 2007) (76).

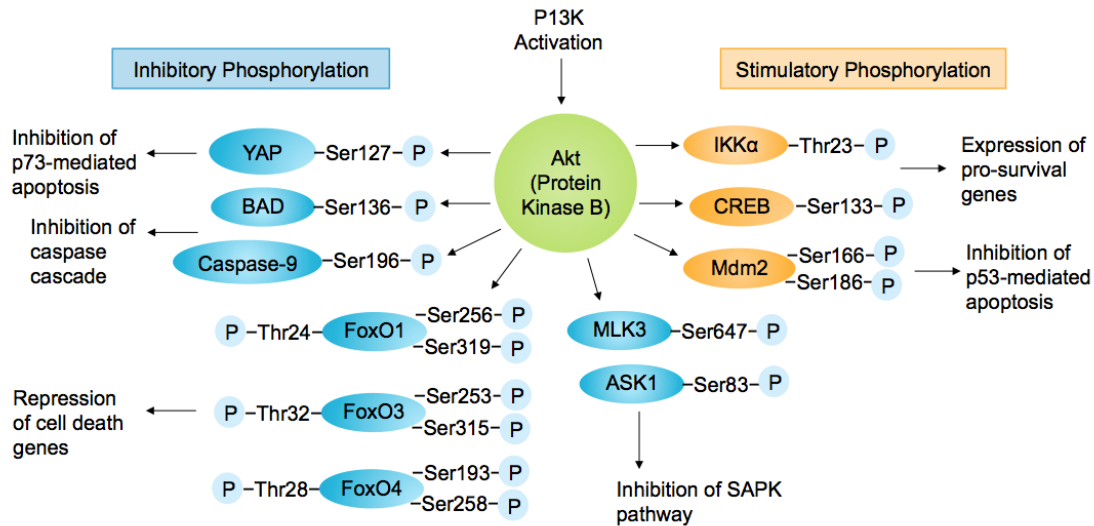


ILUSTRACIÓN 23. DIFERENTES FUNCIONES CELULARES DE LAS QUE AKT ES MEDIADOR A TRAVÉS DE DIFERENTES ACTIVACIONES Y MODULACIONES DE OTRAS PROTEÍNAS AGUASABAJA (82).

Los miembros de la familia AKT han sido encontrados alterados en muchos tipos de tumores, por ejemplo **AKT1** está sobreactivado en tumores de mama, ovarios, próstata y cáncer de cabeza y cuello (Sun et al., 2001; Amornphimoltham et al., 2004; Segrelles et al., 2006); **AKT2** está sobreexpresado en tumores de mama ER+, ovario y tumores de cabeza y cuello (Yuan et al., 2000; Sun et al., 2001; Pedrero et al., 2005), en cáncer de tiroides (Ringel et al., 2001) y en tumores de ovarios, cabeza y cuello y de páncreas (Cheng et al., 1992, 1996; Bellacosa et al., 1995; Pedrero et al., 2005); y **AKT3** está sobreexpresada por el contrario en tumores de mama ER- (Nakatani et al., 1999). Sin embargo, aunque se ha encontrado frecuentemente activado, no se han reportado mutaciones de genes AKT hasta hace muy poco, cuando una lisina activada en sustitución de ácido glutámico en el dominio PH (E17K) de AKT1 fue identificada en algunos tumores de mama, cáncer colorectal y ovarios (76).

El aumento de AKT ha sido demostrado como consecuencia de la sobreexpresión de HER-2 en tumores de mama positivos para este receptor (Bacus et al., 2002) (76)

Las alteraciones genéticas en PI3K, EGFR1 y PTEN pueden dar lugar al incremento de la actividad de AKT, el cual se ha encontrado sobreexpresado entre el 20 y el 60% de los tumores y en la mayoría de las células derivadas de los carcinomas de cabeza y cuello (Amornphimoltham et al., 2004; Pedrero et al., 2005; Mandal et al., 2006; Segrelles et al., 2006). Otros estudios indican que la expresión puede llegar hasta el 81% de los caoss (83). Además de esto, la amplificación del gen AKT2 ha sido demostrada en el 30% de

las muestras de carcinomas de cabeza y cuello (Pedrero et al., 2005). Muy interesante es la demostración de algunos estudios de la no activación de EGFR1 en el 50% de los casos en los cuales se pudo encontrar AKT de manera activa (Molinolo et al., 2007) (76).

Por último, la activación de AKT ha sido demostrada como un predictor de mala supervivencia, asociado a altas tasas de recurrencia (Massarelli et al., 2005; Yu et al., 2007) (76).

1.6.7. Proteína MTOR

MTOR (**m**ammalian **T**arget of **R**apamycin) es una serina/treonina quinasa. Participa en la regulación del inicio de la transcripción del ARNm y la traducción a proteína en respuesta a concentraciones intracelulares de aminoácidos y otros nutrientes esenciales. Interviene en la organización del citoesqueleto de actina, en el tráfico de membrana, degradación de proteínas, señalización de PKC y biogénesis del ribosoma. MTOR regula rutas de señalización esenciales y está implicada en el acoplamiento del estímulo de crecimiento y la progresión del ciclo celular (41).

Existen dos complejos que contienen MTOR: el complejo sensible a rapamicina (también llamado complejo MTOR-1 o MTORC1), que se define por su interacción con la proteína Raptor ("regulatory-associated protein of MTOR"), y un complejo insensible a rapamicina (también llamado complejo MTOR2 o MTORC2), que se define por su interacción con Rictor ("rapamycin-insensitive companion of MTOR").

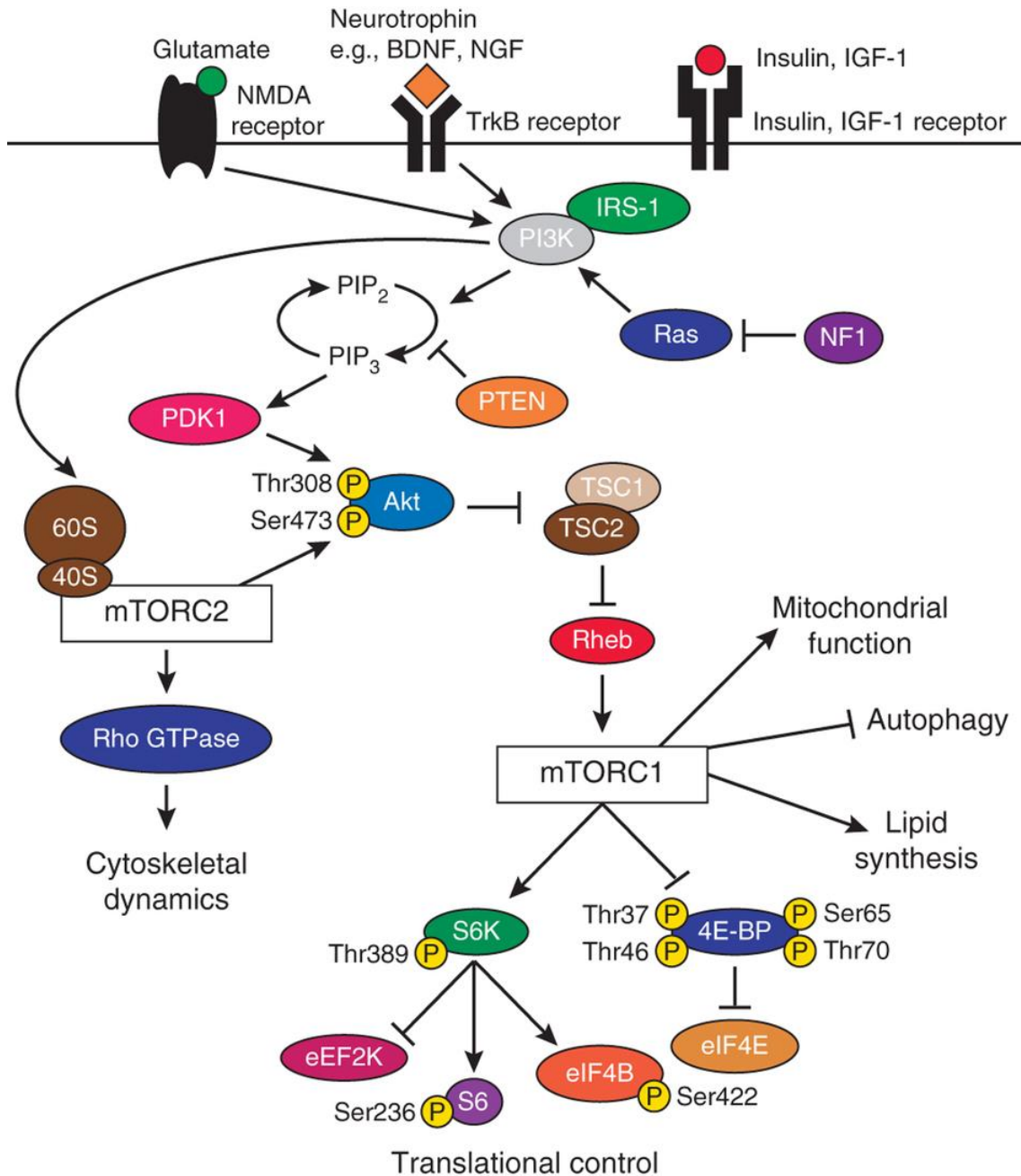


ILUSTRACIÓN 24. RELACIONES DE LOS COMPLEJOS MTORC1 Y MTORC2 CON OTRAS PROTEÍNAS DURANTE EL DESARROLLO DE SUS DIFERENTES FUNCIONES (84).

MTOR es una quinasa clave que actúa por debajo de PI3K. Muchas evidencias apoyan la hipótesis de que MTOR es la llave del catabolismo y anabolismo celular que determina si las células, y en particular las células cancerígenas, deben crecer y proliferar. Además, MTOR tiene efectos en la regulación de la apoptosis (41).

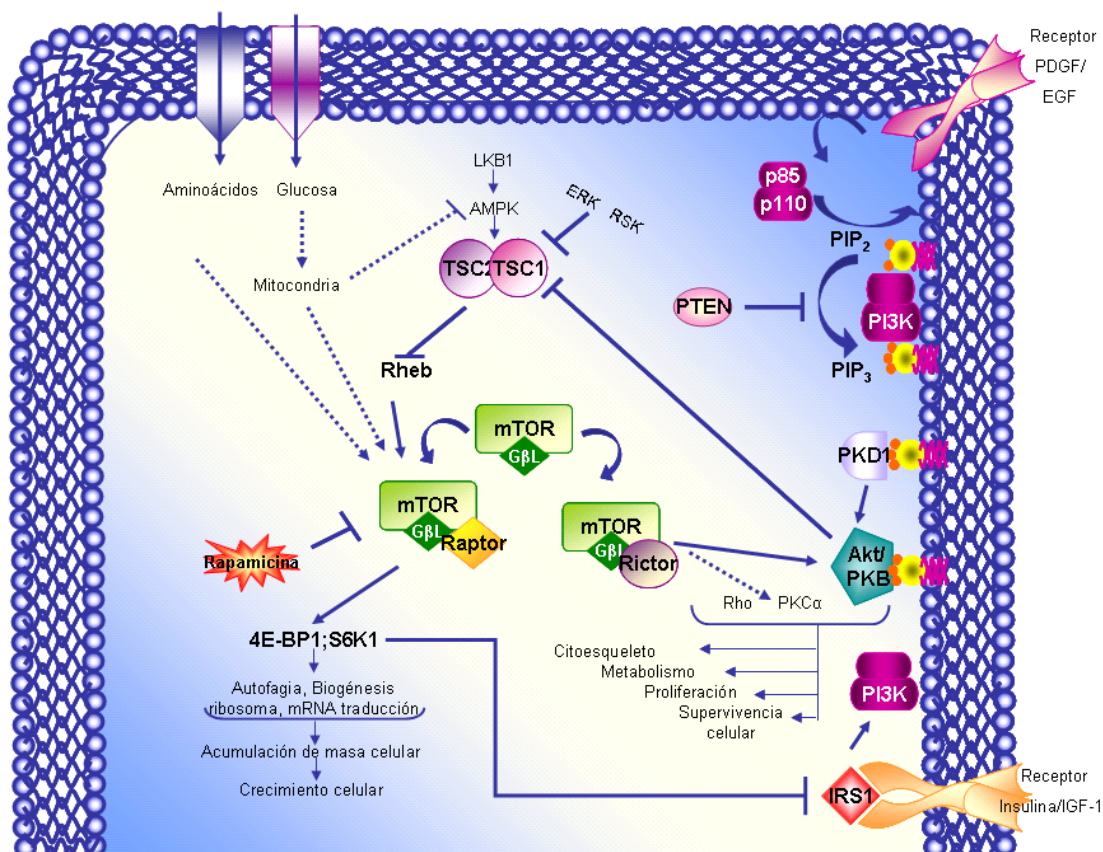


ILUSTRACIÓN 25. MODELO DE LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE MTOR Y PI3K/AKT Y SUS INTERCONEXIONES (41).

El complejo raptor-MTOR regula de forma positiva el crecimiento celular, y su inhibición causa una disminución del tamaño celular. La rama raptor de la ruta MTOR modula la traducción de RNAm, la biogénesis del ribosoma, el metabolismo de los nutrientes y autofagia.

Existen evidencias de que, por debajo de la diana MTOR, p70S6K, se une a la membrana mitocondrial y fosforila la proteína pro-apoptótica BAD. Dicha unión inactiva BAD y aumenta la supervivencia celular.

La inhibición de MTOR tiene como consecuencia un incremento en el movimiento de ciclina D1, a nivel RNAm y proteína, y un descenso en la eliminación del inhibidor de quinasa dependiente de ciclina, p27. Además, MTOR inhibe la ciclina A dependiente de actividad quinasa en células en fase de crecimiento exponencial. La inhibición farmacológica de MTOR disminuye el tránsito de G1 en el ciclo celular.

La desregulación de la ruta MTOR es un elemento clave en el desarrollo de distintas enfermedades humanas y como consecuencia se están desarrollando medicamentos que tienen como diana dicha proteína (everolimus). Pero, según indican algunos estudios, parece que la activación de esta ruta no es suficiente para inducir cáncer, necesiándose un evento oncogénico secundario para inducir la transformación (41).

Encontramos la participación de MTOR en tumores de mama, próstata, páncreas, hígado, colon y recto, tracto urinario, y en órganos reproductores femeninos (85).

En carcinomas de cabeza y cuello los estudios revelan una sobreexpresión de MTOR en el 60-80% de los casos (86), pero la bibliografía es muy escasa.

1.6.8. Proteína PTEN

El gen PTEN proporciona instrucciones para hacer una enzima que se encuentra en casi todos los tejidos del cuerpo y que actúa como un supresor de tumores, lo que significa que ayuda a regular la división celular, manteniendo el crecimiento celular y permitiendo que estas se dividan rápidamente o de forma incontrolada. La enzima PTEN modifica otras proteínas y grasas (lípidos) mediante la eliminación de grupos fosfato, cada uno de los cuales consta de tres átomos de oxígeno y un átomo de fósforo. Las enzimas con esta función se llaman fosfatasas (87).

La proteína PTEN es parte de una ruta química que indica a las células la orden de detener la división y activa la autodestrucción a través de la apoptosis. La evidencia sugiere que PTEN también ayuda a controlar el movimiento celular (migración), la adherencia (adherencia) de las células a los tejidos circundantes, y la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis). Además, probablemente juega un papel en el mantenimiento de la estabilidad de la información genética de una célula. Todas estas funciones ayudan a prevenir el crecimiento incontrolado de células que puede conducir a la formación de tumores (87).

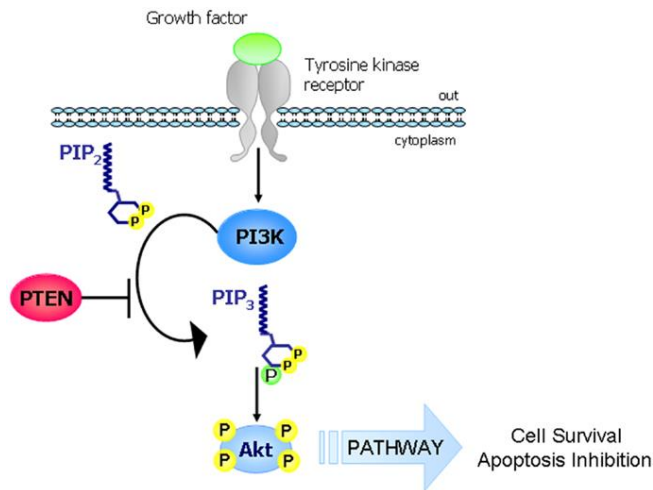


ILUSTRACIÓN 26. ESQUEMA DE PTEN COMO INHIBIDOR DE LA VÍA ENTRE PI3K Y AKT (88).

PTEN trabajando en oposición a PI3K, está asociado a la muerte celular y a inhibición de señales. Los residuos fosfolipídicos, así como PtdIns (3,4,5), P₃ están presentes en las células después de la estimulación de diferentes factores de crecimiento, además de factores de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento insulínico (IGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF). Tras la activación por los factores de crecimiento, las proteínas que contienen un dominio pleckstrin-homology (PH) se asocian a fosfolípidos en la membrana. Uno de los dominios PH que contiene proteínas muy relevantes es AKT (Coffer et al. 1998) (89).

A pesar de las propiedades de inhibición celular observados de PTEN, se ha sugerido que su función de supresión de tumores también resulta de la capacidad de PTEN para aumentar la tasa de apoptosis celular (Li et al. 1998, Stambolic et al. 1998).

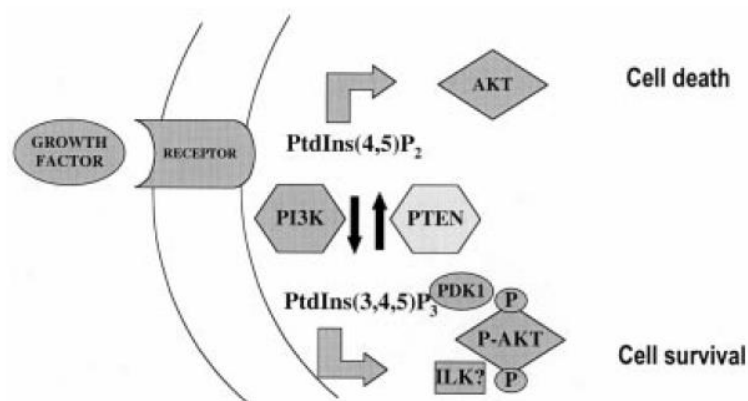


ILUSTRACIÓN 27. PTEN COMO MEDIADOR ENTRE LA VÍA Y LA MUERTE CELULAR A TRAVÉS DE LA INHIBICIÓN DE AKT EN SU PROCESO DE FOSFORILACIÓN (90).

Como un antagonista de la señalización de PI3K, el deterioro de la función PTEN conduce a la acumulación PIP3 en las células y a la activación sin restricciones de sus señales de aguas abajo. La pérdida de la función de PTEN se produce en un amplio espectro de cánceres humanos a través de mutaciones, deleciones, silenciamiento transcripcional e inestabilidad de la proteína a una frecuencia que puede rivalizar con alteraciones de p53. La falta de redundancia de PTEN podría explicar la alta frecuencia de mutaciones. A pesar de su serina, treonina y la actividad potencial de la fosfatasa de la tirosina, la función de la fosfatasa lipídica de PTEN se ha demostrado que es la principal fuerza motriz en la supresión tumoral. Una mutación, G129E, que abroga la actividad fosfatasa lipídica de PTEN pero respeta su actividad fosfatasa de proteínas, resulta en la inactivación de las funciones supresores de tumores PTEN in vitro (38).

Las mutaciones somáticas en PTEN producen en un gran porcentaje de cánceres humanos, con los números más altos encontrados en el endometrio, sistema nervioso central, la piel y cánceres de próstata. Los mecanismos de inactivación de PTEN son bien resaltados en cánceres (91).

La mutación genómica de PTEN se encuentra en un 2-3% de los casos de carcinoma escamosos de cabeza y cuello (69). La sobreexpresión proteica de PTEN en carcinoma de cabeza y cuello se encuentra en unos porcentajes que varían del 35 al 50% de los casos (49).

1.6.9. Proteína VEGFR11

VEGFR11 es una sola proteína transmembrana que media la proliferación vascular. Se expresa no sólo en las células endoteliales vasculares, sino también en otros tipos de células: monocitos y macrófagos, trofoblastos humanos, células mesangiales renales, células del músculo liso vascular, células dendríticas y varios tipos de células cancerosas (93).

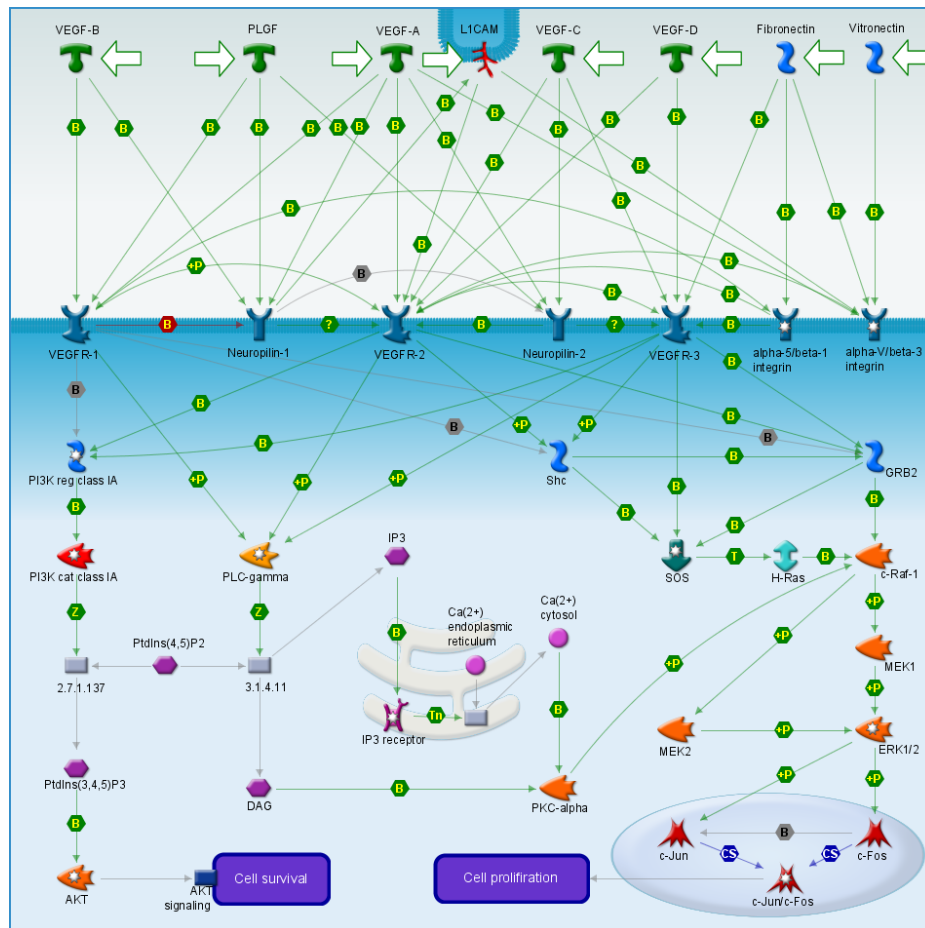


ILUSTRACIÓN 28. PODEMOS VER COMO VEGF 1 PARTICIPA EN LA VÍA PI3K Y RAS A TRAVÉS DE SHC (93).

El delicado equilibrio entre el suministro de oxígeno y nutrientes por los vasos sanguíneos y la proliferación de las células cancerosas determina el inicio de la hipoxia intratumoral y contribuye al cambio angiogénico. Los tumores que no logran activar la vía angiogénica permanecen latentes y no progresan. El regulador clave de la angiogénesis inducida por hipoxia es el factor de transcripción (HIF) -1. Múltiples HIF-1 genes diana están involucrados en diferentes etapas de la angiogénesis (93).

VEGF ejerce múltiples efectos dentro del microambiente del tumor, lo que agrava el crecimiento tumoral y la diseminación metastásica y reduce la eficacia del tratamiento. Los anticuerpos que se unen a VEGF y por lo tanto impiden su unión a VEGFR1 inhiben la angiogénesis y se han explotado clínicamente para la terapia del cáncer (Ferrara, 2005) (93).

De esta manera, es conocida la notable influencia de esta proteína en la progresión y diseminación de los tumores. Más aún, ha sido demostrado que VEGFR1 activa funciones quínicas para mediar el crecimiento y la migración de las células de los

carcinomas colorectales (Fan et al. 2005; Lesslie et al., 2006). También es sabido que la activación de VEGFR11 en los carcinomas de mama provoca un crecimiento y supervivencia celular (Wu et al. 2006) (92).

En carcinomas de cabeza y cuello lo encontramos expresado en un 100 en el estudio de Rajesh et al 2003. (94).

1.6.10. Proteína FGFR1

Los factores de crecimiento fibroblásticos (FGF) actúan a través de sus receptores afines (FGFR) y juegan un papel vital en el desarrollo y la desregulación de la señalización FGF / FGFR, la cual se asocia con muchos síndromes de desarrollo. Además, hay mucho interés en la inhibición de la señalización de FGF / FGFR como un enfoque terapéutico para el cáncer (95).

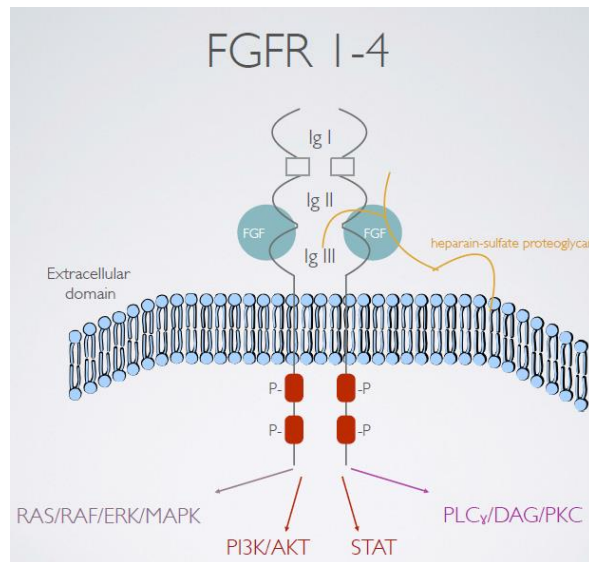


ILUSTRACIÓN 29. ESQUEMA DE LA INICIACIÓN DE LAS VÍAS RAS/RAF, PI3K/AKT, STAT Y PLC/DAG DESDE LOS DOMINIOS EXTRACELULARES TRANSMEMBRANA FGFR 1-4 (95).

La señalización FGF / FGFR es sin duda importante en la angiogénesis tumoral, pero los estudios en los últimos años han descubierto evidencia creciente de que los FGFRs están impulsando oncogenes en ciertos tipos de cáncer y actúan de manera autónoma en la célula para mantener las propiedades malignas de las células tumorales. Estas observaciones hacen a los FGFRs cada vez más atractivos como objetivo para la intervención terapéutica en el cáncer.

Su activación conduce a la señalización aguas abajo a través de la vía PI3K/AKT y la vía Ras/MAPK, que son fundamentales para el crecimiento, la migración y la angiogénesis

supervivencia en muchos tipos de cáncer. La desregulación de la señalización de la familia FGFR. Esto se ha descrito en múltiples tipos de cáncer, así como la amplificación, la translocación y mutaciones puntuales que se describen en una amplia gama de tipos tumorales como el cáncer de mama, próstata, mieloma, sarcoma, vejiga y cáncer de endometrio, entre otros (96).

En el cáncer de pulmón, la amplificación FGFR1 se encuentra en aproximadamente 20% de los cánceres de células escamosas, pero, aparte de la asociación con una histología de carcinoma epidermoide, poco se sabe acerca de clínica o correlatos demográficos de amplificación FGFR1 (96).

También encontramos la co-existencia de amplificación FGFR1 con otras alteraciones genéticas de tumores, incluyendo la mutación PIK3CA. Algunos estudios de cáncer de pulmón indican que la amplificación de FGFR1 no tiene relación con la supervivencia, aunque hay controversia ya que algunos estudios afirman que tiene relación con una inferior supervivencia y otros con una peor respuesta a la terapia endocrina (96).

Múltiples estudios han informado de que la amplificación FGFR1 en el cáncer de mama se asocia con una peor supervivencia libre de metástasis. Sin embargo, la amplificación de FGFR1 también ha sido asociado con la resistencia a la terapia endocrina (96).

Este se encuentra sobreexpresado entre el 10 y el 17% de las células en carcinomas de cabeza y cuello en algunos estudios (97). Mientras otros nos indican una expresión alrededor de 75% (98). No hay mucha bibliografía al respecto en carcinoma de cabeza y cuello.

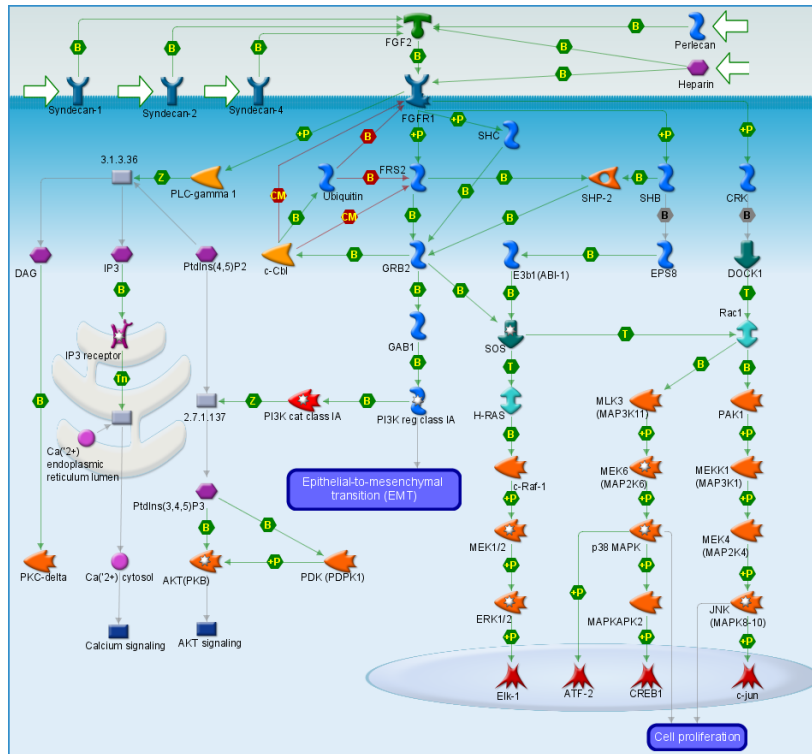


ILUSTRACIÓN 30. ESQUEMA REPRESENTATIVO DE LAS FUNCIONES QUE SE ACTIVAN EN LA CÉLULA SEGÚN LA VÍA QUE ACTIVE FGFR1 (99).

1.6.11. Proteína FGFR3

El receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 3 (FGFR3) es uno de los receptores de la familia de tirosina quinasa, que está compuesta por cuatro receptores, a través de los cuales se produce la señalización de factores de crecimiento de fibroblastos (100).

La unión del ligando promueve la dimerización del receptor, la transfosforilación de los principales residuos de tirosina, y el reclutamiento de proteínas adaptadoras. En última instancia conduce a la activación de múltiples cascadas de señalización corriente abajo, incluyendo PI3K / AKT, RAS / MAPK, lo que resulta en la proliferación y diferenciación celular (101).

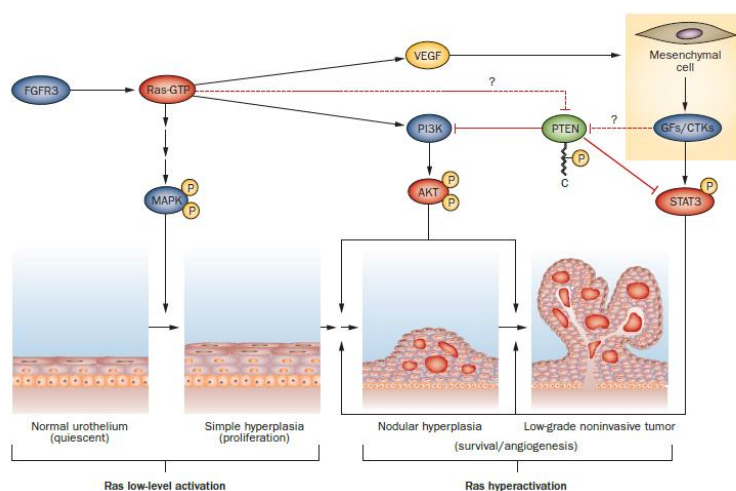


ILUSTRACIÓN 31. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE COMO FGFR3 INDUCE LA HIPERPLASIA SIMPLE MEDIANTE UNA BAJA ESTIMULACIÓN DE LA VÍA RAS/MAPK Y LA HIPERPLASIA NODULAR Y LA GÉNESIS TUMORAL MEDIANTE UNA HIPERESTIMULACIÓN DE RAS QUE ACTIVA LA VÍA PI3K/AKT (102).

Alternativamente, las mutaciones FGFR3 pueden desencadenar la activación de Ras, lo que conduce a una transducción de la señal aguas abajo. Las mutaciones de PIK3CA y FGFR3 generalmente se presentan juntas, y no hay evidencia que sugiera que estas mutaciones tienen un efecto oncogénico aditivo (103).

Otro tipo de tumor en el que se ha informado de la implicación significativa de FGFR3 es el mieloma múltiple en el que 25% de los casos tienen la translocación t(4; 14)(p16; q32) de FGFR3 en el locus de IgH lo que resulta en la sobreexpresión de FGFR3. Las mutaciones de FGFR3 son poco frecuentes, pero se han asociado con la progresión tumoral. El aumento de expresión de FGFs es común también en el cáncer de vejiga. En este y en el mieloma múltiple, el aumento de la expresión de la proteína FGFR3 y la mutación pueden ser un mecanismo por el cual FGFR3 podría contribuir al desarrollo de tumores (104).

FGFR3 se sobreexpresa en la mayoría de las células estudiadas en carcinoma de cabeza y cuello (97).

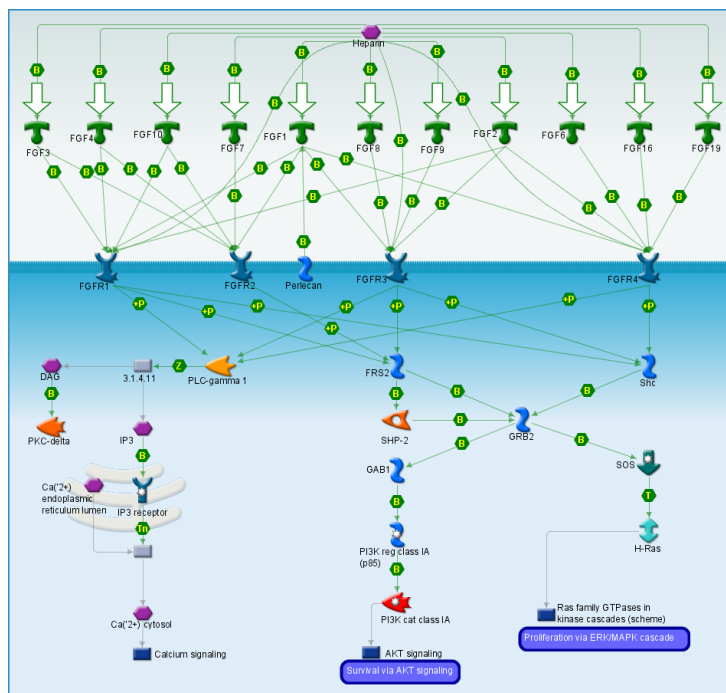


ILUSTRACIÓN 32. ESQUEMA REPRESENTATIVO DE LAS FUNCIONES QUE SE ACTIVAN EN LA CÉLULA SEGÚN LA VÍA QUE ACTIVE FGFR3 (105).

1.6.12. Proteína HRAS

Las tres proteínas principales de la vía Ras son NRAS (neuroblastoma RAS), Kras (Kirsten RAS) y HRAS (Harvey RAS) (106).

Los proto-oncogenes RAS (HRAS, KRAS y ANR) codifican una familia de proteínas altamente homólogas. Participan en una cascada de transducción de señales de la vía RAS/RAF/MEK/ERK, que regula las propiedades de crecimiento y la supervivencia de las células. Son controladas por señales extracelulares transmitidas por el receptor de tirosina quinasa transmembrana y el factor de crecimiento epidérmico receptor (EGFR1) (107).

H-ras es conocido por su actividad pro-apoptótica. La actividad pro-apoptótica de HRAS aumenta la susceptibilidad de las células HT29 de los adenocarcinomas colorrectales humanos cuando son tratados con el inhibidor de la histona deacetilasa (HDACi) y la apoptosis inducida. HDACi media la activación de la caspasa 3, -7, -8 y esto lleva a la muerte celular (108, 109).

Las mutaciones de Ras se encuentran hasta en el 30% de todos los cánceres y son particularmente comunes en los cánceres de páncreas y de colon. Raf es reclutado en la

membrana celular a través de la unión a Ras y se activa en un proceso complejo que implica la fosforilación y a múltiples cofactores (107).

HRAS se encuentra alterado en los cánceres de células escamosas de pulmón (3,8%), y en otros tumores como vejiga (5,1%), vulva (9,3%) y piel (3,8%). (110, 111).

En “The Cáncer Genome Atlas Network” encontramos que el gen HRAS se encuentra mutado alrededor de un 5% en carcinoma escamoso de cabeza y cuello (69,112). En el estudio COSMIC encontramos la mutación del gen en el 8% de los casos. En cuanto a la sobreexpresión de la proteína no hemos encontrado ningún artículo de la literatura que lo describa en carcinoma escamoso de cabeza y cuello.

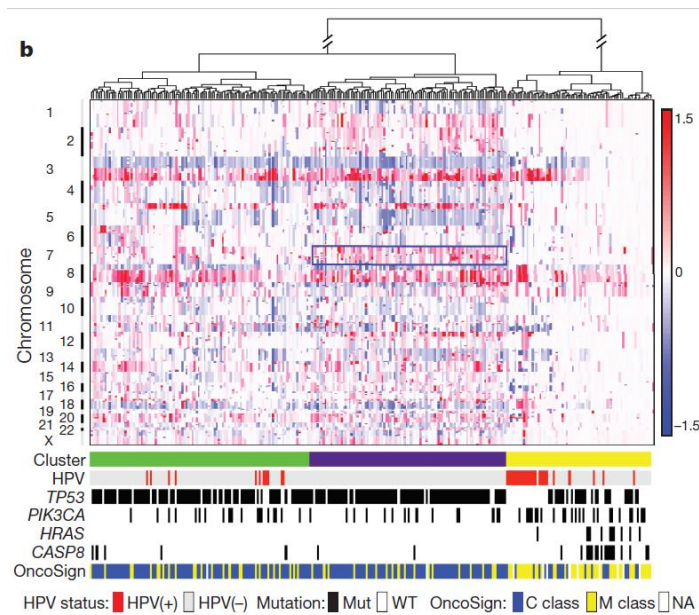


ILUSTRACIÓN 33. ANÁLISIS DE LAS ALTERACIONES CROMOSÓMICAS EN CÁNCER ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO (69).

1.6.13. Proteína NRAS

El gen de NRAS proporciona instrucciones para hacer una proteína llamada N-Ras que está involucrada principalmente en la regulación de la división celular.

La proteína NRas es una GTPasa, lo que significa que convierte una molécula llamada GTP en otra molécula llamada PIB. Actúa como un interruptor, y se encienden y apagan por las moléculas de GTP y GDP. Para transmitir señales, la proteína NRas debe estar activada uniéndose a una molécula de GTP. La proteína NRas se inactiva cuando se convierte el GTP en GDP. Cuando la proteína se une al PIB no retransmite señales al núcleo de la célula (113).

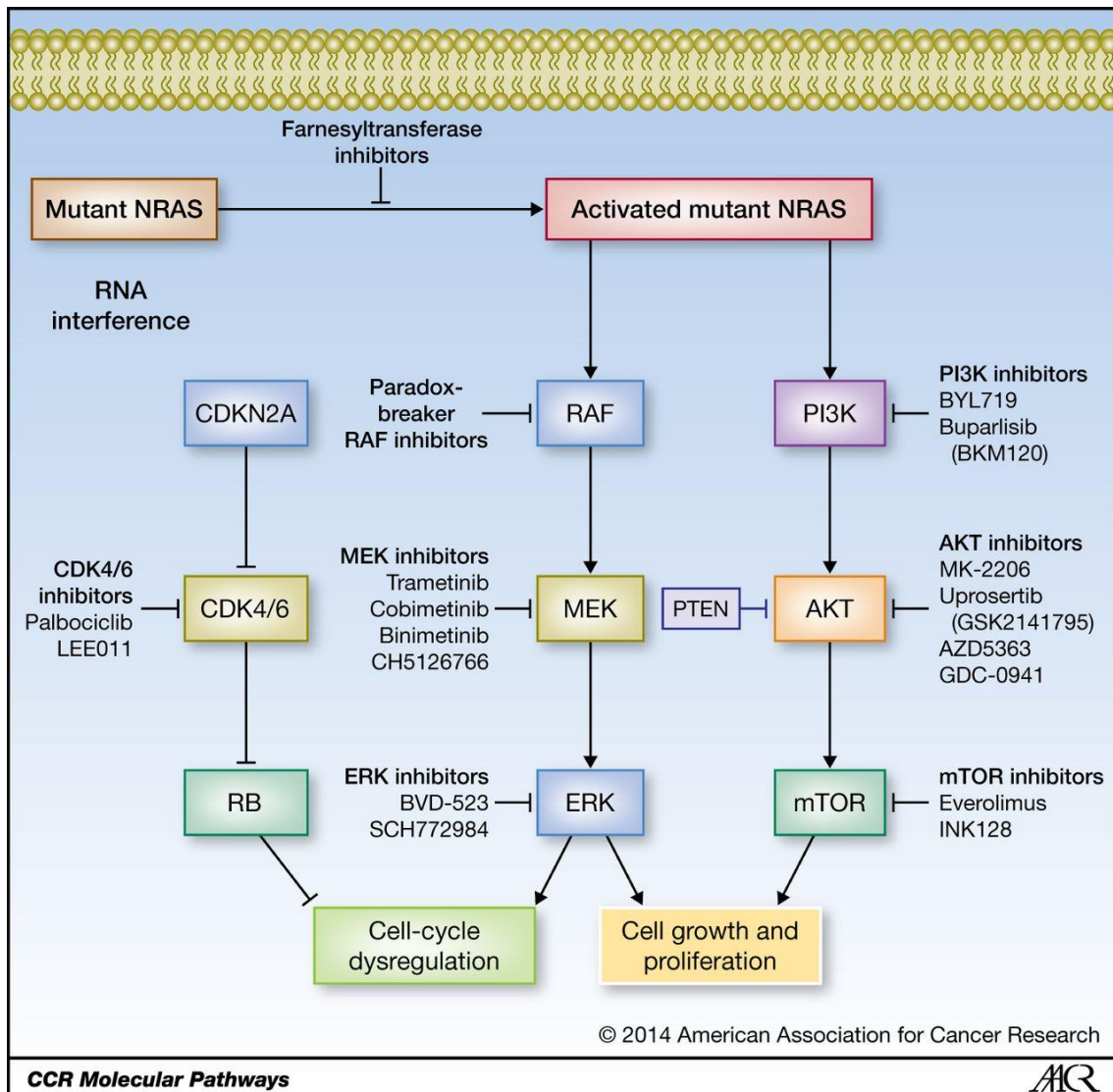


ILUSTRACIÓN 34. ESQUEMA DE LAS MODIFICACIONES CELULARES QUE PRODUCE NRAS MUTADO EN LA SEÑALIZACIÓN PROTEÍCA, PRODUCIENDO FINALMENTE UNA DESREGULACIÓN DEL CICLO CELULAR, UN CRECIMIENTO DE LA CÉLULA Y UNA ACTIVACIÓN DE LOS PROCESOS DE PROLIFERACIÓN (114).

Las mutaciones en NRAS desencadenan procesos tumorales a través de las vías PI3K/AKT y Ral-GDS. Normalmente su mutación no va acompañada de mutaciones en PI3K ni AKT o PTEN, lo que sugiere que la sola mutación de NRAS puede dar lugar a un proceso tumoral por sí misma (106).

Además, hay estudios que afirman que las mutaciones de NRAS y BRAF tienen peor respuesta al tratamiento (115).

NRAS es frecuente en melanomas, cuya mutación ha sido encontrada entre un 13 y 25% de los tumores (116). También aparece mutado en cáncer de pulmón en menos de un 1% de los casos y en neuroblastoma (117).

Se han encontrado deleciones de NRAS en carcinoma escamoso de cabeza y cuello en cantidad menor al 5%(110).

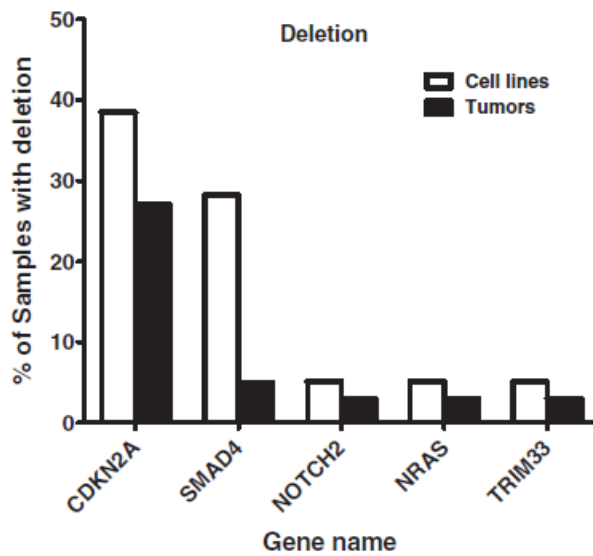


ILUSTRACIÓN 35. FRECUENCIA DE MUTACIÓN DE LOS GENES EN CÉLULAS NORMALES Y EN CÉLULAS DE CARCINOMA ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO (110).

En carcinoma de cabeza y cuello la expresión de NRAS es de un 50%. Según McDonald et al. (1996) cuando la expresión es mayor, la progresión del tumor aumenta proporcionalmente (111).

1.6.14. Proteínas KRAS

Las mutaciones KRAS comprenden el 86% de todas las mutaciones RAS. Las mutaciones en KRAS se producen con mayor frecuencia en todos los cánceres humanos (21,6%) (112).

Ha habido especulaciones sobre que la detección de la mutación KRAS puede augurar un peor pronóstico. Desafortunadamente, los informes han sido contradictorios sobre el valor pronóstico de las mutaciones KRAS (113). Según algunos estudios la sobreexpresión de EGFR1 y KRAS obtiene una peor respuesta al tratamiento y da lugar a más metástasis (114).

En pulmón encontramos la mutación de KRAS en la mayoría de los tumores escamosos (120). Pero al contrario que en el resto de los tumores, la mutación de KRAS no es tan frecuente en los carcinomas de cabeza y cuello (115). Sin embargo, algunos estudios muestran una expresión alrededor del 75% en carcinoma de cabeza y cuello (116).

1.6.15. Proteína BRAF

Es el homólogo B1 del oncogén viral del sarcoma murina v-raf. Es uno de los tres genes RAF (fibrosarcoma rápidamente acelerados A, B, C) localizados en el cromosoma 7q34. Este gen codifica una proteína quinasa citoplasmática serina-treonina de la familia RAF (117).

Las quinasas RAF son parte de la vía proteína mitógena activada quinasa (MAP) implicada en el crecimiento celular, la supervivencia y la diferenciación (117).

Las mutaciones BRAF desempeñan un papel importante en el 40-70% de los melanomas malignos, el 45% de los cánceres papilares de la tiroides y el 10% de los cánceres colorrectales, además de los cánceres ováricos, de mama y de pulmón (117, 118). Parece ser que la expresión de BRAF no tiene relación con el estadio del tumor, su tamaño, grado o nivel de vascularización. (118).

Las mutaciones en BRAF se encontraron en 3/89 HNSCC (3%) (118). Ningún trabajo de los que hemos encontrado analiza la expresión de BRAF.

1.6.16. Proteína ECADH

La E-cadherina es una glicoproteína transmembrana de 120 kDa que media la adhesión intercelular en epitelios disímiles. Además, la E-cadherina es un factor fundamental para administrar la adhesión célula-célula en los tejidos epiteliales. Está asociada con la invasión del cáncer y mal pronóstico en varios carcinomas, incluyendo HNSCC. La baja expresión del gen E-cadherina es una característica de la pérdida de adhesión de las células epiteliales, que se ha correlacionado con los cambios fenotípicos de mayor invasividad y motilidad de las células cancerosas. Algunos estudios han demostrado que la alta expresión del gen E-cadherina se asocia con un buen pronóstico en muchos cánceres epiteliales (119).

Los meta-análisis que encontramos en la literatura científica muestran evidencia clara de que la alta expresión de genes E-cadherina es un factor pronóstico favorable en HNSCC y se asocia con mejor supervivencia libre de enfermedad y mejor pronóstico (119).

Para que ocurran metástasis, las células cancerosas tienen que separarse de la lesión primaria como un paso inicial. La E-cadherina es una molécula de adhesión intercelular dependiente de Ca^{2+} en las células epiteliales, que juegan un papel importante en el establecimiento y mantenimiento de las conexiones intercelulares y morfogénesis (Takeichi, 1991). Se ha demostrado que el extremo citoplasmático de la molécula de E-

cadherina está unido al citoesqueleto de actina a través de alfa-catenina y beta-catenina (McCrea et al, 1991, Ozawa y Kemler, 1992, Knusden et al, 1995) y E-cadherina está directamente asociado con la beta-catenina e indirectamente enlazado a través del complejo heterodimérico de alfa-catenina / beta-catenina a alfa-catenina (Alberle et al., 1994, Stappert y Kemler, 1994). Se ha informado de que la regulación negativa de la alfa-catenina y la beta-catenina parece estar asociada con disfunción de la adhesión celular mediada por la E-cadherina y un aumento del potencial metastásico del cáncer (Kadowaki et al., 1994, Matsui et al, 1994, Ochiai et al, 1994) (120).

Por ello, la pérdida de adhesión debido a los cambios de expresión y función de estas moléculas se ha postulado como un evento temprano de las metástasis tumorales y un factor importante en la progresión del tumor (120).

1.6.17. Proteína P16

La proteína p16, también llamada CDKN2, ejerce una función de supresor tumoral mediante la unión al complejo ciclina D1 CDK4/CDK6, previniendo la fosforilación de la proteína retinoblastoma (Rb). P105Rb y otros miembros de la familia Rb, como son p107 y p130, regulan la actividad del factor de transcripción E2F. Este factor de transcripción y p105Rb participan en la inhibición de la transcripción de genes como la ciclina A, lo que impide la progresión del ciclo celular preservando la integridad de G1-S y el programa de transcripción involucrado en la reproducción celular. Aunque la mutación del gen p16 es difícil de encontrar en tumores de cabeza y cuello, sí que se han encontrado asociaciones a deleciones y metilaciones de su región promotora 5'-CpG que pueden ocasionar un problema funcional de la proteína (121, 122).

La expresión de la p16 está altamente correlacionada con el VPH en la cabeza y en el CECC y se considera marca de subrogado de la infección por el virus. La expresión de la p16 es diferente según las localizaciones de los carcinomas. Así, es más frecuente en los carcinomas de orofaringe que en los de la cavidad oral, laringe e hipofaringe, por lo tanto, el examen de múltiples marcadores moleculares es clave para descifrar la función de p16 como un indicador pronóstico útil cuando se evalúan en combinación con el VPH (123).

Esta infección oral de HPV tiene una asociación significativa con la autopercepción de la salud oral en general, independientemente del hábito de fumar y el sexo oral, por tanto, es importante promover la higiene y salud oral como una medida adicional para prevenir los cánceres orales relacionados con el VPH (124).

El número de casos de cáncer oral y orofaríngeo está aumentando hoy en día, especialmente entre las personas jóvenes sin hábitos tóxicos típicos, como el tabaco y / o alcohol. Los estudios epidemiológicos sugieren una fuerte asociación entre la infección por el VPH, especialmente los tipos 16 y 18 (de alto riesgo oncológico) que ya han demostrado su papel etiológico en los tumores anales, así como en el cáncer de cuello uterino. Hay clara evidencia epidemiológica de que ambos tipos de tumores se relacionan con cambios en el comportamiento sexual y que ambos están relacionados con la transmisión sexual del VPH (125).

En cuanto a su mutación genómica, los estudios Atlas y Cosmic encuentran porcentajes de 22 y 16% respectivamente en carcinomas escamosos de cabeza y cuello (69).

En la literatura encontramos que, en España, el porcentaje de la expresión de p16 en carcinomas de cabeza y cuello es inferiores al 20% (22, 23).

1.6.18. Proteína P53

P53 es una proteína que interactúa con alguna de las proteínas estudiadas pero que no está dentro de las vías estudiadas como tal. Se le considera el guardián del genoma y es el encargado de la reparación celular. Esta deriva del gen TP53 y su mutación es la más común.

El descubrimiento de la mutación de TP53 en leucoplasias y en mucosa de apariencia benigna que luego progresa en carcinoma epidermoide nos da la idea de la importancia de la participación de este gen, que desarrolla una mucosa anormal. Los factores de riesgo más importantes para la mutación del gen que produce la proteína son el tabaco y el alcohol. Además de originar el tumor, también puede dar lugar a una mala respuesta al tratamiento (126).

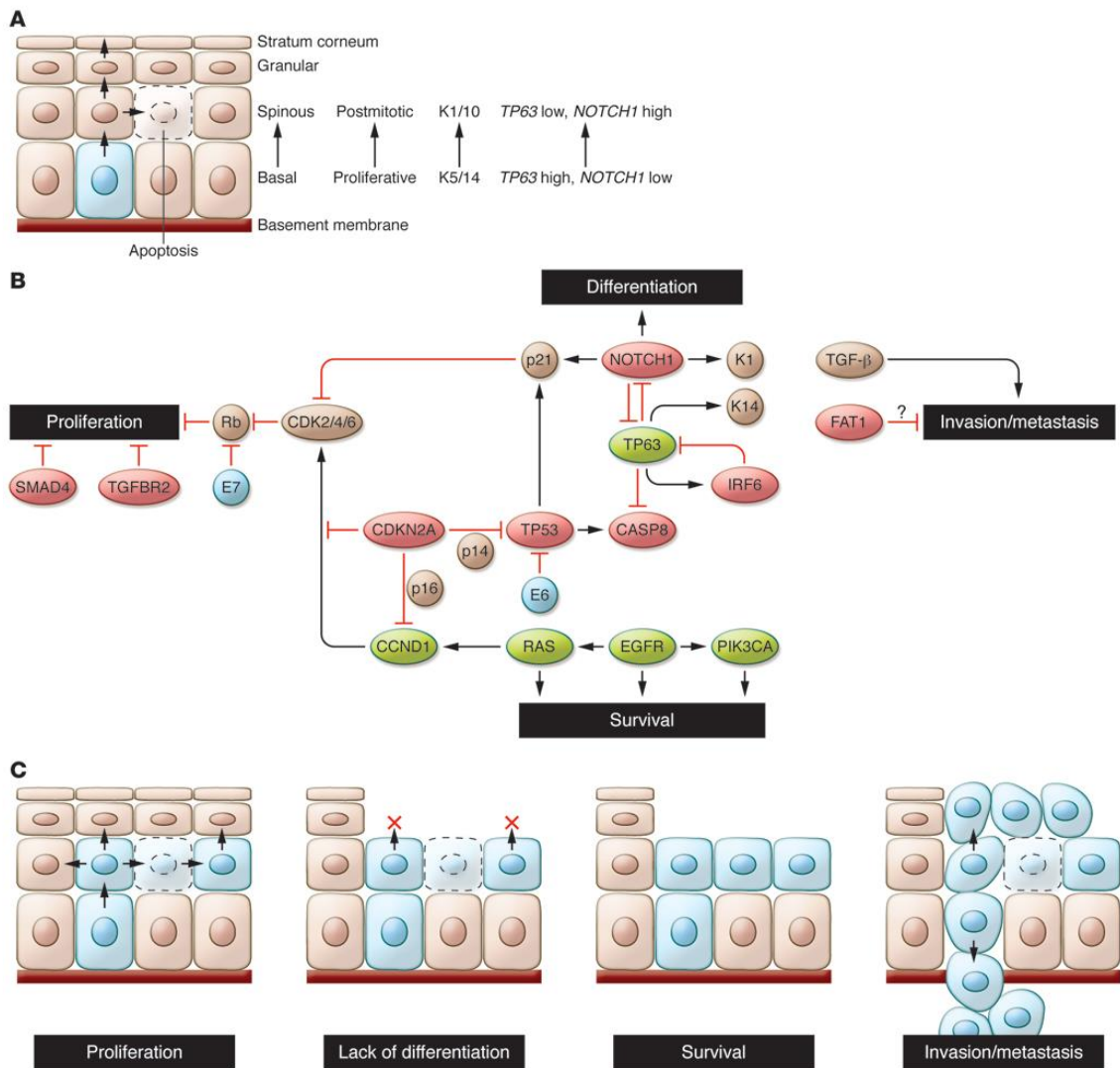


ILUSTRACIÓN 36. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA INFLUENCIA DE LA PÉRDIDA DE TP53 Y CDKN2A EN LAS FUNCIONES CELULARES (126).

La pérdida de TP53 y CDKN2A, la amplificación de CCND1 y la pérdida de GFBR2 / SMAD4 permiten la proliferación anormal y disminuyen la apoptosis. Sin embargo, el ciclo celular anormal puede todavía ser restringido por una diferenciación intacta y los programas apoptóticos. La pérdida de NOTCH1 y / o expresión anormal de TP53, junto con alteraciones en genes de "supervivencia" (por ejemplo, CASP8, PIK3CA, EGFR1), puede eliminar barreras adicionales a la proliferación y supervivencia de células tumorales (126).

El supresor de tumores TP53 y su regulador negativo MDM2 juegan un papel clave en la carcinogénesis. P53 tiene un rol de recibir señalización y de respuesta ante la variedad de situaciones de estrés celular para mantener la homeostasia. La falta de función de este imposibilita la apoptosis celular o el bloqueo del ciclo celular (127).

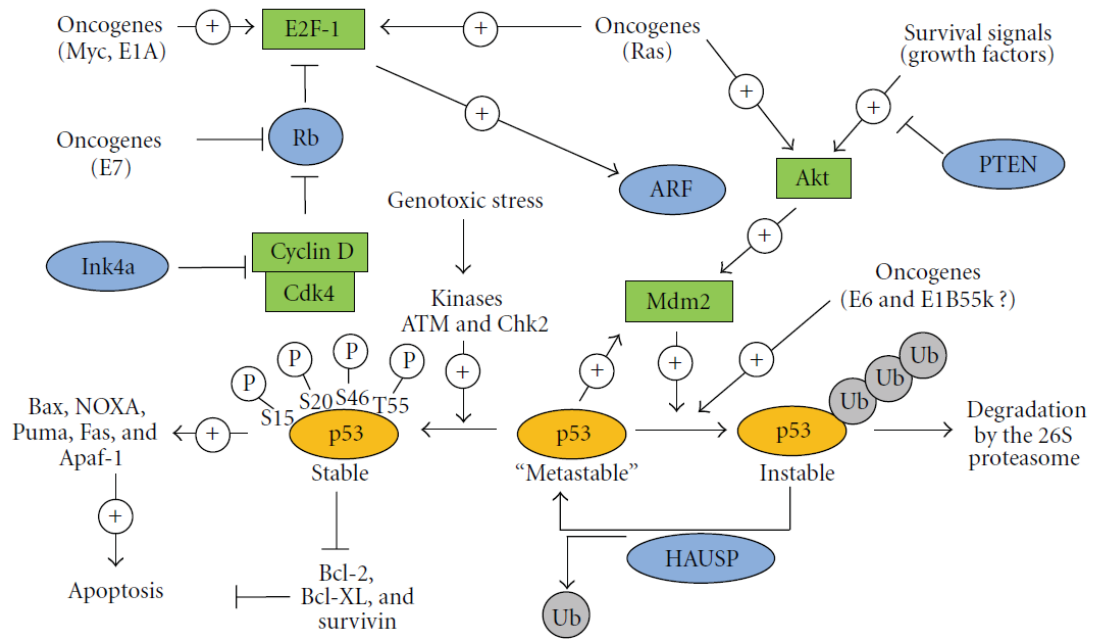


ILUSTRACIÓN 37. REPRESENTACIÓN DE LA FUNCIÓN DE P53 ESTABLE, METAESTABLE E INESTABLE Y SU REPERCUSIÓN EN LAS FUNCIONES CELULARES (127).

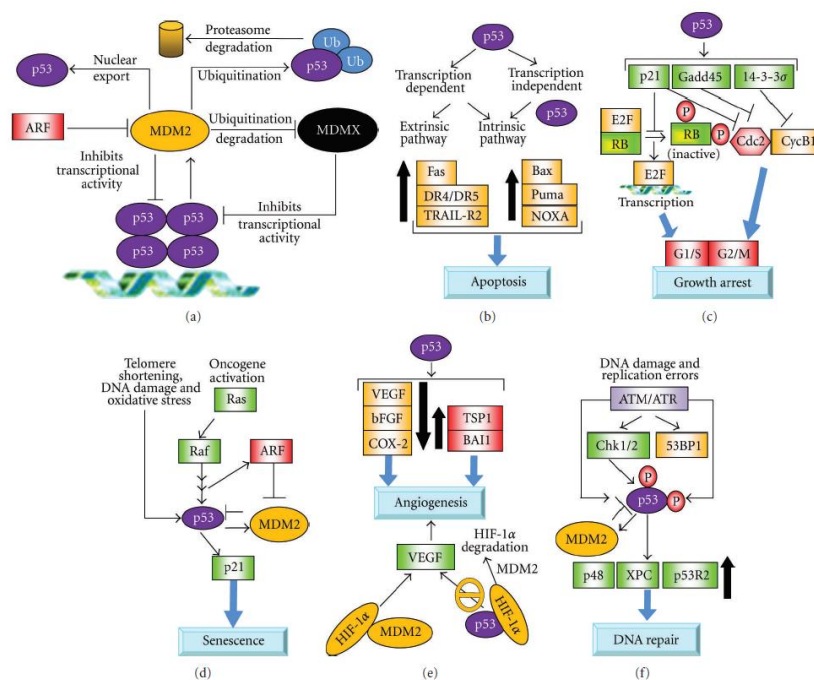


ILUSTRACIÓN 38(B) ESQUEMA DE LAS DIFERENTES SEÑALIZACIONES A LAS QUE PUEDE DAR LUGAR LA EXPRESIÓN DE P53 Y LAS PROTEÍNAS RELACIONADAS (127).

No ha sido demostrada la relación del factor de crecimiento epidérmico EGFR1 con P53 (128).

Las mutaciones genómicas de TP53 se encuentran aproximadamente en el 40% de los tumores estudiados en el COSMIC y en el 72% en ATLAS (69).

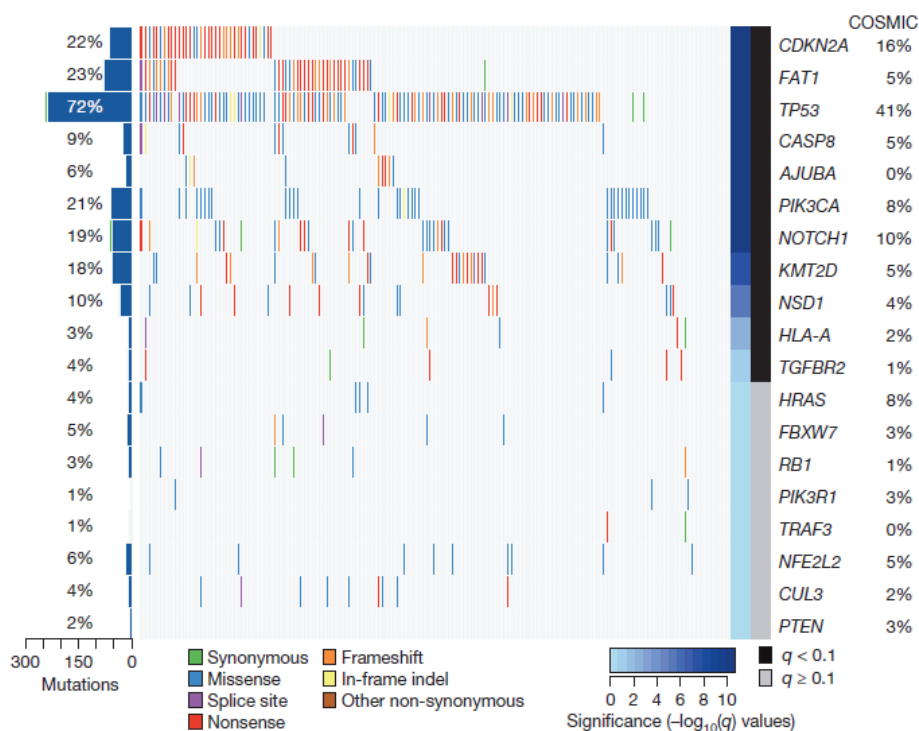


ILUSTRACIÓN 39. COMPARACION DE LAS MUTACIONES GENÓMICAS MÁS IMPORTANTES EN TUMORES DE CABEZA Y CUELLO EN COSMIC Y EN ATLAS (69).

Esta proteína fue de las primeras identificadas en tumores de cabeza y cuello, siendo su expresión superior al 55% en este tipo de tumores (126, 128).

1.6.19. Proteína CKIT

El receptor tirosina quinasa c-KIT, se encuentra en la membrana celular de los mastocitos y puede dar lugar a varios tipos de cáncer, en particular tumores gastrointestinales (GIST), mastocitosis sistémica y subconjuntos de mieloides aguda leucemia y melanoma (129).

Se han demostrado dos mutaciones en el mismo alelo, que conducen a sustituciones de aminoácidos V560G y D816V en el dominio auto-regulador de la membrana y el dominio quinasa, respectivamente. Cada mutación es capaz de causar la activación independiente del ligando CKIT como se demuestra por la auto-fosforilación de la tirosina y la promoción del crecimiento del factor independiente de murina Ba/ F3. La activación de las mutaciones de CKIT ocurre en casi todos los casos de mastocitosis sistémica (SM). Las mutaciones están a menudo presentes en otros linajes hematopoyéticos en estos

pacientes, lo que indica que el objetivo puede estar en el compartimento de células madre (129).

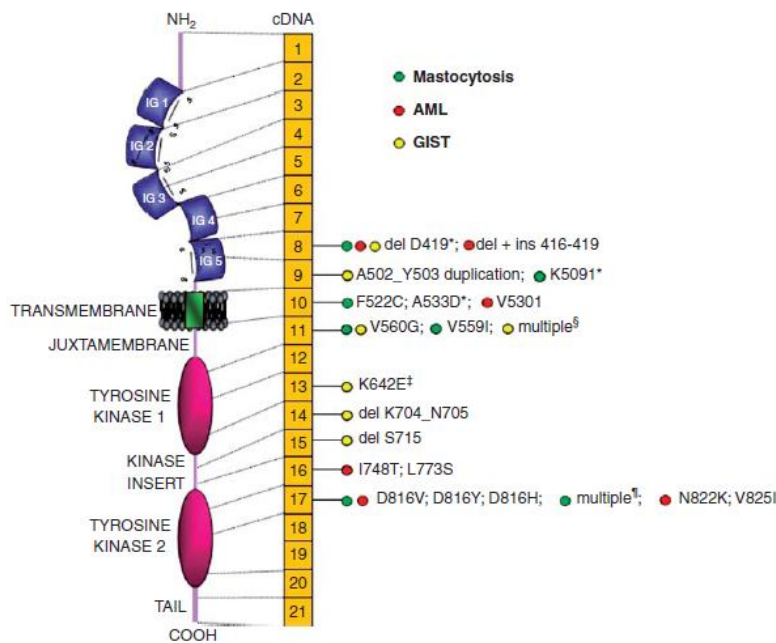


ILUSTRACIÓN 40 ESTRUCTURA DEL DOMINIO KIT(42).

La estructura de dominio de KIT y la ubicación de algunas mutaciones comunes se ilustran en la Ilustración 37. En el curso normal de los acontecimientos el ligando desencadena la dimerización del receptor, aliviando las interacciones auto-inhedoras y transfosforilaciones de pares de dímeros, seguido por el reclutamiento, la fosforilación, la activación y señalización de proteínas corriente abajo. Hay varios sitios de mutación KIT en los cánceres, con algunos "puntos calientes" que corresponden a los dominios intracelulares y extracelulares yuxtamembrana (exones 8, 9 y 11) y el bucle de activación del dominio quinasa (exón 17) que conducen a la interrupción de mecanismos de auto-inhibición. Es de destacar que los sitios comunes de mutación KIT difieren notablemente entre los cánceres. Esto puede reflejar efectos diferenciales de las diferentes mutaciones en las vías de señalización corriente abajo (130).

Aunque en líneas generales C-KIT no es propiamente de ninguna de las vías estudiadas hasta ahora, encontramos en algunos estudios su relación con PI3K (130).

Este es muy común en adenocarcinoma de cabeza y cuello, encontrándose sobreexpresado en la mayoría de estos tumores 90% (131),

También se expresa en un alto porcentaje en los tumores del tracto gastrointestinal (GIST). La oncoproteína CD117/c-kit se ha convertido, en un marcador imprescindible en el diagnóstico de estos tumores.

En carcinoma escamoso de cabeza y cuello, unos estudios encuentran sobreexpresada la proteína entre en 50 y el 86% de los casos (83) y otros, indican porcentajes del 5% (49).

1.6.20. Proteína Nesprin 1

Nesprin 1 es una proteína que se encuentra en la membrana nuclear que conecta el núcleo de la célula con el citoesqueleto. La disrupción de las conexiones citoesqueletales del núcleo con el citoplasma tiene consecuencias severas como la estabilidad del núcleo, su tamaño y su forma. Esto afecta a la migración celular, a sus propiedades mecánicas celulares y a la mecanotransducción del espacio extracelular al interior del núcleo y al proceso de señalización. Cuando hay mutaciones de estas proteínas, que mantienen el correcto funcionamiento de las conexiones de la membrana nuclear, se generan enfermedades degenerativas que afectan al músculo estriado, nervios periféricos, desarrollo de la grasa y síndromes de envejecimiento prematuro (132).

El gen *Syne 1* es el que codifica esta proteína. La modificación de Drop1, una isoforma N-terminal de Nesprin-1, ha sido encontrada en estadios tempranos de tumores en una amplia gama de carcinomas humanos. De manera adicional, se ha demostrado que el gen *Syne 1* se encuentra mutado en carcinoma colorectal y de pulmón (132).

El rol de Nesprin 1 es la respuesta al daño del DNA y de las vías de reparación del mismo, los cuales son determinantes en la inestabilidad genética que provoca el cáncer y los síndromes. No ha sido aún investigado hasta 2014 por Sur, Neumann y Noegel, los cuales analizan la presencia y distribución de Nesprin 1 y sus proteínas asociadas en las líneas celulares del cáncer, y estudian las consecuencias de la pérdida de Nesprin 1 en las células. Según su estudio, la pérdida de Nesprin-1 desencadena alteraciones celulares que podrían conducir a tumorigénesis. Esto podría producirse mediante la alteración de la expresión génica, alteración de la estabilidad del genoma y una estructura nuclear alterada. El informe de Sur, Neumann y Noegel pone de relieve los cambios en la morfología nuclear, el posicionamiento del centrosoma, la estructura de la membrana nuclear, y las respuestas de daño del ADN a la pérdida de Nesprin-1 (132).

No hay literatura sobre Nesprin1 en carcinoma escamoso de cabeza y cuello.

Como síntesis de la revisión efectuada, existen una serie de alteraciones en las vías que controlan la diferenciación, proliferación y muerte celular en la mayoría de los tumores, siendo casi todos ellos rutas tirosinquinasa que tienen dos vías principales de señalización celular, MAPK quinasa y RAS. Existe información sobre la alteración de genes en estas vías, en la cual se centra la investigación científica. Los principales estudios ATLAS y COSMIC, en los que se describen las alteraciones genómicas de los tumores de cabeza y cuello, nos muestran las diversas alteraciones comentadas a lo largo de la introducción. En la ilustración 41 podemos observar algunas de ellas. Estas modificaciones de los genes dan lugar a alteraciones en la expresión de las proteínas de estas vías, que finalmente llevan a una señalización celular anormal que descontrola la diferenciación, proliferación y muerte celular, pero no hay mucha literatura en relación a las alteraciones de estas proteínas.

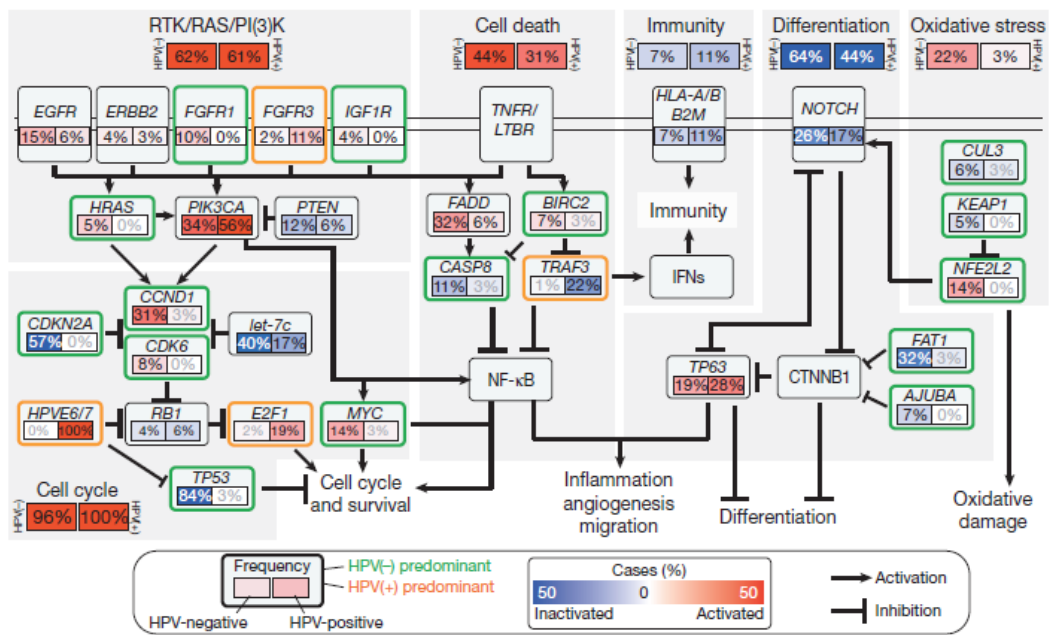


ILUSTRACIÓN 41. DESREGULACIÓN DE LOS GENES DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN Y FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN EN CARCINOMA ESCAMOSOS DE CABEZA Y CUELLO (69).

2.HIPÓTESIS:

Los tumores epidermoides de cabeza y cuello, pese a tener una localización común y ser similares anatomopatológicamente, son heterogéneos tanto en su evolución como en las respuestas al tratamiento. Esta heterogeneidad hoy se sabe que viene provocada por distintas alteraciones moleculares en diferentes vías, las cuales se han detectado por secuenciaciones masivas o bien por la expresión proteica con inmunohistoquímica. En nuestra tesis hemos planteado el estudio de la expresión proteica de algunas de estas moléculas implicadas en las alteraciones moleculares de pacientes con tumores de cabeza y cuello de nuestro medio, así como observar si dichas alteraciones tienen patrones moleculares comunes en la localización, la etiología y/o la evolución.

3. OBJETIVOS:

3.1. Objetivo principal

Estudiar la expresión proteica mediante técnicas de inmunohistoquímica de una serie de alteraciones moleculares seleccionadas, en un grupo de pacientes con tumores de cabeza y cuello de nuestro medio.

3.2. Objetivos secundarios

1. Describir la relación de la expresión proteica con el sexo y la edad en estos carcinomas.
2. Observar y describir si la expresión proteica puede relacionarse con su etiología.
3. Estudiar si dichas alteraciones se corresponden con las distintas localizaciones de los tumores de cabeza y cuello.
4. Relacionar la expresión proteica con la evolución y el estadio, para observar si existe alguna diferencia de expresión entre tumores que se encuentran en estadios iniciales y aquellos que están más avanzados y los que recidivan.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

En nuestra tesis hemos estudiado los tumores de cabeza y cuello diagnosticados de carcinoma epidermoide, recogidos de la base de datos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Salamanca desde 2004 hasta 2014.

4.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Tumores de cabeza y cuello diagnosticados anatomopatológicamente como carcinoma epidermoide.
- Que sean tumores de los cuales conozcamos su localización.
- Pacientes de los que tengamos acceso a la historia clínica que contenga al menos datos de sexo, edad y evolución.
- Tamaño de la muestra anatomopatológica suficiente para realizar las técnicas de inmunohistoquímicas pertinentes para el estudio de la expresión proteica de las moléculas planteadas en el estudio (mínimo 1 cm).

4.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Carcinomas cuyo tamaño de la muestra es menor a 1cm.
- Carcinomas que no sean puramente epidermoides.
- Pacientes a cuya historia clínica no pudimos acceder.
- Pacientes con ausencia de datos clínicos en cuanto al sexo, edad y evolución.

En el presente estudio se recopilaron, de la base de datos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Salamanca, 532 casos clínicos de pacientes diagnosticados, entre 2004 y 2014, con carcinoma epidermoide de las vías aerodigestivas superiores. De estos, seleccionamos aquellos casos de los cuales la muestra de tejido recogida en la biopsia fue mayor de 1 cm, restando así 179 fragmentos que fueran mayores a 1 cm. Esto es debido a que al hacer los tissue microarray, necesitamos suficiente cantidad de tejido con el fin de hacer los cortes histológicos para los 20 anticuerpos seleccionados y realizar así el estudio de la expresión proteica de manera fiable.

De acuerdo con los criterios de exclusión seleccionados, prescindimos de 20 muestras que correspondían a pacientes con muestra duplicada. También excluimos otros 17 pacientes cuya historia clínica fue inaccesible o que, en su historia clínica, observamos que el tumor estaba fuera del rango de temporalidad del estudio (2004-2014).

Trabajamos finalmente sobre una muestra de 142 pacientes.

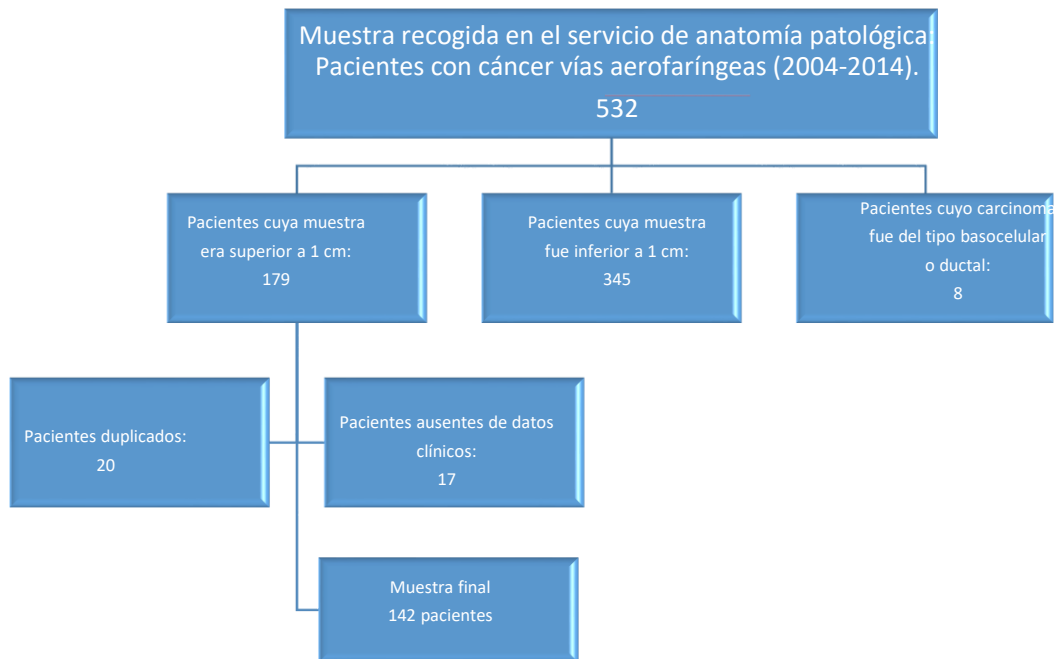


ILUSTRACIÓN 42. ÁRBOL DE SELECCIÓN DE PACIENTES DE LA MUESTRA EN ATENCIÓN A LOS CRITERIOS DE EXCLUSIÓN SELECCIONADOS.

4.3. RECOGIDA DE DATOS DE LAS HISTORIAS CLÍNICAS:

- De las historias clínicas de los pacientes recogimos los datos siguientes: nombre, sexo, ciudad de origen, edad, fecha de diagnóstico, localización tumoral, descripción macroscópica y anatomopatológica, TNM, hábito tabáquico, si el paciente es exfumador, hábito alcohólico, si el paciente es exbebedor, si el paciente ha tenido recidiva, fecha de la recidiva, estado actual, fecha de la última revisión.
- Para la división de los carcinomas por localizaciones hemos considerado la siguiente división:
 - Cavity oral, que corresponde a las siguientes subdivisiones de la base de datos: paladar duro, úvula, lengua, glándulas menores, encía, trigono, suelo de la boca, mucosa oral.
 - Faringe, que corresponde a las siguientes subdivisiones de la base de datos: vallécula de la epiglotis, orofaringe, hipofaringe, faringe, amígdala, paladar blando.

- Laringe, que corresponde a las siguientes subdivisiones de la base de datos: cuerda vocal laríngea, bandas de la laringe, epiglotis, laringe.
- Cuantificación de hábitos:
 - Hemos considerado fumadores a todos los pacientes que indicaban en la historia clínica que consumían tabaco diariamente, o aquellos que habían dejado de fumar en el último año.
 - Hemos considerado pacientes bebedores aquellos que bebieran más de 4 unidades alcohólicas diarias.

4.4. ANÁLISIS DE LABORATORIO:

Revisamos el diagnóstico anatomopatológico mediante la técnica convencional de Hematoxilina-Eosina, y en las tinciones de inmunohistoquímica valoramos la intensidad y el porcentaje de células que expresaban los siguientes anticuerpos: P53, HER-2, ERBB3, IGFR1, PI3K, AKTPAN (1, 2 Y 3), MTOR, PTEN, EGFR1, VEGFR1, FGFR1, FGFR3, HRAS, NRAS, KRAS, BRAF, ECADH, P16, CKIT y NESPRIN1.

- La selección de las proteínas a estudiar vino derivada de las mutaciones descritas dentro del proyecto Atlas del Genóma del cáncer Pan-Cáncer (The Cancer Genome Atlas (TCGA) Pan-Cancer), con una frecuencia mayor o igual a 10%, escogiendo las que consideramos más importantes en las vías PI3K (escogimos Pi3k con una frecuencia de mutación del 18%, Nesprin 20% y P53).
- Además, se estudiaron proteínas derivadas de genes con una mutación descrita mayor o igual al 2%, pertenecientes a estas rutas implicadas en la proliferación celular en cáncer de cabeza y cuello para las que pueden existir tratamientos dirigidos en el momento actual (Dorsey & Agulnik. *Drugs*2013; Elferink & Resto. *Journal of signal transduction* 2011). EGFR1 (5,3%), IGFR-1 (2,7%), MTOR (2,1%), PTEN (2,4%), HRAS (3,7%).
- P16 y Kras se estudiaron debido a su relación con los tumores generados por VPH, ya que, en los casos en que los tumores están provocados por las mutaciones que produce el virus en las células del huésped, se espera mayor frecuencia de mutación en estos genes (Lechner et al. *Genome Medicine* 2013).
- Teniendo en cuenta las vías de señalización implicadas en el CECC y los tratamientos disponibles, o en vías de desarrollo, se analizarán las siguientes proteínas AKT 1, 2 y 3 en un mismo anticuerpo AKTpan. EGFR1, HER-2, BRAF, FGFR1, FGFR3, HRAS, CKIT, NRAS y VEGFR1.

- Como consecuencia del alto índice de mutación descrito en las cadherinas se ha seleccionado la ECADH como representante de este extenso grupo de proteínas de adhesión a la membrana celular.

4.5. ELABORACIÓN DE LOS TISSUE MICROARRAY (TMA):

Para la elaboración de los TMA se utilizó el microarrayer (ilustración 43). Se prepararon los bloques donantes de parafina, con un mínimo aconsejado de 2 mm de profundidad tisular y con una adecuada preservación antigénica durante el proceso de fijación. Seleccionamos la zona elegida en el bloque de parafina. Confeccionamos una plantilla, identificando todos los cilindros y su disposición en el array.

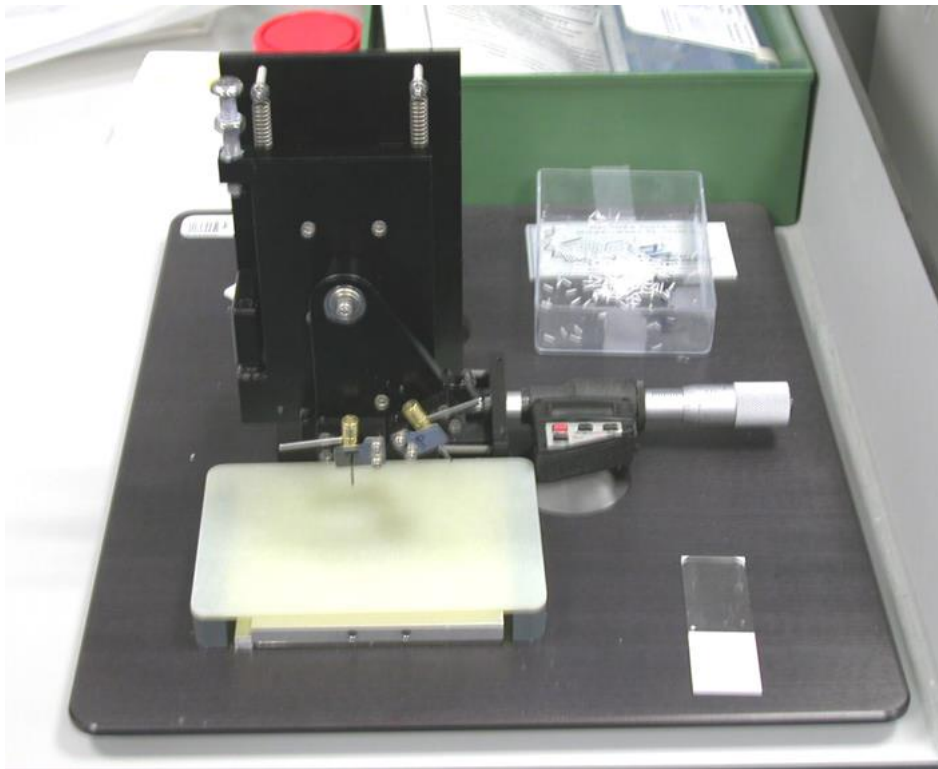


ILUSTRACIÓN 43. MICROARRAYER UTILIZADO PARA LA ELABORACIÓN DE LOS TMA.

En un bloque de parafina en blanco de 40 x 25 mm, utilizado como receptor de las muestras titulares, se introdujeron los cilindros seleccionados con agujas de 0,6mm, ajustando la profundidad de descenso de las agujas aproximadamente a 3mm (Ilustración 44). Una vez terminado, incubamos el bloque en una estufa a 50°C durante 10 minutos aproximadamente. Esto permite que los cilindros del tejido se adhieran mejor a la parafina en los orificios del “array” del bloque receptor. Se sacaron los bloques de la estufa y se presionaron sobre él con un portaobjetos para nivelar la superficie. Se cortaron a 3-4 micras, para su posterior tinción (ilustración 45).

De los 142 bloques se obtuvieron 6 TMA, uno de ellos de recuperación.

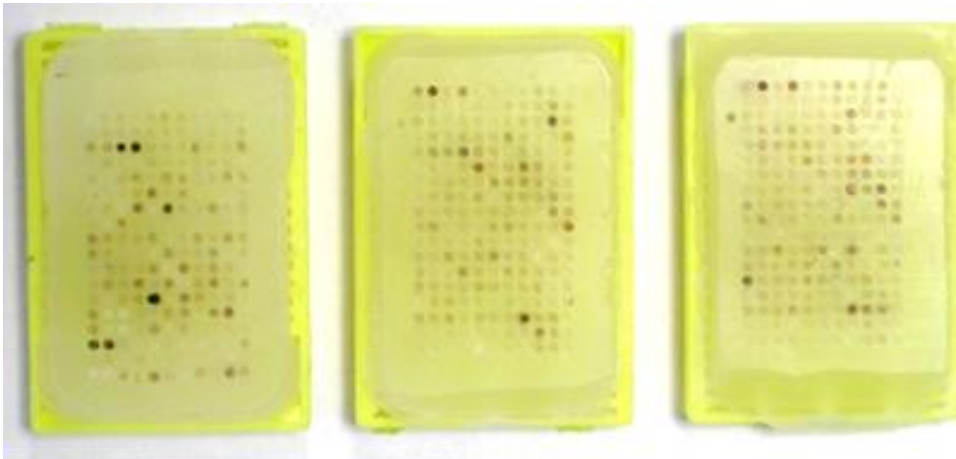


ILUSTRACIÓN 44. BLOQUES DE PARAFINA DE LOS TMAISTOS PARA CORTE Y TINCIÓN CON LOS DIFERENTES ANTICUERPOS.

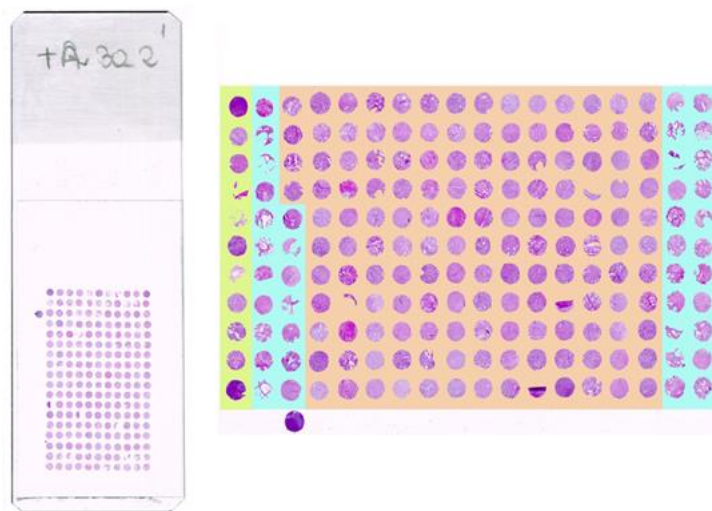


ILUSTRACIÓN 45. IMAGEN DE UN CORTE DEL TMA CON HEMATOXILINA-EOSINA PARA SU COMPROBACION HISTOLÓGICA RESPECTO A LA REPRESENTATIVIDAD DEL TEJIDO TUMORAL.

4.6. TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA:

En nuestro trabajo la técnica de inmunohistoquímica fue realizada sobre cortes obtenidos de los 6 TMA (Ilustración 46). La incubación de los anticuerpos y reactivos fue realizada de modo automático mediante el procesador (Bond mas, Leica).

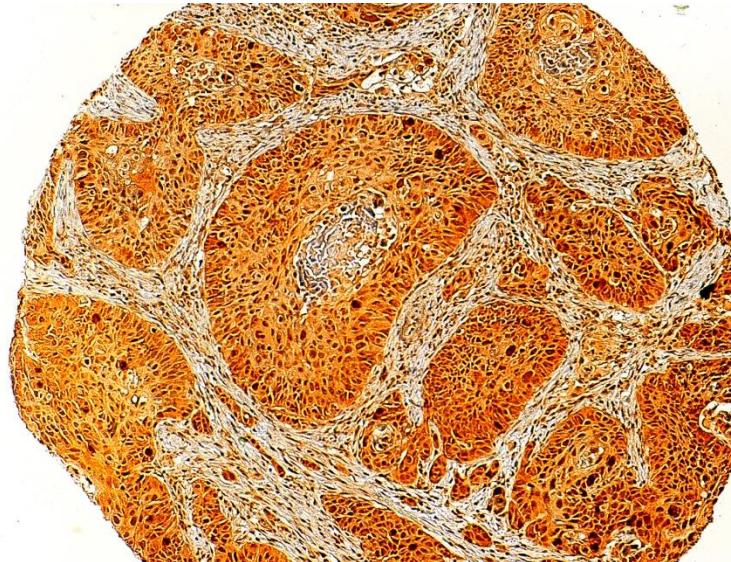


ILUSTRACIÓN 46. IMAGEN DE UN CORTE CON IHQ, PARA PAKT. NOTESE LA EXPRESION (EN COLOR MARRON) DEL ANTICUERPO (PROTEINA) EN UNO DE LOS CORTES DEL TMA.

A continuación, se muestra el protocolo seguido para la realización de la técnica: -Sección mediante microtomo LEITZ de las muestras incluidas en la matriz: cortes entre 3 y 4 micras. -Mantenimiento en estufa MEMMERT a 60° durante 24 horas. A continuación se colocan los tissue en el procesador de muestras para inmunohistoquímica arriba mencionado, el cual hace todo el proceso de manera automática de la siguiente manera:

- Desparafina con un producto similar al Xilol, lo lava con alcohol y lo rehidrata posteriormente con buffer.
- Recuperación antigénica con antígeno retrieval a pH 6 y 7 dependiendo del anticuerpo. A 100° durante 15 minutos.
- Lavado con buffer.
- Bloqueo de peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 2%. 15 minutos.
- Lava con buffer.
- Pone el **anticuerpo primario** destinado a cada tissue, diluciones. 8 minutos.
- Lava con buffer.
- Pone el postprimario (puzzle de inmunoglobulinas). 8 minutos.
- Lava con buffer.
- Pone polímero (peroxidasa sintética). 8 minutos.
- Lava con buffer.

- Revelamos con **diaminobenzidina** (DAB). 10 minutos.
- Contraste con hematoxilina durante 7 minutos.
- Lavado con buffer.

Se realiza la deshidratación con alcoholes. Este paso es manual.

Se monta en un montador automático con medio permanente.

Una vez obtenidas las tinciones, las observamos al microscopio, valorando muestra por muestra en una escala del 1 al 4 de intensidad y estableciendo un porcentaje de tinción de células tumorales aproximado. Esto fue reconvertido en una escala del 0 al 3, utilizando un sistema de puntuación semicuantitativo previamente descrito por Xiao L et al 2009 (133).

De esta manera una tinción negativa es puntuada con 1, una intensidad débil es puntuada con 2, una moderada con 3 y una muy intensa con 4. Del mismo modo se cuantifica el porcentaje de células tumorales teñidas, desde 0 en muestras sin células teñidas, 1 en muestras con un porcentaje de tinción del 1 al 25%, 2 en muestras cuyo porcentaje de tinción es del 26 al 50 %, 3 en casos del 51 al 75% y 4 en los que la muestra contiene del 76 al 100% de células teñidas.

La puntuación final es acorde a la suma de las dos cifras dadas entre la intensidad y la frecuencia, dando lugar a una puntuación que puede ir desde 0 hasta 7. Quedando finalmente la siguiente tabla de puntuaciones:

Intensidad de la tinción	Valor	% de células teñidas	Valor	Puntuación Final	Valor estadístico
Negativa	0	0	0	0-2	0
Débil	1	1-25	1	3-4	1
Moderada	2	26-50	2	5	2
Intensa	3	51-75	3	6-7	3
		76-100	4		

ILUSTRACIÓN 47. TABLA DE VALORACIÓN CUANTITATIVA DE LA INTENSIDAD DE EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS SELECCIONADAS. DESCRITO POR XIAO L ET AL 2009 (133).

Las determinaciones se realizaron doble ciego por dos observadores.

Este proceso lo utilizamos para la mayoría de las proteínas, exceptuando aquellas en las que la literatura establece un criterio individual de medición y de diferencia entre negativo y positivo.

Hay que puntualizar que todas las mediciones se repitieron en diferentes días para dar una visión más objetiva, corrigiendo aquellas en las que hubo discrepancias entre los dos días.

En las proteínas HER-2, ERBB3, IGF-1R, PI3K, AKT, MTOR, PTEN, EGFR1, VEGFR1, FGFR1, FGFR3, HRAS, NRAS, KRAS, BRAF, ECADH, P53, CKIT y Nesprin1 la medición la realizamos siguiendo la regla de Xiao et al 2009 (90).

En la proteína P16 consideramos como positivo si más el 70% de las células tumorales están teñidas en núcleo y membrana (134, 135).

5. RESULTADOS

5.1. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA MUESTRA:

- La frecuencia recogida en cuanto al sexo de los pacientes fue de 116 varones (81,7%) y de 26 mujeres (18,3%), estableciéndose así una diferencia altamente significativa entre ambos sexos (ilustración 48).
- En cuanto a la edad, los datos obtenidos son una edad media de 66,09 años (ilustración 48).
- La distribución de los tumores por localización fue la siguiente: 74 casos en cavidad oral (que representa el 52,11% de la muestra), 16 casos de faringe (11,26%) y 52 casos de laringe (36,61%) (ilustración 48).
- La cantidad de individuos de la muestra que fuman habitualmente es de 108 pacientes (78,3%), frente a 30 que no fumaban (21,7%) y 4 de los que no disponemos del dato en la historia clínica (ilustración 48).
- En cuanto al hábito alcohólico, obtuvimos 65 (50,4%) pacientes que no beben habitualmente y 64 (49,6%) pacientes que si lo hacen con asiduidad. En 13 de los casos no pudimos encontrar el dato (ilustración 48).
- En cuanto al VPH, la tinción del anticuerpo p16 sobre las biopsias nos dio negativa en 128 (90,1%) casos frente a 14 casos positivos (9,9%) (ilustración 48).
- El estadio de los tumores se distribuyó de la siguiente manera: 25 pacientes con estadio I (20,8%), 29 pacientes con estadio II (24,2%), 27 pacientes estadio III (22,5%), 38 pacientes estadio IVAB (31,7%) y 1 paciente estadio IVC (0,8%). En 9 pacientes no pudimos registrar su estadio tumoral (ilustración 48).
- En cuanto a la recidiva de los pacientes de la muestra encontramos 71 casos en los que no hubo recidiva (61,7%) y 44 casos que sí (38,3) (ilustración 48).

		Valor	Porcentaje
SEXO	MUJERES	26	18,3
	VARONES	116	81,7
EDAD	Media	66,09	
	Mediana	65,00	
LOCALIZACIÓN	Cavidad oral	74	52,11
	Faringe	16	11,26
	Laringe	52	36,61
HÁBITO TABÁQUICO	NO	30	21,7
	SI	108	78,3
	Perdidos	4	
HÁBITO ALCÓHOLICO	No bebedor	65	50,4
	Bebedor	64	49,6
	Perdidos	13	
P16 (VPH)	Negativo	128	90,1
	Positivo	14	9,9
TNM	Estadio I	25	20,8
	Estadio II	29	24,2
	Estadio III	27	22,5
	Estadio IVAB	38	31,7
	Estadio IVC	1	,8
	Perdidos	18	
RECIDIVA	NO RECIDIVA	71	61,7
	RECIDIVA	44	38,3
	Perdidos	27	

ILUSTRACIÓN 48. TABLA DE DISTRUBICIÓN GENERAL DE LA MUESTRA.

5.2. RESULTADOS CONCRETOS DE LA MUESTRA:

5.2.1. Sexo

Hay diferencias significativas en la asociación del sexo con las diferentes localizaciones. En varones observamos una frecuencia mayor en faringe y laringe que en cavidad oral donde la frecuencia de los casos es más similar (ilustraciones 49 y 50).

DISTRIBUCIÓN DE SEXOS ENTRE LAS DIFERENTES LOCALIZACIONES				
		Sexo		Total
		MUJERES	VARONES	
LOCALIZACIÓN	LARINGE	3	71	74
	FARINGE	0	16	16
	CAVIDAD ORAL	23	29	52
Total		26	116	142

ILUSTRACIÓN 49. DISTRIBUCIÓN POR SEXOS EN LAS DIFERENTES LOCALIZACIONES TUMORALES.

PRUEBAS DE CHI-CUADRADO			
	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	36,999 ^a	2	,000
Razón de verosimilitud	38,698	2	,000
Asociación lineal por lineal	31,265	1	,000
N de casos válidos	142		

a. 1 casillas (16,7%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 2,93.

ILUSTRACIÓN 50. RESULTADO DE PRUEBA DE CHI-CUADRADO DE PEARSON PARA EL HALLAZGO DE DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE SEXOS POR LOCALIZACIÓN

5.2.2. Edad

En cuanto a la edad por localizaciones, encontramos unas edades similares entre las diferentes localizaciones tumorales (ilustración 51).

EDAD EN CAVIDAD ORAL		EDAD EN FARINGE		EDAD EN LARINGE	
Media	67,46	Media	63,38	Media	65,81
Mediana	65,50	Mediana	64,00	Mediana	67,50
Moda	63	Moda	74	Moda	59

ILUSTRACIÓN 51. DISTRIBUCIÓN DE LA EDAD SEGÚN LAS DIFERENTES LOCALIZACIONES DE LOS TUMORES.

Tampoco encontramos diferencias en cuanto a la edad de aparición de los tumores VPH + y los VPH -. Encontramos una distribución exactamente igual (ilustración 52).

TABLA CRUZADA EDAD*P16				
		P16		Total
		0	1	
EDA	<65	64	7	71
	>65	64	7	71
Total		128	14	142

ILUSTRACIÓN 52. DISTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA P16 POR RANGO DE EDAD.

5.2.3. Etiología

En cuanto a la localización, encontramos que los carcinomas VPH + son más frecuentes en cavidad oral, seguidos de laringe. En la orofaringe son poco frecuentes en nuestra muestra. No hay diferencias significativas entre las localizaciones (ilustración 53).

Tabla cruzada P16*localización							
Recuento		Localización					Total
		LARINGE	HIPOFARINGE	OROFARINGE	CAVIDAD ORAL	FARINGE	
P16	0	68	2	11	46	1	128
	1	6	0	1	6	1	14
Total		74	2	12	52	2	142

ILUSTRACIÓN 53. TABLA CRUZADA DE DISTRIBUCIÓN DE P16 Y LAS DIFERENTES LOCALIZACIONES.

En cuanto a los carcinomas VPH, positivos y negativos, y su relación con el tabaco, observamos que el hecho de fumar no está asociado en nuestra muestra al VPH (ilustración 54).

TABACO					
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	NO	28	21,9	22,4	22,4
	SI	97	75,8	77,6	100,0
	Total	125	97,7	100,0	
Perdidos	9	3	2,3		
Total		128	100,0		
a. P16 = 0					
Tabaco					
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	NO	2	14,3	15,4	15,4
	SI	11	78,6	84,6	100,0
	Total	13	92,9	100,0	
Perdidos	9	1	7,1		
Total		14	100,0		
a. P16 = 1					

ILUSTRACIÓN 54. RELACIÓN DEL HÁBITO TABÁQUICO CON LA SOBREENPRESIÓN DE LA PROTEÍNA P16.

En nuestra muestra hay una fuerte asociación del hábito tabáquico a los casos de carcinoma de laringe (91,9%), orofaringe (100%), hipofaringe (100%) y observamos una asociación menor en cavidad oral, donde el porcentaje de fumadores es del 52%. Hay diferencias significativas en la asociación del tabaco con las diferentes localizaciones (ilustración 55 y 56).

TABLA CRUZADA TABACO POR LOCALIZACIÓN					
Recuento					
		LOCALIZACIÓN			Total
		LARINGE	FARINGE	CAVIDAD ORAL	
Tabaco	NO	6	0	24	30
	SI	68	14	26	108
Total		74	14	50	138

ILUSTRACIÓN 55. TABLA CRUZADA DEL HÁBITO TABÁQUICO CON LA LOCALIZACIÓN TUMORAL PARA OBSERVAR LA ASOCIACIÓN ESTADÍSTICA.

Pruebas de chi-cuadrado			
	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	32,238 ^a	4	,000
Razón de verosimilitud	33,628	4	,000
Asociación lineal por lineal	22,118	1	,000
N de casos válidos	138		
a. 5 casillas (50,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es ,22.			

ILUSTRACIÓN 56. PRUEBA DE CHI-CUADRADO DE PEARSON SOBRE LA ASOCIACIÓN ESTADÍSTICA DEL TABACO Y LA LOCALIZACIÓN TUMORAL.

En cuanto a los pacientes bebedores de alcohol en cantidad importante, tenemos una distribución muy pareja, obteniéndose así 50,4% de pacientes que no beben alcohol habitualmente, frente a un 49,6 % que si lo hacen (ilustración 57).

ALCOHOL		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido
Válidos	NO BEBEDORES	65	45,8	50,4
	BEBEDORES	64	45,1	49,6
	Total	129	90,8	100,0
Perdidos	9	13	9,2	
Total		142	100,0	

ILUSTRACIÓN 57. DISTRIBUCIÓN DE PACIENTES SEGÚN HÁBITO ALCOHÓLICO EN NUESTRA MUESTRA.

En cuanto a la relación de los pacientes VPH, positivo y negativo, y su relación con el alcohol, observamos que el hecho de beber no está asociado en nuestra muestra al VPH de manera significativa (ilustración 58).

ALCOHOL					
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	NO BEBEDOR	60	46,9	51,3	51,3
	BEBEDOR	57	44,5	48,7	100,0
	Total	117	91,4	100,0	
Perdidos	9	11	8,6		
Total		128	100,0		
a. P16 = 0					
Alcohol					
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	NO BEBEDOR	5	35,7	41,7	41,7
	BEBEDOR	7	50,0	58,3	100,0
	Total	12	85,7	100,0	
Perdidos	9	2	14,3		
Total		14	100,0		
a. P16 = 1					

ILUSTRACIÓN 58. TABLA DE ASOCIACIÓN DEL VPH AL HÁBITO ALCOHÓLICO.

A su vez, hemos valorado la asociación de tabaco y alcohol como conjunto, en relación a la localización de aparición del tumor. Podemos observar como no encontramos ningún paciente con cáncer de faringe que no fume ni beba. Vemos como aumentan los casos de laringe en pacientes fumadores que no beben y, de la misma manera, como los pacientes que fuman y beben tienen mayor porcentaje de casos en faringe y laringe (ilustración 59).

		Frecuencia
No fumador ni bebedor	LARINGE	5
	CAVIDAD ORAL	22
	Total	27
Fumador no bebedor	LARINGE	27
	FARINGE	4
	CAVIDAD ORAL	7
	Total	38
Fumador y bebedor	LARINGE	38
	FARINGE	9
	CAVIDAD ORAL	15
	Total	62

ILUSTRACIÓN 59. ASOCIACIÓN DE HÁBITO TABÁQUICO Y ALCOHÓLICO CON LA DISTRIBUCIÓN DE TUMORES POR LOCALIZACIÓN.

5.3. EXPRESIÓN PROTEICA GENERAL DE LA MUESTRA

Los resultados de expresión proteica obtenidos en términos generales fueron los siguientes:

- No obtuvimos ninguna expresión de FGFR1, CKIT o BRAF, por lo que en análisis posteriores no vamos a analizarlos, ya que no se van a encontrar diferencias entre grupos (ilustración 60).
- Obtuvimos expresión menor del 33% en FGFR1, CKIT, BRAF, HERB2, KRAS, P16 y NESPRIN (ilustración 60).
- Alcanzamos porcentajes de expresión del 34 al 65% en MTOR, PTEN, HRAS y TP53 (ilustración 60).
- Las proteínas con más de un 66% de expresión fueron VEGFR1, NRAS, AKT, IGF-1R, ECADH, HER-3, EGFR1, FGFR3, PI3KINA (ilustración 60).

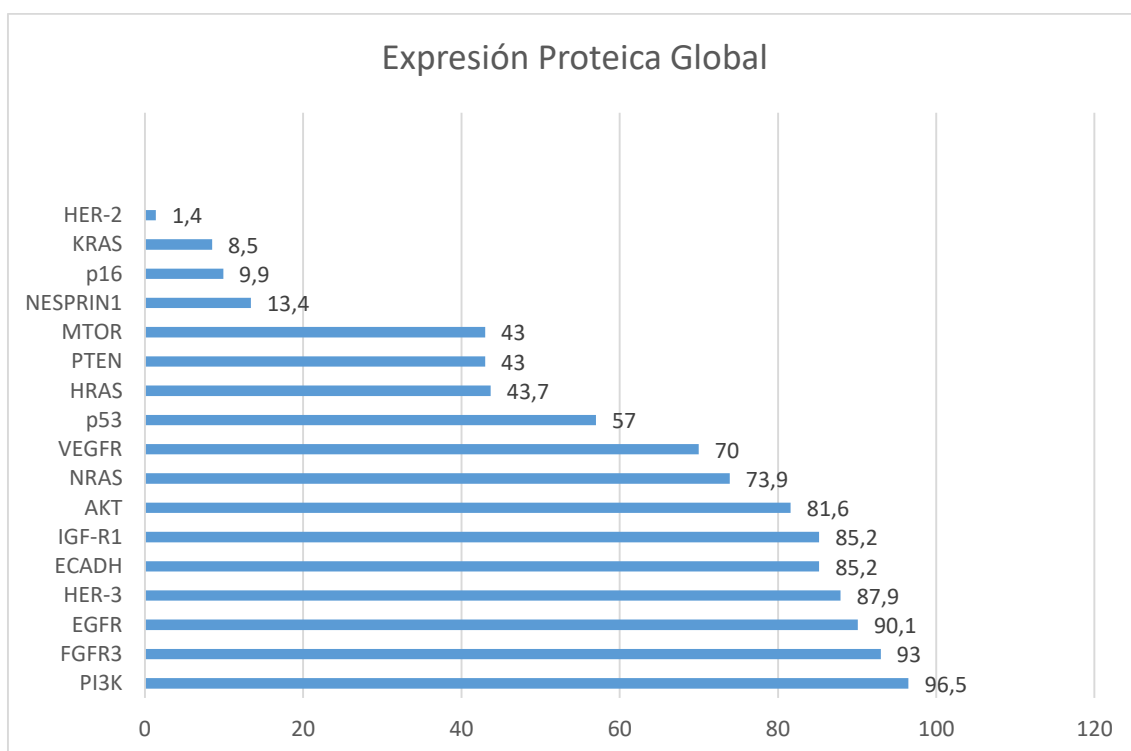


ILUSTRACIÓN 60. GRÁFICA DE EXPRESIÓN PROTEICA GENERALIZADA DE TODOS LOS PACIENTES SELECCIONADOS PARA EL ESTUDIO.

5.4. RESULTADOS DE EXPRESIÓN PROTEICA POR GRUPOS:

- Hemos realizado unas gráficas de expresión proteica por grupos (ilustración 61-67), que comentaremos posteriormente proteína a proteína por cuestión de organización.

- Los grupos que vamos a estudiar son: expresión por sexo, expresión según hábito tabáquico, expresión según hábito alcohólico, expresión por estadio tumoral, expresión por recidiva, expresión según positividad de p16 (VPH) y expresión según positividad de p53.
- El color amarillo indica diferencias estadísticamente significativas en la expresión de una proteína entre ambos grupos. El color verde indica una tendencia no significativa de la proteína entre ambos grupos.



ILUSTRACIÓN 61. PORCENTAJES DE EXPRESIÓN DE LAS DISTINTAS PROTEÍNAS EN MUJERES Y HOMBRES.

Se han hallado diferencias significativas entre varones y mujeres en la expresión de la proteína PTEN.

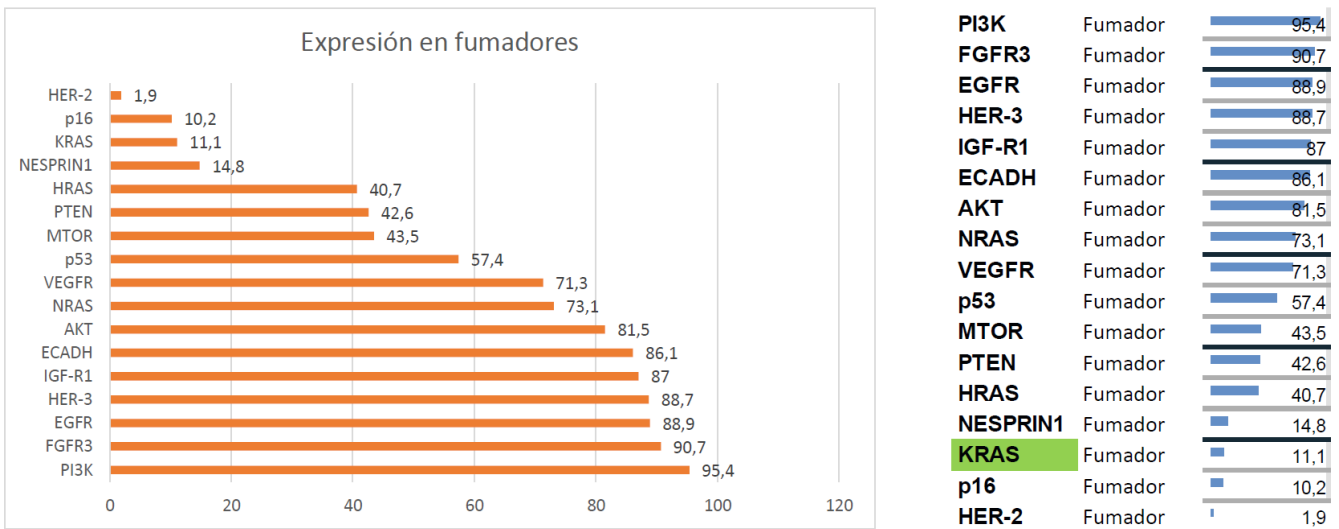
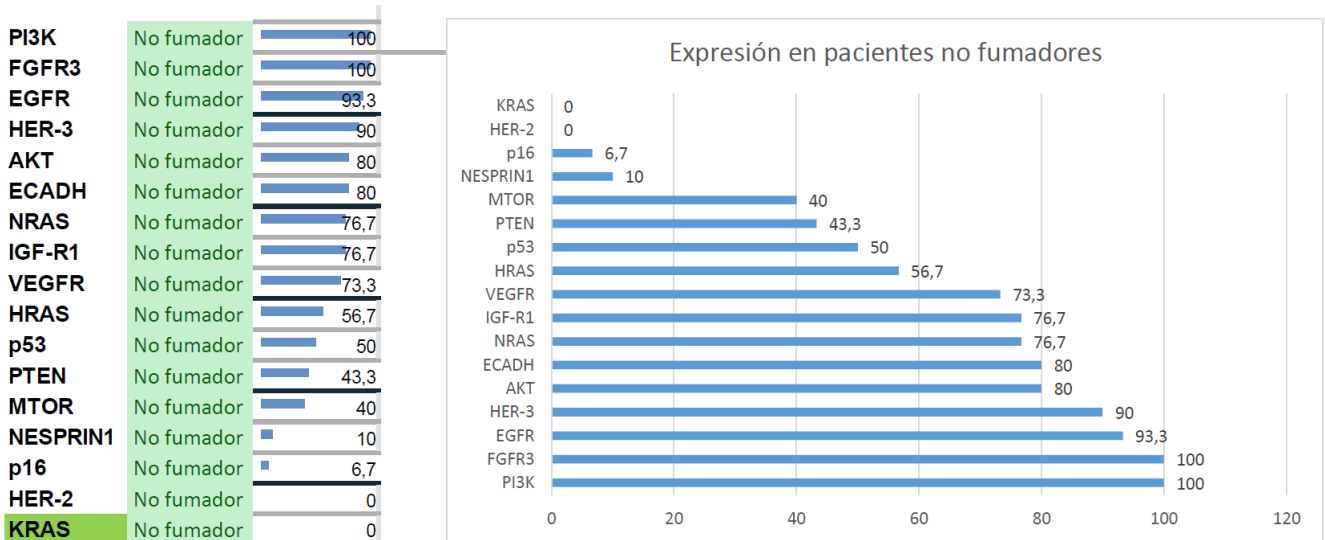
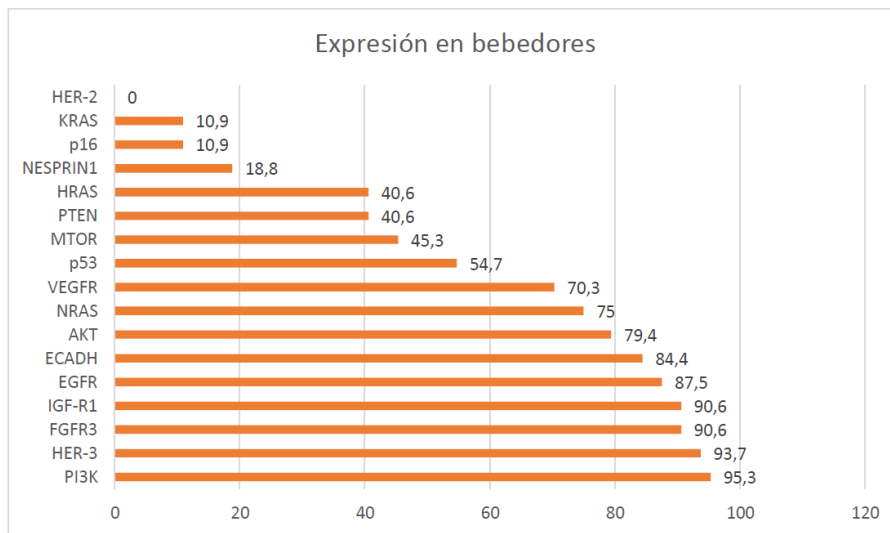
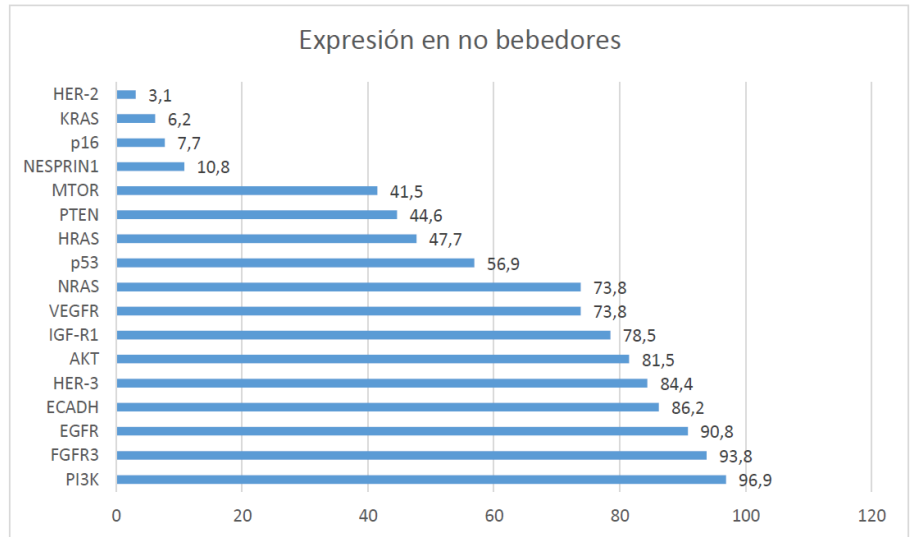


ILUSTRACIÓN 62. PORCENTAJES DE EXPRESIÓN DE LAS DISTINTAS PROTEÍNAS EN FUMADORES Y NO FUMADORES

No encontramos diferencias significativas en la expresión proteica entre fumadores y no fumadores.

PI3K	No bebedor	96,9
FGFR3	No bebedor	93,8
EGFR	No bebedor	90,8
ECADH	No bebedor	86,2
HER-3	No bebedor	84,4
AKT	No bebedor	81,5
IGF-R1	No bebedor	78,5
VEGFR	No bebedor	73,8
NRAS	No bebedor	73,8
p53	No bebedor	56,9
HRAS	No bebedor	47,7
PTEN	No bebedor	44,6
MTOR	No bebedor	41,5
NESPRIN1	No bebedor	10,8
p16	No bebedor	7,7
KRAS	No bebedor	6,2
HER-2	No bebedor	3,1



PI3K	Bebedor	95,3
HER-3	Bebedor	93,7
FGFR3	Bebedor	90,6
IGF-R1	Bebedor	90,6
EGFR	Bebedor	87,5
ECADH	Bebedor	84,4
AKT	Bebedor	79,4
NRAS	Bebedor	75
VEGFR	Bebedor	70,3
p53	Bebedor	54,7
MTOR	Bebedor	45,3
PTEN	Bebedor	40,6
HRAS	Bebedor	40,6
NESPRIN1	Bebedor	18,8
p16	Bebedor	10,9
KRAS	Bebedor	10,9
HER-2	Bebedor	0

ILUSTRACIÓN 63. PORCENTAJES DE EXPRESIÓN DE LAS DISTINTAS PROTEÍNAS EN BEBEDORES Y NO BEBEDORES

No encontramos ninguna diferencia significativa de expresión proteica entre pacientes bebedores y no bebedores en nuestro estudio.

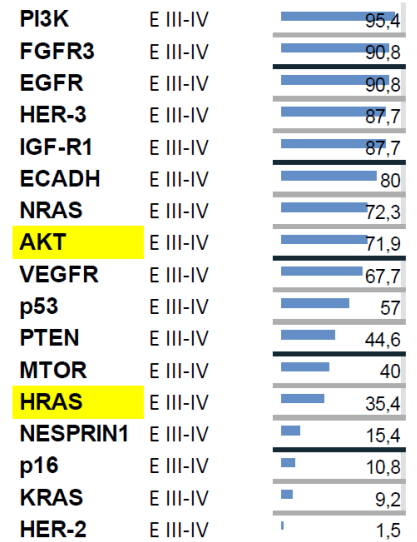
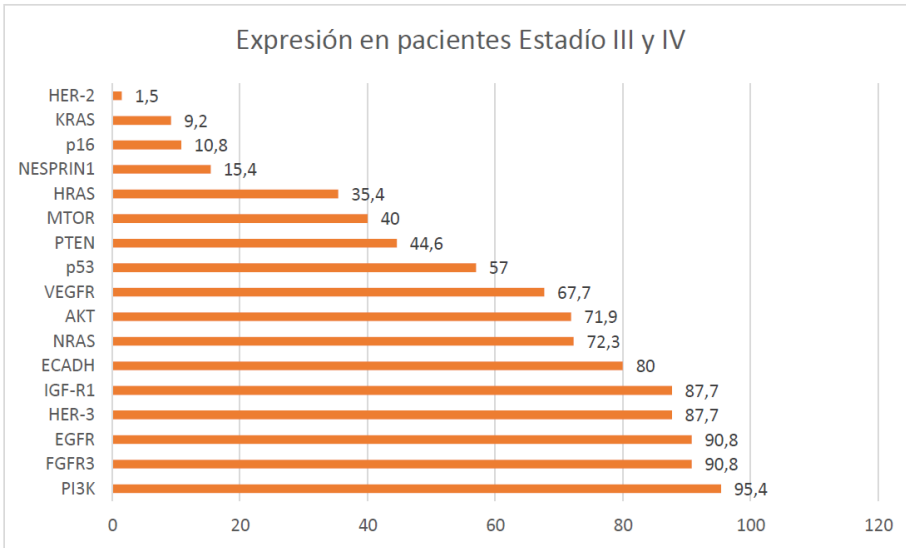
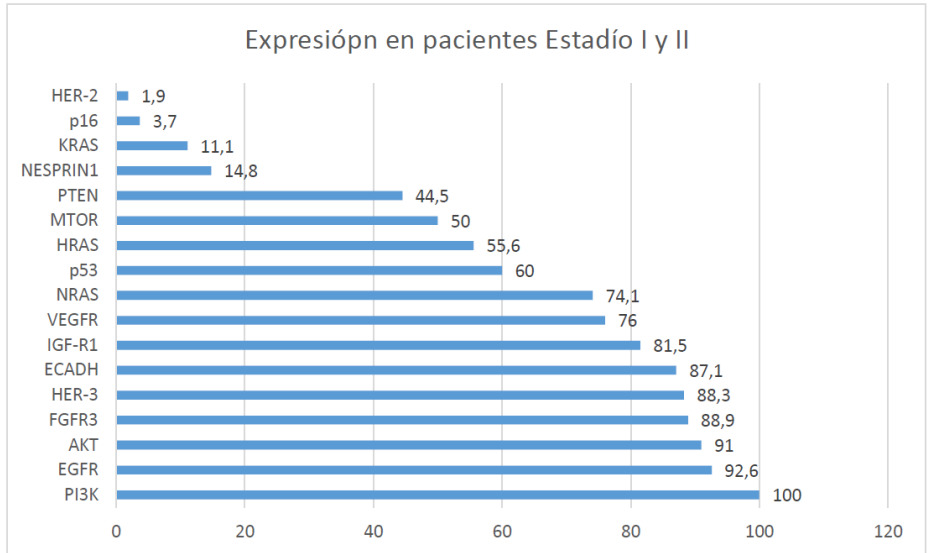
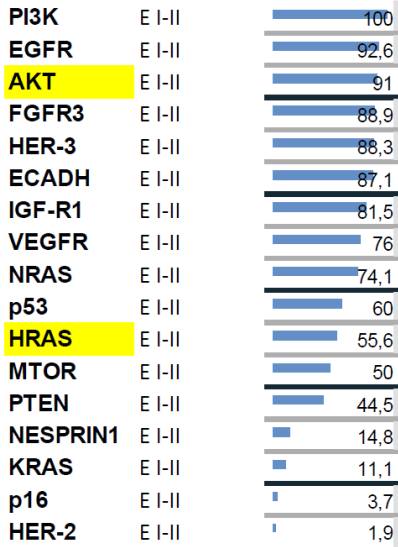
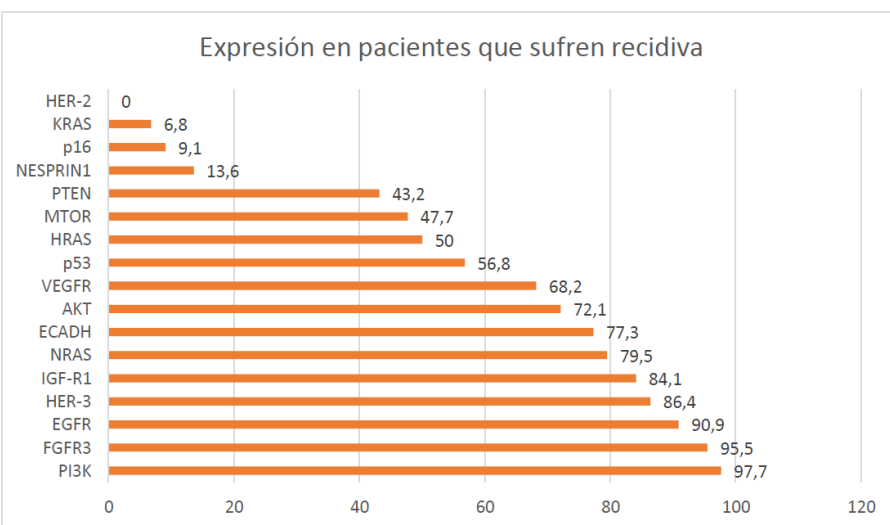
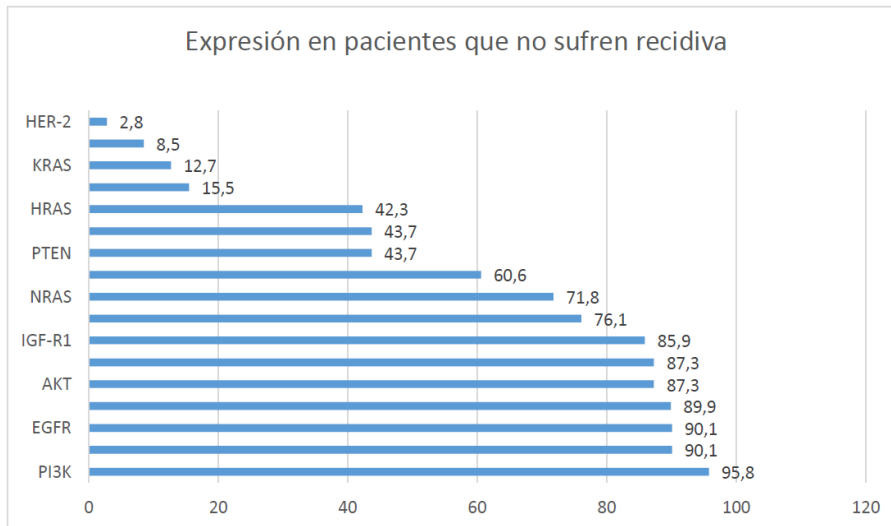


ILUSTRACIÓN 64. PORCENTAJES DE EXPRESIÓN DE LAS DISTINTAS PROTEÍNAS SEGÚN EL ESTADIO TUMORAL.

En la expresión de las proteínas según su estadio tumoral observamos diferencias significativas en AKT y HRAS.

PI3K	No recidiva	95,8
FGFR3	No recidiva	90,1
EGFR	No recidiva	90,1
HER-3	No recidiva	89,9
AKT	No recidiva	87,3
ECADH	No recidiva	87,3
IGF-R1	No recidiva	85,9
VEGFR	No recidiva	76,1
NRAS	No recidiva	71,8
p53	No recidiva	60,6
PTEN	No recidiva	43,7
MTOR	No recidiva	43,7
HRAS	No recidiva	42,3
NESPRIN1	No recidiva	15,5
KRAS	No recidiva	12,7
p16	No recidiva	8,5
HER-2	No recidiva	2,8

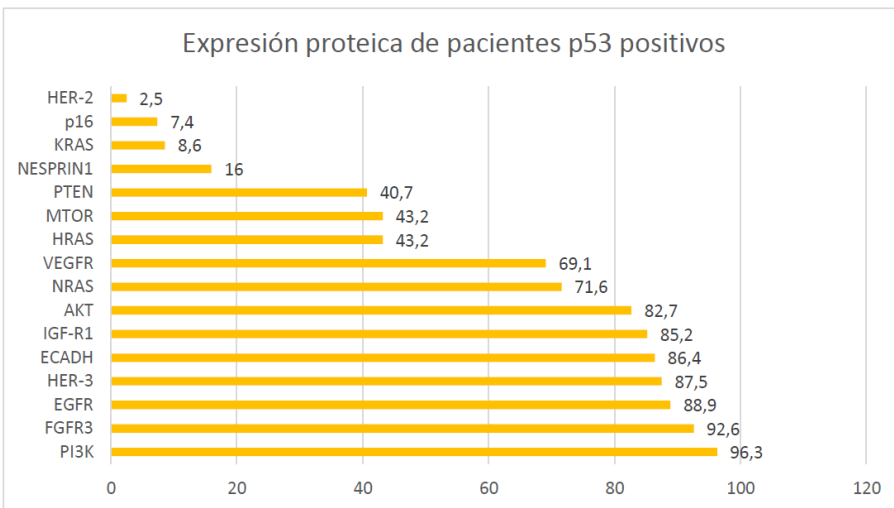
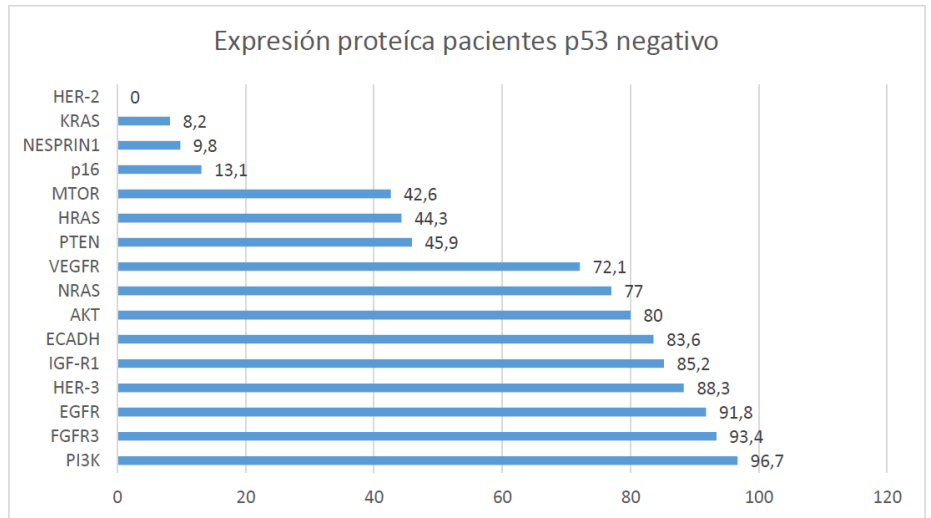


PI3K	Si recidiva	97,7
FGFR3	Si recidiva	95,5
EGFR	Si recidiva	90,9
HER-3	Si recidiva	86,4
IGF-R1	Si recidiva	84,1
NRAS	Si recidiva	79,5
ECADH	Si recidiva	77,3
AKT	Si recidiva	72,1
VEGFR	Si recidiva	68,2
p53	Si recidiva	56,8
HRAS	Si recidiva	50
MTOR	Si recidiva	47,7
PTEN	Si recidiva	43,2
NESPRIN1	Si recidiva	13,6
p16	Si recidiva	9,1
KRAS	Si recidiva	6,8
HER-2	Si recidiva	0

ILUSTRACIÓN 65. PORCENTAJES DE EXPRESIÓN DE LAS DISTINTAS PROTEÍNAS SEGÚN LA APARICIÓN O NO DE RECIDIVA.

En cuanto a la recidiva del carcinoma epidermoide, observamos menor expresión de AKT en pacientes en los que recidiva el tumor. Esta diferencia es estadísticamente significativa.

PI3K	No	96,7
FGFR3	No	93,4
EGFR	No	91,8
HER-3	No	88,3
IGF-R1	No	85,2
ECADH	No	83,6
AKT	No	80
NRAS	No	77
VEGFR	No	72,1
PTEN	No	45,9
HRAS	No	44,3
MTOR	No	42,6
p16	No	13,1
NESPRIN1	No	9,8
KRAS	No	8,2
HER-2	No	0

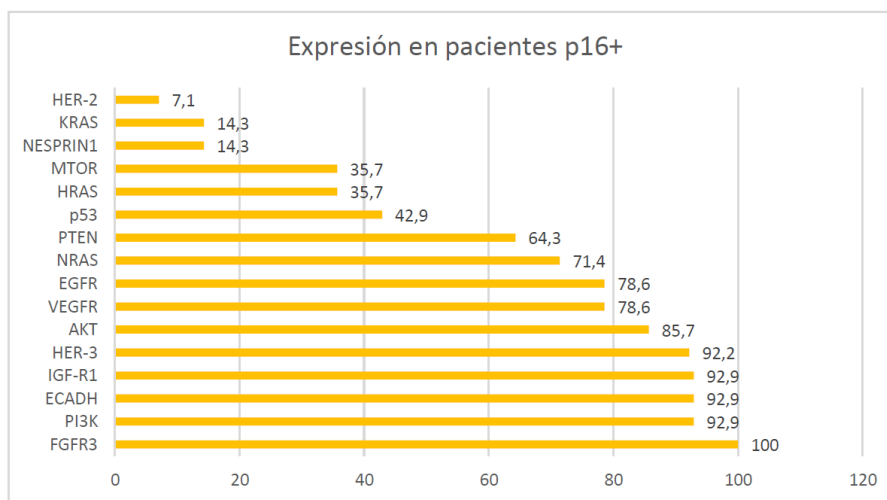
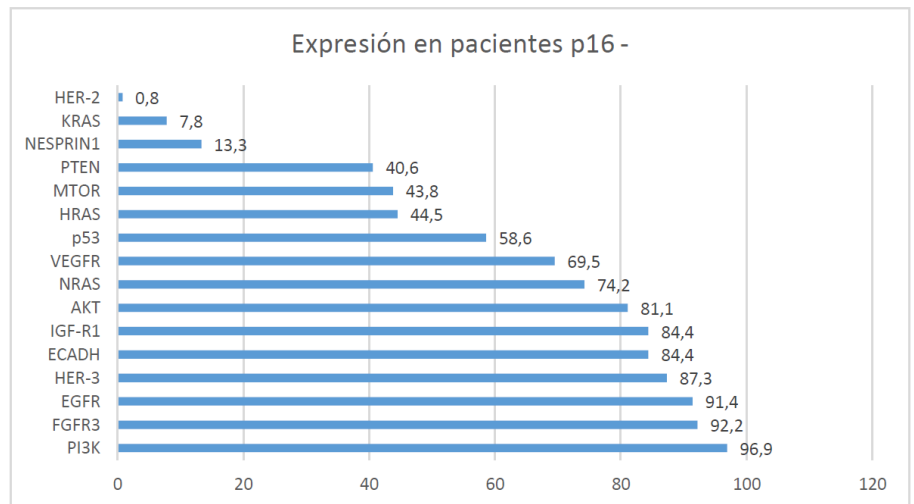


PI3K	Si	96,3
FGFR3	Si	92,6
EGFR	Si	88,9
HER-3	Si	87,5
ECADH	Si	86,4
IGF-R1	Si	85,2
AKT	Si	82,7
NRAS	Si	71,6
VEGFR	Si	69,1
HRAS	Si	43,2
MTOR	Si	43,2
PTEN	Si	40,7
NESPRIN1	Si	16
KRAS	Si	8,6
p16	Si	7,4
HER-2	Si	2,5

ILUSTRACIÓN 66. PORCENTAJES DE EXPRESIÓN DE LAS DISTINTAS PROTEÍNAS SEGÚN POSITIVIDAD O NEGATIVIDAD DE P53

En esta distribución de pacientes que expresan o no P53, tampoco encontramos grandes diferencias con el resto de las proteínas.

PI3K	Negativo	96,9
FGFR3	Negativo	92,2
EGFR	Negativo	91,4
HER-3	Negativo	87,3
ECADH	Negativo	84,4
IGF-R1	Negativo	84,4
AKT	Negativo	81,1
NRAS	Negativo	74,2
VEGFR	Negativo	69,5
p53	Negativo	58,6
HRAS	Negativo	44,5
MTOR	Negativo	43,8
PTEN	Negativo	40,6
NESPRIN1	Negativo	13,3
KRAS	Negativo	7,8
HER-2	Negativo	0,8



FGFR3	Positivo	100
PI3K	Positivo	92,9
ECADH	Positivo	92,9
IGF-R1	Positivo	92,9
HER-3	Positivo	92,2
AKT	Positivo	85,7
VEGFR	Positivo	78,6
EGFR	Positivo	78,6
NRAS	Positivo	71,4
PTEN	Positivo	64,3
p53	Positivo	42,9
HRAS	Positivo	35,7
MTOR	Positivo	35,7
NESPRIN1	Positivo	14,3
KRAS	Positivo	14,3
HER-2	Positivo	7,1

ILUSTRACIÓN 67. PORCENTAJES DE EXPRESIÓN DE LAS DISTINTAS PROTEÍNAS SEGÚN EXPRESIÓN DE P16.

Los resultados no nos ofrecen ninguna diferencia significativa entre ambos grupos en cuanto a la expresión proteica.

5.5. RESULTADOS DE LAS DIFERENTES PROTEÍNAS ANALIZADAS:

5.5.1. Proteína EGFR1

La expresión total de EGFR1 es de 90,1% (ilustración 60). No hemos encontrado ninguna diferencia significativa en la expresión de EGFR1 entre los grupos analizados (sexo, edad, etiología, localización, estadio y recidiva).

En cuanto a la asociación de la expresión de EGFR1 con las demás proteínas, encontramos una asociación entre la expresión proteica de EGFR1 y AKT que no es significativa (ilustración 68 y 69).

No encontramos ninguna otra asociación con el resto de proteínas estudiadas.

Tabla cruzada EGFR1*AKT				
Recuento				
		AKT		Total
		0	1	
EGFR	0	5	9	14
	1	21	106	127
Total		26	115	141

ILUSTRACIÓN 68. TABLA CRUZADA SOBRE LA ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS EGFR1 Y AKT.

Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	3,084 ^a	1	,079		
Corrección de continuidad ^b	1,941	1	,164		
Razón de verosimilitud	2,641	1	,104		
Prueba exacta de Fisher				,137	,088
Asociación lineal por lineal	3,062	1	,080		
N de casos válidos	141				

ILUSTRACIÓN 69. PRUEBA DE CHI-CUADRADO DE PEARSON SOBRE LA ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS EGFR1 Y AKT.

También hemos observado una asociación estadísticamente significativa entre la expresión proteica de EGFR1 y PI3K (ilustración 70 y 71).

Tabla cruzada EGFR1*PI3K				
Recuento				
		PI3KINA		Total
		0	1	
EGFR	0	4	10	14
	1	1	127	128
Total		5	137	142

ILUSTRACIÓN 70. TABLA CRUZADA SOBRE LA ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS EGFR1 Y PI3K.

Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	28,689 ^a	1	,000		
Corrección de continuidad ^b	21,092	1	,000		
Razón de verosimilitud	14,838	1	,000		
Prueba exacta de Fisher				,000	,000
Asociación lineal por lineal	28,487	1	,000		
N de casos válidos	142				
a. 2 casillas (50,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es ,49.					
b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2					

ILUSTRACIÓN 71. PRUEBA DE CHI-CUADRADO DE PEARSON SOBRE LA ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS EGFR1 Y PI3K.

No encontramos ninguna otra asociación estadísticamente significativa entre EGFR1 y el resto de proteínas analizadas.

5.5.2. Proteína HER-2

La expresión total de HER-2 es de 1,4% (ilustración 60).

En nuestros resultados, no hemos encontrado ninguna asociación estadística de HER-2 entre los grupos analizados (sexo, edad, etiología, localización, estadio y recidiva), aunque en la comparación de expresión de las proteínas según la positividad o negatividad del VPH (ilustración 67), HER-2 presenta las diferencias más grandes entre ambos grupos, siendo la expresión de HER-2 menor en pacientes con una baja o nula expresión de P16, sin llegar a ser estadísticamente significativo.

No hemos encontrado ninguna asociación de la expresión proteica de HER-2 con las demás proteínas estudiadas.

5.5.3. Proteína HER-3

La expresión total de HER-3 es de 87,9% (ilustración 60).

No hemos encontrado diferencias significativas de la expresión de HER-3 entre los grupos analizados (sexo, edad, etiología, localización, estadio y recidiva).

Respecto a la asociación de la expresión de HER-3 con otras proteínas observamos una asociación significativa entre HER-3 y AKT. Esto implica que cuando uno de ellos aumenta, el otro también se sobreexpresa (ilustración 72 y 73).

TABLA CRUZADA HER-3 -*AKT				
Recuento				
		AKT		Total
		0	1	
HER-3 en nucleo, xq	0	8	9	17
membrana es -	1	18	104	122
Total		26	113	139

ILUSTRACIÓN 72. TABLA CRUZADA DE LA ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS HER-3 Y AKT.

PRUEBAS DE CHI-CUADRADO					
	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	10,240 ^a	1	,001		
Corrección de continuidad ^b	8,226	1	,004		
Razón de verosimilitud	8,370	1	,004		
Prueba exacta de Fisher				,004	,004
Asociación lineal por lineal	10,166	1	,001		
N de casos válidos	139				
a. 1 casillas (25,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 3,18.					
b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2					

ILUSTRACIÓN 73. PRUEBA CHI-CUADRADO DE PEARSON SOBRE LA ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS HER-3 Y AKT.

Encontramos a su vez una asociación casi significativa entre la sobreexpresión de HER-3 y de PI3K (ilustración 74 y 75).

Tabla cruzada HER-3-PI3K						
Recuento						
		PI3KINA		Total		
		0	1			
HER-3 en nucleo, xq	0	2	15	17		
membrana es -	1	3	120	123		
Total		5	135	140		

ILUSTRACIÓN 74. TABLA CRUZADA SOBRE LA ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS HER-3 Y PI3K.

Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	3,772 ^a	1	,052		
Corrección de continuidad ^b	1,550	1	,213		
Razón de verosimilitud	2,618	1	,106		
Prueba exacta de Fisher				,112	,112
Asociación lineal por lineal	3,745	1	,053		
N de casos válidos	140				
a. 2 casillas (50,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es ,61.					
b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2					

ILUSTRACIÓN 75. PRUEBA DE CHI-CUADRADO DE PEARSON SOBRE LA ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS HER-3 Y PI3K

No encontramos ninguna otra asociación con el resto de proteínas estudiadas.

5.5.4. Proteína IGF-1R

La expresión total de IGF-1R es de 85,2% (ilustración 60).

No hemos encontrado diferencias significativas de la expresión de IGF-1R entre los grupos analizados (sexo, edad, etiología, localización, estadio y recidiva).

En la comparación de expresión de las proteínas en pacientes bebedores y no bebedores (ilustración 63), no encontramos ninguna diferencia significativa de expresión proteica entre ambos grupos de pacientes. La proteína con mayor diferencia estadística entre ambos grupos es IGF-1R que se expresa menos en no bebedores, pero no llega a ser una diferencia significativa.

Por otro lado, encontramos una asociación significativa entre la expresión proteica de IGF-1R y VEGFR1. Esto implica que cuando uno de ellos aumenta, el otro también se sobreexpresa (ilustración 76 y 77).

TABLA CRUZADA IGF-1R*VEGFR1				
Recuento				
		VEGFR1		Total
		0	1	
IGF-1R	0	10	11	21
	1	32	89	121
Total		42	100	142

ILUSTRACIÓN 76. TABLA CRUZADA DE LA ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS IGF-1R Y VEGFR1

PRUEBAS DE CHI-CUADRADO					
	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	3,851 ^a	1	,050		
Corrección de continuidad ^b	2,902	1	,088		
Razón de verosimilitud	3,595	1	,058		
Prueba exacta de Fisher				,069	,047
Asociación lineal por lineal	3,824	1	,051		
N de casos válidos	142				
a. 0 casillas (0,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 6,21.					
b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2					

ILUSTRACIÓN 77. PRUEBA CHI-CUADRADO DE PEARSON SOBRE LA ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS IGF-1R Y VEGFR1.

No encontramos ninguna otra asociación estadísticamente significativa entre la expresión de IGF-1R y el resto de proteínas analizadas.

5.5.5. Proteína PI3K

La expresión total de PI3K es de 96,5% (ilustración 60).

No hemos encontrado diferencias significativas de la expresión de PI3K entre los grupos analizados (sexo, edad, etiología, localización, estadio y recidiva).

Además de los resultados de asociación de la expresión proteica de PI3K y EGFR1 (10.5.1) y de PI3K y HER-3 (10.5.3) descritos previamente, nuestros resultados arrojan los siguientes datos:

Hemos observado que cuando PTEN se expresa se reduce la expresión de PI3K de manera significativa (ilustración 78 y 79).

Tabla cruzada PTEN*PI3K				
Recuento				
		PI3KINA		Total
		0	1	
PTEN	0	5	76	81
	1	0	61	61
Total		5	137	142

ILUSTRACIÓN 78. ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE PTEN Y PI3K.

Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	Df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	3,903 ^a	1	,048		
Corrección de continuidad ^b	2,297	1	,130		
Razón de verosimilitud	5,751	1	,016		
Prueba exacta de Fisher				,070	,057
Asociación lineal por lineal	3,875	1	,049		
N de casos válidos	142				
a. 2 casillas (50,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 2,15.					
b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2					

ILUSTRACIÓN 79. PRUEBA DE CHI-CUADRADO DE PEARSON SOBRE LA ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE PTEN Y PI3K.

Encontramos una asociación estadísticamente significativa en la expresión proteica entre FGFR3 y PI3K (ilustración 80 y 81).

Tabla cruzada FGFR3*PI3K				
Recuento				
		PI3K		Total
		0	1	
FGFR3	0	3	7	10
	1	2	130	132
Total		5	137	142

ILUSTRACIÓN 80. TABLA CRUZADA DE LA ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE FGFR3 Y PI3K.

Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	Df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	22,202 ^a	1	,000		
Corrección de continuidad ^b	14,609	1	,000		
Razón de verosimilitud	10,340	1	,001		
Prueba exacta de Fisher				,002	,002
Asociación lineal por lineal	22,046	1	,000		
N de casos válidos	142				
a. 2 casillas (50,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es ,35.					
b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2					

ILUSTRACIÓN 81. PRUEBA DE CHI-CUADRADO DE PEARSON SOBRE LA ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE FGFR3 Y PI3K.

No encontramos ninguna otra asociación estadísticamente significativa entre la expresión de PI3K y el resto de proteínas analizadas.

5.5.6. Proteína AKT 1,2 y 3

La expresión total de AKTpan es de 81,6% (ilustración 60).

No hemos encontrado diferencias significativas de la expresión de AKT con respecto al sexo, edad, etiología de las biopsias de los pacientes analizados. Si hemos encontrado resultados estadísticamente significativos respecto a la localización, estadio tumoral y etiología. En la expresión de las proteínas según su estadio tumoral (ilustración 64) observamos diferencias significativas en AKT. Esta se expresa más en estadios I y II que en los estadios III y IV, de manera significativa (ilustración 82 y 83).

En cuanto a la recidiva del carcinoma epidermoide, observamos menor expresión de AKT en pacientes en los que recidiva el tumor. Esta diferencia es estadísticamente significativa (ilustración 84 y 85).

Tabla cruzada AKT*Estadio				
		Estadio		Total
		ESTADIO LOCAL	LOCALMENTE AVANZADO	
AKT	0	5	18	23
	1	49	46	95
Total		54	64	118

ILUSTRACIÓN 82. TABLA CRUZADA DE LA ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE AKT CON EL ESTADIO TUMORAL.

Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	6,643 ^a	1	,010		
Corrección de continuidad ^b	5,495	1	,019		
Razón de verosimilitud	7,046	1	,008		
Prueba exacta de Fisher				,011	,008
Asociación lineal por lineal	6,587	1	,010		
N de casos válidos	118				
a. 0 casillas (0,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 10,53.					
b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2					

ILUSTRACIÓN 83. PRUEBA DE CHI-CUADRADO DE PEARSON SOBRE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE AKT CON EL ESTADIO TUMORAL.

Tabla cruzada AKT*1º recidiva				
Recuento				
		1º recidiva		Total
		NO RECIDIVA	RECIDIVA	
AKT	0	9	12	21
	1	62	31	93
Total		71	43	114

ILUSTRACIÓN 84. ILUSTRACIÓN 75. TABLA CRUZADA DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE AKT CON LA PRIMERA RECIDIVA.

Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	4,134 ^a	1	,042		
Corrección de continuidad ^b	3,183	1	,074		
Razón de verosimilitud	4,016	1	,045		
Prueba exacta de Fisher				,050	,039
Asociación lineal por lineal	4,098	1	,043		
N de casos válidos	114				

a. 0 casillas (0,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 7,92.

b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2

ILUSTRACIÓN 85. ILUSTRACIÓN 75. PRUEBA DE CHI-CUADRADO DE PEARSON SOBRE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE AKT CON LA PRIMERA RECIDIVA.

Además, en nuestro análisis estadístico podemos observar que, en los pacientes cuyo carcinoma está en estadio local, la expresión de AKT es menor en faringe que en las otras dos localizaciones de manera estadísticamente significativa (ilustraciones 86 y 87).

TABLA DE CONTINGENCIA					
			AKT		Total
			0	1	
LOCALIZACIÓN	LARINGE	Recuento	0	31	31
		% dentro de LOCALIZACIÓN	0,0%	100,0%	100,0%
	FARINGE	Recuento	2	2	4
		% dentro de LOCALIZACIÓN	50,0%	50,0%	100,0%
	CAVIDAD ORAL	Recuento	3	16	19
		% dentro de LOCALIZACIÓN	15,8%	84,2%	100,0%
Total		Recuento	5	49	54
		% dentro de LOCALIZACIÓN	9,3%	90,7%	100,0%

ILUSTRACIÓN 86. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE AKT ENTRE LOCALIZACIONES CUANDO EL TUMOR ESTÁ EN ESTADIO LOCAL.

a. Estadio = ESTADIO LOCAL					
PRUEBAS DE CHI-CUADRADO					
	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	12,030 ^b	2	,002	,003	
Razón de verosimilitudes	11,198	2	,004	,007	
Estadístico exacto de Fisher	10,100			,003	
Asociación lineal por lineal	4,171 ^c	1	,041	,048	,048
N de casos válidos	54				

ILUSTRACIÓN 87. PRUEBA DE CHI-CUADRADO DE PEARSON DE LA ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE AKT ENTRE LOCALIZACIONES CUANDO EL TUMOR ESTÁ EN ESTADIO LOCAL.

En los pacientes con carcinoma en laringe, la expresión de AKT es menor de manera estadísticamente significativa en estadios avanzados que en locales (ilustraciones 88 y 89).

TABLA DE CONTINGENCIA LARINGE					
			AKT		Total
			0	1	
Estadio	ESTADIO LOCAL	Recuento	0	31	31
		% dentro de Estadio	0,0%	100,0%	100,0%
	LOCALMENTE AVANZADO	Recuento	11	25	36
		% dentro de Estadio	30,6%	69,4%	100,0%
Total	Recuento		11	56	67
	% dentro de Estadio		16,4%	83,6%	100,0%

ILUSTRACIÓN 88. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA DIFERENTE ASOCIACIÓN DE AKT EN TUMORES EN ESTADIO LOCAL O AVANZADO DE LARINGE.

PRUEBAS DE CHI-CUADRADO					
	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	11,333 ^b	1	,001	,001	,000
Corrección por continuidad ^c	9,216	1	,002		
Razón de verosimilitudes	15,520	1	,000	,001	,000
Estadístico exacto de Fisher				,001	,000
Asociación lineal por lineal	11,164 ^d	1	,001	,001	,000
N de casos válidos	67				

ILUSTRACIÓN 89. PRUEBA DE CHI-CUADRADO DE PEARSON SOBRE LA ASOCIACIÓN DE AKT EN TUMORES EN ESTADIO LOCAL O AVANZADO DE LARINGE.

En cuanto a la asociación de la expresión entre AKT y otras proteínas, además de los resultados de asociación de AKT con EGFR1 (10.5.1) y con HER-3 (10.5.3) descritos anteriormente, nuestros resultados arrojan los siguientes datos:

Podemos observar una asociación significativa entre AKT y NRAS en su expresión proteica (ilustración 90 y 91).

Tabla cruzada AKT NRAS				
Recuento				
		AKT		Total
		0	1	
NRAS	0	13	23	36
	1	13	92	105
Total		26	115	141

ILUSTRACIÓN 90. TABLA CRUZADA DE LA ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE NRAS Y AKT.

Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	Df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	10,038 ^a	1	,002		
Corrección de continuidad ^b	8,522	1	,004		
Razón de verosimilitud	9,069	1	,003		
Prueba exacta de Fisher				,003	,003
Asociación lineal por lineal	9,967	1	,002		
N de casos válidos	141				
a. 0 casillas (0,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 6,64.					
b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2					

ILUSTRACIÓN 91. PRUEBA DE CHI-CUADRADO DE PEARSON SOBRE LA ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE NRAS Y AKT.

Encontramos que cuando PTEN se expresa se reduce la expresión de AKT de manera significativa (ilustraciones 92 y 93).

Tabla cruzada PTEN*AKT				
Recuento				
		AKT		Total
		0	1	
PTEN	0	23	58	81
	1	3	57	60
Total		26	115	141

ILUSTRACIÓN 92. ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE PTEN Y AKT.

Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	12,544 ^a	1	,000		
Corrección de continuidad ^b	11,037	1	,001		
Razón de verosimilitud	14,316	1	,000		
Prueba exacta de Fisher				,000	,000
Asociación lineal por lineal	12,455	1	,000		
N de casos válidos	141				
a. 0 casillas (0,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 11,06.					
b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2					

ILUSTRACIÓN 93. PRUEBA DE CHI-CUADRADO DE PEARSON SOBRE LA ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE PTEN Y AKT.

También observamos que cuando AKT se expresa, MTOR también lo hace de manera estadísticamente significativa (ilustraciones 94 y 95).

Tabla cruzada AKT*MTOR				
Recuento				
		MTOR		Total
		0	1	
AKT	0	20	6	26
	1	61	54	115
Total		81	60	141

ILUSTRACIÓN 94. TABLA CRUZADA DE LA ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE AKT Y MTOR.

Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	4,947 ^a	1	,026		
Corrección de continuidad ^b	4,018	1	,045		
Razón de verosimilitud	5,240	1	,022		
Prueba exacta de Fisher				,029	,021
Asociación lineal por lineal	4,912	1	,027		
N de casos válidos	141				
a. 0 casillas (0,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 11,06.					

ILUSTRACIÓN 95. PRUEBA DE CHI-CUADRADO DE PEARSON SOBRE LA ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE AKT Y MTOR.

No encontramos ninguna otra asociación estadísticamente significativa entre la expresión de AKT y el resto de proteínas analizadas.

5.5.7. Proteína MTOR:

La expresión total de MTOR es de 43% (ilustración 60).

No hemos encontrado diferencias significativas de la expresión de MTOR entre los grupos analizados (sexo, edad, etiología, localización, estadio y recidiva).

Además de los resultados de asociación de MTOR con AKT 1, 2 y 3 (10.5.6) expuestos con anterioridad, nuestros resultados nos muestran que:

Existe una asociación estadísticamente significativa entre MTOR y PTEN. Encontramos que cuando PTEN se expresa se reduce la expresión de MTOR (ilustraciones 96 y 97).

Tabla cruzada PTEN*MTOR				
Recuento				
		MTOR		Total
		0	1	
PTEN	0	53	28	81
	1	28	33	61
Total		81	61	142

ILUSTRACIÓN 96. ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE PTEN Y MTOR.

Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	5,416 ^a	1	,020		
Corrección de continuidad ^b	4,649	1	,031		
Razón de verosimilitud	5,427	1	,020		
Prueba exacta de Fisher				,026	,015
Asociación lineal por lineal	5,378	1	,020		
N de casos válidos	142				

a. 0 casillas (0,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 26,20.

b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2

ILUSTRACIÓN 97. PRUEBA DE CHI-CUADRADO DE PEARSON SOBRE LA ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE PTEN Y MTOR.

No encontramos ninguna otra asociación estadísticamente significativa entre la expresión de MTOR y el resto de proteínas analizadas.

5.5.8. Proteína PTEN:

La expresión total de PTEN es de 43% (ilustración 60).

No hemos encontrado diferencias significativas de la expresión de PTEN entre los grupos edad, etiología, localización, estadio y recidiva. Se han hallado diferencias significativas entre varones y mujeres en la expresión de la proteína PTEN (Ilustración 61). Esta está sobreexpresada en el 61,5 % de los casos de mujeres y en el 38,5 de los varones (ilustraciones 98 y 99).

TABLAS DE CONTINGENCIA					
			PTEN		Total
			0	1	
Sexo	MUJERES	Recuento	10	16	26
		% dentro de Sexo	38,5%	61,5%	100,0%
	VARONES	Recuento	71	45	116
		% dentro de Sexo	61,2%	38,8%	100,0%
Total		Recuento	81	61	142
		% dentro de Sexo	57,0%	43,0%	100,0%

ILUSTRACIÓN 98. TABLAS DE CONTINGENCIA DE LA ASOCIACIÓN DE PTEN A LA DISTRIBUCIÓN POR SEXOS DE LA MUESTRA.

PRUEBAS DE CHI-CUADRADO					
	Valor	Df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	4,484 ^a	1	.034		
Corrección de continuidad ^b	3,604	1	,058		
Razón de verosimilitud	4,448	1	,035		
Prueba exacta de Fisher				,048	,029
Asociación lineal por lineal	4,453	1	,035		
N de casos válidos	142				

ILUSTRACIÓN 99. PRUEBA DE CHI-CUADRADO DE PEARSON DE LA ASOCIACIÓN DE PTEN A LA DISTRIBUCIÓN POR SEXOS DE LA MUESTRA.

Además de los resultados de asociación de PTEN con PI3K (10.5.5), con AKT 1, 2 y 3 (10.5.6) y con MTOR (10.5.7) No encontramos ninguna otra asociación estadísticamente significativa entre la expresión de PTEN y el resto de proteínas analizadas.

5.5.8.1. Proteína VEGFR1:

La expresión total de VEGFR1 es de 70% (ilustración 60).

No hemos encontrado diferencias significativas de la expresión de MTOR entre los grupos analizados (sexo, edad, etiología, localización, estadio y recidiva).

Los resultados de asociación de VEGFR1 con las demás proteínas han sido expuestos con anterioridad, IGF-1R (10.5.4). No encontramos ninguna otra asociación estadísticamente significativa entre la expresión de VEGFR1 y el resto de proteínas analizadas.

5.5.9. Proteína FGFR1:

FGFR1 presenta una expresión total de 0% (ilustración 60), por lo que no existen más análisis.

5.5.10. Proteína FGFR3:

La expresión total de FGFR3 es de 93% (ilustración 60).

No hemos encontrado diferencias significativas de la expresión de FGFR3 entre los grupos analizados (sexo, edad, etiología, localización, estadio y recidiva).

Además de los resultados de asociación de FGFR3 con PI3K (10.5.5) expuestos con anterioridad, nuestros resultados nos muestran que:

Existe una asociación estadísticamente significativa entre la expresión proteica de FGFR3 y NRAS (ilustraciones 100 y 101).

Tabla cruzada				
Recuento				
		NRAS		Total
		0	1	
FGFR3	0	7	3	10
	1	30	102	132
Total		37	105	142

ILUSTRACIÓN 100. TABLA CRUZADA DE LA ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE FGFR3 Y NRAS.

Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	10,782 ^a	1	,001		
Corrección de continuidad ^b	8,468	1	,004		
Razón de verosimilitud	9,205	1	,002		
Prueba exacta de Fisher				,003	,003
Asociación lineal por lineal	10,706	1	,001		
N de casos válidos	142				
a. 1 casillas (25,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 2,61.					
b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2					

ILUSTRACIÓN 101. PRUEBA DE CHI-CUADRADO DE PEARSON SOBRE LA ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE FGFR3 Y NRAS.

No encontramos ninguna asociación estadísticamente significativa entre la expresión de FGFR3 y el resto de proteínas analizadas.

5.5.11. Proteína HRAS:

En la expresión general de HRAS, su expresión es de 43,7% (ilustración 60).

No hemos encontrado diferencias significativas de la expresión de HRAS entre los grupos sexo, edad, etiología y recidiva del tumor. En la expresión de la proteína según su estadio tumoral (ilustración 64), observamos que existen diferencias significativas en HRAS (ilustraciones 102 y 103).

Tabla cruzada HRAS*Estadio				
Recuento				
		Estadio		Total
		ESTADIO LOCAL	LOCALMENTE AVANZADO	
HRAS	0	24	42	66
	1	30	23	53
Total		54	65	119

ILUSTRACIÓN 102. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ASOCIACIÓN DE HRAS SEGÚN EL ESTADIO TUMORAL.

Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	4,858 ^a	1	,028		
Corrección de continuidad ^b	4,076	1	,043		
Razón de verosimilitud	4,881	1	,027		
Prueba exacta de Fisher				,041	,022
Asociación lineal por lineal	4,817	1	,028		
N de casos válidos	119				

a. 0 casillas (0,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 24,05.

ILUSTRACIÓN 103. PRUEBA DE CHI-CUADRADO DE PEARSON SOBRE LA ASOCIACIÓN DE HRAS Y EL ESTADIO TUMORAL.

En nuestro estudio estadístico también encontramos que, en los pacientes cuyo carcinoma está en estadio local, la expresión de HRAS es menor en faringe que en las otras dos localizaciones (ilustraciones 104 y 105).

TABLA DE CONTINGENCIA ESTADIO LOCAL					
			HRAS		Total
			0	1	
LOCALIZACIÓN	LARINGE	Recuento	14	17	31
		% dentro de LOCALIZACIÓN	45,2%	54,8%	100,0%
	FARINGE	Recuento	4	0	4
		% dentro de LOCALIZACIÓN	100,0%	0,0%	100,0%
	CAVIDAD ORAL	Recuento	6	13	19
		% dentro de LOCALIZACIÓN	31,6%	68,4%	100,0%
Total		Recuento	24	30	54
		% dentro de LOCALIZACIÓN	44,4%	55,6%	100,0%

ILUSTRACIÓN 104. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ASOCIACIÓN DE HRAS SEGÚN LA LOCALIZACIÓN DE LOS TUMORES EN ESTADIO LOCAL.

PRUEBAS DE CHI-CUADRADO					
	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	6,280 ^b	2	,043	,046	
Razón de verosimilitudes	7,809	2	,020	,026	
Estadístico exacto de Fisher	5,891			,046	
Asociación lineal por lineal	,597 ^c	1	,440	,472	,266
N de casos válidos	54				

ILUSTRACIÓN 105. PRUEBA DE CHI-CUADRADO DE PEARSON SOBRE LA ASOCIACIÓN DE HRAS Y LA LOCALIZACIÓN DE LOS TUMORES EN ESTADIO LOCAL.

No encontramos ninguna asociación de la expresión de HRAS y el resto de proteínas analizadas.

5.5.12. Proteína NRAS:

La expresión total de NRAS es de 73,9% (ilustración 60). Los resultados de asociación de NRAS con las demás proteínas han sido expuestos con anterioridad, AKT (10.5.6).

5.5.13. Proteína KRAS:

La expresión total de KRAS es de 8,5% (ilustración 60).

No hemos encontrado diferencias significativas de la expresión de KRAS entre los grupos analizados (sexo, edad, etiología, localización, estadio y recidiva). Sí encontramos una tendencia importante de aumento de expresión de KRAS en fumadores, comparado con los no fumadores, la cual no tiene significación estadística (ilustración 62).

No encontramos ninguna asociación de la expresión de KRAS con el resto de proteínas estudiadas.

5.5.14. Proteína BRAF:

BRAF presenta una expresión total de 0% (ilustración 60), por lo que no existen más análisis.

5.5.15. Proteína ECADH:

La expresión total de ECADH es de 85,2% (ilustración 60).

No hemos encontrado diferencias significativas de la expresión de ECADH entre los grupos analizados (sexo, edad, etiología, localización, estadio y recidiva). Encontramos que cuando ECADH se expresa, el nivel de recidivas es menor que cuando no se expresa, pero estadísticamente no hemos obtenido diferencias significativas (ilustraciones 106 y 107).

Tabla cruzada ECADH*1º recidiva				
Recuento				
		1º recidiva		Total
		NO RECIDIVA	RECIDIVA	
ECADH	0	9	10	19
	1	62	34	96
Total		71	44	115

ILUSTRACIÓN 106. TABLA CRUZADA DE LA ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ECADH Y LA RECIDIVA TUMORAL.

Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	1,990 ^a	1	,158		
Corrección de continuidad ^b	1,328	1	,249		
Razón de verosimilitud	1,941	1	,164		
Prueba exacta de Fisher				,199	,125
Asociación lineal por lineal	1,973	1	,160		
N de casos válidos	115				

ILUSTRACIÓN 107. PRUEBA DE CHI-CUADRADO DE PEARSON SOBRE LA ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ECADH Y LA RECIDIVA TUMORAL.

No encontramos ninguna asociación de la expresión de ECADH con el resto de proteínas analizadas.

5.5.16. Proteína p16:

La expresión general de p16 es de 9,9% (ilustración 60).

Los resultados no nos ofrecen ninguna diferencia significativa de la expresión de p16 en los grupos analizados (sexo, edad, etiología, localización, estadio y recidiva). Tampoco

encontramos ninguna diferencia significativa en cuanto a la expresión proteica de p16 y el resto de proteínas (ilustración 67).

5.5.17. Proteína p53:

La expresión general de p53 es de 57% (ilustración 60).

Los resultados no nos ofrecen ninguna diferencia significativa de la expresión de p53 en los grupos analizados (sexo, edad, etiología, localización, estadio y recidiva). Tampoco encontramos ninguna diferencia significativa en cuanto a la expresión proteica de p53 y el resto de proteínas (ilustración 66).

5.5.18. Proteína CKIT:

CKIT presenta una expresión total de 0% (ilustración 60), por lo que no existen más análisis.

5.5.19. Proteína NESPRIN1:

Nesprin1 presenta una expresión total de 13,4% (ilustración 60).

Los resultados no nos ofrecen ninguna diferencia significativa de la expresión de NESPRIN1 en los grupos analizados (sexo, edad, etiología, localización, estadio y recidiva).

Tampoco encontramos ninguna diferencia significativa en cuanto a la expresión de NESPRIN1 y el resto de proteínas analizadas.

6.DISCUSIÓN

Nosotros hemos estudiado las alteraciones moleculares más frecuentemente descritas en los tumores de cabeza y cuello, mediante la técnica de tissue microarray, en la cual cuantificamos la expresión proteica. No existen mucha literatura científica al respecto, y pensamos que el estudio de la expresión proteica de estas alteraciones moleculares puede contribuir a un mejor conocimiento de la patogénesis de estos tumores.

Como hemos comentado con anterioridad, no siempre una mutación lleva a una sobreexpresión de la proteína, sino que esta puede llevar a la falta de expresión de la misma, o a la inactivación de alguno de sus los procesos celulares.

Por todo ello, nos propusimos como objetivo estudiar las alteraciones en la expresión proteica de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello y secundariamente correlacionar la expresión proteica de las células tumorales con la edad, el sexo, los hábitos de los pacientes, así como la afectación por VPH, la localización del tumor, el estadio tumoral y las recidivas del tumor. De esta manera pretendemos establecer algún patrón o correlación de la expresión con alguno de estos eventos que permita un mayor conocimiento de los carcinomas epidermoides o escamosos de cabeza y cuello.

En un primer análisis de la muestra estudiada, observamos que la distribución por sexos es de 4 a 1 en favor de los varones (81,7% fueron varones y 18,3% mujeres) (Ilustración 48). Esto es similar a la proporción estadística que nos ofrece Eurocare 4, pero no concuerda con la que se ha establecido en España que es de 10 a 1 (7). Observamos una frecuencia mayor en varones en faringe y laringe que en cavidad oral, donde la frecuencia de los casos es similar en ambos sexos (ilustraciones 49 y 50). La literatura refiere que la distribución de la localización en cavidad oral es similar entre hombres y mujeres, siendo en el resto de localizaciones inferior de manera estadísticamente significativa en mujeres que en hombres (136).

La edad media de diagnóstico de los carcinomas escamosos, que es de 66,09 años en nuestra muestra. Esta edad es similar a la encontrada en la literatura (9,10).

En cuanto a la distribución de los tumores por localización, en la literatura encontramos los siguientes porcentajes: cavidad oral 37%, faringe 28% y laringe 35% (86, 137). En nuestro estudio hemos encontrado una incidencia inferior de tumores de faringe puede estar condicionado por la baja prevalencia de VPH en nuestra muestra (9,9% positivos frente a 90,1% negativos), ya que, los carcinomas epidermoides provocados por VPH se originan predominantemente en la orofaringe, como hemos comentado previamente

(22,23). La prevalencia de infección por HPV en España en pacientes con carcinoma escamoso de cabeza y cuello es algo inferior al 20% (22,23), superior a la de nuestro estudio e inferior a las cifras europeas.

En la literatura los casos de carcinoma epidermoide que deben su etiología a VPH son de aparición en edad más temprana que los que tienen su etiología en consumo de alcohol y tabaco (21). Nosotros no encontramos diferencias en cuanto a la edad de aparición de los tumores VPH + y los VPH -. Encontramos una distribución exactamente igual entre ambos grupos (ilustración 52).

Otro factor etiológico del cáncer de cabeza y cuello es el tabaco. Los pacientes fumadores tienen un riesgo de 3 a 12 veces mayor que los no fumadores, estando directamente relacionado con la dosis y duración del consumo (13,14,15,16). Nosotros hemos analizado 142 casos de carcinoma, de los cuales el 78,3 % de los pacientes son fumadores y el 21,7% no. La localización en la que más incide el tabaco es la laringe, con un riesgo relativo 10 veces mayor, seguido por los tumores de orofaringe e hipofaringe con un riesgo relativo 4 veces mayor (14,15,16). En nuestra muestra, hay una fuerte asociación del hábito a los casos de laringe 91,9% y faringe 100% y menor en con cavidad oral, donde desciende al 52% (Ilustración 55).

También se ha estudiado la ingesta de alcohol superior a cuatro unidades alcohólicas diarias, que es un importante factor promotor de la carcinogénesis en el cáncer de cabeza y cuello (16), sobre todo en asociación con el tabaco, siendo responsables de más del 75 % de los cánceres de cavidad oral, de la orofaringe y de hipofaringe. En nuestra muestra, los datos de consumo de alcohol (alrededor del 50%) son inferiores a los habitualmente referidos. Es posible que esto sea debido a que en la historia clínica no esté correctamente reflejado el consumo de alcohol. En nuestros resultados hemos obtenido una asociación estadísticamente significativa del tabaco y el alcohol con el carcinoma escamosos de faringe y laringe (ilustración 59). Esto corrobora lo comentado anteriormente con respecto a las localizaciones, y también ratifica el efecto sinérgico del tabaco con el consumo de alcohol, siendo este último un potenciador de sus efectos (14,16).

No hemos encontrado ninguna asociación entre la infección por VPH, el consumo de tabaco y el consumo de alcohol (ilustraciones 54 y 58).

En cuanto al estadio tumoral, encontramos una distribución del 38% de los casos en estadios tempranos y 62 % en estadios localmente avanzados, lo cual es similar a los

habitualmente reflejados en la literatura (3). En cuanto a la primera recidiva, vemos que el 61,7% de nuestros pacientes no tienen recidiva tras el tratamiento, frente a un 38,3 % que si recidivan. Estos datos no son comparables con la literatura habitual ya que el seguimiento de los pacientes es limitado en el tiempo y desigual al ser un estudio transversal.

El objetivo fundamental de nuestro trabajo ha sido el estudio de las alteraciones moleculares mediante la expresión proteica por microarrays. De manera general, en la gráfica de expresión de las proteínas en todos los pacientes (ilustración 60), observamos que la expresión proteica varía bastante entre ellas.

En comparación con lo revisado en la literatura, los datos de expresión son muy similares en las proteínas EGFR1, HER-2, HER-3, AKT, PTEN, VEGFR1, MTOR, FGFR3, BRAF, p53 y CKIT. Sin embargo, encontramos ligeras variaciones (menores a un 35%) en la expresión proteica de IGF-R1, MTOR, FGFR1, NRAS y p16. No encontramos ninguna razón concreta para valorar esta disminución, exceptuando para p16, de la cual podemos inferir que la infección por VPH en los pacientes del Hospital Clínico de Salamanca es menor que en la literatura anglosajona cuya prevalencia es de un 20% (22,23). En PI3K y KRAS observamos una variación mayor al 50% de expresión. No encontramos ninguna razón concreta por la que esto sea diferente a lo revisado en la literatura actual.

No hemos podido encontrar en la literatura estudios sobre la expresión en carcinoma epidermoide de cabeza y cuello en las proteínas HRAS, ECADH y NESPRIN1.

Analizaremos y discutiremos una por una las asociaciones en la sobreexpresión de las proteínas entre sí en el siguiente apartado.

RESULTADOS DE LAS DIFERENTES PROTEÍNAS ANALIZADAS:

- **Proteína EGFR1:**

En la proteína EGFR1 encontramos una expresión generalizada en todas las estructuras de la célula, siendo esta bastante intensa y frecuente en la mayoría de las biopsias, 90,1% (ilustración 60). Esto entra dentro de lo revisado en la literatura, ya que EGFR1 está presente en más del 90% de los casos de carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (34, 35, 36 48,128).

No hemos encontrado diferencias en la expresión de EGFR1 entre sexos, edad, localización, estadio tumoral, recidiva y hábitos del paciente. Tampoco hemos encontrado diferencias en la expresión proteica de EGFR1 en estos grupos en la literatura revisada.

La activación de EGFR1 en carcinomas de cabeza y cuello viene regulada por la activación de PI3K (34). En nuestro análisis también hemos encontrado una asociación estadísticamente significativa entre ambas proteínas (ilustración 70 y 71). Vemos, por lo tanto, que EGFR1 participa activamente en la vía PI3K, con una expresión muy alta, y, al ser uno de los receptores que inician la vía, entendemos que a partir de él ya se inicia un proceso de estimulación de la vía en general, donde algunas proteínas se verán más afectadas por este evento y otras menos (34, 46, 47).

La sobreexpresión de esta vía y de EGFR1 también está influida por AKT2 (34), pero en nuestra muestra no hemos podido encontrar diferencias significativas en este evento (ilustración 68 y 69). Esto puede deberse a que nuestro anticuerpo es AKTpan (1,2,3) y la interacción de AKT1 y 3 puede sesgarnos este análisis. A su vez EGFR1, se encuentra sobreexpresado en la literatura en el 50% de los casos en los que AKT si lo está (29). En nuestra muestra, cuando AKT está activado, EGFR1 se expresa el 92,2 % de las veces, por lo que no coincide con lo comentado anteriormente.

No hemos encontrado diferencias significativas en la asociación entre EGFR1 y otras proteínas estudiadas.

- **Proteína HER-2:**

En la proteína HER-2 la tinción fue escasa en general 1,4% (ilustración 60), expresándose en la membrana celular. En cabeza y cuello no hay muchos estudios sobre HER-2, pero la expresión suele encontrarse entre el 2 y el 5% de las biopsias de carcinoma escamoso de cabeza y cuello (59).

No hemos encontrado diferencias entre sexos, edad, localización, estadio tumoral, recidiva y hábitos del paciente. Tampoco hemos encontrado diferencias en la expresión proteica de HER2 en estos grupos en la literatura revisada. Hay estudios que indican que las células que sobreexpresan HER-2 parecen mostrar mayor capacidad metastásica (56). En nuestro estudio, los carcinomas HER-2 positivos no han recidivado ni metastatizado.

La escasez de biopsias con expresión positiva de HER-2 hace que no podamos interpretar este resultado.

No hemos encontrado diferencias significativas en la asociación entre HER-2 y otras proteínas estudiadas.

- **Proteína HER-3:**

Nosotros encontramos la expresión en núcleo y citoplasma en un 87,9% (ilustración 60). En el carcinoma de cabeza y cuello la literatura nos reporta un porcentaje de sobreexpresión aproximada al 77% (70), por lo que encontramos una expresión muy similar.

Aunque la literatura indica que HER-3 está estrechamente relacionado con la progresión tumoral, metástasis y resistencia al tratamiento (61). Nosotros no encontramos ninguna asociación de su expresión con el estadio tumoral o la recidiva. Además, no hemos encontrado diferencias entre sexos, edad, localización y hábitos del paciente. Tampoco hemos encontrado diferencias en la expresión proteica de HER-3 en estos grupos en la literatura revisada.

Por otro lado, la literatura apoya la disminución de la actividad de AKT cuando la expresión de HER-3 es bloqueada (61). Nosotros encontramos la misma distribución, en pacientes que disminuye HER-3, produciéndose también un descenso de expresión de AKT que es estadísticamente significativo (ilustraciones 72 y 73).

También encontramos una mayor expresión de PI3K cuando HER-3 está sobreexpresada (asociación casi estadísticamente significativa) (ilustración 74 y 75), lo que apoya que HER-3 es necesario en el mantenimiento de la señalización de PI3K / AKT (61).

No hemos encontrado diferencias significativas en la asociación entre HER-3 y otras proteínas estudiadas.

- **Proteína IGF-R1**

En la proteína IGF -R1, la expresión es de 85,2% (ilustración 60) y está ligada a la membrana celular y al citoplasma. Estos niveles de expresión son algo mayores que los que encontramos en la literatura, que están alrededor del 50% en carcinoma de cabeza y cuello (139,140)

Nuestra expresión es muy similar en todas las localizaciones, aunque algunos estudios indican que los valores de expresión IGF1 en cavidad oral suelen ser más bajos que en el resto de localizaciones (63). Nosotros no encontramos diferencias entre localizaciones. Tampoco hemos encontrado diferencias entre sexos, edad, estadio tumoral, recidiva y hábitos del paciente al igual que tampoco los hemos encontrado en la literatura revisada.

Del mismo modo, los estudios seleccionados nos indican que la señalización de IGF-1R en células de carcinoma escamoso de cabeza y el cuello induce la señalización del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR1) (63). En nuestro estudio estadístico encontramos un aumento de VEGFR1 importante en aquellos casos en los que IGF está más expresado. Esta diferencia de expresión es estadísticamente significativa (ilustración 76 y 77). Esto podría estar relacionado con aquellos casos en los que hay metástasis, o en aquellos en los que el pronóstico es peor. Nosotros no hemos encontrado relación con la evolución.

No hemos encontrado diferencias significativas en la asociación entre VEGFR1 y las demás proteínas estudiadas.

- **Proteína PI3K**

En nuestro estudio podemos encontrar una tinción generalizada de carácter intenso, que se expresa en el núcleo y el citoplasma. Esta se encuentra en casi todos los casos estudiados 96,5% (ilustración 60), sin embargo, en la literatura se encuentra sobreexpresado en el 40% de los tumores de cabeza y cuello (29).

No hemos encontrado diferencias entre sexos, edad, localización, estadio tumoral, recidiva y hábitos del paciente. Nosotros no hemos encontrado diferencias significativas en la evolución de los tumores entre los casos en que no se expresa PI3K y en los que sí. Aun así, tenemos muy pocos casos donde no se exprese PI3K para sacar conclusiones.

Como ya hemos comentado anteriormente, PI3K está asociado a EGFR1 y HER-3. Esto entra dentro de lo esperado ya que la vía se inicia en los receptores y estos afectan directamente a la expresión de PI3K.

En nuestros resultados hemos observado que, cuando PTEN se expresa, se reduce la expresión de PI3K de manera significativa (ilustración 78 y 79). Este resultado está de acuerdo con la literatura científica. PTEN es una proteína supresora de la vía y, cuando esta está sobreexpresada, la expresión de PI3K es inversamente proporcional (87, 89).

Además, en nuestro análisis estadístico encontramos una asociación estadísticamente significativa en la expresión proteica entre FGFR3 y PI3K (ilustración 80 y 81). Las mutaciones de PI3K y FGFR3 generalmente se presentan juntas, y no hay evidencia que sugiera que estas mutaciones tienen un efecto oncogénico aditivo (103). En nuestra muestra también encontramos esta asociación de manera estadísticamente significativa.

No hemos encontrado diferencias significativas en la asociación entre PI3K y las demás proteínas estudiadas.

- **Proteína AKT**

El porcentaje de expresión de AKT la encontramos en el núcleo y citoplasma, obteniendo en nuestra muestra un porcentaje de expresión del 81,6% de los casos de carcinoma escamoso (ilustración 60), lo cual es mayor que la expresión encontrada en la literatura. La sobreexpresión de AKT ha sido hallada en un porcentaje alto de expresión entre el 20 y 60% en los tumores de cabeza y cuello (Amornphimoltham et al., 2004; Pedrero et al., 2005; Mandal et al., 2006; Segrelles et al., 2006). Otros estudios indican expresión en el 81% de los casos (138). AKT 1 y 2 han sido encontrados alterados en tumores de cabeza y cuello, además de en otras localizaciones (29).

No hemos encontrado diferencias entre sexos, edad ni hábitos del paciente. Tampoco hemos encontrado diferencias en la expresión proteica de AKT en estos grupos en la literatura revisada.

Si hemos encontrado diferencias en cuanto a su localización, los estadios tumorales y la recidiva de los carcinomas. AKT ha sido demostrado como un predictor de mala supervivencia asociado a alta recidiva (Massarelli et al., 2005; Yu et al., 2007) (29). En nuestro estudio observamos que, en estadios tempranos I-II, la encontramos significativamente más expresada (91%) que en estadios III y IV (71%) (ilustración 82 y 83), y de la misma manera, encontramos más expresión en pacientes en los que no ha recidivado el tumor (87,3%) que en los que sí ha recidivado (72,1%), estableciéndose diferencias significativas (ilustración 84 y 85). Esto contradice lo antes comentado, que la literatura indica mayor recidiva y peor pronóstico cuanto más expresión hay.

De una manera más particular, en nuestro análisis estadístico podemos observar que, en los pacientes cuyo carcinoma está en estadio local, la expresión de AKT es menor en faringe que en las otras dos localizaciones de manera estadísticamente significativa ilustraciones 86 y 87.

En los pacientes con carcinoma en laringe, la expresión de AKT es menor de manera estadísticamente significativa en estadios avanzados que en locales (ilustraciones 88 y 89).

Además de las asociaciones encontradas con EGFR1 y HER-3, ya descritas en los puntos anteriores, encontramos una fuerte asociación entre AKT y MTOR, siendo este último expresado un 23,1 % cuando AKT no está activo y un 47% cuando AKT se sobreexpresa (ilustraciones 94 y 95). La fosforilación de MTOR ocurre a través de AKT y de la vía MAPK paralelamente, como ya hemos comentado anteriormente (41). Esto verifica el proceso normal, que es el aumento proporcional de MTOR cuando AKT se sobreexpresa.

En nuestros resultados también podemos ver que, cuando PTEN se expresa, se reduce la expresión de AKT de manera significativa (ilustraciones 92 y 93). Este suceso entra dentro de lo que recoge la literatura, al igual que ocurre en PI3K. PTEN es una proteína supresora de la vía y cuando esta está sobreexpresada, la expresión de AKT es inversamente proporcional (10,29,30).

Otra proteína en la que verificamos una asociación significativa con AKT en su expresión proteica (ilustración 90 y 91) es NRAS. Esto contradice lo que la literatura indica a este respecto, ya que NRAS no está asociado según los estudios a AKT. Normalmente la mutación de NRAS no va acompañada de mutaciones en PI3K ni AKT o PTEN, lo que sugiere que la sola mutación de NRAS puede dar lugar a un proceso tumoral por sí misma (106).

No hemos encontrado diferencias significativas en la asociación entre AKT y las demás proteínas estudiadas.

- **Proteína MTOR**

En la proteína MTOR encontramos una tinción generalizada en el citoplasma. Su sobreexpresión es del 43% (ilustración 60). En la literatura encontramos que, en cabeza y cuello, la expresión va desde el 60 al 80%, por lo que en nuestra muestra tenemos una expresión algo más baja (94).

No hemos podido encontrar diferencias entre sexos, edad, localización, estadio tumoral, recidiva y hábitos del paciente en esta proteína. Tampoco hemos encontrado diferencias en la expresión proteica de MTOR en estos grupos en la literatura revisada.

La activación de MTOR no es oncogénica per sé, necesitando un evento oncogénico secundario para inducir la transformación oncogénica (41). Ya hemos comentado en el punto anterior la asociación de la sobreexpresión de AKT con MTOR.

No hemos encontrado diferencias significativas en la asociación entre AKT y las demás proteínas estudiadas.

- **Proteína PTEN**

PTEN se expresa en el citoplasma de las células. En nuestra muestra la expresión es del 43% (ilustración 60), lo cual es similar a la literatura 35-50%) (29,70).

PTEN se encuentra en casi todos los tejidos del cuerpo y actúa como un supresor de tumores, lo que significa que ayuda a regular la división celular, permitiendo que las células crezcan y se dividan rápidamente o de forma incontrolada (87).

No hemos podido encontrar diferencias entre, edad, localización, estadio tumoral, recidiva y hábitos del paciente en esta proteína. Tampoco hemos encontrado diferencias en la expresión proteica de PTEN en estos grupos en la literatura revisada pero sí hemos encontrado diferencias significativas entre el sexo de los pacientes, siendo la expresión de PTEN en mujeres del 61,5% y del 38,8% en hombres. No tenemos explicación de este hecho.

Además de los resultados de asociación de PTEN con PI3K, con AKT 1, 2 y 3 y con MTOR, comentados en los puntos anteriores, no hemos encontrado asociación de PTEN con las demás proteínas estudiadas. A pesar de la relación de PTEN con la supresión de tumores descrita por la literatura, no encontramos diferencias en la recidiva de los tumores, ni en los estadios, lo que nos indica que podría producirse modificaciones en los tumores por otras vías, que empeoren el pronóstico, y en las que PTEN no interviene. Esto concuerda con lo que indica (Furnari et al., 1998) (89), que el incremento de PTEN no se ha acompañado de un aumento de los índices de apoptosis en todos los tipos celulares estudiados.

- **Proteína VEGFR1**

En la proteína VEGFR1 la expresión se produce en el citoplasma y la membrana celular. La expresión es de carácter intenso y en la mayoría de las muestras (70%) (ilustración 60). En la literatura, VEGFR1 se expresa en un porcentaje cercano al 100% en tumores de cabeza y cuello (97).

No hemos encontrado diferencias entre sexos, edad, localización o hábitos del paciente. Tampoco hemos encontrado diferencias en la expresión proteica de VEGFR1 en estos grupos en la literatura revisada. Esta proteína ejerce múltiples efectos dentro del microambiente del tumor, lo que agrava el crecimiento tumoral y la diseminación metastásica, reduciendo la eficacia del tratamiento (129). En el análisis estadístico no hemos encontrado diferencias significativas entre los diferentes estadios tumorales, o en la recidiva tumoral.

Solamente hemos hallado asociación de VEGFR1 con IGF-1R, como se ha explicado anteriormente.

- **Proteína FGFR1**

En la proteína FGFR1 encontramos una mínima expresión citoplasmática en algunas células, estando esta ausente en muchas de las muestras. En la puntuación de tinción de Xiao et al. (2009) (133), encontramos un 0% de expresión (ilustración 60). En la literatura encontramos su expresión en algunos estudios entre el 10 y el 17% en carcinoma de cabeza y cuello (98).

- **Proteína FGFR3**

En la proteína FGFR3 valoramos la expresión en núcleo, citoplasma y membrana. La tinción es bastante generalizada 93% (ilustración 60) y con una intensidad alta en las muestras estudiadas. Esto corrobora lo encontrado en la literatura, que indica sobreexpresión en la mayoría de las biopsias de carcinoma escamoso de cabeza y cuello (98).

No hemos encontrado diferencias entre sexos, edad, localización, estadio tumoral, recidiva y hábitos del paciente. Tampoco hemos encontrado diferencias en la expresión proteica de EGFR1 en estos grupos en la literatura revisada.

Las mutaciones FGFR3 pueden desencadenar la activación de Ras, lo que conduce a una transducción de la señal aguas abajo (103). Además de la asociación de FGFR3 con PI3K comentada en los puntos anteriores, en nuestra muestra hemos encontrado una asociación de FGFR 3 con NRAS (ilustraciones 100 y 101), pero no con KRAS ni HRAS. Esto implica que es un receptor que activa NRAS e inicia la vía tirosinquinasa de esta manera. No hemos encontrado asociación de FGFR3 con las demás proteínas estudiadas.

- **Proteína HRAS**

La proteína HRAS se expresa en el citoplasma. La frecuencia de expresión de esta proteína en nuestra muestra fue de 43,7% (ilustración 60). La mutación de HRAS es frecuente en cáncer de cabeza y cuello, sobre todo en pacientes con antecedentes de consumo de tabaco (126), pero los estudios revisados no indican un porcentaje concreto. HRAS es una proteína que controla la apoptosis celular, por lo que las mutaciones pueden dar lugar a una desprogramación de la muerte celular.

En la expresión de las proteínas según su estadio tumoral observamos diferencias significativas en HRAS (ilustraciones 102 y 103). Este es mayor en el grupo de estadio local, lo cual concuerda con lo anteriormente comentado. En estadios avanzados el control de la apoptosis mediante HRAS está disminuido. Esto implica que HRAS está involucrado en la progresión tumoral y en su pronóstico.

Además, en nuestro estudio estadístico encontramos que, en los pacientes cuyo carcinoma está en estadio local, la expresión de HRAS es menor en faringe que en las otras dos localizaciones (ilustraciones 104 y 105). Sabemos que los carcinomas de faringe se asocian al hábito tabáquico, lo que puede implicar que el proceso de mutación de HRAS en faringe es más temprano que en el resto de localizaciones, donde la mutación se produciría en un estado tumoral más avanzado (14,15,16).

En cuanto al hábito tabáquico, nosotros no hemos encontrado asociación estadísticamente significativa de los pacientes fumadores con una disfunción en la expresión proteica de HRAS, aunque sí hay un descenso importante de su expresión (ilustración 62). Seguramente con una muestra de no fumadores mayor podríamos realizar un mejor análisis estadístico.

No hemos encontrado diferencias entre sexos, edad, y recidiva. Tampoco hemos encontrado diferencias en la expresión proteica de HRAS en estos grupos en la literatura revisada.

- **Proteína NRAS**

En la proteína NRAS encontramos la tinción en núcleo y citoplasma. Se expresa en el 73,9% (ilustración 60) de las células. La literatura nos indica una expresión de 49,6% en cabeza y cuello, aunque solamente hemos encontrado un estudio que podamos comparar y este indica que, cuanto mayor es la progresión del tumor, mayor es su expresión (115). Nosotros no encontramos asociación estadísticamente significativa entre su expresión y

el estadio del tumor o la recidiva. Observamos una distribución similar de la expresión en estos grupos (ilustración 64 y 65).

N-Ras que está involucrada principalmente en la regulación de la división celular (132). Normalmente su mutación no va acompañada de mutaciones en PI3K ni AKT o PTEN, lo que sugiere que la sola mutación de NRAS puede dar lugar a un proceso tumoral por sí misma (106). En esto difieren nuestros resultados, ya que encontramos asociación de la sobreexpresión de PI3K y AKT con NRAS. Nosotros observamos una asociación estadística de la expresión de NRAS con AKT en nuestra muestra (ilustraciones 90 y 91). No hemos encontrado diferencias entre sexos, edad, hábitos perniciosos del paciente, estadio tumoral y primera recidiva en nuestra muestra. Tampoco hemos encontrado diferencias en la expresión proteica de NRAS en estos grupos en la literatura revisada.

- **Proteína KRAS**

En la proteína KRAS la expresión fue escasa 8,5% (ilustración 60), y se expresa en el citoplasma. Según algunos estudios, la expresión de KRAS en carcinoma de cabeza y cuello es de 75% lo que no concuerda con nuestros datos (116).

Ha habido especulaciones de que la detección de la mutación KRAS puede augurar un peor pronóstico. Desafortunadamente, los informes han sido contradictorios sobre el valor pronóstico de las mutaciones KRAS (113). Nosotros no hemos encontrado diferencias entre sexos, edad, en hábito alcohólico, estadio tumoral y primera recidiva en nuestra muestra. Tampoco hemos encontrado diferencias en la expresión proteica de KRAS en estos grupos en la literatura revisada.

En nuestro estudio estadístico no hemos encontrado diferencias significativas de KRAS entre fumadores y no fumadores, pero cabe resaltar que las diferencias encontradas son muy acusadas (ilustración 62). Encontramos KRAS expresado un 0% en no fumadores y un 11,1 % en los fumadores, lo que podría corroborar, si tuviéramos una muestra mayor, lo descrito en la literatura sobre la asociación de la expresión de KRAS en fumadores (126).

- **Proteína BRAF**

En la proteína BRAF valoramos la expresión de manera generalizada, siendo esta muy leve de manera general y ausente en muchas de las muestras. En la puntuación de tinción de Xiao et al 2009 (133), encontramos un 0% de expresión (ilustración 60).

Esto nos impide hacer más análisis de esta proteína.

Ningún trabajo de los que hemos encontrado analiza la expresión de BRAF, y sí sus mutaciones, que en cáncer de cabeza y cuello son cercanas al 3% (118). Parece ser que BRAF no tiene relación con el estadio del tumor, su tamaño, su grado o su nivel de vascularización.

- **Proteína ECADH**

En la proteína E-Cadherina la tinción aparece en la membrana celular en un 85,2% de los casos (ilustración 60). En nuestras muestras la tinción fue bastante extensa e intensa en general. No hemos encontrado el porcentaje de expresión aproximada de esta proteína en la literatura científica revisada.

La E cadherina está asociada con la invasión del cáncer y mal pronóstico en varios carcinomas, incluyendo el carcinoma escamoso de cabeza y cuello. La baja expresión del gen E-cadherina es una característica de la pérdida de adhesión de las células epiteliales, que se ha correlacionado con los cambios fenotípicos de mayor invasividad y motilidad de las células cancerosas. Algunos estudios han demostrado que la alta expresión del gen E-cadherina se asocia con un buen pronóstico en muchos cánceres epiteliales (119).

Los meta-análisis que encontramos en la literatura científica muestran evidencia clara de que la alta expresión de genes E-cadherina es un factor pronóstico positivo de HNSCC y se asocia con mejor supervivencia libre de enfermedad y mejor pronóstico (119). En nuestro estudio, cuando ECADH se expresa, el nivel de recidivas es mucho menor que cuando no se expresa, pero estadísticamente no hemos obtenido diferencias significativas, lo cual puede ser debido a los pocos negativos encontrados en nuestra muestra. En cuanto al estadio tumoral no hemos encontrado diferencias de ningún tipo entre los diferentes grupos.

Nosotros no hemos encontrado diferencias entre sexos, edad, en hábito alcohólico, localización, estadio tumoral y primera recidiva en nuestra muestra. Tampoco hemos encontrado diferencias en la expresión proteica de ECADH en estos grupos en la literatura revisada.

- **Proteína P16**

En la proteína P16 encontramos una expresión nuclear y citoplasmática en el 9,9% de las biopsias (ilustración 60). En la literatura encontramos que en España los casos son inferiores al 20% (22,23).

La expresión de la p16 está altamente correlacionada con el VPH en carcinomas de cabeza y cuello. Sin embargo, esta expresión de la p16 es diferente según las localizaciones de los carcinomas. Así, fue más frecuente en los carcinomas de Orofaringe, 78% (128), que en los de la cavidad oral, laringe e hipofaringe, (123).

En cuanto a la localización, encontramos que los pacientes VPH + son más frecuentes en cavidad oral, seguidos de laringe (ilustración 53).

En resultados globales de expresión proteica, nuestro estudio no nos ofrece ninguna diferencia significativa entre grupos VPH - y VPH+ (ilustración 67). HER-2 presenta las diferencias más grandes entre ambos grupos, siendo menor en pacientes con una baja o nula expresión de P16.

Esto nos lleva a deducir que los pacientes de esta muestra que tienen p16 sobreexpresado y por lo tanto han tenido contacto con el VPH, tienen hábitos de consumo de tabaco y de consumo de alcohol, además de prácticas sexuales de riesgo, por lo que no podemos establecer ningún patrón diferencial entre grupos.

No hemos encontrado diferencias entre sexos, edad, en hábito alcohólico, tabáquico, estadio tumoral y primera recidiva en nuestra muestra. Tampoco hemos encontrado diferencias en la expresión proteica de p16 en estos grupos en la literatura revisada.

- **Proteína p53**

La expresión obtenida es del 57% de los casos (ilustración 60). Esta se expresa en el núcleo de la célula.

Las mutaciones de TP53 aparecen en más del 55% de los carcinomas de cabeza y cuello en estadios avanzados (126), y su expresión es alrededor del 50% (49).

Como indica la literatura científica, los factores de riesgo más importantes para la mutación del gen TP53 son el tabaco y el alcohol. Además de originar el tumor, también puede dar lugar a una mala respuesta al tratamiento (126). Nosotros no hemos encontrado ninguna asociación de la expresión de p53 a los factores de riesgo comentados. Tampoco tenemos ninguna asociación de p53 a las vías RAS o PI3K (ilustración 66), lo cual está descrito en diversos estudios (126). Así también se ha descrito la sobreexpresión de HRAS y KRAS en estos tumores, de los cuales nosotros encontramos valores muy similares en pacientes p53 – y + (ilustración 66).

No hemos encontrado diferencias entre sexos, edad, en hábito alcohólico y tabáquico, estadio tumoral y primera recidiva en nuestra muestra. Tampoco hemos encontrado diferencias en la expresión proteica de p53 en estos grupos en la literatura revisada.

- **Proteína CKIT**

En la proteína CKIT la expresión fue casi nula en la muestra estudiada, y aunque en las que se expresa la intensidad fue grande, esta tinción se dio en porcentajes mínimos, 5-10%. Esto implica que, según la medición de Xiao et al. (2009) (133), todas las tinciones nos dan una expresión negativa 0-1 obteniendo un resultado global del 0%.

Aunque el resultado parece bajo, la literatura científica nos habla de porcentajes de tinción inmunohistoquímica del 5% en carcinomas de cabeza y cuello, por lo que el dato puede ser correcto (62).

Aunque en líneas generales C-KIT no es propiamente de ninguna de las vías estudiadas hasta ahora, encontramos en algunos estudios su relación con PI3K (130). Nosotros no podemos sacar conclusiones con estos resultados.

- **Proteína Nesprin1**

En la proteína Nesprin1 la tinción se expresa en el núcleo en el 13,4% de los casos (ilustración 60). No hemos encontrado resultados sobre el porcentaje de expresión proteica de esta proteína en carcinoma de cabeza y cuello.

Nesprin1 es parte del filamento intermedio citoplásmico. Pierde su expresión en las células tumorales. Los resultados no nos ofrecen ninguna diferencia significativa en cuanto a la expresión proteica de Nesprin1 y el resto de proteínas. Tampoco encontramos ninguna diferenciación en los grupos analizados.

No hemos encontrado diferencias entre sexos, edad, en hábito alcohólico y tabáquico, estadio tumoral y primera recidiva en nuestra muestra. Tampoco hemos encontrado diferencias en la expresión proteica de Nesprin1 en estos grupos en la literatura revisada.

7. CONCLUSIONES

7.1. La distribución por edad, sexo, localización y estadio es similar en nuestro estudio, a lo esperado y habitualmente referida en la literatura.

7.2. En nuestra muestra los factores etiológicos más comunes han sido alcohol y tabaco, pero en un rango inferior a lo habitualmente referido. Posiblemente por las limitaciones que supone al ser datos recogidos exclusivamente de las historias clínicas.

7.3. La infección por VPH en nuestra muestra, tomando como dato subrogado la de p16, está en el rango inferior de lo habitualmente referido y coincide con la menor incidencia de tumores de orofaringe en nuestro estudio.

7.4. En relación al estudio de las alteraciones de la expresión proteica estudiadas, hemos encontrado que:

7.4.1. VEGFR1, NRAS, AKT, IGF-1R, ECADH, HER-3, EGFR1, FGFR3, PI3KINA, tienen unos valores de expresión proteica muy altos ($\geq 66\%$), valores similares a los encontrados en la literatura. A excepción de PI3K, IGF-1R y NRAS, que tienen una expresión más alta, de los rangos habitualmente descritos.

7.4.2. Las proteínas cuyos valores de expresión están en un rango intermedio ($>33\%$ y $<66\%$) se encuentran MTOR, PTEN, HRAS y p53. A excepción de MTOR, que está menos expresada, todas las proteínas tienen valores similares a los rangos comúnmente descritos.

7.4.3. Las proteínas cuyos valores de expresión están en un rango inferior, ($\leq 33\%$), en nuestro estudio son FGFR1, CKIT, BRAF, HERB2, KRAS, P16 y NESPRIN. A excepción de FGFR1 y p16, que están menos expresadas que en la literatura, todas las proteínas tienen valores similares a los reseñados habitualmente.

7.5. Las alteraciones proteicas encontradas no muestran diferencias significativas en relación con la edad, sexo, etiología, localización, estadio y evolución. A excepción de AKT y HRAS que están menos expresadas en tumores localmente avanzados que en estadios tempranos. Así mismo, AKT está menos expresada en tumores que no recidivan, lo cual es contrario a lo habitualmente encontrado en otros estudios. También HRAS está más expresada en tumores avanzados que en tumores en estadio local. Por último, PTEN está más expresado en mujeres que en hombres, de lo que no encontramos referencias en la literatura.

7.6. Las correlaciones entre las diferentes proteínas encontradas en nuestro estudio coinciden con lo habitualmente encontrado en la literatura y se corresponden con sus mecanismos de acción, exceptuando que hay asociación en la expresión proteica entre NRAS con PI3K y AKT, hecho habitualmente no referido. En sentido contrario no hemos encontrado asociación entre EGFR y AKT cuando normalmente se refiere dicha asociación. Tampoco hemos encontrado asociación en la expresión proteica de p53 con KRAS y HRAS.

8.BIBLIOGRAFÍA

1. Sturgis, E. M., Wei, Q. & Spitz, M. R. Descriptive epidemiology and risk factors for head and neck cancer. *Semin. Oncol.* 31, 726-733 (2004).
2. Ganci, F. et al. Molecular Genetics and Biology of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Implications for Diagnosis, Prognosis and Treatment. Dr. Mark Agulnik (Ed.), In Tech, doi: 10.50772/31956 (2012).
3. Cruz Hernández JJ. Cáncer de cabeza y cuello. *Mini manuales prácticos 1.* Oncología. Ed Arán. (2008).
4. Maasland, D. H. E., van den Brandt, P. A., Kremer, B., Goldbohm, R. A. S. & Schouten, L. J. Alcohol consumption, cigarette smoking and the risk of subtypes of head-neck cancer: results from the Netherlands Cohort Study. *BMC Cancer* 14, 187 (2014).
5. Leemans, C. R., Braakhuis, B. J. M. & Brakenhoff, R. H. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat. Rev. Cancer* 11, 9-22 (2011).
6. Torre, L. A. et al. Global Cancer Statistics, 2012. *CA. Cancer J. Clin.* 65, 87-108 (2015).
7. De Angelis, R. et al. The EUROCORE-4 database on cancer survival in Europe: data standardisation, quality control and methods of statistical analysis. *Eur. J. Cancer.* 45, 909-30 (2009).
8. Gatta, G. et al. Prognoses and improvement for head and neck cancers diagnosed in Europe in early 2000s: The EUROCORE-5 population-based study. *Eur. J. Cancer.* 51, 2130-2143 (2015).
9. SEOM. Las cifras del cáncer en España 2017. Accesible en: http://www.seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Las_cifras_del_cancer_en_Esp_2017.pdf
10. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. *ARCI: OMS*; Accesible en: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
11. Curado, M. P. & Hashibe, M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. *Curr. Opin. Oncol.* 21, 194-200 (2009).
12. Toporcov, T. N. et al. Risk factors for head and neck cancer in young adults: a pooled analysis in the INHANCE consortium. *Int. J. Epidemiol.* 44, 169-185 (2015).

13. Gandini, S. et al. Tobacco smoking and cancer: A meta-analysis. *Int. J. Cancer*. **122**, 155-164 (2008).
14. Hashibe, M. et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J. Natl. Cancer Inst.* **99**, 777-89 (2007).
15. Lubin, J. H. et al. Total Exposure and Exposure Rate Effects for Alcohol and Smoking and Risk of Head and Neck Cancer: A Pooled Analysis of Case-Control Studies. *Am. J. Epidemiol.* **170**, 937-947 (2009).
16. Maasland, D. H. et al. Alcohol consumption, cigarette smoking and the risk of subtypes of head-neck cancer: results from the Netherlands Cohort Study. *BMC Cancer*. **14**, 187.
17. Hashibe, M. et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: Pooled analysis in the international head and neck cancer epidemiology consortium. *J. Natl. Cancer Inst.* **99**, 777-789 (2007).
18. Hashibe, M. et al. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the INHANCE consortium. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **18**, 541-550 (2009).
19. Pinzón, C.E. Serrano, M.L. Sanabria, M.C. Papel de la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/AKT) en humanos. *Rev. Cienc. Salud.* **7**, 47-66 (2009).
20. Lee, J.I. et al. Loss of PTEN Expression as a Prognostic Marker for Tongue Cancer. *Arch. Otolaryngol. Head. Neck. Surg.* **127**, 1441-1445 (2001).
21. Heck, J. E. et al. Sexual behaviours and the risk of head and neck cancers: a pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium. *Int. J. Epidemiol.* **39**, 166-81 (2010).
22. Marur, S., D'Souza, G., Westra, W. H. & Forastiere, A. A. HPV-associated head and neck cancer: A virus-related cancer epidemic. *The Lancet Oncology*. **11**, 781-789 (2010).
23. Baboci, L. et al. Low prevalence of HPV-driven head and neck squamous cell carcinoma in North-East Italy. *Papillomavirus Res.* **2**, 133-140 (2016).
24. Niedobitek, G. Epstein-Barr virus infection in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma. *J. Clin. Pathol: Mol Pathol.* **53**: 248-254 (2000).

25. Pearson, G.R. Epstein-Barr virus and nasopharyngeal carcinoma. *J. Cell. Biochem. Suppl.* **17F**:150-4 (1993).
26. Riboli, E. & Norat, T. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *Am. J. Clin. Nutr.* **78**, (2003).
27. Paget-Bailly, S. et al. Occupation and head and neck cancer risk in men: results from the ICARE study, a French population-based case-control study. *J. Occup. Environ. Med.* **55**, 1065-73 (2013).
28. Negri, E. et al. Family history of cancer: Pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology consortium. *Int. J. Cancer* **124**, 394-401 (2009).
29. Moral, M. & Paraminio, J.M. Akt pathway as a target for therapeutic intervention in HNSCC. *Histol. Histopathol.* **23**, 1269-1278 (2008).
30. Kenneth, S.S. Anatomía y fisiología. La unidad entre forma y función. Accesible en: http://accessmedicina.mhmedical.com/data/books/1516/saladin_c05_fig-ch05-14.png
31. Rodríguez Piayaes, J. Atlas de histología online. Accesible en: http://www.educa2.madrid.org/web/argos/inicio/-/book/atlas-de-histologia19?_book_viewer_WAR cms_tools_chapterIndex=745ac0cd-7b78-4f66-a37b-f885a2971e39
32. Hanahan ,D., Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-74 (2011).
33. Gordón-Nuñez, M. A. et al. Clinical and histomorphological analysis of normal oral mucosa, oral inflammatory hyperplasia and oral epithelial displasia. *Int J. Morphol.* **26**, 345-352 (2008).
34. Aaron, R. & Siu, L.L. Epidermal growth factor receptor targeting in head and neck cancer: have we been just skimming the surface? *Journal of clinical oncology* **31**, 1381-1383 (2013).
35. Argiris, A., Karamouzis, M. V, Raben, D. & Ferris, R. L. *Head and neck cancer. Lancet (London, England)* **371**, 1695–709 (2008).
36. Perez-Ordoñez, B., Beauchemin, M. & K Jordan, R. C. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J. Clin. Pathol.* **59**, 445–453 (2006).

37. Martínez, B. Atlas de histopatología Oral – Tejidos blandos. Accesible en:
http://patoral.umayor.cl/patoral/?page_id=1303
38. Chalhoub, N. Baker, S.J. PTEN and the PI3-Kinase pathway in cancer. *Annu. Rev. Pathol.* **4**,127-50 (2009).
39. [Imagen sin título de descripción del trabajo]. Recuperado de:
<https://www.qiagen.com/geneglobe/static/images/Pathways/PI3K%20Signaling.jpg>
40. [Imagen sin título de descripción del trabajo]. Accesible en:
https://www.caymanchem.com/cms/caymanchem/cmsImages/700x578xfigure2_id141.jpg.pagespeed.ic.5YwrwSBvAJ.jpg
41. Machin, R.P, Rodríguez Díaz, Y. Vega Hernández, M.C. La ruta Mtor como diana terapéutica. *Biocáncer* **3**, 1-22 (2006).
42. Gay, B. et al. Selective GRB2 SH2 inhibitors as anti-Ras therapy. *Int. J. Cancer* **83**, 235-41 (1999).
43. [Imagen sin título de descripción del trabajo]. Recuperado de:
<https://www.qiagen.com/geneglobe/static/images/Pathways/Ras%20Pathway.jpg>
44. Nagaria, T.S. et al. Flavopiridol synergizes with sorafenib to induce cytotoxicity and potentiate antitumorigenic activity in EGFR1/HER-2 and mutant RAS/RAF breast cancer model systems. *Neoplasia* **15**, 939-51 (2013).
45. Zhou, Z. & Hick, D.G. HER2 Amplification or Overexpression in Upper GI Tract and Breast Cancer with Clinical Diagnosis and Treatment. *Oncogene and Cancer* (2013).- From Bench to Clinic, Dr. Yahwardiah Siregar (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/53921. Accesible en:
<http://www.intechopen.com/books/oncogene-and-cancer-from-bench-to-clinic/her2-amplification-or-overexpression-in-upper-gi-tract-and-breast-cancer-with-clinical-diagnosis-and>
46. Leslie, K.K. et al. Lapatinib and potential prognostic value of EGFR1 mutations in a gynecologic oncology group phase II trial of persistent or recurrent endometrial cancer. *Gynecol. Oncol.* **127**, 345-50 (2012).
47. Shen, Z.Y et al. miR 375 inhibits the proliferation of gastric cancer cells by repressing ERBB2 expression. *Exp. Ther. Med.***7**, 1757-1761 (2014).
48. Baba, Y. et al. Present and future of EGFR1 inhibitors for head and neck squamous cell cancer. *Journal of Oncology*, 1-9 (2012).

49. Feldman, R. et al. Molecular profiling of head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of the sciences and specialties of the head and neck* **38**, 1625-1638 (2015).
50. Ezra, E.W. et al. Phase II trial of ZD1839 in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Journal of Clinical Oncology* **21**, 1980–1987 (2003).
51. Soulieres, D. et al. Multicenter phase II study of erlotinib, an oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent or metastatic squamous cell cancer of the head and neck. *Journal of Clinical Oncology* **22**, 77–85 (2004).
52. Baselga, J. Trigo, J.M. Bourhis, J. et al. A phase II multicenter study of the anti-epidermal growth factor receptor (EGFR1) monoclonal antibody cetuximab in combination with platinum-based chemotherapy in patients with refractory metastatic and/or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN). *J. Clin. Oncol.* **23**, 5568-77 (2005).
53. Vermorken, J.B. Trigo, J. Hitt, R. et al. Open-label, uncontrolled, multicenter phase II study to evaluate efficacy and toxicity of Cetuximab as a single agent in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck who failed to respond to platinum-based therapy. *J. Clin. Oncol.* **16**, 2171-7 2007.
54. Hitt, R. et al. Phase II study of the combination of cetuximab and weekly paclitaxel in the first-line treatment of patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of head and neck. *Ann. Oncol.* **23**, 1016-1022 (2012).
55. Bonner, M.D. et al. Radiotherapy plus Cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N. Engl. J. Med.* **354**, 567-578 (2006).
56. Gilani, R.A. et al. The importance of HER2 signaling in the tumor-initiating cell population in aromatase inhibitor-resistant breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **135**, 681-92 (2012).
57. Slamon, D.J. et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.* **344**, 783-92 (2001).
58. Piccart-Gebhart, M.J. et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **353**, 1659-72 (2005).

59. Birkeland, A.C. et al. Identification of targetable ERBB2 aberrations in head and neck squamous cell carcinoma. *JAMA. Otolaryngol. Head. Neck. Surg.* **142**, 559-67 (2016).
60. Takikita, M. et al. Membranous expression of Her3 is associated with a decreased survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of Translational Medicine* **9**, 126 (2011).
61. Knights, V. Cook, S.J. De-regulated FGF receptors as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol. Ther.* **125**, 105-17 (2010).
62. Pandiella et al. Neuregulin expression modulates clinical response to trastuzumab in patients with metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **25**, 2656-63 (2007).
63. Friedrich, R.E. Hagel, C. Bartel-Friedrich, S. Insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) in primary and metastatic undifferentiated carcinoma of the head and neck: A possible target of immunotherapy. *Anticancer Research* **30**, 1641-1644 (2010).
64. Sachdev, D. & Yee, D. The IGF system and breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* **8**, 197–209 (2001).
65. Genetics Reference. PIK3CA gene (2017). Accesible en: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PIK3CA>
66. Spoerke et al. Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway alterations are associated with histologic subtypes and are predictive of sensitivity to PI3K inhibitors in lung cancer preclinical models. *Clin. Cancer Res.* **7**, 1-32 (2012).
67. Guha, D. et al. LS-4-P-1597 assembly and molecular architecture of the TSC1-TSC2 complex póster. Accesible en: <http://www.microscopy.cz/html/1597.html>
68. Zhou, J. Parada, L.F. A motor driving PTEN. *Nature Cell Biology* **11**, 1177 – 1179 (2009). Accesible en: http://www.nature.com/ncb/journal/v11/n10/fig_tab/ncb1009-1177_F1.html
69. The cancer genome atlas network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* **517**, 576-582 (2015).
70. Matsuoka, T. Yashiro, M. The role of PI3K/Akt/Mtor signaling in gastric carcinoma. *Cancers* **6**, 1441-1463 (2014).
71. Matsushima-Nishiwaki, R. et al. Direct association of heat shock protein 20 (HSPB6) with phosphoinositide 3-kinase (PI3K) in human hepatocellular

- carcinoma: regulation of the PI3K activity. *Guan X-Y, ed. Plos ONE* **8**, e78440 (2013)
72. Robbins, H.L. & Hague, A. The PI3K/Akt pathway in tumors of endocrine tissues. *Frontiers in Endocrinology* **6**,188 (2015).
 73. Guo, H. et al. The PI3K/AKT pathway and renal cell carcinoma. *Journal of genetics and genomics* **42**, 343-353 (2015).
 74. Zhao, H. et al. Recent advances in the use of PI3K inhibitors for glioblastoma multiforme: current preclinical and clinical development. *Molecular Cancer* **16**, 100 (2017).
 75. Kim, B.R. et al. SOX2 and PI3K cooperate to induce and stabilize a squamous-committed stem cell injury state during lung squamous cell carcinoma pathogenesis. *Eaves CJ, ed. PLoS Biology* **14**, e1002581 (2016).
 76. Moral, M. Paraminio, J.M. Akt pathway as a target for therapeutic intervention in HNSCC. *Histol. Histopathol.* **23**, 1269-1278 (2008).
 77. Genetics Reference. AKT1 gene (2017). Accesible en: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/AKT1>
 78. Genetics Reference. AKT2 gene (2017). Accesible en: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/AKT2>
 79. Genetics Reference. AKT3 gene (2017). Accesible en: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/AKT3>
 80. Li, H. et al. OIP5, a target of miR-15b-5p, regulates hepatocellular carcinoma growth and metastasis through the AKT/mTORC1 and β -catenin signaling pathways. *Oncotarget* **8**, 18129-18144 (2017).
 81. Gu, Y. et al. Rictor/mTORC2 is essential for maintaining a balance between beta-cell proliferation and cell size. *Diabetes* **60**, 827-37 (2011).
 82. Tbatan. File: Akt Phosphorylation Substrates Affecting Apoptosis.png (2015). https://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/b/b0/Akt_Phosphorylation_Substrates_Affecting_Apoptosis.png
 83. Ongkeko et al. Expression of protein tyrosine kinases in head and neck squamous cell carcinomas. *Am. J. Clin. Pathol.* **124**, 71-76 (2005).
 84. Accesible en: <http://www.nature.com/neuro/journal/v16/n11/images/nn.3546-F2.jpg>

85. Bibi, Z. et al. Formal modeling of mTOR associated biological regulatory network reveals novel therapeutic strategy for the treatment of cancer. *Front. Physiol.* **8**, 416 (2017).
86. Clack, C. et al. Teasing out the best molecular marker in the AKT/MTOR pathway in HNSCC patientst. *Laryngoscope* **120**, 1159–1165 (2010).
87. Genetics Reference. PTEN gene (2017). <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PTEN>
88. Molinari, F. & Frattini, M. Functions and regulation of the PTEN gene in colorectal cancer. *Front. Oncol.* **3**, 1-8 (2014).
89. Conley-LaComb, M.K. et al. Pten loss mediated AKT activation promotes prostate tumor growth and metastasis via CXCL12/ CXCR4 signaling. *Molecular cancer* **12**, 1-10 (2013).
90. Dahia, P.L.M. PTEN, a unique tumor suppressor gene. *Endocrine-Related Cancer* **7**, 115–129 (2000).
91. Ashman, L.K. Griffith, R. Therapeutic targeting of c-KIT in cancer. *Expert. Opin. Investig. Drugs* **22**,103-115 (2013).
92. Marinas, A.E. Ciurea, P. Mărgăritescu, C. Cotoi, O.S. Expression of epidermal growth factor (EGF) and its receptors (EGFR1 and EGFR12) in chronic bronchitis. *Rom J Morphol Embryol.* **53**, 957-66 (2012).
93. Thomson Reuters. Development_EPO-induced Jak-STAT pathway. <https://lsresearch.thomsonreuters.com/maps/737/>
94. Rajesh, V. et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptors on tumor cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **129** 882-888 (2003).
95. Monaco, S.E. Rodriguez, E.F. Mahaffey, A.L. Dacic, S. FGFR1 amplification in squamous cell carcinoma of the lung with correlation of primary and metastatic tumor status. *Am. J. Clin. Pathol.* **145** 55-61 (2016).
96. Chang, H. et al. Immunohistochemistry accurately predicts FGFR3 aberrant expression and t(4;14) in multiple myeloma. *Blood* **106**, 353-5 (2005).
97. Chae, Y.K. et al. Fibroblast growth factor receptor (FGFR) as a therapeutic target in lung and head and neck cancer. *The american journal of hematology/oncology* **12**, 13-19 (2016).

98. Koole, K. et al. FGFR1 is a potential prognostic biomarker and therapeutic target in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **1** 3884-93 (2016).
99. Thomson Reuters. Development_FGFR signaling pathway. Accesible en https://lsresearch.thomsonreuters.com/static/maps/444_map.png
100. Acquaviva J et al. FGFR3 translocations in bladder cancer: differential sensitivity to HSP90 inhibition based on drug metabolism. *Mol Cancer Res.* 2014;12(7):1042-54.
101. Ewen, K.A. Expression of FGFR3 during human testis development and in germ cell-derived tumours of young adults. *Int. J. Dev. Biol.* **57**, 141-51 (2013).
102. Images.nature.com. Accesible en: <https://images.nature.com/full/nature-assets/nrurol/journal/v9/n1/images/nrurol.2011.193-f2.jpg>
103. Tomlinson, D.C. Baldo, O. Harnden, P. Knowles, M.A. FGFR3 protein expression and its relationship to mutation status and prognostic variables in bladder cancer. *J. Pathol.* **213**, 91-8 (2007).
104. Takahashi, N. et al. Clinicopathological features and prognostic roles of KRAS, BRAF, PIK3CA and NRAS mutations in advanced gastric cancer. *BMC. Res. Notes* **7**, 271 (2014).
105. Thomson Reuters. Development_FGF-family signaling. Accesible en: https://lsresearch.thomsonreuters.com/static/maps/549_map.png
106. Johnson, D.B. Smalley, K.S.M. Sosman, J.A. Molecular pathways: targeting NRAS in melanoma and acute myelogenous leukemia. *Clin. Cancer Res.* **20** (2014).
107. De Roock, W. et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet oncol.* **11** 753-762 (2010).
108. Hafner, C. Toll, A. Real, F.X. HRAS mutation mosaicism causing urothelial cancer and epidermal nevus. *N. Engl. J. Med.* **365** 1940-2 (2011).
109. Cai, H. et al. Collaboration of Kras and androgen receptor signaling stimulates EZH2 expression and tumor-propagating cells in prostate cancer. *Cancer Res.* **72**, 4672-81 (2012).

110. Li, H. et al. Genomic analysis of head and neck squamous cell carcinoma cell lines and human tumors: a rational approach to preclinical model selection. *Mol. Cancer Res.* **12**(4): 571–82 (2014).
111. McDonald et al. Immunohistochemical expression of N-ras oncogene is a late event in head and neck carcinomas. *Pathol. Oncol. Res.* **2**, 30-33 (1996).
112. Genetics Reference. NRAS gene (2017). Accessible en: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/NRAS>
113. Arrington, A.K. et al. Prognostic and predictive roles of KRAS mutation in colorectal cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 12153-68 (2012).
114. Rajasekharan SK, Raman T. Ras and Ras mutations in cancer. *Cent. Eur. J. Biol.* 2013; 8(7): 609-624.
115. Hoa, M. et al. Amplification of wild-type K-ras promotes growth of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* **62** 7154-6 (2002).
116. Al-Rawi, N. H. Merza, M. S. Ghazi, A. M. PIK3CB and K-ras in oral squamous Cell carcinoma. A possible cross-talk!. *J. Orofac. Sci.* **6**, 99-103 (2014).
117. Ihle et al. Comparison of high resolution melting analysis, pyrosequencing, next generation sequencing and immunohistochemistry to conventional Sanger sequencing for the detection of p.V600E and non-p.V600E BRAF mutations. *BMC Cancer* **14**, 1-13 (2014).
118. Webber, A. Mutations of the BRAF gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oncogene* **22**, 4757–4759 (2003).
119. Ren, X. et al. e-cadherin expression and prognosis of head and neck squamous cell carcinoma: evidence from 19 published investigations. *OncoTargets and Therapy* **9**, 2447–2453 (2016).
120. Tanaka et al. Expression of E-cadherin, a-catenin, and b-catenin in the process of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer* **89**, 557 – 563 (2003).
121. Weinberger, P.M. et al. Prognosis significance of p16 protein levels in oropharyngeal squamous cell cancer. *Clinical Cancer Research.* **10**, 5684-5691 (2004).
122. Salehinejad, J. et al. Immunohistochemical expression of p16 protein in oral squamous cell carcinoma and lichen planus. *Ann. Diagn. Pathol.* **18**, 210-3 (2014)

123. Stephen JK, Divine G, Chen KM, Chitale D, Havard S, Worsham MJ. Significance of p16 in Site-specific HPV Positive and HPV Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Clin. Oncol.* **2**, 51-61 (2013).
124. Bui, T.C. et al. Examining the association between oral health and oral HPV infection. *Cancer. Prev. Res. (Phila)*. **6**, 917-24 (2013).
125. Martín-Hernán, F. et al. Oral cancer, HPV infection and evidence of sexual transmission. *Med. Oral. Patol. Oral. Cir. Bucal* **18**, 439-44 (2013).
126. Rothenberg, S.M. & Ellisen, L.W. The molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *The journal of clinical investigation* **122**, 1951-57 (2012).
127. Denaro, N. et al. The role of p53 and MDM2 in head and neck cancer. *ISRN Otolaryngology* **2011**, 1-8 (2011).
128. Peltonen, J.K. et al. P53 in head and neck cancer: functional consequences and environmental implications of TP53 mutations. *Head & neck oncology* **2**, 1-10 (2010).
129. Rapisarda, A. & Melillo, G. Role of the VEGF/VEGFR1 axis in cancer biology and therapy. *Adv. Cancer. Res.* **114**, 237-67 (2012).
130. Lennartsson, J. & Rönnstrand, L. Stem cell factor receptor/c-kit: from basic science to clinical implications. *Physiol. Rev.* **92**, 1619–1649 (2012).
131. Salehinejad et al. Evaluation of c-kit protein (CD117) expression in common salivary gland neoplasms. *J. Oral Maxillofac. Pathol.* **18**, 177–182 (2014).
132. Sur, I. Neumann, S. Noegel, A. Nesprin-1 role in DNA damage response. *Nucleus* **5**, 173–191 (2014).
133. Xiao, L. et al. The role of mTOR and phospho-p70S6K in pathogenesis and progression of gastric carcinomas: an immunohistochemical study on tissue microarray. *J. Exp. Clin. Cancer. Res.* **28**, 152 (2009).
134. Fatima, N. et al. Automated and manual human papilloma virus in situ hybridization and p16 immunohistochemistry: comparison in metastatic oropharyngeal carcinoma. *Acta Cytol.* **57**, 633–40 (2013).
135. Kawakami, H. et al. Human papillomavirus DNA and p16 expression in Japanese patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer Med.* **2**, 933–41 (2013).
136. Cancer Trends. *Cancers of the head and neck* **24**, 1-8 (2014).

137. Fonseca, E. Factores de riesgo e historia natural del cáncer de cabeza y cuello.
En: *Monografías en Oncología Médica. Cáncer de cabeza y cuello*. Díaz Rubio E. Madrid: You & Us. 3-14 (2005).
138. Forcelledo, M. F. Determinación inmunohistoquímica de CD117/c-kit en el GIST (tumor estromal gastrointestinal). *Oncología*. **27**, 242-245 (2004).
139. Zhi, X. et al. Expression levels of insulin-like growth factor 1 and 2 in head and neck squamous cell carcinoma. *Growth. Horm. IGF. Res.* 24, 137–141 (2014).
140. Kasprzak, A. et al. Differential expression of IGF-1 mRNA isoforms in colorectal carcinoma and normal colon tissue. *Int J Oncol.* 2013 Jan;42(1):305-16.

9.