



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma
de Barcelona

Departamento de Cirugía y Ciencias Morfológicas
Facultad de Medicina

**EVALUACIÓN DE FACTORES MOLECULARES ASOCIADOS A LA RESPUESTA A
CETUXIMAB: INTEGRACIÓN CON TRATAMIENTOS DE RADIOTERAPIA Y
QUIMIOTERAPIA EN CARCINOMA ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO**

Memoria de tesis doctoral presentada por **María Eugenia Semidey Raven** para optar al grado de doctora por la Universidad Autónoma de Barcelona.

Trabajo realizado en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Vall d'Hebron, bajo la dirección del Dr. Santiago Ramón y Cajal Agüeras, la Dra. Margarita Alberola Ferranti y el Dr. Jordi Giralt López de Sagredo.

Barcelona, 2016

Doctoranda María Eugenia Semidey Raven

Director Santiago Ramón y Cajal Agüeras

Codirectora Margarita Alberola Ferranti

Codirector Jordi Giralt López de Sagredo

Barcelona, 2016

El Dr. Santiago Ramón y Cajal Agüeras, catedrático del Departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona y Jefe de Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Vall d'Hebron,

CERTIFICA:

Que Doña **María Eugenia Semidey Raven** ha realizado bajo la dirección de los abajo firmantes el trabajo de investigación correspondiente a la tesis doctoral:

EVALUACIÓN DE FACTORES MOLECULARES ASOCIADOS A LA RESPUESTA A
CETUXIMAB: INTEGRACIÓN CON TRATAMIENTOS DE RADIOTERAPIA Y QUIMIOTERAPIA
EN CARCINOMA ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO

Revisado el presente trabajo, estimo que corresponde fielmente a los resultados obtenidos y quedo conforme con su presentación para ser juzgado por el tribunal que sea designado para su lectura.

Dr. Santiago Ramón y Cajal Agüeras
Barcelona, 2016

Directores de la tesis:

Dr. Santiago Ramón y Cajal Agüeras
Departamento de Anatomía Patológica
H. U, Vall d'Hebron, Barcelona

Dra. Margarita Alberola Ferranti
Departamento de Anatomía Patológica
H. U, Vall d'Hebron, Barcelona

Dr. Jordi Giralt López de Sagredo
Departamento de Radioterapia
H. U, Vall d'Hebron, Barcelona

“Los sueños parecen al principio imposibles, luego improbables y luego, cuando nos comprometemos firmemente, se vuelven inevitables”

M. Gandhi

A Moncho y Nacho que son la alegría de mi vida.

SIGLAS Y ABREVIATURAS

4EBP1	Factor de iniciación de traslación eucariótico proteína ligadora 4E-1
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AJCC	Comité Americano de Cáncer (<i>American Joint Committee on Cancer</i>)
AKT	Proteína quinasa B
AP1	Proteína activadora 1
AREG	Anfiregulina
ARN	Ácido ribonucleico
ATM	Quinasa mutada de ataxia telangiectasia
BD	Bien diferenciado
BER	Reparación por escisión de bases
bFGF	Factor de crecimiento fibroblástico
BTC	Betacelulina
CaMK	Ca ²⁺ /calmodulina dependiente proteína quinasa
CCC	Cáncer de cabeza y cuello
CCCLA	Carcinoma de cabeza y cuello localmente avanzado
COSMIC	Catálogo de mutaciones somáticas en cáncer (<i>Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer</i>)
CREB	Proteína ligadora de c-Fos y cAMP
DAB	Diaminobenzidina tetrahidroclorhídrico
DAG	Diacilglicerol
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EGFRvIII	Receptor del factor de crecimiento epidérmico variante III
eIF4E	Factor de iniciación de traslación eucariótico 4E
ELK1	Proteína contenedora del dominio ETS

EMEA	Agencia Europea de Medicamentos
EPGN	Epígeno
EREG	Epiregulina
ERK	Quinasa reguladora de señal extracelular
FDA	Administración de Alimentos y Drogas (<i>Food and Drug Administration</i>)
HBEGF	EGF-factor de crecimiento-like
HER	Receptor de la proteína tirosina quinasa
H-score	Histo-score
IARC	Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (<i>International Agency for Research on Cancer</i>)
IHQ	Inmunohistoquímica
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
JAK	Janus kinasa
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
MD	Moderadamente diferenciado
MEK	Quinasa de proteína quinasa activada por mitógeno
MMP	Metaloproteinasas
MNK1/2	Proteína quinasa activada por MAP quinasa
MSK1/2	Proteína quinasa activada por estrés
mTOR	Diana mamaria de rapamicina (<i>Mammalian target of rapamycin</i>)
NER	Reparación por escisión de nucleótidos
NNK	Cetona de nitrosamina derivada de Nicotina
PD	Poco diferenciado
PDK	Proteína dependiente de quinasa
PI3K	Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato 3-quinasa
PIK3CA	Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato 3-quinasa subunidad catalítica alfa
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato
PKC	Proteína quinasa

PPARγ	Receptor activador de proliferación de peroxisoma γ
pRb	Gen del retinoblastoma
PTEN	Proteína homóloga de fosfatasa y tensina
QRT	Quimio-radioterapia
QTI	Quimioterapia de inducción
Raptor	Proteína reguladora asociada a mTOR
Rictor	Proteína acompañante de mTOR insensible a rapamicina
RSK	Proteína p90 ribosomal S6 quinasa
Ser	Serina
SG	Supervivencia global
SLE	Supervivencia libre de enfermedad
STAT	Señal de transducción y activador de transcripción 1 y 3
TGF-alfa	Factor de crecimiento tumoral-alfa
Thr	Treonina
TNM	Sistema de estadificación tumoral Tumor, Ganglios y Metástasis
Tyr	Tirosina
UICC	Unión Internacional de Control de Cáncer (<i>Union for International Cancer Control</i>)
VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular
VPH	Virus del Papiloma Humano

ÍNDICE

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	25
1. Anatomía de la región de la cabeza y el cuello.....	27
2. Epidemiología.....	27
3. Carcinoma de cabeza y cuello.....	31
3.1. Tipos histológicos	31
3.2. Grados de diferenciación histológica.....	31
3.3. Expresión inmunohistoquímica.....	33
3.4. Clasificación del cáncer de cabeza y cuello: sistema de estadificación tumor, ganglios y metástasis (TNM).....	33
4. Factores de riesgo.....	37
4.1. Tabaco y Alcohol.....	37
4.2. Virus del Papiloma Humano (VPH).....	38
4.2.a. Proteína p16.....	40
4.3. Factores menores.....	40
5. Factores pronósticos.....	40
6. Vías de carcinogénesis.....	42
6.1. Vía de PI3K / AKT / mTOR	44
6.1.a. PI3K.....	44
6.1.b. PTEN.....	45
6.1.c. AKT.....	46
6.1.d. mTOR.....	47
6.1.e. 4EBP1.....	47

6.1.f. eIF4E.....	48
6.1.g. S6.....	48
6.2. Vía de RAS / RAF / MAPK	49
6.2.a. RAS.....	49
6.2.b. RAF.....	50
6.2.c. MAPK.....	51
6.3. Vía de JAK / STAT	52
6.3.a. JAK.....	52
6.3.b. STAT.....	52
6.4. Vía NOTCH1.....	53
6.5. Factor supresor p53.....	54
7. Tratamiento.....	55
7.1. Revisión histórica.....	55
7.2. Concepto de tumores resecables e irresecables.....	55
7.2.a. Tumores resecables.....	56
7.2.b. Tumores irresecables.....	56
7.3 Nuevas dianas terapéuticas.....	57
7.3.a. EGFR vIII.....	60
II. JUSTIFICACIÓN.....	61
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	65
Hipótesis.....	67
Objetivo Principal.....	69
Objetivos Específicos.....	69
IV. METODOLOGÍA.....	71
1. Población de estudio. Criterios de Inclusión.....	73
2. Variables clínicas y anatomopatológicas.....	73
3. Selección de material histológico.....	74
4. Estudio inmunohistoquímico.....	75
4.1. Valoración de las técnicas de Inmunohistoquímica.....	76
5. Estudio Molecular.....	77

5.1. Extracción y cuantificación del ADN	77
5.2. Detección de mutaciones de H-RAS, K-RAS, B-RAF y PI3K	79
5.3. Estudio de secuencias del Virus del Papiloma Humano	80
6. Análisis estadístico.....	81
V. RESULTADOS.....	83
1. Parámetros clínicopatológicos.....	85
1.1. Parámetros generales.....	85
1.2. Clasificación TNM.....	88
1.3. Factores de riesgo.....	90
1.4. Tratamiento recibido.....	92
1.5. Supervivencia global y libre de enfermedad.....	93
2. Estudio de vías de carcinogénesis.....	94
2.1. Vía de PI3K/AKT/mTOR	94
2.1.1. Estudio inmunohistoquímico.....	94
a. mTOR	94
b. pmTOR	97
c. 4EBP1.....	100
d. p4EBP1.....	103
e. eIF4E.....	106
f. pEIF4E.....	109
g. pS6.....	112
h. PTEN.....	115
i. HER3.....	117
2.1.2. Correlación de las formas fosforiladas.....	120
2.1.3. Estudio molecular (PIK3CA).....	121
2.2. Vía de RAF/RAS/MAPK.....	121
2.2.1. Estudio inmunohistoquímico.....	121
a. pMAPK.....	121
2.2.2. Estudio molecular.....	124

a. BRAF.....	124
b. KRAS.....	125
c. HRAS.....	125
2.3. Índice de proliferación tumoral (Ki67).....	125
2.4. Factor de supresión tumoral (p53).....	128
2.5. Asociación entre las variables clínicopatológicas y la expresión de proteínas estudiadas.....	130
3. Estudio de la infección por VPH y p16.....	131
3.1. Factor de supresión tumoral (p16). Estudio inmunohistoquímico.....	131
3.2. Determinación de la presencia de infección por VPH.....	134
3.3. Correlación VPH/p16.....	134
3.4. Correlación p16/p53.....	135
4. Estudio multivariante.....	135
4.1. Supervivencia libre de enfermedad.....	136
4.2. Supervivencia global.....	137
VI. DISCUSIÓN.....	139
1. Estudio de las variables clínicopatológicas como factores pronóstico en CCC.....	141
2. Estudio de la expresión de las proteínas de la vía PI3K/AKT/mTOR como factores pronósticos clínico-patológicos y de resistencia a Cetuximab.....	142
3. Estudio de la expresión de las proteínas de la vía RAF/RAS/MAPK como factores pronósticos clínico-patológicos y de resistencia a Cetuximab.....	148
4. CCC y VPH. Papel del factor de supresión tumoral p16.....	151
VII. CONCLUSIONES.....	155
VIII. AGRADECIMIENTOS.....	159
IX. REFERENCIAS.....	163

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia y mortalidad del CCC a nivel mundial para todas las edades. Año 2012. Proporciones por 100.000, [pág. 30](#)

Figura 2. Incidencia y mortalidad del CCC en Europa para todas las edades. Año 2012. Proporciones por 100.000, [pág. 31](#)

Figura 3. Frecuencia de CCC según comunidades en España para ambos sexos. Año 2011, [pág.32](#)

Figura 4. Presentación histológica del carcinoma escamoso, [pág. 34](#)

Figura 5. Mecanismo de acción de VPH, [pág. 41](#)

Figura 6. Representación de vías de carcinogénesis comunes en CCC dependientes de EGFR, [pág. 45](#)

Figura 7. Acción y efecto de Cetuximab y RT–QT en el proceso de carcinogénesis, [pág. 60](#)

Figura 8. Distribución de casos según la edad (años) y el sexo de los pacientes, [pág. 85](#)

Figura 9. Distribución de casos según la localización tumoral, [pág. 85](#)

Figura 10. Distribución de casos según la diferenciación histológica, [pág. 86](#)

Figura 11. Distribución de casos según el estadio tumoral (Sistema de Clasificación TNM de la OMS, 2010), [pág. 88](#)

Figura 12. Distribución de casos según estadio T y N del Sistema de Clasificación TNM de la OMS (2010), [pág. 89](#)

Figura 13. Mediana de supervivencia libre de enfermedad. Análisis de Kaplan Meier de acuerdo a la presencia/ausencia de metástasis ganglionares, [pág. 89](#)

Figura 14. Mediana de supervivencia global. Análisis de Kaplan Meier ajustado de acuerdo a la presencia/ausencia de metástasis ganglionares, [pág. 90](#)

Figura 15. Proporción de pacientes con CCC y consumo de tabaco y alcohol, [pág. 90](#)

Figura 16. Mediana de supervivencia libre de enfermedad. Análisis de Kaplan Meier de acuerdo al consumo tabáquico, [pág. 91](#)

Figura 17. Mediana de supervivencia global. Análisis de Kaplan Meier ajustado de acuerdo al consumo tabáquico, [pág. 91](#)

Figura 18. Mediana de supervivencia libre de enfermedad. Análisis de Kaplan Meier de acuerdo al consumo alcohólico, [pág. 92](#)

Figura 19. Mediana de supervivencia global. Análisis de Kaplan Meier ajustado de acuerdo al consumo alcohólico, [pág. 92](#)

Figura 20. Mediana de supervivencia libre de enfermedad. Análisis de Kaplan Meier, [pág. 93](#)

Figura 21. Mediana de supervivencia global. Análisis de Kaplan Meier, [pág. 94](#)

- Figura 22.** Expresión inmunohistoquímica de mTOR sobre tejido parafinado. 20X, [pág. 95](#)
- Figura 23.** Mediana de supervivencia libre de enfermedad. Análisis de Kaplan Meier de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de mTOR, [pág. 96](#)
- Figura 24.** Mediana de supervivencia global. Análisis de Kaplan Meier de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de mTOR, [pág. 96](#)
- Figura 25.** Riesgo de recidiva o muerte de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de mTOR y al tratamiento recibido, [pág. 97](#)
- Figura 26.** Expresión inmunohistoquímica de pmTOR sobre tejido parafinado. 20X y 40X, [pág. 97](#)
- Figura 27.** Mediana de supervivencia libre de enfermedad. Análisis de Kaplan Meier de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de pmTOR, [pág. 99](#)
- Figura 28.** Mediana de supervivencia global. Análisis de Kaplan Meier de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de pmTOR, [pág. 99](#)
- Figura 29.** Riesgo de recidiva o muerte de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de pmTOR y al tratamiento recibido, [pág. 100](#)
- Figura 30.** Expresión inmunohistoquímica de 4EBP1 sobre tejido parafinado. 20X y 10X, [pág. 101](#)
- Figura 31.** Mediana de supervivencia libre de enfermedad. Análisis de Kaplan Meier de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de 4EBP1, [pág. 102](#)
- Figura 32.** Mediana de supervivencia global. Análisis de Kaplan Meier de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de 4EBP1, [pág. 102](#)
- Figura 33.** Riesgo de recidiva o muerte de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de 4EBP1 y al tratamiento recibido, [pág. 103](#)
- Figura 34.** Expresión inmunohistoquímica de p4EBP1 sobre tejido parafinado. 10X, [pág. 103](#)
- Figura 35.** Mediana de supervivencia libre de enfermedad. Análisis de Kaplan Meier de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de p4EBP1, [pág. 105](#)
- Figura 36.** Mediana de supervivencia global. Análisis de Kaplan Meier de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de p4EBP1, [pág. 105](#)
- Figura 37.** Riesgo de recidiva o muerte de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de p4EBP1 y al tratamiento recibido, [pág. 106](#)
- Figura 38.** Expresión inmunohistoquímica de eIF4E sobre tejido parafinado. 20X, [pág. 106](#)
- Figura 39.** Mediana de supervivencia libre de enfermedad. Análisis de Kaplan Meier de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de eIF4E, [pág. 108](#)
- Figura 40.** Mediana de supervivencia global. Análisis de Kaplan Meier de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de eIF4E, [pág. 108](#)
- Figura 41.** Riesgo de recidiva o muerte de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de eIF4E y al tratamiento recibido, [pág. 109](#)

- Figura 42.** Expresión inmunohistoquímica de pelf4E sobre tejido parafinado. 10X, [pág. 110](#)
- Figura 43.** Mediana de supervivencia libre de enfermedad. Análisis de Kaplan Meier de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de pelf4E, [pág. 111](#)
- Figura 44.** Mediana de supervivencia global. Análisis de Kaplan Meier de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de pelf4E, [pág. 111](#)
- Figura 45.** Riesgo de recidiva o muerte de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de pelf4E y al tratamiento recibido, [pág. 112](#)
- Figura 46.** Expresión inmunohistoquímica de pS6 sobre tejido parafinado. 10X, [pág. 112](#)
- Figura 47.** Mediana de supervivencia libre de enfermedad. Análisis de Kaplan Meier de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de pS6, [pág. 113](#)
- Figura 48.** Mediana de supervivencia global. Análisis de Kaplan Meier de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de pS6, [pág. 114](#)
- Figura 49.** Riesgo de recidiva o muerte de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de pS6 y al tratamiento recibido, [pág. 114](#)
- Figura 50.** Expresión inmunohistoquímica de PTEN sobre tejido parafinado. 20X y 40X, [pág. 115](#)
- Figura 51.** Mediana de supervivencia libre de enfermedad. Análisis de Kaplan Meier de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de PTEN, [pág. 116](#)
- Figura 52.** Mediana de supervivencia global. Análisis de Kaplan Meier de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de PTEN, [pág. 116](#)
- Figura 53.** Riesgo de recidiva o muerte de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de PTEN y al tratamiento recibido, [pág. 117](#)
- Figura 54.** Expresión inmunohistoquímica de HER3 sobre tejido parafinado. 40X, [pág. 118](#)
- Figura 55.** Mediana de supervivencia libre de enfermedad. Análisis de Kaplan Meier de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de HER3, [pág. 119](#)
- Figura 56.** Mediana de supervivencia global. Análisis de Kaplan Meier de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de HER3, [pág. 119](#)
- Figura 57.** Riesgo de recidiva o muerte de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de HER3 y al tratamiento recibido, [pág. 120](#)
- Figura 58.** Expresión inmunohistoquímica de pMAPK sobre tejido parafinado. 4X y 10X, [pág. 122](#)
- Figura 59.** Mediana de supervivencia libre de enfermedad. Análisis de Kaplan Meier de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de pMAPK, [pág. 123](#)
- Figura 60.** Mediana de supervivencia global. Análisis de Kaplan Meier de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de pMAPK, [pág. 123](#)
- Figura 61.** Riesgo de recidiva o muerte de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de pMAPK y al tratamiento recibido, [pág. 124](#)

- Figura 62.** Expresión inmunohistoquímica de Ki67 sobre tejido parafinado. 20X, [pág. 125](#)
- Figura 63.** Mediana de supervivencia libre de enfermedad. Análisis de Kaplan Meier de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de Ki67, [pág. 126](#)
- Figura 64.** Mediana de supervivencia global. Análisis de Kaplan Meier de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de Ki67, [pág. 127](#)
- Figura 65.** Riesgo de recidiva o muerte de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de Ki67 y al tratamiento recibido, [pág. 127](#)
- Figura 66.** Expresión inmunohistoquímica de p53 sobre tejido parafinado. 10X, [pág. 128](#)
- Figura 67.** Mediana de supervivencia libre de enfermedad. Análisis de Kaplan Meier de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de p53, [pág. 129](#)
- Figura 68.** Mediana de supervivencia global. Análisis de Kaplan Meier de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de p53, [pág. 129](#)
- Figura 69.** Riesgo de recidiva o muerte de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de p53 y al tratamiento recibido, [pág. 130](#)
- Figura 70.** Expresión inmunohistoquímica de p16 sobre tejido parafinado. 4X, [pág. 132](#)
- Figura 71.** Mediana de supervivencia libre de enfermedad. Análisis de Kaplan Meier de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de p16, [pág. 133](#)
- Figura 72.** Mediana de supervivencia global. Análisis de Kaplan Meier de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de p16, [pág. 134](#)

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estadificación T en tumores de Cavidad Oral, Orofaringe e Hipofaringe (7ª Edición, 2010), [pág. 36](#)

Tabla 2. Estadificación T en tumores de Laringe (7ª Edición, 2010), [pág. 37](#)

Tabla 3. Estadificación N en tumores de Cabeza y Cuello (7ª Edición, 2010), [pág. 37](#)

Tabla 4. Estadificación M en tumores de Cabeza y Cuello (7ª Edición, 2010), [pág. 38](#)

Tabla 5. Estadificación de tumores de Cabeza y Cuello según clasificación TNM (7ª Edición, 2010), [pág. 38](#)

Tabla 6. Características de los anticuerpos de proteínas utilizados, [pág. 76](#)

Tabla 7. Características demográficas basales (n=90)^a, [pág. 87](#)

Tabla 8. Supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de mTOR, [pág. 95](#)

Tabla 9. Supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de pmTOR, [pág. 98](#)

Tabla 10. Supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de 4EBP1, [pág. 101](#)

Tabla 11. Supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de p4EBP1, [pág. 104](#)

Tabla 12. Supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de eIF4E, [pág. 107](#)

Tabla 13. Supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de pEIF4E, [pág. 110](#)

Tabla 14. Supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de pS6, [pág. 113](#)

Tabla 15. Supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de PTEN, [pág. 115](#)

Tabla 16. Supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de HER3, [pág. 118](#)

Tabla 17. Correlación de las formas fosforiladas de las proteínas estudiadas de la vía PI3K/AKT/mTOR, [pág. 121](#)

Tabla 18. Supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de pMAPK, [pág. 122](#)

Tabla 19. Supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de Ki67, [pág. 126](#)

Tabla 20. Supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de p53, [pág. 128](#)

Tabla 21. Correlación entre variables clínicas y proteínas estudiadas, [pág. 131](#)

Tabla 22. Supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de p16, [pág. 132](#)

Tabla 23. Correlación entre la expresión inmunohistoquímica de p16 y la presencia de VPH determinado por PCR, [pág. 135](#)

Tabla 24. Análisis multivariante de supervivencia libre de enfermedad, [pág. 136](#)

Tabla 25. Análisis multivariante de supervivencia global, [pág. 137](#)

Tabla 26. Resumen de análisis de supervivencia (Cox y KM) incluyendo todas las proteínas estudiadas, [pág. 138](#)

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. ANATOMÍA DE LA REGIÓN DE LA CABEZA Y EL CUELLO

La región topográfica de la cabeza y el cuello comprende una variedad de estructuras anatómicas situadas por encima de la línea supraclavicular. La patología tumoral de la zona excluye a la piel, glándula tiroides, glándula paratiroides y al sistema nervioso central por pertenecer a otras regiones anatómicas con distinto manejo terapéutico. De esta manera, se engloban dentro de la patología tumoral de la región de cabeza y cuello a los senos paranasales, nasofaringe, orofaringe (amígdalas, paladar blando, base de la lengua), hipofaringe, laringe, cavidad oral (mucosa oral, encía, paladar duro, lengua y suelo de la boca) y glándulas salivales¹.

2. EPIDEMIOLOGÍA

Los últimos datos reportados por la Organización Mundial de la Salud y la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC), revelan una incidencia de cáncer mundial de 14,1 millones de casos nuevos en el año 2012, con una mortalidad de 8,2 millones de personas y una prevalencia de 32,6 millones de casos a 5 años del diagnóstico² (*figura 1*).

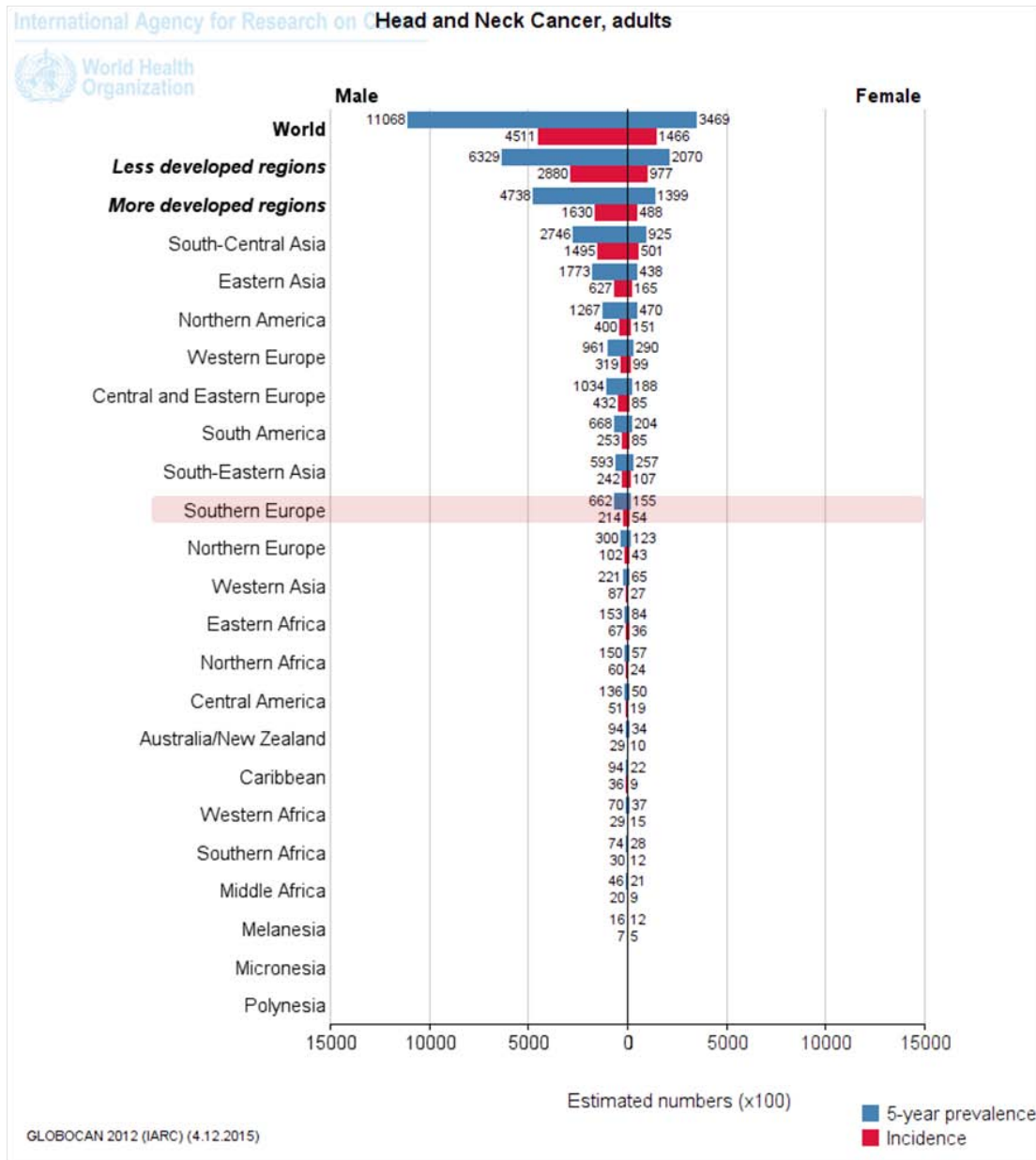
En España, para el año 2012, se observó una incidencia de 215.534 casos nuevos de cáncer, con una tasa de 249/100.000 habitantes, de los cuales 4,3% (9160 casos) eran de cabeza y cuello (*figura 2*).

Comparativamente al resto de órganos, el cáncer de cabeza y cuello (CCC) presenta una baja incidencia y prevalencia si es considerado separadamente por las localizaciones descritas previamente. Sin embargo, al agrupar dichas localizaciones, alcanza la sexta posición en incidencia nacional (4,3%), por detrás del cáncer colorrectal (15,0%), prostático (12,9%), pulmonar (12,4%), mamario (11,7%) y vesical (6,4%).

La mortalidad alcanza el 37,0% (3.391 casos), siendo la comunidad de Cataluña la

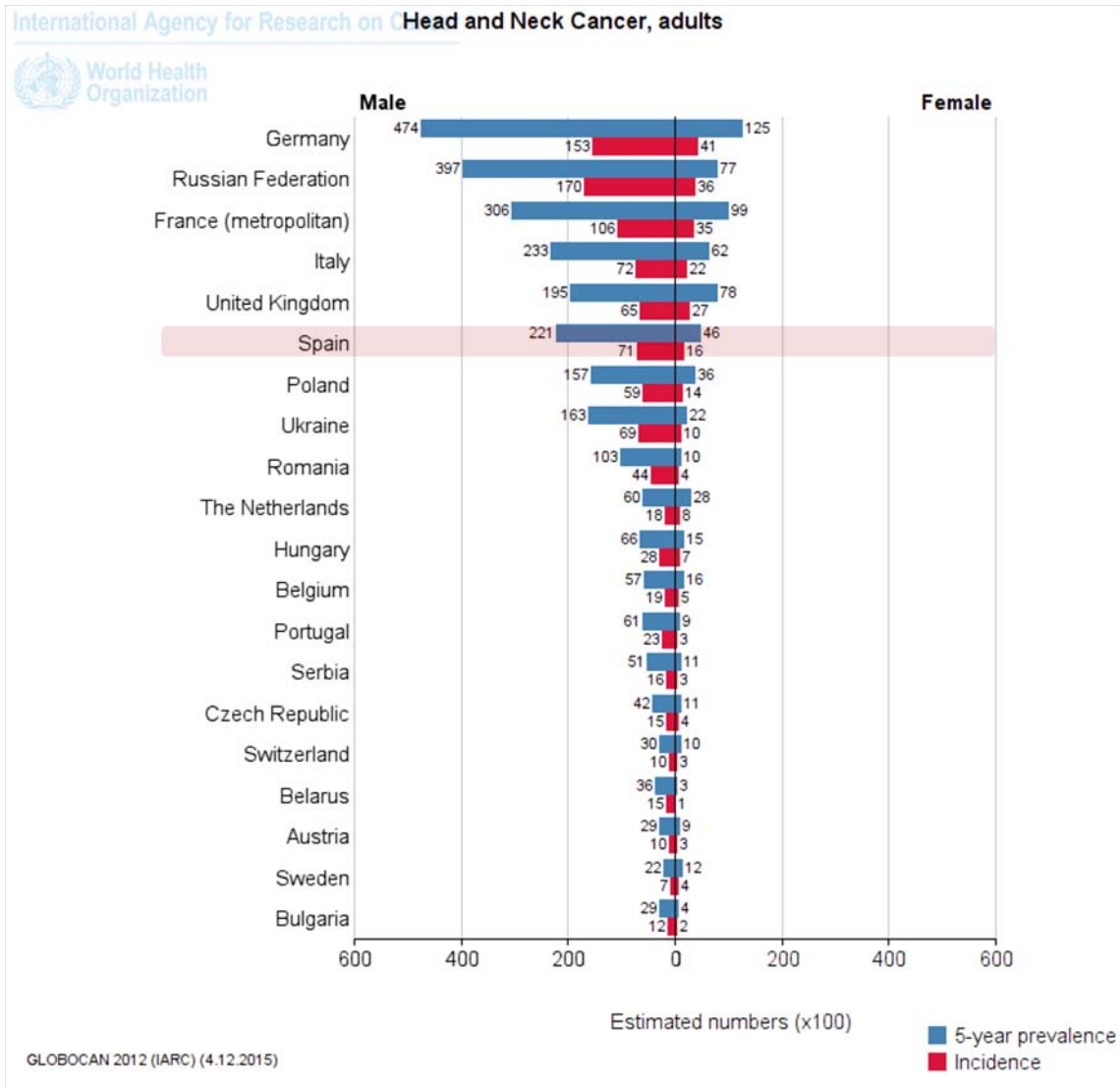
segunda comunidad con más mortalidad (542 casos) sólo superada por Andalucía (608 casos) para el año 2012³ (figura 3).

Figura 1. Incidencia y mortalidad del CCC a nivel mundial para todas las edades. Año 2012. Proporciones por 100.000 habitantes.



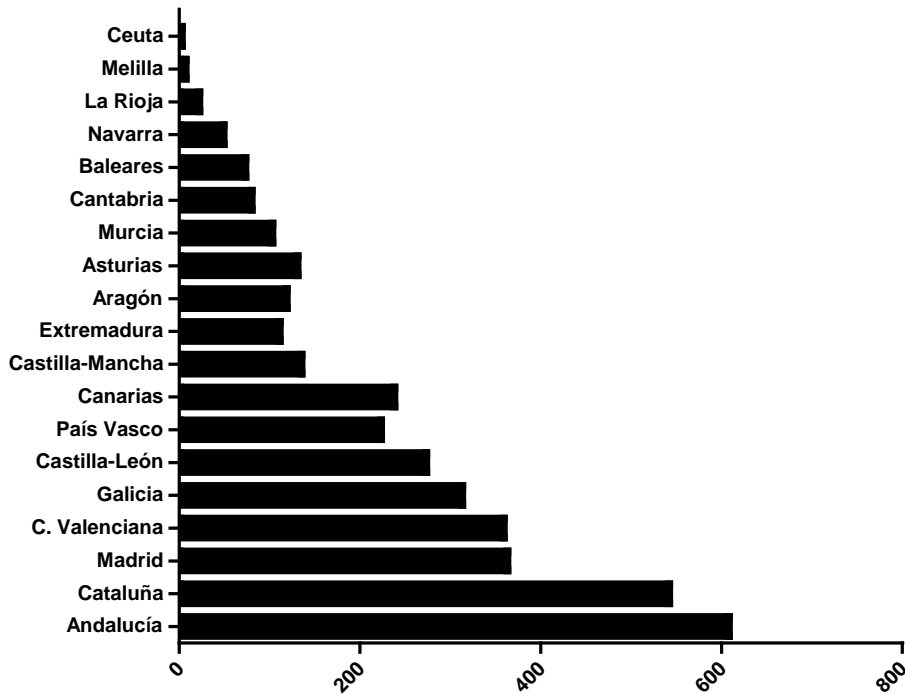
Fuente: Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC

Figura 2. Incidencia y mortalidad del CCC en Europa para todas las edades. Año 2012. Proporciones por 100.000 habitantes.



Fuente: Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC

Figura 3. Frecuencia de CCC según comunidades en España para ambos sexos. Año 2011.



Fuente: Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III. Mortalidad por CCC. Disponible en <http://cne.isciii.es/morta/fTip.php>

La localización más frecuente del CCC es la laringe, seguido de la orofaringe, cavidad oral y nasofaringe y se presenta con mayor tendencia en el género masculino con una relación de 2:1 a 4:1^{4,5,6}. Sin embargo, dicha tendencia se ha modificado en los últimos tiempos, secundario al aumento de factores de riesgo en las mujeres y a la asociación con el virus del papilomavirus. De igual manera, clásicamente ha sido considerado un tumor cuya presentación ocurre generalmente en individuos >50 años, pero con los cambios en el estilo de vida y factores de riesgo, se ha observado un descenso en las edades de presentación^{1,7,8}.

3. CARCINOMA DE CABEZA Y CUELLO

3.1. TIPOS HISTOLÓGICOS

Los tumores de cabeza y cuello son clasificados histológicamente, al igual que en el resto de órganos, de acuerdo al tipo celular afectado. De esta manera, se observa que la mayor frecuencia de tumores son de etiología epitelial (>90%), siendo una minoría los tumores mesenquimales o de estirpe hematolinfoide⁴.

El carcinoma escamoso es el tipo histológico más frecuente, constituyendo prácticamente el 100% de los tumores epiteliales de cabeza y cuello. Este tumor se origina en el revestimiento epitelial escamoso de la mucosa y sobre la metaplasia escamosa del epitelio respiratorio de la zona. Puede ser catalogado según sus variantes histológicas en carcinoma escamoso de tipo verrucoso, basaloide, papilar, fusocelular, acantolítico o adenoescamoso⁴.

3.2. GRADOS DE DIFERENCIACIÓN HISTOLÓGICA

El carcinoma escamoso es tradicionalmente clasificado según el grado de diferenciación histológica en bien diferenciado, moderadamente diferenciado y poco diferenciado. Los tumores bien diferenciados presentan cierto grado de atipia citológica y escasas figuras mitóticas con abundante queratinización, siendo los más similares al epitelio normal. Los tumores moderadamente diferenciados presentan mayor pleomorfismo nuclear y actividad mitótica, incluyendo figuras mitóticas atípicas y menor queratinización que los carcinomas bien diferenciados. Por el contrario, en los carcinomas escamosos poco diferenciados predominan las células escamosas inmaduras con numerosas figuras mitóticas típicas y atípicas con un mínimo componente de queratinización (*figura 4*). La mayoría de los carcinomas escamosos de cabeza y cuello son clasificados como moderadamente diferenciados, por lo que el valor pronóstico del grado de diferenciación tumoral es limitado en comparación al nivel y patrón de invasión tumoral⁴.

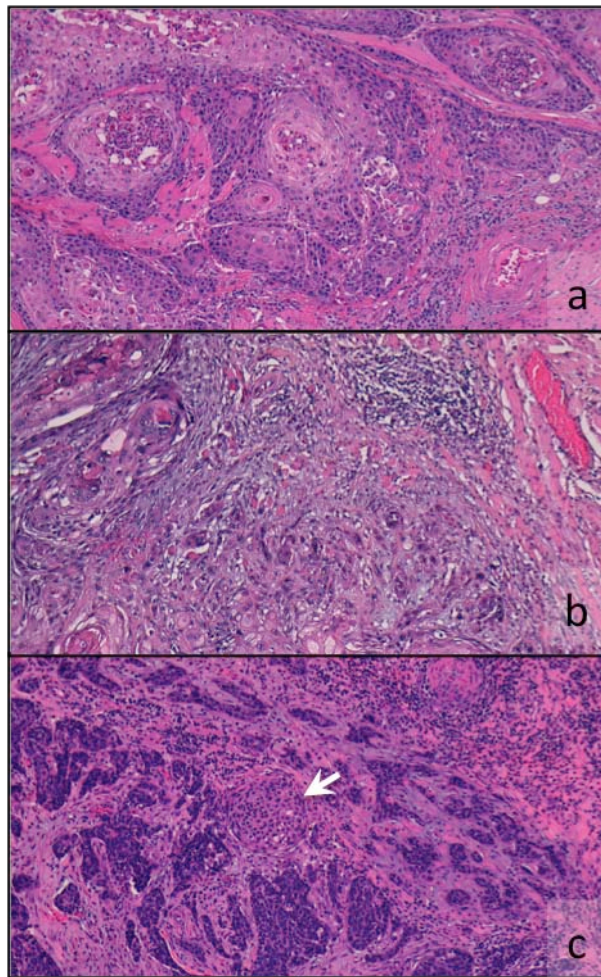


Figura 4. Presentación histológica del carcinoma escamoso bien diferenciado (a), moderadamente diferenciado (b) y poco diferenciado (c). Nótese en el centro de la imagen (c) un foco de invasión perineural (flecha). Tinción de Hematoxilina y Eosina.

La invasión tumoral se manifiesta como una ruptura de la membrana basal por las células y nidos tumorales con la consiguiente invasión del tejido subyacente. Generalmente se acompaña de una reacción estromal tumoral (desmoplasia), que no es más que una proliferación fibroblástica periférica a la noxa tumoral. La presencia de invasión perineural y/o invasión vascular angiolinfática son consideradas características adicionales de malignidad (*figura 4c*).

El frente de invasión puede ser de tipo expansivo y de tipo infiltrativo. En la invasión de tipo expansivo, los nidos tumorales son de base ancha, bien delimitados y empujan al tejido subyacente, rompiendo la membrana basal traspasando a otras capas. La invasión de tipo infiltrativo se caracteriza por la presencia de nidos tumorales

pequeños, cordones y células tumorales dispersas, cuyos márgenes se encuentran mal definidos, logrando traspasar la membrana basal y diseminarse en el tejido subyacente. Generalmente, el patrón de invasión de tipo infiltrativo está asociado a mayor desmoplasia estromal y a mayor agresividad tumoral. Pueden verse patrones de invasión mixtos en el mismo tumor⁴.

3.3. EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA

El carcinoma escamoso, al ser una tumoración de estirpe epitelial, tiene una expresión de citoqueratinas por inmunohistoquímica que varía de acuerdo al grado de diferenciación histológica y puede cambiar durante el proceso de dediferenciación. Por esto, los tumores bien diferenciados expresan citoqueratinas de medio y alto peso molecular pero no de bajo peso molecular, situación similar al epitelio normal. Por el contrario, los tumores poco diferenciados pierden la expresión de citoqueratinas de medio y alto peso molecular, siendo positivos para las de bajo peso molecular, pudiendo a su vez expresar vimentina⁴.

3.4. CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO: SISTEMA DE ESTADIFICACIÓN TUMOR, GANGLIOS LINFÁTICOS Y METÁSTASIS (TNM)

Uno de los mayores inconvenientes a la hora de clasificar y estadificar los tumores de cabeza y cuello es que, al incluir una variedad heterogénea de localizaciones anatómicamente pequeñas y con relaciones topográficas distintas, se han creado sistemas de clasificación para cada localización sin lograr un sistema único que las agrupe a todas. Por esta razón, expondremos el sistema de clasificación TNM para cada una de las localizaciones de estudio (*tablas 1-5*), aunque se excluyen las clasificaciones correspondientes a los senos paranasales, nasofaringe y glándulas salivales por no formar parte de nuestro foco principal de estudio.

Tabla 1. Estadificación T en tumores de Cavidad Oral, Orofaringe e Hipofaringe (7ª Edición, 2010)

T	Cavidad Oral	Orofaringe	Hipofaringe	
Tx	Tumor primario no puede ser precisado			
T0	Sin evidencia de tumor primario			
Tis	Carcinoma in situ			
T1	Tumor <2cm de diámetro máximo			
T2	>2 cm y <4cm de diámetro máximo			
T3	>4cm de diámetro máximo			
T4	T4a	(Labio) Invasión de hueso cortical, nervio alveolar inferior, suelo de la boca o piel (nariz o barbilla) (Cavidad oral) Invasión de hueso cortical, lengua, seno maxilar o piel facial	Invasión de laringe, lengua, pterigoides medial, paladar duro o mandíbula	Invasión de cartílago cricoides/tiroides, hueso hioides, tiroides, esófago, partes blandas (compartimiento central)
	T4b	Invasión de espacio masticatorio, placa pterigoides, base del cráneo o carótida interna	Invasión de músculo lateral pterigoideo, placa pterigoidea, nasofaringe lateral, base del cráneo o carótida interna	Invasión de fascia prevertebral, carótida o mediastino

Fuente: Union for International Cancer Control (UICC), 2011. Disponible en www.uicc.org/tnm

Tabla 2. Estadificación T en tumores de Laringe (7ª Edición, 2010)

T	Supraglotis	Glottis	Subglottis
Tx	Tumor primario no puede ser precisado		
T0	Sin evidencia de tumor primario		
Tis	Carcinoma in situ		
T1	Una localización con movilidad normal	Limitado a cuerda vocal, movilidad conservada T1a Una cuerda T1b Ambas cuerdas	Limitado a subglottis
T2	Mucosa de mas de una localización adyacente a supraglotis o glottis, zona adyacente externa a supraglotis sin fijación	Invasión de supraglotis, subglottis, alteración de movilidad de cuerdas vocales	Invasión de cuerdas vocales con/sin alteración de movilidad
T3	Fijación de cuerdas vocales o invasión de área postcricoides, tejido pre-epiglótico, espacio paraglótico o erosión del cartílago tiroides	Fijación de cuerdas vocales, invasión de espacio paraglótico o erosión de cartílago tiroides	Fijación de cuerdas vocales
T4	T4a	Invasión de cartílago tiroides (cricoides en hipofaringe), traquea, partes blandas de cuello, lengua, tiroides, músculos cervicales o esófago	
	T4b	Invasión de espacio prevertebral, mediastino, carótida	

Fuente: Union for International Cancer Control (UICC), 2011. Disponible en www.uicc.org/tnm

Tabla 3. Estadificación N en tumores de Cabeza y Cuello (7ª Edición, 2010)

N	Estadificación ganglionar	
N1	Un ganglio ipsilateral ≤3 cm	
N2	N2a	Un ganglio ipsilateral >3 a 6 cm
	N2b	Múltiples ganglios ipsilateral ≤6 cm
	N2c	Ganglios bilaterales, contralateral ≤6 cm
N3	Ganglio >6 cm	

Fuente: Union for International Cancer Control (UICC), 2011. Disponible en www.uicc.org/tnm

Tabla 4. Estadificación M en tumores de Cabeza y Cuello (7ª Edición, 2010)

M	Metástasis a distancia
Mx	Metástasis no pueden ser precisadas
M1	Sin evidencia de metástasis
M2	Metástasis a distancia

Fuente: Union for International Cancer Control (UICC), 2011. Disponible en www.uicc.org/tnm

Tabla 5. Estadificación de tumores de Cabeza y Cuello según clasificación TNM (7ª Edición, 2010).

Estadio		Clasificación TNM		
Estadio 0		Tis	N0	M0
Estadio I		T1	N0	M0
Estadio II		T2	N0	M0
Estadio III		T1, T2	N0	M0
		T3	N0, N1	M0
Estadio IV	IVa	T1, T2, T3	N2	M0
		T4a	N0, N1, N2	M0
	IVb	T4b	Cualquier N	M0
		Cualquier T	N3	M0
	IVc	Cualquier T	Cualquier N	M1

Fuente: Union for International Cancer Control (UICC), 2011. Disponible en www.uicc.org/tnm

4. FACTORES DE RIESGO

Los factores de riesgo más importantes relacionados con el CCC son el tabaquismo y el consumo de alcohol, con un efecto sinérgico entre ambos. Aproximadamente, el 75% de los CCC están asociados al consumo combinado de ambas sustancias, lo cual se ha relacionado con la presencia de polimorfismos en genes involucrados en el metabolismo del folato^{9,10}. Otro factor de riesgo relacionado con el desarrollo de CCC es la infección por el Virus del Papiloma Humano (VPH), el cual también juega un papel importante como factor pronóstico en esta patología.

4.1. Tabaco y Alcohol

El tabaco, conocido carcinógeno en cualquiera de sus formas de consumo, es el factor de riesgo más importante en el desarrollo de CCC, incrementando hasta 10 veces la probabilidad de desarrollar CCC en comparación a un individuo sin hábito tabáquico. Esta asociación tiene además una relación directa con la frecuencia y duración del consumo^{11,9}.

Uno de los mecanismos a través del cual se ha observado que el tabaco posee un efecto carcinógeno está ligada al metabolismo del folato, el cual es un nutriente esencial para el humano con un papel de extrema importancia en la síntesis, reparación y metilación del ADN. Los polimorfismos genéticos que se desarrollan a raíz del consumo tabáquico en los genes codificadores de enzimas, pueden alterar estos procesos y modular el desarrollo del cáncer. Con respecto al CCC, se han descrito una serie de polimorfismos en el folato como SHMT1 1420 CT / 1420 TT, que combinado con el consumo tabáquico y edad >49 años, adquieren un efecto sinérgico en relación directa con el desarrollo de CCC^{10,12}.

Adicionalmente, se ha evidenciado que la presencia de carcinógenos del tabaco, como el NNK (Nicotine-derived nitrosamine ketone), pueden activar algunas vías de transducción de señales involucradas en procesos de desarrollo tumoral, incluida la vía de AKT (ver detalle más adelante), tanto en tejido normal como en tejido tumoral de pulmón¹³. Se ha demostrado de la misma manera, que en los CCC y en el tejido sano de cabeza y cuello, AKT se encuentra activado con una mayor frecuencia en los

pacientes fumadores que en los no fumadores, observándose dependencia en cuanto a la dosis y al tiempo de exposición¹⁴.

Aunque el alcohol por sí mismo no se ha probado que sea carcinogénico, se cree que puede cambiar la permeabilidad de membrana y actuar como solvente para la entrada de carcinógenos como el tabaco, potenciando el efecto carcinogénico del mismo e induciendo el metabolismo de enzimas hepáticas y del epitelio de las mucosas. Aproximadamente, el 75% de los CCC están asociados a consumo combinado de tabaco y alcohol^{9,10}.

4.2. Virus del Papiloma Humano (VPH)

En 1983, Syrjänen *et al*, asociaron por primera vez el CCC con la infección por el virus del VPH, ocasionando un interés masivo en el estudio de la biología molecular del VPH y su relación con el desarrollo de CCC¹⁵.

El VPH pertenece a la familia *Papillomaviridae* constituido por virus ADN pequeños, con un genoma de aproximadamente 8.000 pares de bases nitrogenadas. Presentan epiteliotropismo, dependiendo de la diferenciación epitelial para completar su ciclo celular. La infección es establecida cuando el virus tiene acceso a las células basales epiteliales de la piel o mucosas a través de microabrasiones de la superficie. Las partículas virales son desarrolladas progresivamente a medida que las células basales maduran, siendo posteriormente liberadas al alcanzar las capas más superficiales del epitelio. Más de 100 tipos virales han sido identificados, siendo clasificados según su potencial maligno, en alto riesgo y bajo riesgo¹⁶. El VPH se encuentra presente en el 20% de los CCC, siendo el tipo VPH-16 el más frecuentemente observado, especialmente en el de localización orofaríngea, donde se ha reportado una frecuencia de hasta 87-90% de los CCC VPH positivos. El segundo tipo más frecuente es el VPH-18, el cual sólo se ha encontrado en el 2,8% de los casos^{6,16,17}.

El VPH favorece el desarrollo del CCC a través de sus oncogenes E5, E6 y E7. La oncoproteína E6 forma un complejo con una E3 ligasa de ubiquitina que degrada a la molécula supresora p53 del núcleo celular con el consiguiente fallo en la supresión de la vía de carcinogénesis y apoptosis celular. Su mecanismo consiste en causar un fallo

pacientes con tumores VPH-negativos. El aumento en las conductas de riesgo, tales como la promiscuidad sexual y el mayor número de parejas con las que se mantiene contacto sexual por vía oral son factores relacionados con el aumento de la incidencia de VPH^{6,17}. Otros estudios han observado una evolución favorable de los casos de CCC VPH-positivos comparados con los VPH-negativos, demostrando mejor control locorregional y mayor tiempo libre de enfermedad y de supervivencia¹⁸.

4.2.a. Proteína p16

La proteína p16 es una proteína quinasa supresora tumoral ciclina-dependiente codificada por el gen CDKN2A, implicada en la inhibición de la progresión del ciclo celular (transición a G1). El virus del papiloma humano induce una supresión en la proteína del retinoblastoma (pRb) por la oncoproteína E7, lo cual resulta en la liberación de p16 y su consiguiente expresión^{16,17,19}.

4.3. Factores menores

Existen una serie de factores de riesgo adicionales con una relación no muy clara con la aparición del CCC como la dieta, mala higiene bucal, infecciones (Epstein-Barr Virus), radiaciones ionizantes y anemia de Fanconi^{9,6}. También se ha señalado la exposición al asbesto como factor de riesgo en el CCC, aunque en estudios posteriores se ha evidenciado que más que la exposición al asbesto, el riesgo se asocia a la exposición a otras sustancias tóxicas (hidrocarburos aromáticos policíclicos, polvo de metal, polvo de cemento, barniz, laca, diesel, ácido sulfúrico y gas mostaza)^{4,20,21}.

5. FACTORES PRONÓSTICOS

Los factores pronósticos del CCC se pueden dividir de acuerdo a la relación con el paciente, el tratamiento y el tumor.

Dentro de los factores relacionados con el paciente se encuentra en primer lugar la edad y las condiciones generales del mismo. En este sentido, a mayor edad, la presencia de comorbilidades, así como el pobre estado funcional del paciente, se

asocian a un peor pronóstico. Otras características como la raza o el género no se han encontrado asociadas al pronóstico de los pacientes con CCC.

En cuanto a los factores relacionados con el tratamiento, la respuesta inicial al tratamiento quirúrgico o quimio/radioterapia se considera uno de los factores más importantes. Este dato tiene una importancia fundamental debido a que menos del 20% de los pacientes que no responden a la quimioterapia de inducción responderán posteriormente a la radioterapia, por lo cual en estos casos, debería plantearse el rescate con cirugía (ver más adelante, en sección tratamiento)⁹.

Finalmente, los factores pronósticos relacionados con el propio tumor están determinados principalmente por la estadificación clínica al momento del diagnóstico. La extensión tumoral así como el compromiso ganglionar, sobretodo si hay afectación extracapsular, son los factores predictivos más significativos en el CCC. La invasión vascular y la presencia de márgenes positivos, luego de la cirugía, también tienen pronóstico desfavorable. Por el contrario, los tumores con bordes expansivos son menos agresivos que los que tienen bordes infiltrantes, presentando un mejor pronóstico a largo plazo. La localización del tumor es también un factor pronóstico importante, mas que por la característica tumoral en sí, por el grado de resecabilidad del mismo. Los tumores de cavidad oral, más accesibles y de mas fácil resección se comportan mejor que los de otras localizaciones, salvo en estadios avanzados, donde los tumores de laringe presentan un mejor pronóstico^{4,9}. El grado histológico no se correlaciona con el pronóstico de la enfermedad (*Tabla 5*).

Otros factores, como el consumo de tabaco y la presencia de infección por VPH, han demostrado recientemente tener importancia en cuanto al pronóstico de la enfermedad. El hábito tabáquico confiere peor pronóstico, mientras que la presencia de tumores VPH positivos, especialmente en los tumores de orofaringe, se ha observado una mejor sobrevida^{6,10}.

6. VÍAS DE CARCINOGENÉISIS

La identificación de alteraciones moleculares en las vías de carcinogénesis en el CCC, permite identificar nuevas estrategias para subdividir los tumores según su comportamiento biológico y determinar nuevas dianas terapéuticas²².

La señalización celular es parte de un proceso complejo de comunicación que coordina las funciones celulares, en donde se perciben estímulos y se responde acorde a las necesidades del organismo con proliferación celular, procesos reparativos, inmunidad y homeóstasis. Los errores en el flujo de las señales generan unas respuestas incorrectas, algunas veces aberrantes, como ocurre en el caso del cáncer.

Existen diversas vías de señalización tumoral a través de las cuales se produce la activación de las proteínas de la cascada de carcinogénesis con la consiguiente proliferación celular desmedida. En el CCC, las cascadas de carcinogénesis secundarias a la activación de EGFR han sido identificadas y descritas ampliamente. Las vías dependientes de EGFR que tienen mayor participación en el desarrollo tumoral son tres (*figura 6*). La vía PI3K/AKT/mTOR favorece la supervivencia celular y los mecanismos anti-apoptóticos. La vía RAS/RAF/MAPK favorece la proliferación celular, invasión tumoral y metástasis y, por último, la vía JAK/STAT, la cual está implicada en la activación de transcripción de genes asociados a la supervivencia celular^{8,23,24,25}. Recientemente se ha descrito una nueva vía de desarrollo tumoral no dependiente de EGFR, conocida como NOTCH1, ligada a múltiples funciones biológicas pro-tumorales incluyendo la renovación de células madre, proliferación celular, angiogénesis tumoral y el desarrollo de metástasis²⁶.

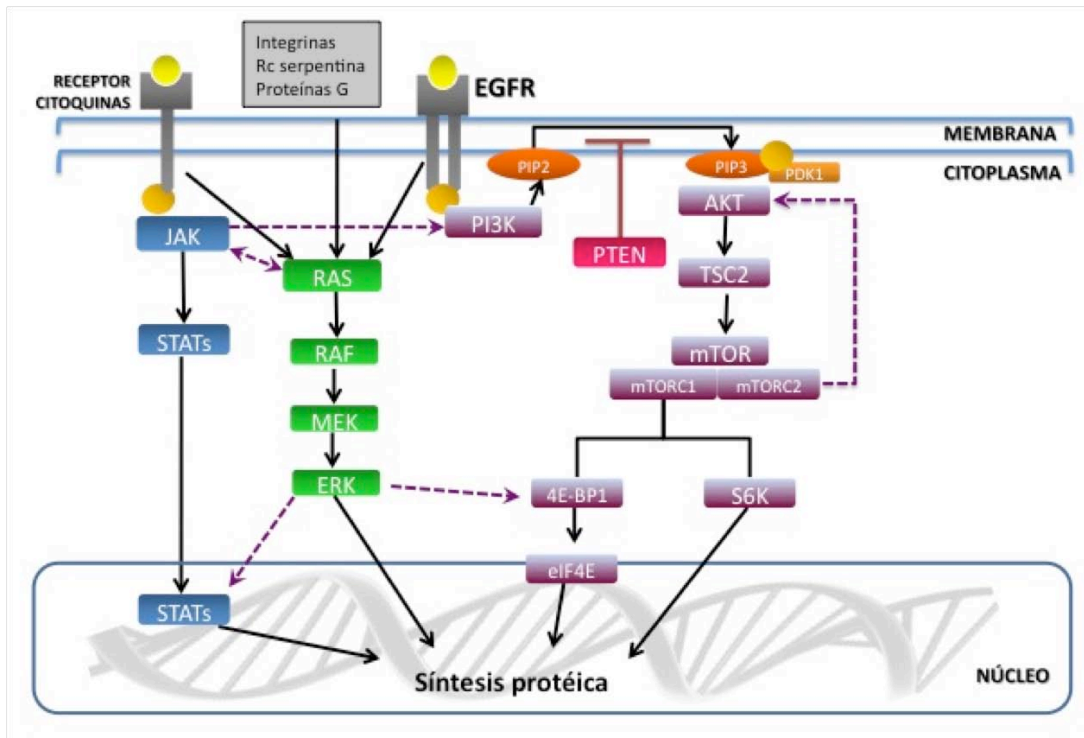


Figura 6. Representación de las vías de carcinogénesis dependientes de EGFR comunes en CCC.

EGFR es un receptor del tipo tirosina-quinasa que incluye a la familia del receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano (HER), expresado en tejido epitelial normal y sobreexpresado en numerosos tipos de cáncer. La familia de EGFR está formada por cuatro receptores transmembrana conocidos como HER1 (erbB-1), HER2 (erbB-2/neu), HER3 (erbB3) y HER4 (erbB-4). Éstos están constituidos a su vez por proteínas con tres dominios funcionales principales: extracelular, transmembrana y el dominio intracitoplasmático, el cual tiene actividad intrínseca tirosina-quinasa que regula el crecimiento celular cuando se produce la unión del receptor con sus ligandos²⁷.

Existen distintos ligandos que se unen a EGFR como EGF, TGF-alfa, heparina-ligada a EGF-factor de crecimiento-like (HBEGF), anfiregulinas (AREG), betacelulina (BTC), epiregulina (EREG) y epígeno (EPGN). La unión del ligando con el receptor EGFR desencadena la dimerización y posterior activación en el dominio intrínseco de la tirosina-quinasa, con la consiguiente activación de la cascada de eventos celulares como la autofosforilación y transducción de señal de las distintas vías de señalización^{23,28}. La activación de EGFR conlleva a la hidrólisis del fosfatidil-inositol 4,5 bifosfato (PIP2) en inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG), resultando en la

activación de la proteína-quinasa (PKC) y la proteína quinasa Ca^{2+} /calmodulin-dependiente (CaMK). La activación de estos sistemas genera unos programas de transcripción que median en la respuesta celular y que incluyen la división celular, motilidad, invasión, adhesión, reparación celular y la supervivencia/muerte celular. Después de la transducción de la señal, el complejo ligando-receptor puede ser internalizado, inactivado o reciclado en la superficie celular.

La alteración de EGFR más frecuente es su sobre-expresión, que puede observarse en tumores de mama, pulmón, cerebro (glioblastoma multiforme), vejiga, cabeza y cuello, ovario, colon, recto y próstata. Su expresión se correlaciona con la progresión de la enfermedad, peor supervivencia y baja respuesta al tratamiento por resistencia a fármacos citotóxicos^{23,29}.

En las células tumorales existen otros mecanismos relacionados con la activación de EGFR y que conllevan al desarrollo tumoral, tales como el incremento de ligandos por las propias células malignas o la expresión de una variante mutada del receptor (EGFRvIII) capaz de activar por sí sola su propia tirosina-quinasa^{30,31}.

6.1. VÍA DE PI3K / AKT / mTOR

La vía de carcinogénesis de PI3K/AKT/mTOR es una de las vías comúnmente activadas en la patología cancerosa general y en CCC, jugando un papel clave en la regulación de los procesos celulares, incluyendo la iniciación tumoral, invasión, recidivas, metástasis y resistencia al tratamiento^{8,14}. En el CCC, la vía de PI3K/AKT/mTOR es considerada una de las vías más frecuentemente activadas, con mayor frecuencia en alteraciones moleculares incluyendo el oncogen PIK3CA y en el gen supresor PTEN³². El conocimiento detallado de las proteínas que participan en esta cascada es esencial para el éxito en el tratamiento de los tumores originados por la activación de esta vía³² (*figura 6*).

6.1.a. PI3K

La familia de enzimas conocida como PI3K tiene como función principal fosforilar el grupo hidroxilo del fosfatidilinositol (PIP). Existen tres clases de PI3K descritas, siendo

la IA-PI3K el tipo más implicado en la patología tumoral humana³³.

El paso inicial de la cascada es la estimulación de IA-PI3K a través del receptor de tirosínquinasa y, de manera indirecta, a través de RAS. Seguidamente se produce la fosforilación de PIP2 en la membrana citoplásmica, generando así un segundo mensajero, PIP3, el cual se une a unas proteínas dependientes de quinasa (PDK) y a la proteína quinasa B (AKT), continuando así la cascada carcinogénica.

El gen PIK3CA codifica la subunidad catalítica p110 α de PI3K, constituyendo uno de los oncogenes más frecuentemente mutados en los tumores humanos, con una frecuencia de 12% según la base de datos del Catálogo de Mutaciones Somáticas en Cáncer (COSMIC)³⁴. Muchas de estas mutaciones se encuentran en los exones 9 y 20 que corresponden al dominio helicoidal E545K y al dominio quinasa H1047R, respectivamente. En CCC se han observado mutaciones en el gen PIK3CA, sobreexpresión génica y mayormente amplificaciones cromosómicas entre el 10 y el 30% de los tumores, siendo mayores (20%) en la localización orofaríngea^{8,14,22,35}. Las alteraciones genéticas de PIK3CA se correlacionan en CCC con un estadio avanzado, invasión vascular y metástasis ganglionar¹⁴.

6.1.b. PTEN

La proteína fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN) es un regulador negativo de la señal de PI3K al desfosforilar PIP3 en PIP2 y detener la señalización tumoral. Es el segundo factor supresor tumoral más frecuentemente mutado en la patología cancerosa humana, superado sólo por p53³⁶.

Se estima que la frecuencia general de mutaciones de PTEN en los cánceres humanos esporádicos alcanza el 12%, siendo alrededor del 3% en CCC³⁴. Sin embargo, la pérdida de expresión de PTEN en CCC se presenta hasta en un 30% de los casos, lo cual se correlaciona con un peor pronóstico de la enfermedad¹⁴.

Los mecanismos a través de los cuales se produce la pérdida de expresión de PTEN son aún desconocidos. Sin embargo, se ha descrito que las mutaciones en PIK3R1 y PIK3R2 afectan su estabilidad, así como su regulación post-transcripcional a través de mRNAs necesarios para su expresión, tales como miR-21, miR-26a y miR-106b-25^{14,37}.

6.1.c. AKT

Una vez que PIP2 es fosforilado, PIP3 se une a PDK1 en la membrana plasmática. Éste fosforila a AKT, el cual es una quinasa de serina/treonina que media en múltiples procesos celulares incluyendo supervivencia celular, proliferación, angiogénesis, metabolismo y traslación protéica a través de variadas proteínas de señalización³⁸. Sin embargo, estudios recientes sugieren que PI3K oncogénico puede continuar la señalización de la vía a través de una vía independiente de AKT, añadiendo mayor complejidad en el estudio y control de la carcinogénesis^{14,39,40}. La activación de AKT, puede ser secundaria a la activación de PIK3CA o a la inactivación de PTEN y representa uno de los cambios moleculares más frecuentes en la génesis del cáncer, proporcionando dianas estratégicas para el desarrollo de fármacos específicos antitumorales.

Se han descrito tres isoformas de AKT (AKT1, AKT2 y AKT3) relacionadas con distintos tipos tumorales, siendo las mutaciones en AKT1, específicamente la mutación E17K, las más prevalentes, encontrándose en tumores de mama (5%), tiroideos, vesicales (3%, respectivamente) y en carcinomas escamosos de pulmón^{14,34,41,42}. Las mutaciones en AKT2 han sido descritas esporádicamente en carcinomas endometriales, también relacionados a mutaciones en AKT3. Por otra parte, se describen sobreexpresiones de las isoformas de AKT en distintos tumores, sin llegarse a determinar mutaciones, como en tumores de ovario, páncreas, mama y colon (AKT2), tumores gástricos (AKT1) y melanomas (AKT3).

A pesar de que en CCC no se han descrito mutaciones en las isoformas de AKT, Iamaroon et al, evidenciaron sobreexpresión de AKT2 en carcinomas escamosos de cavidad oral⁴³.

La activación persistente de AKT en CCC es frecuente y suele ocurrir en estadios iniciales, incluyendo displasia y carcinoma *in situ*, lo cual sugiere que la activación de AKT es un evento inicial en el proceso de tumorigénesis^{44,45}.

6.1.d. mTOR

La proteína mTOR (*mammalian target of rapamycin*) es una quinasa de serina/treonina que se activa tras la fosforilación de AKT. Esta proteína participa en la regulación del inicio de la transcripción del ARNm y su respectiva traducción a proteína y está asociado a dos complejos adicionales: mTOR-1/mTORC1 y mTOR-2/mTORC2. El complejo mTOR-1/mTORC1 interactúa con la proteína *Raptor* para formar otro complejo, el mTORC1/*raptor*, el cual tiene como función fosforilar sus efectores como la quinasa S6 y 4EBP1 (factor de iniciación eucariótico de unión a proteína 1), regulando de forma positiva el crecimiento celular, síntesis protéica, el tamaño celular y la angiogénesis. El complejo mTOR-2/mTORC2 está ligado a su vez a la proteína *Rictor*. Dicho complejo mTORC2/*rictor* activa a su vez de manera ascendente a AKT^{46,47,48}.

6.1.e. 4EBP1

En estado no fosforilado, 4EBP1 permanece unido a eIF4E e inhibe la traducción del ARN-m cap-dependiente (proteína activadora de catabolitos). Por el contrario, la fosforilación de 4EBP1 por medio de la activación del complejo mTORC1/*raptor*, favorece la liberación de eIF4E. De esta manera, se reestablece la traducción del ARN-m dependiente de *cap*, favoreciendo la síntesis de proteínas clave en la carcinogénesis (c-myc, ciclina D1 y VEGF) que inducen a la proliferación celular, tumorigénesis, angiogénesis, invasión tumoral y desarrollo de metástasis^{46,49,50}. Los niveles de expresión de 4EBP1 y su efector eIF4E se correlacionan con formas más agresivas de tumores incluyendo mama, ovario, próstata, cérvix, colon y CCC^{51,52}.

Algunos autores han propuesto a 4EBP1 como un factor embudo en las vías de carcinogénesis, ya que, aunque es mayormente activado a través de la vía de mTOR, presenta otros 6 sitios de fosforilación donde otras quinasas, como ERK1/2, quinasa dependiente de ciclina 1, ATM y PI3K/AKT, pueden establecerse y desencadenar la liberación de su principal efector, eIF4E^{49,53,54}. De esta manera, la fosforilación de 4EBP1 puede ser consecuencia de diversos eventos oncogénicos que ocurren en distintas vías de señalización, que incluyen amplificaciones y mutaciones de factores de crecimiento, pérdida de funciones o mutaciones en PTEN, ATM, p53, PI3K, RAS u

otros mecanismos colaterales de activación oncogénica que resultan en su activación⁵³.

6.1.f. eIF4E

El factor de iniciación eucariota 4E, también conocido como eIF4E, es una proteína que forma parte del complejo de iniciación eIF4F. Está constituido por eIF4E y eIF4G y su función es ligar el ARN-m (proteína activadora de catabolitos-cap dependiente) para llevarlo al ribosoma y así iniciar la síntesis protéica. Puede existir dentro del complejo (eIF4F) o de manera libre. En general, prácticamente todas las proteínas celulares requieren de eIF4E para ser traducidas a proteínas⁵⁵. La sobreexpresión de eIF4E genera un aumento en la translación de ARN mensajeros que regulan distintos oncogenes implicados en la progresión tumoral⁵⁰.

La expresión de eIF4E por las células tumorales en los márgenes de resección y en el tejido sano de la periferia tumoral es considerado un factor predictor independiente de recidiva en el CCC. De hecho, cuando eIF4E se expresa en el tejido sano de la periferia tumoral, el riesgo de recidiva tumoral es siete veces mayor a pesar de presentar márgenes quirúrgicos de resección negativos. Esta recidiva es independiente del tamaño tumoral, afectación ganglionar, estadificación, grado histológico, localización, niveles de expresión de eIF4E intratumoral y del grado de displasia en los márgenes de resección⁴⁶. Así mismo, se ha descrito correlación entre los niveles de expresión de eIF4E y los grados de displasia, lo cual se considera esencial en la progresión maligna del CCC⁵⁶.

6.1.g. S6

La proteína p90 ribosomal S6 quinasa 2 (RSK2) es una quinasa implicada en la síntesis protéica bajo la estimulación de la vía PI3K/AKT/mTOR que se expresa en algunas líneas tumorales del CCC. Es considerada reguladora de la señal que promueve el desarrollo de metástasis al activar múltiples señales efectoras pro-metástasicas cuya fosforilación y activación potencian las propiedades de invasión y metástasis de las células de CCC. Algunas de estas señales están constituidas por CREB, Hsp27, histona

H3 (que contribuye al remodelamiento de la cromatina durante la mitosis y la activación transcripcional) y DAP quinasa (proteína asociada a la muerte celular)⁵⁷.

6.2. VÍA DE RAS / RAF / MAPK

La cascada de RAS/RAF/MAPK es considerada una vía lineal que se inicia por la activación del receptor de tirosina-quinasa de la superficie celular y acaba con la regulación de la transcripción genética en el núcleo, dirigida por la quinasa regulada por la señal extracelular (ERK). Sin embargo, aunque es considerada lineal, se conocen distintos mecanismos de interacción entre la vía RAS/RAF/MAPK y otras vías de carcinogénesis como la vía PI3K/AKT/mTOR⁵⁸ (figura 6).

La activación clásica de la cascada ocurre al unirse un ligando al receptor de tirosina-quinasa en la superficie celular. Sin embargo, las integrinas, receptor de serpentina, proteínas G hetero-triméricas y receptores de citoquinas tienen la capacidad de activarla de manera independiente^{58,59,60}. Asimismo, EGFR es capaz de activar el receptor intracelular tirosina-quinasa, ocasionando la autofosforilación del receptor y activando las isoformas de RAS.

6.2.a. RAS

La familia de genes RAS es conocida por su activación oncogénica en distintos tumores. Poseen un papel significativo en numerosos procesos celulares normales que incluyen la proliferación, diferenciación y muerte celular. Al poseer una función tan vital en la señalización celular normal, es de esperar que cualquier mutación ocasione un fallo en su regulación, con el consiguiente descontrol en su función. La importancia de la señalización de RAS en la iniciación tumoral y su mantenimiento se enfatiza no solo por la prevalencia en sus mutaciones sino por la desregulación en sus activadores y efectores que afectan su actividad dentro de la cascada.

Sus miembros más conocidos, H-RAS, K-RAS y N-RAS, son los principales factores de una superfamilia que incluye más de 150 GTPasas y que, a su vez, están divididos en base a sus relaciones secuenciales en 5 subfamilias distintas (Ras, Rho/Rac, Rab, Arf y Ran). Todas las proteínas comparten estructuras moleculares similares con la habilidad de unirse e hidrolizar nucleótidos de guanina⁶¹. Las isoformas H-RAS, N-RAS y K-RAS

son prácticamente iguales en cuanto a su secuencia de aminoácidos (80%), estando las diferencias entre una y otra en la región hipervariable de su dominio c-terminal^{61,62,63}.

RAS es expresado en todas las líneas celulares de órganos de mamíferos, donde se expresan distintas isoformas en distintos órganos, lo que se conoce como especificidad biológica⁶¹. De esta manera, las mutaciones en distintas isoformas favorecerán la aparición de tumores en aquellas localizaciones donde presentan especificidad, encontrándose en el 30% de los cánceres humanos⁵⁸. En este sentido, las mutaciones en H-RAS se observan preferentemente en tumores de piel (melanomas), vejiga, tiroides, mama y cabeza y cuello. Las mutaciones en K-RAS se observan en tumores de vejiga, ovario, tiroides, pulmón, colon, recto, páncreas, neuroblastomas, rhabdomiosarcomas y leucemia aguda no linfocítica. Finalmente, las mutaciones en N-RAS, se observan en melanomas, tiroides, teratocarcinoma, fibrosarcoma, neuroblastoma, rhabdomiosarcoma, linfoma de Burkitt, leucemia promielocítica aguda, leucemia de células T y leucemia mieloide crónica^{61,64}. Más aún, se han observado mutaciones simultáneas en K-RAS y N-RAS en casos de mieloma múltiple, al igual que se han descrito mutaciones en las tres isoformas principales (H-RAS, K-RAS y N-RAS) en los tumores de tiroides, lo cual sugiere que cada isoforma contribuye a distintos aspectos del crecimiento tumoral⁶¹.

La activación de RAS es el primer paso en la cascada de MAPK. Consecutivamente a la activación de RAS, el complejo RAF es reclutado de la mano de RAS a la membrana celular y activado en un proceso complejo que incluye la fosforilación de distintos factores no conocidos en la actualidad.

6.2.b. RAF

RAF es una familia de proteína-quinasas específicas de serina-treonina con una función importante en la transducción de señal en la cascada de MAPK. Tres isoformas de la proteína se han identificado en los humanos con los nombres de A-RAF, B-RAF y C-RAF. De éstas, B-RAF y C-RAF tienen un papel en la tumorigénesis, siendo las mutaciones en B-RAF las que se asocian a un 8% aproximadamente de los cánceres humanos⁶⁵.

La práctica totalidad de las mutaciones en B-RAF se han localizado en los exones 11 y

15, los cuales son responsables de la codificación del dominio quinasa de la proteína. La sustitución de un único nucleótido en la posición 1799 del exon 15 (GTG por GAG) origina la mutación conocida como V600E en el dominio quinasa, la cual constituye la mutación mas frecuente del B-RAF que llega a aparecer en el 90% de los tumores que presentan B-RAF mutado^{65,66}.

Los tumores sólidos en los cuales se observa la mutación V600E de B-RAF son el melanoma (50%), carcinoma papilar de tiroides (38,4%) y carcinoma colorrectal (6-15%)⁶⁷. Sin embargo, las mutaciones de B-RAF son también detectadas en 3% de los CCC, siendo relativamente raras⁶⁵.

Las proteínas RAF activan directamente a MEK1 y MEK2 a través de la fosforilación de múltiples residuos de serina, continuando así la activación en cascada. Sin embargo, B-RAF (V600E) es capaz de activarse por sí mismo descontroladamente, traduciendo la señal a las proteínas siguientes de la cascada de una manera independiente de EGFR/RAS.

6.2.c. MAPK

La activación de RAS/RAF origina la fosforilación de residuos de tirosina en MAPK (ERK) a través de las proteínas MEK1 y MEK2, las cuales son quinasas específicas tanto para tirosina como para treonina y serina, sin otra función destacable en la biología tumoral.

MAPK (proteína quinasa activada por mitógeno) también es una familia de proteína quinasas específicas para la tirosina, serina y treonina. Son catalíticamente inactivas en su forma base. Para lograr su activación, requieren de la fosforilación en conjunto de los residuos de treonina y tirosina. Tras su activación, MAPK es capaz de traslocarse al núcleo y activar una serie de quinasas que incluyen MNK1, MNK2, MSK1, MSK2 y RSK. Es capaz también de fosforilar una serie de factores de transcripción incluyendo ELK1, PPAR γ , STAT1 y STAT3, C-myc y AP1^{33,68,69}. La activación de estos factores de transducción genera una transcripción de genes, entre los que se encuentra la Ciclina D1, involucrados en la proliferación celular, supervivencia, mitosis y migración celular^{58,69}.

6.3. Vía de JAK / STAT

La vía de JAK/STAT también está implicada en el proceso de carcinogénesis en los CCC junto con la vía RAS/RAF/MAPK y PI3K/AKT/mTOR⁷⁰. Su rol es el de controlar la proliferación, diferenciación y supervivencia celular y la angiogénesis. Tiene la capacidad de activar, de manera independiente, la vía de RAS/RAF/MAPK y la vía de PI3K/AKT, al igual que puede ser activada a su vez, por RAS^{8,71} (figura 6).

6.3.a. JAK

JAK (Janus quinasa) es una familia de tirosina quinasas no receptoras de localización intracelular que incluye cuatro miembros JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2⁸. Los cambios conformacionales en el receptor conllevan a su transfosforilación, lo cual resulta en la adquisición de la capacidad de reclutar sustratos activos como las proteínas STAT que causan su dimerización y posterior activación. Cuando STAT se encuentra activada, puede traslocarse al núcleo y regular la expresión de distintos genes.

Diversos estudios han descrito la presencia de mutaciones en las proteínas de la vía JAK/STAT asociadas a algunos trastornos hematopoyéticos, tales como enfermedades mieloproliferativas (mutación V617F en JAK2), leucemia megacarioblástica, leucemia linfoblástica y diversos linfomas (mutaciones en JAK1 y JAK3)^{22,72,73,74}. En tumores sólidos, se han detectado mutaciones en tumores de pulmón (JAK1) y mama (JAK1 y JAK3) así como en tumores gástricos (JAK3) y en CCC (JAK1 y JAK2)^{22,71}.

6.3.b. STAT

La activación de JAK conlleva a la fosforilación de las proteínas STAT en los residuos de tirosina específicos. Los dímeros activados de STAT se traslocan al núcleo donde son capaces de unirse a secuencias de ADN y transactivar genes diana⁷⁰.

De los miembros de la familia STAT, STAT3 es la proteína más frecuentemente asociada a la desregulación del crecimiento celular y a la aparición de neoplasias. Se han descrito activaciones aberrantes de STAT3 en tumores de mama, pulmón, tiroides y cabeza y cuello, así como en leucemias y linfomas⁷⁰.

Se conoce que STAT3 se expresa en CCC, a diferencia del epitelio normal, en el cual no se ha evidenciado su expresión⁸. Sin embargo, Nagpal *et al*, describieron una diferencia en la expresión entre tumores iniciales (T1-T2) y tumores avanzados (T3-T4), donde demostró una mayor intensidad de expresión en los tumores iniciales. De esta manera, sugiere que STAT3 juega un papel importante en los estadios iniciales tumorales, probablemente estimulado por agentes carcinógenos como el tabaco⁷⁵.

Sriuranpong *et al*, en el 2003, analizaron el estado de activación de STAT3 en CCC, encontrando que la práctica totalidad de las líneas celulares estudiadas exhibieron niveles elevados de STAT3 en comparación con los queratinocitos normales, de los cuales el 30% de los casos estudiados mostraron activación de EGFR⁷⁰. Sin embargo, al bloquear la estimulación de EGFR por inhibidores específicos, observaron que no se lograba inactivar a STAT3. De la misma manera, al bloquear la activación de STAT3, se inhibió el crecimiento celular y se promovió la apoptosis en las células de CCC. De esta forma, concluyeron que STAT3 constituye un mecanismo regulatorio independiente de la activación de EGFR, proponiendo un mecanismo de activación autocrino/paracrino mediado por los receptores de citoquinas gp130 en el que IL6 juega un papel protagónico⁷⁰.

6.4. VIA NOTCH1

La vía de NOTCH1 se ha descrito ligada a múltiples funciones biológicas, incluyendo la regulación de la capacidad de autorrenovación, salida del ciclo celular y supervivencia celular²⁶.

La activación de la vía comienza cuando una célula expresa el ligando apropiado (Jag/Delta) y éste se une a un receptor NOTCH (NOTCH 1-4) en la membrana celular. El complejo formado, es translocado al núcleo con la ayuda de una metaloproteasa y un complejo secretasa. Una vez en el núcleo, interactúa con los factores de unión del ADN (CSL/CBF1/RBPjk), reclutando coactivadores (proteínas MAML) para activar transcritores en los genes diana^{24,26}.

Diversos estudios han sugerido que las mutaciones en NOTCH pueden tener tanto un efecto oncogénico como un efecto supresor tumoral. De esta manera, se ha visto un efecto pro-tumorigénico en la leucemia/linfoma linfoblástica aguda de células T y un efecto supresor en la leucemia mielomonocítica crónica, tumores cutáneos, pulmonares y CCC²⁶.

Sun *et al.* reportaron en 2014 la presencia de mutaciones en NOTCH1 con una relativa alta frecuencia (10-15%) en CCC. Algunas de estas mutaciones bloquean la proteína N-terminal del dominio transmembrana con la consiguiente inactivación del mismo^{24,26}.

Esta vía ha demostrado tener potencial como diana terapéutica en oncología. Krop y Tolcher *et al.*, han realizado estudios de fase I en los que analizan dos potentes inhibidores de la secretasa (MK-0752 y RO4929097), una enzima necesaria para la activación de NOTCH, y ha demostrado una buena tolerancia de la inhibición de la vía de NOTCH en tumores sólidos avanzados^{76,77}. Por otra parte, existen otros estudios clínicos en curso para una gran variedad de tipos tumorales incluyendo mama, páncreas, próstata, sarcomas, melanomas, carcinoma pulmonar de células no pequeñas y leucemia/linfoma linfoblástica aguda de células T^{24,76,77}.

6.5. FACTOR SUPRESOR p53

El factor de supresión tumoral p53 posee un rol crítico en el ciclo celular, deteniéndolo e induciendo la apoptosis o senescencia, por lo cual, la pérdida de su función favorece el proceso carcinogénico⁷⁸. Las mutaciones de p53 se encuentran aproximadamente en 60% de los CCC y también se hallan en las lesiones pre-malignas, lo cual sugiere su participación en el proceso de transformación neoplásica^{6,4}.

Diversos estudios han planteado el comportamiento biológico de los tumores de cabeza y cuello en relación a la expresión de p53 e infección por VPH. Se destaca un patrón VPH-positivo, donde se sobreexpresa p16, con mutaciones infrecuentes de p53 y mínima expresión de EGFR. Por el contrario, los tumores VPH-negativos, presentan frecuentemente mutaciones en p53, con expresión de EGFR y mínima o ausencia de

expresión de p16, causando inestabilidad genómica global, resistencia al tratamiento pro-apoptótico y menor supervivencia tras la cirugía^{8,16,19,78}.

7. TRATAMIENTO

7.1. REVISIÓN HISTÓRICA

Históricamente, el tratamiento de los CCC comenzó su “era moderna” a principios del siglo XX, cuando aparecieron una serie de publicaciones en torno a cirugías radicales con intención curativa. En 1905, G. Crile publica un procedimiento radical novedoso de disección cervical en bloque con resultados alentadores y técnica reproducible⁷⁹. Entonces, el tratamiento estaba dirigido a identificar el tumor, tratarlo, fuese con cirugía radical o radioterapia, y curar al paciente⁸. No obstante, los pacientes quedaban mutilados por la técnica quirúrgica en sí misma o morían en la cirugía o en el postoperatorio. El desarrollo de la anestesia, así como de nuevos medicamentos y técnicas reconstructivas disminuyeron las muertes secundarias a las cirugías radicales y mejoraron el pronóstico de la enfermedad y la calidad de vida de los pacientes. El descubrimiento de la estructura del ADN por Watson y Crick en 1953 abrió una nueva “era biológica” en la medicina, originando el estudio de la biología molecular de los tumores y desarrollar así tratamientos individualizados cada vez más eficaces y con menor toxicidad⁸.

7.2. CONCEPTO DE TUMORES RESECABLES E IRRESECABLES

El carcinoma de cabeza y cuello localmente avanzado (CCCLA) puede ser dividido en resecable e irresecable, siendo de vital importancia la distinción entre uno y otro por las implicaciones en cuanto al control locorregional, supervivencia y actitud terapéutica para cada uno. No obstante, no existe una definición universalmente aceptada para el término irresecable en tumores de cabeza y cuello, pudiendo variar dependiendo de la institución, experiencia del cirujano y del avance en las técnicas de reconstrucción.

7.2.a. TUMORES RESECABLES

En general, para los tumores de cabeza y cuello resecables, en estadios iniciales I y II e indistintamente de la localización presentada, el tratamiento será con intención curativa. En función de la localización, se indica resección quirúrgica o radioterapia radical. Si se busca una preservación del órgano se puede plantear un tratamiento de quimioterapia de inducción seguido de radioterapia. La cirugía radical con márgenes de seguridad se puede asociar o no a radioterapia post-operatoria. Además, la cirugía suele ser individualizada, especialmente si existen factores de mal pronóstico como probabilidad de márgenes afectados o invasión extracapsular ganglionar. Si hay persistencia de enfermedad tras la radioterapia o quimio-radioterapia, se plantea cirugía de rescate complementaria (para mayor detalle consultar las Guías de Práctica Clínica para el Tratamiento del Cáncer de Cabeza y Cuello del Grupo Español de Tratamiento de Tumores de Cabeza y Cuello)^{1,80}.

7.2.b. TUMORES IRRESECABLES

Se han acordado unos criterios de irresecabilidad entre de los cuales están la presencia de invasión vascular (grandes vasos), de la fascia prevertebral, mediastínica y de la base del cráneo. También deben considerarse como irresecables aquellos tumores donde no haya posibilidad de lograr una exéresis completa del tumor con márgenes de seguridad⁸⁰.

El término inoperable engloba a los tumores irresecables y a aquellos en los que se sospeche una baja tasa de curabilidad quirúrgica, en donde las secuelas funcionales y/o estéticas derivadas del tratamiento quirúrgico no sean aceptables o en aquellos donde exista una contraindicación médica para la cirugía⁸⁰.

El manejo de los CCCLA irresecables se basa en la integración de la quimiorradioterapia (QRT), la quimioterapia de inducción (QTI) y la cirugía de rescate.

La administración de quimioterapia (QT) y radioterapia (RT) concomitante ha demostrado mayor control locorregional y beneficio en la supervivencia. Uno de los problemas fundamentales al incorporar la QT de forma concomitante a la RT es el incremento en la severidad y duración de la toxicidad aguda.

7.3. NUEVAS DIANAS TERAPÉUTICAS

Con el surgimiento de nuevas tecnologías y el incremento en el conocimiento de los mecanismos moleculares que participan en la carcinogénesis y en la progresión tumoral, se han desarrollado nuevos fármacos diseñados para actuar en moléculas diana de la vía carcinogénica, constituidas típicamente por proteínas que tienen un rol clave en el desarrollo y progresión tumoral. La identificación de las dianas apropiadas se basa en los conocimientos específicos de los cambios moleculares asociados a cada tipo de cáncer²³.

El cetuximab es un anticuerpo monoclonal anti-EGFR aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) y la EMEA (Agencia Europea de Medicamentos) para el tratamiento de CCCLA asociado a RT o en monoterapia como segunda línea de tratamiento en los casos recurrentes o metastásicos, tras el fracaso de la QT con platino^{23,81}. Se produce *in vitro* en cultivos celulares y está compuesto por las regiones variables del anticuerpo anti-EGFR murino y regiones constantes humanas de cadenas pesadas IgG1 y ligeras kappa. Está constituido por dos cadenas pesadas idénticas que contienen 449 aminoácidos respectivamente y dos cadenas ligeras de 214 aminoácidos respectivamente, con un peso molecular de 152 kDa⁸². El cetuximab se une específicamente al dominio extracelular de EGFR en células normales y tumorales con gran afinidad (Kd= 0.1-0.2 nM) e inhibe competitivamente la unión a EGF y a otros ligandos como TGF-alfa^{83,84}.

El efecto del cetuximab se produce al bloquear la fosforilación y activación del receptor asociado a proteína quinasas, interfiriendo con la activación de la cascada de señalización carcinogénica de las vías de señalización de la MAPK, PI3K/Akt y de JAK/Stat^{23,85} (*figura 7*).

Bonner *et al.* en 2006 publicaron datos de un estudio fase III que comparaban el tratamiento único con RT vs. RT combinado con cetuximab. En este estudio, en el que se incluyeron 424 pacientes con CCCLA, el tratamiento combinado fue superior en cuanto a control locorregional y supervivencia. Estos beneficios fueron alcanzados sin incrementar la toxicidad por la radioterapia, al compararlo con el grupo control, con la

excepción de las reacciones infusionales y rash acneiforme, el resto de las toxicidades no difirieron entre ambos esquemas⁸⁶.

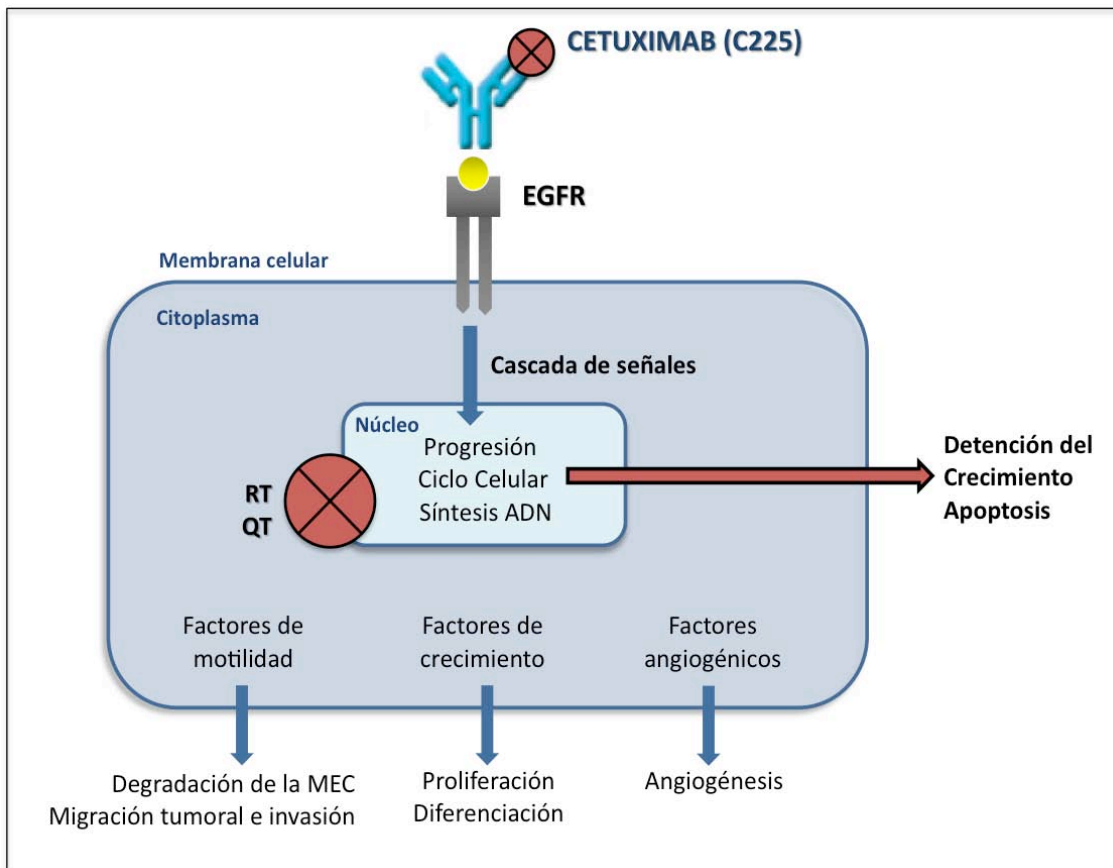


Figura 7. Acción y efecto del cetuximab y radioterapia–quimioterapia en el proceso carcinogénico.

El mecanismo antitumorígeno del cetuximab comienza al unirse y activar el receptor EGFR. Numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* han descrito distintas propiedades biológicas atribuibles a cetuximab, como lo son:

1. Inhibición directa de EGFR por medio de su actividad tirosina quinasa e inhibición de la progresión del ciclo celular.

Los estudios han demostrado que el cetuximab interviene en la detención del ciclo celular de diversas líneas celulares tumorales. Se ha demostrado que las ciclinas

dependientes de quinasas son unos reguladores selectivos de la progresión del ciclo celular, particularmente en la fase G1. El bloqueo de EGFR mediado por el cetuximab induce una detención en la fase G1 del ciclo celular con la consiguiente detención de la replicación y división celular^{23,87}.

2. Inhibición de la angiogénesis

El cetuximab reduce la producción de factores de crecimiento vasculares como VEGF (Factor de crecimiento de endotelio vascular), bFGF (Factor de crecimiento fibroblástico) e interleuquina 8 (IL-8). Su efecto no sólo reduce el desarrollo en el número de nuevos capilares sino que obstaculiza el crecimiento de los vasos hacia la masa tumoral.

Por otra parte, el VEGF y la IL-8 actúan como factores protectores de las células endoteliales inmaduras, protegiéndolas de la apoptosis. Por lo tanto, al reducirse su producción por efecto del cetuximab, se origina una mayor apoptosis de células endoteliales que contribuye a la reducción de la neovascularización²³.

3. Inhibición de procesos de invasión tumoral y metástasis

El cetuximab tiene la propiedad de inhibir la expresión y la actividad de ciertas metaloproteinasas (MMP), las cuales son endopeptidasas dependientes de zinc liberadas por las células cancerígenas que producen componentes de la matriz extracelular, proteínas de la superficie celular y moduladores inmunes. Al bloquear la actividad de las MMP, se alteran las condiciones óptimas para el desarrollo tumoral y se obstaculizan los procesos de invasión y metástasis tumoral²³.

4. Activación de moléculas pro-apoptóticas activadas automáticamente después de la detención de la fase G1 del ciclo celular.

5. Inducción de citotoxicidad del sistema inmune

El efecto del cetuximab en el sistema inmune se cree que es producido por su actividad antitumoral a través del efecto citotóxico mediado por células efectoras (monocitos y células natural-killer), así como por la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Sin embargo, los mecanismos específicos aún no han sido aclarados^{23,88}.

6. Efecto citotóxico sinérgico con quimioterapia y radioterapia^{23,89}.

El tratamiento combinado del cetuximab y RT en el CCCLA mejora el control de enfermedad loco-regional y la supervivencia general, con una media de supervivencia de 20 meses⁸⁶. De igual manera, la combinación con QT basada en platino o administrado en monoterapia, mejora la supervivencia global y progresión de la enfermedad en pacientes con enfermedad recurrente o metastásica.

No obstante, a pesar de la evolución de los tratamientos de QT y RT y el desarrollo de la terapia dirigida con anticuerpos monoclonales, la sobrevida a 5 años sigue siendo del 50% aproximadamente. Por lo tanto, la creación de nuevas estrategias de tratamiento que mejoren la eficacia y reduzcan la toxicidad de los tratamientos en los pacientes con CCC continua siendo una necesidad^{22,23}.

7.3.a. EGFR VIII

La resistencia a la inhibición de EGFR por el cetuximab es un evento frecuente. Uno de los mecanismos propuestos para explicar dicha resistencia es la expresión de una variedad mutante EGFR VIII, encontrado hasta en el 42% de los casos de CCC^{6,8,78}.

EGFRVIII es una variedad truncada de EGFR, originada por una mutación por delección en la base 801 del exón 2-7 que se localiza en el dominio extracelular con actividad tirosina quinasa independiente del ligando⁷⁸.

Se ha sugerido que EGFRVIII se presenta con mayor frecuencia en la enfermedad recidivante/metastásica y que podría ser responsable del fracaso terapéutico a la terapia anti-EGFR. La expresión de EGFRVIII está asociada a una menor sobrevida libre de enfermedad en pacientes tratados con cetuximab y docetaxel^{8,78}.

II. JUSTIFICACIÓN

II. JUSTIFICACIÓN

Por todo lo descrito anteriormente, se desprende que el tratamiento de los CCC en estadio avanzado sigue teniendo unos resultados pobres.

Dicho tratamiento está basado en la combinación de radioterapia y quimioterapia con o sin anticuerpos monoclonales anti-EGFR como el cetuximab. El estudio de factores que pueden conllevar sensibilidad o resistencia a dichos tratamientos, incluyendo la aplicación del anticuerpo monoclonal cetuximab sigue siendo de enorme trascendencia a la hora de poder seleccionar a los pacientes.

Dado que en los CCC, así como en la mayoría de los tumores malignos humanos, se describen alteraciones oncogénicas, en este trabajo nos planteamos estudiar fundamentalmente las vías de señalización que llevan la señal proliferativa desde la membrana al núcleo y a los ribosomas, independientemente de las alteraciones oncogénicas específicas a nivel de receptores de la membrana celular. En este sentido estudiamos la ruta de PI3K/AKT/mTOR/4EBP1 y S6 y la de RAS/RAF/MAPK/eIF4E. Estas vías, a través de los factores 4EBP1 y eIF4E, controlan la síntesis protéica canónica.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La hipótesis general del trabajo se centra en estudiar las mutaciones de los genes mas relevantes en las vías de señalización celular y de caracterizar los niveles de expresión de las proteínas implicadas en dichas vías, especialmente aquellas a nivel de los denominados factores “embudo” desde el mTOR, MAPK, eIF4E y 4EBP1. Dicha hipótesis plantea que la señal oncogénica, que puede depender de múltiples alteraciones genéticas, tiene que pasar inexorablemente por la activación funcional de dichos factores y que por tanto sus niveles de expresión pueden representar el nivel de activación de la vía que desencadena la proliferación tumoral.

Por tanto, dicha valoración podría permitirnos asociar los niveles de expresión de las proteínas, no solamente con el pronóstico de los tumores, sino con la resistencia a los tratamientos dirigidos contra receptores de membrana o factores constituyentes de las vías implicadas.

OBJETIVOS

Objetivo Principal

Determinar la relación existente entre la expresión y mutaciones de las distintas proteínas de las vías de señalización de EGFR y la respuesta al tratamiento con quimioterapia o radioterapia en combinación con cetuximab en los tumores de cabeza y cuello.

Objetivos Específicos

1. Determinar la expresión de las proteínas que participan en las vías de carcinogénesis de EGFR (mTOR, 4EBP1 y eIF4E) y sus formas fosforiladas (PTEN, pS6, pMAPK y HER3) por inmunohistoquímica (IHQ) en tumores de cabeza y cuello.
2. Determinar la expresión de los factores supresores p53, p16 y el índice de proliferación celular Ki67 por inmunohistoquímica .
3. Determinar las alteraciones por estudio mutacional de proteínas implicadas en la tumorigénesis (PI3K, B-RAF , KRAS y H-RAS).
4. Determinar la presencia de VPH, especificando los serotipos observados.
5. Correlacionar la expresión por inmunohistoquímica y estudio mutacional de las proteínas implicadas con las características patológicas de los tumores y pronóstico de la enfermedad.
6. Correlacionar la expresión por inmunohistoquímica y estudio mutacional de las proteínas implicadas con la presencia de factores pronósticos de resistencia al tratamiento anti-EGFR (cetuximab).

IV. METODOLOGÍA

IV. METODOLOGÍA

1. Población de estudio. Criterios de inclusión

Para el estudio de la presente tesis doctoral se seleccionaron los pacientes diagnosticados con CCCLA en el Hospital Universitario Vall d'Hebron entre los años 1999 y 2010 que tuvieran como mínimo 5 años de seguimiento.

Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

- Pacientes diagnosticados de carcinoma escamoso de cabeza y cuello de orofaringe (amígdalas, paladar blando, base de la lengua), hipofaringe, laringe y cavidad oral (mucosa oral, encía, paladar duro, lengua y suelo de la boca).
- Disponer de material histológico previo al tratamiento recibido y en cantidad suficiente para la realización de técnicas de inmunohistoquímica y biología molecular.
- Disponer de información clínico-patológica completa durante el período de seguimiento.
- No haber fallecido en el acto quirúrgico o en el postoperatorio inmediato.

2. Variables clínicas, anatomopatológicas y moleculares

Se revisaron retrospectivamente las historias clínicas de los pacientes incluidos tomando en consideración las siguientes variables clínicas:

- Sexo
- Edad
- Localización del tumor
- Fecha de diagnóstico

-Fecha de recidiva, fecha del último seguimiento, o fecha del fallecimiento, dependiendo de cada caso

- Hábito tabáquico

- Hábito alcohólico

- Grado de diferenciación tumoral (bien, moderadamente y poco diferenciado)

- Estadio TNM (según la AJCC 2010)⁹⁰

- Presencia de metástasis ganglionares (N0 o N+)

- Tratamiento recibido (RT-Cetuximab, QT-Cetuximab, o RT-QT)

Se incluyeron como variables anatomopatológicas y moleculares:

- Grado de diferenciación tumoral

- Expresión de las proteínas estudiadas (mTOR, pmTOR, 4EBP1, p4EBP1, eIF4E, pEIF4E, pS6, PTEN, HER3, pMAPK, p53, Ki67 y p16) mediante el Histo-score

- Presencia de mutaciones de PI3K, KRAS, HRAS y BRAF

- Presencia de VPH

3. Selección de material histológico

El material estudiado fue obtenido a través de las muestras de biopsias diagnósticas o exéresis quirúrgicas de pacientes con tumores escamosos de cabeza y cuello previos al tratamiento médico. Tras la fijación en formaldehído, fueron incluidas en parafina para la realización del bloque histológico. En cada caso incluido se seleccionó un bloque de parafina representativo del tejido tumoral, previamente a la valoración de su correspondiente sección histológica teñida con hematoxilina y eosina. La utilización de material biológico fue aprobado previamente por el comité de ética del hospital.

4. Estudio inmunohistoquímico

Las técnicas de inmunohistoquímica fueron realizadas de manera automatizada sobre secciones histológicas de 3µm utilizando el sistema Ventana Benchmark® XT Automated IHC Stainer. Para su visualización se utilizó el kit de detección Ventana *ultraView*™ Universal DAB detection kit (catalog no. 760-500). Se añadieron controles positivos y negativos apropiados para cada anticuerpo (tabla 6).

El procedimiento fue el siguiente:

1. Desparafinación de las secciones histológicas con la solución Ventana EZ Prep Solution (catálogo No.950-102).
2. Recuperación antigénica con la solución Ventana Tris-based buffer solution CC1 (catálogo No.950-124) a temperatura estándar durante 60 minutos.
3. Bloqueo de la peroxidasa endógena con *ultraView* inhibitor con 3% de H₂O₂ durante 4 minutos a 37°C.
4. Lavado e incubación con el anticuerpo primario durante 1 hora, mientras que para Her3, Ki67, p53 y p16 se emplearon 80, 16, 16 y 20 minutos de incubación, respectivamente (ver condiciones específicas en tabla No. 6).
5. El complejo anticuerpo primario – HRP (horseradish peroxidase) se visualizó con el cromógeno diaminobenzidina tetrahidroclorhídrico (DAB).
6. Contra-tinción con hematoxilina durante 8 minutos y con Bluing reagent por 4 minutos.

Tabla 6. Características de los anticuerpos de proteínas utilizados.

Proteína	Tipo de Anticuerpo	Sitio de fosforilación	Dilución	Anticuerpo Secundario	Fuente (No.Catálogo)
pMAPK	policlonal	Thr202/Tyr204	1:50	Conejo	Cell Signaling (9101)
pS6	monoclonal	Ser240/Ser244	1:100	Conejo	Cell Signaling (5364)
4EBP1	policlonal	Ser65/Thr70	1:50	Conejo	Cell Signaling (9472)
p4EBP1	policlonal	Thr70	1:50	Conejo	Cell Signaling (9455)
eIF4E	policlonal	Ser209	1:100	Conejo	Cell Signaling (9742)
peIF4E	monoclonal	Ser209	1:100	Conejo	Abcam (EP2151Y)
mTOR	monoclonal	Ser2481	1:50	Conejo	Cell Signaling (2983)
pmTOR	policlonal	Ser2448	1:100	Conejo	Cell Signalling (2971)
PTEN	monoclonal	13866	1:50	Conejo	Cell Signalling (9559)
p16	monoclonal	-	Prediluido	Ratón	Ventana (06695248001)
p53	monoclonal	-	Prediluido	Ratón	Ventana (05278074001)
Ki67	monoclonal	-	Prediluido	Conejo	Ventana (05278384001)
HER3	monoclonal	-	1:75	Conejo	CIC Salamanca

Se realizaron para todos los casos incluidos las técnicas de inmunohistoquímica de 4EBP1, p4EBP1, eIF4E, peIF4E, mTOR, pmTOR, PTEN, pMAPK, pS6, HER3, p16, p53 y Ki67.

4.1. Valoración de las técnicas de Inmunohistoquímica

Los marcadores del ciclo celular (p53, Ki67 y p16) fueron valorados como porcentaje simple de células teñidas (nuclear para p53 y Ki67; nuclear y citoplasmático para p16).

Los factores de crecimiento y transcripción (mTOR, pmTOR, 4EBP1, p4EBP1, eIF4E, peIF4E, pS6, PTEN y pMAPK) fueron valorados con el método semicuantitativo de Histo-score (Hscore)⁹¹.

El Hscore evalúa conjuntamente, el porcentaje de células teñidas (nuclear para pMAPK y nuclear/citoplasmática para el resto de marcadores) y la intensidad de tinción en 10 campos de gran aumento (40X) representativos. La intensidad de tinción es valorada como: 0 (sin evidencia de tinción), 1 (tinción débil), 2 (tinción moderada) y 3 (tinción marcada). Para calcular el Hscore se debe multiplicar la intensidad de tinción por el porcentaje de células teñidas, con lo cual, se obtienen resultados entre 0 y 300.

Her3 fue valorado de la siguiente manera: 0 (ausencia de expresión), 1 (expresión débil o moderada en <10% de las células tumorales), 2 (expresión moderada en >10% de las células tumorales) y 3 (expresión intensa en >10% de células tumorales). Se consideraron positivos los casos con score 3 y negativos, aquellos cuyo score fue de 0, 1 o 2.

5. Estudio Molecular

5.1. Extracción y cuantificación del ADN

La extracción del ADN fue realizada a través del protocolo del kit comercial *Qiagen DNA extraction FFPE QIAamp®* para muestras parafinadas, cuyo protocolo es el siguiente:

1. Incubación durante 5 minutos con 100µl de xilol a temperatura ambiente.
2. Se centrifuga durante 2 minutos a 13200 rpm.
3. Se retira el xilol
4. Se repiten los pasos 1-3.
5. Se incuba durante 5 minutos con 1000 µl de etanol a temperatura ambiente.
6. Se centrifuga durante 2 minutos a 13200 rpm.

7. Se retira el etanol.
8. Se repiten los pasos 5-7.
9. Se incuba en un termoblock a 37°C durante 15 minutos.
10. Se agregan 20 µl de proteinasa K y 180 µl de Buffer ATL.
11. Se incuba toda la noche a 56°C.
12. Se incuba 1 hora a 90°C.
13. Se centrifuga brevemente.
14. Se agregan 200 µl de Buffer AL y 200 µl de etanol.
15. Se centrifuga brevemente.
16. Se recoge el sobrenadante y se coloca en una columna de precipitación (*QIAamp MinElute*)
17. Se centrifuga durante 1 minuto a 800 rpm.
18. Se coloca la columna de precipitación en un tubo limpio.
19. Se agregan 500 µl de Buffer de lavado número 1.
20. Se coloca la columna de precipitación en un tubo colector limpio.
21. Se centrifuga durante 1 minuto a 800 rpm.
22. Se agregan 500 µl de Buffer de lavado número 2.
23. Se centrifuga durante 1 minuto a 800 rpm.
24. Se coloca la columna de precipitación en un tubo colector limpio.
25. Se centrifuga durante 3 minutos a 13200 rpm.
26. Se coloca la columna de precipitación en un tubo eppendorf limpio.
27. Se incuba 5 minutos con 50 µl de Buffer ATE.

28. Se centrifuga 1 minuto a 13200 rpm.

29. Se guarda el ADN a 4°C hasta el momento de la cuantificación.

La calidad y la concentración de las muestras de ADN se evaluó mediante la absorbancia de las longitudes 260 y 280nm utilizando un espectofotómetro NanoDrop 2000.

5.2. Detección de mutaciones de H-RAS, K-RAS, B-RAF y PI3K

Para la detección de las mutaciones de los genes KRAS, BRAF y PIK3CA se siguieron las instrucciones del kit comercial CLART® CMA KRAS·BRAF·PI3K de la casa comercial GENOMICA⁹². Dicho kit es capaz de detectar las mutaciones más frecuentes de dichos genes, las cuales se indican a continuación:

KRAS: G12A, G12C, G12D, G12R, G12S, G12V, G13D, Q61H y Q61L.

BRAF: V600E y V600K.

PI3K: E542K, E545D, E545K y H1047R.

La detección de mutaciones de H-RAS fue realizada a través de una amplificación de los exones 2 y 3 del gen HRAS y posterior secuenciación por método Sanger. Las condiciones de la PCR fueron: 1x Mytaq Reaction Buffer, 0.12 µM primers *forward and reverse*, 0.3 U de MyTaq DNA polymerase (Bioline) y 50 ng *input* de DNA. Se usaron dos programas de amplificación dependiendo del exón amplificado, siendo en el caso del exón 2 del gen 95°C 10 min, 40 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 57°C y 60 seg a 72°C y un paso final de 10 min a 72°C. En el caso del exón 3 de HRAS se realizó el mismo programa salvo que la temperatura de annealing se bajo a 55°C.

Los *primers* utilizados fueron:

HRAS-2 Forward: AGGAGACCCTGTAGGAGGA

HRAS-2 Reverse: CGCCAGGCTCACCTCTATAGTG

HRAS-3 Forward: CTGCAGGATTCCTACCGGA

HRAS-3 Reverse: *ACTTGGTGTTGTTGATGGCA*

Las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador Mastercycler EP de la casa comercial Eppendorf. Los amplicones de ADN fueron visualizados en geles virtuales mediante el uso del Qiexcel y una vez comprobados fueron tratados con Exonuclease I y Shrimp Alkaline Phosphatase (Exo sap, Affymetrix, Wooburn Green, Reino Unido). Para eliminar restos de ADN monocatenario se añadieron 2 µl de Exo sap y 5 µl de cada amplicón tratándose durante 15 min., a 37°C y posteriormente se realizó una incubación durante 15 min a 80°C para inactivar la actividad enzimática. Para realizar la PCR de secuenciación se añadieron 2 µl ADN purificado, 1 µl Big Dye, 1 µl de 3.2 µM *primer forward o reverse* y 1 µl de buffer secuenciador (Applied Biosystems). Las reacciones de secuenciación fueron realizadas en un termociclador Mastercycler EP de la casa comercial Eppendorf con el siguiente programa: 96°C 2 min y 30 ciclos de 96°C 10 seg, 50°C 5 seg y una extensión final a 60°C durante 4 min. Las secuencias fueron purificadas siguiendo el protocolo X-Terminator (Applied Biosystems) para luego ser analizados con Chromas Pro Software (versión 2.4)

5.3. Estudio de secuencias del Virus del Papiloma Humano (VPH)

La infección por el virus de VPH se demostró mediante la presencia de secuencias de ADN viral (VPH) a través de la amplificación de un fragmento común L1 y posterior secuenciación directa. El método utilizado (GP5/GP6) detecta 14 tipos de VPH de alto riesgo (tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68) y 6 tipos de bajo riesgo oncogénico (tipos 6, 11, 40, 42, 43 y 44)⁹³.

Una vez extraído el ADN, se realizó una amplificación del ADN por PCR utilizando los primers GP5-GP6:

Primer GP5: *TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC*

Primer GP6: *GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC*

6. Análisis estadístico

El estudio estadístico se realizó mediante el programa Statistical Package for Social Science (SPSS 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas al tener un p-valor menor o igual a 0,05. Se consideraron como variables cualitativas el sexo, la localización, el hábito tabáquico, el hábito alcohólico, el grado de diferenciación tumoral, el estadio TNM, el tratamiento recibido, las proteínas valoradas según grupos como positivas o negativas, el valor de HER3, la presencia de mutación de BRAF, PIK3CA, HRAS y NRAS, y la presencia de VPH. Las variables cuantitativas fueron la edad, el H-score de las proteínas estudiadas y la actividad proliferativa (Ki67), p53 y p16.

Para el estudio de las variables cualitativas se realizaron pruebas de Chi-cuadrado. Para estudiar las variables cuantitativas con distribución normal se realizaron pruebas de T-student y correlación de Pearson. Los tests no paramétricos de Rho de Spearman y U de Mann-Whitney se utilizaron para aquellas variables cuantitativas con distribución no normal.

Se realizaron curvas de Roc para determinar el punto de mayor sensibilidad y especificidad para peor pronóstico sobre cada una de las proteínas estudiadas. La supervivencia se analizó mediante las curvas de Kaplan-Meier, utilizando la prueba de log-rank como estadística de contraste. Se realizaron modelos de regresión logística de Cox para determinar las variables asociadas, de manera independiente, a peor pronóstico.

V. RESULTADOS

V. RESULTADOS

1. PARÁMETROS CLÍNICOPATOLÓGICOS

1.1. Parámetros generales

Un total de 90 casos de tumores de cabeza y cuello localmente avanzados fueron incluidos en este estudio. La media de edad en el momento del diagnóstico fue de $59,7 \pm 10,9$ años y se observó una mayor frecuencia del sexo masculino con 78 casos (86,67%) que de mujeres (12 casos, 13,33%) con un ratio hombres:mujeres de 6,5:1. (figura 8).

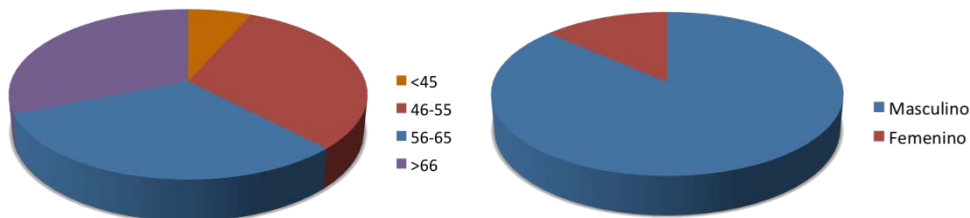


Figura 8. Distribución de casos según la edad (años) y género.

La localización tumoral más frecuente fue en la boca (25,56%), seguido de laringe (23,33%), lengua (20%), amígdala (15,56%), faringe (13,33%) y zona cervical (2,22%) (Figura 9).

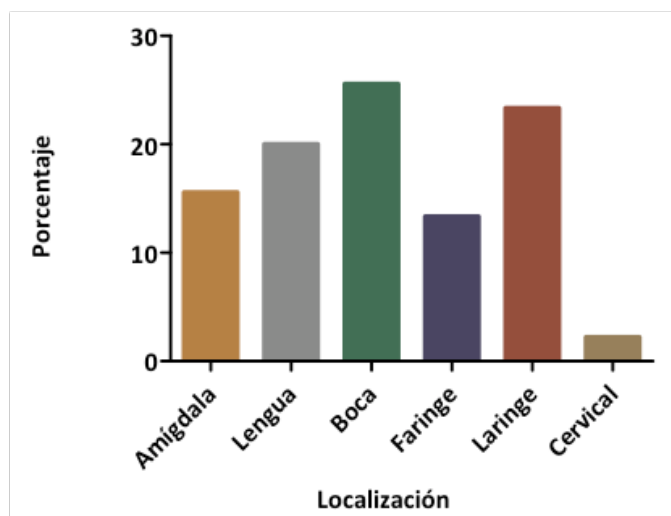


Figura 9. Distribución de casos según la localización tumoral.

En cuanto a la diferenciación histológica, no se observaron diferencias significativas entre los 3 grupos, presentando 24 casos tumores bien diferenciados (26,67%), 39 moderadamente diferenciados (43,33%) y 27 poco diferenciados (30%) (Figura 10).

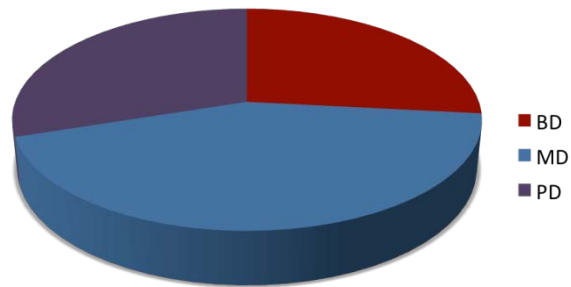


Figura 10. Distribución de casos según la diferenciación histológica.

Los parámetros clínicopatológicos generales estudiados se encuentran resumidos en la tabla 7.

Tabla 7. Características demográficas basales (n=90)^a

Variable clínicopatológica		Frecuencia (%)
Edad ^b		59,7 (10,9DE)
Sexo	Masculino	78 (86,7)
	Femenino	12 (13,3)
Consumo Alcohol		60 (72,29)
Tabaquismo		70 (84,34)
Localización	Boca	23 (25,6)
	Laringe	21 (23,3)
	Lengua	18 (20,0)
	Amígdala	14 (15,6)
	Faringe	12 (13,3)
	Cervical	2 (2,2)
	Clasificación T	T1
T2		14 (15,6)
T3		31 (34,4)
T4		40 (44,4)
Clasificación N	N0	25 (27,8)
	N1	14 (15,6)
	N2	48 (53,3)
	N3	3 (3,3)
Estadios TNM	I	4 (4,44%)
	II	2 (2,22%)
	III	20 (22,22%)
	IV	64 (71,11%)
Diferenciación	BD	24 (26,7)
	MD	39 (43,3)
	PD	27 (30,0)

^aDatos expresados como frecuencia (%) excepto cuando sea especificada.

^bMedia (Desviación estándar).

1.2. Clasificación TNM

De acuerdo a la clasificación global de TNM, se incluyeron 4 casos en estadio 1 (4,44%), 2 casos en estadio 2 (2,22%), 20 casos en estadio 3 (22,22%) y 64 casos en estadio 4 (71,11%).

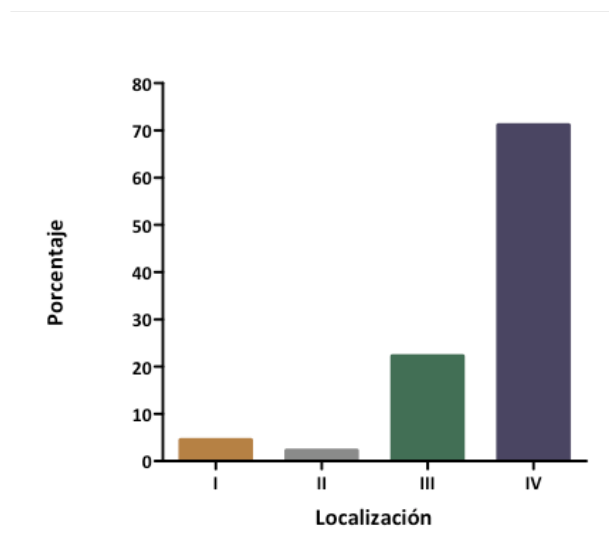


Figura 11. Distribución de casos según el estadio tumoral (Sistema de Clasificación TNM de la OMS, 2010).

Al desglosar dicha clasificación, se observó una distribución de tamaño tumoral (estadificación T del TNM) de 5,56% para T1, 15,56% para T2, 34,44% para T3, y 44,44% para T4 (figura 12).

La estadificación ganglionar fue evaluada como presente (N+) o ausente (N0) sin desglosar los parámetros del TNM (N1, N2 o N3), para facilitar los análisis estadísticos. En el momento del diagnóstico, 65 casos presentaban metástasis ganglionar (72,22%) frente a 25 casos (27,78%) sin evidencia de afectación ganglionar (figura 12).

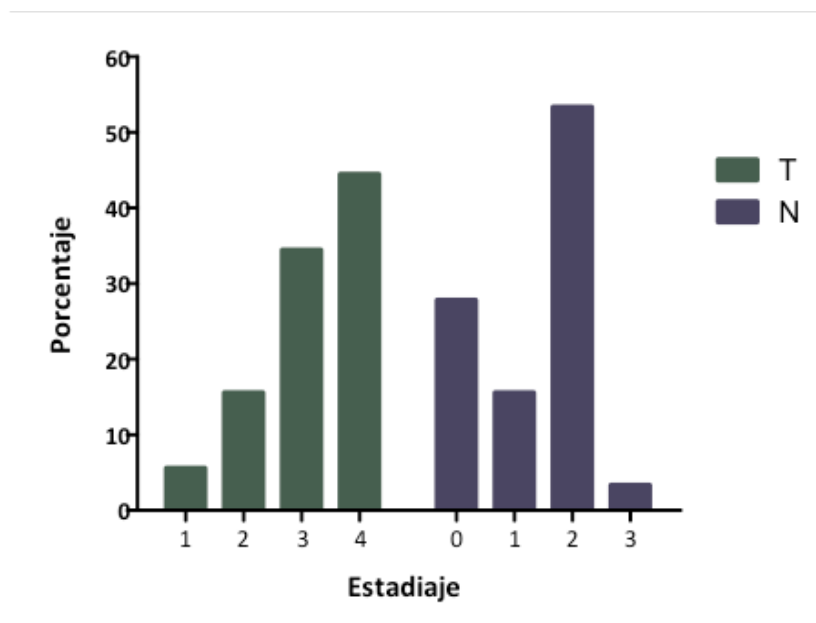


Figura 12. Distribución de casos según estadio T y N del Sistema de Clasificación TNM de la OMS (2010).

Globalmente, los pacientes que tenían diseminación ganglionar presentaron una supervivencia global significativamente menor en comparación a los pacientes sin metástasis ganglionares (92 vs 215 sem, $p=0.004$). Por el contrario, no hubo diferencias significativas en el tiempo medio de supervivencia libre de enfermedad entre los pacientes que presentaban o no diseminación ganglionar.

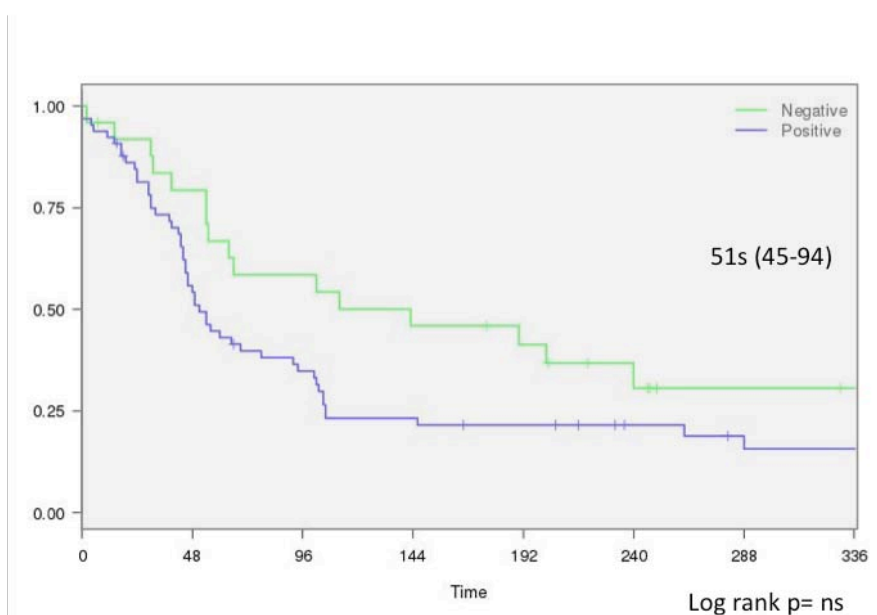


Figura 13. Mediana de supervivencia libre de enfermedad. Análisis de Kaplan Meier ajustado de acuerdo a la presencia de metástasis ganglionares.

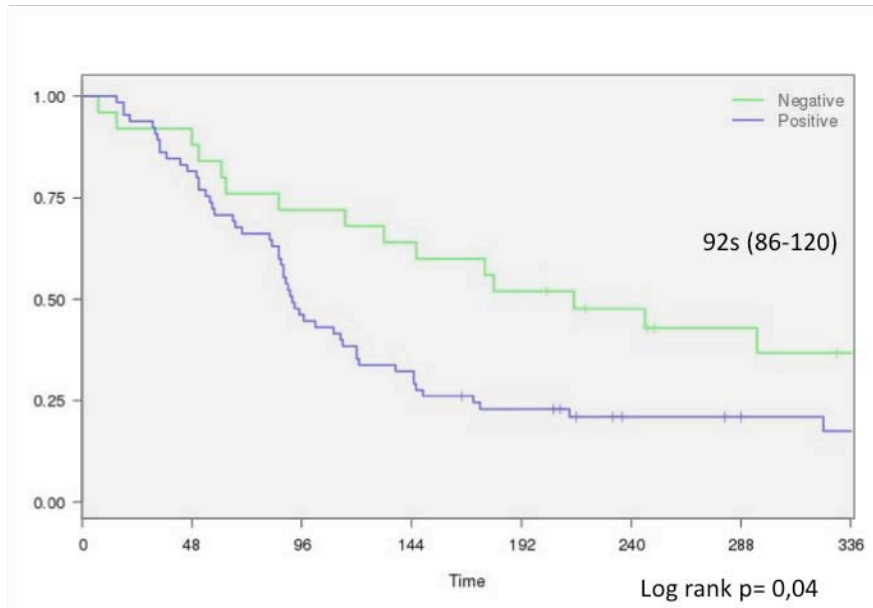


Figura 14. Mediana de supervivencia global. Análisis de Kaplan Meier ajustado de acuerdo a la presencia de metástasis ganglionares.

1.3. Factores de riesgo

Se observó una mayor frecuencia en pacientes que presentaban hábito tabáquico (84,34%), al igual que hábito alcohólico (72,29%). El 65,55% de los pacientes estudiados presentaban tanto hábito tabáquico como alcohólico a la vez (figura 15).

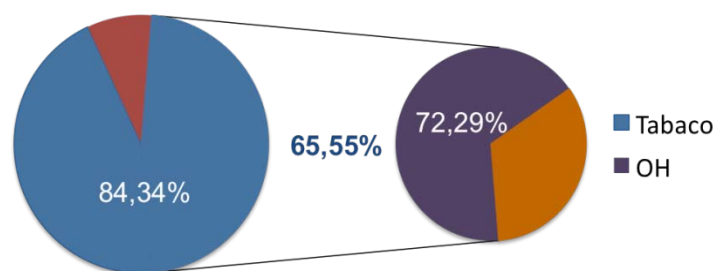


Figura 15. Proporción de pacientes con CCC y consumo de tabaco y alcohol.

En cuanto al estudio de supervivencia para valorar peor pronóstico en relación a la supervivencia global y libre de enfermedad, no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

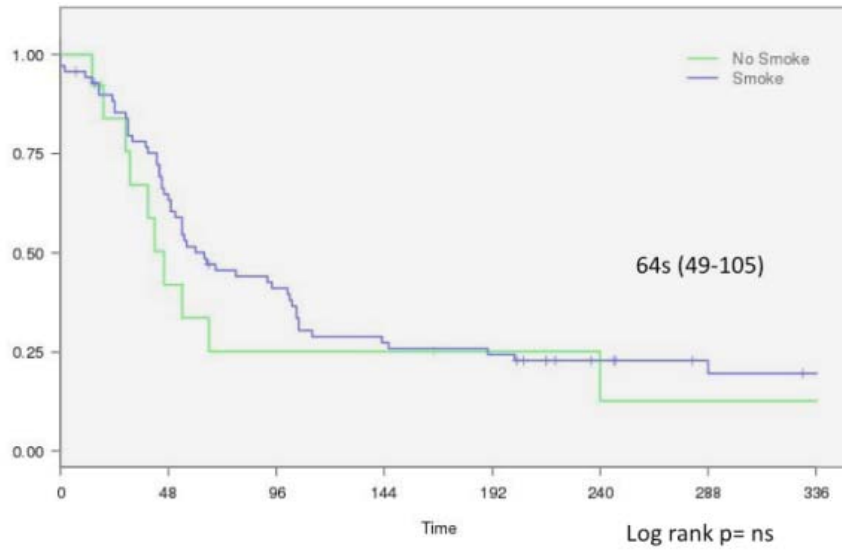


Figura 16. Mediana de supervivencia libre de enfermedad. Análisis de Kaplan Meier ajustado de acuerdo al consumo tabáquico.

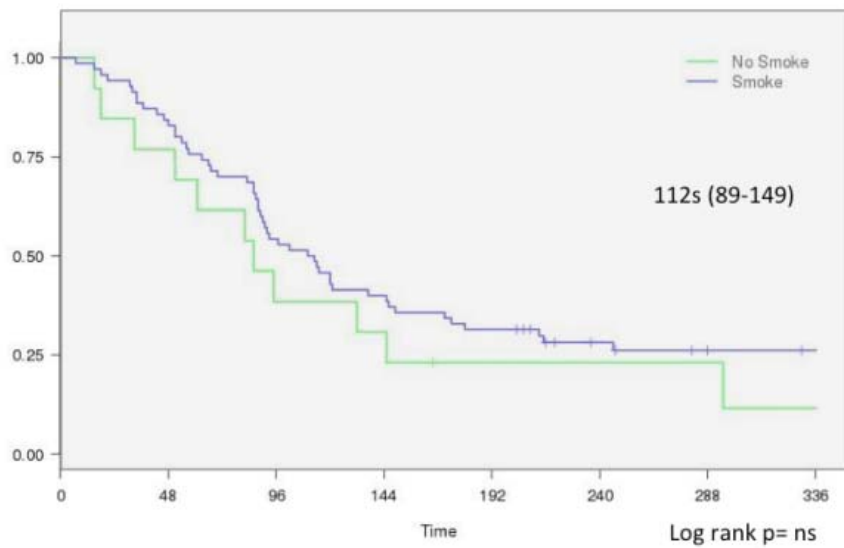


Figura 17. Mediana de supervivencia global. Análisis de Kaplan Meier ajustado de acuerdo al consumo tabáquico.

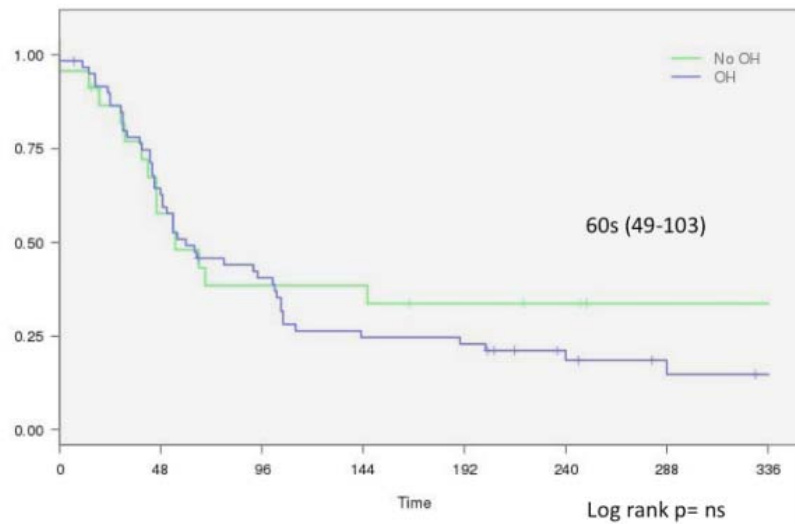


Figura 18. Mediana de supervivencia libre de enfermedad. Análisis de Kaplan Meier ajustado de acuerdo al consumo alcohólico.

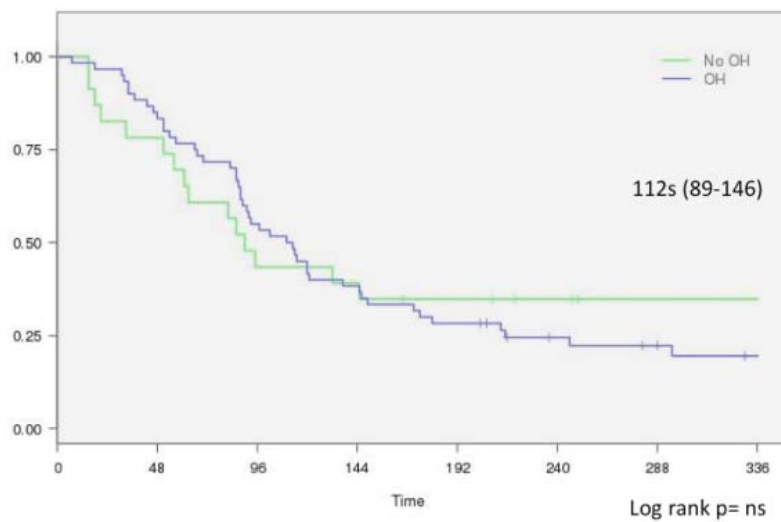


Figura 19. Mediana de supervivencia global. Análisis de Kaplan Meier ajustado de acuerdo al consumo alcohólico.

1.4. Tratamiento recibido

Del total de pacientes estudiados, el 57,77% fue sometido a intervención quirúrgica como primera opción. El resto, 42,23%, fue dirigido a tratamiento médico según los

criterios clínicos establecidos¹. Se fijaron tres ramas según el tratamiento recibido con RT asociado a Cetuximab (21 casos; 23,33%), QT asociado a Cetuximab (25 casos; 27,78%) y tratamiento convencional con QT y RT (44 casos; 48,89%).

1.5. Supervivencia libre de enfermedad y global

El seguimiento de los casos se estableció como requisito mínimo en dos años, siendo la mediana de 111,5 (58,75-214,5) semanas.

La mediana de supervivencia libre de enfermedad fue de 48,5 semanas (30-97,75).

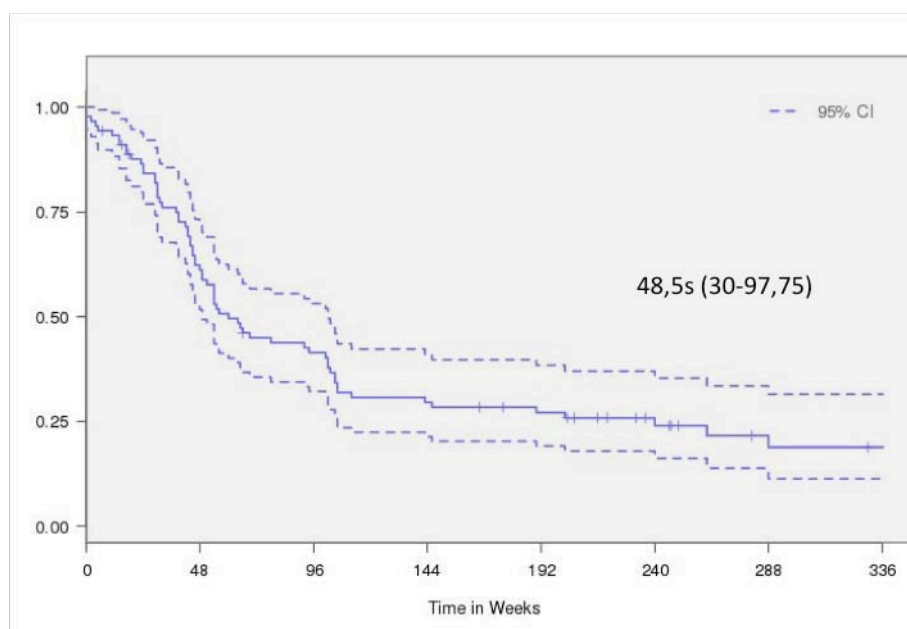


Figura 20. Mediana de supervivencia libre de enfermedad. Análisis de Kaplan Meier.

La mediana de supervivencia global fue de 88 (51-135,75) semanas. Hubo 3 casos de fallecimientos no relacionados con el CCC. Uno de ellos, con respuesta clínica completa a las 18 semanas del tratamiento, falleció por infarto agudo de miocardio. Otro paciente falleció por un carcinoma de pulmón (no relacionado con el CCC) a las 88 semanas del seguimiento, habiendo presentado una recidiva del CCC a las 54 semanas del diagnóstico. El tercer paciente falleció por una insuficiencia respiratoria secundaria

a una neumonía a las 120 semanas de seguimiento, habiendo presentado la primera recidiva a las 51 semanas del diagnóstico.

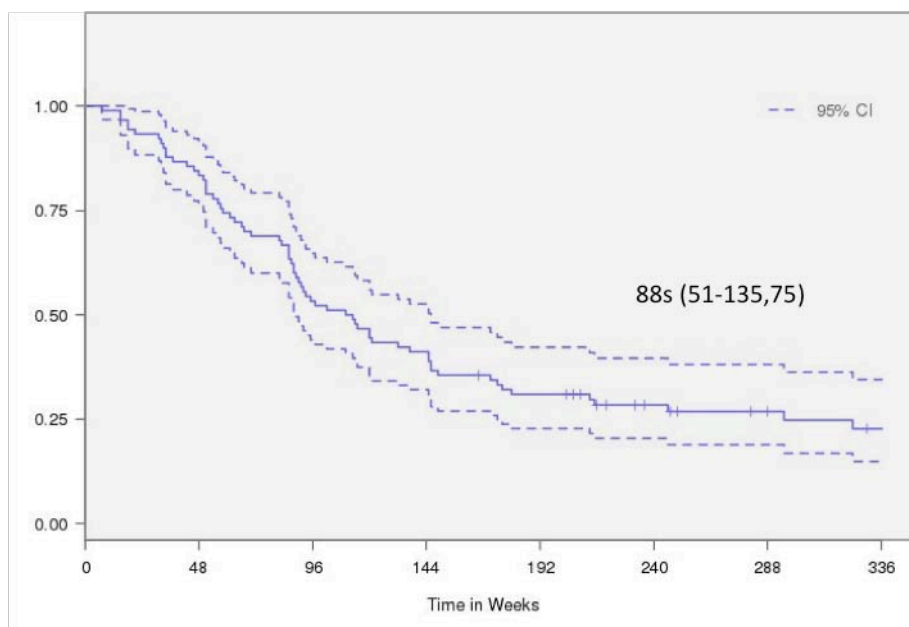


Figura 21. Mediana de supervivencia global. Análisis de Kaplan- Meier.

2. ESTUDIO DE VÍAS DE CARCINOGENESIS

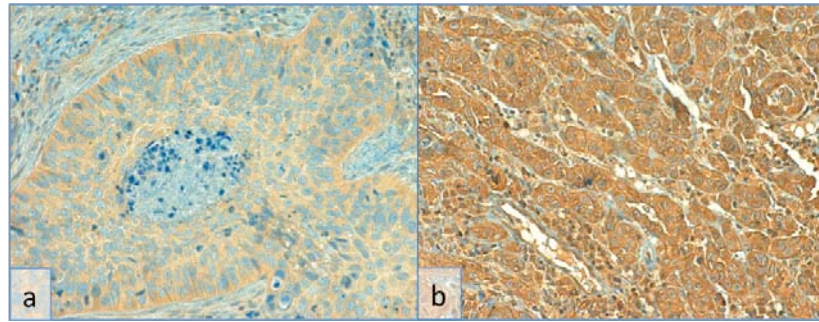
2.1. Vía de PI3K/AKT/mTOR

2.1.1. Estudio inmunohistoquímico

a. mTOR

La expresión de mTOR total fue citoplasmática y de membrana con expresión uniforme y homogénea en las células tumorales. El punto de corte obtenido mediante las curvas Roc con mayor sensibilidad y especificidad para el estudio de la proteína, fue de Hscore 125, tanto para la supervivencia libre de enfermedad como global, siendo la mediana de expresión de la proteína de Hscore 140 (60-200).

Figura 22. Expresión inmunohistoquímica de mTOR sobre tejido parafinado. 20X.



a. Expresión negativa, b. Expresión positiva (H-score 200).

Se observó un mayor riesgo a presentar recidivas (HR 2,05) en aquellos tumores considerados positivos a mTOR ($p < 0,01$) al igual que un menor tiempo a que aparezcan dichas recidivas con respecto a los tumores considerados negativos (54 semanas frente a 102, $p < 0,01$).

En cuanto a la supervivencia global, se observó un mayor riesgo (HR: 1,88; IC 95%: 1,14-3,10) estadísticamente significativo ($p = 0,01$) al compararlo con los tumores cuya expresión fue considerada negativa (H-score < 125). La supervivencia global fue significativamente menor en aquellos casos con expresión de mTOR, con una media de 93 semanas frente a 149 semanas en aquellos tumores negativos ($p = 0,01$) (tabla 8, figuras 23-24).

Tabla 8. Supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de mTOR.

mTOR (H-score > 125)		
	SLE	SG
HR	2,05	1,88
IC (95%)	1,23-3,43	1,14-3,10
P valor	$< 0,01$	0,01
Análisis de Kaplan Meier		
p valor	$< 0,01$	0,01
Semanas a evento (IC95%)	54 (43-94)	93 (86-132)

Evaluado mediante análisis univariante de Cox y Kaplan Meier. SLE: supervivencia libre de enfermedad, SG: supervivencia global.

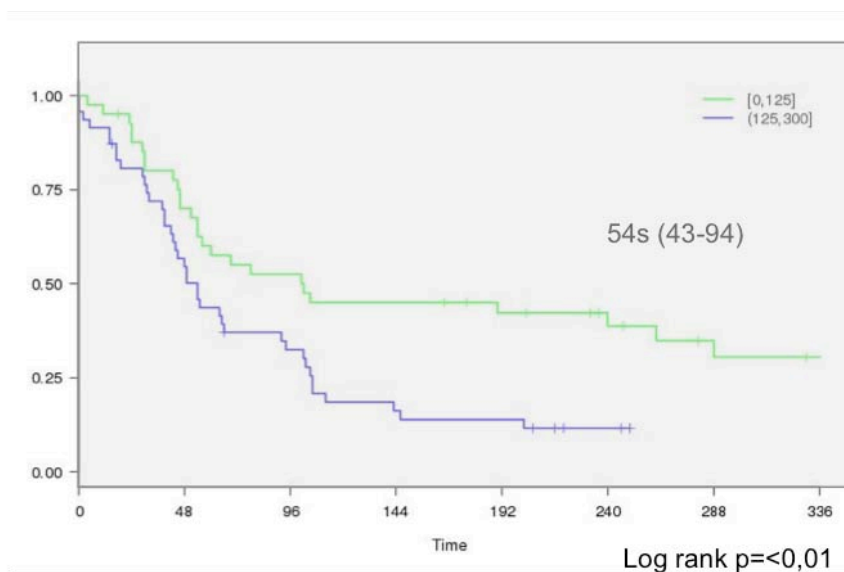


Figura 23. Mediana de supervivencia libre de enfermedad. Análisis de Kaplan Meier ajustado de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de mTOR.

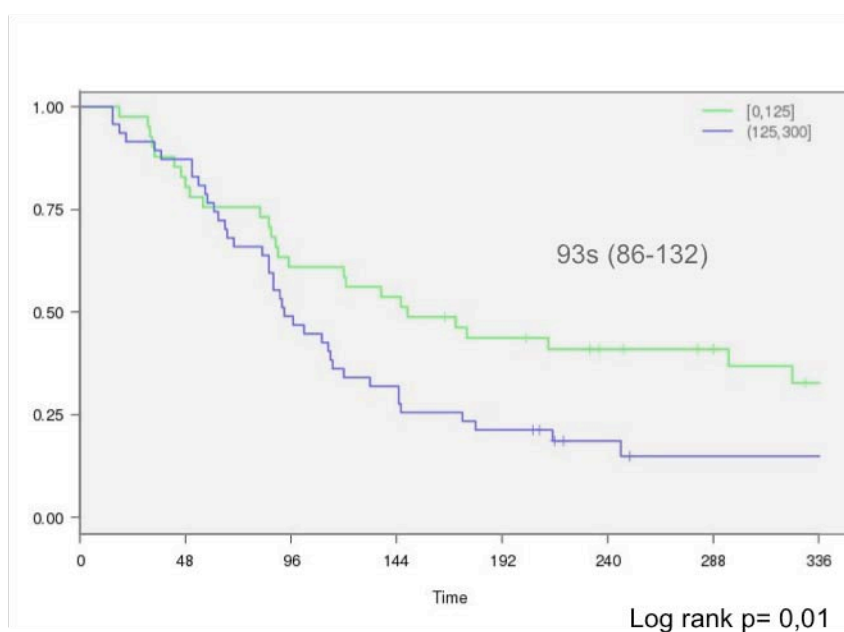


Figura 24. Mediana de supervivencia global. Análisis de Kaplan Meier ajustado de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de mTOR.

Al estudiar los casos según el tratamiento recibido, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la expresión de mTOR y el pronóstico de la enfermedad, tanto en riesgo a muerte como a recidivas (figura 25).

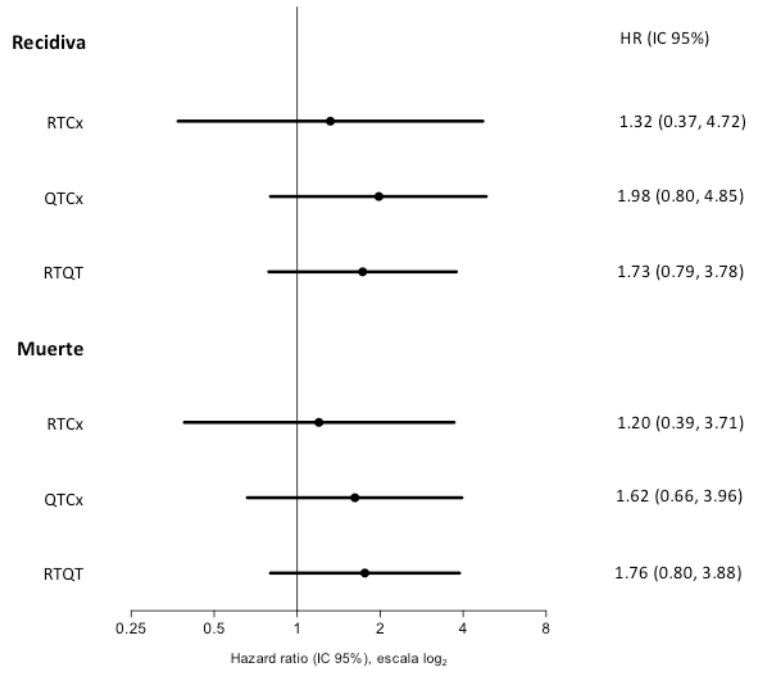
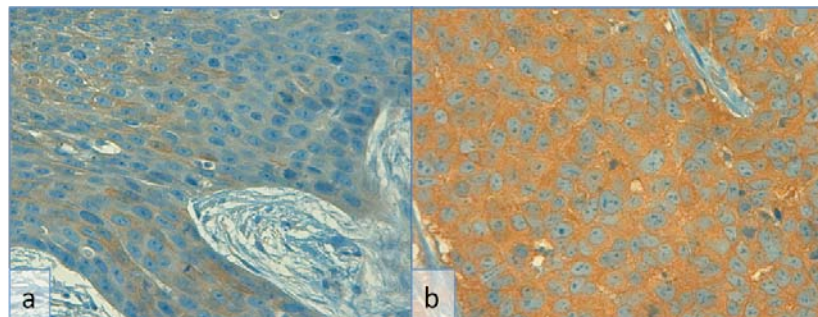


Figura 25. Riesgo de recidiva o muerte de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de mTOR y al tratamiento recibido.

b. pmTOR

La expresión de la forma fosforilada de mTOR (pmTOR) es citoplasmática y de membrana. Se observó una expresión leve de manera global con una mediana de Hscore 40 (20-102). El punto de mayor especificidad y sensibilidad para pmTOR fue de H-score: 65 para la supervivencia libre de enfermedad y 25 para la supervivencia global.

Figura 26. Expresión inmunohistoquímica de pmTOR sobre tejido parafinado (20X y 40X).



a. Expresión negativa, b. Expresión positiva (H-score 120).

En el estudio univariante, se observó un mayor riesgo tanto a recidivas como a muerte (HR: 1,52 y 1,37; respectivamente) en aquellos tumores que expresaban pmTOR, aunque los hallazgos no fueron significativos estadísticamente.

De la misma manera, se observó en el estudio de supervivencia por medio de las curvas de Kaplan Meier, la aparición de recidivas a 45 (39-94) semanas del diagnóstico y muerte a 97 (86-171) semanas, aunque las diferencias no fueron significativas estadísticamente (tabla 9).

Tabla 9. Supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de pmTOR.

pmTOR		
	SLE	SG
	>65	>25
HR	1,52	1,37
IC (95%)	0,92-2,52	0,80-2,36
P valor	ns	ns
Análisis de Kaplan Meier		
p valor	ns	ns
Semanas a evento (IC95%)	45 (39-94)	97 (86-171)

Evaluado mediante análisis univariante de Cox y Kaplan Meier. SLE: supervivencia libre de enfermedad, SG: supervivencia global.

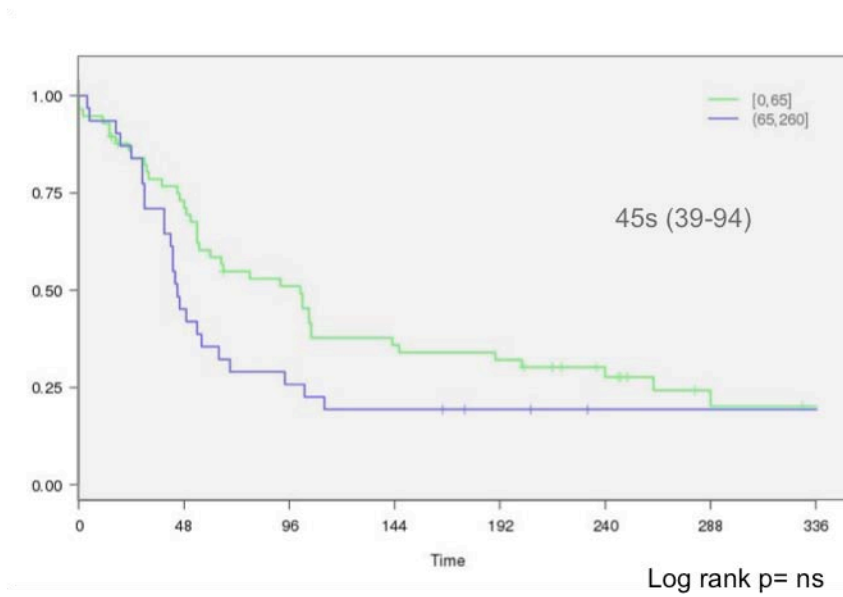


Figura 27. Mediana de supervivencia libre de enfermedad. Análisis de Kaplan Meier ajustado de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de pmTOR.

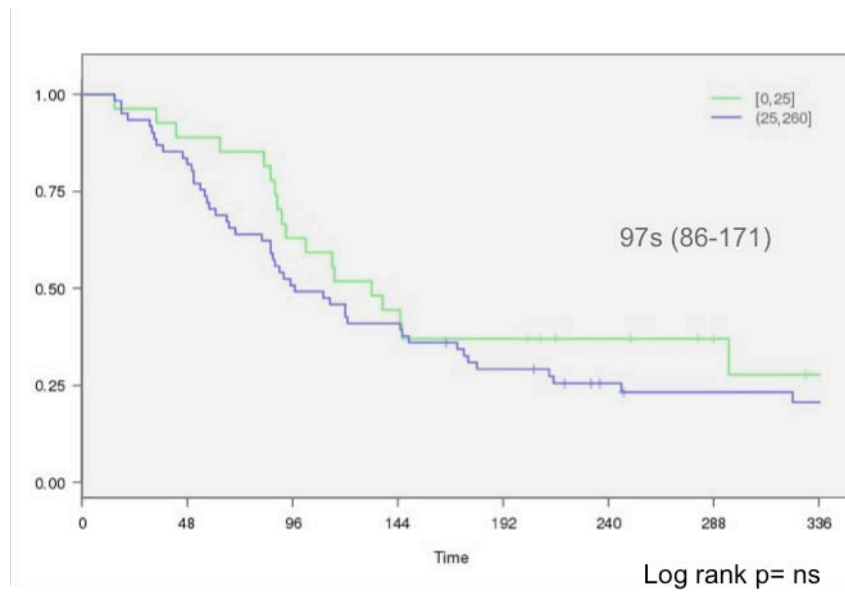


Figura 28. Mediana de supervivencia global. Análisis de Kaplan Meier ajustado de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de pmTOR.

Al realizar el estudio según los grupos de tratamiento, se observó un mayor riesgo a recidivas en aquellos pacientes tratados con RT-QT convencional ($p=0,03$), no así, en los tratados con QT o RT asociados a Cetuximab.

En cuanto al mayor riesgo de fallecimientos, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los tratamientos recibidos.

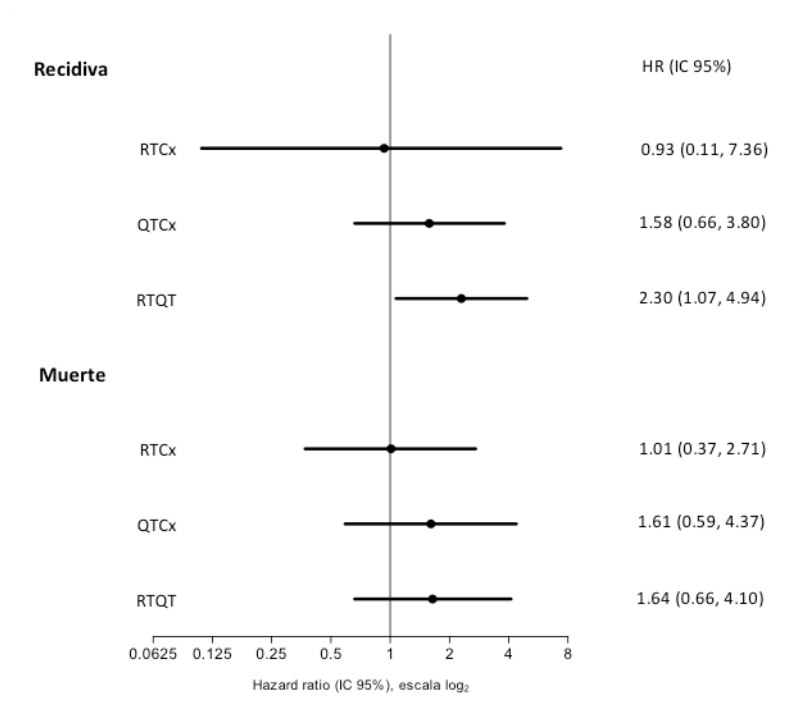
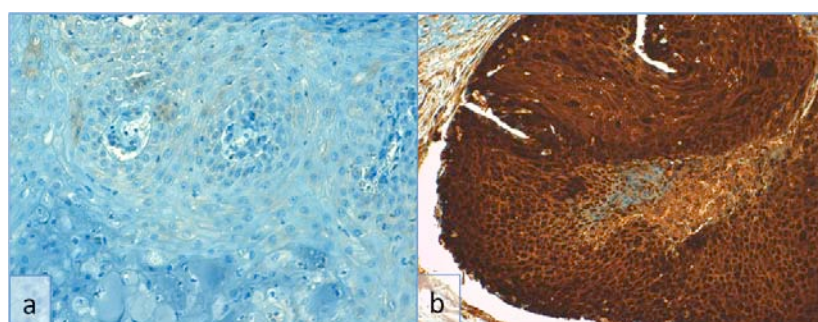


Figura 29. Riesgo de recidiva o muerte de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de pmTOR y al tratamiento recibido.

c. 4EBP1

La expresión de 4EBP1 en su forma no fosforilada fue encontrada en el citoplasma de las células tumorales. El punto de corte fue de H-score 245, concidiendo con la mediana de expresión (IC95% 180-300), para ambos eventos, tanto para la supervivencia global como libre de enfermedad.

Figura 30. Expresión inmunohistoquímica de 4EBP1 sobre tejido parafinado. 20X y 10X.



a. Expresión negativa, b. Expresión positiva (H-score 300).

La asociación entre la expresión de 4EBP1 y el pronóstico de la enfermedad, sea supervivencia libre de enfermedad o global, no fue significativo estadísticamente. A través de las curvas de Kaplan Meier, se observó un tiempo a recidivas de 58 (49-106) semanas y un tiempo a muerte de 112 (91-213) semanas, respectivamente, sin relación estadísticamente significativa (tabla 10).

Tabla 10. Supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de 4EBP1.

4EBP1 (H-score >245)		
	SLE	SG
HR	1,03	0,87
IC (95%)	0,63-1,67	0,54-1,41
P valor	ns	ns
Análisis de Kaplan Meier		
p valor	ns	ns
Semanas a evento (IC95%)	58 (49-106)	112 (91-213)

Evaluated using univariate analysis of Cox and Kaplan Meier. SLE: disease-free survival, SG: global survival.

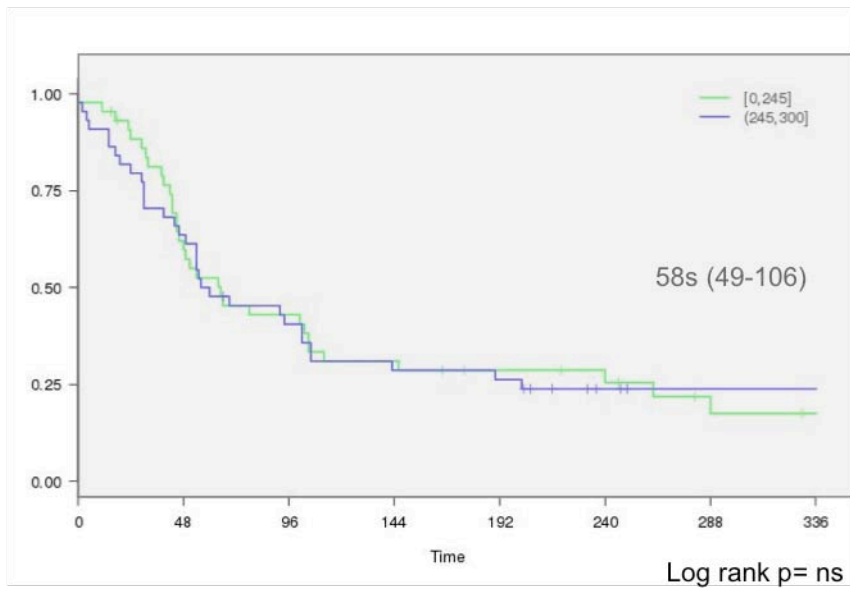


Figura 31. Mediana de supervivencia libre de enfermedad. Análisis de Kaplan Meier ajustado de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de 4EBP1.

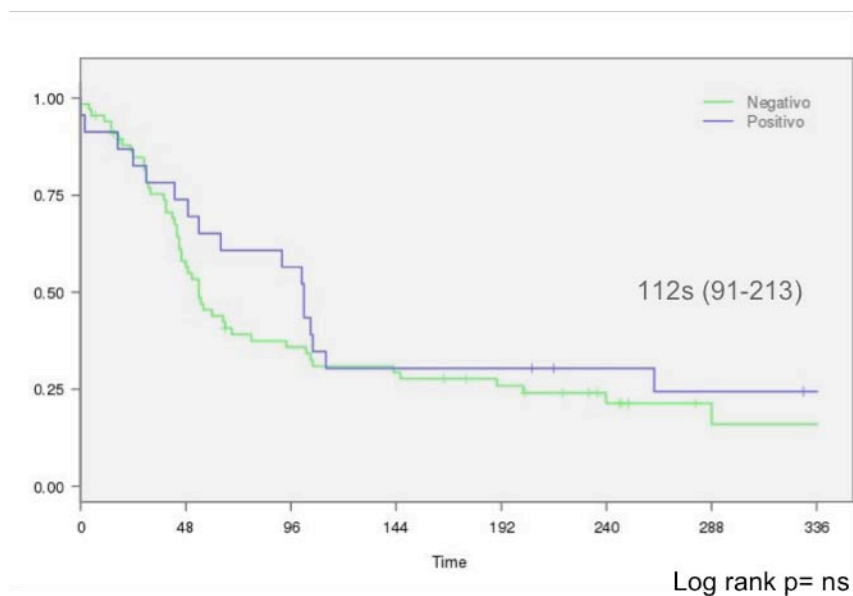


Figura 32. Mediana de supervivencia global. Análisis de Kaplan Meier ajustado de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de 4EBP1.

Tampoco se observaron diferencias significativas en cuanto a la expresión de 4EBP1 y el pronóstico de la enfermedad según el tipo de tratamiento recibido.

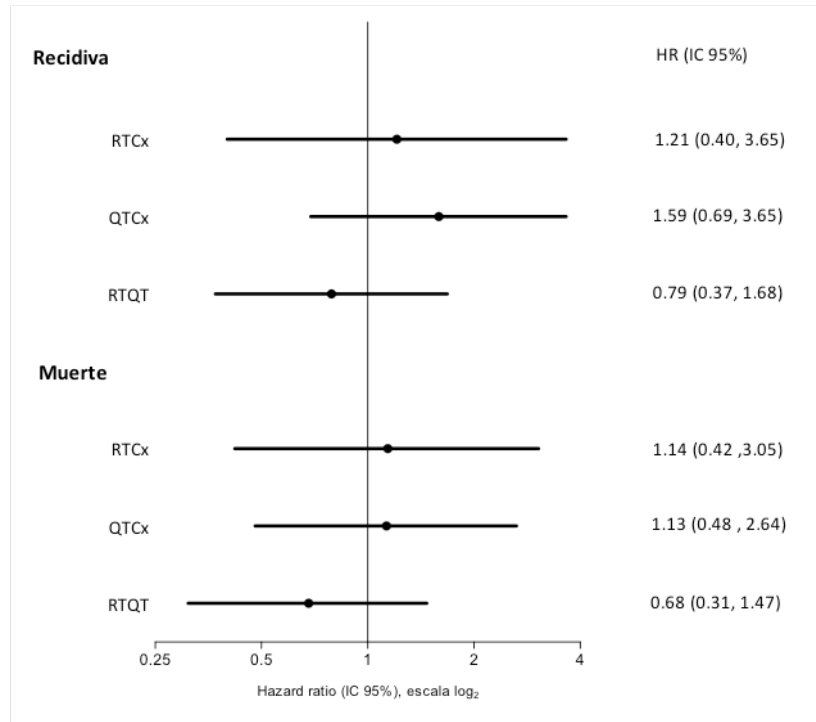


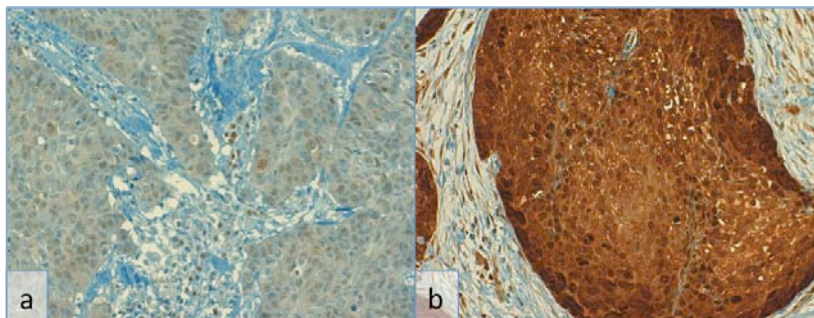
Figura 33. Riesgo de recidiva o muerte de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de 4EBP1 y al tratamiento recibido.

d. p4EBP1

La forma fosforilada de 4EBP1 (p4EBP1) se observó mayoritariamente en los citoplasmas de las células tumorales, con menor proporción en los núcleos tumorales.

La mediana de expresión fue de Hscore 60 (20-137,5), con un punto de corte de 50 para la supervivencia libre de enfermedad y 70 para la supervivencia global.

Figura 34. Expresión inmunohistoquímica de p4EBP1 sobre tejido parafinado. 10X.



a. Expresión negativa, b. Expresión positiva (H-score 260).

Por medio del análisis de Cox, se observó un mayor riesgo de recidivas (HR 1,32) y de muerte (HR 1,37) para aquellos pacientes cuyos tumores expresaban p4EBP1, aunque no fueron estadísticamente significativos.

De la misma manera, se observó una supervivencia libre de enfermedad (60 semanas, 46-103) así como una supervivencia global (113 semanas, 88-146) menor en aquellos tumores p4EBP1 positivos, sin ser hallazgos estadísticamente significativos (tabla 11).

Tabla 11. Supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de p4EBP1.

p4EBP1		
	SLE	SG
	>50	>70
HR	1,32	1,37
IC (95%)	0,81-2,15	0,84-2,22
P valor	ns	ns
Análisis de Kaplan Meier		
p valor	ns	ns
Semanas a evento (IC95%)	60 (46-103)	113 (88-146)

Evaluado mediante análisis univariante de Cox y Kaplan Meier. SLE: supervivencia libre de enfermedad, SG: supervivencia global.

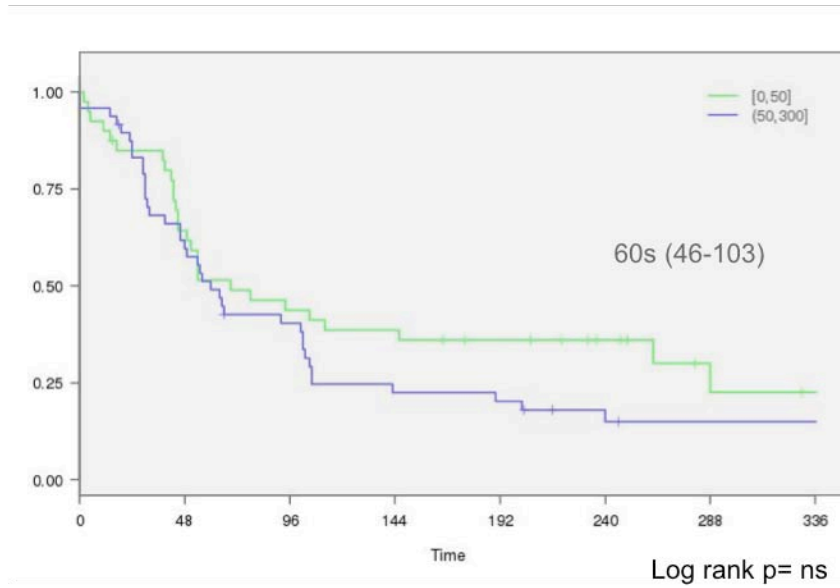


Figura 35. Mediana de supervivencia libre de enfermedad. Análisis de Kaplan Meier ajustado de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de p4EBP1.

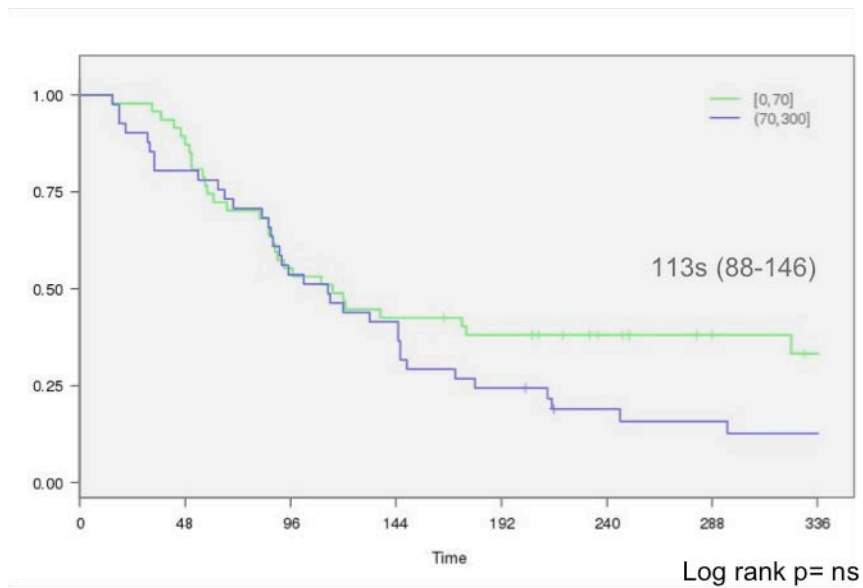


Figura 36. Mediana de supervivencia global. Análisis de Kaplan Meier ajustado de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de p4EBP1.

Al realizar el estudio por grupos de tratamiento, tampoco se hallaron diferencias estadísticamente significativas, aunque de manera global se observó mayor riesgo tanto a recidivas como muerte independientemente del tratamiento realizado.

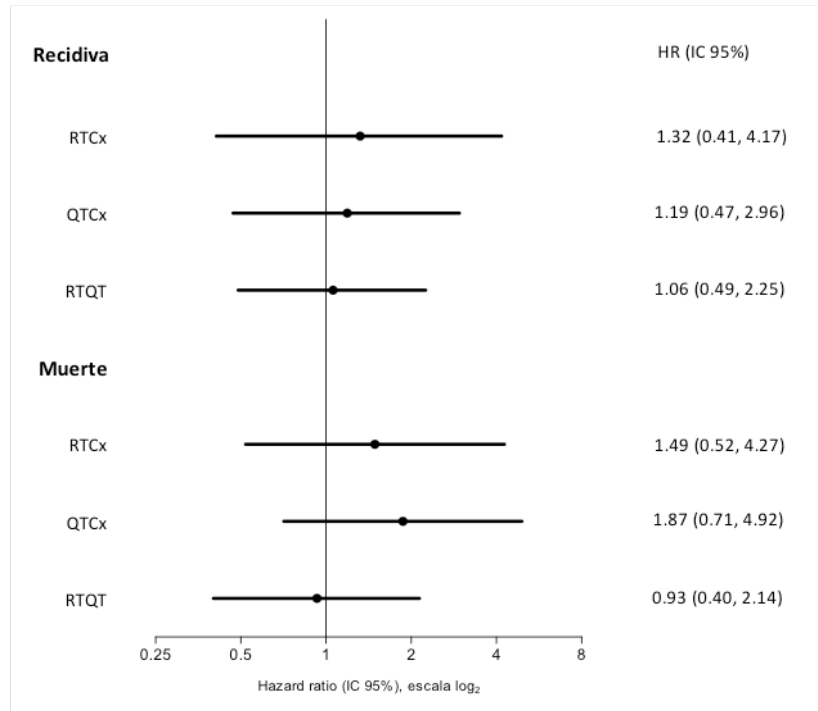
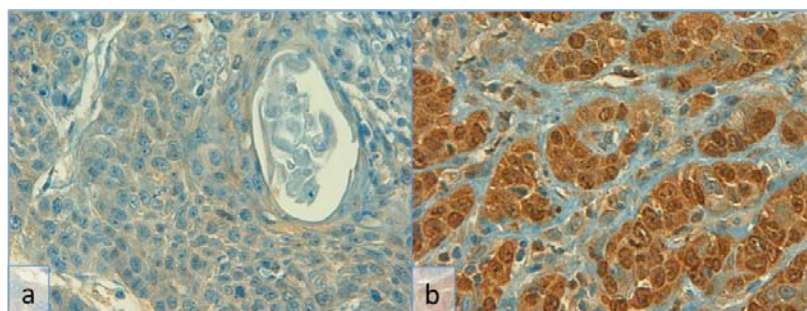


Figura 37. Riesgo de recidiva o muerte de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de p4EBP1 y al tratamiento recibido.

e. eIF4E

La técnica de inmunohistoquímica de eIF4E demuestra expresión en las células tumorales de predominio en membrana y citoplasma. La mediana de expresión fue de Hscore 185 (80-245), siendo el punto de corte con mayor sensibilidad y especificidad para su estudio de Hscore 115 para la supervivencia libre de enfermedad y Hscore 135 para la supervivencia global.

Figura 38. Expresión inmunohistoquímica de eIF4E sobre tejido parafinado. 20X.



a. Expresión negativa, b. Expresión positiva (H-score 180).

Al realizar el estudio univariante de Cox, se observó un mayor riesgo (HR 1,67; 1-2,78) de recidivas en aquellos pacientes cuyos tumores expresaban eIF4E >115 (p=0,04). De la misma manera se observó, por medio de las curvas de Kaplan Meier, un menor tiempo a recidivas, presentándose a las 54 semanas (45-102) frente a 66 semanas en aquellos casos negativos a eIF4E (p=0,04).

En cuanto a la supervivencia global, se observó un mayor riesgo de muerte (HR 1,50; 0,91-2,47) así como menor tiempo de presentación (102 semanas; 90-137 frente a 149 semanas) pero sin valor estadísticamente significativo (tabla 12).

Tabla 12. Supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de eIF4E.

eIF4E		
	SLE	SG
	>115	>135
HR	1,67	1,50
IC (95%)	1,00-2,78	0,91-2,47
P valor	0,04	ns
Análisis de Kaplan Meier		
p valor	0,047	ns
Semanas a evento (IC95%)	54 (45-102)	102 (90-137)

Evaluado mediante análisis univariante de Cox y Kaplan Meier. SLE: supervivencia libre de enfermedad, SG: supervivencia global.

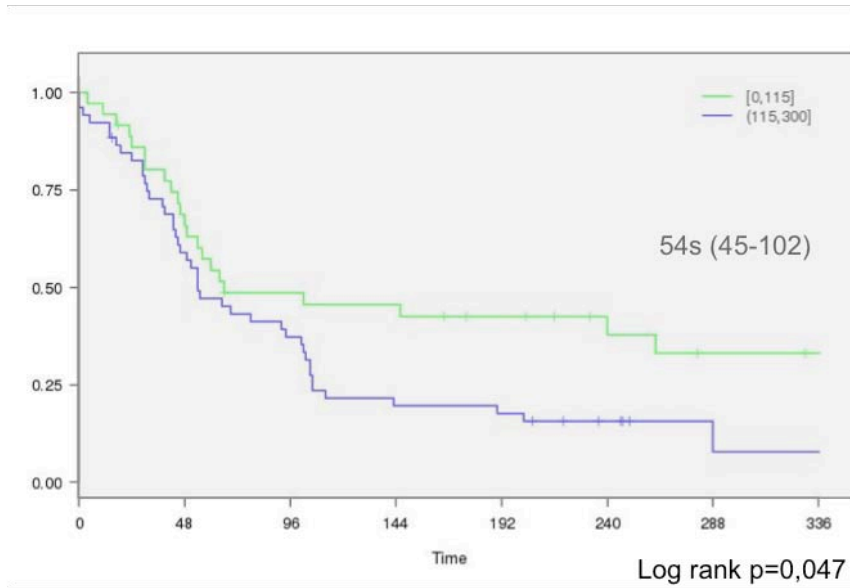


Figura 39. Mediana de supervivencia libre de enfermedad. Análisis de Kaplan Meier ajustado de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de eIF4E.

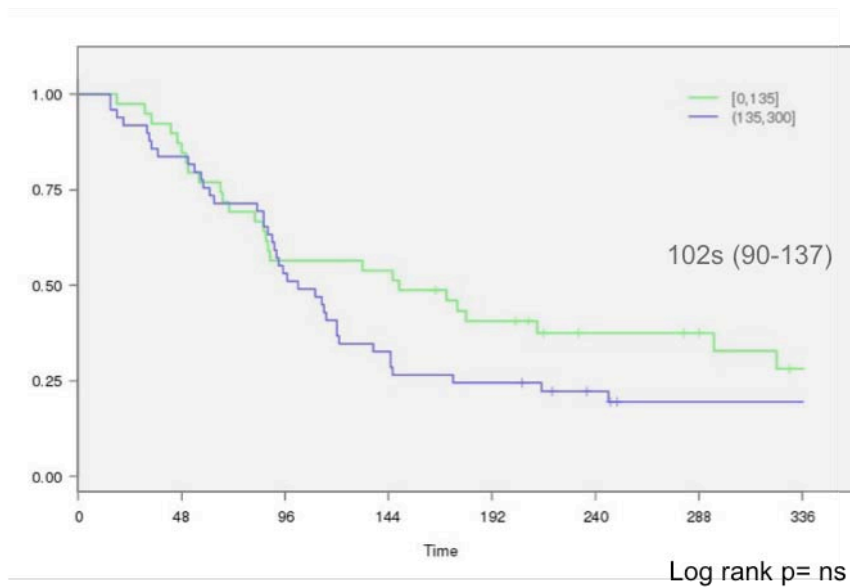


Figura 40. Mediana de supervivencia global. Análisis de Kaplan Meier ajustado de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de eIF4E.

Al realizar el estudio separando por grupos de tratamiento, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos establecidos.

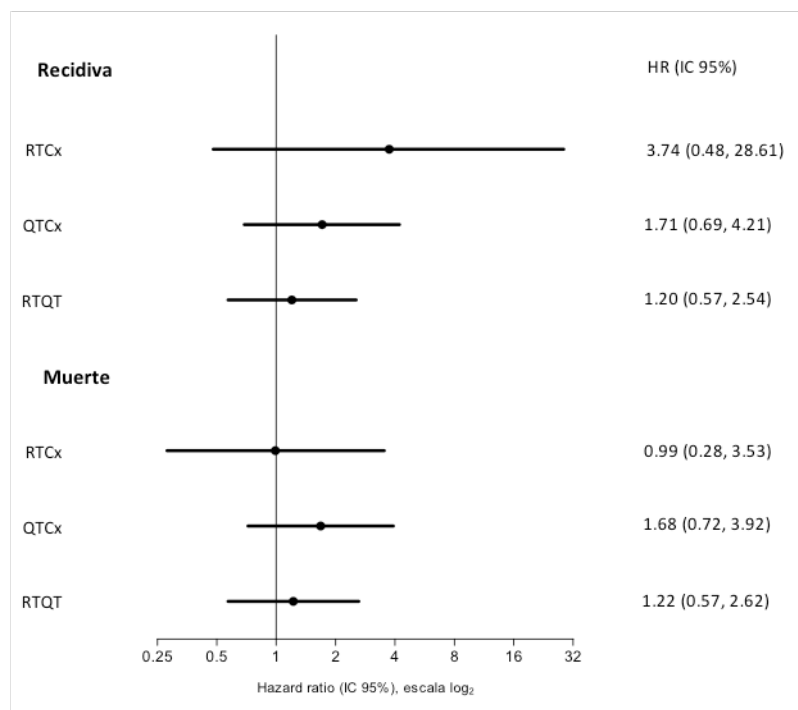
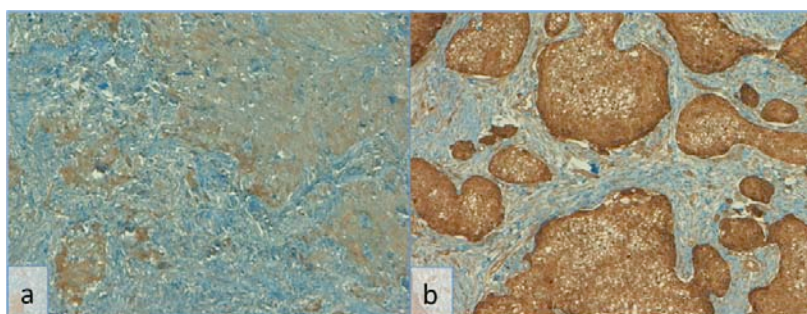


Figura 41. Riesgo de recidiva o muerte de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de eIF4E y al tratamiento recibido.

f. pEIF4E

La expresión de la forma fosforilada de eIF4E (peIF4E) se observó principalmente en los citoplasmas de las células tumorales. Se identificó en general una tinción moderada-intensa, obteniéndose una mediana de Hscore 250 (185-287,5). El punto de corte para el estudio de supervivencia libre de enfermedad fue de Hscore 275 y para la supervivencia global fue de 235.

Figura 42. Expresión inmunohistoquímica de peIF4E sobre tejido parafinado. 10X.



a. Expresión negativa, b. Expresión positiva (H-score 280).

En cuanto al estudio de riesgos, tanto para recidivas como para muertes, no fue significativo estadísticamente. De igual manera, el estudio de supervivencia mediante las curvas de Kaplan Meier, tampoco fue significativo estadísticamente (tabla 13).

Tabla 13. Supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de peIF4E.

peIF4E		
	SLE	SG
	>275	>235
HR	0,91	0,67
IC (95%)	0,54-1,51	0,41-1,09
P valor	ns	ns
Análisis de Kaplan Meier		
p valor	ns	ns
Semanas a evento (IC95%)	69 (43-202)	145 (97-213)

Evaluado mediante análisis univariante de Cox y Kaplan Meier. SLE: supervivencia libre de enfermedad, SG: supervivencia global.

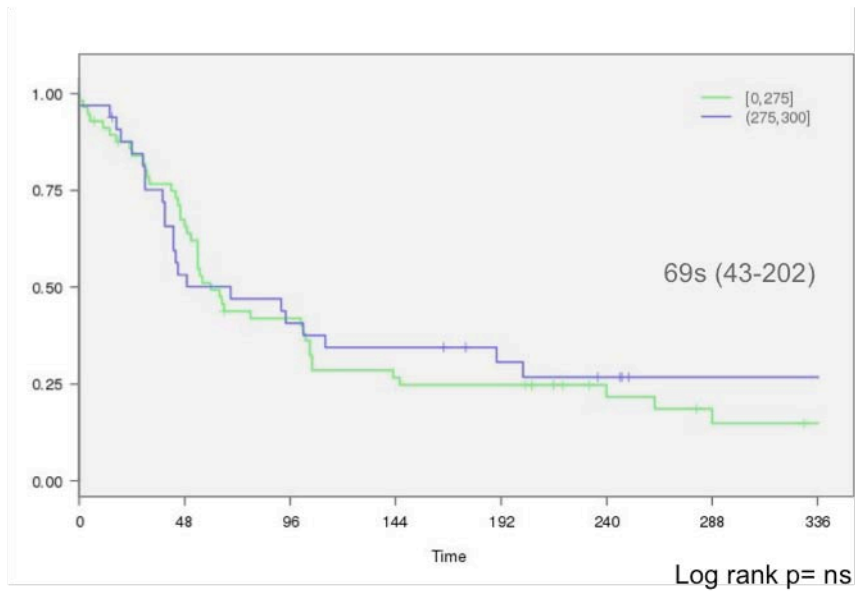


Figura 43. Mediana de supervivencia libre de enfermedad. Análisis de Kaplan Meier ajustado de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de pIF4E.

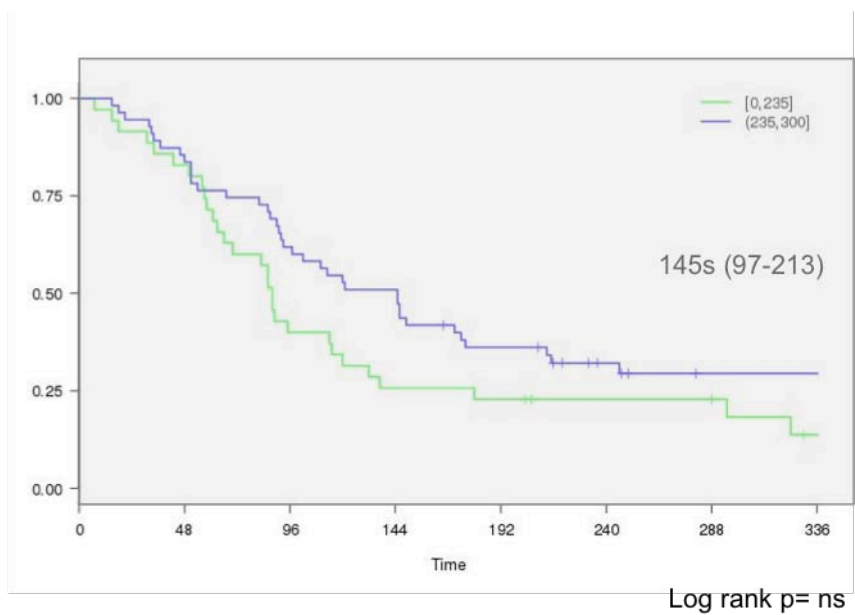


Figura 44. Mediana de supervivencia global. Análisis de Kaplan Meier ajustado de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de pIF4E.

Al separar por grupos de tratamiento, no se observaron diferencias significativas en cuanto al riesgo a recidivas o muerte.

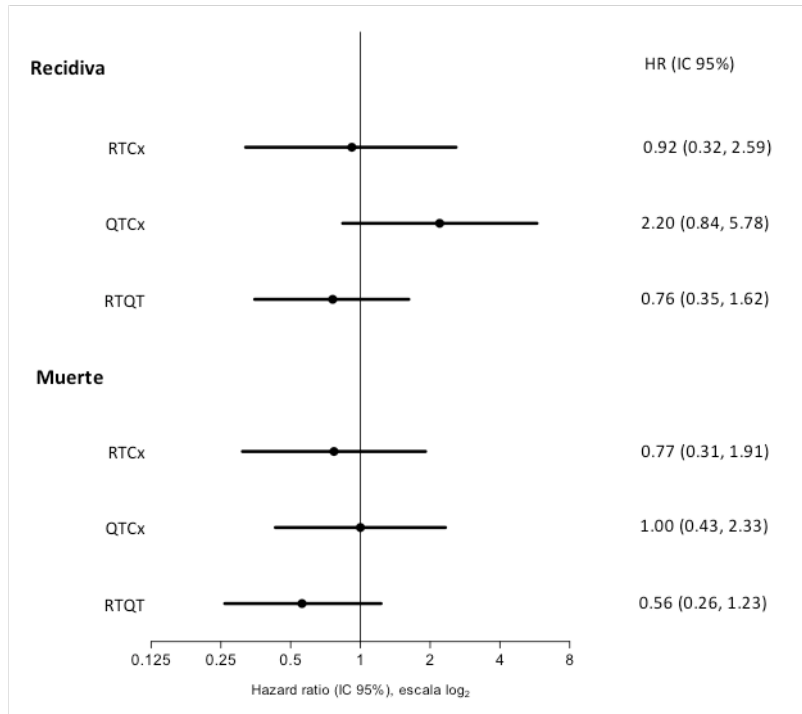
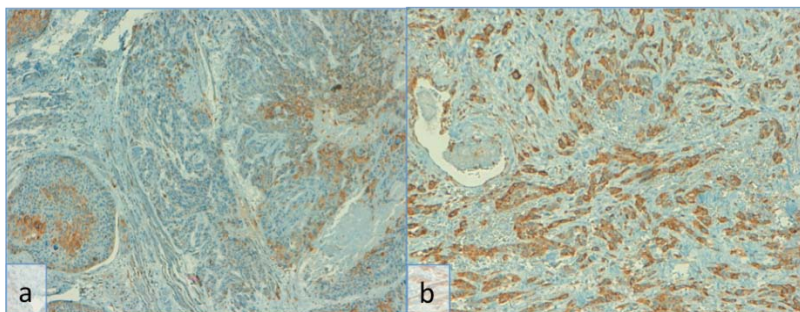


Figura 45. Riesgo de recidiva o muerte de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de pelf4E y al tratamiento recibido.

g. pS6

La expresión inmunohistoquímica de la forma fosforilada de S6 (pS6) se observa en los citoplasmas de las células tumorales. La mediana de tinción fue de Hscore 60, con expresión bastante heterogénea entre los casos, presentando un intervalo de confianza del 95% entre 0 y 180. El punto de corte por medio de las curvas Roc para valorar la supervivencia global y libre de enfermedad coincide en Hscore 70.

Figura 46. Expresión inmunohistoquímica de pS6 sobre tejido parafinado. 10X.



a. Expresión negativa, b. Expresión positiva (H-score 140).

El análisis tanto para la supervivencia global como libre de enfermedad por medio de la prueba de Cox, no demuestra ninguna relación estadísticamente significativa.

Las curvas de Kaplan Meier demuestran menor tiempo a recidivas (56 semanas frente a 92) y a muerte (89 semanas frente a 137) sin ser relaciones estadísticamente significativas (tabla 14).

Tabla 14. Supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de pS6.

pS6 (H-score >70)		
	SLE	SG
HR	0,79	1,10
IC (95%)	0,48-1,30	0,68-1,80
P valor	ns	ns
Análisis de Kaplan Meier		
p valor	ns	ns
Semanas a evento (IC95%)	56 (45-NA)	89 (66-213)

Evaluado mediante análisis univariante de Cox y Kaplan Meier. SLE: supervivencia libre de enfermedad, SG: supervivencia global.

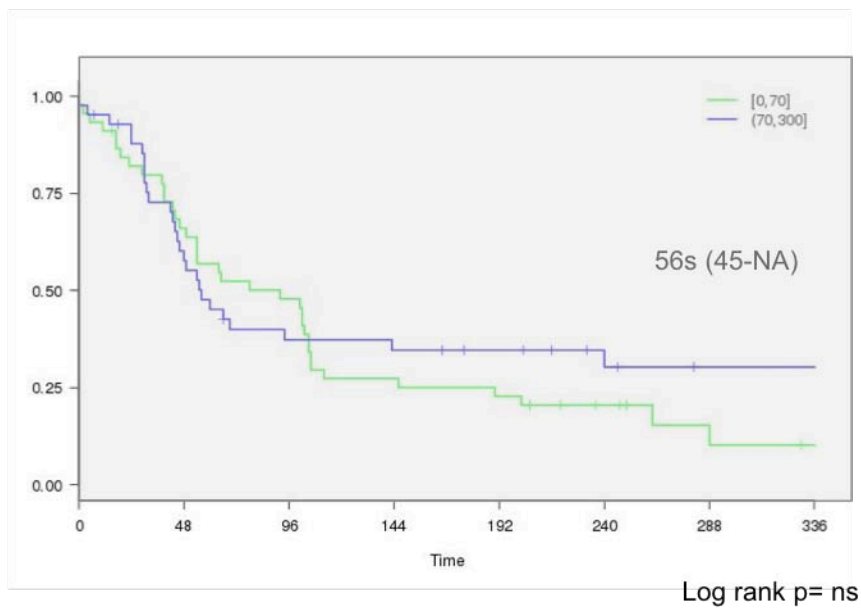


Figura 47. Mediana de supervivencia libre de enfermedad. Análisis de Kaplan Meier ajustado de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de pS6.

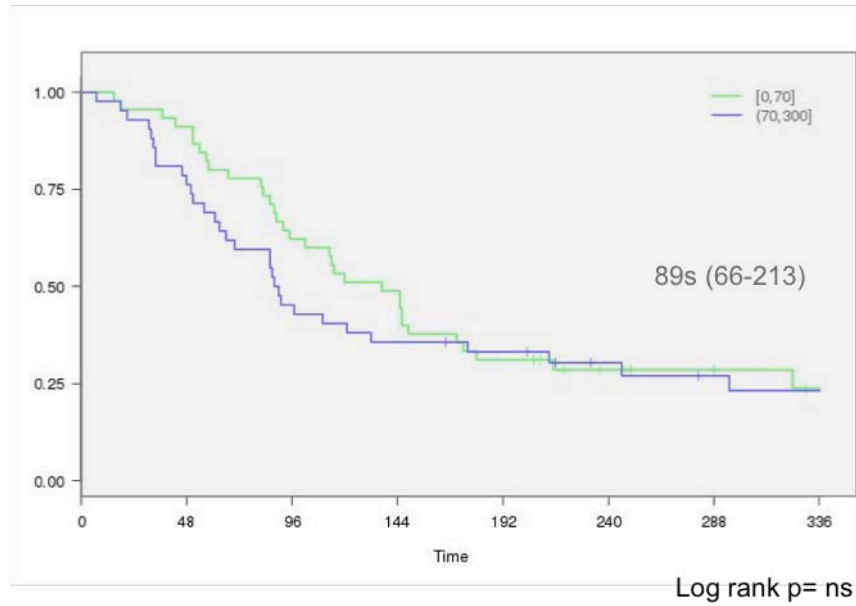


Figura 48. Mediana de supervivencia global. Análisis de Kaplan Meier ajustado de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de pS6.

Al realizar el estudio separando por grupos de tratamiento, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos establecidos.

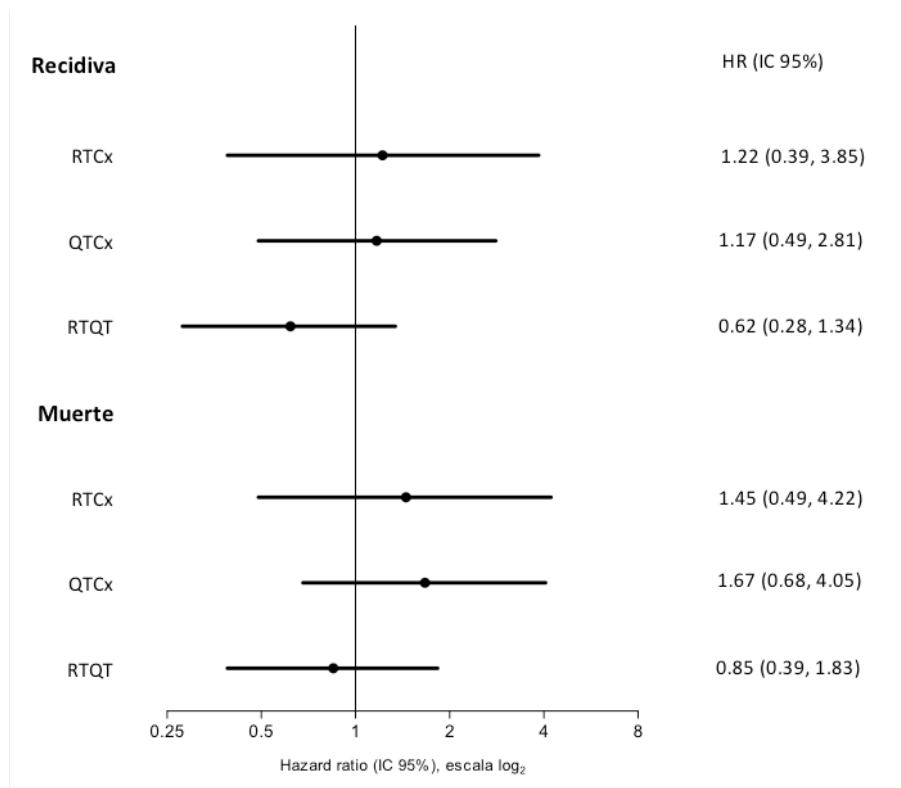
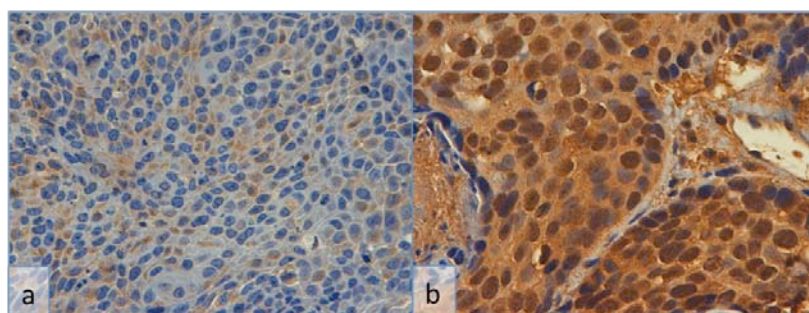


Figura 49. Riesgo de recidiva o muerte de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de pS6 y al tratamiento recibido.

h. PTEN

La expresión de la proteína supresora PTEN se observa en las membranas y citoplasmas de las células tumorales, con leve tinción nuclear. La expresión en la serie de casos estudiada fue baja, obteniendo una mediana de Hscore 10 (0-40). El punto de corte fue establecido en Hscore 15, tanto para la supervivencia global como libre de enfermedad.

Figura 50. Expresión inmunohistoquímica de PTEN sobre tejido parafinado. 20X y 40X.



a. Expresión negativa, b. Expresión positiva (H-score 60).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas al estudiar la supervivencia tanto por el análisis de Cox como por las curvas de Kaplan Meier (tabla 15).

Tabla 15. Supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de PTEN.

PTEN (H-score >15)		
	SLE	SG
HR	1,42	1,04
IC (95%)	0,87-2,31	0,64-1,68
P valor	ns	ns
Análisis de Kaplan Meier		
p valor	ns	ns
Semanas a evento (IC95%)	54 (38-105)	113 (91-180)

Evaluado mediante análisis univariante de Cox y Kaplan Meier. SLE: supervivencia libre de enfermedad, SG: supervivencia global.

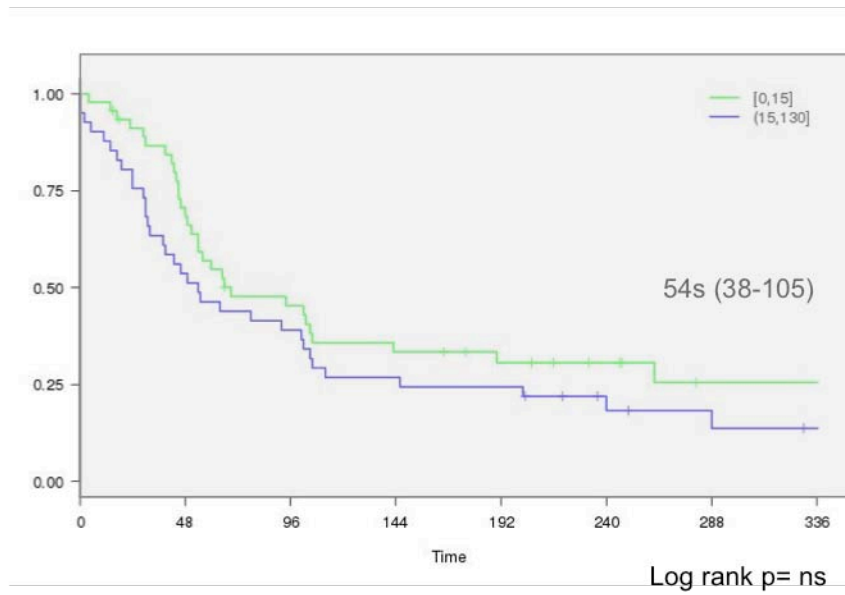


Figura 51. Mediana de supervivencia libre de enfermedad. Análisis de Kaplan Meier ajustado de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de PTEN.

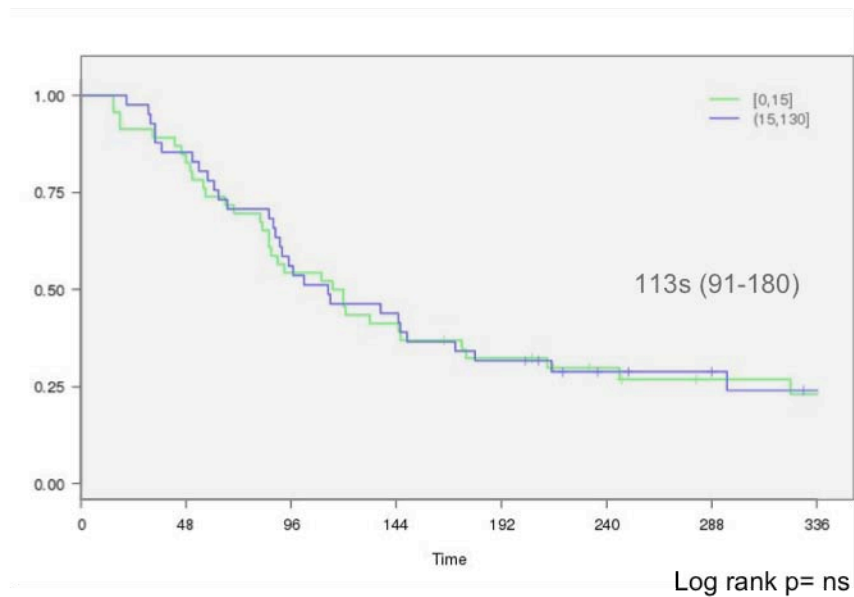


Figura 52. Mediana de supervivencia global. Análisis de Kaplan Meier ajustado de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de PTEN.

Tras separar los casos según el tratamiento recibido, no se observaron diferencias significativas en cuanto al riesgo de recidivas o muerte.

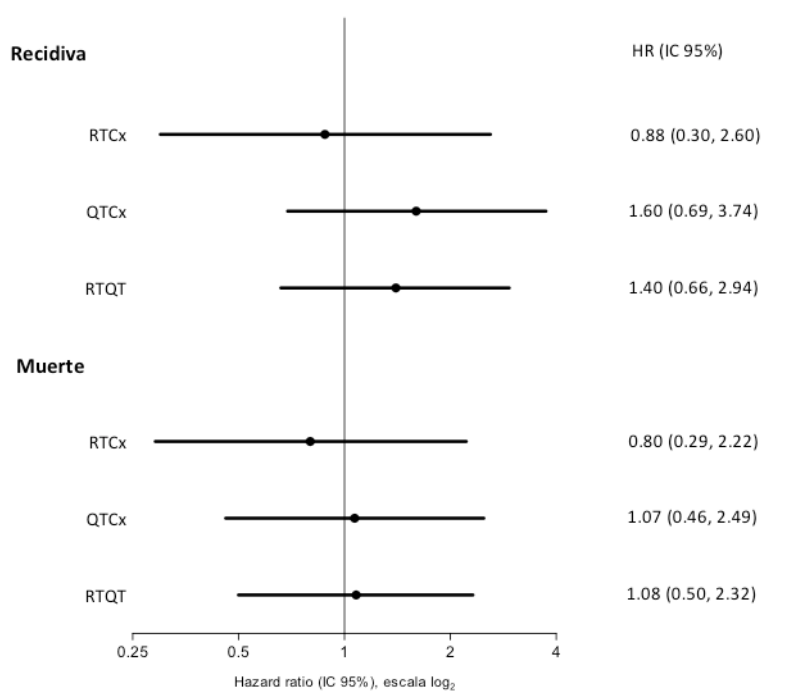


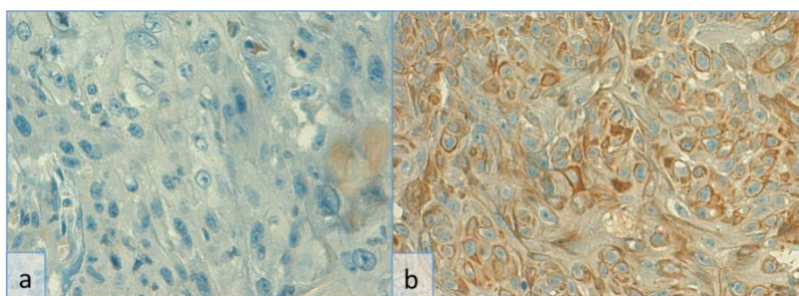
Figura 53. Riesgo de recidiva o muerte de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de PTEN y al tratamiento recibido.

i. HER3

HER3 fue valorado según la intensidad de expresión de predominio en membrana y en menor grado en citoplasma. No se observó tinción nuclear de las células evaluadas.

Se obtuvieron dos grupos de acuerdo al nivel de expresión de HER3, agrupando los casos considerados negativos, que incluyeron aquellos con tinción 0: ausente (13%), 1: leve (10%) y 2: moderada en <10% de células tumorales (14%) con un total de 37% de casos (28 casos). Los casos considerados positivos con tinción 3: moderada e intensa en >10% de células tumorales, constituyeron el 63% de los casos (49 casos).

Figura 54. Expresión inmunohistoquímica de HER3 sobre tejido parafinado. 40X.



a. Expresión negativa (0), b. Expresión positiva (3+).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas al estudiar la supervivencia global y libre de enfermedad de acuerdo a la expresión de HER3 (tabla 16).

Tabla 16. Supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de HER3.

HER3		
	SLE	SG
HR	0,89	0,80
IC (95%)	0,47-1,66	0,43-1,47
P valor	ns	ns
Análisis de Kaplan Meier		
p valor	ns	ns
Semanas a evento (IC95%)	69 (49-106)	121 (90-180)

Evaluado mediante análisis univariante de Cox y Kaplan Meier. SLE: supervivencia libre de enfermedad, SG: supervivencia global.

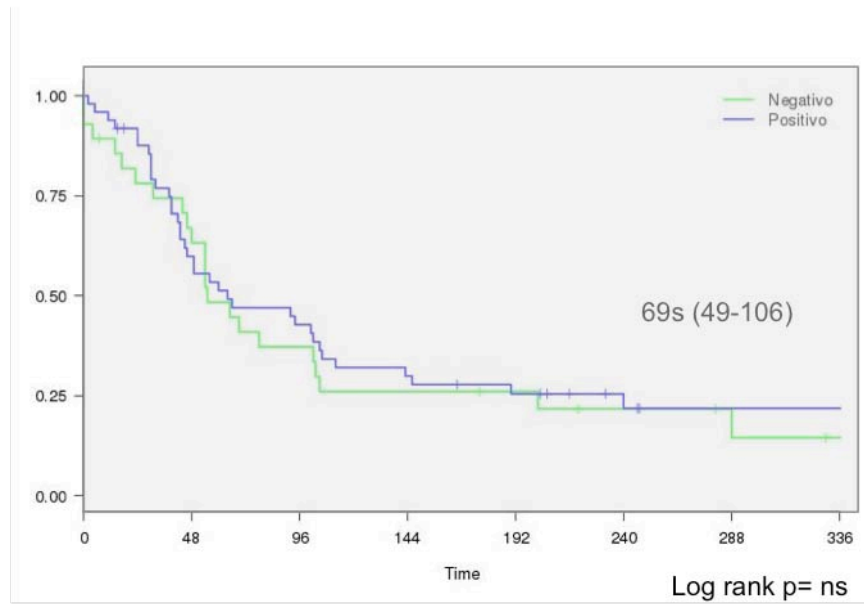


Figura 55. Mediana de supervivencia libre de enfermedad. Análisis de Kaplan Meier ajustado de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de HER3.

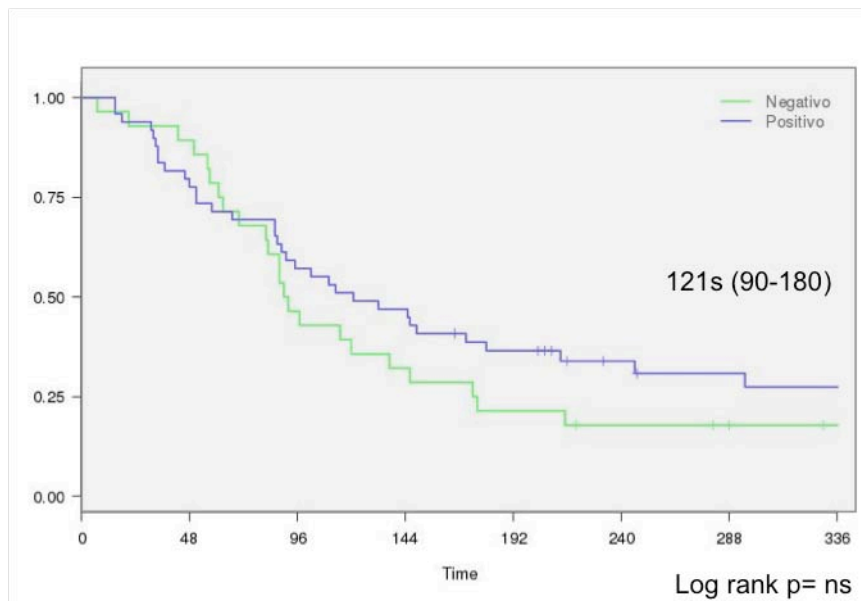


Figura 56. Mediana de supervivencia global. Análisis de Kaplan Meier ajustado de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de HER3.

Al estudiar los casos según el tratamiento recibido, tampoco se obtuvieron diferencias significativas estadísticamente.

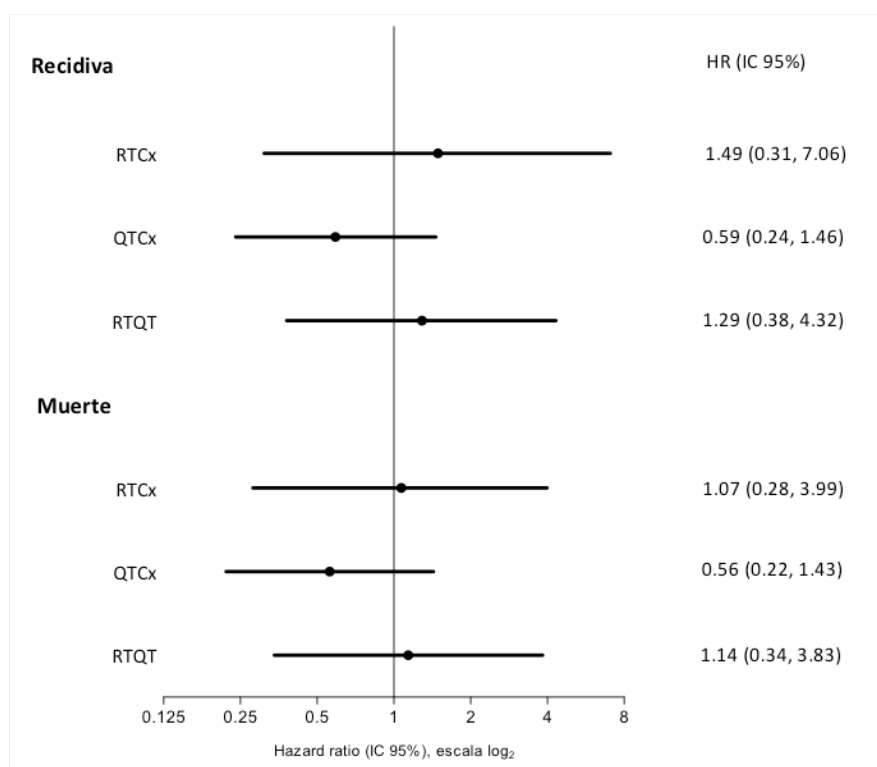


Figura 57. Riesgo de recidiva o muerte de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de HER3 y al tratamiento recibido.

2.1.2. Correlación de las formas fosforiladas

Se estudiaron las formas fosforiladas de las proteínas de la cascada de carcinogénesis para valorar el grado de correlación existente entre ellas. Se incluyeron las formas fosforiladas de mTOR, 4EBP1, eIF4E y S6.

Se obtuvo una relación estadísticamente significativa y directamente proporcional entre la expresión de pmTOR y p4EBP1 y de p4EBP1 con pS6.

No se obtuvo una relación significativa entre peIF4E y las proteínas estudiadas.

Tabla 17. Correlación de las formas fosforiladas de las proteínas estudiadas de la vía PI3K/AKT/mTOR.

Proteínas	pmTOR	p4EBP1	peIF4E	pS6
pmTOR	-	0,04	0,30	0,60
p4EBP1	0,04	-	0,67	0,01
peIF4E	0,30	0,67	-	0,67
pS6	0,60	0,01	0,67	-

2.1.3. Estudio molecular (PIK3CA)

Del total de casos de la serie estudiada, se observaron 89 casos (98,89%) sin evidencia de mutaciones en el gen PIK3CA, siendo variedad *wild type*. En un caso (1,11%) no pudo realizarse el estudio dada la falta de ADN en el material extraído.

2.2. Vía de RAF/RAS/MAPK

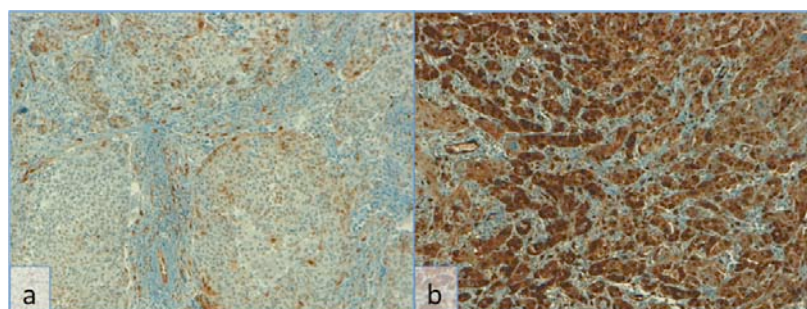
2.2.1. Estudio inmunohistoquímico

a. pMAPK

La forma fosforilada de MAPK (pMAPK) presentó tinción nuclear y citoplasmática en las células tumorales. La mediana de expresión fue de Hscore 90 (40-187,5). El punto de corte se estableció en Hscore 40 tanto para la supervivencia global como libre de enfermedad.

Figura 58. Expresión inmunohistoquímica de pMAPK sobre tejido parafinado.

4X y 10X.



a. Expresión negativa, b. Expresión positiva (H-score 240).

Se observó un mayor riesgo de recidivas (HR 1,11; 0,65-1,90), así como mayor riesgo de muerte (HR 1,5; 0,86-2,63), aunque no fueron estadísticamente significativos.

Al analizar los datos mediante las curvas de Kaplan Meier, se observó una tendencia significativa ($p=0,056$) en cuanto a la supervivencia libre de enfermedad, donde la mediana de presentación de la primera recidiva fue a las 46 semanas (40-51) del diagnóstico. De la misma manera, al analizar la supervivencia global, se observó una mediana de 86 semanas (64-107) al fallecimiento, dato estadísticamente significativo ($p=0,008$) (tabla 18).

Tabla 18. Supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de pMAPK.

pMAPK (H-score >40)		
	SLE	SG
HR	1,11	1,50
IC (95%)	0,65-1,90	0,86-2,63
P valor	ns	ns
Análisis de Kaplan Meier		
p valor	0,056*	<0,01
Semanas a evento (IC95%)	46 (40-51)	86 (64-107)

*valor p no significatiivo. Evaluado mediante análisis univariante de Cox y

Kaplan Meier. SLE: supervivencia libre de enfermedad, SG: supervivencia global.

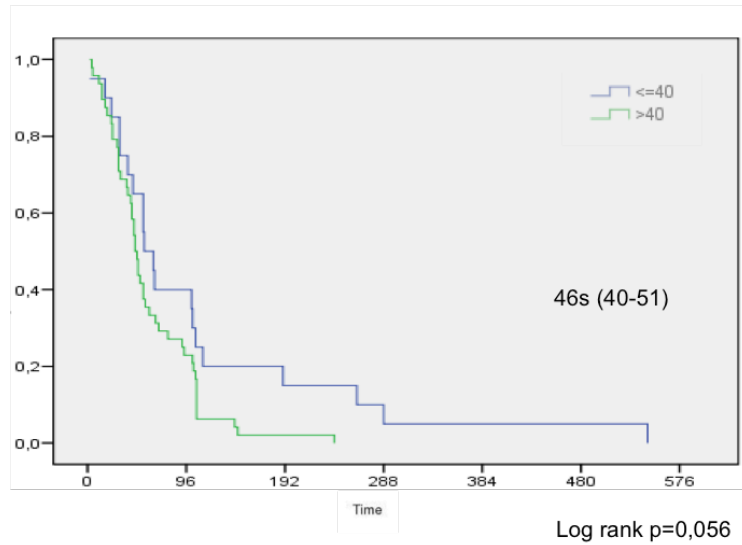


Figura 59. Mediana de supervivencia libre de enfermedad. Análisis de Kaplan Meier ajustado de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de pMAPK.

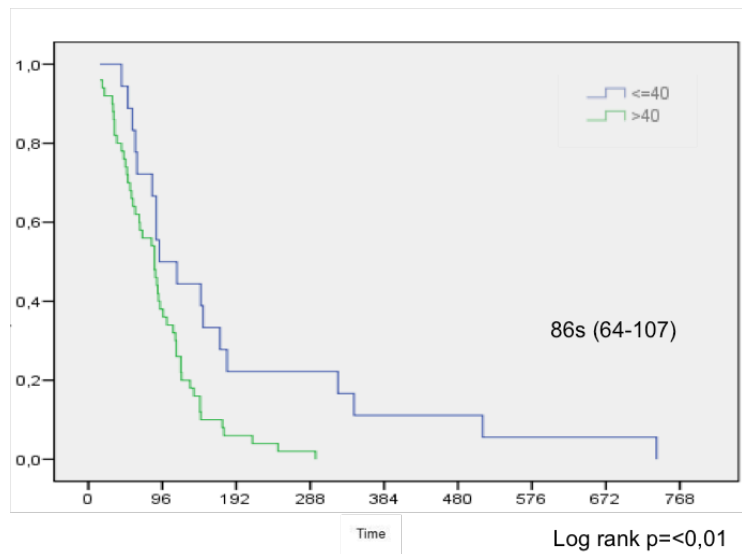


Figura 60. Mediana de supervivencia global. Análisis de Kaplan Meier ajustado de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de pMAPK.

Al realizar el análisis por grupos de tratamiento, se observó un claro aumento del riesgo a recaer o fallecer en aquellos pacientes cuyos tumores expresaban pMAPK, con HR 3,42 (1,15-10,15) y 7,15 (2,20-23,18), respectivamente, en el grupo que recibió

Quimioterapia combinado con Cetuximab. Dichas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p=0,02$ y $<0,01$, respectivamente). No se observaron diferencias en los otros dos grupos de tratamientos (Radioterapia/Cetuximab y Quimioterapia/Radioterapia convencional).

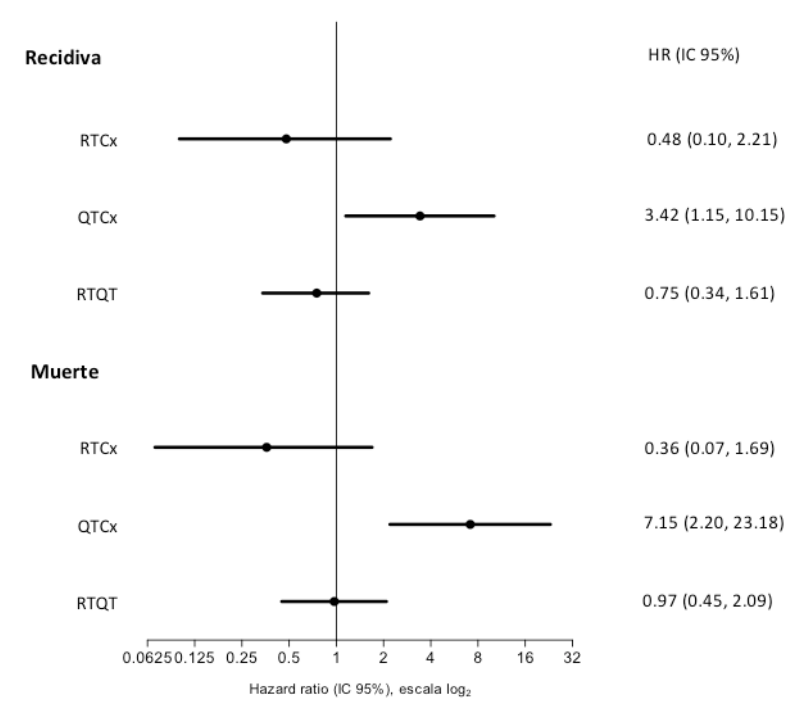


Figura 61. Riesgo de recidiva o muerte de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de pMAPK y al tratamiento recibido.

2.2.2. Estudio molecular

a. BRAF

En la totalidad de casos estudiados (90 casos) no se detectaron mutaciones del gen BRAF, siendo el 100% del tipo *wild type*.

b. KRAS

Se detectó en uno de los casos estudiados (1,11%) la presencia de una mutación G12V del gen de KRAS. Los otros 89 casos (98,89%) fueron *wild type*.

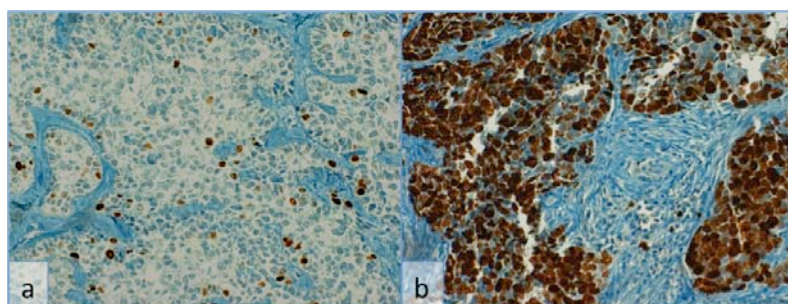
c. HRAS

Se detectaron dos casos con mutaciones en el gen de HRAS, siendo una de ellas G12D (1,11%) y la segunda G12S (1,11%). El resto de casos presenta un HRAS de tipo *wild type*.

2.3. Índice de proliferación tumoral (Ki67)

El índice de proliferación tumoral (Ki67) es valorado como una tinción intensa y nuclear en las células tumorales. Las tinciones que no sean intensas no son consideradas en el cálculo del porcentaje de células que proliferan. La mediana de tinción fue de 70% (40-80), estableciéndose el punto de corte en 65% para la supervivencia libre de enfermedad y 75% para la supervivencia global.

Figura 62. Expresión inmunohistoquímica de Ki67 sobre tejido parafinado. 20X.



a. Expresión negativa (1%), b. Expresión positiva (80%).

Tras realizar el estudio estadístico, no se observaron diferencias significativas en la supervivencia global o libre de enfermedad de acuerdo a la expresión de Ki67 (Tabla 19).

Tabla 19. Supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de Ki67.

Ki67 (> 65%)		
	SLE	SG
HR	0,90	0,78
IC (95%)	0,55-1,48	0,47-1,30
P valor	ns	ns
Análisis de Kaplan Meier		
p valor	ns	ns
Semanas a evento (IC95%)	56 (51-143)	115 (88-NA)

Evaluado mediante análisis univariante de Cox y Kaplan Meier. SLE: supervivencia libre de enfermedad, SG: supervivencia global.

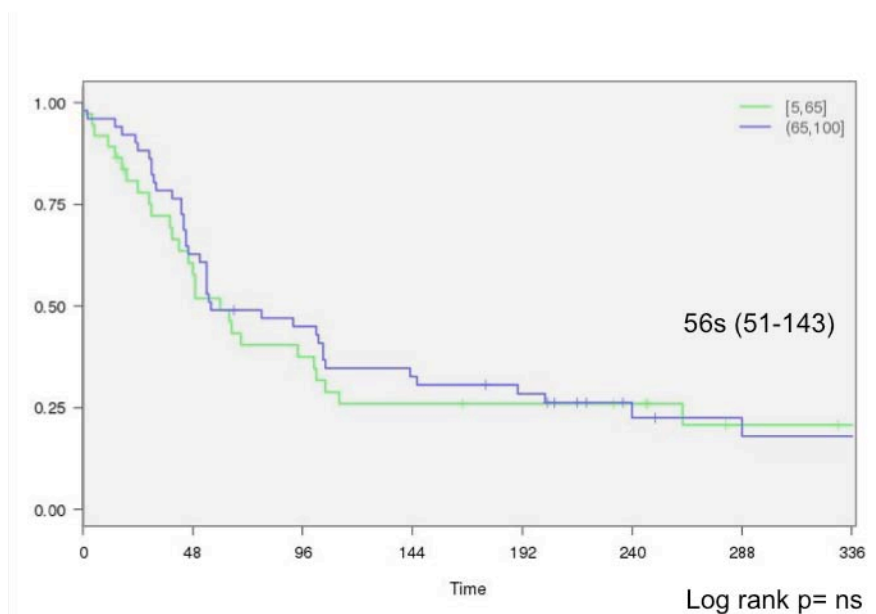


Figura 63. Mediana de supervivencia libre de enfermedad. Análisis de Kaplan Meier ajustado de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de Ki67.

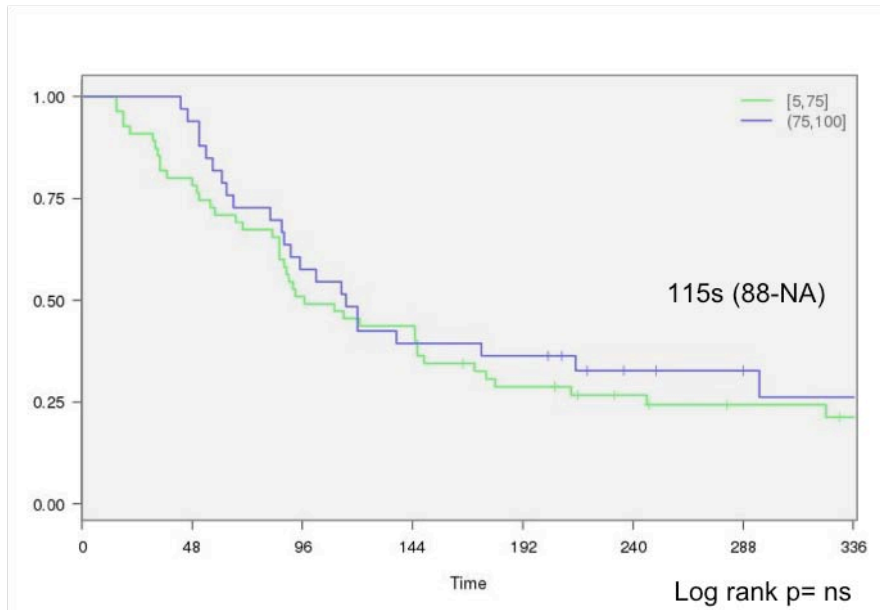


Figura 64. Mediana de supervivencia global. Análisis de Kaplan Meier ajustado de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de Ki67.

Al separar los casos por grupos de tratamiento, no se observaron diferencias significativas en cuanto al comportamiento de la enfermedad de acuerdo al Ki67.

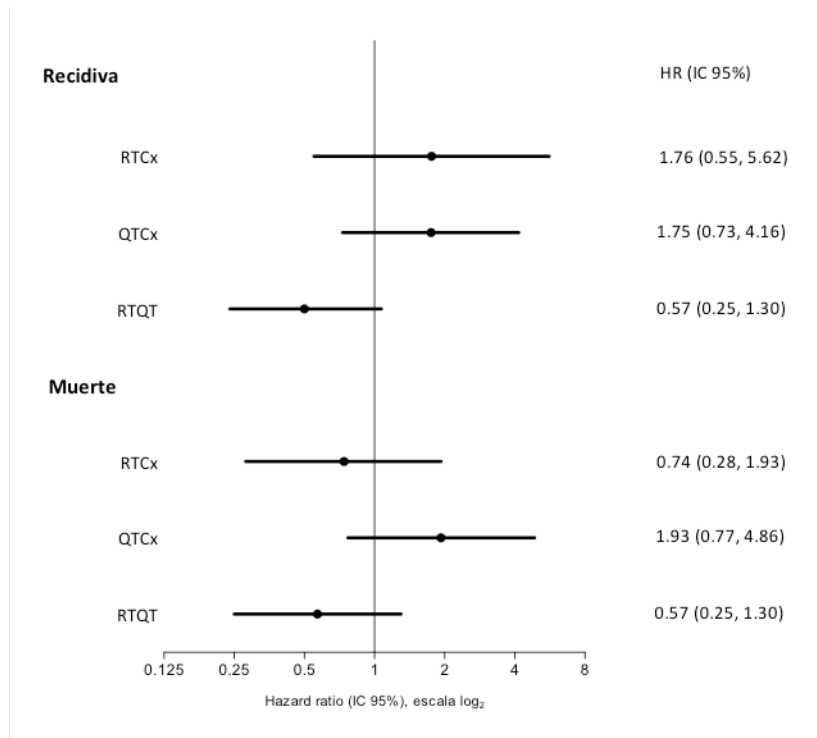
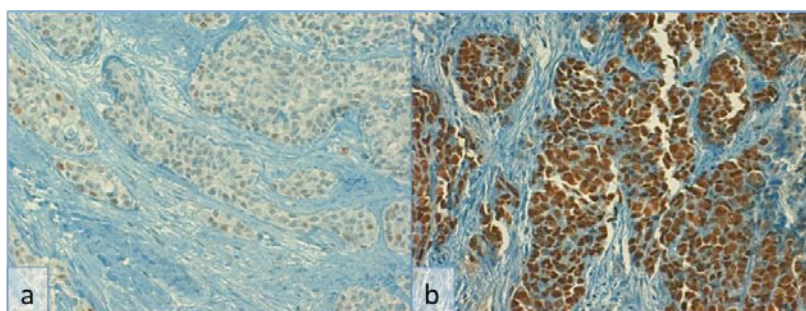


Figura 65. Riesgo de recidiva o muerte de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de Ki67 y al tratamiento recibido.

2.4. Factor de supresión tumoral (p53)

El factor de supresión tumoral p53 se observa por medio de la inmunohistoquímica en los núcleos de las células tumorales. Su expresión es positiva cuando se observa intensamente y negativa cuando es débil o ausente.

Figura 66. Expresión inmunohistoquímica de p53 sobre tejido parafinado. 10X.



a. Expresión negativa, b. Expresión positiva intensa nuclear.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la supervivencia global o libre de enfermedad mediante el análisis de Cox ni las curvas de Kaplan Meier (tabla 20).

Tabla 20. Supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de p53.

p53		
	SLE	SG
HR	1,32	1,15
IC (95%)	0,81-2,16	0,70-1,87
P valor	ns	ns
Análisis de Kaplan Meier		
p valor	ns	ns
Semanas a evento (IC95%)	55 (43-105)	117 (92-149)

Evaluated mediante análisis univariante de Cox y Kaplan Meier. SLE: supervivencia libre de enfermedad, SG: supervivencia global.

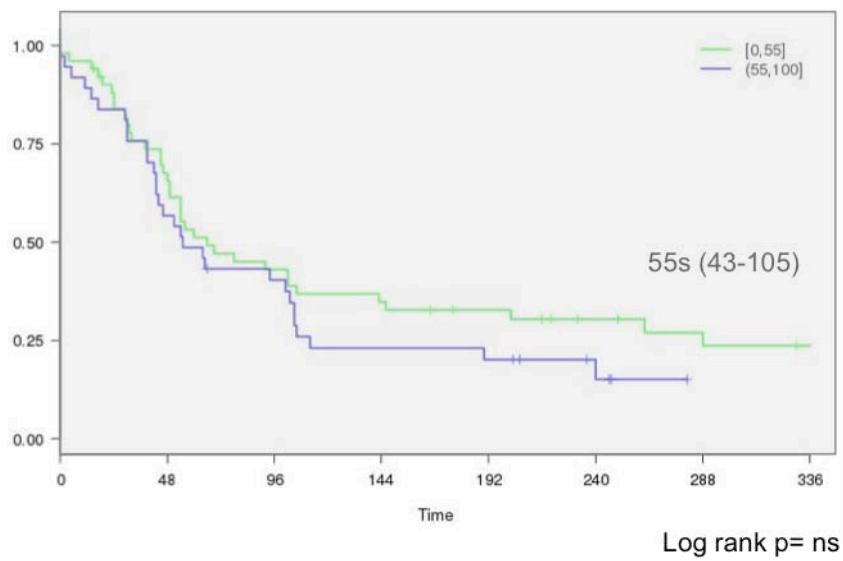


Figura 67. Mediana de supervivencia libre de enfermedad. Análisis de Kaplan Meier ajustado de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de p53.

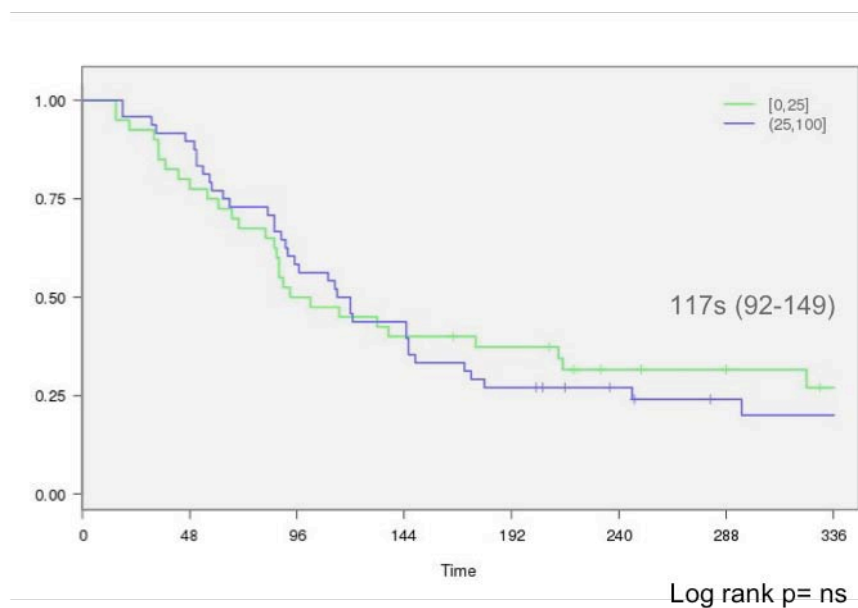


Figura 68. Mediana de supervivencia global. Análisis de Kaplan Meier ajustado de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de p53.

En el estudio por grupos de tratamiento, no se observaron diferencias significativas entre ellos, tanto en la supervivencia global como libre de enfermedad.

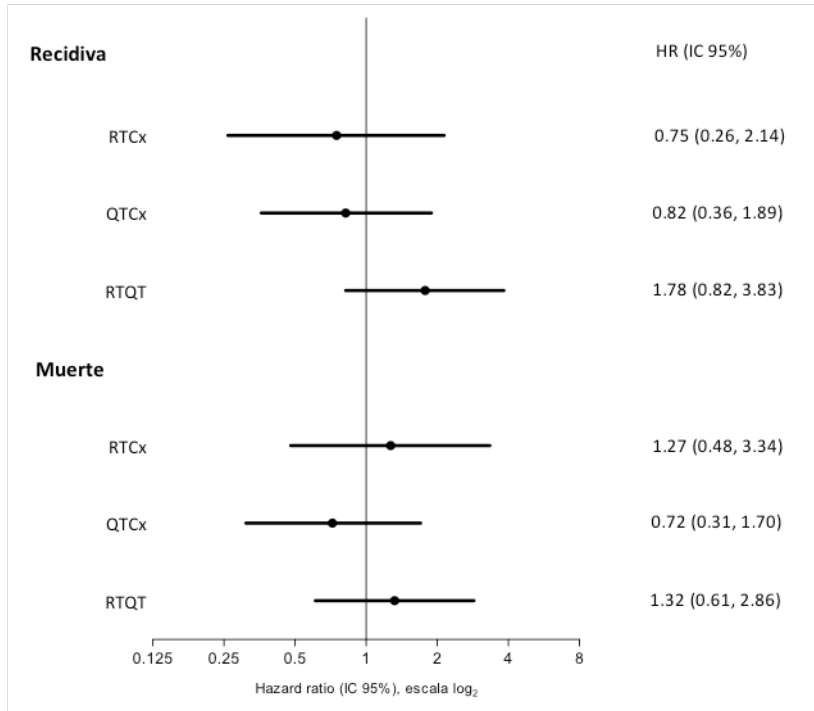


Figura 69. Riesgo de recidiva o muerte de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de p53 y al tratamiento recibido.

2.5. Asociación entre las variables clínicopatológicas y la expresión de proteínas estudiadas

Se realizaron análisis que correlacionan las variables clínicas de Sexo (M/F), hábito alcohólico (s/n), hábito tabáquico (s/n) y presencia de metástasis ganglionares al momento del diagnóstico (N0/N+) con cada una de las proteínas estudiadas de las distintas vías de carcinogénesis de PI3K/AKT/mTOR y de RAF/RAS/MAPK. Los valores de significación (p) se resumen en la tabla siguiente.

Tabla 21. Correlación entre variables clínicas y proteínas estudiadas.

	4EBP1	p4EBP1	eIF4E	peIF4E	mTOR	pmTOR	PTEN	pMAPK	pS6	HER3	p16	p53	Ki67
Sexo	0,75	0,97	0,15	0,15	1,00	0,15	0,17	0,15	0,44	0,15	0,15	0,02	0,15
N+	0,81	1,00	0,87	1,00	0,74	0,13	0,92	0,03	0,60	0,94	0,15	0,84	1,00
Tabaco	0,28	1,00	0,14	0,15	0,65	0,15	0,61	0,15	0,30	0,15	0,15	0,43	0,15
Alcohol	0,43	0,67	0,83	0,85	0,89	0,66	0,72	0,33	0,37	0,72	0,15	0,02	0,05

Se observa una relación estadísticamente significativa entre el sexo masculino y la expresión de p53 ($p=0,02$).

La presencia de metástasis ganglionares al momento del diagnóstico se relaciona directamente con la expresión de MAPK por las células tumorales, hallazgos significativos estadísticamente ($p=0,03$).

De la misma manera, el hábito alcohólico presenta una relación estadísticamente significativa con la expresión de p53 ($p=0,02$) así como el índice de proliferación tumoral Ki67 ($p=0,02$).

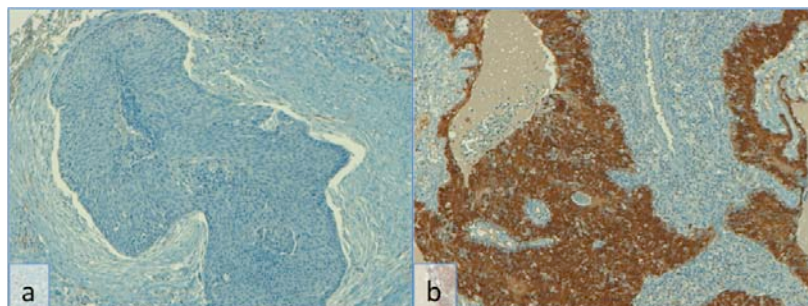
3. ESTUDIO DE LA INFECCIÓN POR VPH Y p16

3.1. Factor de supresión tumoral (p16). Estudio inmunohistoquímico.

La expresión del factor de supresión tumoral p16 por inmunohistoquímica es nuclear y citoplasmática, con expresión intensa y homogénea en las células tumorales. La positividad fue considerada al presentar por lo menos un 70% de expresión intensa y difusa en el tumor. Los casos con expresión $<70\%$ fueron considerados negativos.

De esta manera, se obtuvieron 9 casos positivos para p16 constituyendo el 10% de la muestra estudiada.

Figura 70. Expresión inmunohistoquímica de p16 sobre tejido parafinado. 4X.



a. Expresión negativa, b. Expresión positiva (>70%).

Al realizar el estudio de supervivencias, se observó que los casos p16 positivos presentaron un riesgo menor de recidivas (HR 0,53; 0,23-1,24), al igual que un mayor intervalo de tiempo de aparición de las mismas (240 frente a 54 semanas) al comparar con los casos p16 negativos, aunque dichas diferencias no fueron significativas estadísticamente (tabla 22).

Tabla 22. Supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de p16.

p16		
	SLE	SG
HR	0,53	0,37
IC (95%)	0,23-1,24	0,13-1,04
P valor	ns	0,05
Análisis de Kaplan Meier		
p valor	ns	0,05
Semanas a evento (IC95%)	54 (46-102)	97 (87-145)

Evaluado mediante análisis univariante de Cox y Kaplan Meier.

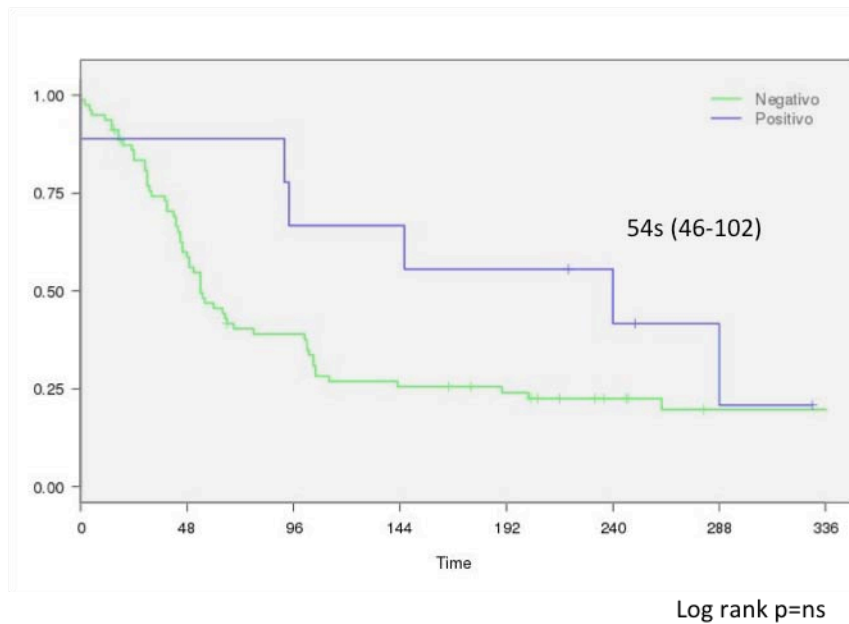


Figura 71. Mediana de supervivencia libre de enfermedad. Análisis de Kaplan Meier ajustado de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de p16.

En cuanto a la supervivencia global, se observó un menor riesgo de muerte en los pacientes cuyos tumores expresaban p16, frente a los que eran negativos para la proteína (HR 0,37; 0,13-1,04). De la misma manera, se observó a través del estudio con las curvas de Kaplan Meier, un mayor tiempo a la muerte en aquellos tumores p16 positivos, con una diferencia de 198 semanas (295 semanas frente a 97 en los tumores p16 negativos). Dichas diferencias fueron estadísticamente significativas con valores p de 0,05 y log rank de 0,05, respectivamente.

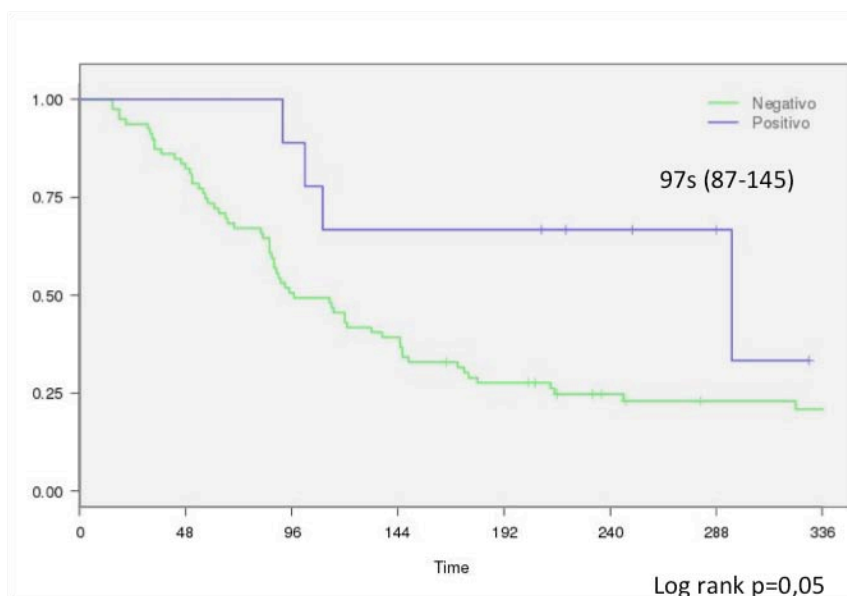


Figura 72. Mediana de supervivencia global. Análisis de Kaplan Meier ajustado de acuerdo a la expresión inmunohistoquímica de p16.

3.2. Determinación de la presencia de infección por VPH

Se detectaron cuatro casos (4,44%) con presencia de infección por VPH. De ellos, los genotipos fueron VPH 16 en 2 casos (2,22%), VPH 16 y 72 en 1 caso (1,11%) y VPH 35 en 1 caso (1,11%).

No se identificaron otros serotipos de VPH en la serie estudiada.

3.3. Correlación VPH/p16

De la serie estudiada (90 casos), se observaron 9 casos p16 positivos. De éstos, 3 casos (3,33%) tuvieron confirmación molecular de la presencia del virus del Papiloma Humano (VPH) (p16+/VPH+). En los otros 6 casos p16 positivos, no se demostraron fragmentos de ADN viral en el material estudiado (p16+/VPH-).

Se observó 1 caso con presencia de ADN viral de tipo VPH 16 pero sin expresión de p16 (p16-/VPH+).

3.4. Correlación p16/p53

De los 6 casos p16+/VPH-, se observaron 5 de ellos con expresión intensa de p53. Sin embargo, los casos p16+/VPH+ fueron negativos para p53.

Se observa 1 caso p16-/VPH-, sin expresión de p53.

Tabla 23. Correlación entre la expresión inmunohistoquímica de p16 y la presencia de VPH determinado por PCR.

p16/HPV	Frecuencia	p53
p16+/HPV+	3 (3,33%)	-
p16+/HPV-	6 (6,66%)	5+ (5,55%) 1- (1,11%)
p16-/HPV+	1 (1,11%)	+
p16-/HPV-	81 (90%)	50+ (61,7%)

4. ESTUDIO MULTIVARIANTE

Para estimar el efecto de las distintas variables clínicopatológicas sobre el tiempo de supervivencia y el tiempo libre de enfermedad, se realizó un análisis multivariante modelo de regresión de Cox. De esta manera, se puede observar si existe alguna variable que de manera independiente sea factor de peor o mejor pronóstico de la enfermedad.

4.1. Supervivencia libre de enfermedad

Se incluyeron todas las variables que en el análisis univariante presentaron significación estadística, ajustando por edad y sexo, así como también la presencia de metástasis ganglionares y factores de riesgo (hábito tabáquico y alcohólico).

Se puede observar en la tabla 24, que la presencia de metástasis ganglionares en el momento del diagnóstico ($p=0,008$), así como la expresión de mTOR ($p=0,028$) y pmTOR ($p=0,020$) son factores independientes de peor pronóstico en la aparición de recidivas.

Tabla 24. Análisis multivariante de supervivencia libre de enfermedad.

Proteínas	HR	IC (95%)	P valor
N+	2,28	0,31-2,65	0,007
Tabaco	1,39	0,33-5,83	0,64
Alcohol	1,65	0,57-4,70	0,34
mTOR	1,81	1,06-3,08	0,028
pmTOR	1,84	1,09-3,10	0,020
p4EBP1	0,91	0,44-1,87	0,81
eIF4E	1,35	0,65-2,80	0,41
pS6	0,96	0,44-2,08	0,92
pMAPK	1,09	0,55-2,14	0,80
p53	0,58	0,30-1,11	0,10
p16	0,64	0,23-1,75	0,39

4.2. Supervivencia global

Para el estudio multivariante de supervivencia global (tiempo a muerte), se incluyeron todas las variables que en el análisis univariante presentaron significación estadística, ajustando por edad y sexo (tabla 25).

Se observó que las variables de metástasis ganglionares en el momento del diagnóstico ($p=0,005$) y la expresión de mTOR ($p=0,0001$), son factores independientes de peor pronóstico. Por el contrario, la expresión de p16 ($p=0,032$) es factor independiente de mejor pronóstico de la enfermedad.

Tabla 25. Análisis multivariante de supervivencia global.

Proteínas	HR	IC (95%)	P valor
N+	3,10	1,59-6,04	<0,001
Tabaco	0,57	0,29-1,12	0,10
mTOR	2,09	1,17-3,73	0,011
pmTOR	1,36	0,72-2,60	0,33
eIF4E	1,40	0,71-2,77	0,32
p4EBP1	1,31	0,70-2,46	0,38
pMAPK	0,81	0,41-1,80	0,61
Ki67	0,77	0,44-1,35	0,37
p16	0,60	0,31-1,18	0,032

Tabla 26. Resumen de análisis de supervivencia (Cox y KM) incluyendo todas las proteínas estudiadas.

Proteína	Recidiva			Muerte		
	Cox	p	KM	Cox	p	KM
mTOR	2,05	<0,01	<0,01	1,88	0,01	0,01
pmTOR	1,52	ns	ns	1,37	ns	ns
4EBP1	1,03	ns	ns	0,87	ns	ns
p4EBP1	1,32	ns	ns	1,37	ns	ns
eIF4E	1,67	0,04	0,04	1,57	ns	ns
peIF4E	0,91	ns	ns	0,67	ns	ns
pS6	0,79	ns	ns	1,10	ns	ns
PTEN	1,42	ns	ns	1,04	ns	ns
HER3	0,89	ns	ns	0,80	ns	ns
pMAPK	1,11	ns	0,056*	1,50	ns	<0,01
p53	1,32	ns	ns	1,15	ns	ns
Ki67	0,90	ns	ns	0,78	ns	ns
p16	0,53	ns	ns	0,37	0,05	0,05

VI. DISCUSIÓN

VI. DISCUSIÓN

El CCC es una enfermedad que debido a sus características anatómicas, el alto riesgo de desarrollar recidivas, las comorbilidades asociadas (hábito tabáquico y alcohólico) y la toxicidad medicamentosa, confieren un manejo terapéutico complicado, sobretodo en los casos localmente avanzados. Los pacientes que presentan enfermedad recurrente o metastásica tienen un peor pronóstico, limitando la oferta terapéutica. El reciente progreso en la biología molecular ha iniciado una era en la medicina más personalizada, en donde la investigación de las alteraciones específicas en los biomarcadores tumorales permite identificar dianas terapéuticas indispensables para predecir la efectividad del tratamiento dirigido. De la misma manera, estudios recientes han demostrado que la investigación de dichos biomarcadores puede predecir, a su vez, posibles resistencias a los diversos tratamientos disponibles y conducir a modificaciones en el esquema terapéutico establecido.

1. Estudio de las variables clínicopatológicas como factores pronóstico en CCC

Existen en la literatura una serie de factores clínicopatológicos clásicamente relacionados con mejor o peor pronóstico en CCC. Entre ellos, los factores de riesgo ampliamente estudiados como el hábito tabáquico y alcohólico, han demostrado ser de los factores clínicos más importantes en relación a una menor supervivencia.

El tabaco está asociado a cambios estructurales en el ADN que inducen daño oxidativo y alteraciones en el metabolismo del folato. Dichas noxas pueden ser corregidas por el sistema de reparación del ADN celular conocido como “reparación por escisión de nucleótidos y bases” (NER y BER, respectivamente). El sistema BER corrige el mayor número de lesiones de bases mutagénicas y citotóxicas removiendo las bases que han sido metiladas, oxidadas o reducidas y las repara por medio de interrupciones simples en la base afectada. De esta manera, las alteraciones individuales en el sistema NER/BER secundarias al efecto carcinógeno del tabaco, son uno de los factores que podrían estar en relación con el riesgo de desarrollar CCC en pacientes fumadores⁹⁴.

El consumo de alcohol, por sí solo, no ha demostrado ser un factor independiente de riesgo de alteraciones genéticas o de desarrollo de CCC. Sin embargo, sí se ha demostrado tener un efecto sinérgico cuando está asociado al tabaco^{9,10}.

En nuestra serie, como en la literatura, la gran mayoría de pacientes son fumadores (84%), con hábito alcohólico (72%) o ambos inclusive (65%). Sin embargo, no observamos diferencias significativas en cuanto al pronóstico de la enfermedad,. Esto podría explicarse, probablemente, porque la muestra de pacientes sin dichos hábitos era pequeña y porque la mayoría presentaba una enfermedad localmente avanzada, los cuales ya tenían por sí mismos un pronóstico desfavorable.

Otro de los factores determinantes de peor pronóstico en CCC es la presencia de metástasis ganglionares en el momento del diagnóstico. El CCC presenta una alta tendencia a diseminarse a través de vasos linfáticos con afectación de los ganglios linfáticos locoregionales, disminuyendo la supervivencia global en un 50%. De hecho, se ha demostrado que en aquellos pacientes que no presentan evidencia de afectación ganglionar en el momento del diagnóstico (estadio NO inicial), la incidencia de metástasis ocultas puede variar entre el 10 y el 50%⁹⁵.

En nuestro estudio se demuestra, al igual que en la literatura, que la presencia de metástasis ganglionares al momento del diagnóstico es un factor de mal pronóstico, ya que se asoció de manera independiente a una peor supervivencia libre de enfermedad así como a una peor supervivencia global. Dichos resultados han demostrado ser independientes del tratamiento recibido, sea con RT/Cx, QT/RT o RT/QT.

2. Estudio de la expresión de las proteínas de la vía PI3K/AKT/mTOR como factores pronósticos clínico-patológicos y de resistencia a Cetuximab

La vía de PI3K/AKT/mTOR se encuentra frecuentemente activada en el CCC, bien sea de manera asociada a la activación de EGFR o de manera independiente⁹⁶. Igualmente, se ha asociado la activación de dicha vía a un estadio tumoral más avanzado y a mayor progresión de la enfermedad, con una correlación independiente e intensa, especialmente en los casos de carcinoma laríngeo y orofaríngeo⁹⁴. El estudio de las vías

de carcinogénesis, en especial de la vía de PI3K/AKT/mTOR, es necesario para establecer marcadores moleculares efectivos y de fácil reproducción, que sirvan de pronóstico, de dianas terapéuticas y como indicadores de eficacia de tratamientos.

La activación de las proteínas mTOR y AKT ha sido observada en más del 80% de los CCC, correlacionándose con peor pronóstico. La activación de mTOR puede resultar a su vez de la activación de EGFR, así como de la sobreexpresión o presencia de mutaciones en PI3K o de la ausencia de actividad supresora de PTEN⁹⁵.

Algunos autores han demostrado utilizando modelos animales, que el bloqueo de la actividad de mTOR por un inhibidor específico como la rapamicina (sirolimus, temserolimus y everolimus) y sus análogos provoca una rápida regresión del tamaño tumoral y una disminución de la progresión de las lesiones displásicas, así como un enlentecimiento en el crecimiento tumoral sobre focos de tumor residual. Asimismo, también se ha evidenciado que la inhibición de mTOR disminuye la linfangiogénesis tumoral y la diseminación linfática local^{95,45}. En concordancia con estos resultados, en nuestro estudio, hemos observado que mTOR y su forma fosforilada, pmTOR, se encontraron asociados a un menor tiempo hasta la aparición de recidivas y muerte, así como a un riesgo de 2,05 y 1,88 mayor de recidiva tumoral o muerte, respectivamente, para aquellos tumores que expresaron mTOR, en comparación con aquellos tumores que no lo expresaron. Curiosamente, nuestros resultados demuestran que la forma fosforilada de mTOR no presenta diferencias significativas, al ser analizado por sí solo, en el estudio univariante. Sin embargo, al realizar la correlación entre las formas fosforiladas de mTOR, 4EBP1, eIF4E y S6, se observa una relación coherente y significativa entre ellas, lo cual podría explicarse por el tamaño de la *n* de nuestro estudio o por problemas con el procesamiento y reactivos de inmunohistoquímica, que podrían conferir una tinción más débil de lo que correspondería realmente. La capacidad de mTOR de mantener activada la vía carcinógena y favorecer el crecimiento tumoral, estableciéndose como un factor de peor pronóstico de la enfermedad, queda demostrada en el análisis multivariante en donde se determina que es un factor independiente de peor pronóstico a recidiva y muerte de manera independiente al bloqueo de EGFR.

En algunas líneas de CCC, la inhibición de EGFR no ha tenido efecto en la activación de mTOR. Esto sugiere un potencial beneficio terapéutico si se utiliza un tratamiento combinado anti-EGFR y anti-mTOR para los tumores que expresen dicha proteína⁹⁴. Tal es el caso del inhibidor de mTOR rapamicina⁴⁵ y sus análogos, los cuales pueden reducir el tamaño y velocidad de crecimiento del tumor primario, prevenir la angiоinvasión, reducir la migración hacia los ganglios linfáticos y la diseminación locoregional y metastásica de las lesiones primarias.

Por otra parte, la activación de la vía PI3K/AKT/mTOR está implicada en los grandes mecanismos de resistencia a los fármacos, incluyendo radioresistencia intrínseca, proliferación tumoral e hipoxia. Además, el bloqueo de la vía PI3K/AKT/mTOR tiene un gran potencial de mejorar la efectividad de la radioterapia en estos pacientes¹⁴. Du et al., demostraron que la inhibición de AKT induce la activación retrógrada de proteínas superiores en la cascada como HER3, así como la inhibición de mTOR induce la activación de la señalización de AKT y MAPK, concluyendo que la combinación de terapias contra PI3K así como HER3, c-Myc o MAPK pueden ser mas beneficiosas para el tratamiento en estos tipos de tumores¹⁴.

Los inhibidores de mTOR, incluyendo rapamicina (sirolimus) y sus análogos CCI-779 (temserolimus) y RAD001 (everolimus), tienen la capacidad de reducir drásticamente el volumen tumoral en CCC de modelos murinos. Los estudios emergentes, sugieren que la rapamicina puede ejercer su actividad antitumoral en múltiples áreas. Puede reducir el tamaño y velocidad de crecimiento del tumor primario, prevenir la angiоinvasión y reducir la actividad migratoria hacia ganglios linfáticos, previniendo así la diseminación locoregional y metastásica de las lesiones primarias⁹⁵.

En nuestro estudio, pudimos determinar que los pacientes que recibieron QT-RT como tratamiento y que expresaban pmTOR, tuvieron mayor riesgo de presentar recidivas que aquellos que recibieron RTCx o QTCx por separado, pudiendo estar en relación al hecho de que hayan recibido cetuximab asociado. Esto permite plantear un posible efecto inductor o sensibilizador del cetuximab al tratamiento, similar a lo que ocurre con la radioterapia. Este efecto parece ser independiente de la expresión de pmTOR y

podría permitir además un mejor control locoregional de la enfermedad. No obstante, se necesitan más estudios que puedan corroborar dicho planteamiento.

La expresión de 4EBP1 y de su forma fosforilada, se ha demostrado que presenta peor pronóstico en tumores de distintas localizaciones, como es el caso de mama, ovario, próstata, colon y SNC. En mama y ovario, se ha descrito peor pronóstico independiente del estado de HER2, y de las proteínas de la vía PI3K/AKT/mTOR. Se ha relacionado su expresión con presencia de mayor tamaño tumoral, metástasis ganglionares y mayor recurrencia loco-regional^{91,97}. En próstata se ha observado una mayor expresión de p4EBP1 en los casos que progresan de neoplasia intraepitelial de alto grado a carcinoma⁵³. De la misma manera, en SNC, se ha observado una correlación con la progresión tumoral de astrocitomas a glioblastomas⁹⁸.

La sobreexpresión de la forma fosforilada de 4EBP1 se ha asociado con una presentación más agresiva del CCC. Asimismo, 50% de los tumores de cabeza y cuello expresan 4EBP1, la cual es la forma no fosforilada o inactiva presente en la cascada de carcinogénesis⁵⁰. En nuestro estudio observamos peor supervivencia tanto global como libre de enfermedad en los tumores que expresaban 4EBP1 y su forma fosforilada. Sin embargo la asociación no fue estadísticamente significativa. No obstante, se observó una correlación significativa con las formas activas de mTOR y S6, proteínas activadoras y efectoras de p4EBP1, lo cual demuestra su participación e importancia en la continuidad de la cascada de carcinogénesis.

En cuanto a eIF4E y coincidiendo con la literatura⁹⁹, en nuestro estudio se observó un mayor riesgo de presentar recidivas en aquellos tumores que expresaban eIF4E, así como menor tiempo hasta la aparición de las mismas. En cambio, la forma fosforilada de eIF4E, no se asoció significativamente, probablemente por problemas en el procesamiento de la inmunohistoquímica y por el tamaño muestral. De forma similar, tampoco se asoció significativamente a un mayor riesgo de muerte.

Diversos análisis a través de técnicas de inmunohistoquímica han demostrado que la expresión de pS6 exhibe un patrón de expresión similar al de AKT, lo cual se correlaciona con la progresión tumoral⁴⁵. La expresión de pS6 puede observarse en células aisladas del epitelio normal, aumentando progresivamente en casos de

hiperplasia, displasia y carcinoma. Inclusive la expresión varía significativamente según el grado de diferenciación tumoral, siendo menor en los tumores bien diferenciados y mayor en los poco diferenciados. En el caso concreto de los CCC, algunos autores han demostrado que la acumulación aberrante de pS6 (una de las proteínas finales de la vía AKT/mTOR) se encuentra frecuentemente en lesiones displásicas, persistiendo durante la progresión tumoral hasta carcinomas. También demostraron, que la activación de la proteína ribosomal disminuía en las líneas celulares tratadas con rapamicina, sin evidencia de re-crecimiento durante el período de observación al final del tratamiento⁴⁵.

En nuestro estudio, se observó una correlación entre pS6 con la forma fosforilada de 4EBP1 demostrando la activación de la cascada carcinogénica. Se observó a su vez, un ligero aumento del riesgo de muerte en los tumores que expresaban pS6 (HR: 1,10), aunque dicha asociación no fue estadísticamente significativa. Sin embargo, el pequeño tamaño muestral representa una limitación considerable que obliga a tomar con precaución este hallazgo.

PTEN es un factor de supresión tumoral de suma importancia en la vía de PI3K/AKT/mTOR, que se ha relacionado con una activación persistente en caso de pérdida de función o mutaciones⁷⁸.

El efecto de la expresión de PTEN en la sensibilidad a Cetuximab, ha sido estudiada en diversos órganos¹⁴. En CCC, los datos contrastan con los observados en colon y próstata. Se ha descrito que los tumores PTEN negativos de líneas celulares conducen a una activación de la vía de señalización tumoral, aumentando la expresión de pAKT y pERK1/2. Sin embargo, no han demostrado estar asociados con cambios significativos en la proliferación o viabilidad celular. Además, cetuximab logró la inhibición de pAKT y pERK1/2, con la disminución en la proliferación celular. Dichos resultados sugieren que la pérdida de PTEN no está asociada a la resistencia a cetuximab en CCC⁶⁵. En línea con estos datos, la expresión de PTEN en nuestro estudio fue globalmente baja, sin observarse diferencias significativas en cuanto a la supervivencia de la enfermedad, o en la respuesta al tratamiento recibido.

Por otra parte, otro mecanismo propuesto que podría causar una resistencia adquirida al tratamiento antiEGFR es la activación persistente de la vía RAS/RAF/MAPK como consecuencia del aumento de heregulina. La heregulina es un ligando que se une a HER3 y HER4 en la membrana celular. Troiani et al., describieron niveles aumentados de heregulina en tumores colorrectales metastásicos resistentes a Cetuximab, con lo cual, infieren que tanto la amplificación de HER2 como el aumento de heregulina podrían causar resistencia adquirida al tratamiento antiEGFR¹⁰⁰. En nuestro estudio no observamos sobreexpresión de HER3 en las células tumorales, sin obtener diferencias significativas en el estudio de supervivencias.

Las mutaciones en la proteína PIK3CA, gen que codifica a PI3K en CCC se encuentran en torno al 10% y están asociadas a la activación persistente de AKT. Boeckx et al., describieron que el tratamiento con Cetuximab en los tumores resistentes, no demuestra disminución de los niveles de pAKT cuando presentan mutaciones en el gen PIK3CA. Por el contrario, si no existen mutaciones en PIK3CA, sí se observa una disminución de pAKT al tratar con Cetuximab⁷⁸.

Se ha descrito que la actividad de PI3K requiere de la activación de RAS, incluso en presencia de EGFR activo. Ambos, PI3K y RAS son proteínas fundamentales para la consecución de activaciones en las vías de señalización que coordinan la proliferación tumoral, supervivencia y migración de células tumorales. Esto sugiere que la activación de PI3K, de manera independiente, no es suficiente para promover su actividad oncogénica en ausencia de RAS en las células tumorales de cabeza y cuello¹⁰¹. En nuestra serie de 90 casos, no se detectó ninguna mutación del gen PIK3CA, con lo cual el valor pronóstico de esta proteína no es representativo.

3. Estudio de la expresión de las proteínas de la vía RAF/RAS/MAPK como factores pronósticos clínico-patológicos y de resistencia a Cetuximab

La vía de RAS/RAF/MAPK ha estado recientemente ligada a procesos de resistencia a la terapia dirigida. Numerosos estudios retrospectivos han demostrado que uno de los mecanismos de resistencia primaria a los inhibidores de EGFR en distintos órganos, es secundario a mutaciones en las proteínas efectoras de EGFR como KRAS, HRAS, NRAS, BRAF y PIK3CA¹⁰⁰.

Las mutaciones puntuales en KRAS se presentan en una variedad de tumores humanos, siendo las más frecuentes en carcinoma pancreático, carcinoma de células no pequeñas pulmonar y carcinoma colorrectal. Estas mutaciones confieren resistencia a la terapia con anticuerpos monoclonales antiEGFR utilizados como Cetuximab y Panitumumab, siendo considerado como el principal factor predictor negativo de respuesta a Cetuximab^{78,100}. Por el contrario, en CCC, las mutaciones en KRAS son infrecuentes, oscilando entre 0 y 9,1%, con lo cual, el valor predictivo del estado mutacional de KRAS en CCC es bajo⁷⁸. En nuestra serie, se detectó una mutación de tipo G12V, en un carcinoma localizado en lengua, que presentó recidiva a las 42 semanas y falleció a las 86 semanas, estando un poco por debajo de la mediana de la serie (48,5 y 88 semanas, respectivamente).

Las mutaciones en HRAS, otro miembro de la familia RAS, son un poco más frecuentes que KRAS, oscilando entre 0 y 22%⁷⁸. Los estudios de modelos animales con carcinoma oral, han mostrado que silenciando el gen mutado de HRAS, las líneas celulares de CCC restablecían la sensibilidad al cetuximab y se disminuía la activación de ERK. Curiosamente, al silenciar HRAS mutado, también se observaba una disminución de AKT, demostrando que las vías PI3K/AKT/mTOR y RAS/RAF/MAPK están interconectadas en CCC. Por lo tanto, se demostró que el grupo de tumores con mutaciones de HRAS se asociaban a una menor probabilidad de respuesta a la terapia basada en cetuximab que el grupo no mutado, el cual presentaba más probabilidad de responder parcial o completamente al cetuximab¹⁰¹.

En nuestro estudio, hemos detectado dos mutaciones en el gen HRAS, constituyendo el 2,22% de frecuencia de nuestra serie. Uno de los casos, con mutación G12S de HRAS

en el carcinoma de mucosa oral, presentó recidiva a las 31 semanas del diagnóstico y falleció a las 61 semanas, estando dentro del grupo de tratamiento de QT/Cx. El segundo caso con mutación G12D, en carcinoma de amígdala, no presentó recidivas ni falleció durante el tiempo de seguimiento del estudio. De acuerdo con la literatura, se puede inferir que en el primer caso con HRAS mutado, podría haber existido resistencia al tratamiento con cetuximab, lo cual derivó en la primera recidiva y posterior fallecimiento secundario a la progresión de la enfermedad, al poco tiempo de haberse iniciado el tratamiento. En el segundo caso, hubo respuesta completa al tratamiento recibido, independientemente de la mutación de HRAS, con lo cual dicha mutación podría no repercutir en el grado de respuesta al tratamiento anti EGFR. Sin embargo, se tratan de apenas dos casos, por lo que es difícil establecer conclusiones válidas en cuanto a la implicación de estas mutaciones en la respuesta al tratamiento con cetuximab. Por esto, se recomienda la realización de nuevos estudios que evalúen estas mutaciones.

BRAF pertenece a la familia de proteínas-quinazas de RAF. La mutación más frecuentemente observada en distintos tumores humanos es V600E, relacionándose con tumores no respondedores al tratamiento. En CCC la frecuencia de mutaciones es menor al 3%, siendo relativamente rara⁶⁹. En nuestro estudio, no se detectó ningún tipo de mutaciones en el gen BRAF, siendo los 90 casos estudiados, del tipo *wild type*.

Los últimos estudios realizados en la literatura definen a la vía de RAS/RAF/MAPK como una de las vías clave para determinar los mecanismos de resistencia primaria y adquirida al tratamiento antiEGFR¹⁰⁰. Mediante observaciones realizadas en patología tumoral de distintos órganos, se ha postulado que la activación de MEK/MAPK está relacionada con la resistencia primaria y adquirida al tratamiento con cetuximab de manera independiente a la activación de EGFR, pudiendo corresponder con un punto de convergencia de distintas vías de señalización tumoral para carcinomas resistentes a inhibidores de EGFR. De hecho, se ha evidenciado que la inhibición directa de MEK en casos resistentes a cetuximab, tenía un efecto antiproliferativo tumoral y se restablecía la sensibilidad al fármaco, sugiriendo que la combinación de inhibidores de EGFR y MEK podría representar una buena estrategia de tratamiento en casos de resistencia al cetuximab en carcinomas colorrectales metastásicos¹⁰⁰.

Por otra parte, en modelos de carcinoma de células no pequeñas pulmonar y CCC, la sobreexpresión del receptor de tirosina-quinasa AXL, el cual está en relación estrecha con la expresión de EGFR con un mecanismo regulatorio dependiente de éste, es suficiente para originar una resistencia adquirida al cetuximab en las células tumorales¹⁰². La activación de dicho receptor estimula la proliferación celular, activación de EGFR y la señal de MAPK en las células tumorales resistentes a cetuximab, pudiendo formar parte de uno de los mecanismos de activación paralela de MAPK y su vía de señalización tumoral que no es bloqueado por el cetuximab. En este estudio se demostró que la resistencia seguida de un tratamiento prolongado con cetuximab estaba asociada a la hiperactivación de AXL y su asociación con EGFR¹⁰².

En nuestro estudio, observamos un menor tiempo de supervivencia y menor tiempo libre de enfermedad en aquellos tumores que expresaban pMAPK. De igual forma, al separar por grupos de tratamientos, se observó un mayor riesgo de recidiva y de muerte en los pacientes que fueron tratados en el grupo de QT-cetuximab. Estos resultados pueden deberse a que la activación persistente de la vía de pMAPK conlleva a una probable resistencia al tratamiento recibido, lo cual se demuestra por la falta de respuesta clínica. A pesar de haber encontrado sólo un 2% de mutaciones de HRAS y 1% de mutaciones en BRAF, debe existir otro mecanismo no demostrado aún, que mantenga la activación de la vía independientemente del estado de activación de EGFR. En los casos en que se determine la expresión de pMAPK en las células tumorales, la combinación de QT convencional y cetuximab puede no ser del todo efectiva. Se deben ampliar los estudios para probar en estos casos la efectividad de añadir al tratamiento basal un fármaco dirigido contra MAPK.

Nuestro estudio también demostró una relación entre la expresión de pMAPK y la presencia de metástasis ganglionares al momento del diagnóstico. Se conoce que en el CCC existe una probabilidad de presentar metástasis ganglionares ocultas en el 10-50% de los casos⁹⁵, por lo cual la expresión de pMAPK, podría ser tomada en cuenta a la hora de valorar los factores pronósticos en el momento del diagnóstico y su posible implicación en la evolución de la enfermedad.

4. CCC y VPH. Papel del factor de supresión tumoral p16

La presencia de infección por VPH en CCC ha demostrado ser un factor pronóstico significativo en la evolución de la enfermedad, confiriendo un efecto “protector” de mejor sobrevida. Las características del genotipo y el perfil molecular de los CCC asociados a VPH podrían ser los responsables de la radiosensibilidad de estos tumores que, en definitiva, confieren un mejor control locoregional¹⁶.

Los genotipos de alto riesgo de VPH (16 y 18) asociados a CCC, especialmente aquellos de localización orofaríngea, alteran las vías de señalización para activar el crecimiento y desarrollo celular e inhibir la apoptosis. La transformación maligna comienza con la inactivación del gen de supresión tumoral p53 por la proteína constitutiva del virus E6, mientras que una segunda proteína viral E7 inactiva la proteína supresora de retinoblastoma (Rb). Funcionalmente ambas proteínas (E6 y E7) alteran la regulación del ciclo celular y los mecanismos de reparación del ADN, ocasionando cambios genéticos que conllevan a la progresión de CCC. La proteína E6 inicia un proceso de degradación de p53 y E7 promueve el inicio de una división celular incontrolada, activando posteriormente a ciclina D1, la cual es inhibida por p16⁹⁴.

Lassen *et al.*, estudiaron el estatus de infección por VPH en una cohorte de pacientes con CCC, expresados a través de p16, demostrando que la expresión de esta proteína era el factor determinante e independiente más sólido de control tumoral locoregional, así como de supervivencia global y permanencia libre de enfermedad relacionado directamente con la infección por VPH¹⁶.

Coincidiendo con Lassen *et al.*, en nuestro estudio, se observó un efecto “protector” del VPH con una mayor supervivencia global en los pacientes cuyos tumores expresaban p16, siendo un factor independiente en el estudio multivariante asociado a una mejor respuesta terapéutica.

La razón por la cual los CCC-VPH+ presentan una mejor respuesta al tratamiento no está clara. Kimple *et al.*, han sugerido que se debe a que la proteína p53 en las células tumorales podría seguir siendo parcialmente funcional, a pesar de encontrarse con niveles bajos, condicionando mejor sensibilidad a la radiación. Como consecuencia,

tendrían la capacidad de reactivarse e inducir la apoptosis celular tras recibir RT¹⁰³. Otra posible causa se atribuye a la ausencia de cambios genéticos iniciales inducidos por carcinógenos en el epitelio y el desarrollo de tumores multifocales, con el consiguiente mejor control de la enfermedad. En este mismo sentido, Goodwin *et al.* han demostrado en líneas celulares de carcinoma de cérvix asociado a VPH, que el bloqueo de la expresión de E6 y E7 conlleva la restauración de los niveles de pRb y p53, lo cual suele ser suficiente para detener el crecimiento celular y reactivar el control de la apoptosis celular¹⁰⁴.

Las mutaciones en p53 son unas de las alteraciones más iniciales y frecuentes en CCC, pudiendo ser detectadas de igual manera en lesiones displásicas y en márgenes de resección negativos. En un estudio mutacional en el que se evaluaban 12 tipos de cáncer, se describieron mutaciones de p53 en aproximadamente 70% de los casos de CCC, siendo junto al carcinoma de ovario y pulmón, los más frecuentes con mutaciones de p53¹⁰⁵. La incidencia de mutaciones de p53 están en relación a su vez, con el consumo de alcohol y tabaco, descrito como factor de riesgo en la mayoría de pacientes con CCC¹⁰⁶. En nuestro estudio se observó un 43% de casos positivos, resultados ligeramente por debajo de la literatura, que pueden ser mejorados probablemente si se aumentase el tamaño muestral.

En los tumores con p53 *wild type*, la función puede estar inactivada a través de otros mecanismos como infección por VPH, sobreexpresión o amplificación de MDM2 o delección del gen p14ARF¹⁰⁶. Suh *et al.*, demostraron que la combinación de la mutación de p53, la pérdida de p16 y la sobreexpresión de ciclina D1 están asociados con disminución en la supervivencia. Adicionalmente, las mutaciones de p53 son predictivas de peor respuesta a la QT y RT, asociados a mayor frecuencia de recidivas^{24, 106}. La presencia de una respuesta apoptótica mediada por el factor de supresión tumoral p53 intacto, a un daño del ADN inducido por la radiación, ha sido propuesto como una posible explicación a la buena respuesta en los casos de CCC asociados a VPH, pero los mecanismos exactos no están claros¹⁶.

En nuestra serie, observamos 9 casos que expresaban p16 de manera intensa y difusa en las células tumorales. De éstos, se pudo comprobar la presencia de VPH en 3 de

ellos, siendo el serotipo VPH16 el más frecuente, tal y como se describe en la literatura^{16,17}. De los 6 casos restantes, se pudo evidenciar que en 5 de ellos la proteína supresora p53 estaba marcadamente expresada en las células tumorales, lo cual podría corresponder a que el cáncer sigue otra vía de señalización distinta al VPH, como las descritas anteriormente. Hubo un caso en donde no se pudo detectar la presencia de VPH ni la expresión de p53, lo cual podría explicarse de diversas maneras. En primer lugar, podría corresponder a un serotipo viral no detectado con el método utilizado, aunque no sería de los más frecuentes en CCC. Por otra parte, podría ser un problema técnico en la realización y procesamiento de la muestra y técnica de inmunohistoquímica, o podría corresponder a un cáncer que sigue una vía de señalización distinta a la de EGFR, sin relación con VPH ni p53.

Boeckx *et al.*, describen que las células sensibles a cetuximab pueden disminuir su respuesta al silenciar p53 en dichas células, mientras que si se restablece la función de p53, volverían al estado inicial de sensibilidad al cetuximab. En un estudio sobre líneas celulares resistentes a cetuximab se indujo la función de p53, observando un restablecimiento de la sensibilidad al cetuximab. Adicionalmente, el cetuximab fue capaz de inhibir el crecimiento celular en las células con p53 *wild type*, pero no en las p53 mutadas⁷⁸. En otro estudio, se reportó que no existían beneficios en el control y el pronóstico de la enfermedad al añadir cetuximab al tratamiento convencional de RT-QT en casos de CCC-VPH+¹⁰⁷.

En nuestro estudio, la expresión de p53 no se encontró asociado al riesgo de recidiva y muerte. Sin embargo, se observó una relación entre la expresión de p53 en hombres y en pacientes con hábito alcohólico, sugiriendo un probable mecanismo oncogénico asociado al metabolismo del alcohol. En general, existe poca evidencia experimental que indique que la pérdida de función de p53 puede predecir algún tipo de resistencia al tratamiento antiEGFR. No obstante, son necesarios más estudios que dirijan la atención a este punto para aclarar los datos hasta ahora descritos.

En resumen, las diferencias en pronóstico y respuesta al tratamiento en los CCC/VPH+, implican una revisión personalizada del paciente para valorar la aplicación de un tratamiento menos agresivo con similar respuesta y así disminuir la morbilidad del

paciente. Sin embargo, todavía quedan algunas dudas en los mecanismos de acción y control del VPH, con lo cual el tratamiento actual de estos pacientes sigue siendo el convencional para los CCC, en espera de nuevos avances que logren aportar nuevos datos para el tratamiento y seguimiento de estos pacientes.

El CCC ha demostrado ser de las neoplasias con mayores desafíos en el manejo médico. La era de la medicina personalizada ha permitido estudiar cada caso en particular para ofrecer el tratamiento que obtenga mejores resultados. Se ha demostrado que existen distintas vías de señalización tumoral en el CCC, siendo las vías derivadas de la activación de EGFR las más frecuentes. Los estudios exhaustivos de las proteínas que constituyen dichas vías han permitido identificar mecanismos de resistencia a los tratamientos y probables alteraciones moleculares que conllevan al fallo en la respuesta. Es así como, en nuestro estudio, hemos podido determinar que tanto la vía de PI3K/AKT/mTOR y RAS/RAF/MAPK, participan en los probables mecanismos de resistencia al tratamiento. El cetuximab, a pesar de haber tenido muy buenos resultados al comienzo, presenta un alto índice de resistencia primaria y secundaria, en probable relación con la persistencia de la activación de las distintas proteínas de las vías de carcinogénesis dependientes de EGFR, las cuales mantienen su señalización a pesar de ser bloqueadas en distintos puntos así como de probables vías alternas a EGFR.

Durante la realización del trabajo, no pudieron ser evaluados otros factores clínicopatológicos que afectan el pronóstico de los pacientes con CCC, tales como la afectación de los márgenes de resección, invasión vascular y linfática y la displasia del epitelio adyacente. De la misma manera, la heterogeneidad de la expresión en las proteínas estudiadas, limita la valoración al hacer el estudio sobre biopsias diagnósticas previas al tratamiento en la mayoría de casos y no con las piezas de resección quirúrgica donde se podría haber observado la expresión en la totalidad del tumor.

VII. CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

1. La presencia de metástasis ganglionares al momento del diagnóstico es un factor independiente de mal pronóstico en cuanto a la supervivencia global y libre de enfermedad, siendo de igual manera independiente al tratamiento recibido.

2. p16 constituye un factor predictor de mejor respuesta al tratamiento de manera independiente con mejor supervivencia global y control locoregional relacionado directamente con la infección por VPH.

3. La expresión de eIF4E intratumoral se correlaciona con peor control locoregional de la enfermedad al aumentar el riesgo de presentar recidivas en un menor intervalo de tiempo.

4. La expresión de mTOR/pmTOR constituyen factores de peor pronóstico en cuanto a la supervivencia global y libre de enfermedad de manera independiente al bloqueo de EGFR.

5. La expresión de pMAPK intratumoral podría ser considerada como factor predictor de la aparición metástasis ganglionares.

6. La activación persistente de la vía de pMAPK conlleva a una probable resistencia al tratamiento recibido con antiEGFR/Cetuximab, pudiendo corresponder con un factor clave en los mecanismos de resistencia primaria al tratamiento. Podría haber beneficio terapéutico el conocer su estado de activación previo a la indicación del tratamiento.

7. Cetuximab podría tener un probable efecto inductor o sensibilizador al tratamiento con RT y QT, en aquellos pacientes cuyos tumores expresen pmTOR con el consiguiente mejor control locoregional de la enfermedad.

8. Los mecanismos de resistencia a Cetuximab se encuentran en probable relación con la persistencia en la activación de las distintas proteínas de las vías de carcinogénesis como mTOR y MAPK, dependientes de EGFR, así como de probables vías alternas a EGFR.

9. En resumen, se plantea que la combinación de inhibidores de mTOR puede tener un efecto sinérgico con el tratamiento antiEGFR en el CCC. Se deben continuar los estudios valorando dichos tratamientos junto a la activación de las distintas vías carcinógenas descritas, para validar el beneficio terapéutico de nuestros resultados.

VIII. AGRADECIMIENTOS

VIII. AGRADECIMIENTOS

Llegados a la última parte de mi tesis doctoral, quisiera agradecer a tantas personas que han formado parte de mi vida y que directa o indirectamente me han permitido llegar a este punto y dar un gran “Gracias”.

A Santiago que apostó por mí cuando por primera vez me propuso dirigir este proyecto y que dobló la apuesta al “repescarme” y permitirme trabajar en su equipo.

A Marga, que además de directora de tesis ha sido una gran compañera, guía y hasta madre postiza cuando ha tocado.

A Jordi, por su interés y apoyo en la realización de este proyecto.

A Javi, porque de dos semanas en dos semanas hemos logrado acabar el proyecto con éxito.

A Pere, porque con su gran sonrisa alegra cualquier tristeza, inspira buenas energías y ahora llena de arte mi trabajo.

A Inés, Natalia, Arantxa, Helena, Nuria y Lirola, porque me iniciaron en este mundo en el cual estoy encantada.

A Arelly por su ayuda inestimable con el temido y misterioso mundo de la estadística.

Al equipo de Radioterapia, Oncología y Cirugía Maxilofacial, por su colaboración en estos años de trabajo.

A Teresa y Rosa, porque hacen las cosas con cariño (.....y se nota). Siempre amables y dispuestas a solucionar problemas, incluso en los días grises.

A Stefania, porque ha sido un gran redescubrimiento y un gran apoyo en los momentos complicados y a Marta porque siempre te contagia su alegría.

A Mayte, Elena, Vicente y a los compañeros del Hospital, porque “se sufre pero se goza”.

A mis compis de siempre Irene y Alejandra, porque no me pude encontrar con unas mejores co-R's.

A Sandra, porque con su estilo inigualable me ha acompañado y empujado a seguir adelante en varias oportunidades y porque nuestros destinos están ligados.

A Rocío, por ser mi mano izquierda y por las tardes de catarsis.

A mis amigos de la universidad, porque tenemos la inmensa fortuna de estar cerca y seguir siendo la "neofamilia".

A mis amigas del cole, porque no hay como una amiga de toda la vida.

A mi hermana, porque siempre me acompaña y llena mis déficits artísticos.

A mis padres, porque me han hecho lo que soy.

A Moncho, porque me hace la mujer más feliz del mundo.

A Nacho y al que viene en camino, porque son mi vida.

IX. REFERENCIAS

IX. REFERENCIAS

- 1 Hitt R. Cáncer de cabeza y cuello Epidemiología Causas y factores de riesgo Estadiaje Factores pronósticos. Soc. Española Oncol. Médica. 2013; : 1–28.
- 2 Globocan. Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization (WHO). 2012; **33**; disponible en <http://globocan.iarc.fr>.
- 3 ISCIII. Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, España. Estadísticas. 2012; disponible en www.isciii.es.
- 4 Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology & Genetics Head and Neck Tumours IARC. 2005.
- 5 Argiris A, Karamouzis M V, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet* 2008; **371**: 1695–709.
- 6 Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 2011; **11**: 9–22.
- 7 Van Monsjou HS, Wreesmann VB, van den Brekel MWM, Balm AJM. Head and neck squamous cell carcinoma in young patients. *Oral Oncol* 2013; **49**: 1097–102.
- 8 Bose P, Brockton NT, Dort JC. Head and neck cancer: from anatomy to biology. *Int J cancer* 2013; **133**: 2013–23.
- 9 (SEOM) SE de OM. Las Cifras del Cáncer en España 2014. 2014; disponible en www.seom.org.
- 10 Succi M, de Castro TB, Galbiatti ALS, *et al.* DNMT3B C46359T and SHMT1 C1420T polymorphisms in the folate pathway in carcinogenesis of head and neck. *Mol Biol Rep* 2014; **41**: 581–9.
- 11 Pfeiffer J, Wiech T, Maier W, Ridder GJ, Laszig R, Birkenhäger R. Head and neck cancer in young adults and nonsmokers: study of cancer susceptibility by genome-wide high-density SNP microarray mapping. *Acta Otolaryngol* 2011; **131**: 1091–8.
- 12 Silva Galbiatti AL, Rebolho Batista da Silva LM, Ruiz-Cintra MT, *et al.* Association between 11 genetic polymorphisms in folate-metabolising genes and head and neck cancer risk. *Eur J Cancer* 2012; **48**: 1525–31.

- 13 West K, Clark AS, Linnoila IR. Rapid Akt activation by nicotine and a tobacco carcinogen modulates the phenotype of normal human airway epithelial cells. *J Clin Invest* 2003; **111**: 81–90.
- 14 Du L, Shen J, Weems A, Lu S-L. Role of phosphatidylinositol-3-kinase pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *J Oncol* 2012; **2012**: 1–12.
- 15 Syrjänen KJ, Pyrhönen S, Syrjänen SM, Lamberg M a. Immunohistochemical demonstration of Human papilloma virus (HPV) antigens in oral squamous cell lesions. *Br J Oral Surg* 1983; **21**: 147–53.
- 16 Lassen P. The role of Human papillomavirus in head and neck cancer and the impact on radiotherapy outcome. *Radiother Oncol* 2010; **95**: 371–80.
- 17 Chung CH, Gillison ML. Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications. *Clin cancer Res* 2009; **15**: 6758–62.
- 18 Friedman JM, Stavas MJ, Cmelak AJ. Clinical and scientific impact of human papillomavirus on head and neck cancer. *World J Clin Oncol* 2014; **5**: 781–91.
- 19 Mendelsohn AH, Lai CK, Shintaku IP, *et al.* Histopathologic findings of HPV and p16 positive HNSCC. *Laryngoscope* 2010; **120**: 1788–94.
- 20 Browne K, Gee BL. Asbestos exposure and laryngeal cancer. *Ann Occup Hyg* 2000; **44**: 239–50.
- 21 Maier H, Tisch M. Epidemiology of laryngeal cancer: results of the Heidelberg case-control study. *Acta Otolaryngol* 1997; **527**: 160–4.
- 22 De Carvalho TG, De Carvalho AC, Maia DCC, Ogawa JK, Carvalho AL, Vettore AL. Search for mutations in signaling pathways in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2013; **30**: 334–40.
- 23 Vincenzi B, Zoccoli A, Pantano F, Venditti O, Galluzzo S. CETUXIMAB : From Bench to Bedside. *Curr Cancer Drug Targets* 2010; **10**: 80–95.
- 24 Sun W, Califano J a. Sequencing the head and neck cancer genome: implications for therapy. *Ann N Y Acad Sci* 2014; **1333**: 33–42.
- 25 Tabatabaeifar S, Kruse T a, Thomassen M, Larsen MJ, Sørensen J a. Use of next generation sequencing in head and neck squamous cell carcinomas: A review. *Oral Oncol* 2014; **50**: 1035–40.
- 26 Sun W, Gaykalova D a, Ochs MF, *et al.* Activation of the NOTCH pathway in head and neck cancer. *Cancer Res* 2014; **74**: 1091–104.
- 27 Gerber DE. EGFR Inhibition in the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer. *Drug Dev Res* 2008; **69**: 359–72.

- 28 Shigeishi H, Higashikawa K, Hiraoka M, *et al.* Expression of epiregulin, a novel epidermal growth factor ligand associated with prognosis in human oral squamous cell carcinomas. *Oncol Rep* 2008; **19**: 1557–64.
- 29 Brabender J, Danenberg KD, Metzger R, *et al.* Epidermal growth factor receptor and HER2-neu mRNA expression in non-small cell lung cancer Is correlated with survival. *Clin cancer Res* 2001; **7**: 1850–5.
- 30 Kuan CT, Wikstrand CJ, Bigner DD. EGF mutant receptor VIII as a molecular target in cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* 2001; **8**: 83–96.
- 31 Moscatello D, Holgado-Madruga M, Godwin A, Ramirez G, Gunn G *et al.* Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res* 1995; **55**: 5536–9.
- 32 Engelman J a, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 2006; **7**: 606–19.
- 33 Zhao L, Vogt PK. Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene* 2008; **27**: 5486–96.
- 34 COSMIC. Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. 2015; disponible en <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic>.
- 35 Estilo CL, O-charoenrat P, Ngai I, *et al.* The Role of Novel Oncogenes Squamous Cell Carcinoma-related Oncogene and Phosphatidylinositol 3-Kinase p110 in Squamous Cell Carcinoma of the Oral Tongue 1. *Clin cancer Res* 2003; **9**: 2300–6.
- 36 Keniry M, Parsons R. The role of PTEN signaling perturbations in cancer and in targeted therapy. *Oncogene* 2008; **27**: 5477–85.
- 37 Cheung LWT, Hennessy BT, Li J, *et al.* High frequency of PIK3R1 and PIK3R2 mutations in endometrial cancer elucidates a novel mechanism for regulation of PTEN protein stability. *Cancer Discov* 2011; **1**: 170–85.
- 38 Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 2007; **129**: 1261–74.
- 39 Vasudevan KM, Barbie D a, Davies M a, *et al.* AKT-independent signaling downstream of oncogenic PIK3CA mutations in human cancer. *Cancer Cell* 2009; **16**: 21–32.
- 40 Vogt PK, Gymnopoulos M, Hart JR. PI 3-kinase and cancer: changing accents. *Curr Opin Genet Dev* 2009; **19**: 12–7.

- 41 Eom HS, Kim MS, Hur SY, Yoo NJ, Lee SH. Absence of oncogenic AKT1 E17K mutation in prostate, esophageal, laryngeal and urothelial carcinomas, hepatoblastomas, gastrointestinal stromal tumors and malignant meningiomas. *Acta Oncol (Madr)* 2009; **48**: 1084–5.
- 42 Bleeker FE, Felicioni L, Buttitta F, *et al.* AKT1(E17K) in human solid tumours. *Oncogene* 2008; **27**: 5648–50.
- 43 Iamaroon A, Krisanaprakornkit S. Overexpression and activation of Akt2 protein in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2009; **45**: 175–9.
- 44 Molinolo A a, Amornphimoltham P, Squarize CH, Castilho RM, Patel V, Gutkind JS. Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. *Oral Oncol* 2009; **45**: 324–34.
- 45 Amornphimoltham P, Patel V, Sodhi A, *et al.* Mammalian target of rapamycin, a molecular target in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 2005; **65**: 9953–61.
- 46 Liao Y-M, Kim C, Yen Y. Mammalian target of rapamycin and head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck Oncol* 2011; **3**: 22.
- 47 Guertin D a, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell* 2007; **12**: 9–22.
- 48 Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM. Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol* 2005; **17**: 596–603.
- 49 Castellvi J, Garcia A, Ruiz-Marcellan C, Hernández-Losa J, Peg V, Salcedo M, Gil-Moreno A R y CS. Cell signaling in endometrial carcinoma: phosphorylated 4E-binding protein-1 expression in endometrial cancer correlates with aggressive tumors and prognosis. *Hum Pathol* 2009; **40**: 1418–26.
- 50 Clark C, Shah S, Herman-ferdinandez L, *et al.* Teasing out the best molecular marker in the AKT/MTOR pathway in HNSCC patients. *Laryngoscope* 2011; **120**: 1159–65.
- 51 De Benedetti A, Graff JR. eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene* 2004; **23**: 3189–99.
- 52 Topisirovic I, Ruiz-gutierrez M, Borden KLB. Phosphorylation of the Eukaryotic Translation Initiation Factor eIF4E Contributes to Its Transformation and mRNA Transport Activities. *Cancer Res* 2004; **64**: 8639–42.
- 53 Armengol G, Rojo F, Castellví J, *et al.* 4E-binding protein 1: a key molecular ‘funnel factor’ in human cancer with clinical implications. *Cancer Res* 2007; **67**: 7551–5.

- 54 Ferrandiz-Pulido C, Masferrer E, Toll A, *et al.* mTOR signaling pathway in penile squamous cell carcinoma: pmTOR and pelf4E over expression correlate with aggressive tumor behavior. *J Urol* 2013; **190**: 2288–95.
- 55 Mader S, Lee HAN, Pause A, Sonenberg N. The Translation Initiation Factor eIF-4E Binds to a Common Motif Shared by the Translation Factor eIF-4 and the Translational Repressors 4E-Binding Proteins. *Mol Cell Biol* 1995; **15**: 4990–7.
- 56 Sorrells DL, Ghali GE, Meschonat C, *et al.* Competitive PCR to detect eIF4E gene amplification in head and neck cancer. *Head Neck* 1999; **1**: 60–5.
- 57 Kang S, Elf S, Lythgoe K, *et al.* p90 ribosomal S6 kinase 2 promotes invasion and metastasis of human head and neck squamous cell carcinoma cells. *J Clin Invest* 2010; **120**: 1165–77.
- 58 Friday BB, Adjei A a. Advances in targeting the Ras/Raf/MEK/Erk mitogen-activated protein kinase cascade with MEK inhibitors for cancer therapy. *Clin cancer Res* 2008; **14**: 342–6.
- 59 Liebmann C. Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: Paradigms of multiplicity. *Cell Signal* 2001; **13**: 777–85.
- 60 Juliano RL. Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002; **42**: 283–323.
- 61 Castellano E, Santos E. Functional specificity of ras isoforms: so similar but so different. *Genes Cancer* 2011; **2**: 216–31.
- 62 Karnoub AE, Weinberg R a. Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; **9**: 517–31.
- 63 Bar-sagi D. A Ras by Any Other Name. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 1441–3.
- 64 Bentires-Alj M, Kontaridis MI, Neel BG. Stops along the RAS pathway in human genetic disease. *Nat Med* 2006; **12**: 283–5.
- 65 Yokota T. Is biomarker research advancing in the era of personalized medicine for head and neck cancer? *Int J Clin Oncol* 2014; **19**: 211–9.
- 66 Sheikh Ali M, Gunduz M, Gunduz E, *et al.* Lack of B-RAF Mutations in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Folia Biol* 2008; **54**.
- 67 Yokota T, Ura T, Shibata N, *et al.* BRAF mutation is a powerful prognostic factor in advanced and recurrent colorectal cancer. *Br J Cancer* 2011; **104**: 856–62.

- 68 Yamatodani T, Ekblad L, Kjellén E, Johnsson A, Mineta H, Wennerberg J. Epidermal growth factor receptor status and persistent activation of Akt and p44/42 MAPK pathways correlate with the effect of cetuximab in head and neck and colon cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009; **135**: 395–402.
- 69 Brand TM, Iida M, Wheeler DL. Molecular mechanisms of resistance to the EGFR monoclonal antibody cetuximab. *Cancer Biol Ther* 2011; **11**: 777–92.
- 70 Sriuranpong V, Park JI, Amornphimoltham P, Patel V, Nelkin BD, Gutkind JS. Epidermal Growth Factor Receptor-independent Constitutive Activation of STAT3 in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Is Mediated by the Autocrine / Paracrine Stimulation of the Interleukin 6 / gp130 Cytokine System. *Cancer Res* 2003; : 2948–56.
- 71 Sen M, Pollock NI, Black J, *et al.* JAK Kinase Inhibition Abrogates STAT3 Activation and Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Tumor Growth. *Neoplasia* 2015; **17**: 256–64.
- 72 Flex E, Petrangeli V, Stella L, *et al.* Somatically acquired JAK1 mutations in adult acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med* 2008; **205**: 751–8.
- 73 Walters DK, Mercher T, Gu T-L, *et al.* Activating alleles of JAK3 in acute megakaryoblastic leukemia. *Cancer Cell* 2006; **10**: 65–75.
- 74 Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, *et al.* Mechanisms of Disease Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005; **365**: 1054–61.
- 75 Nagpal JK, Mishra R, Das BR. Activation of Stat-3 as one of the early events in tobacco chewing-mediated oral carcinogenesis. *Cancer* 2002; **94**: 2393–400.
- 76 Krop I, Demuth T, Guthrie T, *et al.* Phase I pharmacologic and pharmacodynamic study of the gamma secretase (Notch) inhibitor MK-0752 in adult patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2012; **30**: 2307–13.
- 77 Tolcher AW, Messersmith W a, Mikulski SM, *et al.* Phase I study of RO4929097, a gamma secretase inhibitor of Notch signaling, in patients with refractory metastatic or locally advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2012; **30**: 2348–53.
- 78 Boeckx C, Baay M, Wouters A, *et al.* Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Therapy in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Focus on Potential Molecular Mechanisms of Drug Resistance. *Oncologist* 2013; : 850–64.
- 79 Rinaldo A, Ferlito A, Silver CE. Early history of neck dissection. *Eur Arch oto-rhino-laryngology* 2008; **265**: 1535–8.

- 80 Grupo Español de Tratamiento de Tumores de Cabeza y Cuello. Guías de Práctica Clínica para el Tratamiento del Cáncer de Cabeza y Cuello. *Clin Transl Oncol* 2010.
- 81 Licitra L, Mesia R, Rivera F, *et al.* Evaluation of EGFR gene copy number as a predictive biomarker for the efficacy of cetuximab in combination with chemotherapy in the first-line treatment of recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: EXTREME study. *Ann Oncol* 2011; **22**: 1078–87.
- 82 Humblet Y. Cetuximab: an IgG 1 monoclonal antibody for the treatment of epidermal growth factor receptor- expressing tumours. *Expert Opin Investig Drugs* 2004; **5**: 1621–33.
- 83 Kawamoto T, Polikoff J, Mendelsohn J. Growth stimulation of A431 cells by epidermal growth factor: Identification of high-affinity receptors for epidermal growth factor by an anti-receptor monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**: 1337–41.
- 84 Gill GN, Kawamoto T, Cochets C, *et al.* Monoclonal Anti-epidermal Growth Factor Receptor Antibodies Which Are Inhibitors of Epidermal Growth Factor Binding and Antagonists of Epidermal Growth Factor-stimulated Tyrosine Protein Kinase Activity. *J Biol Chem* 1984; **259**: 7755–60.
- 85 Bou-Assaly W, Mukherji S. Cetuximab (Erbix). *Am J Neuroradiol* 2010; **31**: 626–7.
- 86 Bonner J, Harari P, Giralt J. Radiotherapy plus Cetuximab for Squamous- Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med* 2006; **354**: 567–78.
- 87 Wu X, Bhayani MK, Dodge CT, *et al.* Coordinated Targeting of the EGFR Signaling Axis by MicroRNA- 27a. *Oncotarget* 2013; **4**: 1388–98.
- 88 Yang X, Zhang X, Mortenson ED, Radkevich-Brown O, Wang Y, Fu Y-X. Cetuximab-mediated tumor regression depends on innate and adaptive immune responses. *Mol Ther* 2013; **21**: 91–100.
- 89 Liu B, Fang M, Lu Y, Mendelsohn J, Fan Z. Fibroblast growth factor and insulin-like growth factor differentially modulate the apoptosis and G1 arrest induced by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody. *Oncogene* 2001; **20**: 1913–22.
- 90 Union for International Cancer Control (UICC). TNM. 2009; disponible en www.uicc.org/tnm.

- 91 Rojo F, Najera L, Lirola J, *et al.* 4E-binding protein 1, a cell signaling hallmark in breast cancer that correlates with pathologic grade and prognosis. *Clin cancer Res* 2007; **13**: 81–9.
- 92 Genomica. CLART CMA KRAS·BRAF·PI3K. Disponible en www.genomica.com.
- 93 Jacobs M V, Snijders PJF, Brule AJCVANDEN, Helmerhorst TJM, Meijer CJLM, Walboomers JANMM. A General Primer GP5 / GP6 -Mediated PCR-Enzyme Immunoassay Method for Rapid Detection of 14 High-Risk and 6 Low-Risk Human Papillomavirus Genotypes in Cervical Scrapings. *J Clin Microbiol* 1997; **35**: 791–5.
- 94 Stadler M, Patel M, Couch M, Hayes DN. Molecular Biology of Head & Neck Cancer: Risks and Pathways. *Hematol Oncol Clin North Am* 2008; **22**: 1099–124.
- 95 Patel V, Marsh C a, Dorsam RT, *et al.* Decreased lymphangiogenesis and lymph node metastasis by mTOR inhibition in head and neck cancer. *Cancer Res* 2011; **71**: 7103–12.
- 96 Molinolo A a, Hewitt SM, Amornphimoltham P, *et al.* Dissecting the Akt/mammalian target of rapamycin signaling network: emerging results from the head and neck cancer tissue array initiative. *Clin cancer Res* 2007; **13**: 4964–73.
- 97 Castellvi J, Garcia A, Rojo F, *et al.* Phosphorylated 4E binding protein 1: a hallmark of cell signaling that correlates with survival in ovarian cancer. *Cancer* 2006; **107**: 1801–11.
- 98 Martínez E. Estudio de vías de señalización celular en astrocitomas infiltrantes difusos. UAB. 2015.
- 99 Nathan CO, Franklin S, Abreo FW, Benedetti A De, Glass J. Analysis of Surgical Margins With the Molecular Marker eIF4E: A Prognostic Factor in Patients With Head and Neck Cancer. *J Clin Oncol* 1999; **17**.
- 100 Troiani T, Napolitano S, Vitagliano D, *et al.* Primary and acquired resistance of colorectal cancer cells to anti-EGFR antibodies converge on MEK/ERK pathway activation and can be overcome by combined MEK/EGFR inhibition. *Clin cancer Res* 2014; **20**: 3775–86.
- 101 Rampias T, Giagini A, Siolos S, *et al.* RAS/PI3K crosstalk and cetuximab resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin cancer Res* 2014; **20**: 2933–46.
- 102 Brand TM, Iida M, Stein AP, *et al.* AXL mediates resistance to cetuximab therapy. *Cancer Res* 2014; **74**: 5152–64.

- 103 Kimple RJ, Smith M a, Blitzer GC, *et al.* Enhanced radiation sensitivity in HPV-positive head and neck cancer. *Cancer Res* 2013; **73**: 4791–800.
- 104 Goodwin EC, DiMaio D. Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 12513–8.
- 105 Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, *et al.* Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 2013; **502**: 333–9.
- 106 Suh Y, Amelio I, Guerrero Urbano T, Tavassoli M. Clinical update on cancer: molecular oncology of head and neck cancer. *Cell Death Dis* 2014; **5**:548.
- 107 Eisbruch A. Adding Cetuximab to Chemoradiation Did Not Benefit Patients With Advanced Head and Neck Cancer: What Were the Reasons? *ASCO Post* 2014; **5**: 7–9.



Universitat Autònoma de Barcelona