



Universidad de Oviedo
- Programa de Doctorado de Investigación en
Cirugía -

**“MODELIZACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA Y RECIDIVA EN
CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LA CAVIDAD
ORAL, MEDIANTE ANÁLISIS DE DATOS CLÍNICOS,
HISTOPATOLÓGICOS, EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE
ADHESIÓN (E-CADHERINA, β -CATENINA Y FAK) Y MÁQUINAS
DE VECTORES DE SOPORTE”**

Pablo Rosado Rodríguez
2011

Tesis Doctoral



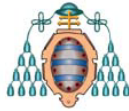
Universidad de Oviedo
- Programa de Doctorado de Investigación en
Cirugía -

**“MODELIZACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA Y RECIDIVA EN
CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LA CAVIDAD
ORAL, MEDIANTE ANÁLISIS DE DATOS CLÍNICOS,
HISTOPATOLÓGICOS, EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE
ADHESIÓN (E-CADHERINA, β -CATENINA Y FAK) Y MÁQUINAS
DE VECTORES DE SOPORTE”**

Tesis Doctoral

Autor:
Pablo Rosado Rodríguez

Directores:
Juan Carlos de Vicente Rodríguez
Lucas de Villalaín Álvarez
Paloma Lequerica Fernández



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español: MODELIZACION DE LA SUPERVIVENCIA Y RECIDIVA EN CARCINOMAS DE CELULAS ESCAMOSAS DE LA CAVIDAD ORAL, MEDIANTE ANALISIS DE DATOS CLINICOS, HISTOPATOLOGICOS, EXPRESION DE MOLECULAS DE ADHESION (E-CADHERINA, β -CATENINA Y FAK) Y MAQUINAS DE VECTORES DE SOPORTE	Inglés: SURVIVAL AND RECURRENCE MODELLING IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA BASED ON CLINICAL AND HISTOPATHOLOGICAL PARAMETERS, CELL ADHESION MOLECULES (E- CADHERIN, B-CATENIN AND FAK) AND SUPPORT VECTOR MACHINES

2.- Autor	
Nombre: PABLO ROSADO RODRÍGUEZ	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: INVESTIGACIÓN EN CIRUGÍA	
Órgano responsable: DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA Y ESPECIALIDADES MÉDICO- QUIRÚRGICAS	

RESUMEN (en español)

El carcinoma oral de células escamosas es una enfermedad de gran importancia debido a su elevada prevalencia, cuya capacidad invasiva y metastásica requiere la alteración de procesos como la adhesión celular y célula-matriz extracelular o de la movilidad celular.

El presente trabajo se ha realizado con el fin de obtener más información sobre el papel que en el cáncer oral juegan in vivo tres moléculas de adhesión: E-cadherina, β -catenina y Fak. Se trata de un estudio retrospectivo en el que se han estudiado 69 casos de carcinoma de células escamosas primarios de la cavidad oral tratados en el Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial del Hospital Universitario Central de Asturias. La técnica de estudio elegida fue la inmunohistoquímica. Se contrastan los datos clínicopatológicos con los resultados inmunohistoquímicos y se analizan las relaciones estadísticas que se establecen entre ambos.

En una segunda fase, hemos llevado a cabo un modelo matemático mediante máquinas de vectores de soporte (Support vector machines o SVM) de las variables supervivencia y recidiva. Este modelo por un lado se centra en la búsqueda de patrones de comportamiento relevantes para la probabilidad de supervivencia y la presencia de recidiva en aquellos pacientes que padecen un cáncer oral y, por otro, introduce un modelo inteligente capaz de predecir el comportamiento de las variables supervivencia y recidiva en función del resto de variables disponibles identificadas como relevantes.



UNIVERSIDAD DE OVIEDO
Vicerrectorado de Ordenación Académica
y Nuevas Titulaciones



CENTRO INTERNACIONAL
DE POSTGRADO
CAMPUS DE EXCELENCIA
INTERNACIONAL

RESUMEN (en Inglés)

Oral squamous cell carcinoma is a life-threatening disease with a high worldwide prevalence. Invasion and metastasis require the alteration of certain processes such as cell-cell and cell-extracellular matrix adhesion or cell mobility. This work has been done to learn more about the role played in oral cancer by three adhesion molecules: E-cadherin, β -catenin and Fak. This is a retrospective study, in which we have studied 69 cases of primary oral squamous cell carcinoma treated at the Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Hospital Universitario Central de Asturias. The technique chosen was the immunohistochemical study. Clinicopathological data are contrasted with the immunohistochemical results and the statistical relationships established between them are subsequently reviewed. In a second phase, we have carried out a mathematical model using support vector machines so as to predict survival and recurrence probability. This model focuses on one hand in the search for relevant patterns for survival and recurrence, and, on the other hand, introduces an intelligent model that can predict the survival and recurrence according to related variables.

SR. DIRECTOR DE DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA Y ESPECIALIDADES MÉDICO-QUIRÚRGICAS
SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO INVESTIGACIÓN EN
CIRUGÍA Y ESPECIALIDADES MÉDICO-QUIRÚRGICAS

A mis padres, hermano y abuelos

ÍNDICE

INDICE.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	vii
ABREVIATURAS.....	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ESTADO ACTUAL.....	5
2.1 Cáncer oral: aspectos generales	6
2.1.1 Epidemiología	6
2.1.2 Histología	7
2.1.3 Etiopatogenia	8
2.1.4 Desarrollo y progresión del cáncer oral.....	8
2.1.5 Modelos de diseminación tumoral.....	10
2.1.6 Importancia del estroma en la capacidad metastásica del tumor.....	11
2.1.7 Angiogénesis en el cáncer oral	12
2.1.8 Estadaje tumoral.....	12
2.1.9 Tratamiento	14
2.1.10 Pronóstico.....	15
2.2 Moléculas de adhesión.....	19
2.3 E-cadherina	19
2.3.1 Estructura y función	19
2.3.2 Funciones de E-cadherina	20
2.3.3 E-cadherina y carcinogénesis	21
2.3.4 E-cadherina y cáncer.	23
2.3.5 E-cadherina y cáncer oral	24
2.4 β-catenina	25
2.4.1 Estructura	25
2.4.2 Funciones	25
2.4.3 β-catenina y cáncer.....	27

2.4.4 β -catenina y cáncer oral	28
2.5 Quinasa de adhesión focal (Fak)	30
2.5.1 Estructura	31
2.5.2 Funciones de Fak.....	31
2.5.3 Fak y cáncer.....	32
2.5.4 Fak y cáncer oral.....	33
III. HIPÓTESIS DE TRABAJO	35
IV. OBJETIVOS.....	37
V. MATERIAL Y MÉTODO	39
5.1 Pacientes	40
5.1.1 Selección de la muestra.....	40
5.1.2 Parámetros clinicopatológicos evaluados.....	40
5.1.3 Tratamiento	42
5.1.4 Seguimiento.....	42
5.2 Estudio microscópico.....	43
5.2.1 Elaboración de <i>microarrays</i> tisulares.	43
5.2.2 Técnica inmunohistoquímica	43
5.2.3 Controles	44
5.2.4 Valoración de los resultados inmunohistoquímicos.....	44
5.3 Análisis estadístico.....	45
5.4 Modelo de predicción mediante <i>Support Vector Machines</i> (SVM).....	46
5.4.1 Análisis discriminante de la muestra.....	49
5.4.2 Selección de variables por medio de SVM.....	50
5.4.3 Modelo clasificador SVM.....	52
VI. RESULTADOS.....	53
6.1 Inmunoexpresión de E-cadherina en los carcinomas orales de células escamosas.	54

6.2 Inmunexpresión de E-cadherina en los carcinomas orales de células escamosas primarios y su relación con los parámetros clinicopatológicos	56
6.3 Inmunexpresión de β -catenina en los carcinomas orales de células escamosas...	57
6.4 Inmunexpresión de β -catenina en los carcinomas orales de células escamosas y su relación con los parámetros clinicopatológicos.....	59
6.5 Inmunexpresión de Fak en los carcinomas orales de células escamosas	61
6.6 Inmunexpresión de Fak en los carcinomas orales de células escamosas y su relación con los parámetros clinicopatológicos.....	63
6.7 Análisis discriminante de la muestra	65
6.7.1 Variable “supervivencia”	66
6.7.2 Variable “recidiva”	70
6.8 Selección de variables por medio de SVM	75
6.8.1 SVM con penalización no cóncava.....	75
6.8.2 SVM con el método de Newton.	82
6.8.3 Comparación de resultados.....	89
6.9 Modelo clasificador SVM.....	92
6.9.1 Variable supervivencia	93
6.9.2 Variable recidiva	96
VII. DISCUSIÓN	101
7.1 E-cadherina y cáncer oral.....	102
7.2 β -catenina y cáncer oral	105
7.3 Fak y cáncer oral	107
7.4 Modelo de predicción mediante SVM	110
7.4.1 Análisis discriminante de la muestra.....	111
7.4.2 Selección de variables por medio de SVM.	112
VIII. CONCLUSIONES.....	117
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	123

AGRADECIMIENTOS

Aunque parecía que nunca iba a llegar el momento, por fin me encuentro escribiendo estas palabras de agradecimiento que, en cierta manera, simbolizan la culminación del trabajo de estos años.

Me gustaría expresar mi agradecimiento en primer lugar a los directores de la Tesis. En especial al Prof. Juan Carlos de Vicente, que con su tenacidad me ha animado a realizar este proyecto y, como bien sabe, es y será para mí un referente en este camino de la Cirugía, que emprendí hace ahora ya seis años. Mi más sincera gratitud.

En segundo lugar, mi agradecimiento al Prof. Juan Sebastián López-Arranz, por su apoyo, tutela y cariño durante todos estos años de residencia.

A Soledad Fernández, por su ayuda desinteresada con las muestras, las fotos y todas las horas que me dedicó de su tiempo.

Al Dr. Juan Pablo Rodrigo, que ha tenido a bien apoyarnos y brindarnos un hueco en el laboratorio. A la Dra. Eva Allonca por su ayuda en el procesado de las muestras y tinciones.

A Fernando Sánchez y la empresa *Tecniproject*, artífice de los modelos creados mediante SVM, por su paciencia y explicaciones.

A todos los miembros del Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial del HUCA, con los que he compartido tantas horas y que llegó a convertirse en una segunda casa.

A los miembros del Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial del Hospital de Cabueñes, donde he iniciado una nueva etapa.

A mi familia, que siempre me apoyan incondicionalmente en todo y siempre están “ahí”. No sería nada sin su cariño y su aliento. Gracias.

A mis amigos, gracias por hacerme sacar la sonrisa, tenga el día que tenga.

A Eva, porque durante todo este tiempo siempre has estado a mi lado. Muchas de las horas de esta Tesis te las he robado a ti.

Gijón, 24 de Junio de 2011

ABREVIATURAS

APC: Adenomatous Polyposis Coli

BCL-2: B-cell lymphoma 2

bFGF: Basic Fibroblast Growth Factor CBD

CDH1: Cadherin-1 (gen codificador de cadherina). Conocido también como CD324 (cluster of differentiation 324)

C-Myc: gen clonado de mielocitomatosis

COX-2: ciclooxigenasa-2

CpG: Citosina y Guanina enlazados por fosfatos

CTNNB1: catenin (cadherin-associated protein), beta 1 (gen codificador de catenina).

EGF: Epidermal Growth Factor

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

EpCAM: Epithelial Cell Adhesion Molecule

Fak: Focal Adhesión Kinases

FRA-1: Fos Relating Antigen

GCV: Generic Cross Validation

GSK-3 β : Glycogen Synthase Kinase

Gy: Grays

HER2/C-NEU/ERBB-2: Human Epidermal Growth Factor Receptor- 2

HGF: Hepatocyte growth factor

HIF: Hypoxia Inducible Factor

IGF-R: Insulin-like Growth Factor 1 Receptor

kDa: kiloDaltons

MDM2: Murine Double Minute 2

MMP: Matrix Metalloproteinase.

MT1-MMP: Membrane type 1- Matrix Metalloproteinase

PDGF: Platelet Derived Growth Factor

RMSE: Root of the Mean Square Error

RMSESD: Root Of The Mean Square Error Standard Deviation

SCAD: Smoothly Clipped Absolute Deviation

SFRP: Secreted frizzled-related protein

SIAH-1: Seven In Absentia Homolog

SIP1: Smad-Interacting Protein 1

SRC: Gen de Sarcoma.

SVM: Suport Vector Machines

TIMP: Tissue Inhibitor of Metalloproteinases

TKRs: Tyrosine Kinase Receptors

TMA: Tissue Microarray

TNM: Tumor, Nodes, Metastasis

UICC: Unión Internacional contra el Cáncer

AJCC: American Joint Committee for Cancer Staging and End-Results Reporting

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

Wnt: Wingless type

ZEB1/2: Zinc-finger E-box banding homeobox 1/2

µm: micrómetro

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

El carcinoma oral de células escamosas es una enfermedad de enorme importancia debido a su elevada prevalencia y coste en vidas humanas. Una de sus características clínicas más destacada es la capacidad de invadir los tejidos adyacentes y de metastatizar locoregionalmente. La capacidad invasiva y metastásica de las células tumorales requiere la alteración de procesos como la adhesión celular y célula-matriz extracelular o de la movilidad celular. Estos procesos están mediados por diversas moléculas que forman parte de las denominadas uniones adherentes y contactos focales y que establecen uniones con el citoesqueleto, actuando como señalizadores intracelulares.

Las uniones adherentes median la adhesión célula-célula y están formadas por varias moléculas unidas entre sí. E-cadherina atraviesa la membrana celular y se une a una molécula homóloga de la célula adyacente. En su extremo intracitoplasmático se une a β -catenina y α -catenina y, a través de éstas, al citoesqueleto de actina. Por otro lado, β -catenina forma parte de la llamada vía Wnt. Ante determinados estímulos, β -catenina puede translocarse al núcleo celular y activar ciertos genes implicados en la carcinogénesis.

En cuanto a las uniones célula-matriz extracelular, también existen varias moléculas implicadas. Las integrinas forman parte de los contactos focales, que además de servir de unión a dicha matriz participan en la movilidad celular. Las quinasas de adhesión focal (*Focal adhesion kinases* o Fak) regulan la actividad de las integrinas y, por tanto, de ambos procesos.

Se han publicado varios estudios que han mostrado pérdida de expresión de E-cadherina y β -catenina por parte de los carcinomas escamosos de la cavidad oral. A menudo se han analizado los patrones de expresión y se han puesto en relación con parámetros clínicos e histopatológicos del tumor, pero no con la evolución posterior del paciente tratado de dicho tumor. Con respecto a la expresión de Fak en este tipo de tumores, lo que se conoce hasta la fecha es aún más escaso. Mejor conocidos que los moleculares son los factores clínico-patológicos de relevancia pronóstica. Sin embargo, con frecuencia estos parámetros se muestran poco eficientes e inexactos para conocer el destino de cada paciente concreto. Por tanto, se hace necesaria la búsqueda de marcadores moleculares que nos permitan individualizar el pronóstico de cada paciente, predecir la tendencia recidivante y servir de diana a posibles terapias. Así, el manejo de las bases de datos compuestas por muchas variables y escasos pacientes requieren del desarrollo de

herramientas matemáticas que ayuden a disminuir el error producido por el análisis de los datos.

El presente trabajo se ha realizado con el fin de obtener más información sobre el papel que en el cáncer oral juegan *in vivo* E-cadherina, β -catenina y Fak. Se trata de un estudio retrospectivo en el que se han analizado 69 casos de carcinoma de células escamosas primario de la cavidad oral, tratados en el Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial del Hospital Universitario Central de Asturias. La técnica de estudio elegida fue la inmunohistoquímica, realizada en el Servicio de Anatomía Patológica I del mismo centro. Los datos clínicopatológicos y los resultados inmunohistoquímicos fueron analizados buscando relaciones estadísticas entre ambos.

En una segunda fase, hemos implementado un modelo matemático mediante Máquinas de Vectores de Soporte (*Support vector machines* o SVM), utilizando como variables dependientes la “supervivencia” y la aparición de “recidiva”. Este modelo, por un lado, busca patrones de comportamiento relevantes para la probabilidad de supervivencia y la presencia de recidiva en aquellos pacientes que padecen un cáncer oral y, por otro, introduce un modelo inteligente capaz de predecir el comportamiento de las variables supervivencia y recidiva en función del resto de variables disponibles identificadas como relevantes.

II. ESTADO ACTUAL

2.1 Cáncer oral: aspectos generales

2.1.1 Epidemiología

Los carcinomas de células escamosas de la cabeza y el cuello constituyen el sexto tumor sólido maligno más frecuente (Hoffman et al., 1998) y el 48% de los mismos se localizan en la cavidad oral (Jemal et al., 2004). En algunos países, como La India, el cáncer oral supone hasta el 40% de todos los tumores malignos, presentando igualmente una incidencia particularmente elevada en otras regiones como Brasil, sudeste asiático, Pacífico occidental, Francia o Terranova (Johnson, 1991).

En Europa Occidental, el cáncer oral junto con el de orofaringe ocupa la 7ª posición del total de cánceres. Aquellos países con una mayor incidencia son Francia y Hungría, en contraposición con Grecia y Chipre que ostentan las tasas más bajas. En nuestro país en el año 1998 la incidencia fue de 31,7 casos por 100.000 hombres y de 3,89 casos por 100.000 mujeres (Ministerio de Sanidad y Consumo, 1998). Esta incidencia supone una frecuencia por encima de la media Europea para ese año (21,84%), solamente por debajo de Francia y equiparable a la de Portugal (45,51% y 31,61%, respectivamente). En los EE.UU. la incidencia en el mismo año fue de 9,3 casos por 100.000 habitantes (Ries et al., 2003). Cada año se estima que se diagnostican 575.000 nuevos casos de cáncer oral en todo el mundo (Edwards et al., 2002).

Aproximadamente el 90% de los cánceres orales se diagnostican en personas mayores de 40 años y más del 50% en mayores de 65 años (Edwards et al., 2002; Silverman, 2001). Sin embargo, en los últimos años se ha visto un aumento de incidencia en personas menores de 40 años (Myers et al., 2000), el cual se ha relacionado con la infección por el virus del papiloma humano. El cáncer oral es más frecuente en hombres que en mujeres, con una razón de 1,5:1, si bien las frecuencias se están aproximando, debido a los cambios en los estilos de vida y hábitos tóxicos (Warnakulasuriya, 2009).

Los estudios sobre localizaciones en la cavidad oral y frecuencias relativas aportan resultados no coincidentes. En un estudio de 14.253 casos realizado por el Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los EEUU de Norteamérica (Krolls y Hoffman, 1976), se observaron las siguientes distribución y frecuencias: labio inferior (38%), lengua

(22%), suelo bucal (17%), encía (6%), paladar (5,5%), amígdalas (5%), labio superior (4%), mejilla (2%) y úvula (5%). Otro estudio más reciente (Jemal et al., 2004) pone de manifiesto la siguiente distribución: lengua (37%), labio (22%), suelo de la boca (13%), mucosa yugal (6%), encía (6%) y paladar (4%). A pesar de las discrepancias, ambos coinciden en que dentro de la cavidad oral las principales localizaciones son la lengua y el suelo de la boca. Esta diferencia respecto a otros países como La India, en los que la localización más frecuente es la región yugal, se atribuye a la existencia en estos últimos de otros hábitos tóxicos como la masticación de tabaco y de nuez de betel o el hábito de fumar invertido. Algunos estudios en poblaciones emigrantes han puesto de manifiesto la influencia de los hábitos de vida en el desarrollo del cáncer oral. Así, la población de la India que ha emigrado a Gran Bretaña presenta tasas de incidencia mayores que la población autóctona (Warnakulasuriya, 2009).

En los últimos años han aumentado notablemente tanto la incidencia como la mortalidad global atribuible al cáncer oral. Así en el estudio SEER (*Surveillance Epidemiology and End Results*) del 2004, se describen tasas de mortalidad de 4,1 por 100.000 personas/año en hombres y 1,5/100.000 personas/año en mujeres, siendo estas tasas aún mayores entre la población de raza negra (SEER, 2004).

2.1.2 Histología

El carcinoma de células escamosas surge de un epitelio malpighiano displásico, caracterizado por presentar microscópicamente islas o cordones de células invasivas que rompen la membrana basal y penetran en el tejido conectivo subyacente (Mashberg y Samit, 1995), con mayor o menor diferenciación hacia la morfología escamosa. Las células tumorales muestran abundante citoplasma eosinófilo, con núcleo grande, y una relación núcleo/citoplasma elevada. Se ven diversos grados de pleomorfismo celular y nuclear. El producto natural del epitelio escamoso, la queratina, se observa en ocasiones en forma de “perlas de queratina o globos córneos”, o en el interior de las células.

El grado de semejanza histológica de las células neoplásicas con las células epiteliales de las que derivan permite definir un grado de diferenciación, de modo que, a mayor grado, menor diferenciación y comportamiento biológico más agresivo (Strassburg

y Knolle, 1996). Al igual que otras neoplasias malignas, el carcinoma de células escamosas induce cambios en el estroma próximo, que pueden ser desmoplásicos (colagenización densa), angiogénicos (pequeños nuevos vasos sanguíneos) o inflamatorios (inmunológicos) (Marsh et al., 2011).

2.1.3 Etiopatogenia

La carcinógenesis oral surge como consecuencia de sucesivas mutaciones en los genes que regulan el comportamiento celular. Es de sobra conocida la implicación del tabaco en este proceso (Johnson, 2001) . Sin embargo, no es el único factor conocido y a él se suman otra serie de agentes externos que pueden participar sinérgicamente, tales como el alcohol, la dieta y los virus (Das y Napgal, 2002). Por otro lado, todo este proceso se desarrolla sobre los tejidos de un sujeto que posee su propia susceptibilidad genética frente al cáncer. Finalmente, a la interacción entre los factores genéticos y los carcinógenos locales debe añadirse el estado inmunológico del paciente (Das y Napgal, 2002).

2.1.4 Desarrollo y progresión del cáncer oral

En 1996, Joseph Califano presentó un modelo de progresión tumoral para el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, basado en el modelo de progresión del cáncer de colon. Este modelo establece la pérdida de heterocigosidad de determinados genes supresores y estima que en el desarrollo del fenotipo invasivo del carcinoma epidermoide de cabeza y cuello están implicadas entre 6-10 alteraciones genéticas de forma cronológica y acumulativa.

En general para que se desarrolle un cáncer, sus células deben adquirir ciertas capacidades, tales como la invasividad, la capacidad de degradar la matriz extracelular, la movilidad y la diseminación celular. Además debe desarrollar una actividad angiogénica capaz de nutrir la nueva masa tumoral.

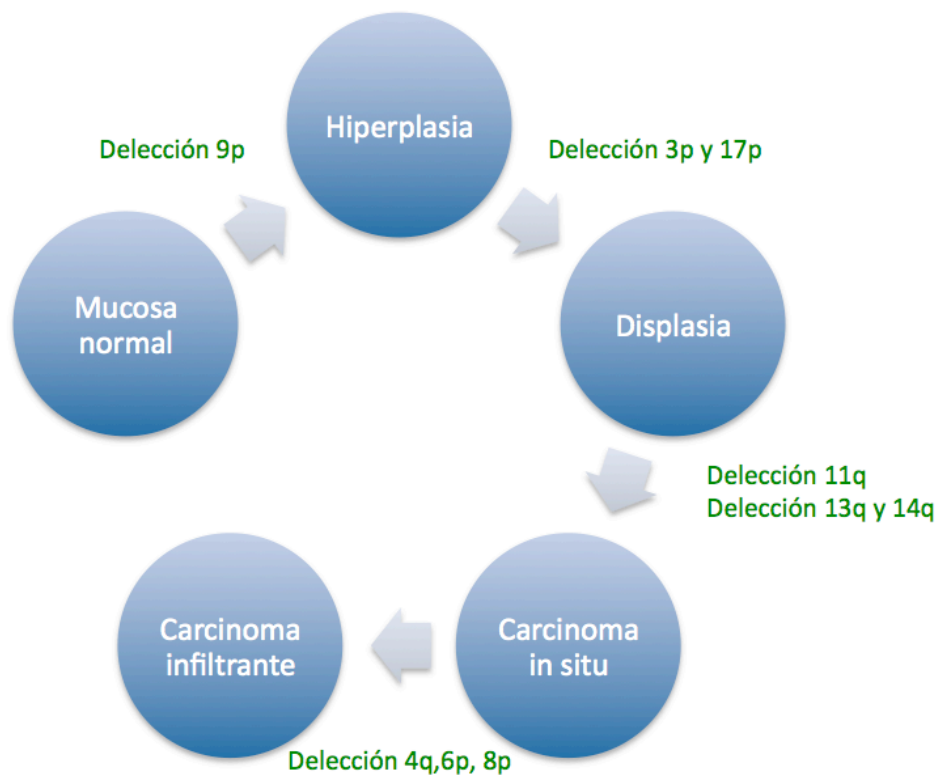


Figura 2.1 Modelo de progresión del cáncer de cabeza y cuello (modificado de Califano et al., 1996).

Crecimiento y extensión local

En estadios iniciales, el carcinoma de células escamosas se presenta a menudo en forma de placa blanca (leucoplasia), roja (eritroplasia) o roja y blanca (eritroleucoplasia). Con el paso del tiempo se desarrolla una tumoración o una ulceración en la superficie mucosa, que posteriormente puede adquirir distintos patrones de crecimiento: exofítico, endofítico o superficial. El dolor no es un dato diagnóstico fiable en las fases iniciales (Neville y Day, 2002).

Extensión ganglionar

El lugar de asiento más frecuente de las metástasis de los carcinomas de células escamosas orales son los ganglios linfáticos cervicales ipsilaterales. Sin embargo, tumores

situados en la base de la lengua, tumores próximos a la línea media o tumores de gran tamaño pueden metastatizar en ganglios linfáticos contralaterales o bilaterales. En la exploración física, los ganglios metastásicos están frecuentemente agrandados y endurecidos. Cuando están adheridos a los tejidos vecinos y, por tanto fijos, suele indicar la existencia de extensión extracapsular. La frecuencia de metástasis ganglionares oscila entre el 7,8 y el 43% de los casos (Horch, 1996). Esta cifra aumenta hasta el 66% en el subgrupo de los tumores linguales (Neville y Day, 2002).

Diseminación a distancia:

Se caracteriza por la formación de agregados de células neoplásicas que se desarrollan de forma autónoma en un tejido u órgano situado a distancia del tumor primitivo del que proceden. El riesgo metastático (de Vicente, 1998) se incrementa si existe una histología indiferenciada, afectación ganglionar (especialmente si es múltiple, extensa o bilateral), en tumores primitivos de gran tamaño y rápido crecimiento, cuando la edad es inferior a 40 años y en casos de recidiva tumoral.

La frecuencia de presentación oscila entre el 5,3% y el 49% según la fuente consultada y el tipo de estudio realizado (en el momento del diagnóstico del tumor primario o postmortem). Los órganos de predilección son los pulmones y la pleura, a continuación el esqueleto, y posteriormente el hígado (Horch, 1996).

2.1.5 Modelos de diseminación tumoral

El desarrollo de metástasis locoregionales o a distancia representa la culminación de un complejo proceso que requiere la interacción de las células tumorales con el entorno y con las células del estroma que lo rodea (Fidler, 1990). El proceso para adquirir potencial metastásico incluye los siguientes requisitos: (1) capacidad de invasión del tumor primario, (2) desarrollo de nuevos vasos sanguíneos y/o linfáticos, (3) separación de las células con capacidad de originar metástasis, (4) intravasación de las células tumorales en los vasos linfáticos o sanguíneos, (5) extravasación de las células tumorales en el lugar de metástasis y (6) implantación y crecimiento de células tumorales en este lugar distante

del tumor primario. La regulación de cada paso es compleja y puede implicar la alteración de múltiples genes en diversas vías celulares en cuyo estudio es de especial utilidad el análisis de *microarrays* (Kitadai, 1996; Herbst, 2000; Hynes, 2003).

Se han propuesto varios modelos para tratar de explicar el fenómeno de producción de metástasis. Por un lado, el modelo de **selección clonal** propone que una sola célula sufriría cambios moleculares que la diferenciarían del resto y que sería la responsable de la producción de metástasis. Por otro, el **modelo de dominación clonal** sugiere la aparición en el tumor primario de una minoría de células con potencial metastásico, que sustituirían a la mayoría de células restantes. El modelo de **selección clonal sobre un fondo predisponente** sugiere que la progresión tumoral ocurre a través de múltiples mutaciones sujetas a selección darwiniana, de manera que las células "más aptas" dominarían finalmente el tumor. Este proceso de selección se repetiría hasta diez veces durante el desarrollo de un tumor (Hanahan, 2000). Finalmente, el **modelo metastásico de células madre** de cáncer se asemeja al de selección clonal sobre un fondo predisponente. En él, la mayoría de las células cancerosas del tumor primario tendrían características genéticas derivadas de las células madre. Éstas se describen como células poco comunes en el cáncer, relativamente indiferenciadas y con capacidad de recrear todos los aspectos del tumor.

2.1.6 Importancia del estroma en la capacidad metastásica del tumor

La interacción entre las células del tumor y el estroma circundante ha sido reconocida recientemente como un factor importante en el comportamiento del tumor. Dentro de un cáncer, las células epiteliales y mesenquimales interactúan entre sí alterando o condicionando el comportamiento celular. Así se sabe que las células del estroma pueden influir dramáticamente en el comportamiento de las células epiteliales hasta el punto de producir el comportamiento maligno de células de otro modo premalignas (Cunha, 2003).

Los genes que codifican las proteínas responsables de la unión a la matriz extracelular, así como los que participan en la degradación de la matriz extracelular se encuentran sobreexpresados en los tumores metastásicos (Roepman, 2006). Aunque estos datos parecen incongruentes entre sí, no hacen sino validar la compleja naturaleza del

microambiente tumoral y corroborar la opinión de que las células tumorales pueden utilizar tanto los mecanismos de degradación y fijación, como los mecanismos basados en la motilidad y la invasión.

2.1.7 Angiogénesis en el cáncer oral

El crecimiento de nuevos vasos sanguíneos desempeña un papel importante en la progresión tumoral y en el desarrollo de metástasis. El desarrollo vascular y los factores que regulan la angiogénesis han sido estudiados ampliamente en diversos tumores, incluyendo aquellos con asiento en la cavidad oral.

Varios estudios han demostrado un aumento en el número de pequeños vasos sanguíneos en los cánceres de la cavidad oral a medida que ocurre la transición desde la mucosa normal a la displasia y a tumores invasivos (López de Cicco, 2004; Pazouki, 1997).

Tal vez la vía más importante en la angiogénesis tumoral es la familia de factores de crecimiento VEGF, de los cuales VEGF¹⁶⁵ es la isoforma predominante producida por las células tumorales (Ferrara, 2003).

El papel de VEGF en el desarrollo de metástasis no está claro en los cánceres de la cavidad oral. Sin embargo, la mayoría de los estudios sugieren que la expresión de VEGF se asocia con un mayor riesgo de metástasis ganglionares y que su inhibición mejora los índices de recidiva tumoral (Kyzas, 2005).

2.1.8 Estadiaje tumoral

La clasificación unificada de la UICC (Unión Internacional Contra el Cáncer) y de la AJCC (*American Joint Comité for Cancer Staging and End-Results Reporting*) (Sobin, 1997) es en la actualidad la más aceptada, a pesar de sus limitaciones e inexactitudes pronósticas. Ésta se basa en tres características clínicas, donde T representa el tamaño del tumor primario, N indica el grado de afectación de los ganglios linfáticos regionales y M la presencia o ausencia de metástasis a distancia (Tabla 1).

Tumor primario (T)	
TX:	No puede evaluarse el tumor primario.
T0:	No hay evidencia de tumor primario.
Tis:	Carcinoma in situ.
T1:	Tumor de 2 centímetros o menos en su diámetro mayor.
T2:	Tumor de más de 2 centímetros pero no más de 4 centímetros en su diámetro mayor.
T3:	Tumor de más de 4 centímetros en su diámetro mayor.
T4 (labio):	Tumor que invade a través de hueso cortical, nervio alveolar inferior, suelo de la boca o piel facial, p.ej., mentón o nariz.
T4a (cavidad oral):	Tumor que invade las estructuras adyacentes (p.ej., a través del hueso cortical, a los músculos profundos [extrínsecos] de la lengua [geniogloso, hiogloso, palatogloso y estilogloso], seno maxilar, piel facial).
T4b:	Tumor que invade el espacio masticatorio, apófisis pterigoideas o la base del cráneo y/o engloba la arteria carótida interna.
Ganglios linfáticos regionales (N)	
NX:	No pueden evaluarse los ganglios linfáticos regionales.
N0:	No hay metástasis a ganglios linfáticos regionales.
N1:	Metástasis en un solo ganglio linfático ipsilateral, de 3 centímetros o menos de dimensión mayor.
N2a:	Metástasis en un solo ganglio linfático, de más de 3 centímetros pero no más de 6 centímetros de dimensión mayor.
N2b:	Metástasis en múltiples ganglios linfáticos ipsilaterales, ninguno de más de 6 centímetros de dimensión mayor.
N2c:	Metástasis en ganglios linfáticos bilaterales y contralaterales, ninguno de más de 6 centímetros de dimensión mayor.
N3:	Metástasis en un ganglio linfático de más de 6 centímetros de dimensión mayor.
Metástasis distante (M)	
MX:	No puede evaluarse la metástasis distante.
M0:	No hay metástasis distante.
M1:	Metástasis distante.

Tabla 2.1. Parámetros clínicos de la clasificación TNM.

II. ESTADO ACTUAL

La clasificación TNM permite más de 30 permutaciones, lo que para la mayoría de los estudios dividiría el material en múltiples grupos, con muy pocos casos en cada uno como para permitir un análisis estadístico fiable. Por ello, y fundamentalmente con el fin de comunicar los casos, sería deseable agrupar aquellas combinaciones de T, N y M para las que la tasa de supervivencia es similar, disminuyendo el número total de categorías. El fin fundamental del estadiaje es, una vez conocido el pronóstico, elegir el tratamiento que mejor influya en el curso natural de la enfermedad (Tabla 2). Este sistema permite valorar parámetros como la invasión ganglionar que mantienen una correlación estadística con la supervivencia. Sin embargo globalmente resulta obsoleto. Al igual que en los cánceres de mama o próstata se utilizan parámetros moleculares para establecer el pronóstico de la enfermedad, consideramos que los marcadores moleculares pueden ayudar a predecir el pronóstico en los cánceres de la cavidad oral.

Estadio 0	Tis, N0, M0.
Estadio I	T1, N0, M0.
Estadio II	T2, N0, M0.
Estadio III	T3, N0, M0. T1, N1, M0. T2, N1, M0. T3, N1, M0.
Estadio IVA	T4a, N0, M0. T4a, N1, M0. T1, N2, M0. T2, N2, M0. T3, N2, M0. T4a, N2, M0
Estadio IVB	Cualquier T, N3, M0. T4b, cualquier N, M0.
Estadio IVC	Cualquier T, cualquier N, M1.

Tabla 2.2. Estadiaje clínico según la clasificación TNM.

2.1.9 Tratamiento

Las opciones de tratamiento para los carcinomas escamosos son variadas y dependen del tamaño y localización del tumor primario, grado de afectación ganglionar, presencia o no de metástasis a distancia, tolerancia al tratamiento y deseo del paciente. En

cualquier caso, el tratamiento exitoso requiere la actuación no sólo sobre el tumor primario sino también sobre sus cadenas linfáticas de drenaje (Das, 2002). La cirugía y/o la radioterapia siguen siendo la mejor opción para los cánceres de labio y cavidad oral. Los tumores de orofaringe en estadios iniciales pueden ser tratados con cirugía y/o radioterapia. En estadios avanzados, podría estar indicada la cirugía con radioterapia adyuvante, mientras que recientes resultados sugieren que la adición de la quimioterapia a la radioterapia podría mejorar la supervivencia (Neville y Day, 2002).

2.1.10 Pronóstico

2.1.10.1 Valor pronóstico de los diferentes parámetros clinicopatológicos

El pronóstico de los pacientes afectos de un cáncer oral tradicionalmente se ha relacionado con una serie de parámetros clinicopatológicos tales como la localización anatómica, el tamaño tumoral, la afectación ganglionar regional, la invasión extracapsular y el grado histológico de diferenciación (Tralongo, 1999; Woolgar, 1999).

- **Localización anatómica:** Es de sobra conocido que los carcinomas del bermellón labial tienen mucho mejor pronóstico que los carcinomas intraorales (Moore et al., 1999 y 2000). Dentro de este último grupo se acepta, en general, que los de mejor pronóstico son los de lengua anterior y mucosa yugal, y los de peor, los de paladar blando y orofaringe (Shaw et al., 2009).
- **Tamaño tumoral:** Varios estudios (Moore et al., 1986; Lo et al., 2002) avalan la asociación del mismo con la supervivencia, que sobre todo queda patente en los tumores muy pequeños (T1) y en los muy grandes (T4).
- **Afectación ganglionar:** Al igual que sucede con otros muchos tumores, la afectación metastásica de los ganglios linfáticos regionales es considerada como uno de los factores pronósticos de mayor importancia en el cáncer oral (Cerezo, 1992; Mamelle, 1994; Tralongo, 1999; Woolgar, 1999).
- **Diseminación extracapsular:** la presencia de invasión extracapsular en un ganglio metastatizado empeora considerablemente el pronóstico de la enfermedad (Snow,

1982). La diseminación extracapsular aparece hasta en el 75% de los pacientes con ganglios linfáticos metastáticos de más de 3 cm de diámetro.

- **Grado histológico:** Pese a las distintas clasificaciones que sobre el mismo se han hecho, en general los resultados coinciden al afirmar que éste es un factor pronóstico independiente y significativo, de tal forma que a menor grado de diferenciación, se observa peor evolución clínica (Kademani et al., 2005).

Otros factores histopatológicos cuyo valor está siendo estudiado en la actualidad son:

- **Profundidad tumoral:** Algunos estudios han puesto de manifiesto la importancia de este parámetro como factor pronóstico independiente para el desarrollo de metástasis ganglionares. En un meta-análisis reciente se ha establecido un límite de 4mm de profundidad como punto de corte en este sentido (Huang, 2009).
- **Contenido nuclear de ADN:** la citometría de flujo ha sido empleada para valorar el carácter euploide o aneuploide de las células tumorales. Sin embargo no existe consenso acerca de su valor como marcador de la agresividad tumoral (Baretton et al., 1995).
- **Angiogénesis tumoral, perfil de expresión de genes, apoptosis, marcadores serológicos y salivares:** todavía no está claro el papel que estos factores pueden desempeñar en establecer el pronóstico del cancer oral (Bello et al., 2010).

2.1.10.2 Valor pronóstico de los distintos marcadores moleculares

La carcinogénesis oral es un proceso multiescalonado en el que acontecen distintas alteraciones genéticas que dan como resultado la afectación de los oncogenes y de los genes supresores tumorales. Esto puede dar lugar a una producción elevada de factores de crecimiento o de sus receptores celulares, aumento de la transmisión de señal intracelular o aumento de la producción de factores de transcripción. En combinación con la pérdida de la actividad supresora tumoral, esto conduce a un fenotipo celular capaz de aumentar enormemente su capacidad proliferativa, con pérdida de cohesión celular y consiguiente capacidad de infiltrar el tejido localmente y diseminarse a distancia, características

definitorias de una neoplasia maligna (Epstein, 2002; Napgal, 2003; Williams, 2000; Martínez-González, 2002).

La identificación de moléculas individuales, que están implicadas en la transformación maligna, ha conducido al establecimiento de un importante número de marcadores moleculares que se ha demostrado que guardan relación con el estadio y el grado tumorales y que pueden ser indicativos del pronóstico y del curso clínico (Das, 2002; López-Martínez, 2002; Nagata, 2003; Ruibal, 2002; de Vicente, 2002 y 2003) de la enfermedad neoplásica. Los marcadores de proliferación celular llevan usándose durante más de una década como indicadores moleculares de malignidad histológica, sin que, en cambio, haya podido establecerse su relación clara con la evolución clínica de la enfermedad. Además de estos marcadores, durante los últimos años se ha adquirido un importante conocimiento sobre moléculas clave del ciclo celular y apoptosis, así como sobre otras nuevas áreas de la biología tumoral, tales como degradación de la matriz extracelular, adhesión e inmunología tumoral.

De la caracterización tumoral mediante marcadores moleculares se espera que explique las distintas variaciones del curso individual entre pacientes y permita estimar su pronóstico. Además, los marcadores moleculares implicados en la transformación maligna, podrían proporcionar un nuevo enfoque terapéutico no quirúrgico.

A continuación, se describen 32 marcadores moleculares distintos, recogidos en una revisión bibliográfica llevada a cabo recientemente por Bello, que son clasificados en ocho grupos según su función (Tabla 3).

1. Receptores de membrana de ligandos extracelulares	1. Receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR) 2. Receptor del factor de crecimiento epitelial humano tipo 2 (HER2/ c-neu or ErbB-2).
2. Proteínas del ciclo celular	3. Ciclina B1 4. Ciclina D1 5. p34 6. Ki-67
3. Supresores tumorales	7. p16 8. p14 9. p21 10. p27 11. Maspina 12. Proteína del retinoblastoma

	13. p53
4. Moléculas de adhesión	14. Proteínas de las uniones estrechas (claudinas y ocludina) 15. Integrinas 16. Fak 17. E-cadherina 18. CD44 19. β -catenina 20. Molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM)
5. Metaloproteinasas de la matriz extracelular	21. MMP-2 y 9
6. Marcadores de angiogénesis	22. Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) 23. Factor de crecimiento de los fibroblastos (bFGF) 24. CD-34
7. Marcadores relacionados con la apoptosis	25. Bcl-2 26. Bax 27. Bag-1
8. Marcadores de hipoxia	28. HIF-1 y -2 29. Anhidrasa carbónica 30. Transportador de glucosa 31. Receptores de eritropoyetina

Tabla 2.3. Marcadores moleculares del cáncer oral (modificado de Bello y cols., 2010).

A pesar del gran número de marcadores estudiados, cantidad que, por otro lado, va en aumento, no parece que se pueda extraer un resultado aplicable en la clínica claro e invariable de ninguno de ellos de forma aislada en cuanto al pronóstico. Tampoco en el momento actual hay ningún marcador tisular o serológico que permita determinar la existencia de metástasis en el momento del diagnóstico (Impola et al., 2004). La gran variedad de marcadores moleculares existentes explica la complejidad de la carcinogénesis, que debe de ser entendida como un proceso en múltiples fases que precisa de la desestabilización de los sistemas de control en un tejido determinado. Por esta misma razón, una conclusión general de los estudios llevados a cabo con estos marcadores es que más de uno de ellos debe de ser evaluado para poder establecer un pronóstico y, en consecuencia, una estrategia terapéutica (Lippman, 2001; Naggler, 2002; van den Breckel, 2002; van Diese, 1998).

2.2 Moléculas de adhesión

Las moléculas de adhesión celular se encuentran en la superficie de todas las células y ejercen su función en las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular. Se han identificado varias familias de moléculas de adhesión como las integrinas, cadherinas, selectinas, la superfamilia de las inmunoglobulinas y otras, como CD44. Además de proporcionar un vínculo mecánico entre la matriz extracelular y el citoesqueleto, las moléculas de adhesión celular están implicadas en la señalización entre el interior y el exterior de la célula. Así, estarían relacionadas con procesos como el crecimiento, proliferación, organización espacial y la migración, y por tanto, desempeñarían un papel en el crecimiento fisiológico normal y en el desarrollo. Así mismo están implicadas en procesos patológicos tales como la curación de heridas, la inflamación y el cáncer, en particular en el proceso de invasión tumoral y metástasis.

Describiremos a continuación tres moléculas implicadas en la adhesión y que han sido incluidas en este estudio: E-cadherina, β -catenina y la quinasa de adhesión focal (Fak).

2.3 E-cadherina

Las cadherinas abarcan una gran familia de glucoproteínas transmembrana o asociadas a las proteínas de membrana, que median en la adhesión célula-célula de forma calcio-dependiente, constituyendo unas moléculas clave en la morfogénesis de una gran variedad de órganos.

2.3.1 Estructura y función

E-cadherina, considerada el prototipo dentro de la superfamilia de cadherinas, está codificada por el gen CDH1, en el cromosoma 16q. Como veremos posteriormente, forma parte de las llamadas uniones adherentes, que establecen el contacto célula-célula. En relación a esto, E-cadherina está formada por tres dominios: extracelular, transmembrana e intracelular.

El **dominio extracelular** está compuesto por 5 subdominios. A nivel del extremo amino-terminal de los dímeros de E-cadherina de células vecinas y en presencia de calcio, se establecen uniones homotípicas (Trojanosky, 2007).

El **dominio intracelular** está dividido en un subdominio yuxtamembrana (JMD) y en un dominio de unión a β -catenina (CBD) (Rimm y Morrow, 1994).

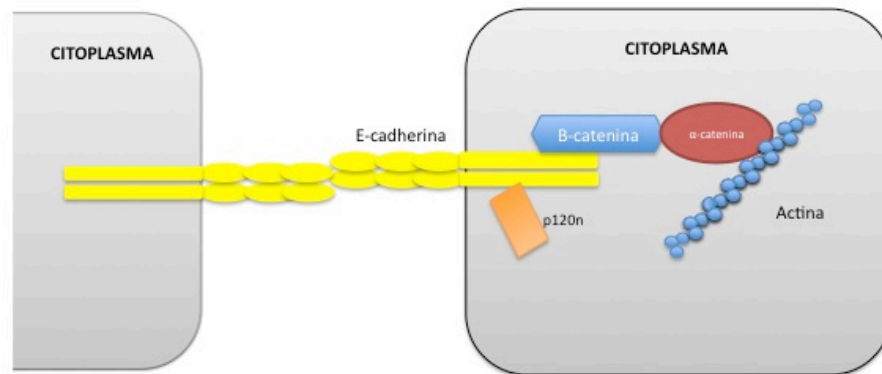


Figura 2.2. Estructura de las uniones adherentes (modificado de Huber 2001).

E-cadherina se asocia con β -catenina, con la que forma un complejo (Hinck et al., 1994). Cuando este complejo está próximo a la superficie basal de la membrana plasmática, se unen alfa catenina y p120ctn (Hink et al., 1994; Ozawa et al., 1992).

2.3.2 Funciones de E-cadherina

E-cadherina está implicada en la señalización celular de una manera indirecta, al secuestrar las proteínas p120ctn, β -catenina y plakoglobina en la superficie de la célula; ya que la presencia de estas cateninas en el citoplasma o en el núcleo daría lugar a reordenamientos a nivel del citoesqueleto y a actividad transcripcional. Sin embargo, el contacto célula-célula por sí sólo no es capaz de producir este efecto (Gottardi et al., 2001; Sasaki, 2000). La inhibición de la señalización nuclear de β -catenina por E-cadherina puede basarse en un mecanismo más complejo que la simple restricción física (Torres et al., 2007).

Además de su capacidad para inhibir la señalización por secuestro de cateninas, E-cadherina también inhibe la activación del ligando del receptor de las tirosina quinasas (TKRs), a saber: receptor EGF (EGFR), Neu/ErbB2, receptor del factor de crecimiento tipo insulina (IGF-1R) y del receptor de HGF c-Met (Qian et al., 2004).

EGFR forma un complejo con E-cadherina a expensas del dominio extracelular de E-cadherina (Qian et al., 2004; Fedor-Chaiken et al., 2003), pero independiente de p120ctn y β -catenina (Qian et al., 2004). La interrelación entre EGFR y E-cadherina está implicada en numerosos procesos tumorales.

2.3.3 E-cadherina y carcinogénesis

Diferentes estudios han demostrado que los tumores epiteliales pueden sufrir una pérdida total o parcial de la expresión de E-cadherina, a medida que progresan en su malignidad (Strumane et al., 2004). Los diferentes mecanismos de inactivación de E-cadherina en los tumores malignos son:

- **Pérdida de heterocigosidad y mutaciones inactivadoras en el cáncer**

Las mutaciones con inactivación de E-cadherina fueron descritas por primera vez por Becker en el cáncer gástrico difuso (Becker, 1993). Los estudios sobre la pérdida de heterocigosidad de la región del cromosoma 16q21-22 nos han dado pistas sobre el papel de E-cadherina en el desarrollo del cáncer humano. Este fenómeno ha sido comprobado en diversos cánceres como el de estómago y el carcinoma lobulillar de mama (Strumane et al., 2004).

- **Silenciamiento epigenético de E-cadherina en el lugar del cáncer**

La hipermetilación del promotor se ha identificado como un evento epigenético importante asociado con la pérdida de la expresión génica de E-cadherina durante la progresión del cáncer.

Esto se ha comprobado en al menos ocho tipos diferentes de carcinomas humanos (Berx et al., 1994; Chang et al., 2002; Kanazawa 2002). En líneas celulares de cáncer, el gen de E-cadherina muestra un patrón heterogéneo de metilación del promotor que es dinámico e inestable (Graff et al., 2000). La metilación de la isla de CpG de los genes CDH1 parece aumentar durante la malignización progresiva de los cánceres de mama y carcinomas hepatocelulares (Nass et al., 2000; Kanai et al., 2000).

- **Represión transcripcional por factores de transcripción**

Los factores de transcripción Snail1, Snail2, ZEB1, ZEB2, E47 y TWIST1 reprimen la E-cadherina e inducen la Transición Epitelio-Mesénquima (Peinado, 2004). El proceso de Transición Epitelio-Mesénquima conlleva la pérdida de las características epiteliales y la adquisición de un fenotipo mesenquimal con alta capacidad migratoria e invasiva y propiedades de *stem cell*. Se ha encontrado elevada expresión de estos factores en distintos tipos de carcinomas humanos, que se ha correlacionado con pérdida de expresión de E-cadherina, menor grado de diferenciación y presencia de invasión y metástasis (Peinado, 2007).

Algunos supresores de E-cadherina, como SNAIL y SIP1, son capaces de inducir la expresión de N-cadherina, que a menudo se asocia con la pérdida de expresión E-cadherina. Este fenómeno es conocido como “*switching*” (Hazan, 2004; Wheelock et al., 2008) y se supone que forma parte de una reprogramación transcripcional de las células epiteliales desdiferenciadas (Cano et al., 2000; Vandewalle et al., 2005).

- **Endocitosis y procesamiento proteolítico de E-cadherina**

E-cadherina se elimina de la membrana plasmática mediante endocitosis y posteriormente puede ser reciclada a nuevos lugares de contacto célula-célula.

La activación anormal de proto-oncogenes, tales como c-Met, Src y EGFR da lugar a un aumento de la fosforilación de residuos de tirosina de E-cadherina, que conduce al reclutamiento de la proteína E3-ubiquitina ligasa Hakai y en consecuencia a la internalización y degradación de E-cadherina (Fujita et al., 2002; Shen et al., 2008). La MDM2, uno de los principales antagonistas de p53, es capaz de inducir la degradación de

E-cadherina (Yang et al., 2006). Así mismo esta fosforilación puede tener lugar a nivel del dominio de unión a la β -catenina, llevando a una alteración en la vinculación de estas dos moléculas, bien por aumento (Huber y Weiss, 2001; Jaggi et al., 2005), bien por disminución de la unión entre ellas (Dupre-Crochet, 2007).

2.3.4 E-cadherina y cáncer.

La expresión de E-cadherina se ha examinado en varios tipos de tumores como el de mama, colon, vejiga, páncreas, próstata, hígado y carcinomas de células escamosas (Behrens, 1999). Esta expresión resulta muy variada tanto entre distintos tumores como dentro del propio tumor. E-cadherina ha demostrado ser una molécula importante en la progresión del cáncer y puede servir como un indicador del potencial metastásico de un tumor primario. Diversos estudios han sugerido que este hecho también sucede en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello.

En carcinomas epidermoides de esófago la expresión de E-cadherina se correlaciona negativamente con el grado histológico, tamaño tumoral, la estadificación clínica, metástasis en los ganglios linfáticos y la invasión tumoral y se asocia con mal pronóstico (Zhao et al., 2003).

En carcinomas epidermoides de cabeza y cuello, la pérdida de expresión de E-cadherina en el tumor primario se correlaciona con el desarrollo de metástasis ganglionares, progresión tumoral y mal pronóstico (Bankfalvi et al., 2002). En modelos *in vitro*, la supresión de E-cadherina da lugar a líneas celulares con un fenotipo más invasivo, mientras que el mantenimiento de la expresión de E-cadherina puede prevenir la invasión, tanto *in vitro* como *in vivo* (Margulis et al., 2005).

El EGFR y sus ligandos han demostrado ser claves en la regulación de E-cadherina, participando tanto en su modulación como en los fenómenos de transición epitelio-mesenquimal (Hazan y Norton, 1998). Sin embargo, los mecanismos de regulación de estos procesos no están completamente comprendidos.

2.3.5 E-cadherina y cáncer oral

Como hemos dicho, la pérdida de expresión de E-cadherina se observa con frecuencia en carcinomas y se correlaciona con la presencia de metástasis ganglionares en el momento del diagnóstico. En los carcinomas orales de células escamosas, la reducción de expresión de E-cadherina y P-cadherina se ha correlacionado con la disminución de la diferenciación y con la capacidad de invasión (Mattijssen, 1993; Pignatelli, 1994). Además, se ha descrito que la disadherina (una glicoproteína de membrana de reciente descubrimiento asociada al cáncer) es capaz de reducir la expresión de E-cadherina y promover el desarrollo de metástasis (Hirohashi, 2003). La pérdida de adherencia resultante de la reducción de expresión de cadherinas puede ser un factor importante en la invasión tumoral y en la aparición de metástasis (Andrews, 1997).

Por otro lado, algunos tumores conservan la expresión de E-cadherina, pero ésta funciona de manera defectuosa, debido a alteraciones en la formación de complejos o a la presencia de mutaciones en la propia molécula (Lo Muzio, 1999; Sakaki, 1999). Así, en tumores infiltrantes se han hallado mutaciones tanto en el gen de E-cadherina como los de alfa y β -catenina. En los frentes de invasión tumoral, el sistema de adhesión celular se inactiva por fosforilación de β -catenina mediada por una tirosina (Hirohashi, 2003).

Finalmente, algunos trabajos recientes han demostrado que el bloqueo de los receptores de EGFR *in vitro* puede promover uniones desmosómicas con participación de cadherinas, resultando en una mayor adhesión célula-célula y reduciendo la motilidad de las células tumorales (Lorch, 2004).

2.4 β -catenina

El gen de β -catenina , localizado en el cromosoma 3p22, codifica una proteína de 92 kDa (Aberle et al., 1996) que juega un papel central en numerosos procesos celulares y en el desarrollo embrionario.

2.4.1 Estructura

β -catenina es un polipéptido formado por 781 aminoácidos que se agrupan formando tres dominios: un **dominio central o armadillo** (Huber et al., 1997) que es el responsable de la unión con otras proteínas como E-cadherina, Tcf/Lef, Apc y axina, con las que forma complejos mutuamente excluyentes; un **dominio N-terminal** que contiene la zona de unión a α -catenina (Aberle et al., 1994); y un **dominio C-terminal**.

2.4.2 Funciones

β -catenina está relacionada con dos funciones importantes: la adhesión celular y la transcripción nuclear, formando parte de la vía de señalización Wnt.

- **Adhesión:**

A nivel de las uniones adherentes, el dominio citoplasmático de E-cadherina interacciona con la región central (Hülsken et al., 1994) mientras que el dominio N-terminal de β -catenina interacciona con α -catenina, formándose un puente entre estas dos moléculas.

- **Activación transcripcional: la vía Wnt.**

En función de los niveles citoplasmático de β -catenina libre, ésta puede translocarse al núcleo e inducir la expresión de un amplio número de genes. Revisaremos a continuación los aspectos fundamentales de este complejo proceso.

En ausencia de señalización Wnt (Figura 2.3.), β -catenina interacciona con diversas proteínas quinasas junto con las proteínas estructurales Axina y Apc (Hart et al., 1999). En conjunto, estas proteínas forman el complejo de degradación, el cual permite que la β -catenina pueda ser degradada por el proteasoma (Aberle et al., 1997; Latres et al., 1999; Liu et al., 1999). Existe un mecanismo de degradación de β -catenina diferente y que depende de la actividad del producto del gen SIAH-1, que es activado por p53 (Matsuzawa et al., 2001). La activación a través de señales Wnt da lugar a una inhibición de la degradación de β -catenina .

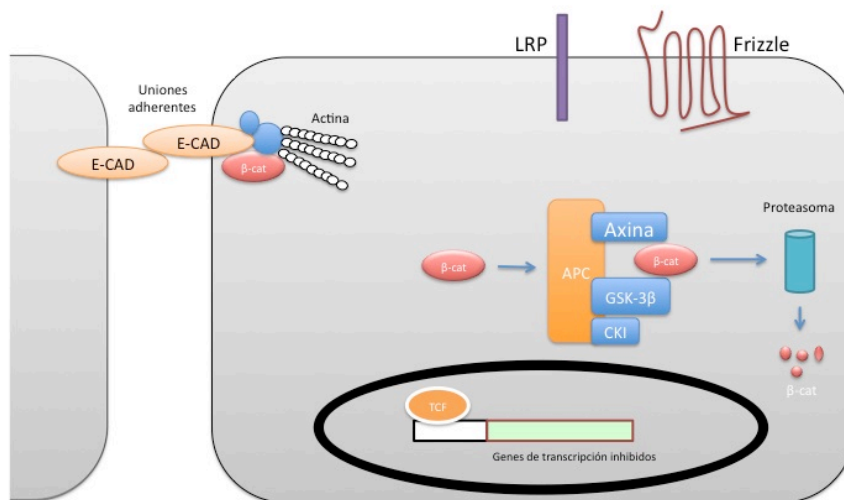


Figura 2.3. Mecanismos implicados en la vía Wnt en ausencia de estímulo (modificado de Moon et al 2004).

La acumulación citoplasmática de β -catenina conlleva su traslado al núcleo (Figura 2.4.). Una vez en el núcleo, ésta se une a Tcf/LEF, alterándose la maquinaria transcripcional (Munemitsu et al., 1996) y activando diversos genes diana. Existe un

innumerable número de genes activados por el complejo β -catenina -LEF. Los niveles en el núcleo de β -catenina están normalmente modulados por la interacción con las proteínas Apc y Axina-2 del núcleo, los cuales actúan a modo de lanzadera de la β -catenina de vuelta al citoplasma. Las mutaciones que producen estabilización de β -catenina, APC y Axina se encuentran en muchos tipos de cáncer (Polakis et al., 2007).

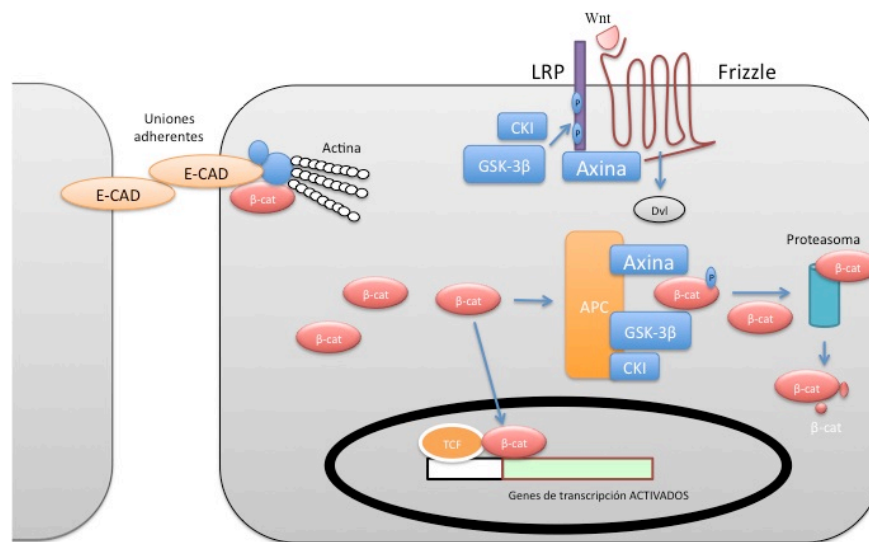


Figura 2.4. Mecanismos implicados en la vía Wnt al ser estimulada (modificado de Moon et al 2004).

2.4.3 β -catenina y cáncer

El papel oncogénico de β -catenina fue sugerido por primera vez en el cáncer de colon, a partir del descubrimiento de mutaciones activadoras de β -catenina, en concreto mutaciones de la proteína Apc (Morin et al., 1997; Rubinfeld et al., 1997; Sparks et al., 1998; Lu et al., 2004).

Así mismo otros estudios han detectado estas mutaciones en tumores de próstata. En ellos se observó que las mutaciones de β -catenina podían producirse durante la progresión tumoral (Voeller et al., 1998). A partir de estos estudios se han encontrado mutaciones oncogénicas de β -catenina en otros tumores humanos.

Además, recientemente diversos modelos animales han demostrado el papel crítico de β -catenina en la carcinogénesis (Gat et al., 1998; Harada et al., 1999).

2.4.4 β -catenina y cáncer oral

Como se ha comentado anteriormente, β -catenina juega un papel fundamental tanto en la adhesión celular mediada por E-cadherina como en la señalización de la vía Wnt (en el citoplasma y núcleo). En consonancia con esto, no es de extrañar que los diferentes estudios encuentren distintos patrones de expresión de β -catenina en las muestras tumorales:

- **Pérdida de expresión a nivel de la membrana plasmática:**

Diferentes estudios refieren una pérdida de expresión de β -catenina a nivel de la membrana plasmática en los carcinomas orales de células escamosas (Odajima et al., 2005; Yu et al., 2005; Wang et al., 2007). Además parece ser que este hecho es más frecuente en los frentes de invasión tumoral y en aquellos tumores poco diferenciados (Williams et al., 1998; Lo Muzio et al., 1999; Kudo et al., 2004; Mahomed et al., 2007), lo cual podría constituir una característica de un comportamiento biológico agresivo de las células tumorales. Clínicamente esta pérdida de expresión se ha relacionado con alto riesgo de metástasis en los ganglios linfáticos y peor supervivencia libre de enfermedad (Bankfalvi et al., 2002; Potras et al., 2005; Yu et al., 2005; Ueda et al., 2006), así como disminución en las tasas de supervivencia y menor respuesta al tratamiento (Rodríguez-Pinilla et al., 2005).

- **Expresión citoplasmática y nuclear de β -catenina:**

Algunos autores han puesto de manifiesto que la pérdida de expresión de β -catenina a nivel de la membrana está relacionada con un aumento en su expresión citoplasmática y nuclear (Odajima et al., 2005). Igualmente se ha encontrado que este fenómeno es más frecuente en tumores poco diferenciados y en los frentes de invasión, existiendo una correlación con la supervivencia (Mahomed et al., 2007). Esta expresión

aberrante a nivel citoplasmático se ha relacionado también con la pérdida de heterocigosidad e hipermetilación del promotor de APC, lo que sugiere que estos hechos podrían conducir a la acumulación de β -catenina libre en el citoplasma celular y por tanto a su malignización (Gao et al., 2005). Diferentes estudios in vitro han corroborado a través del cultivo de líneas celulares con diferentes grados de diferenciación la correlación entre la localización nuclear de β -catenina y la invasión tumoral, potencial metastásico y malignidad del tumor, lo que implica que la señalización Wnt/ β -catenina juega un papel en la progresión de los tumores escamosos de cabeza y cuello (Gasparoni et al., 2002).

Otros investigadores han encontrado que β -catenina se encuentra en el citoplasma y el núcleo en las primeras etapas de desarrollo del tumor (Sato et al., 2002; Ishida et al., 2007). Sus resultados sugieren que la translocación al núcleo de β -catenina está implicada en la progresión desde el epitelio normal a la displasia.

2.5 Quinasa de adhesión focal (Fak)

Fak es una proteína tirosina quinasa de localización citoplasmática identificada como un mediador clave en la señalización mediada por integrinas. Las integrinas forman parte de los **contactos focales**, que constituyen las principales uniones entre el citoesqueleto de actina y la matriz extracelular. Fundamentalmente son receptores de membrana, de manera que algunos reconocen fibronectina y laminina, que son componentes mayoritarios de la matriz extracelular (Figura 2.5.). En el interior celular se ligan principalmente a moléculas de actina. Las integrinas se encuentran en el centro de multitud de procesos biológicos, tales como la adhesión celular a la matriz extracelular, la migración o la transducción de señales al interior celular.

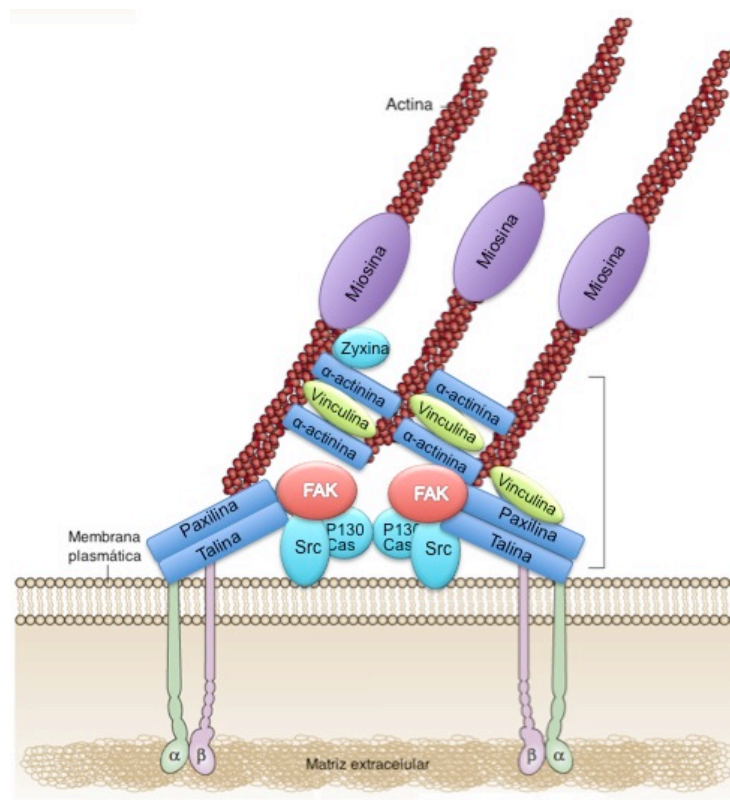


Figura 2.5. Estructura molecular de los contactos focales (modificado de Mitra et al., 2005).

2.5.1 Estructura

La proteína Fak (proteína tirosina-quinasa-2 o PTK-2) está codificada por el gen PtK2, localizado en la región cromosómica 8q24.3 (Fiedorek y Kay, 1995). Presenta un **dominio N-terminal**, un **dominio central quinasa** y un **dominio C-terminal** que incluye la secuencia responsable de la unión a los contactos focales (Figura 2.6.).



Figura 2.6. Estructura y dominios de Fak (modificado de Zhao 2009).

2.5.2 Funciones de Fak

La adhesión celular mediada por integrinas es el activador más importante de Fak. El **dominio amino-terminal** de Fak desempeña un papel crítico en la regulación de su activación (Cooper et al., 2003; Dunty et al., 2004; Cohen y Guan, 2005; Lietha et al., 2007). Cuando Fak se encuentra en estado inactivo, se produce un contacto entre los dominios amino-terminal y quinasa que bloquea cualquier acceso. En cambio, en el estado activo, el dominio amino-terminal es desplazado por una proteína de activación (como el dominio β citoplasmático de las integrinas). Además, el dominio amino-terminal de Fak también interactúa con los receptores activados del PDGF, EGF y HGF, los cuales están involucrados en la regulación de la actividad de Fak (Sieg et al., 2000).

Los contactos focales juegan un papel importante en la señalización intracelular, así como en los procesos de adhesión celular y migración. Los primeros estudios al respecto realizados con ratones *knock-out* revelaron que la ausencia de Fak producía defectos en la morfogénesis (Ilic et al., 1995). Así, los fibroblastos mostraban un exceso de contactos focales, lo cual hizo pensar en el papel de Fak en el desmontaje de los mismos. Así mismo,

la pérdida de expresión de Fak interrumpe la polarización de los microtúbulos dentro de las células, lo cual ha sido relacionado con la regulación de las GTPasas de la familia Rho. Estas GTPasas Rho actuarían como “interruptores” moleculares, controlando la formación y el desmontaje de las estructuras del citoesqueleto (fibras de estrés, lamelipodios y filopodios) implicadas en la motilidad celular.

2.5.3 Fak y cáncer

Se ha visto que Fak juega un papel importante tanto en el inicio como en la progresión y desarrollo de metástasis de diversos tumores (Zhao y Guan, 2009). Su papel en la génesis del tumor se ha relacionado con diversos factores. Por un lado Fak está implicada en la supervivencia celular al interactuar con la proteína p53 e inhibiendo la anoikis (Lim et al., 2008). Por otro, la expresión de Fak se relaciona con la proliferación celular al activar a la ciclina D1 (Zhao et al., 1995). Algunos estudios han demostrado que la señalización dependiente de Fak puede promover cambios en la forma celular y la formación de invadopodios, lo que conduciría a un fenotipo de células invasoras (Haskell et al., 2003; Hauck et al., 2002; Hsia et al., 2003).

Existe una amplia evidencia de que las vías de señalización Fak pueden estimular la progresión del tumor y la formación de metástasis a través de la regulación de la migración celular, invasión, transición epitelio-mesenquimal y la angiogénesis (Zhao y Guan, 2009). Diversos autores han estudiado la expresión de Fak en distintos tipos de cáncer en humanos, como los cánceres de mama (García et al., 2007), colorrectal (Lark et al., 2003), hepatocelular (Itoh et al., 2004), endometrio (Zhao y Guan, 2009), esófago (Miyazaki et al., 2003), estómago (Su et al., 2002), laringe (Aronsohn et al., 2003), pulmón (Hsu et al., 2007), cavidad oral (Kornberg, 1998), ovario (Judson et al., 1999), próstata (Rovin et al., 2002) y tiroides (Kim et al., 2004). Estos estudios han correlacionado el aumento de la expresión de Fak con la actividad metastásica y con un pronóstico pobre, por lo que se ha sugerido que podría utilizarse como un marcador pronóstico. Sin embargo, existen diferencias entre los distintos tumores por lo que en conjunto, se piensa que Fak podría jugar un papel en diferentes etapas de la progresión del tumor en función de cada tipo. De igual modo, los mecanismos moleculares responsables del incremento en la expresión de Fak en el cáncer siguen siendo en gran medida desconocidos. Se ha observado la

amplificación del gen Fak o el aumento del número de copias en varios tipos de cáncer. Sin embargo, estos hechos no siempre se correlacionan con el aumento de expresión de Fak (Agochiya et al., 1999; Canel et al., 2006), lo que de nuevo sugiere la implicación de diversos mecanismos en función de cada tipo de tumor.

2.5.4 Fak y cáncer oral

Como hemos mencionado diversos autores han demostrado que la expresión de Fak podría ser útil como marcador molecular de metástasis ganglionar en el cáncer epidermoide de cabeza y cuello (Schneider et al., 2002; Canel et al., 2006; Rodrigo et al., 2007).

Si bien algunos estudios han relacionado la sobreexpresión de Fak con una mayor invasividad y metástasis cervicales en los carcinomas de la cavidad oral (Kornberg, 1998; Schneider et al., 2002; Jiang et al., 2010), su papel en estos tumores es todavía poco conocido.

II. ESTADO ACTUAL

III. HIPÓTESIS DE TRABAJO

El cáncer oral es una enfermedad que evoluciona en tres fases a partir de su localización inicial: (i) crecimiento y extensión locales, (ii) propagación a los ganglios linfáticos regionales y (iii) extensión a distancia. Esta enfermedad, de curso frecuentemente fatal, ocasiona la muerte de los pacientes a resultas de las recidivas loco-regionales y/o de las metástasis ganglionares cervicales.

La capacidad invasiva y metastásica de un tumor depende entre otros factores de la pérdida de la capacidad de adhesión de las células entre sí y a la matriz extracelular, así como de la movilidad excesiva de éstas, que permite la penetración en el estroma adyacente y el desplazamiento a distancia. Las dos primeras moléculas estudiadas (E-cadherina y β -catenina) están directamente relacionadas con la adhesión, formando parte de las llamadas uniones adherentes. Pero además, actúan como señalizadores intracelulares, de manera que su alteración puede activar a determinados genes implicados en la carcinogénesis. Por otra parte, Fak controla la vía de las integrinas, que están implicadas en la adhesión célula-matriz extracelular y en la movilidad celular, al controlar el citoesqueleto de actina.

Por tanto, en el presente trabajo se pretende dar respuesta a las siguientes preguntas:

- I. *E-cadherina, β -catenina y Fak, ¿muestran un papel destacado en la invasividad del cáncer oral, y exhiben una significativa relevancia pronóstica?*
- II. *¿Podemos construir un modelo predictivo para la supervivencia y la posible presentación de recidivas en los pacientes a partir de una serie de variables de entrada conocidas?*
- III. *¿Cómo podemos minimizar el error producido por el elevado número de variables y el número reducido de pacientes?*

IV. OBJETIVOS

Las preguntas recién formuladas pueden concretarse en los siguientes objetivos:

- *Objetivo 1: Estudiar la expresión de E-cadherina en cánceres orales y su relación con las variables clínico-patológicas de significación pronóstica.*
- *Objetivo 2: Estudiar la expresión de β -catenina en cánceres orales y su relación con las variables clínico-patológicas de significación pronóstica.*
- *Objetivo 3: Estudiar la expresión de Fak en cánceres orales y su relación con las variables clínico-patológicas de significación pronóstica.*
- *Objetivo 4: Buscar patrones de comportamiento relevantes para la probabilidad de supervivencia en aquellos pacientes que padecen un cáncer oral.*
- *Objetivo 5: Buscar patrones de comportamiento relevantes para la probabilidad de recidiva en aquellos pacientes que padecen un cáncer oral.*
- *Objetivo 6: Introducir un modelo inteligente capaz de predecir el comportamiento de la variable supervivencia en función del resto de variables de la muestra identificadas como relevantes.*
- *Objetivo 7: Introducir un modelo inteligente capaz de predecir el comportamiento de la variable recidiva en función del resto de variables de la muestra identificadas como relevantes.*

V. MATERIAL Y MÉTODO

5.1 Pacientes

Para la realización del presente estudio han sido utilizados 69 pacientes aquejados de un carcinoma oral de células escamosas, seleccionados mediante un muestreo consecutivo entre los que acudieron al Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial del Hospital Universitario Central de Asturias (Oviedo, España) y fueron sometidos a cirugía con intención curativa, entre enero de 1990 y diciembre de 1992.

5.1.1 Selección de la muestra

Los criterios de inclusión que permitieron seleccionar los pacientes fueron los siguientes:

1. Confirmación histológica de la lesión y de su grado de diferenciación, así como de su comportamiento infiltrante.
2. Descripción del procedimiento quirúrgico realizado.
3. Registro completo de datos clinicopatológicos.
4. Disponibilidad de suficiente material tumoral incluido en parafina.

5.1.2 Parámetros clinicopatológicos evaluados

La información clinicopatológica, obtenida de las historias clínicas de los pacientes, incluyó, en cada caso, la siguiente:

1. Edad.
2. Sexo.
3. Antecedentes de consumo de tabaco y/o alcohol y magnitud del consumo.
4. Localización del tumor primario.
5. Tamaño tumoral.
6. Estado de los ganglios linfáticos regionales.
7. Grado de diferenciación histológico.
8. Tipo de tratamiento quirúrgico realizado.
9. Empleo de radioterapia postoperatoria.

10. Estado de los bordes de resección quirúrgica.

11. Presencia o ausencia de recidiva tumoral.

Componían la muestra 16 mujeres (23%) y 53 hombres (77%), cuyas edades oscilaban entre 24 y 87 años (mediana 61 años). Las principales características clínicas de los 69 pacientes están recogidas en la Tabla 5.1. Todos los casos fueron clasificados en estadios de acuerdo con la Clasificación TNM de la UICC (Unión Internacional Contra el Cáncer), de 1997.

<i>Variable</i>	<i>Número (69)</i>	<i>%</i>
Edad (años)	61	(24 – 87)
Mediana (intervalo)		
Sexo		
Hombres	53	77
Mujeres	16	23
Localización tumoral		
Labio	4	5,8
Lengua	29	42
Suelo de la boca	18	26,1
Encía	8	11,6
Mucosa yugal	6	8,7
Paladar	4	5,8
T		
T1	19	27,5
T2	28	40,6
T3	6	8,7
T4	16	23,2
N		
N0	44	63,8
N1	13	18,8
N2	12	17,4
N3	0	0
Estadio TNM		
I	14	20,3
II	19	27,5
III	12	17,4
IV	24	34,8
Grado de diferenciación histológica		
Pobre	0	0
Moderada	14	20,3
Buena	55	79,7

Tabla 5.1. Características de los pacientes.

5.1.3 Tratamiento

Todos los pacientes fueron sometidos a una extirpación del tumor primario con límites macroscópicos de seguridad y linfadenectomía cervical ipsi o bilateral, cuya extensión (número de niveles ganglionares involucrados) dependió de los hallazgos clínicos y de imagen preoperatorios. En aquellos pacientes en los que se consideró necesario (31 en total, 44,9%) se realizó, asimismo, un tratamiento complementario postoperatorio con radiaciones ionizantes, recibiendo una dosis de 40-70 Gy, de acuerdo a las siguientes indicaciones:

1. Tamaño tumoral T4.
2. Carcinomas pobremente diferenciados.
3. Bordes de resección positivos o presencia tumoral a 1 mm o menos de distancia de los mismos.
4. Presencia de metástasis ganglionares cervicales.

Los márgenes quirúrgicos de resección estaban libres de infiltración tumoral en 66 de los 69 casos (95,7%). Tras el estudio anatomopatológico se encontró que 25 casos presentaban metástasis ganglionares (36,2%).

5.1.4 Seguimiento

El periodo de seguimiento de los pacientes osciló entre 1 y 128 meses (media 55,5 meses). En cada caso se registró el periodo de tiempo libre de recidiva y la supervivencia en meses. El resultado clínico fue medido mediante dos eventos: muerte causada por recidiva de la enfermedad, o presencia de enfermedad no tratable al final del periodo de seguimiento. Al final de este periodo, 28 pacientes (40,6%) habían muerto como resultado de una recidiva de la neoplasia oral, mientras que los 41 restantes (59,4%) permanecieron vivos y libres de recidiva tumoral.

5.2 Estudio microscópico

El estudio histopatológico fue realizado en el Servicio de Anatomía Patológica I del Hospital Universitario Central de Asturias. Los especímenes tumorales obtenidos en la cirugía fueron fijados en formaldehído tamponado al 10% y procesados de forma rutinaria mediante inclusión en parafina. Posteriormente se obtuvieron secciones de 4 μm de grosor de cada bloque tisular, para el estudio histológico convencional e inmunohistoquímico.

5.2.1 Elaboración de *microarrays* tisulares

Los *tissue microarrays* (TMA) fueron elaborados según el método descrito por Kononen, en 1998. Se construyeron TMA de especímenes de cáncer oral a partir de los bloques de parafina almacenados de los 69 pacientes del estudio. Las muestras de hematoxilina-eosina archivadas originalmente fueron examinadas por un patólogo y de cada una de ellas se obtuvieron al menos tres muestras seleccionadas. Además, se incluyeron también muestras de mucosa oral morfológicamente normal, las cuales fueron obtenidas de pacientes no oncológicos sometidos a cirugía oral. Con el fin de comprobar el diagnóstico histopatológico y la adecuación de la toma de muestras de tejidos, una sección de cada uno de los *arrays* fue teñida con hematoxilina-eosina y examinada por microscopía óptica.

El método de elaboración consistió en la reunión de finas *core*-biopsias de tejidos parafinados pre-existentes y nuevamente reparafinados en un nuevo bloque *array* master. Finalmente las muestras se colocaron en una estufa durante 5 minutos.

5.2.2 Técnica inmunohistoquímica

Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes: *Monoclonal Mouse Anti-Human E-cadherin*, *FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Beta-Catenin* y anti-Fak, cuyas especificaciones técnicas están resumidas en la Tabla 5.2. Los cortes histológicos de 4 μm obtenidos de los bloques de TMA, se montaron en portaobjetos de cristal (Dako Cytomation), y fueron puestos a secar en una estufa a 54-56° durante 24 horas. Posteriormente fueron desparafinados e hidratados con el sistema PT Link en el que

V. MATERIAL Y MÉTODO

también se llevó a cabo la recuperación antigénica a pH 9, durante 20 minutos. Las reacciones de tinción se llevaron a cabo a temperatura ambiente de forma automatizada, en una estación de trabajo Dako Autostainer Plus, en una sola sesión. Las muestras estuvieron 5 minutos en un medio de bloqueo (peróxido de hidrógeno al 5 %) y posteriormente reaccionaron con el anticuerpo primario a temperatura ambiente. La inmunodetección se realizó con el sistema Envision (Envision Plus, Dako, California, Estados Unidos) empleando como cromógeno la diaminobenzidina. A continuación se realizó la contratinción con hematoxilina durante 8 minutos a temperatura ambiente. El tiempo de incubación con el anticuerpo primario fue de 20, 25 y 30 minutos para E-cadherina, β -catenina y Fak, respectivamente. E-cadherina se empleó a dilución 1:25, β -catenina a dilución 1:200 y Fak a dilución 1:250 (Tabla 5.2). Finalmente las secciones fueron aclaradas y deshidratadas con alcoholes y xilol, y posteriormente cubiertas con Entellan.

Anticuerpo	Clon	Referencia	Fabricante	Dilución	Incubación	Desenmascaramiento
E-CADHERINA	NCH-38	M-3612-29	DAKO	1:25	20 min.	PTlink pH 9 20 min
BETA-CATENINA	β -catenin-1	IR702/IS702	DAKO	1:200	25 min.	PTlink pH 9 20 min
Fak	4.47	05-537	MILLIPORE	1:250	30 min.	PTlink pH 9 20 min

Tabla 5.2. Anticuerpos utilizados en el estudio inmunohistoquímico.

5.2.3 Controles

Como controles negativos, se utilizaron secciones representativas de los tumores, procesadas de la forma descrita, pero omitiendo el anticuerpo primario y reemplazándolo por suero de conejo no inmune. Bajo estas condiciones no se observó inmunotinción específica. Como controles positivos de la inmunorreacción se utilizaron secciones archivadas de adenocarcinoma de colon para Fak y epitelio oral normal de individuos sanos para E-cadherina y β -catenina.

5.2.4 Valoración de los resultados inmunohistoquímicos

Todas las preparaciones fueron evaluadas independientemente por dos investigadores que desconocían el desenlace clínico de cada caso. En caso de disenso se procedió a una discusión para resolverlo, y cuando las diferencias persistían, las preparaciones fueron evaluadas por un tercer observador independiente, siendo elegida como medida la opinión mayoritaria. La valoración morfológica de las inmunotinciones se realizó de forma semicuantitativa.

La inmunotinción de E-cadherina, β -catenina y Fak fue medida como el porcentaje de células teñidas positivamente, y asignada a una de 4 categorías, considerando la inmunorreacción observada en el propio epitelio sano como control fuertemente positivo para E-cadherina y β -catenina y el adenocarcinoma de colon para Fak. Se consideraron cuatro categorías: 0, negativa, ausencia total de tinción; 1, tinción leve, menos del 33% de células teñidas; 2, tinción moderada, entre 34 y 66% de las células teñidas; 3, tinción intensa, más del 66% de las células teñidas. Además en el caso de β -catenina se valoró la posibilidad de expresión citoplasmática o nuclear como 4 y 5, respectivamente. El grupo 0 fue definido como negativo, y los grupos 1, 2 y 3 como positivos para la inmunoexpresión de E-cadherina, β -catenina y Fak. Aquellas zonas de la preparación histológica que mostraban inflamación pronunciada o necrosis fueron excluidas de la evaluación.

5.3 Análisis estadístico

Fue realizado mediante el programa informático SPSS para Windows (versión 18, SPSS Inc., Chicago, IL). Las asociaciones entre los parámetros clínicos (tamaño tumoral, afectación ganglionar, localización tumoral y grado de diferenciación histopatológico) y los resultados inmunohistoquímicos fueron examinadas mediante el test de chi-cuadrado o el exacto de Fisher (si los efectivos fueron menores de 5). Asimismo, se estimaron curvas de supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier y comparadas entre sí mediante el estadístico de log-rank. El tiempo de supervivencia fue medido como el transcurrido entre el tratamiento de cada paciente y la fecha del último contacto de seguimiento en el periodo del estudio o la fecha de la muerte para los que fallecieron a causa del cáncer oral o

mostraron una recidiva intratable. Todas las pruebas estadísticas fueron consideradas significativas cuando los valores de P fueron iguales o menores de 0,05.

Tras este primer análisis se lleva a cabo un estudio de las variables implicadas en la supervivencia y recidiva mediante máquinas de vectores de soporte. En este caso el software utilizado tiene la referencia: R Development Core Team (2010). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

Además, hemos utilizado dos paquetes pertenecientes a dicho software, a saber:

Paquete *caret*:

Max Kuhn. Contribuciones de Jed Wing, Steve Weston, Andre Williams, Chris Keefter and Allan Engelhardt (2011). *Caret: Classification and Regression Training*. R package version 4.92., URL <http://CRAN.R-project.org/package=caret>.

Paquete *penalized SVM*:

Natalia Becker, Wiebke Werft and Axel Benner (2010). *Penalized SVM: Feature Selection SVM using penalty functions*. R package version 1.1., URL <http://CRAN.R-project.org/package=penalizedSVM>.

5.4 Modelo de predicción mediante *support vector machines* (SVM)

En el análisis estadístico se han empleado métodos de clasificación basados tanto en técnicas estadísticas como en inteligencia artificial, así como métodos inteligentes de ponderación de variables y de modelación de las mismas. Para ello se han utilizado tanto las variables que hemos estudiado en el presente trabajo, como otras utilizadas en estudios previos de nuestro grupo (de Vicente et al., 2003, 2005 y 2007). Las variables disponibles para la realización del siguiente trabajo, junto con su descripción, se listan en la Tabla 5.3.

Nombre	Escala de medida	Descripción
Tiempo de seguimiento	Cuantitativa continua	Tiempo transcurrido entre el momento del tratamiento inicial y la muerte del paciente o el fin del estudio
Estado final	Cualitativa dicotómica	Vivo o muerto
Edad	Cuantitativa continua	Edad del paciente (en años cumplidos)
Género	Cualitativa dicotómica	Sexo del paciente: Hombre o Mujer
Tt	Cualitativa dicotómica	Tamaño tumoral medido en una escala dicotómica: (T1+2, T3+4)
T	Cualitativa ordinal	Tamaño tumoral: T1, T2, T3 y T4
N	Cualitativa ordinal	Estadio ganglionar: N0, N1, N2 o N3
Nn	Cualitativa dicotómica	Estadio ganglionar: (N0 / N1+2+3)
Estadio	Cualitativa ordinal	Estadio de la enfermedad: I, II, III, IV
Localización	Cualitativa	Localización del tumor
Estado de los márgenes de resección	Cualitativa dicotómica	Libres o afectados por el tumor
Número de recidivas	Cuantitativa	Número de recidivas
Recidiva	Cualitativa dicotómica	Presencia o ausencia de recidiva
Radioterapia	Cualitativa dicotómica	Radioterapia: sí o no
Mandibulectomía	Cualitativa dicotómica	Mandibulectomía: sí o no
Tabaco	Cualitativa dicotómica	Consumo de tabaco: sí o no
Número de cigarrillos	Cuantitativa	Número promedio de cigarrillos fumados diariamente
Alcohol	Cualitativa dicotómica	Consumo de alcohol: sí o no
Grado de diferenciación histológica	Cualitativa ordinal	Bien diferenciado, moderadamente diferenciado, indiferenciado
E-cadherina	Cualitativa	Inmunoexpresión de E-cadherina (<33%, 34-66%, >66%).
β-catenina	Cualitativa	Inmunoexpresión de β -catenina (<33%, 34-66%, >66%).
β-catenina	Cualitativa dicotómica	Ausencia o presencia de inmunoexpresión
Fak (quinasa de adhesión focal)	Cualitativa	Inmunoexpresión de Fak (<33%, 34-66%, >66%).
Fak	Cualitativa dicotómica	Ausencia o presencia de inmunoexpresión
MMP-2	Cualitativa dicotómica	Gelatinasa A: ausencia o presencia de inmunoexpresión
MMP-9	Cualitativa dicotómica	Gelatinasa B: ausencia o presencia de inmunoexpresión

V. MATERIAL Y MÉTODO

TIMP-1	Cualitativa dicotómica	Inhibidor tisular de metaloproteinasas-1: ausencia o presencia de inmunexpresión
TIMP-2	Cualitativa dicotómica	Inhibidor tisular de metaloproteinasas-1: ausencia o presencia de inmunexpresión
Bcl-2	Cualitativa dicotómica	Ausencia o presencia de inmunexpresión
p53	Cuantitativa continua	Proporción de células tumorales que expresan p53
p53	Cualitativa dicotómica	Expresión de p53 en <10% de las células tumorales y en \geq 10%.
p53	Cualitativa dicotómica	Expresión de p53 en <20% de las células tumorales y en \geq 20%.
MMP-7	Cualitativa dicotómica	Matrilisina: ausencia o presencia de inmunexpresión
MT1-MMP o MMP-14	Cualitativa dicotómica	Metaloproteinasa membranaria-1: ausencia o presencia de inmunexpresión

Tabla 5.3. Identificación y descripción de las variables incluidas en el estudio.

La enorme cantidad de información existente puede causar serios problemas a los algoritmos de datos fundamentalmente en lo relativo a los parámetros relacionados con la escalabilidad y su rendimiento (Yang y Pederson, 1997; Xing et al., 2001). En el caso que nos ocupa, el número de pacientes puede considerarse reducido (69), mientras que el número de variables es elevado (33), lo que degrada el rendimiento de los algoritmos. Por tanto, se hace necesario seleccionar un subconjunto de variables que faciliten la obtención de resultados.

Para afrontar los objetivos propuestos se ha procedido de la siguiente manera:

1. En primer lugar, hemos aplicado el análisis discriminante para clasificar a los pacientes que fallecen y sobreviven en función del resto de sus variables así como intentar separar en función de estas últimas, a los pacientes que sufren recidiva de aquellos que no. Con esta metodología se evaluará la influencia de las variables redundantes incluidas en los modelos clasificadores.
2. Hemos aplicado dos técnicas avanzadas de selección de variables basadas en máquinas de vectores soportes (también conocidos por su nombre en inglés “*support vector machines*” o SVM) para reducir la dimensionalidad de la muestra de origen y encontrar el número óptimo de variables que permita implementar el mejor modelo posible de clasificación de pacientes con riesgo

de muerte o recidiva. En esta segunda parte será donde se afronte el problema de la alta dimensionalidad de las variables. Con el fin de reducir la influencia negativa que tiene la reducida cantidad de instancias disponibles, se incluirán en la implementación de los algoritmos SVM técnicas de validación cruzada y “*bootstrapping*”.

3. Finalmente se implementarán dos modelos clasificadores, también basados en SVM, con objeto de modelar las variables de salida contempladas (supervivencia y recidiva) manteniendo la filosofía de validación cruzada en su construcción.

Dado lo novedoso de la metodología utilizada, haremos una breve descripción de la misma.

5.4.1 Análisis discriminante de la muestra

El análisis discriminante es una técnica estadística multivariante cuya finalidad es analizar si existen diferencias significativas entre grupos de objetos respecto a un conjunto de variables medidas sobre los mismos (Huberty, 1994). Se trata por tanto de una técnica cuyo objetivo es obtener una función capaz de clasificar a un nuevo individuo a partir del conocimiento de los valores de ciertas variables discriminadoras. En nuestro caso, para las variables analizadas (supervivencia y recidiva) el número de categorías son dos. En todos los modelos de análisis discriminante, la matriz de confusión se estimó por medio de la técnica de validación cruzada: cada uno de los pacientes existentes se clasificó construyendo un modelo que empleaba toda la información disponible a excepción de la correspondiente a dicho paciente.

En primer lugar se lleva a cabo un modelo tomando como variables de entrada todas las variables disponibles. Tras aplicar el análisis SVM y encontrar cuales son las variables óptimas, hemos creado un nuevo modelo que incluya a éstas. Se quiere destacar este hecho para resaltar que el estudio por medio del análisis discriminante y de las técnicas SVM no ha sido secuencial sino que ambas técnicas han sido evaluadas en paralelo.

5.4.2 Selección de variables por medio de SVM

Las tareas llevadas a cabo para, a partir de modelos SVM, conseguir la clasificación de las variables disponibles y, posteriormente, entrenar y validar los mejores modelos posibles para las variables de salida supervivencia y recidiva se han resumido en la Figura 5.1. del presente apartado. La primera etapa del proceso consistió en confirmar la conveniencia de emplear un sistema de validación cruzada. Tras esto, se procedió a la selección de variables en función de su importancia por medio de dos métodos que se aplicaron en paralelo (penalización no cóncava y método de Newton). Finalmente, se llevó a cabo el entrenamiento y validación de modelos por medio de un método de adición de variables que comprueba cómo influye en el rendimiento del modelo obtenido la adición de cada una de las variables disponibles al mismo.

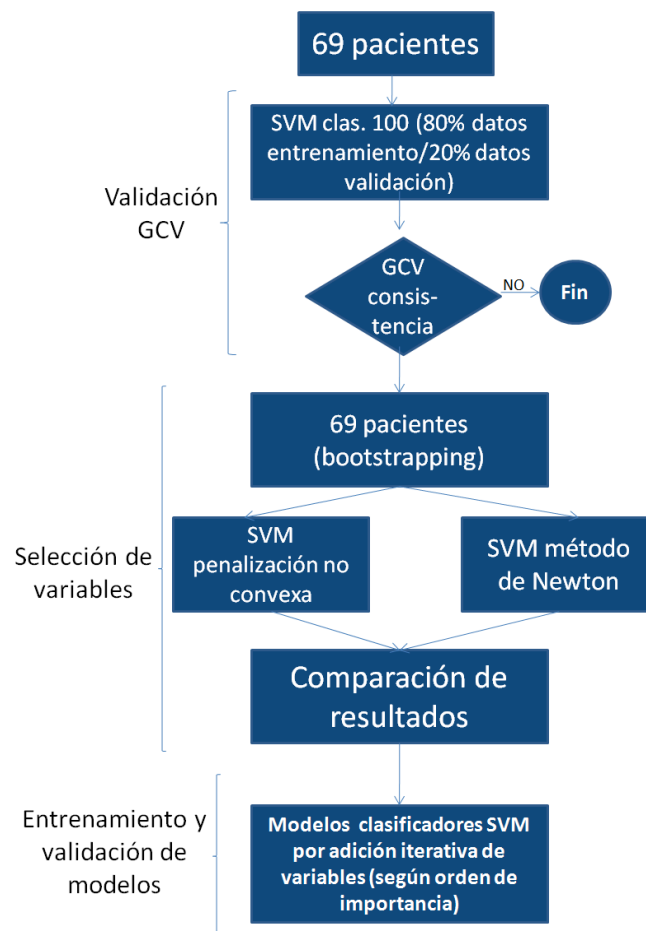


Figura 5.1. Esquema completo de las tareas realizadas usando modelos SVM.

a) SVM con penalización no cóncava

Esta técnica es una particularización del algoritmo de Vapnik y Lerner en la que se introduce una nueva función de penalización no cóncava presentada por Fan y Li (Fan y Li, 2001) y conocida como “*smoothly clipped absolute deviation*”. Debido al reducido tamaño de la muestra de pacientes disponibles se aplicó de nuevo la técnica de validación cruzada. Para ello el algoritmo clasificador fue ejecutado cien veces tomando para cada una de las cien ejecuciones una muestra aleatoria de 55 pacientes para el entrenamiento (80% del total de la muestra) y 14 (20% del total de la muestra) para la validación. Así mismo con objeto de evaluar la consistencia de la validación cruzada se registraron en cada una de las cien ejecuciones del algoritmo, parámetros tales como precisión, coeficiente Kappa, sensibilidad, prevalencia, incidencia y valores predictivos positivos y negativos.

Tras la validación de la metodología de clasificación y con el objeto de realizar una evaluación de la importancia con el mayor número de datos posible se implementó un nuevo algoritmo con la totalidad de las 69 pacientes disponibles aplicando la técnica de “*bootstrapping*” (Efron, 1979) con 25 repeticiones. Los resultados de dicho algoritmo clasificador se representan en gráficas donde se muestra el nivel de importancia para cada variable en el eje de abscisas en cada una de las variables dependientes estudiadas, es decir por un lado supervivencia y por otro recidiva.

b) SVM con el método de Newton

En general, los algoritmos SVM para clasificación lineal minimizan la función de costo para los residuos (CFR) que es llamada “Función de pérdida de Vapnik” (o ϵ -sensitivo). En este caso usamos el algoritmo propuesto por Schmidt (Schmidt et al., 2007) que se basa en el uso de CFR Vapnik más una regularización L1 conocida capaz de generar un conjunto de soluciones reducido (Bradley y Mangasarian, 1998; Zhy et al., 2003).

Así, el clasificador empleado en este apartado requiere la resolución de una ecuación lineal. Al igual que en el caso del SVM con penalización no cóncava, los modelos fueron entrenados con la filosofía de validación cruzada (55 muestras para entrenamiento y 14 para validación). Tras este primer análisis se llevó a cabo una segunda

implementación del algoritmo con la totalidad de los 69 pacientes disponibles y realizando de nuevo “*bootstrapping*” con 25 repeticiones en su proceso de entrenamiento.

c) Comparación de resultados

Una vez evaluada la metodología por medio de validación cruzada se contrastaron las variables detectadas como importantes por cada uno de los dos algoritmos de ponderación empleados para las variables de salida analizadas (supervivencia y recidiva).

5.4.3 Modelo clasificador SVM

Tras la clasificación por importancia de las variables se realizó la implementación de dos modelos predictores (uno para cada variable analizada: supervivencia y recidiva) utilizando el algoritmo SVM como clasificador según la implementación de Cortes y Vapnik (Cortes y Vapnik, 1995).

A continuación se describe en detalle el proceso de entrenamiento:

- Paso 1: Entrenamiento tipo “*generic cross validation*” o GCV (100 modelos con 55 pacientes para el entrenamiento y 14 para la validación) tomando como variable de entrada la identificada como más importante por el proceso de ponderación empleado (todos los pasos son ejecutados con el algoritmo de penalización no cóncava en primer lugar y con el método Newton en segundo).
- Paso 2: Evaluación del valor medio de Sensibilidad, Especificidad y Precisión (“*Accuracy*”) de los 100 modelos entrenados.
- Paso 3: Entrenamiento GCV (100 modelos con 55 pacientes para el entrenamiento y 14 para la validación) tomando como variables de entrada la designada en el paso anterior más la siguiente por orden de importancia.
- Paso 4: Evaluación de los nuevos valores medios de Sensibilidad, Especificidad y Precisión y comparación con los obtenidos en el Paso 2.
- Paso 5: Decisión de inclusión en el modelo general de la última variable añadida si los valores de Sensibilidad, Especificidad y Precisión se incrementasen con dicha inclusión.

VI. RESULTADOS

VI. RESULTADOS

6.1 Inmunoexpresión de E-cadherina en los carcinomas orales de células escamosas

Se detectó inmunorreacción para E-cadherina en los 69 casos analizados (100%). De éstos, 37 (53,8%) mostraron reacción intensa; 21 (30,4%) lo hicieron de forma moderada (entre el 33 y el 66% de las células tumorales), y finalmente 11 casos (15,9%) expresaron E-cadherina en menos del 33% de las células tumorales. Los tumores mostraban, en general, una menor expresión de E-cadherina que el epitelio normal.

La inmunotinción observada en las células tumorales se localizó en la membrana plasmática y fue homogénea (Figura 6.1.), con leve tinción del citoplasma.

Inmunotinción	Frecuencia absoluta	Porcentaje
intensa	37	53,7%
moderada	21	30,4%
leve	11	15,9%
Total	69	100%

Tabla 6.1. Distribución de la inmunoexpresión de E-cadherina en las células tumorales.

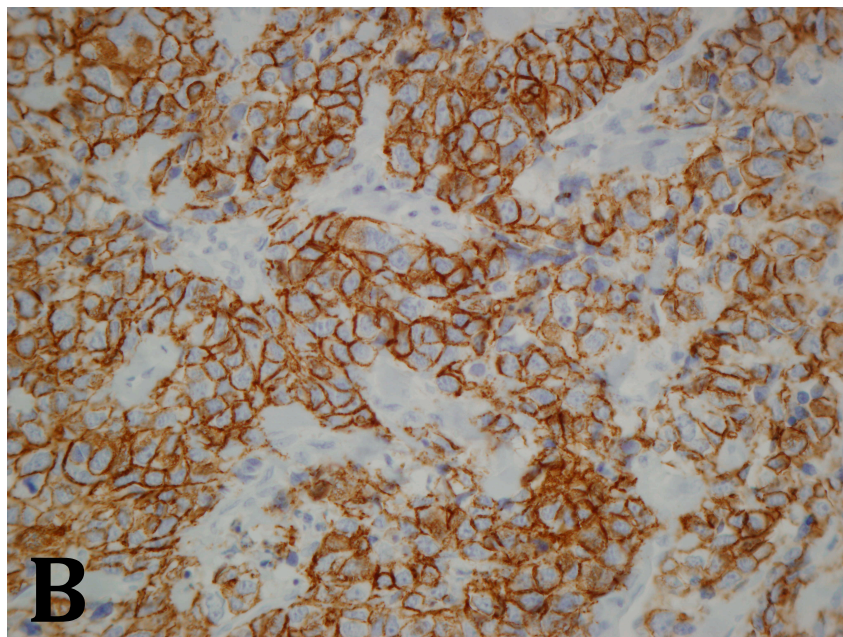
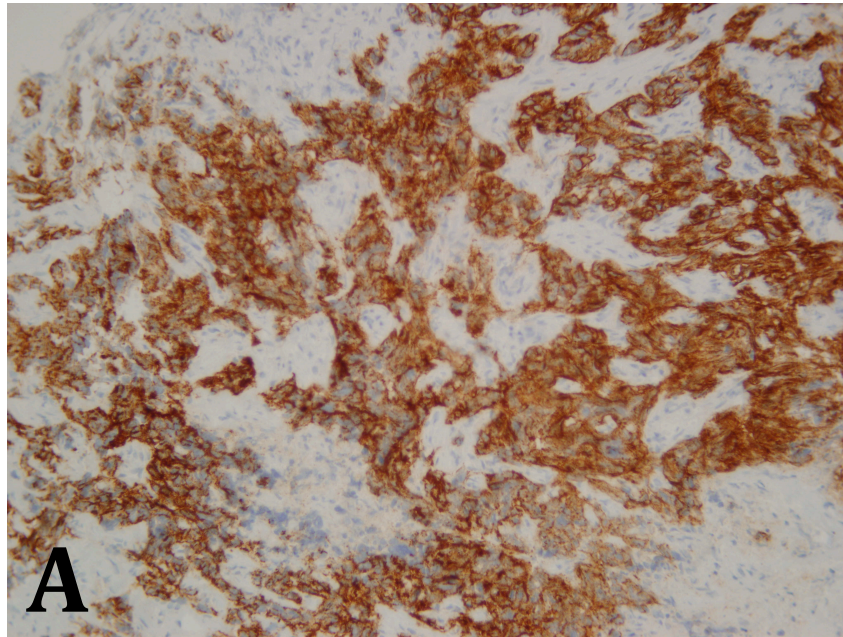


Figura 6.1. Inmunexpresión de E-cadherina en el cáncer oral. (A) Tinción intensa de membrana citoplasmática de E-cadherina en los nidos tumorales (aumento original $\times 200$). (B) E-cadherina se expresa de forma homogénea en la membrana citoplasmática de las células tumorales (aumento original $\times 400$).

VI. RESULTADOS

6.2 Inmunoexpresión de E-cadherina en los carcinomas orales de células escamosas primarios y su relación con los parámetros clinicopatológicos

No se observó relación estadísticamente significativa entre la localización tumoral y la inmunoexpresión de la E-cadherina ($p=0,8$). Tampoco fue posible establecer relación con el sexo ($p=0,5$), la edad ($p=0,4$), el tamaño tumoral T ($p=0,7$), el estadio N ($p=0,7$), el estadio TNM ($p=0,4$), la recurrencia tumoral ($p=0,4$) o el consumo de tabaco ($p=0,8$). Sin embargo, la inmunotinción por E-cadherina fue significativamente mayor en pacientes consumidores de alcohol ($p= 0,05$) (Tabla 6.2.) y el grado de diferenciación tumoral se asoció de manera significativa con la expresión de E-cadherina ($p=0,003$) (Tabla 6.3.). En un análisis de supervivencia (Kaplan-Meier), la expresión de E-cadherina no mostró significación estadística ($p=0,6$).

		Leve	Moderada	Intensa	Total
Consumo de alcohol	NO	4	3	17	24
	SI	7	18	20	45
Total		11	21	37	69

Tabla 6.2. Asociación entre la inmunoexpresión de E-cadherina y el consumo de alcohol (χ^2 , $p= 0,05$).

		Leve	Moderada	Intensa	Total
Grado de diferenciación	BIEN DIFERENCIADO	6	14	35	55
	MODERADAMENTE DIFERENCIADO	5	7	2	14
Total		11	21	37	69

Tabla 6.3. Asociación entre la inmunoexpresión de E-cadherina y el grado de diferenciación histológica (χ^2 , $p= 0,003$).

6.3 Inmunoexpresión de β -catenina en los carcinomas orales de células escamosas

Se detectó inmunotinción para β -catenina en 64 de los 69 casos analizados (92,8%) (Tabla 6.4.). De ellos, 19 (27,90%) mostraron reacción de membrana y citoplasmática intensa; 26 (38,30%) lo hicieron de forma moderada (entre el 33 y el 66% de las células tumorales) y, finalmente, 18 casos (26,50%) expresaron β -catenina en menos del 33% de las células tumorales. La inmunotinción observada en las células tumorales se localizó en la membrana plasmática y fue homogénea (Figura 6.2.), en todos los casos, excepto en uno en que la tinción fue citoplasmática. En ningún caso se detectó tinción nuclear. En cuatro de los casos estudiados no se encontró inmunoexpresión de β -catenina.

Inmunotinción	Frecuencia absoluta	Porcentaje
negativa	5	7,2%
membrana leve	18	26,2%
membrana moderada	26	37,7%
membrana intensa	19	27,5%
citoplasmática	1	1,4%
Total	69	100%

Tabla 6.4. Distribución de la inmunoexpresión de β -catenina en las células tumorales.

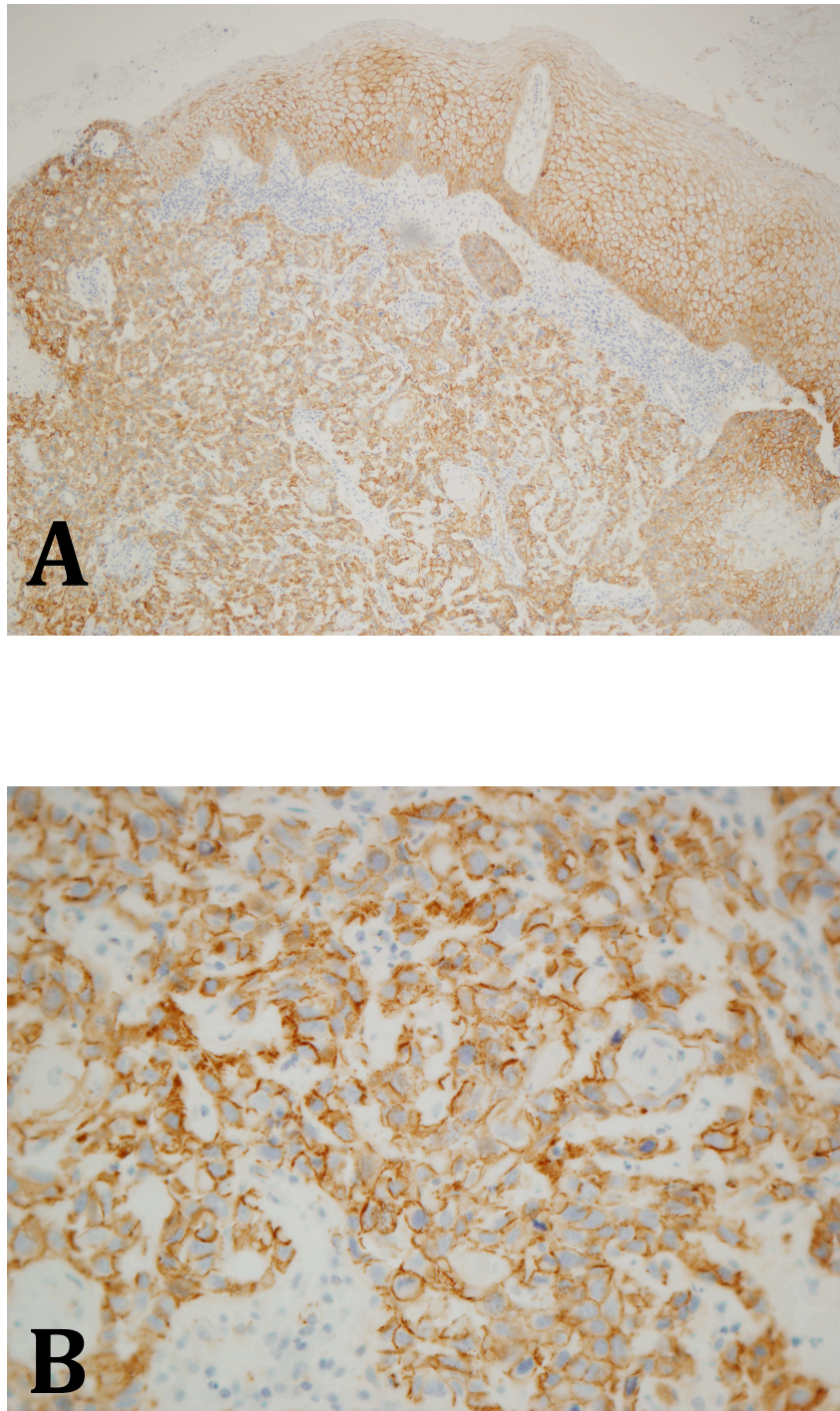


Figura 6.2. Inmunoexpresión de β -catenina en el cáncer oral. (A) Tinción intensa de membrana citoplasmática de β -catenina en los nidos tumorales (aumento original $\times 100$). En esta imagen puede compararse la positividad en las células tumorales con la del epitelio sano adyacente a la lesión. (B) β -catenina se expresa de forma homogénea en la membrana citoplasmática de las células tumorales (aumento original $\times 400$).

6.4 Inmunoexpresión de β -catenina en los carcinomas orales de células escamosas y su relación con los parámetros clinicopatológicos

No fue posible establecer una relación estadísticamente significativa con el sexo ($p=0,7$), la edad ($p=0,7$), el tamaño tumoral T ($p=0,4$), el consumo de alcohol ($p=0,4$), el de tabaco ($p=0,5$) ni la existencia de recidivas ($p=0,07$), si bien en este último caso, la relación fue casi significativa. Sin embargo, considerando que la expresión está conservada en los casos con tinción intensa y que está reducida en los casos con tinción moderada, leve o negativa, encontramos asociación significativa con la presencia de metástasis ganglionares ($p= 0,02$) (Tabla 6.5.). También encontramos una asociación significativa con el estadio tumoral TNM ($p=0,008$) (Tabla 6.6.) y con la expresión de E-cadherina ($p=0,018$) (Tabla 6.7.). Realizando un análisis de Kaplan-Meier en función de la expresión de β -catenina no se observó significación estadística ($p=0,9$). Por lo tanto, la inmunorreacción de β -catenina no se relacionó con la supervivencia de los pacientes.

		Expresión reducida	Expresión conservada	Total
N	No	28	16	44
	N 1+2+3	22	3	25
	Total	50	19	69

Tabla 6.5 Asociación entre la inmunoexpresión de β -catenina y la presencia de metástasis ganglionares (χ^2 , $p= 0,029$).

		Expresión reducida	Expresión conservada	Total
Estadio	I	6	8	14
	II	12	7	19
	III	11	1	12
	IV	21	3	24
	Total	50	19	69

Tabla 6.6. Asociación entre la inmunoexpresión de β -catenina y el estadio tumoral (χ^2 , $p= 0,009$).

VI. RESULTADOS

		Expresión reducida	Expresión conservada	Total
E-cadherina	Leve	11	0	11
	Moderada	17	4	21
	Intensa	22	15	37
	Total	50	19	69

Tabla 6.7. Asociación entre la inmunoexpresión de β -catenina y E-cadherina (χ^2 , $p=0,018$).

6.5 Inmunoexpresión de Fak en los carcinomas orales de células escamosas

Se detectó inmunorreacción para Fak en 62 de los 69 casos analizados (89,8%)(Tabla 6.8.). De estos 62 casos, 23 (33,3%) mostraron reacción intensa; 16 (23,2%) lo hicieron de forma moderada (entre el 33 y el 66% de las células tumorales), y finalmente 23 (33,3%) de forma leve (en menos del 33% de las células tumorales). Los 7 casos restantes (10,2%) se consideraron negativos para Fak. Dentro del tejido tumoral, Fak se expresaba de manera homogénea en la mayoría de los casos con mayor intensidad que en el epitelio sano.

La inmunotinción observada en las células tumorales fue de tipo citoplasmática y homogénea (Figuras 6.3).

Inmunotinción	Frecuencia absoluta	Porcentaje
negativa	7	10,2%
leve	23	33,3%
moderada	16	23,2%
intensa	23	33,3%
Total	69	100%

Tabla 6.8. Distribución de la inmunoexpresión de Fak en las células tumorales.

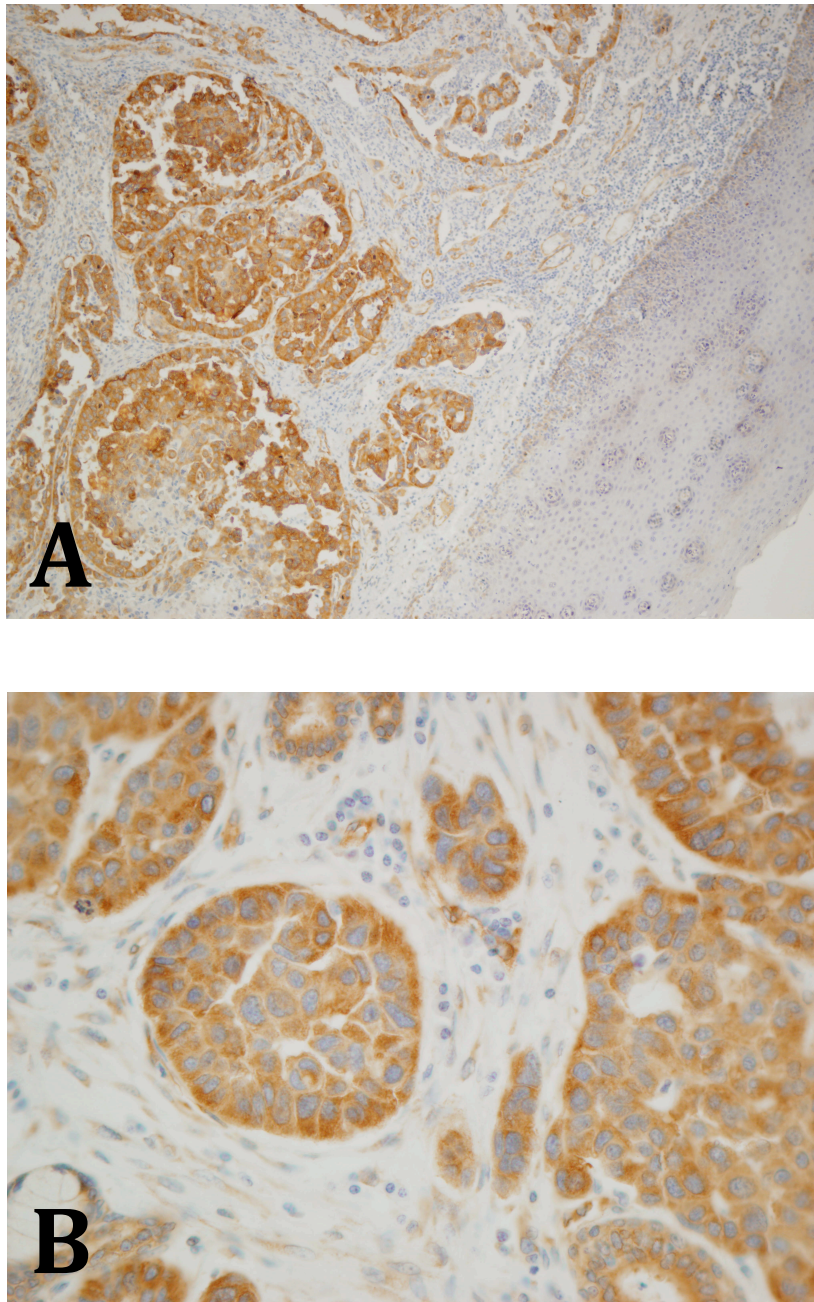


Figura 6.3. Inmunoexpresión de Fak en el cáncer oral. (A) Tinción intensa del citoplasma en los nidos tumorales (aumento original $\times 100$). Contrasta la negatividad del epitelio sano adyacente a la lesión y la positividad de las estructuras glandulares del corion. (B) Fak se expresa de forma homogénea en el citoplasma de las células tumorales (aumento original $\times 400$).

6.6 Inmunoexpresión de Fak en los carcinomas orales de células escamosas y su relación con los parámetros clinicopatológicos

No se observó relación estadísticamente significativa entre la inmunotinción de Fak y las variables clínicas tales como la edad ($p=0,6$), el sexo ($p=0,3$), el grado histológico ($p=0,2$), la localización tumoral ($p=0,2$), el estadio TNM ($p=0,1$), el consumo de tabaco ($p=0,6$) ni el consumo de alcohol ($p=0,636$). Sin embargo, la inmunorreacción para Fak sí mostró asociación significativa con tamaños tumorales T ($p= 0,01$) grandes (T3 y T4 respecto a T1 y T2) (Tabla 6.9.). También se mostró una asociación estadísticamente significativa entre la inmunotinción de Fak y el estadio ganglionar (Test exacto de Fisher, $p=0,01$)(Tabla 6.10), y entre Fak y recidiva tumoral local (Test exacto de Fisher, $p= 0,01$)(Tabla 6.11.). En un análisis de Kaplan-Meier se observó la existencia de una asociación significativa entre la expresión de Fak y pobre supervivencia (Figura 3.4). Así, los pacientes con tumores negativos para Fak comparados con los positivos tenían una supervivencia más prolongada. Por otro lado, la expresión de Fak mostró asociación significativa con la de β -catenina ($p = 0,01$)(Tabla 6.12).

	negativa	leve	moderada	intensa	Total
T1+T2	7	10	13	17	47
T3+T4	0	13	3	6	22
Total	7	23	16	23	69

Tabla 6.9. Asociación entre la inmunoexpresión de Fak y el tamaño tumoral agrupado (Test exacto de Fisher, $p= 0,010$).

	negativa	leve	moderada	intensa	Total
N0	6	15	5	18	44
N+	1	8	11	5	25
Total	7	23	16	23	69

Tabla 6.10. Asociación entre la inmunoexpresión de Fak y la presencia de ganglios cervicales afectados (χ^2 , $p= 0,012$).

VI. RESULTADOS

	Negativa	Positiva	Total
RECIDIVA NO	7	33	40
RECIDIVA SI	0	29	29
Total	7	62	69

Tabla 6.11. Asociación entre la inmunoexpresión de Fak y la recurrencia del tumor (Test exacto de Fisher, $p=0,019$).

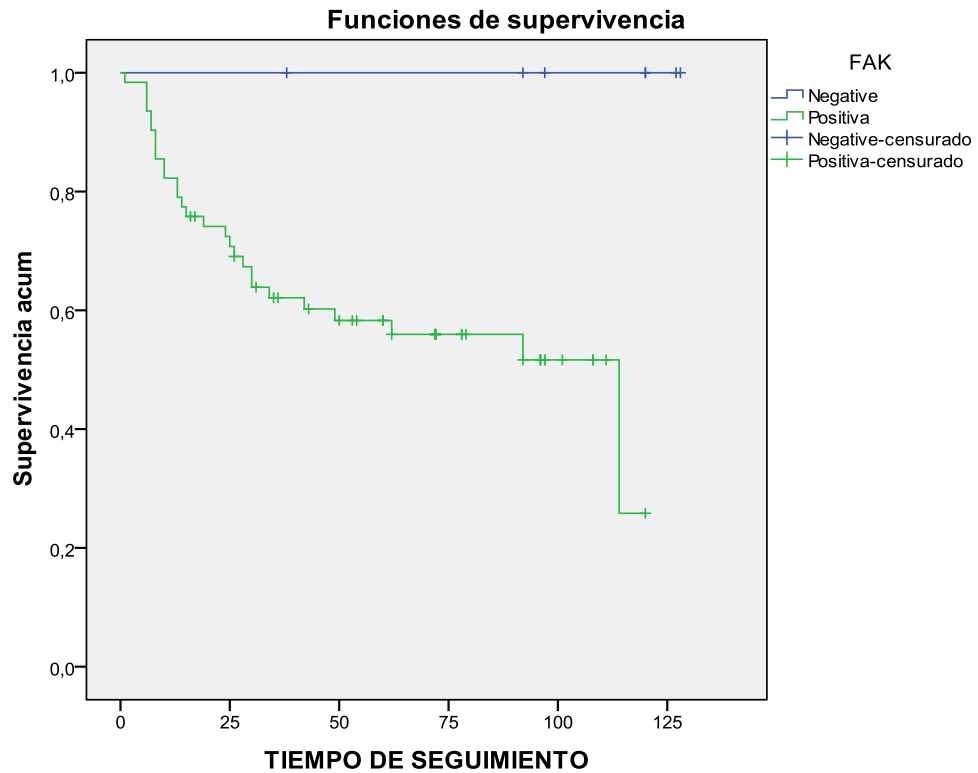


Figura 6.4. Curvas de supervivencia estimadas por el método de Kaplan-Meier en función de la inmunorreacción para el Fak ($p=0,017$).

6.7 Análisis discriminante de la muestra

Se han analizado las variables “supervivencia” y “recidiva”, ambas con dos categorías (vivo o fallecido y ausencia o presencia de recidiva tumoral). La Figura 6.5. muestra un esquema con todos los modelos discriminantes realizados para cada una de las dos variables, con esquemas de trabajo paralelos.

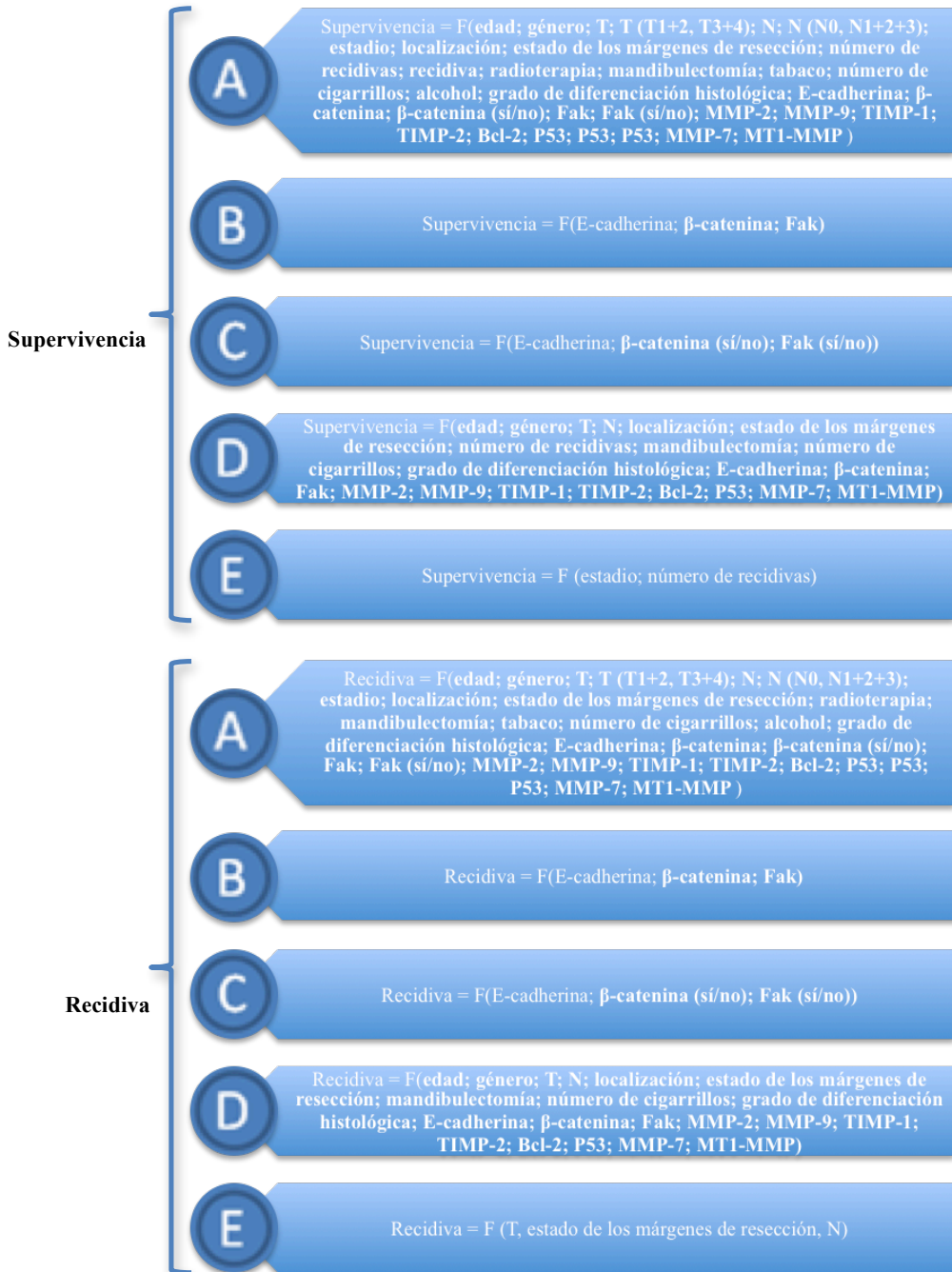


Figura 6.5. Modelos discriminantes para cada una de las dos variables supervivencia y recidiva.

VI. RESULTADOS

A continuación, expondremos los resultados para cada variable.

6.7.1 Variable supervivencia

a) Primer modelo:

Tiene como variable de salida “supervivencia” y como variables de entrada a todas aquellas que se recogen en la Tabla 5.3. a excepción del tiempo de seguimiento. La Tabla 6.12. presenta la matriz de confusión, en la que del total de pacientes vivos un 95,12% (39 de 41) son correctamente clasificados, en comparación con el 96,43% (27 de 28) de los fallecidos. La Tabla 6.13. presenta los coeficientes de las funciones de clasificación lineales obtenidas para cada grupo. La tasa global de clasificación del modelo alcanza el 95,65%.

Grupo propuesto	Grupo verdadero	
	vivo	fallecido
vivo	39	1
fallecido	2	27
Total N	41	28
N correctas	39	27
Proporción	0,9512	0,9643

Tabla 6.12. Matriz de confusión del modelo (con validación cruzada) de análisis discriminante de la variable supervivencia que usa como variables de entrada todas las disponibles.

	Vivo	Fallecido
Constante	-53,53	-118,11
Edad	0,41	0,27
Sexo	14,71	25,34
T	6,6	23,98
T (T1+2, T3+4)	-3,09	-12,12
N	3,34	4,1
N (N0, N1+2+3)	-1,49	9,82
Estadio	-0,4	4,13
Localización	-1,08	-1,85
Margen de resección	-6,37	2,06
Número de recidivas	-4,03	-7,32
Recidiva	0,9	143,94
Radioterapia	7,56	-11,82
Mandibulectomía	-3,52	-2,11
Tabaco	0,2	-2,73
Número de cigarrillos diarios	0,36	0,28

Alcohol	1,04	14,1
Grado de diferenciación histológica	17,92	16,45
E-cadherina	8,45	13,3
β -catenina	0,86	2,39
β -catenina (si/no)	1,66	-7,71
Fak	1,67	2,63
Fak (si/no)	5,67	-0,39
MMP-2	-0,95	-4,33
MMP-9	5,37	7,52
TIMP-1	4,65	-0,49
TIMP-2	0,16	10,41
Bcl-2	-0,17	-0,22
p53	-0,09	-0,17
p53 (<10%)	6,24	19,68
p53 (<20%)	6,26	0,65
MMP-7	0,14	-11,1
MT1-MMP	1,96	1,63

Tabla 6.13. Coeficientes de las funciones de clasificación lineales obtenidas para cada grupo.

b) Segundo modelo:

Tiene como variables de entrada E-cadherina, β -catenina y Fak (Tabla 6.14 y 6.15.). Los valores de clasificación que alcanza dicho modelo son bajos, clasificando de forma correcta solamente al 43,90% de los pacientes vivos y al 46,43% de los pacientes fallecidos. Por tanto, se alcanza un 44,93% de clasificación global.

Grupo propuesto	Grupo verdadero	
	vivo	fallecido
vivo	18	15
fallecido	23	13
Total N	41	28
N correctas	18	13
Proporción	0,4390	0,4643

Tabla 6.14. Matriz de confusión del modelo (con validación cruzada) de análisis discriminante de la variable vive que usa como variables de entrada ecad, Fak y β -catenina.

VI. RESULTADOS

	Vivo	Fallecido
Constante	-5,722	-4,9081
E-cadherina	3,4301	3,2264
β -catenina	1,0587	0,8939
Fak	0,624	0,6041

Tabla 6.15. Coeficientes de las funciones de clasificación lineales obtenidas para cada grupo en el modelo con validación cruzada de la variable vive usando como variables de entrada E-cadherina, β -catenina y Fak.

c) Tercer modelo:

Tiene como variables de entrada E-cadherina, Fak y β -catenina, medidas en una escala cualitativa dicotómica (Tabla 6.16.). La tasa de clasificación de los pacientes vivos es muy superior a la obtenida en el modelo anterior (70,73%) mientras que en el grupo de fallecidos el porcentaje de aciertos conseguidos se mantiene en el mismo valor (46,43%). En este caso, la tasa de clasificación global del modelo aumenta hasta el 60,87%.

Grupo propuesto	Grupo verdadero	
	vivo	fallecido
vivo	29	15
fallecido	12	13
Total N	41	28
N correctas	29	13
Proporción	0,7073	0,4643

Tabla 6.16. Matriz de confusión del modelo (con validación cruzada) de análisis discriminante de la variable vive que usa como variables de entrada E-cadherina, Fak (dicotómica) y β -catenina (dicotómica).

d) Cuarto modelo :

Incluye todas las variables presentes en la Tabla 5.3, a excepción de aquellas que aparecen repetidas, considerando como tales las que expresan los mismos contenidos de forma diferente. Las variables excluidas respecto al primer modelo son aquellas que, además de en su forma original, son registradas en otras escalas, generalmente dicotómicas: T(T1+2, T3+4), recidiva, tabaco, β -catenina, Fak, N, estadio, p53 (Tabla 6.17.). Así mismo también se ha excluido la variable radioterapia porque, no era una

variable clínica, patológica o molecular expresada en los tumores en el momento del diagnóstico o tratamiento inicial.

La tasa global de clasificación alcanza el 88,5%. La capacidad de clasificación de los pacientes fallecidos es del 85,7%, mientras que la de clasificación de pacientes vivos es del 90,2%.

Grupo propuesto	Grupo verdadero	
	vivo	fallecido
vivo	37	4
fallecido	4	24
Total N	41	28
N correctas	35	24
Proporción	0,902	0,857

Tabla 6.17. Matriz de confusión del modelo (con validación cruzada) de análisis discriminante de la variable supervivencia que usa como variables de entrada todas las disponibles a excepción de las consideradas como redundantes.

	Vivo	Fallecido
Constante	-46,561	-47,664
Edad	0,420	0,411
Sexo	10,988	8,748
T	-0,219	0,777
N	1,536	-2,088
Localización	-1,467	-2,088
Bordes de resección	-3,825	4,409
Número de recidivas	-4,309	4,761
Mandibulectomía	1,706	-1,354
Número de cigarrillos	0,278	0,221
Grado de diferenciación	17,140	14,151
E-cadherina	8,769	6,913
β-catenina	1,289	1,685
Fak	0,413	1,224
MMP-2	-0,028	1,222
MMP-9	5,909	6,426
TIMP-1	4,135	5,336
TIMP-2	-0,868	1,484
Bcl-2	-0,133	-0,065
p53	0,024	0,036
MMP-7	1,581	0,566
MT1-MMP	2,045	0,812

Tabla 6.18. Coeficientes de las funciones de clasificación lineales obtenidas para cada grupo.

VI. RESULTADOS

e) Quinto modelo:

Finalmente, se decidió la realización de un modelo que tuviese como factores a las variables que las técnicas de SVM encontraron como de mayor importancia, a excepción de la radioterapia y las variables consideradas como redundantes. Las incluidas por tanto son recidiva y estadio. La matriz de confusión de este modelo se presenta en la Tabla 6.19. Se observa como las tasas de clasificación global alcanzadas son mejores que las obtenidas con los modelos anteriores, llegándose a un 97,56% de clasificación correcta para los pacientes vivos y un 100% para los fallecidos (tasa de clasificación global del 98,55%).

Grupo propuesto	Grupo verdadero	
	vivo	fallecido
vivo	40	0
fallecido	1	28
Total N	41	28
N correctas	40	28
Proporción	0,9756	1

Tabla 6.19. Matriz de confusión del modelo (con validación cruzada) de análisis discriminante de la variable supervivencia que usa como variables de entrada recidiva y estadio.

6.7.2 Variable recidiva

Las variables de entrada incluidas en cada modelo fueron las mismas que en el caso de la variable supervivencia, a excepción del quinto modelo.

a) Primer modelo:

En él, con inclusión de todas las variables, del total de pacientes que no han sufrido recidiva, un 82,93% (34 de 40) son correctamente clasificados, en comparación con el 62,07% (11 de 29) de los pacientes que sí sufren recidiva. El nivel global de clasificación que se alcanza es del 75,36% (52 pacientes sobre 69 son correctamente clasificados) (Tablas 6.20. y 6.21.).

Grupo propuesto	Grupo verdadero	
	recidiva no	recidiva sí
recidiva no	34	11
recidiva sí	6	18
Total N	40	29
N correctas	34	18
Proporción	0,8293	0,6207

Tabla 6.20. Matriz de confusión del modelo (con validación cruzada) de análisis discriminante de la variable recidiva que usa como variables de entrada todas las disponibles.

	Recidiva no	Recidiva sí
Constante	-52,453	-59,896
Edad	0,426	0,386
Sexo	13,781	15,199
T (dicotómica: T1+2, T3+4)	8,207	10,036
T (T1, T2, T3, T4)	-3,62	-3,661
N	3,349	8,262
N (dicotómica: N0, N1+2+3)	-1,71	-11,578
Estadio	0,225	1,009
Localización	-1,31	-1,922
Estado de los márgenes de resección	-3,194	-0,931
Radioterapia	6,059	12,283
Mandibulectomía	-3,466	-3,722
Tabaco	-0,026	1,019
Número de cigarrillos consumidos diariamente	0,337	0,346
Alcohol	2,304	0,631
Grado de diferenciación	17,445	16,874
E-cadherina	8,164	6,24
β-catenina	1,003	0,896
B-catenina (expresión: si / no)	1,149	5,817
Fak	2,207	2,409
Fak (expresión: si/no)	4,618	9,07
MMP-2	-0,785	-0,407
MMP-9	5,054	4,973
TIMP-1	4,96	7,753
TIMP-2	1,015	-0,507
Bcl-2	-0,164	-0,126
p53 (proporción de células positivas)	-0,09	-0,131
p53 (dicotómica: <10%, ≥10%)	4,835	10,418

VI. RESULTADOS

p53 (dicotómica: <20%, ≥20%)	7,529	6,831
MMP-7	-0,081	-0,081
MT1-MMP	1,655	1,059

Tabla 6.21. Coeficientes de las funciones de clasificación lineales obtenidas para cada grupo.

b) Segundo modelo:

Con este modelo se consigue clasificar de forma correcta sólo el 43,90% de los pacientes vivos y el 46,43% de los fallecidos. Por tanto, se logra sólo un 44,93% de clasificación global (Tablas 6.22. y 6.23).

Grupo propuesto	Grupo verdadero	
	recidiva no	recidiva sí
recidiva no	20	14
recidiva sí	20	15
Total N	40	29
N correctas	20	15
Proporción	0,4878	0,5172

Tabla 6.22. Matriz de confusión del modelo (con validación cruzada) de análisis discriminante de la variable recidiva que usa como variables de entrada E-cadherina, Fak y β -catenina.

	recidiva no	recidiva sí
Constante	-5,9492	-4,8207
E-cadherina	3,5526	3,1996
β -catenina	1,0989	0,8979
Fak	0,5853	0,6235

Tabla 6.23. Coeficientes de las funciones de clasificación lineales obtenidas para cada grupo en el modelo con validación cruzada de la variable recidiva usando como variables de entrada E-cadherina, Fak y β -catenina.

c) Tercer modelo:

La tasa de clasificación de los pacientes vivos es muy superior a la obtenida en el modelo anterior (70,73%) mientras que en el grupo de fallecidos el porcentaje de aciertos conseguidos es algo inferior que en el modelo previo (48,28%). En este caso, la tasa de clasificación global del modelo aumenta hasta el 62,32% (Tabla 6.24).

Grupo propuesto	Grupo verdadero	
	recidiva no	recidiva sí
recidiva no	29	15
recidiva sí	11	14
Total N	40	29
N correctas	29	14
Proporción	0,7073	0,4828

Tabla 6.24. Matriz de confusión del modelo (con validación cruzada) de análisis discriminante de la variable recidiva que usa como variables de entrada E-cadherina, Fak (dicotómica) y β -catenina (dicotómica).

d) Cuarto modelo:

Las tasas de clasificación global alcanzan un 70,0% de clasificación correcta para los pacientes que no presentaron recidiva y un 58,60% para los pacientes con recidiva. La tasa de clasificación global del modelo es del 65,21% (Tabla 6.25. y 6.26)

Grupo propuesto	Grupo verdadero	
	recidiva no	recidiva sí
recidiva no	28	12
recidiva sí	12	17
Total N	40	29
N correctas	28	17
Proporción	0,700	0,586

Tabla 6.25. Matriz de confusión del modelo (con validación cruzada) de análisis discriminante de la variable vive que usa como variables de entrada todas las disponibles a excepción de las consideradas como redundantes.

	Vivo	Fallecido
Constante	-46,568	-48,163
Edad	0,469	0,474
Sexo	9,784	9,966
T	0,627	1,439
N	-1,231	-1,378
Localización	-0,819	-1,358
Estado de los márgenes de resección	-6,739	-2,747
Mandibulectomía	-2,66	-2,686
Número de cigarrillos	0,285	0,274
Grado de diferenciación	15,171	14,157
E-cadherina	8,093	7,3
β-catenina	1,05	1,103

VI. RESULTADOS

Fak	0,994	1,236
MMP-2	0,837	2,025
MMP-9	5,424	5,28
TIMP-1	4,364	5,991
TIMP-2	0,51	0,089
Bcl-2	-0,111	-0,099
p53	0,046	0,051
MMP-7	0,425	1,087
MT1-MMP	1,398	1,332

Tabla 6.26. Coeficientes de las funciones de clasificación lineales obtenidas para cada grupo en el modelo con validación cruzada de la variable recidiva, usando como variables de entrada todas las disponibles a excepción de las consideradas como redundantes.

e) Quinto modelo:

Este modelo discriminante emplea como variables a aquellas que las SVM encontraron como de mayor importancia en los modelos anteriores. Así, para la variable de salida recidiva, éstas fueron el tamaño tumoral (T), la presencia de márgenes de resección afectados por el tumor y la presencia de metástasis linfáticas ganglionares (N). La tasa global de clasificación global de este modelo alcanza el 66,66% de los pacientes (Tabla 6.27.)

Grupo propuesto	Grupo verdadero	
	recidiva no	recidiva sí
recidiva no	32	14
recidiva sí	8	15
Total N	40	29
N correctas	32	14
Proporción	0,800	0,517

Tabla 6.27. Matriz de confusión del modelo (con validación cruzada) de análisis discriminante de la variable recidiva que usa como variables de entrada T, márgenes de resección y N.

6.8 Selección de variables por medio de SVM

Como hemos descrito previamente, tras la validación de la metodología empleada, se realizó la selección de variables en función de su importancia, mediante dos métodos que se aplicaron en paralelo (penalización no cóncava y método de Newton). Nótese en este punto que la presencia de variables redundantes o parcialmente redundantes no es un parámetro a considerar por los algoritmos ponderadores que se centran en evaluar la importancia individual de cada variable. Describiremos a continuación los resultados obtenidos por cada método para cada variable de salida a estudio (supervivencia y recidiva).

6.8.1 SVM con penalización no cóncava

a) Variable supervivencia

Debido al reducido tamaño de la muestra de pacientes disponibles y tal y como ya se ha explicado con anterioridad, se aplicó la técnica de validación cruzada. Para llevar a cabo la evaluación de consistencia, el algoritmo clasificador fue ejecutado cien veces tomando para cada una de las cien ejecuciones una muestra aleatoria de 55 pacientes para el entrenamiento (80% del total de la muestra) y 14 (20% del total de la muestra) para la validación. Así mismo se registraron en cada una de las cien ejecuciones del algoritmo, parámetros tales como la precisión (*Accuracy*), coeficiente Kappa (*kappa*), sensibilidad (*Sensitivity*), especificidad (*Specificity*), prevalencia (*Prevalence*), valores predictivos positivo y negativo (*Pos. Pred. Value* y *Neg. Pred. Value*) e incidencia (*Incidence*). Las Figuras 6.6 y 6.7 muestran en forma de *boxplot* los valores medios, máximos, mínimos y desviaciones estándar de los valores tomados por los mencionados parámetros. Los elevados valores medios obtenidos en los 100 modelos entrenados donde destacan sensibilidades y especificidades por encima del 90% así como precisiones por encima del 95%, validan la consistencia del proceso de selección y la fiabilidad de los resultados obtenidos.

VI. RESULTADOS

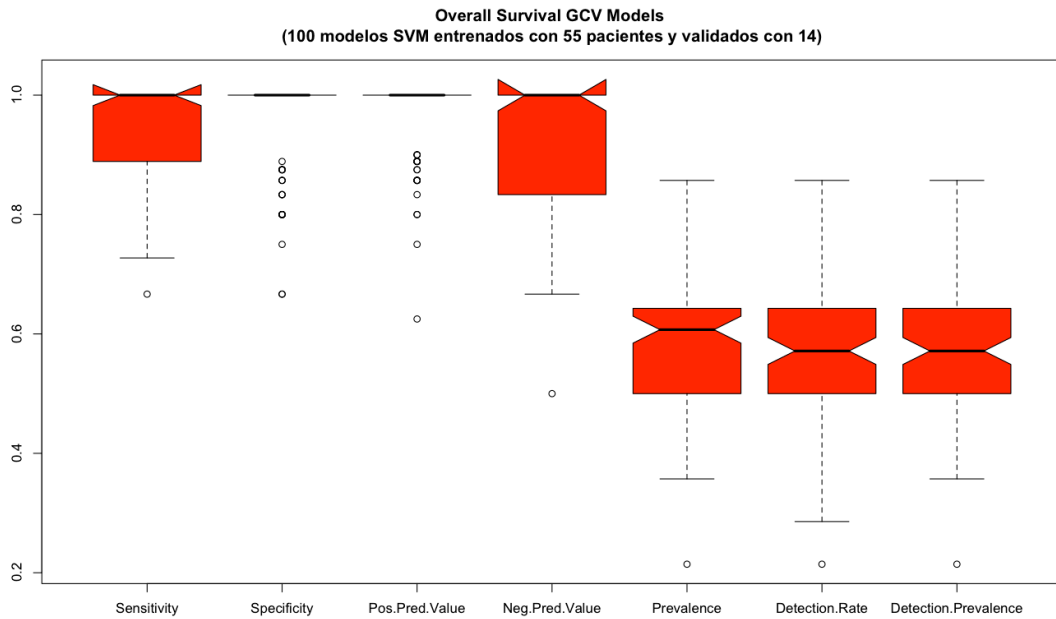


Figura 6.6. Variación de los valores de sensibilidad, especificidad, prevalencia, ratio de detección y prevalencia de detección para los 100 modelos entrenados en el proceso de validación cruzada (Penalización no cóncava, variable supervivencia).

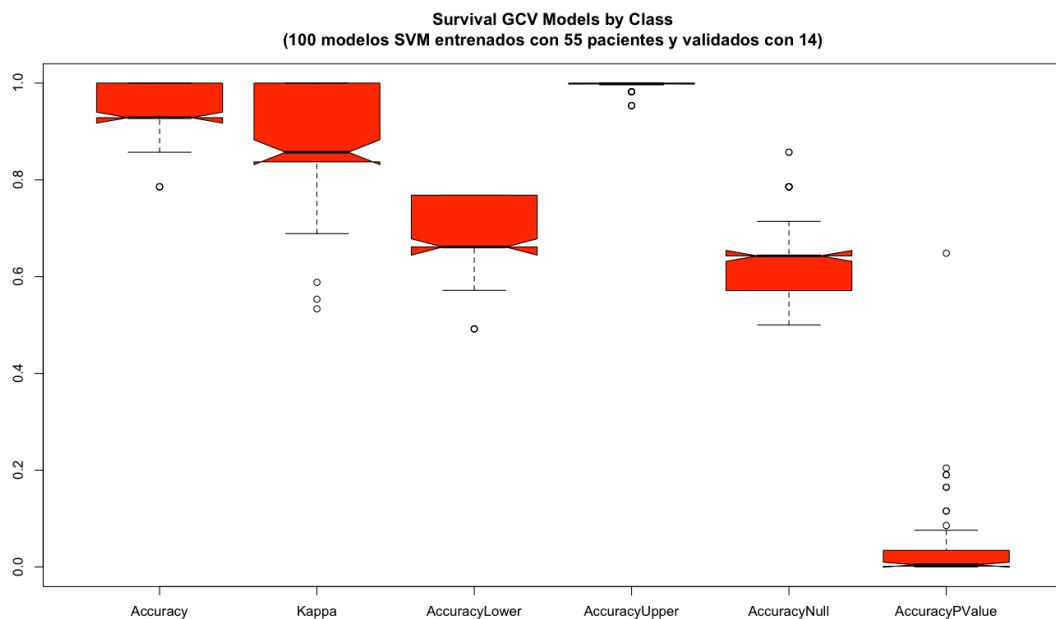


Figura 6.7. Variación de los valores de *accuracy*, *kappa*, *accuracylower*, *accuracyupper*, *accuracynull* y *accuracy p-value* y para los 100 modelos entrenados en el proceso de validación cruzada (Penalización no cóncava, variable supervivencia).

Tras la validación y con objeto de realizar una evaluación de la importancia del modelo con el mayor número de datos posible, se implementó un nuevo algoritmo con la

totalidad de los 69 pacientes disponibles aplicando la técnica de *bootstrapping*. En la Figura 6.8. se muestran 20 de las 32 variables estudiadas, quedando descartadas el resto por su escasa influencia y por considerarse contraproducente su adición a un futuro modelo predictivo. La Tabla 6.28. incluye los valores de salida del algoritmo en forma numérica.

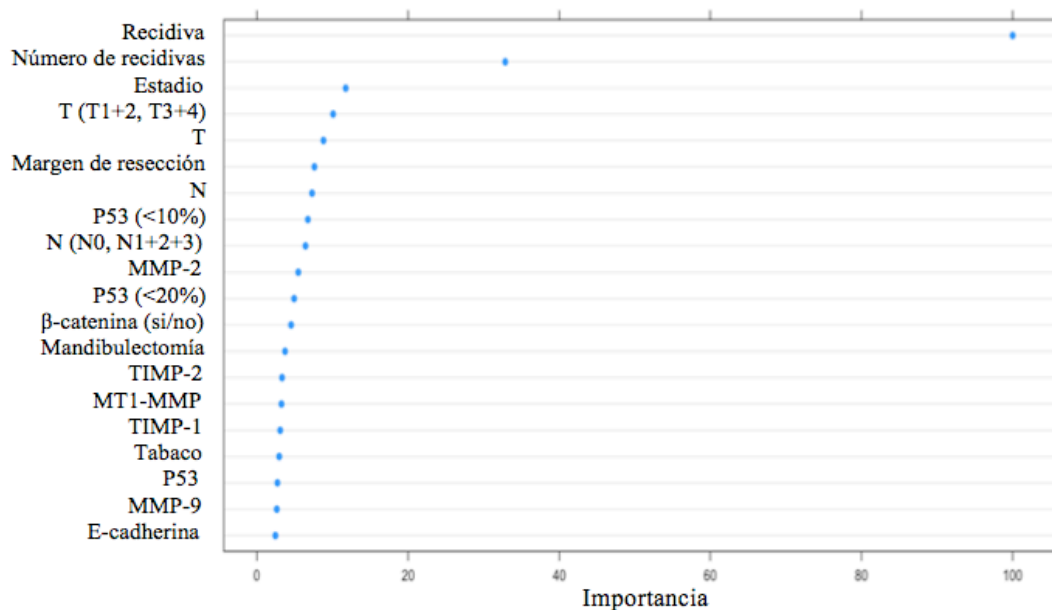


Figura 6.8. Resultado de la ordenación de las variables estudiadas según nivel de importancia (Penalización no cóncava, variable supervivencia).

Variable	Importancia
Recidiva	100
Número de recidivas	32,84746687
Estadio	11,74563198
T (T1+2, T3+4)	10,08178631
T	8,806027663
Margen de resección	7,610435128
N	7,30181752
p53 (<10%)	6,744249185
N (N0, N1+2+3)	6,432641818
MMP-2	5,475628886

VI. RESULTADOS

p53 (<20%)	4,92614163
β-catenina (si/no)	4,529851741
Mandibulectomía	3,728678838
TIMP-2	3,332546831
MT1-MMP	3,256998004
TIMP-1	3,087291623
Tabaco	2,956199035
p53	2,718850402
MMP-9	2,636022068
E-cadherina	2,450368087
β-catenina	2,436970663
Fak (si/no)	1,99756559
Grado de diferenciación histológica	1,941791104
Localización	1,614150979
MMP-7	1,601562163
Número de cigarrillos diarios	1,511107979
Sexo	1,411032248
Fak	1,136596865
Edad	0,350669618
Alcohol	0,184595313
Bcl-2	0

Tabla 6.28. Clasificación por importancia de las variables según SVM con penalización no cóncava (Variable supervivencia). Resultado medio de las 25 repeticiones.

b) Variable recidiva

En este caso el algoritmo tendrá 30 variables de entrada (todas menos las variables supervivencia y número de recidivas) y una variable de salida (recidiva). De nuevo en

primer lugar se valida la metodología empleada. Las Figuras 6.9. y 6.10. muestran en forma de *boxplot* los valores medios, máximos, mínimos y distancia entre percentiles 25% y 75% de los valores tomados por los parámetros: precisión (*Accuracy*), coeficiente Kappa (*kappa*), sensibilidad (*Sensitivity*), especificidad (*Specificity*), prevalencia (*Prevalence*), valores predictivos positivo y negativo (*Pos. Pred. Value* y *Neg. Pred. Value*) e incidencia (*Incidence*). En este caso los valores medios obtenidos en los 100 modelos entrenados resultan en sensibilidades y especificidades del orden del 80% así como precisiones del 70%, que si bien no son tan destacados como en el caso de sus homólogos para la variable supervivencia, permiten validar la consistencia del proceso de selección.

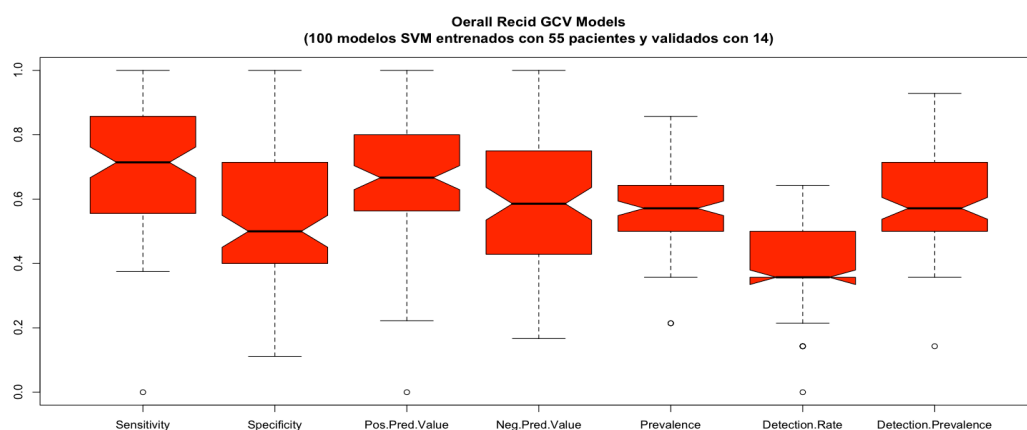


Figura 6.9. Variación de los valores de sensibilidad, especificidad, prevalencia, razón de detección y prevalencia de detección para los 100 modelos entrenados en el proceso de validación cruzada (Penalización no cóncava, variable recidiva).

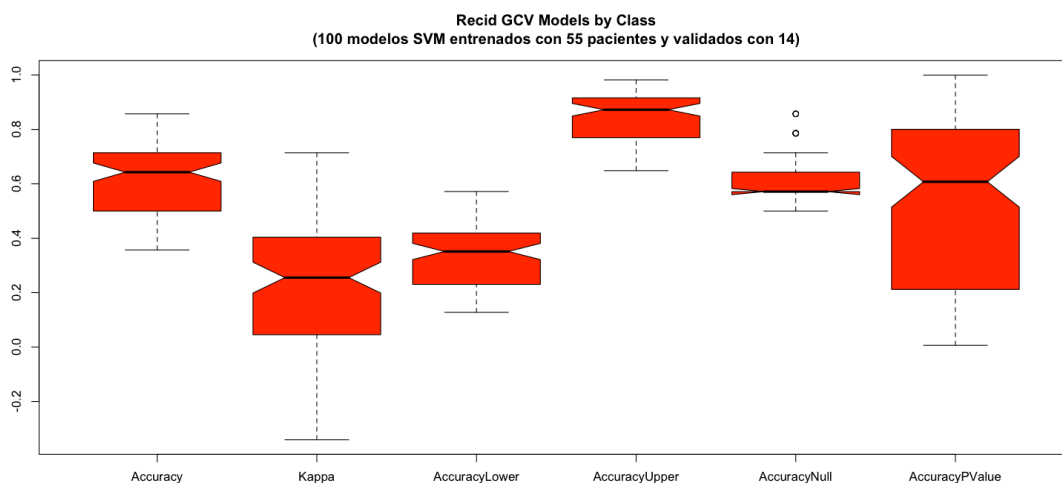


Figura 6.10. Variación de los valores de *Accuracy*, *Kappa*, *AccuracyLower*, *AccuracyUpper*, *AccuracyNull* y *Accuracy P-Value* y para los 100 modelos entrenados en el proceso de validación cruzada (Penalización no cóncava, variable recidiva).

VI. RESULTADOS

Tras la validación y con objeto de realizar una evaluación de la importancia con el mayor número de datos posible se implementó un nuevo algoritmo con la totalidad de los 69 pacientes disponibles aplicando la técnica de *bootstrapping*. En la Figura 6.11. se muestran 20 de las 32 variables estudiadas, quedando descartadas el resto por su escasa influencia y por considerarse contraproducente su adición a un futuro modelo predictivo. La Tabla 6.29. incluye los valores de salida del algoritmo en forma numérica.

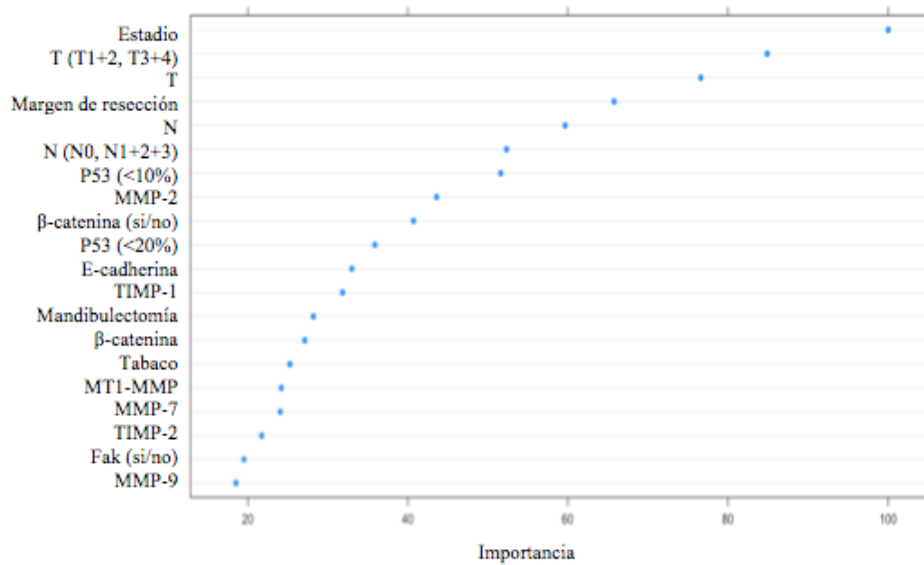


Figura 6.11. Resultado de la ordenación de las variables estudiadas según nivel de importancia (Penalización no cóncava, variable recidiva).

Variable	Importancia
Estadio	100
T (T1+2, T3+4)	84,89162812
T	76,61302695
Márgen de resección	65,77412714
N	59,66760856
N (N0, N1+2+3)	52,37155717
p53 (<10%)	51,64826715
MMP-2	43,58231606
β-catenina (si/no)	40,71356884
p53 (<20%)	35,90256761
E-cadherina	33,02474781
TIMP-1	31,8135228
Mandibulectomía	28,16704032
β-catenina	27,08967418
Tabaco	25,2461681
MT1-MMP	24,16707196
MMP-7	24,03528554
TIMP-2	21,7277377
Fak (si/no)	19,520587
MMP-9	18,50892932
p53	17,69670347
Número de cigarrillos diarios	12,13966319
Alcohol	9,425681235
Localización	8,821638046
Edad	8,485890641
Sexo	7,882737322

Grado de diferenciación histológica	7,241655978
Fak	7,025826898
Bcl2	0

Tabla 6.29. Clasificación por importancia de las variables según SVM con penalización no cóncava (Variable recidiva). Resultado medio de las 25 repeticiones.

6.8.2 SVM con el método de Newton

a) Variable supervivencia

Las Figuras 6.12. y 6.13. muestran en forma de *boxplot* los valores medios, máximos, mínimos y desviaciones estándar de los valores tomados por los parámetros: precisión (*Accuracy*), coeficiente Kappa (*kappa*), sensibilidad (*Sensitivity*), especificidad (*Specificity*), prevalencia (*Prevalence*), valores predictivos positivo y negativo (*Pos. Pred. Value* y *Neg. Pred. Value*) e incidencia (*Incidence*). En este caso los valores medios obtenidos en los 100 modelos entrenados son muy similares a los que se habían alcanzado con penalización no cóncava si bien se detecta cierta pérdida de especificidad en los modelos.

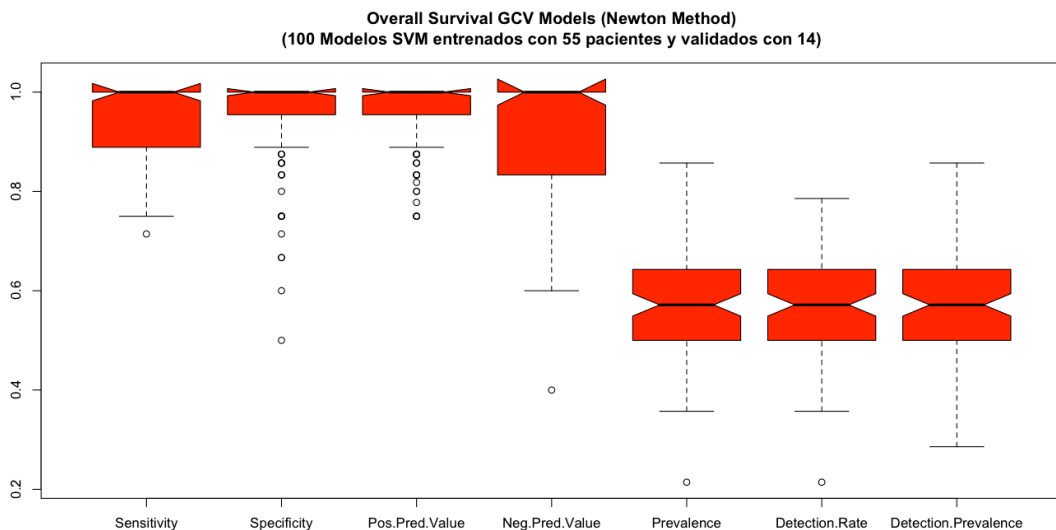


Figura 6.12. Variación de los valores de sensibilidad, especificidad, prevalencia, ratio de detección y prevalencia de detección para los 100 modelos entrenados en el proceso de validación cruzada. (Método de Newton, variable supervivencia).

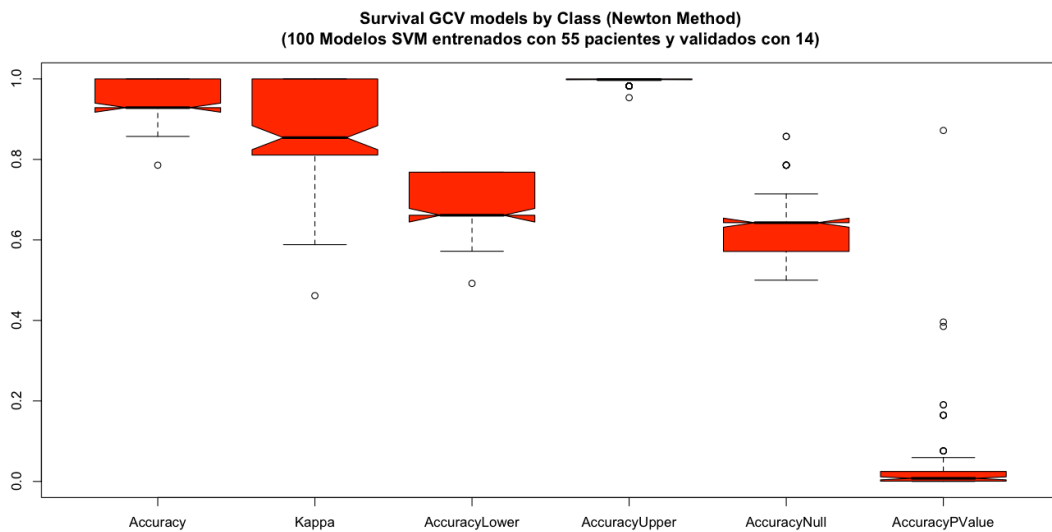


Figura 6.13. Variación de los valores de *Accuracy*, *Kappa*, *AccuracyLower*, *AccuracyUpper*, *AccuracyNull* y *Accuracy P-Value* y para los 100 modelos entrenados en el proceso de validación cruzada (Método de Newton, variable supervivencia).

Tras realizar el segundo entrenamiento con la totalidad de los datos disponibles y llevando a cabo *bootstrapping*, se obtuvieron los resultados que se presentan en la Figura 6.14. donde se muestra para cada variable, en el eje de ordenadas, el nivel de importancia o influencia que tendría su inclusión en un modelo predictivo de la supervivencia (eje de las abscisas). En la mencionada Figura sólo se muestran 20 de las 32 variables estudiadas, habiendo quedado descartadas el resto por el propio algoritmo debido a su escasa influencia y por considerarse nuevamente contraproducente su adición a un futuro modelo predictivo. La Tabla 6.30. incluye los valores de salida del algoritmo en forma numérica.

VI. RESULTADOS

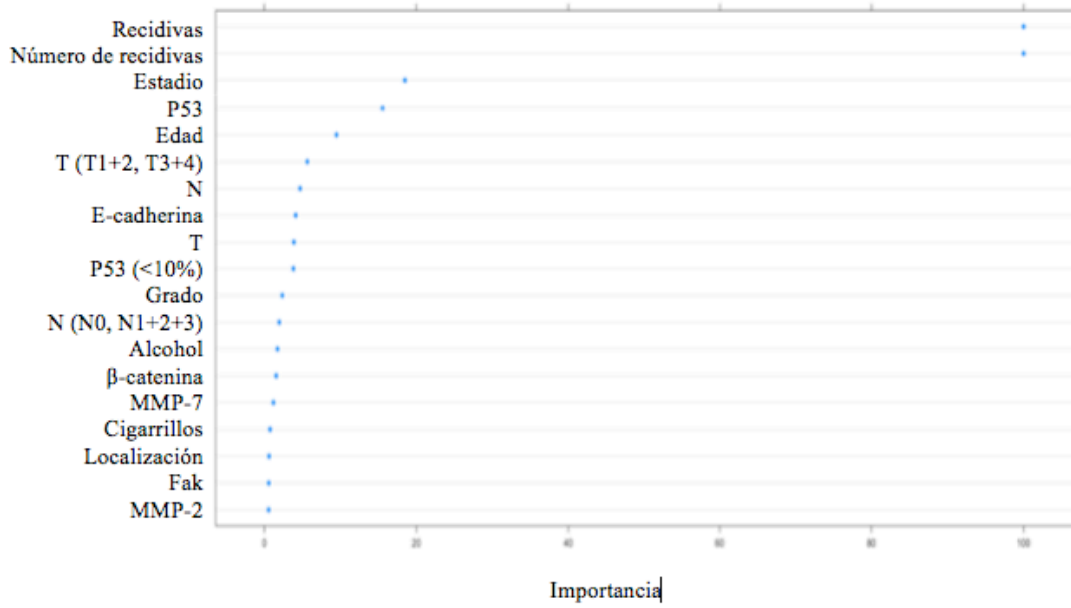


Figura 6.14. Resultado de la ordenación de las variables estudiadas según nivel de importancia (Método de Newton, variable supervivencia).

Variable	Importancia
Recidiva	100
Número de recidivas	100
Estadio	15,55556287
p53	10,28501193
Edad	9,675648929
T (T1+2, T3+4)	8,254204802
N	6,906538393
E-cadherina	5,056284382
T	3,905746349
p53 (<10%)	2,972341325
Grado de diferenciación histológica	2,415226678
N (N0, N1+2+3)	2,091127021
Alcohol	2,032143615

β-catenina	1,851630585
MMP-7	1,633754142
Número de cigarrillos diarios	1,610502867
Localización	1,290434815
Fak	1,233074993
MMP-2	1,007172467
Tabaco	0,949853453
Mandibulectomía	0,894120819
TIMP-2	0,753679637
β-catenina (si/no)	0
Fak (si/no)	0
Bcl-2	0
MT1-MMP	0
Margen de resección	0
MMP-9	0
p53 (<20%)	0
Sexo	0
TIMP-1	0

Tabla 6.30. Clasificación por importancia de las variables según SVM con el método de Newton (Variable supervivencia).

Los resultados del mejor modelo obtenido tras el proceso de *bootstrapping* son los que se muestran en la Tabla 6.31. RMSE representa el error cuadrático medio, Rsquared es el coeficiente de correlación generalizado, mientras que RMSESD y RSQUARED son los parámetros equivalentes pero referidos a la desviación estándar.

VI. RESULTADOS

RMSE	Rsquared	RMSESD
0,093613611	0,946756955	0,072694038

Tabla 6.31. Niveles de error obtenido por el mejor modelo SVM tras el proceso de *bootstrapping* combinados. (Newton Method, variable supervivencia).

b) Variable recidiva

Las Figuras 6.15. y 6.16. muestran en forma de *boxplot* los valores medios, máximos, mínimos y desviaciones estándar de los valores tomados por los siguientes parámetros entre otros: precisión (*Accuracy*), coeficiente Kappa (*kappa*), sensibilidad (*Sensitivity*), especificidad (*Specificity*), prevalencia (*Prevalence*), valores predictivos positivo y negativo (*Pos. Pred. Value* y *Neg. Pred. Value*) e incidencia (*Incidence*).

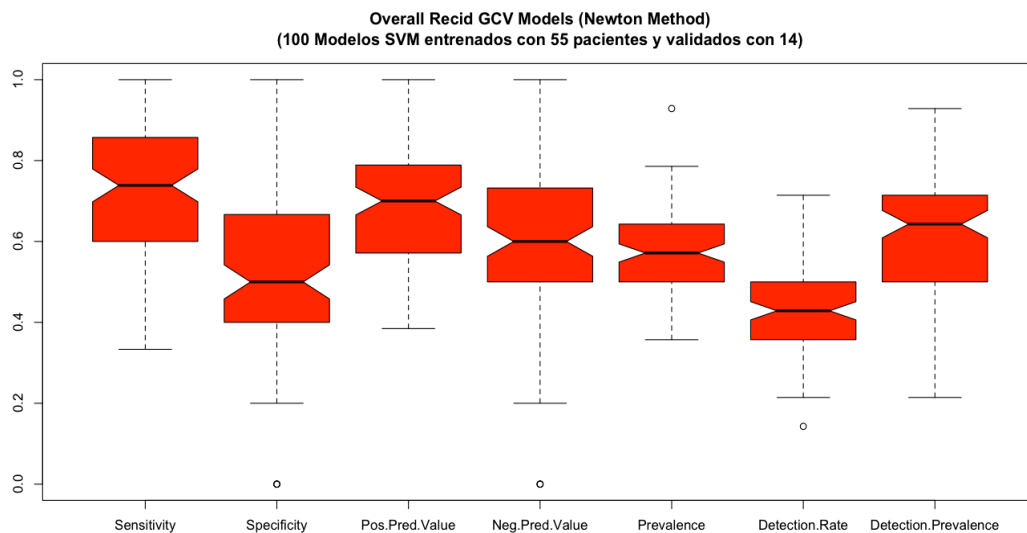


Figura 6.15. Variación de los valores de Sensibilidad, Especificidad, Prevalencia, Ratio de detección y Prevalencia de detección para los 100 modelos entrenados en el proceso de validación cruzada. (Método de Newton, variable recidiva).

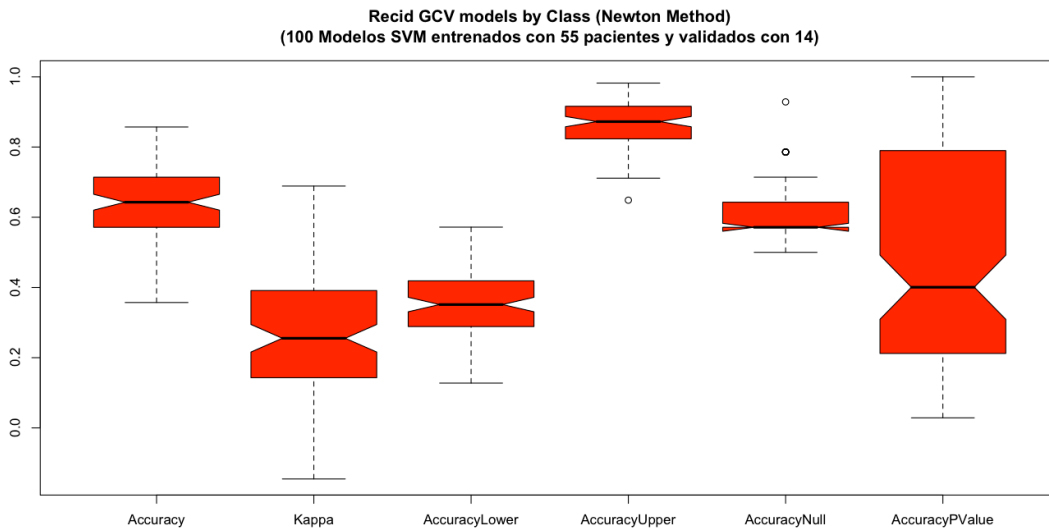


Figura 6.16. Variación de los valores de *Accuracy*, *Kappa*, *AccuracyLower*, *AccuracyUpper*, *AccuracyNull* y *Accuracy P-Value* y para los 100 modelos entrenados en el proceso de validación cruzada (Método de Newton, variable recidiva).

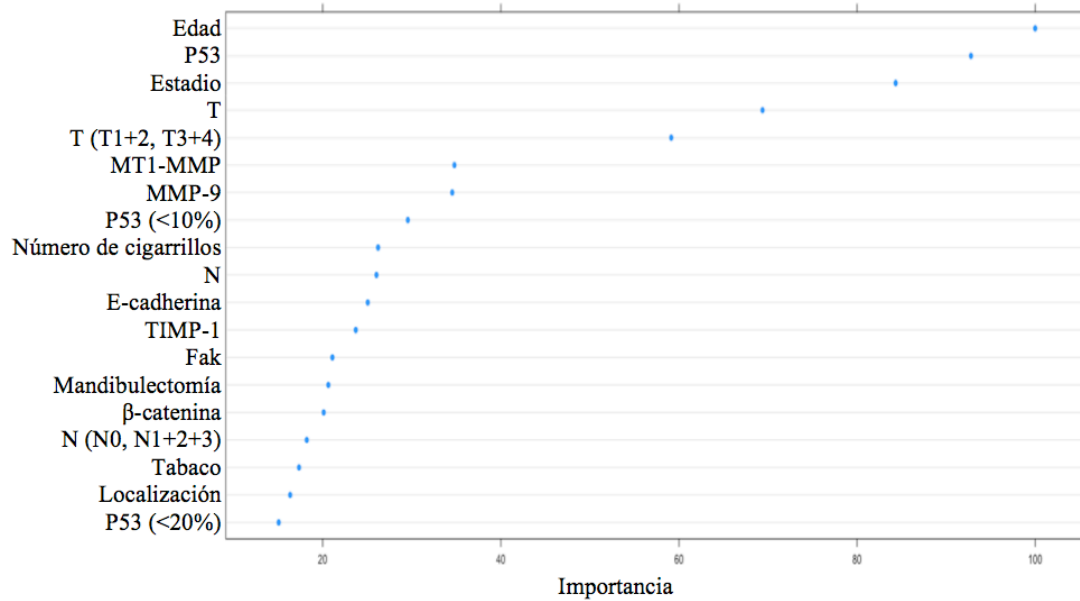


Figura 6.17. Resultado de la ordenación de las variables estudiadas según nivel de importancia (Método de Newton, variable recidiva).

VI. RESULTADOS

Variable	Importancia
Edad	100
p53	80,09038349
Estadio	75,59608957
T	72,97407257
T (T1+2, T3+4)	63,31284456
MT1-MMP	60,77229888
MMP-9	42,03291008
p53 (<10%)	35,8920723
Número de cigarrillos diarios	30,06942894
N	29,6758391
E-cadherina	27,12946682
TIMP-1	26,89985639
Fak	25,10508217
Mandibulectomía	24,85888795
β-catenina	22,79164308
N (N0, N1+2+3)	20,8133607
Tabaco	19,34222481
Localización	17,90681241
p53 (<20%)	17,58915781
Alcohol	15,79258889
MMP-2	11,35714389
TIMP-2	8,378081065
Sexo	7,448075231
Grado de diferenciación histológica	7,237448611
MMP-7	6,422496073
Margen de resección	3,254134254

β-catenina (si/no)	2,230207709
Bcl2	0
Fak (sí/no)	0

Tabla 6.32. Clasificación por importancia de las variables según SVM con el método de Newton (Variable recidiva).

Los resultados del mejor modelo obtenido tras el proceso de *bootstrapping* son los que se muestran en la Tabla 6.33.

RMSE	Rsquared	RMSESD
0,487218723	0,143295334	0,048761404

Tabla 6.33. Niveles de error obtenido por el mejor modelo SVM tras el proceso de *bootstrapping* combinados. (Newton Method, variable recidiva).

6.8.3 Comparación de resultados

Una vez evaluada la metodología por medio de validación cruzada, resulta de interés contrastar las variables detectadas como importantes por cada uno de los dos algoritmos de ponderación empleados (Tablas 6.34. y 6.35.) para las variables de salida analizadas (supervivencia y recidiva).

a) Variable supervivencia

Penalización No Cóncava		Método Newton	
Variable	Importancia	Variable	Importancia
Recidiva	100	Recidivas	100
Número de recidivas	32,84746687	Número de recidivas	100
Estadio	11,74563198	Estadio	15,55556287
T (T1+2, T3+4)	10,08178631	p53	10,28501193

VI. RESULTADOS

T	8,806027663	Edad	9,675648929
Margen de resección	7,610435128	T (T1+2, T3+4)	8,254204802
N	7,30181752	N	6,906538393
p53 (<10%)	6,744249185	E-cadherina	5,056284382
N (N0, N1+2+3)	6,432641818	T	3,905746349
MMP-2	5,475628886	p53 (<10%)	2,972341325
p53 (<20%)	4,92614163	Grado de diferenciación histológica	2,415226678
β-catenina (si/no)	4,529851741	N (N0, N1+2+3)	2,091127021
Mandibulectomía	3,728678838	Alcohol	2,032143615
TIMP-2	3,332546831	β-catenina	1,851630585
MT1-MMP	3,256998004	MMP-7	1,633754142
TIMP-1	3,087291623	Número de cigarrillos diarios	1,610502867
Tabaco	2,956199035	Localización	1,290434815
p53	2,718850402	Fak	1,233074993
MMP-9	2,636022068	MMP-2	1,007172467
E-cadherina	2,450368087	Tabaco	0,949853453
β-catenina	2,436970663	Mandibulectomía	0,894120819
Fak (si/no)	1,99756559	TIMP-2	0,753679637
Grado de diferenciación histológica	1,941791104	β-catenina (si/no)	0
Localización	1,614150979	Fak (si/no)	0
MMP-7	1,601562163	Bcl-2	0

Número de cigarrillos diarios	1,511107979	MT1-MMP	0
Sexo	1,411032248	Margen de resección	0
Fak	1,136596865	MMP-9	0
Edad	0,350669618	p53 (<20%)	0
Alcohol	0,184595313	Sexo	0
Bcl-2	0	TIMP-1	0

Tabla 6.34. Ordenación de variables según su nivel de importancia según algoritmo de ponderación (variable supervivencia).

b) Variable recidiva

Penalización No Cóncava		Método Newton	
Variable	Importancia	Variable	Importancia
Estadio	100	Edad	100
T (T1+2, T3+4)	84,89162812	p53	80,09038349
T	76,61302695	Estadio	75,59608957
Margen de resección	65,77412714	T	72,97407257
N	59,66760856	T (T1+2, T3+4)	63,31284456
N (N0, N1+2+3)	52,37155717	MT1-MMP	60,77229888
p53 (<10%)	51,64826715	MMP-9	42,03291008
MMP-2	43,58231606	p53 (<10%)	35,8920723
β-catenina (si/no)	40,71356884	Número de cigarrillos diarios	30,06942894
p53 (<20%)	35,90256761	N	29,6758391
E-cadherina	33,02474781	E-cadherina	27,12946682
TIMP-1	31,8135228	TIMP-1	26,89985639

VI. RESULTADOS

Mandibulectomía	28,16704032	Fak	25,10508217
β-catenina	27,08967418	Mandibulectomía	24,85888795
Tabaco	25,2461681	β-catenina	22,79164308
MT1-MMP	24,16707196	N (N0, N1+2+3)	20,8133607
MMP-7	24,03528554	Tabaco	19,34222481
TIMP-2	21,7277377	Localización	17,90681241
Fak (si/no)	19,520587	p53 (<20%)	17,58915781
MMP-9	18,50892932	Alcohol	15,79258889
p53	17,69670347	MMP-2	11,35714389
Número de cigarrillos diarios	12,13966319	TIMP-2	8,378081065
Alcohol	9,425681235	Sexo	7,448075231
Localización	8,821638046	Grado de diferenciación histológica	7,237448611
Edad	8,485890641	MMP-7	6,422496073
Sexo	7,882737322	Margen de resección	3,254134254
Grado de diferenciación histológica	7,241655978	β-catenina (si/no)	2,230207709
Fak	7,025826898	Fak (sí/no)	0
Bcl2	0	Bcl-2	0

Tabla 6.35. Ordenación de variables según su nivel de importancia según algoritmo de ponderación (variable recidiva).

6.9 Modelo clasificador SVM

Como hemos mencionado previamente, en este apartado se acomete la implementación de dos modelos predictores (uno para cada variable analizada: supervivencia y recidiva) utilizando el algoritmo SVM como clasificador según la implementación de Cortes y Vapnik (Cortes y Vapnik, 1995).

6.9.1 Variable supervivencia

a) Penalización no cóncava

Los resultados obtenidos son los que se muestran en la Tabla 6.36. para penalización no cóncava.

	Sensibilidad	Especificidad	Precisión
Recidiva	0,968214286	1	0,982142857
Número de recidivas	0,967659355	1	0,980357143
Estadio	0,972199488	1	0,982142857
T (T1+2, T3+4)	0,968781524	0,997571429	0,979285714
T	0,970571905	0,99797619	0,980952381
Margen de resección	0,970282773	0,998265306	0,980612245
N	0,972410125	0,996482143	0,982042857
p53 (<10%)	0,973509176	0,994650794	0,982036508
N (N0, N1+2+3)	0,972082862	0,998785714	0,982142857
MMP-2	0,96909048	0,998896104	0,980844156
p53 (<20%)	0,969577679	0,998988095	0,980952381
β-catenina (si/no)	0,967354366	0,998681319	0,979945055
Mandibulectomía	0,966161537	0,99877551	0,979336735
TIMP-2	0,966324842	0,998440476	0,979285714
TIMP-1	0,967908706	0,998147321	0,980133929
Tabaco	0,966050991	0,998256303	0,978991597
p53	0,966170974	0,998353175	0,978968254
MMP-9	0,964504516	0,99843985	0,977819549
E-cadherina	0,964412046	0,997431548	0,977142857
β-catenina	0,964215176	0,996816893	0,97670068
Fak (si/no)	0,964727943	0,995825216	0,976785714
Grado de diferenciación histológica	0,964637114	0,994536749	0,976086957
Localización	0,964749712	0,993896329	0,975892857
MMP-7	0,964775719	0,992261111	0,975
Número de cigarrillos diarios	0,96436525	0,99207036	0,974450549
Sexo	0,963817772	0,9920995	0,974206349
Fak	0,963413501	0,991382511	0,97372449
Edad	0,963735661	0,990386563	0,973399015
Alcohol	0,964058229	0,989132937	0,97297619
Bcl-2	0,963430646	0,987391833	0,971889401

Tabla 6.36. Resultados del proceso iterativo de adición de variables GCV basado en la ponderación no cóncava para la implementación del modelo clasificador supervivencia.

VI. RESULTADOS

Tras el análisis de la Tabla 6.36. se puede concluir que el mejor modelo posible es el formado por las variables: recidiva, número de recidivas y estadio. Tal como y se puede ver en dicha Tabla la adición del resto de variables disminuiría la sensibilidad y especificidad del modelo, por lo que no son incluidas en el modelo.

En la Tabla 6.37. se detalla el comportamiento del modelo seleccionado cuando se introducen como entradas los valores de las variables elegidas (recidiva, número de recidivas y estadio) para los 69 pacientes del estudio.

Matriz de confusión y estadísticas

Predicción	Referencia	
	0	1
0	41	0
1	0	28

Precisión	1
Intervalo de confianza al 95%	(0,9479; 1)
Tasa de no información	0,5942
p-valor [Precisión>Tasa de no información]	1,21E-14
Kappa	1
Sensibilidad	1
Especificidad	1
Valor predictivo positivo	1
Valor predictivo negativo	1
Prevalencia	0,5942
Tasa de detección	0,5942
Prevalencia de la detección	0,5942

Tabla 6.37. Comportamiento del modelo clasificador creado sobre la base de la penalización no cóncava con las 69 instancias disponibles (variable supervivencia).

b) Método de Newton

Los resultados obtenidos tras ejecutar el procedimiento descrito con el método de Newton son los que se muestran en la Tabla 6.38.

	Sensibilidad	Especificidad	Precisión
Recidiva	0,967850683	1	0,981513824
Número de recidivas	0,968770304	1	0,981525207

Estadio	0,971304688	1	0,982243008
p53	0,961804923	0,990594828	0,972309113
Edad	0,962398596	0,989802881	0,972779072
T (T1+2, T3+4)	0,967829308	0,995811841	0,97815878
N	0,964307332	0,99037935	0,974040064
E-cadherina	0,970253957	0,995395575	0,979681289
T	0,962783132	0,989485984	0,972843127
p53 (<10%)	0,961632321	0,991437945	0,973385997
Grado de diferenciación histológica	0,967131594	0,99654201	0,978506296
N (N0, N1+2+3)	0,957529309	0,988856262	0,970119998
Alcohol	0,965978107	0,99859208	0,979153305
β-catenina	0,965944118	0,998059752	0,97890499
MMP-7	0,959275959	0,989514574	0,971501182
Número de cigarrillos diarios	0,964779248	0,99698456	0,977719854
Localización	0,963969248	0,996151449	0,976766528
Fak	0,960842588	0,994777922	0,974157621
MMP-2	0,959881436	0,992900938	0,972612247
Tabaco	0,961345945	0,993947662	0,973831449
Mandibulectomía	0,957958341	0,989055614	0,970016112
TIMP-2	0,962776312	0,992675947	0,974226155
β-catenina (si/no)	0,956750654	0,985897271	0,967893799
Fak (si/no)	0,962311954	0,989797346	0,972536235
Bcl-2	0,955774758	0,983479868	0,965860057
MT1-MMP	0,955008048	0,983289776	0,965396625
Margen de resección	0,959031888	0,987000898	0,969342877
MMP-9	0,959236961	0,985887863	0,968900315
p53 (<20%)	0,954781032	0,97985574	0,963698993
Sexo	0,958510724	0,982471911	0,966969479

Tabla 6.38. Resultados del proceso iterativo de adición de variables y GCV basado en la ponderación de Newton para la implementación del modelo clasificador supervivencia.

Tras el análisis de la Tabla 6.38., se puede afirmar que el mejor modelo posible siguiendo el criterio de ponderación basado en el método de Newton es el formado por las variables: recidiva, número de recidivas y estadio. Tal como y se puede ver en dicha tabla, la adición del resto de variables disminuiría la sensibilidad y especificidad del modelo, por lo que no son incluidas en el mismo.

VI. RESULTADOS

En la Tabla 6.40. se detalla el comportamiento del modelo seleccionado cuando se introducen como entradas los valores de las variables elegidas (recidiva, número de recidivas y estadio) para los 69 pacientes del estudio.

Matriz de confusión y estadísticas

Predicción	Referencia	
	0	1
0	40	0
1	1	28

Precisión	0,9855
Intervalo de confianza al 95%	(0,9219; 9996)
Tasa de no información p-valor [Precisión>Tasa de no información]	0,5942
Kappa	1,21E-14
Sensibilidad	0,9701
Especificidad	0,9756
Valor predictivo positivo	1
Valor predictivo negativo	1
Prevalencia	0,9655
Tasa de detección	0,5942
Prevalencia de la detección	0,5797

Tabla 6.40. Comportamiento del modelo clasificador creado sobre la base del método de Newton con las 69 instancias disponibles (variable supervivencia).

6.9.2 Variable recidiva

a) Penalización no cóncava

Los resultados obtenidos son los que se muestran en la Tabla 6.41. para penalización no cóncava.

	Sensibilidad	Especificidad	Precisión
Estadio	0,787910053	0,641815777	0,719047619
T (T1+2, T3+4)	0,781843434	0,674095719	0,723809524
T	0,735396825	0,705111432	0,717460317
Margen de resección	0,702098365	0,731002886	0,702380952
N	0,732959115	0,751474266	0,72952381
N (N0, N1+2+3)	0,745757175	0,761166025	0,74047619
p53 (<10%)	0,7506868	0,749162716	0,73877551

MMP-2	0,751604437	0,73588444	0,735119048
β-catenina (si/no)	0,755241569	0,73519534	0,737566138
p53 (<20%)	0,761006734	0,720599086	0,733809524
E-cadherina	0,764419301	0,718045826	0,734199134
TIMP-1	0,763929774	0,710272166	0,731746032
Mandibulectomía	0,762930773	0,705086395	0,729304029
β-catenina	0,762857486	0,693424895	0,723809524
Tabaco	0,759495591	0,680942601	0,717460317
MT1-MMP	0,753568573	0,678626744	0,712202381
MMP-7	0,751148318	0,6732609	0,708403361
TIMP-2	0,751277858	0,666990674	0,705820106
Fak (si/no)	0,748713577	0,661280221	0,702756892
MMP-9	0,744660173	0,663130231	0,701428571
p53	0,744017843	0,658532949	0,697959184
Número de cigarrillos diarios	0,743396629	0,651245135	0,694155844
Alcohol	0,742335676	0,644479474	0,69047619
Localización	0,743333734	0,64675976	0,691468254
Edad	0,740796152	0,648305243	0,691047619
Sexo	0,741475561	0,646160414	0,69010989
Grado de diferenciación histológica	0,744232003	0,642319669	0,68994709
Fak	0,743753006	0,637731911	0,68792517
Bcl2	0,74478214	0,633275364	0,686535304

Tabla 6.41. Resultados del proceso iterativo de adición de variables y GCV basado en la ponderación no cóncava para la implementación del modelo clasificador de recidiva.

Para la modelización de la variable recidiva la combinación de variables de entrada que redundan en un modelo más eficiente es, tal y como se puede apreciar en la Tabla 6.39., estadio, T, Tt (T1+2, T3+4), estado de los márgenes de resección, N y N (N0, N1+2+3)

En la Tabla 6.42. se puede ver el comportamiento del modelo seleccionado cuando se introducen como entradas los valores de las variables seleccionadas para los 69 pacientes.

VI. RESULTADOS

Matriz de confusión y estadísticas

Predicción	Referencia	
	0	1
0	39	1
1	1	28

Precisión	0,971
Intervalo de confianza al 95%	(0,8992; 0,9965)
Tasa de no información	0,5797
p-valor [Precisión>Tasa de no información]	5,89E-14
Kappa	0,9405
Sensibilidad	0,975
Especificidad	0,9655
Valor predictivo positivo	0,975
Valor predictivo negativo	0,9655
Prevalencia	0,5797
Tasa de detección	0,5652
Prevalencia de la detección	0,5797

Tabla 6.42. Comportamiento del modelo clasificador creado sobre la base de la penalización no cóncava con las 69 instancias disponibles (variable recidiva).

b) Método de Newton

Los resultados obtenidos tras ejecutar el procedimiento sobre la variable recidiva sobre la base de la ordenación hecha con el método de Newton son los que se muestran en la Tabla 6.43.

	Sensibilidad	Especificidad	Precisión
Edad	0,57489418	0,425873016	0,519047619
p53	0,661399711	0,389880952	0,547619048
Estadio	0,669551868	0,402486772	0,56031746
T	0,67772126	0,409603175	0,567857143
T (T1+2, T3+4)	0,691338624	0,446645503	0,588571429
MT1-MMP	0,691357624	0,448218695	0,591269841
MMP-9	0,693144841	0,485429894	0,605952381
p53 (<10%)	0,698659612	0,503430335	0,615343915
Número de cigarrillos diarios	0,697410053	0,504634921	0,614285714
N	0,70015873	0,506652237	0,617316017

E-cadherina	0,702513582	0,518227513	0,622619048
TIMP-1	0,693997071	0,519867725	0,617948718
Fak	0,700472715	0,523715042	0,623129252
Mandibulectomía	0,694355903	0,524504409	0,618730159
β-catenina	0,695187706	0,529160053	0,620535714
N (N0, N1+2+3)	0,69627377	0,528238406	0,621008403
Tabaco	0,699461382	0,530646678	0,623015873
Localización	0,698512725	0,5370621	0,62406015
p53 (<20%)	0,696255439	0,536050265	0,622619048
Alcohol	0,695167689	0,537653061	0,622675737
MMP-2	0,694923174	0,543620731	0,624242424
TIMP-2	0,696011171	0,545005751	0,625879917
Sexo	0,700618309	0,542096561	0,626785714
Grado de diferenciación histológica	0,700297761	0,544926984	0,627428571
MMP-7	0,699555466	0,543603989	0,626556777
Margen de resección	0,701785334	0,544851068	0,628218695
β-catenina (sí/no)	0,702133515	0,544261149	0,628231293
Fak (sí/no)	0,704454913	0,543011312	0,628899836
Bcl-2	0,70642867	0,54707672	0,631269841

Tabla 6.43. Resultados del proceso iterativo de adición de variables y GCV basado en la ponderación de Newton para la implementación del modelo clasificador recidiva.

En este caso, contrariamente a lo que cabría esperar, tras conocer los resultados del modelo de recidiva basado en ponderación no cóncava, los mejores resultados se consiguen con la totalidad de las variables disponibles, si bien dichos resultados son considerablemente peores que en el caso anterior.

En la Tabla 6.44. se puede ver el comportamiento del modelo seleccionado cuando se introducen como entradas los valores de las variables escogidas para los 69 pacientes. En este caso, como también era de esperar, los resultados son superiores a los obtenidos en el caso del proceso de construcción, pues el 80% de los datos introducidos fueron empleados en el entrenamiento del modelo.

VI. RESULTADOS

Matriz de confusión y estadísticas

Predicción	Referencia	
	0	1
0	33	9
1	7	20

Precisión	0,7681
Intervalo de confianza al 95%	(0,6509; 0,8613)
Tasa de no información	0,5797
p-valor [Precisión>Tasa de no información]	8,38E-04
Kappa	0,5196
Sensibilidad	0,825
Especificidad	0,6897
Valor predictivo positivo	0,7857
Valor predictivo negativo	0,7407
Prevalencia	0,5797
Tasa de detección	0,4783
Prevalencia de la detección	0,6087

Tabla 6.44. Comportamiento del modelo clasificador creado sobre la base del método de Newton con los 69 pacientes del estudio (variable recidiva).

VII. DISCUSIÓN

7.1 E-cadherina y cáncer oral

Como hemos mencionado previamente, E-cadherina es una molécula de adhesión que se expresa en casi todos los epitelios embrionarios y adultos. Desarrolla una papel esencial en la formación y mantenimiento de la arquitectura epitelial y resulta fundamental para mantener la cohesión y la polaridad celular. La pérdida de su expresión constituye el primer paso en la invasividad tumoral y el desarrollo de metástasis, considerándose que el gen de E-cadherina actuaría como un supresor de dicha invasividad (Vleminckx, 1991). Además, esta pérdida de expresión influye en varias vías de señalización celular. En este sentido, Onder y cols han demostrado recientemente que para que se induzca el fenómeno de metástasis es necesario la pérdida de la expresión de la molécula y no sólo de la capacidad de adhesión (Onder, 2008).

Los mecanismos por los que la expresión de E-cadherina puede resultar inhibida incluyen la pérdida de heterocigosidad y mutaciones inactivadoras del gen; el silenciamiento epigenético en el lugar del cáncer, la represión transcripcional y sustitución de cadherinas y los fenómenos de endocitosis y procesamiento proteolítico. Las mutaciones en el gen CDH1 son características del carcinoma gástrico y del carcinoma lobulillar de mama, pero son infrecuentes en otros tumores como los de la cavidad oral (Berx, 1998). Sin embargo, el silenciamiento epigenético ha sido ampliamente demostrado en varios tumores. Consiste en la hipermetilación de islas CpG del promotor del gen que producen el silenciamiento del mismo, aunque éste esté libre de mutaciones. Han sido varios los estudios que han puesto de manifiesto este fenómeno en el cáncer oral (Saito, 1998; Nakayama, 2001; Tian, 2002; Yeh, 2002; Viswanathan, 2003; Kudo, 2004; Maeda, 2007; de Moraes, 2008; Supic, 2009).

Otro mecanismo implicado en la reducción de la expresión E-cadherina es la represión transcripcional por factores de transcripción. En el cáncer de células escamosas de la cavidad oral, algunos estudios han puesto de manifiesto una relación inversa entre la expresión de la proteína Snail y la expresión de E-cadherina (Yokohama, 2001; Takkunen, 2006; Schwock, 2010). En el mismo sentido, aunque el fenómeno de sustitución de cadherinas todavía no ha sido bien caracterizado en el cáncer oral, algunos estudios han correlacionado inversamente la expresión de E-cadherina y N-cadherina en estos tumores (Pyo, 2006). Tampoco ha podido relacionarse con un peor pronóstico o invasividad.

En el presente estudio, hemos valorado por medio de inmunohistoquímica, la expresión y la distribución de E-cadherina en carcinomas orales de células escamosas. La inmunohistoquímica fue el método elegido porque permite una visualización directa de la molécula y su intensidad, así como la relación entre ésta y los parámetros clínicos. Además, ésta es una técnica que se puede realizar en especímenes embebidos en parafina, lo que permite incluir en el estudio a pacientes con largos periodos de seguimiento. E-cadherina tiñe la membrana celular del epitelio normal con intensidad alta, que va disminuyendo al ascender en las capas epiteliales. En las células tumorales se manifiesta una tinción disminuida o ausente a nivel de los nidos de queratina de los carcinomas bien diferenciados. El examen de los 69 casos mostró una tinción intensa de las células tumorales en el 53,7% de los casos frente al resto en los que la expresión estaba reducida. Estos hallazgos sugieren que el cáncer oral de células escamosas muestra heterogeneidad en su potencial para expresar dicha molécula. Resulta interesante destacar la hipótesis de que la metilación de E-cadherina puede ser reversible. Esto podría explicar la reducción heterogénea de la expresión de E-cadherina dentro de un cáncer metastásico y el que la metilación se observe con mayor frecuencia en las células metastásicas con una expresión reducida de E-cadherina (Kudo, 2004). Así mismo, las células cancerosas del tumor primario podrían presentar una hipermetilación del promotor y sufrir una desmetilación al metastatizar. Esto explicaría el aumento de expresión de E-cadherina en las metástasis ganglionares observado en algunos estudios (Hung, 2006). Por otro lado, se ha correlacionado la hipermetilación del promotor como causa de reducción en la expresión de E-cadherina con un peor pronóstico y mayor frecuencia de metástasis ganglionares (de Moraes, 2008; Supic, 2009).

Además, hemos encontrado una relación estadísticamente significativa entre la inmunoexpresión de E-cadherina y el grado de diferenciación tumoral. Estos hallazgos coinciden con los de estudios previos en los que los tumores con menor diferenciación expresaron en menor medida dicha molécula (Williams, 1988; Mattijssen, 1993; Sakaki, 1994; Yamada, 1997; Saito, 1998; Sasaki, 1999). En este sentido es necesario incidir sobre la ausencia de tumores totalmente indiferenciados en nuestra muestra, a pesar de lo cual se aprecia esta asociación. Sin embargo, no hemos encontrado asociación con la supervivencia a largo plazo ni con la presencia de metástasis ganglionares, a diferencia de

otros estudios (Mattijssen, 1993; Takes, 2002; Bankfalvi, 2002; Tian, 2002; Tanaka, 2003; Lim, 2004; Kurtz, 2006; Diniz-Feitas, 2006; Foschini, 2008; Wang, 2009; Liu, 2010).

El tabaco y el alcohol etílico están clásicamente implicados en la génesis del carcinoma oral de células escamosas. A pesar de que los estudios epidemiológicos muestran una estrecha relación entre el consumo de etanol y el cáncer oral, el etanol nunca ha demostrado claramente su capacidad carcinogénica *per se*, persistiendo la base biológica de su influencia sin aclarar en el momento actual (Das, 2002; Figuero-Ruiz, 2004). Como una consecuencia de todo ello, el etanol podría ser visto como un facilitador del proceso carcinogénico. Hasta donde hemos podido comprobar, el presente estudio contiene la primera descripción de la asociación entre la reducción de la expresión de E-cadherina y la ingesta de alcohol. Nuestra hipótesis es que el etanol podría incrementar la agresividad del carcinoma conduciendo a la reducción de la expresión de moléculas de adhesión, como E-cadherina y de esta forma incrementar el potencial invasivo del tumor.

7.2 β -catenina y cáncer oral

Como hemos dicho previamente, β -catenina es una proteína necesaria para el establecimiento de las uniones adherentes, uniendo E-cadherina con el citoesqueleto de actina. La pérdida de E-cadherina aumenta la presencia de β -catenina soluble en el citosol, si bien sólo se produce la activación de la vía Wnt/ β -catenina cuando se altera su degradación. Este proceso tiene lugar a nivel del denominado complejo de degradación, que está formado entre otras por las proteínas Axina y Apc (Hart et al., 1999). Cuando se acumula a nivel del citosol, β -catenina es trasladada al núcleo celular, donde se une al factor Tcf y produce la activación de genes que aumentan la proliferación y malignidad (c-myc, c-jun, fra-1, matrilisina, COX-2, fibronectina, ciclina D1). Podríamos resumir las alteraciones de la vía Wnt/ β -catenina en el cáncer en: exceso de expresión de proteínas Wnts o represión de sus inhibidores, mutación de Axin, mutación de Apc y mutaciones activadoras del gen β -catenina/CTNNB1. Todas ellas tienen como resultado común la elevación en la actividad transcripcional del producto β -catenina/Tcf.

La vía Wnt/ β -catenina se altera por mutación de los genes codificadores de Apc, β -catenina o Axina en un porcentaje variable de numerosos procesos tumorales. Sin embargo, otros cánceres tienen activada la vía por otros mecanismos. En el cáncer oral de células escamosas, si bien no se han hallado mutaciones relevantes de dichos genes (Kok et al., 2002; Tsuchiya et al., 2004; Iwai et al., 2005), la pérdida de heterocigosidad del gen APC parece un evento de aparición frecuente (Largey et al., 1994; Mao et al., 1996; Huang et al., 1997; Mao et al., 1998; Chang et al., 2000; Tandle et al., 2000; Kannan et al., 2002) que se ha asociado a un pronóstico pobre y al hábito tabáquico intenso (Mao et al., 1998). Más recientemente Sogabe ha relacionado la metilación del gen SFRP (cuyo producto es un inhibidor de las proteínas Wnt) con la activación de la vía Wnt/ β -catenina en estos pacientes (Sogabe, 2008).

En el presente trabajo, hemos estudiado por medio de la inmunohistoquímica, la expresión y la distribución de β -catenina en carcinomas orales de células escamosas. Como hemos mencionado, β -catenina suele teñir la membrana celular, pero en algunas ocasiones se traslada al citoplasma o incluso al núcleo, produciendo la tinción a estos niveles. En nuestro estudio, el epitelio normal mostró una tinción fuerte de β -catenina en la membrana, más marcada en la capa de células espinosas, pero no se observó tinción de citoplasma o

nuclear. A nivel del tumor, β -catenina se expresó de manera reducida en 50 tumores (72.5%). Además se observó tinción citoplasmática en un caso (1,4%), mientras que en ningún caso se observó tinción nuclear. A diferencia de otros tumores, la tinción nuclear de β -catenina es un fenómeno infrecuente en los carcinomas orales de células escamosas y, cuando ocurre, suele ser en tumores indiferenciados (Gasparoni et al., 2002). La ausencia de tumores totalmente indiferenciados en nuestra muestra podría justificar que no se expresara dicha tinción en ningún caso. Otros autores han observado frecuencias de expresión reducida muy similares a las halladas en nuestro estudio, siendo éstas del 83%, 71,10%, 58%, 71% y 37,7% (Chow et al., 2001; Tanaka et al., 2003; Ueda et al., 2006; Cai et al., 2008; Liu et al., 2009), respectivamente. Las diferencias existentes pueden deberse tanto a los anticuerpos empleados como a deficiencias en los métodos semicuantitativos de valoración de las muestras. Finalmente, a nivel de los nidos de queratina de los tumores bien diferenciados, la expresión resultó ser negativa, en contraste con las zonas invasivas.

La pérdida de E-cadherina aumenta la presencia de β -catenina soluble en el citoplasma celular, condicionando una pérdida de expresión de la misma. No es de extrañar por tanto que la expresión reducida de E-cadherina se halla relacionado en este estudio de manera significativa con la de β -catenina, si bien no hemos encontrado una mayor tinción a nivel del citoplasma en estos casos.

Como hemos mencionado previamente, el factor pronóstico más importante en el cáncer oral de células escamosas es la presencia de metástasis ganglionares. En el presente estudio hemos observado que la inmunexpresión de β -catenina está reducida en los pacientes con metástasis ganglionares, asociándose a ésta de manera significativa. Han sido varios los trabajos que han observado esta asociación (Bánkfalvi et al., 2002; Tanaka et al., 2003; Fillies et al., 2005; Ueda et al., 2006; Wang et al., 2007; Cai et al., 2008). También hemos observado una correlación entre el estadio TNM y la reducción en la tinción de la molécula, si bien no hemos encontrado relación con la supervivencia ni con la recidiva. Este hallazgo también coincide con otros estudios publicados al respecto, de hecho solamente Liu ha observado una relación significativa con la supervivencia en un estudio realizado en 82 pacientes (Liu et al., 2009).

7.3 Fak y cáncer oral

El papel de Fak en el desarrollo del cáncer ha sido relacionado con varios mecanismos de acción (McLean et al., 2005). En primer lugar, parece que Fak es un importante regulador de la migración celular y de la angiogénesis (ambos procesos son necesarios para la invasión y desarrollo de metástasis de las células cancerosas), ya que controla la regulación dinámica de las uniones focales, de las uniones intercelulares dependientes de cadherinas y de las uniones a las estructuras periféricas de actina. En segundo lugar, Fak puede causar la remodelación del citoesqueleto de actina a través de las vías Rho-GTPasa (Mitra et al., 2005). En tercer lugar, se ha implicado en la expresión de ciertas metaloproteasas implicadas en la invasión de tipo mesenquimal. En cuarto lugar, Fak es un mediador en la muerte celular programada al perder el contacto con la matriz extracelular (fenómeno conocido como "anoikis"), capacidad que a menudo se pierde en las células tumorales. Finalmente, diversos estudios han puesto de manifiesto que Fak tiene un papel directo en el crecimiento del tumor, a través de la vía ERK-MAPK.

Hasta la fecha se han llevado a cabo pocos estudios para determinar la expresión de Fak en los tumores de células escamosas orales y su relación con los parámetros clínicos y anatomopatológicos. En el presente trabajo hemos estudiado, por medio de la inmunohistoquímica, la expresión y la distribución de Fak en carcinomas orales de células escamosas. En nuestro estudio, Fak se expresó en el epitelio oral normal a nivel de las capas basal y media con una intensidad débil y con un patrón de expresión citoplasmático. A nivel del tumor, hemos observado diferencias en la tinción entre las zonas invasivas y las zonas centrales. La sobreexpresión de Fak, entendida como tinción moderada o intensa apareció en el 56,5% de los casos, frente a un 43,5% que presentaron tinción débil o ausente. Otros autores han encontrado frecuencias de sobreexpresión del 18% (Schneider, 2002) y del 69% (Jiang et al., 2010). Estas diferencias podrían explicarse por los anticuerpos y el procesamiento tisular empleados, así como por las diferencias biológicas y epidemiológicas entre países y poblaciones.

La invasión y desarrollo de metástasis constituyen un proceso multiescalonado, que engloba la separación de las células tumorales del tumor primario, la intravasación en la

circulación linfática y/o sanguínea, la propagación a través de la circulación, la extravasación hacia lugares secundarios y el crecimiento de nuevos tumores (Gupta y Masagué, 2006). La presencia de metástasis en los ganglios linfáticos cervicales es el factor pronóstico más importante en los pacientes con cáncer oral de células escamosas. Por lo tanto, resulta de gran interés identificar marcadores moleculares, que permitan la selección de los pacientes con metástasis ganglionares en el momento del diagnóstico. Varios estudios han demostrado una correlación estadísticamente significativa entre la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos y la sobreexpresión de Fak en tumores de laringe (Canel, 2006; Rodrigo et al., 2006), esófago (Miyazaki et al., 2003), mama (Cance et al., 2000; Watermann et al., 2005), colon (Cance et al., 2000; Theocharis et al., 2002) y páncreas (Furuyama et al., 2006). En el caso de la cavidad oral, Schneider y Jiang también han sugerido el posible papel de Fak como marcador precoz de metástasis ganglionares (Schneider et al., 2002; Jiang et al., 2010). En consonancia con ellos, en el presente estudio hemos observado que la inmunoexpresión de Fak es más elevada en los pacientes con metástasis ganglionares, asociándose a ésta de manera significativa. Por otra parte, el estudio de muestras pareadas de tumores primarios y sus metástasis ganglionares ha revelado que esta sobreexpresión constituiría un fenómeno temprano en el desarrollo del cáncer (Ropman et al., 2006, Rodrigo et al., 2008).

En el presente estudio hemos encontrado una asociación significativa entre los tumores de gran tamaño (T3 + T4) y el aumento de la expresión de Fak. Este hecho es compatible con la resistencia progresiva a la anoikis que las células necesitan adquirir para sobrevivir después de la separación de la matriz extracelular y su papel directo en el crecimiento tumoral. Fak parece jugar un papel clave en la resistencia a la anoikis en la progresión de varios tipos de cáncer, incluido el cáncer oral. Zhang et al. examinaron la expresión de Fak por *Western-Blot* en dos cultivos de células de cáncer oral en uno de los cuales se había inducido anoikis por separación de la matriz extracelular (Zhang et al., 2004). Llegaron a la conclusión de que Fak resultaba fundamental para desarrollar resistencia a la anoikis. Más recientemente, otros autores (Jiang et al., 2010) han encontrado que el silenciamiento de Fak *in vitro* aumenta significativamente la fracción de células que sufren la anoikis (si bien no se encontraron diferencias significativas en cultivos en monocapa individual). Todos estos datos son consistentes con los hallazgos clínicos de éste y otros estudios que muestran un incremento en la expresión de Fak en

tumores de gran tamaño (Jiang et al., 2010) y en los carcinomas invasivos (90%) en comparación con los carcinomas in situ (70%) (Schneider et al., 2002).

La invasividad del carcinoma oral de células escamosas también se ha asociado con una elevada fosforilación de Fak y, por lo tanto activación, en algunos estudios. Schneider realizó un análisis mediante *Western-Blot* en dos líneas celulares de cáncer oral con capacidad invasora baja y alta, encontrando un aumento en la expresión de Fak de las últimas (Schneider et al., 2002). Otros autores han sugerido que el silenciamiento del gen codificador de Fak disminuye significativamente el potencial de migración e invasión de las células tumorales *in vitro*. Clínicamente, todos estos datos son consistentes con un mal pronóstico y una pobre supervivencia de los pacientes. En nuestro estudio hemos encontrado una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de Fak y la presencia de recurrencias tumorales y peores tiempos de supervivencia. De hecho, ninguno de los pacientes vivos había expresado Fak (el seguimiento medio fue de 104 meses), mientras que la mediana de supervivencia de los pacientes que expresaron Fak fue de 50 meses (desviación estándar 35,39). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que Fak desempeña un papel positivo en la recurrencia del tumor y la supervivencia del paciente. En otros tumores de células escamosas de laringe (Rodrigo et al., 2007) y esófago (Miyazaki et al., 2003) también se ha objetivado una relación significativa con el pronóstico. Sin embargo, hasta el momento éste es el primer trabajo en el que se analiza la supervivencia de los pacientes con cáncer oral en relación a Fak.

7.4 Modelo de predicción mediante SVM

El presente trabajo se centra, por un lado, en la búsqueda de patrones de comportamiento relevantes para la probabilidad de supervivencia y la presencia de recidiva en aquellos pacientes que padecen un cáncer oral, y por otro, introduce un modelo inteligente capaz de predecir el comportamiento de las variables supervivencia y recidiva en función del resto de variables de la muestra identificadas como relevantes. Para lograr los objetivos propuestos, hemos empleado métodos de clasificación basados tanto en técnicas estadísticas (análisis discriminante) como en inteligencia artificial (SVM), así como métodos inteligentes de ponderación de variables y de modelación de las mismas (SVM).

En la actualidad y debido fundamentalmente a la popularización de la informática, el uso de las bases de datos se ha extendido en todos los ámbitos de la ciencia y de la técnica. En el caso de las aplicaciones biomédicas, el gran tamaño de las bases de datos puede causar serios problemas a los algoritmos, fundamentalmente en lo relativo a la escalabilidad y su rendimiento. En la teoría clásica del aprendizaje automático, se denomina error de Bayes al menor error que cualquier clasificador puede cometer al clasificar. En teoría, el error de Bayes (o error óptimo) decrece conforme la dimensionalidad de los datos se incrementa (Chick, 2006). En la práctica, sin embargo, se usa un número fijo de objetos para construir el clasificador. De esta forma, los estimadores de las densidades de probabilidad, las cuales determinan las fronteras de decisión entre clases, están sesgados por la muestra disponible (Fukunaga, 1990).

Hughes mostró que la precisión conseguida por un clasificador construido a partir de un número finito de objetos aumenta con la dimensionalidad hasta un cierto punto, a partir del cual la precisión decrece conforme se incorporan nuevas variables (Hughes, 1968). Esto se conoce como el fenómeno de Hughes. Según Fukunaga y Hayes (Fukunaga y Hayes, 1989), cuando el tamaño de la muestra de entrenamiento es relativamente pequeño comparado con la dimensionalidad de los datos, los estimadores por máxima verosimilitud obtenidos son inestables y sesgados, produciendo errores de clasificación más altos. Este fenómeno puede interpretarse de la siguiente manera: existe un valor óptimo de dimensionalidad que es función del tamaño del conjunto de entrenamiento. Si no se manifiesta este fenómeno, el clasificador construido a partir de un número fijo de

muestras se comportará relativamente bien, ya que se aproximará al clasificador de Bayes. Sin embargo, si el número de observaciones en la muestra de entrenamiento es insuficiente y la dimensionalidad de los datos es alta, el fenómeno de Hughes se manifiesta. Este fenómeno es más grave cuanto mayor sea la dimensionalidad de los datos.

La selección de variables es una técnica usada frecuentemente en el procesamiento de los datos en problemas de alta dimensionalidad como el que nos ocupa. Tradicionalmente, la selección de variables se ha enfocado en eliminar las variables irrelevantes. Sin embargo, en problemas de alta dimensionalidad, eliminar las variables redundantes, resulta ser igualmente importante (Yu y Liu, 2003). En la actualidad se dispone de una gran cantidad de métodos de selección de variables que han demostrado ser efectivos para eliminar las variables irrelevantes y redundantes, incrementando así la eficiencia de los algoritmos, mejorando el rendimiento en términos de precisión y haciendo posible que los resultados sean más fáciles de interpretar (Dash y Liu, 1997; Kohavi y John, 1997). Entre ellos destacan los árboles de clasificación, la regresión logística y las redes neuronales. Algunas de las ventajas que aportan las SVM frente a éstos incluyen su simplicidad a la hora de la interpretación geométrica y su precisión en la clasificación de las variables, permitiendo una reducción eficaz de las mismas (Lee et al., 2010). Así el modelo que presentamos en el presente trabajo permite comparar de una manera gráfica y numérica la importancia de las distintas variables de salida en la supervivencia y la recidiva de los pacientes afectos de carcinoma oral de células escamosas.

Las aplicaciones de las SVM son innumerables en campos tan diversos como la informática, electrónica, ingeniería o la biomedicina. En el estudio de los carcinomas orales, aunque las posibilidades que ofrece son muy variadas, hasta la fecha sólo hay un estudio al respecto (Zhong et al., 2008) en el que se validó el uso de la misma para el diagnóstico del cáncer oral a partir de marcadores serológicos.

7.4.1 Análisis discriminante de la muestra

En este apartado hemos llevado a cabo cinco modelos cuyo objetivo era obtener una función capaz de clasificar a un nuevo individuo a partir de ciertas variables discriminadoras.

Para la variable supervivencia, el primer modelo realizado en base a todas las variables disponibles presentaba altas tasas de clasificación global y para cada categoría. Sin embargo, este modelo incluía variables redundantes, por lo que se optó por realizar un modelo (modelo cuatro) que excluyera a éstas. Así mismo, también se excluyó a la variable radioterapia, pues ésta no era una variable clínica, patológica o molecular expresada en los tumores en el momento del diagnóstico o tratamiento inicial. Este modelo presentaba tasas de clasificación inferiores. Por otro lado, los modelos dos y tres se construyeron en base a los marcadores moleculares estudiados en el presente trabajo (E-cadherina, β -catenina y Fak en sus variantes normal y dicotómica). La tasa de clasificación resultó ser mejor en el tercero, aunque baja. Finalmente, el último modelo realizado (modelo cinco) se construyó en base a las variables con mayor importancia encontradas en las SVM, excluyendo aquellas que se consideraban redundantes. Es decir se utilizaron las variables estadio y número de recidivas. Éste obtuvo una tasa de clasificación global del 98,55%. Se hace necesario destacar cómo la realización de éste último modelo no fue posible hasta conocer los resultados que nos aportaba el análisis por medio de las SVM. Por tanto, el estudio por medio del análisis discriminante y de las SVM no ha sido secuencial sino que ambas técnicas han sido evaluadas en paralelo.

Para la variable recidiva, los cuatro primeros modelos fueron construidos en base a los mismos criterios anteriormente explicados. Las tasas de clasificación global fueron claramente inferiores a aquellas obtenidas para la variable supervivencia. El último modelo fue realizado como hemos dicho en base a las variables con mayor importancia encontradas en las SVM y excluyendo de nuevo aquellas que se consideraban redundantes. Para la variable recidiva las variables incluidas fueron el tamaño tumoral (T), la presencia de márgenes de resección afectados por el tumor y la presencia de metástasis linfáticas ganglionares (N). La tasa de clasificación global fue del 66,6%, inferior a la obtenida con el modelo que incluía a todas las variables (75,36%).

7.4.2 Selección de variables por medio de SVM

En el año 1963, Vapnik y Lerner (Vapnik y Lerner, 1995) presentaron por primera vez el clasificador SVM, el cual fue especialmente diseñado para la resolución de problemas de clasificación binarios en los que las clases eran linealmente separables. Por

este motivo se le conoció también como "hiperplano óptimo de decisión" ya que la solución proporcionada era aquella en la que se clasificaban correctamente todas las muestras disponibles, colocando el hiperplano de separación lo más lejos posible de todas ellas. Las muestras más próximas al hiperplano óptimo de separación son conocidas como muestras críticas o "vectores soporte", que es lo que da nombre a los modelos SVM. El modelo basado en SVM debería producir un hiperplano que separase completamente los datos del universo estudiado en dos categorías. Sin embargo, una separación perfecta no siempre es posible y, si lo es, el resultado del modelo no puede ser generalizado para otros datos. Con el fin de permitir cierta flexibilidad, los SVM manejan un parámetro C que controla la compensación entre errores de entrenamiento y los márgenes rígidos, creando así un margen blando que permita algunos errores en la clasificación a la vez que los penaliza (Cortes y Vapnik, 1995).

Posteriormente se desarrollaron clasificadores no lineales, basados en los mismos principios que los SVM lineales, los cuales obtienen mejores resultados (Belousov et al., 2002). Para obtener funciones de clasificación no lineales, los SVM buscan el hiperplano óptimo de decisión en un espacio en el que previamente se han transformado los datos ("espacio de características") y este hiperplano se convierte en una función de decisión no lineal que se aplica sobre el espacio original. La ventaja de esta transformación es que sólo se debe conocer su núcleo reproductor o "*kernel*" de la transformación, lo cual simplifica en gran medida la obtención de funciones de decisión no lineales.

En nuestro trabajo hemos utilizado dos métodos de clasificación en paralelo: penalización no cóncava y método de Newton. De manera resumida, diremos que el primero de ellos es una particularización del algoritmo de Vapnik y Lerner en la que se introduce una nueva función de penalización no cóncava (Fan y Li, 2001), conocida como *smoothly clipped absolute deviation* (SCAD). El segundo (Schmidt et al., 2007) se basa en el uso de una función de costo para los residuos (también llamada "función de pérdida de Vapnik") más una regularización L1 conocida, capaz de generar un conjunto de soluciones reducido.

Los resultados de ambos métodos pueden compararse fácilmente y por tanto elegir aquellas variables de entre las seleccionadas de mayor importancia. Para la variable supervivencia, destaca cómo las primeras tres variables (recidiva, número de recidivas y estadio) presentan la misma ordenación con ambos algoritmos, si bien su nivel de

ponderación es diferente. En el caso de la variable recidiva, difieren según el método elegido. Así para la penalización no cóncava la combinación de variables de entrada que redundan en un modelo más eficiente es, tal y como se puede apreciar en la Tabla 6.39., estadio, T, Tt (T1+2, T3+4), estado de los márgenes de resección, N y N (N0, N1+2+3). Resulta especialmente interesante la elección, por parte del método de Newton, de la variable edad como la más relevante, cuando la penalización no cóncava la sitúa con valores muy bajos (este fenómeno ya se apreciaba, aunque de manera mucho menos significativa, en la ponderación de la variable supervivencia). Por otra parte, si bien el resto de variables están ordenadas de manera diferente, no existe tanta divergencia en cuanto a su ponderación. Así por ejemplo, en el caso de la variable estadio, dicha variable está ponderada con 78,9 en un caso y 75,5 en otro. Contrariamente a lo que cabría esperar tras conocer los resultados del modelo de recidiva basado en ponderación no cóncava, los mejores resultados con el método de Newton se consiguen con la totalidad de las variables disponibles, si bien éstos son considerablemente peores que en el caso anterior.

Finalmente, tras la clasificación por importancia de las variables disponibles para el modelado tanto del riesgo de mortalidad como del riesgo de padecer recidiva se acomete la implementación de dos modelos predictores (uno para cada variable analizada: supervivencia y recidiva) utilizando el algoritmo SVM como clasificador según la implementación de Cortes y Vapnik (Cortes y Vapnik, 1995). Para la implementación del modelo predictor de la variable supervivencia se realizó un proceso iterativo de adición de variables según su importancia combinado con un proceso de entrenamiento con validación cruzada.

Si analizamos el comportamiento del modelo para la variable supervivencia cuando se introducen como entradas los valores de las variables seleccionadas para los 69 pacientes, vemos que se obtienen valores muy elevados de sensibilidad, especificidad y precisión (Tabla 6.42.). Para la variable recidiva, aunque estos valores son más bajos, son superiores a los obtenidos en el caso del proceso de construcción, pues el 80% de los datos introducidos fueron empleados en el entrenamiento del modelo.

En resumen, podemos afirmar que el algoritmo de validación cruzada implementado para el proceso de selección de variables permite asegurar la consistencia de ambos métodos empleados, aún con un número reducido de pacientes disponibles.

Además, la utilización de *bootstrapping* en el proceso de ponderación permitió realizar una ordenación por importancia fiable con los algoritmos empleados.

Las técnicas de modelización basadas en datos se muestran adecuadas para construir herramientas predictivas capaces de predecir con alto nivel de acierto la supervivencia de un individuo a un cáncer oral. Además el procedimiento de validación cruzada empleado en el entrenamiento de los modelos finales permite asegurar su consistencia. Sin embargo, resulta más complejo predecir la aparición de recidiva en un individuo que su posible muerte con las variables estudiadas y el conjunto de pacientes disponibles.

VIII. CONCLUSIONES

En el contexto del presente estudio, las conclusiones derivadas del análisis de los datos, relacionadas con cada objetivo propuesto, son las siguientes:

8.1 Conclusiones del objetivo 1: Estudiar la expresión de E-cadherina en cánceres orales y su relación con las variables clínico-patológicas de significación pronóstica.

- 1^a) La reducción de la inmunexpresión de E-cadherina se observó en el 46,3% de los casos.
- 2^a) La inmunexpresión de E-cadherina fue significativamente más elevada en pacientes que consumían de forma habitual alcohol.
- 3^a) La reducción de la inmunexpresión de E-cadherina se observó especialmente en tumores pobremente diferenciados.
- 4^a) La inmunexpresión de E-cadherina no exhibió relación significativa con la presencia de metástasis ganglionares ni con la supervivencia de los pacientes.

8.2 Conclusiones del objetivo 2: Estudiar la expresión de β -catenina en cánceres orales y su relación con las variables clínico-patológicas de significación pronóstica.

- 5^a) La inmunexpresión de β -catenina fue observada de manera reducida en el 72,5% de los casos estudiados. Ningún caso mostró tinción nuclear y uno sólo presentó tinción citoplasmática.
- 6^a) La inmunexpresión de β -catenina mostró asociación significativa con la presencia de metástasis ganglionares regionales y con el estadio tumoral TNM.
- 7^a) La inmunexpresión de β -catenina no exhibió relación estadísticamente significativa con la supervivencia.
- 8^a) La inmunexpresión de β -catenina mostró asociación significativa con la de E-cadherina.

8.3 Conclusiones del objetivo 3: Estudiar la expresión de Fak en cánceres orales y su relación con las variables clínico-patológicas de significación pronóstica.

9ª) La inmunoexpresión de Fak fue observada de manera elevada en el 56,5% de los casos, presentando un patrón de tinción citoplasmática.

10ª) La inmunoexpresión de Fak mostró asociación significativa con el tamaño tumoral, con la presencia de metástasis ganglionares regionales y con el estadio TNM.

11ª) La inmunoexpresión de Fak mostró asociación significativa con la presencia de recidivas e inversa con la supervivencia de los pacientes.

8.4 Conclusiones del objetivo 4: Buscar patrones de comportamiento relevantes para la probabilidad de supervivencia en aquellos pacientes que padecen un cáncer oral.

12ª) El modelo obtenido al incluir todas las variables disponibles alcanza una tasa de clasificación global del 96,65%.

13ª) El modelo obtenido al incluir las variables E-cadherina, β -catenina y Fak empleando sus variantes dicotómicas presenta una tasa baja de clasificación global (60,87%).

14ª) El modelo obtenido al excluir las variables redundantes y la radioterapia alcanza una tasa de clasificación global del 65,21%.

15ª) El modelo obtenido tras la utilización de las SVM para identificar las variables de mayor importancia (recidiva y estadio) alcanza una tasa de clasificación global del 98,55%. La tasa de clasificación para los pacientes vivos y muertos es del 97,56% y del 100% respectivamente.

8.5 Conclusiones del objetivo 5: Buscar patrones de comportamiento relevantes para la probabilidad de recidiva en aquellos pacientes que padecen un cáncer oral.

16ª) El modelo obtenido al incluir todas las variables disponibles alcanza una tasa de clasificación global del 75,36%.

17^a) El modelo obtenido al incluir las variables E-cadherina, β -catenina y Fak empleando sus variantes dicotómicas presenta una tasa baja de clasificación global baja (60,87%).

18^a) El modelo obtenido al excluir las variables redundantes y la radioterapia alcanza una tasa de clasificación global de 68,12%.

19^a) El modelo obtenido tras la utilización de las SVM para identificar las variables de mayor importancia (T, bordes afectos y N) alcanza una tasa de clasificación global del 66,66%. La tasa de clasificación para los pacientes sin y con recidiva es del 80% y del 51,7% respectivamente.

8.6 Conclusiones del objetivo 6: Introducir un modelo inteligente capaz de predecir el comportamiento de la variable supervivencia en función del resto de variables de la muestra identificadas como relevantes.

20^a) El algoritmo de validación cruzada implementado para el proceso de selección de variables permite asegurar la consistencia de ambos métodos empleados aún con un número reducido de instancias disponibles.

21^a) Los mejores resultados en el modelo creado para la variable supervivencia con las SVM incluyen a las variables recidiva, número de recidivas y estadio tumoral TNM. La precisión del modelo, sensibilidad y especificada alcanzan el 97,1%, 95,12% y 100%, respectivamente.

22^a) Las técnicas de modelización basadas en datos se muestran adecuadas para construir herramientas predictivas capaces de predecir con alto nivel de acierto la supervivencia de un individuo a un cáncer oral. Además el procedimiento de validación cruzada empleado en el entrenamiento de los modelos finales permite asegurar su consistencia.

8.7 Conclusiones del objetivo 7: Introducir un modelo inteligente capaz de predecir el comportamiento de la variable recidiva en función del resto de variables de la muestra identificadas como relevantes.

- 23^a) El algoritmo de validación cruzada implementado para el proceso de selección de variables permite asegurar la consistencia de ambos métodos empleados aún con un número reducido de casos disponibles.
- 24^a) Los mejores resultados en el modelo creado para la variable recidiva con las SVM incluyen a las variables T, márgenes de resección y N. La precisión del modelo, sensibilidad y especificidad alcanzan el 76,8%, el 82,5% y el 68,97%, respectivamente.
- 25^a) Resulta más complejo predecir la aparición de recidiva que la de muerte en un individuo a partir de las variables estudiadas y el conjunto de casos disponibles.

IX. BIBLIOGRAFÍA

A

Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo J* 1997; 16: 3797–804.

Aberle H, Butz S, Stappert J, Weissig H, Kemler R, Hoschuetzky H. Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *J Cell Sci* 1994; 107: 3655-63.

Aberle H, Schwartz H, Kemler R. Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. *J Cell Biochem* 1996; 61: 514-23.

Agochiya M, Brunton VG, Owens DW, Parkinson EK, Paraskeva C, Keith WN, Frame MC. Increased dosage and amplification of the focal adhesion kinase gene in human cancer cells. *Oncogene* 1999; 18(41): 5646-53.

Amit S, Hatzubai A, Birman Y, Andersen JS, Ben-Shushan E, Mann M, Ben-Neriah Y, Alkalay I. Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev* 2002; 16: 1066–1076.

Andrews NA, Jones AS, Helliwell TR, Kinsella AR. Expression of the Ecadherin catenin adhesion complex in primary squamous cell carcinomas of the head and neck and their nodal metastases. *Br J Cancer* 1997; 75: 1474–80.

Aronsohn MS, Brown HM, Hauptman G, Kornberg LJ. Expression of focal adhesion kinase and phosphorylated focal adhesion kinase in squamous cell carcinoma of the larynx. *Laryngoscope* 2003; 113(11): 1944-8.

B

Bánkfalvi A, Krassort M, Buchwalow IB, Végh A, Felszeghy E, Piffkó J. Gains and losses of adhesion molecules (CD44, E-cadherin, and beta-catenin) during oral carcinogenesis and tumour progression. *J Pathol* 2002; 198(3): 343-51.

Bánkfalvi A, Krassort M, Véghe A, Felszeghy E, Piffkó J. Deranged expression of the E-cadherin/beta-catenin complex and the epidermal growth factor receptor in the clinical evolution and progression of oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 2002; 31(8): 450-7.

Baretton G, Li X, Stoll C, Fischer-Brandies E, Schmidt M, Löhns U. Prognostic significance of DNA ploidy in oral squamous cell carcinomas. A retrospective flow and image cytometric study with comparison of DNA ploidy in excisional biopsy specimens and resection specimens, primary, tumors, and lymph node metastases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995; 79(1): 68-76.

Becker KF, Atkinson MJ, Reich U, Huang HH, Nekarda H, Siewert JR, Höfler H. Exon skipping in the E-cadherin gene transcript in metastatic human gastric carcinomas. *Hum Mol Genet* 1993; 2(6): 803-4.

Bello IO, Soini Y, Salo T. Prognostic evaluation of oral tongue cancer: means, markers and perspectives (I). *Oral Oncol* 2010; 46(9): 630-5.

Belousov A, Verzakov S, von Frese J. Applicational aspect of support vector machine. *J Chemometrics* 2002; 16: 482-9.

Ben Slama L. Precancerous lesions of the buccal mucosa. *Rev Stomatol Chir Maxillofac* 2001; 102(2): 77-108.

Behrens J. Cadherins and catenins: role in signal transduction and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 1999; 18(1): 15-30.

Berx G, Becker KF, Höfler H, van Roy F. Mutations of the human E-cadherin(CDH1) gene. *Hum Mutat* 1998; 12(4): 226-37.

Bradley PS, Mangasarian OL. Feature selection via concave minimization and support vector machines. *Proceedings of the Fifteenth International Conference on Machine Learning* 1998; 82-90.

C

Cai ZG, Shi XJ, Gao Y, Wei MJ, Wang CY, Yu GY. beta-catenin expression pattern in primary oral squamous cell carcinoma. *Chin Med J (Engl)* 2008; 121(19): 1866-70.

Canel M, Secades P, Rodrigo JP, Cabanillas R, Herrero A, Suarez C, Chiara MD. Overexpression of focal adhesion kinase in head and neck squamous cell carcinoma is independent of Fak gene copy number. *Clin Cancer Res* 2006; 12(11 Pt 1): 3272-9.

Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2000; 2(2): 76-83.

Cavallo RA, Cox RT, Moline MM, Roose J, Polevoy GA, Clevers H, Peifer M, Bejsovec A. Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature* 1998; 395: 604-8.

Chang HW, Chow V, Lam KY, Wei WI, Yuen A. Loss of E-cadherin expression resulting from promoter hypermethylation in oral tongue carcinoma and its prognostic significance. *Cancer* 2002; 94(2): 386-92.

Chang KW, Lin SC, Mangold KA, Jean MS, Yuan TC, Lin SN, Chang CS. Alterations of adenomatous polyposis Coli (APC) gene in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2000; 29(3): 223-6.

Chow V, Yuen AP, Lam KY, Tsao GS, Ho WK, Wei WI. A comparative study of the clinicopathological significance of E-cadherin and catenins (alpha, beta, gamma) expression in the surgical management of oral tongue carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001; 127(1): 59-63.

Chung CH, Parker JS, Karaca G, Wu J, Funkhouser WK, Moore D, Butterfoss D, Xiang D, Zanation A, Yin X, Shockley WW, Weissler MC, Dressler LG, Shores CG, Yarbrough WG, Perou CM. Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. *Cancer Cell* 2004; 5(5): 489-500.

Cohen LA, Guan JL. Residues within the first subdomain of the FERM-like domain in focal adhesion kinase are important in its regulation. *J Biol Chem* 2005; 280(9): 8197-207.

Cooper LA, Shen TL, Guan JL. Regulation of focal adhesion kinase by its amino-terminal domain through an autoinhibitory interaction. *Mol Cell Biol* 2003; 23(22): 8030-41.

Cortes C, Vapnik VN. Support vector networks. *Mach Learn* 1995; 20(3): 273-97.

Cunha GR, Hayward SW, Wang YZ, Ricke WA. Role of the stromal microenvironment in carcinogenesis of the prostate. *Int J Cancer* 2003; 107(1): 1-10.

D

Das BR, Nappal JK. Understanding the biology of oral cancer. *Med Sci Monit* 2002; 8(11): 258-67.

Dash M, Liu H. Feature Selection for Classification. *Intelligent Data Analysis* 1997; 3: 131-56.

de Moraes RV, Oliveira DT, Landman G, de Carvalho F, Caballero O, Nonogaki S, Nishimoto I, Kowalski LP. E-cadherin abnormalities resulting from CPG methylation promoter in metastatic and nonmetastatic oral cancer. *Head Neck* 2008; 30(1): 85-92.

de Vicente JC, Esteban I, Germaná P, Germaná A, Vega JA. Expresión of ErbB-3 and ErbB-4 protooncogene proteins in oral squamous cell carcinoma: a pilot study. *Med Oral* 2003; 8: 374-81.

de Vicente JC, Fresno MF, Villalain L, Vega JA, Hernández Vallejo G. Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2005; 41(3): 283-93.

de Vicente JC, Fresno MF, Villalain L, Vega JA, López Arranz JS. Immunoexpression and prognostic significance of TIMP-1 and -2 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2005; 41(6): 568-79.

IX. BIBLIOGRAFÍA

de Vicente JC, Lequerica-Fernández P, Santamaría J, Fresno MF. Expression of MMP-7 and MT1-MMP in oral squamous cell carcinoma as predictive indicator for tumor invasion and prognosis. *J Oral Pathol Med* 2007; 36(7): 415-24.

de Vicente JC, Olay S, Lequerica-Fernandez P, Sánchez-Mayoral J, Junquera LM, Fresno MF. Expression of Bcl-2 but not Bax has a prognostic significance in tongue carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2006; 35(3): 140-5.

de Vicente Rodríguez JC. Cáncer oral. Aspectos clínicos y epidemiológicos. Tratado de Odontología. Cap. 5. Sección XXX. Trigo ediciones. Madrid, 1998.

Dunty JM, Gabarra-Niecko V, King ML, Ceccarelli DF, Eck MJ, Schaller MD. FERM domain interaction promotes Fak signaling. *Mol Cell Biol* 2004; 24(12): 5353-68.

Dupre-Crochet S, Figueroa A, Hogan C, Ferber EC, Bialucha CU, Adams J, Richardson EC, Fujita Y. Casein kinase 1 is a novel negative regulator of E-cadherin-based cell-cell contacts. *Mol Cell Biol* 2007; 27(10): 3804-16.

E

Edwards BK, Howe HL, Ries LA, Thun MJ, Rosenberg HM, Yancik R, Wingo PA, Jemal A, Feigal EG. Annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1999, featuring implications of age and aging on U.S. cancer burden. *Cancer* 2002; 94(10): 2766-92.

F

Fan J, Li R. Variable selection via non concave penalized likelihood and its oracle properties. *J Am Stat Assoc* 2001; 96: 1348-60.

Fedor-Chaiken M, Hein PW, Stewart JC, Brackenbury R, Kinch MS. E-cadherin binding modulates EGF receptor activation. *Cell Commun Adhes* 2003; 10(2): 105-18.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9(6): 669-76.

Fidler IJ, Kripke ML. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science* 1977; 197(4306): 893-5.

Fidler IJ. Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Res* 1990; 50(19): 6130-8.

Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nat rev Cancer* 2003; 3(6): 453-8.

Fiedorek FT Jr, Kay ES. Mapping of the focal adhesion kinase (Fak) gene to mouse chromosome 15 and human chromosome 8. *Mamm Genome* 1995; 6(2): 123-6.

Figuro-Ruiz E, Carretero-Peláez MA, Cerero-Lapiedra R, Esparza-Gómez G, Moreno-López LA. Efectos del consumo de alcohol etílico en la cavidad oral: Relación con el cáncer oral. *Med Oral* 2004; 9: 14-23.

Fujita Y, Krause G, Scheffner M, Zechner D, Leddy HE, Behrens J, Sommer T, Birchmeier W. Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nat Cell Biol* 2002; 4: 222-31.

Fukunaga K, Hayes RR. Effects of Sample Size in Classifier Design. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell* 1989; 11(8): 873-885.

G

Gao S, Eiberg H, Krogdahl A, Liu CJ, Sørensen JA. Cytoplasmic expression of E-cadherin and beta-Catenin correlated with LOH and hypermethylation of the APC gene in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 2005; 34(2): 116-9.

Gao S, Eiberg H, Krogdahl A, Liu CJ, Sørensen JA. Cytoplasmic expression of E-cadherin and beta-Catenin correlated with LOH and hypermethylation of the APC gene in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 2005; 34(2): 116-9.

Garcia S, Dales JP, Charafe-Jauffret E, Carpentier-Meunier S, Andrac-Meyer L, Jacquemier J, Andonian C, Lavaut MN, Allasia C, Bonnier P, Charpin C. Overexpression

IX. BIBLIOGRAFÍA

of c-Met and of the transducers PI3K, Fak and JAK in breast carcinomas correlates with shorter survival and neoangiogenesis. *Int J Oncol* 2007; 31(1): 49-58.

Gasparoni A, Chaves A, Fonzi L, Johnson GK, Schneider GB, Squier CA. Subcellular localization of beta-catenin in malignant cell lines and squamous cell carcinomas of the oral cavity. *J Oral Pathol Med* 2002; 31(7): 385-94.

Gat U, DasGupta R, Degenstein L, Fuchs E. De Novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated beta-catenin in skin. *Cell* 1998; 95: 605–14.

Gottardi CJ, Wong E, Gumbiner BM. E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J Cell Biol* 2001; 153(5): 1049-60.

Gupta GP, Massague J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 2006; 127(4): 679-95.

H

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000 ; 100(1): 57-70.

Harada N, Tamai Y, Ishikawa T, Sauer B, Takaku K, Oshima M, Taketo MM. Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene. *Embo J* 1999; 18: 5931–42.

Hart M, Concorde JP, Lassot I, Albert I, del los Santos R, Durand H, Perret C, Rubinfeld B, Margottin F, Benarous R, Polakis P. The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell. *Curr Biol* 1999; 9: 207–10.

Haskell H, Natarajan M, Hecker TP, Ding Q, Stewart J Jr, Grammer JR, Gladson CL. Focal adhesion kinase is expressed in the angiogenic blood vessels of malignant astrocytic tumors in vivo and promotes capillary tube formation of brain microvascular endothelial cells. *Clin Cancer Res* 2003; 9(6): 2157-65.

Hauck CR, Hsia DA, Ilic D, Schlaepfer DD. v-Src SH3-enhanced interaction with focal adhesion kinase at beta 1 integrin-containing invadopodia promotes cell invasion. *J Biol Chem* 2002; 277(15): 12487-90.

Hazan RB, Norton L. The epidermal growth factor receptor modulates the interaction of E-cadherin with the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 1998 10; 273(15): 9078-84.

Hazan RB, Qiao R., Keren R., Badano I. and Suyama K. (2004) Cadherin switch in tumor progression. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 1014, 155–63.

He ZX, He HW, Wang D, Fang MX. Expression and clinical significance of focal adhesion kinase in oral squamous cell carcinoma. *Sichuan Da XueXueBaoYiXueBan* 2006; 37(6): 876-8.

Herbst RS, Yano S, Kuniyasu H, Khuri FR, Bucana CD, Guo F, Liu D, Kemp B, Lee JJ, Hong WK, Fidler IJ. Differential expression of E-cadherin and type IV collagenase genes predicts outcome in patients with stage I non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000; 6(3): 790-7.

Hinck L, Näthke IS, Papkoff J, Nelson WJ. Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J Cell Biol* 1994; 125(6): 1327-40.

Hippo Y, Yashiro M, Ishii M, Taniguchi H, Tsutsumi S, Hirakawa K, Kodama T, Aburatani H. Differential gene expression profiles of scirrhous gastric cancer cells with high metastatic potential to peritoneum or lymph nodes. *Cancer Res* 2001; 61: 889-95.

Hirohashi S, Kanai Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci* 2003; 94: 575–581.

Hoffman HT, Karnell LH, Funk GF, Robinson RA, Menck HR. The National Cancer Data Base report on cancer of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998; 124(9): 951-62.

Horch H. *Cirugía Oral y Maxilofacial*. Capítulo 6. Editorial Masson. Barcelona, 1996.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Hsia DA, Mitra SK, Hauck CR, Streblov DN, Nelson JA, Ilic D, Huang S, Li E, Nemerow GR, Leng J, Spencer KS, Cheresch DA, Schlaepfer DD. Differential regulation of cell motility and invasion by Fak. *J Cell Biol* 2003; 160(5): 753-67.

Hsu NY, Chen CY, Hsu CP, Lin TY, Chou MC, Chiou SH, Chow KC. Prognostic significance of expression of nm23-H1 and focal adhesion kinase in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2007; 18(1): 81-5.

Huang JS, Chiang CP, Kok SH, Kuo YS, Kuo MY. Loss of heterozygosity of APC and MCC genes in oral squamous cell carcinomas in Taiwan. *J Oral Pathol Med* 1997; 26(7): 322-6.

Huang SH, Hwang D, Lockwood G, Goldstein DP, O'Sullivan B. Predictive value of tumor thickness for cervical lymph node involvement in squamous cell carcinoma of the oral cavity. A meta-analysis of reported studies. *Cancer* 2009; 115(7): 1489-97.

Huber AH and Weis WI. The structure of the betacatenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell* 2001; 105: 391-402.

Huber AH, Nelson WJ, Weis WI. Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell* 1997; 90(5): 871-82

Huber AH, Stewart DB, Laurents DV, Nelson WJ, Weis WI. The cadherin cytoplasmic domain is unstructured in the absence of beta-catenin. A possible mechanism for regulating cadherin turnover. *J Biol Chem* 2001; 276(15): 12301-9.

Hughes GF. On the mean accuracy of statistical pattern recognizers. *IEEE Trans Inf Theory* 1968; 14: 55-63.

Hung KF, Chang CS, Liu CJ, Lui MT, Cheng CY, Kao SY. Differential expression of E-cadherin in metastatic lesions comparing to primary oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2006; 35(10): 589-94.

Hülken J, Birchmeier W, Behrens J. E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. *J Cell Biol* 1994; 127(6Pt 2): 2061-9.

Hynes RO. Metastatic potential: generic predisposition of the primary tumor or rare, metastatic variants-or both? *Cell* 2003; 113(7): 821-3.

I

Impola U, Uitto VJ, Hietanen J, Hakkinen L, Zhang L, Larjava H, Isaka K, Saarialho-Kere U. Differential expression of matrilysin-1 (MMP-7), 92 kD gelatinase (MMP-9), and metalloelastase (MMP-12) in oral verrucous and squamous cell cancer. *J Pathol* 2004; 202(1): 14-22.

Ishida K, Ito S, Wada N, Deguchi H, Hata T, Hosoda M, Nohno T. Nuclear localization of beta-catenin involved in precancerous change in oral leukoplakia. *Mol Cancer* 2007; 6: 62-9.

Itoh S, Maeda T, Shimada M, Aishima S, Shirabe K, Tanaka S, Maehara Y. Role of expression of focal adhesion kinase in progression of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10(8): 2812-7.

Iwai S, Katagiri W, Kong C, Amekawa S, Nakazawa M, Yura Y. Mutations of the APC, beta-catenin, and axin 1 genes and cytoplasmic accumulation of beta-catenin in oral squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005; 131(12): 773-82.

J

Jaggi M, Rao PS, Smith DJ, Wheelock MJ, Johnson KR, Hemstreet GP, Balaji KC. E-cadherin phosphorylation by protein kinase D1/protein kinase C $\{\mu\}$ is associated with altered cellular aggregation and motility in prostate cancer. *Cancer Res* 2005; 65(2): 483-92.

Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafour A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin* 2004; 54(1): 8-29.

Jiang H, Liu L, Ye J, Liu H, Xing S, Wu Y. Focal adhesion kinase serves as a marker of cervical lymph node metastasis and is a potential therapeutic target in tongue cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; 136(9): 1295-302.

Johnson N. Tobacco use and oral cancer: a global perspective. *J Dent Educ* 2001; 65(4): 328-39.

Johnson NW. Orofacial neoplasms: global epidemiology, risk factors and recommendations for research. *Int Dent J* 1991; 41(6): 365-75.

Judson PL, He X, Cance WG, Van Le L. Overexpression of focal adhesion kinase, a protein tyrosine kinase, in ovarian carcinoma. *Cancer* 1999; 86(8): 1551-6.

K

Kademani D, Bell RB, Bagheri S, Holmgren E, Dierks E, Potter B, Homer L. Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histologic grade. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63(11): 1599-605.

Kanazawa T, Watanabe T, Kazama S, Tada T, Koketsu S, Nagawa H. Poorly differentiated adenocarcinoma and mucinous carcinoma of the colon and rectum show higher rates of loss of heterozygosity and loss of E-cadherin expression due to methylation of promoter region. *Int J Cancer* 2002; 102(3): 225-9.

Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, Córdón-Cardo C, Guise TA, Massagué J. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* 2003; 3(6): 537-49.

Kannan S, Yokozaki H, Jayasree K, Sebastian P, Mathews A, Abraham EK, Nair MK, Tahara E. Infrequent loss of heterozygosity of the major tumour suppressor genes in Indian oral cancers. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002; 31(4): 414-8.

Kim SJ, Park JW, Yoon JS, Mok JO, Kim YJ, Park HK, Kim CH, Byun DW, Lee YJ, Jin SY, Suh KI, Yoo MH. Increased expression of focal adhesion kinase in thyroid cancer: immunohistochemical study. *J Korean Med Sci* 2004; 19(5): 710-5.

Kitadai Y, Ellis LM, Tucker SL, Greene GF, Bucana CD, Cleary KR, Takahashi Y, Tahara E, Fidler IJ. Multiparametric in situ mRNA hybridization analysis to predict disease recurrence in patients with colon carcinoma. *Am J Pathol* 1996; 149(5): 1541-51.

Kohavi R, John GH. Wrappers for feature subset selection. *Artificial Intelligence* 1997; 97: 273-324.

Kok SH, Lee JJ, Hsu HC, Chiang CP, Kuo YS, Kuo MY. Mutations of the adenomatous polyposis coli gene in areca quid and tobacco-associated oral squamous cell carcinomas in Taiwan. *J Oral Pathol Med* 2002; 31(7): 395-401.

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärnlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998; 4: 844-7

Kornberg LJ. Focal adhesion kinase expression in oral cancers. *Head Neck* 1998; 20(7): 634-9.

Krolls SO, Hoffman S. Squamous cell carcinoma of the oral soft tissues: a statistical analysis of 14,253 cases by age, sex, and race of patients. *J Am Dent Assoc* 1976; 92(3): 571-4.

Kudo Y, Kitajima S, Ogawa I, Hiraoka M, Sargolzaei S, Keikhaee MR, Sato S, Miyauchi M, Takata T. Invasion and metastasis of oral cancer cells require methylation of E-cadherin and/or degradation of membranous beta-catenin. *Clin Cancer Res* 2004; 10(16): 5455-63.

Kurtz KA, Hoffman HT, Zimmerman MB, Robinson RA. Decreased E-cadherin but not beta-catenin expression is associated with vascular invasion and decreased survival in head and neck squamous carcinomas. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2006; 134(1): 142-6.

Kyzas PA, Cunha IW, Ioannidis JP. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor immunohistochemical expression in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *Clin Cancer Res* 2005; 11(4): 1434-40.

L

Lanfranchi-Tizeira HE, Aguas SC, Sano SM. Malignant transformation of atypical oral lichen planus: a review of 32 cases. *Med Oral* 2003; 8(1): 2-9.

Largey JS, Meltzer SJ, Sauk JJ, Hebert CA, Archibald DW. Loss of heterozygosity involving the APC gene in oral squamous cell carcinomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; 77(3): 260-3.

Lark AL, Livasy CA, Calvo B, Caskey L, Moore DT, Yang X, Cance WG. Overexpression of focal adhesion kinase in primary colorectal carcinomas and colorectal liver metastases: immunohistochemistry and real-time PCR analyses. *Clin Cancer Res* 2003; 9(1): 215-22.

Latres E, Chiaur DS and Pagano M. The human F box protein beta-Trep associates with the Cull1/Skp1 complex and regulates the stability of beta-catenin. *Oncogene* 1999; 18: 849-54.

LaTulippe E, Satagopan J, Smith A, Scher H, Scardino P, Reuter V, Gerald WL. Comprehensive gene expression analysis of prostate cancer reveals distinct transcriptional programs associated with metastatic disease. *Cancer Res* 2002; 62(15): 4499-506.

Lee Y. Support vector machines for classification: a statistical portrait. *Methods Mol Biol* 2010; 620: 347-68.

Lietha D, Cai X, Ceccarelli DF, Li Y, Schaller MD, Eck MJ. Structural basis for the autoinhibition of focal adhesion kinase. *Cell* 2007; 129(6): 1177-87.

Lim SC, Zhang S, Ishii G, Endoh Y, Kodama K, Miyamoto S, Hayashi R, Ebihara S, Cho JS, Ochiai A. Predictive markers for late cervical metastasis in stage I and II invasive squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Clin Cancer Res* 2004; 10(1 Pt 1): 166-72.

Lim ST, Chen XL, Lim Y, Hanson DA, Vo TT, Howerton K, Larocque N, Fisher SJ, Schlaepfer DD, Ilic D. Nuclear Fak promotes cell proliferation and survival through FERM-enhanced p53 degradation. *Mol Cell* 2008; 29(1): 9-22.

Lippman SM, Hong WK. Molecular markers of the risk of oral cancer. *N Engl J Med* 2001; 344(17): 1323-25.

Liu H, Yu L, Dash M, Motoda H. Active Feature Selection Using Classes. *Pacific-Asia Conference on Knowledge Discovery and Data Mining (PAKDD2003)* 2003: 474-485.

Liu LK, Jiang XY, Zhou XX, Wang DM, Song XL, Jiang HB. Upregulation of vimentin and aberrant expression of E-cadherin/beta-catenin complex in oral squamous cell carcinomas: correlation with the clinicopathological features and patient outcome. *Mod Pathol* 2010; 23(2): 213-24.

Liu JW, Shen JJ, Tanzillo-Swarts A, Bhatia B, Maldonado CM, Person MD, Lau SS, Tang DG. Annexin II expression is reduced or lost in prostate cancer cells and its re-expression inhibits prostate cancer cell migration. *Oncogene* 2003; 22(10): 1475-85.

Lo Muzio L, Staibano S, Pannone G. Beta- and gamma-catenin expression in oral squamous cell carcinomas. *Anticancer Res* 1999; 19: 3817–26.

Lo WL, Kao SY, Chi LY, Wong YK, Chang RC. Outcomes of oral squamous cell carcinoma in Taiwan after surgical therapy: factors affecting survival. *J Oral Maxillofac Surg* 2003; 61(7): 751-8.

López de Cicco R, Watson JC, Bassi DE, Litwin S, Klein-Szanto AJ. Simultaneous expression of furin and vascular endothelial growth factor in human oral tongue squamous cell carcinoma progression. *Clin Cancer Res* 2004; 10(13): 4480-8.

Lorch JH, Klessner J, Park JK, Getsias S, Wu YL, Stack MS, Green KJ. Epidermal growth factor receptor inhibition promotes desmosome assembly and strengthens intercellular adhesion in squamous cell carcinoma cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 37191–200.

Luu HH, Zhang R, Haydon RC, Rayburn E, Kang Q, Si W, Park JK, Wang H, Peng Y, Jiang W, He TC. Wnt/beta-catenin signaling pathway as a novel cancer drug target. *Current Cancer Drug Targets* 2004; 4: 653–71.

M

MacIntosh RB. Oral malignant disease: management and investigational directions. In: Fonseca RJ, editor. *Oral and Maxillofacial Surgery*. Vol 5. *Surgical Pathology*. Philadelphia: WB Saunders Co., 2000. p 152-235.

Maeda G, Chiba T, Aoba T, Imai K. Epigenetic inactivation of E-cadherin by promoter hypermethylation in oral carcinoma cells. *Odontology* 2007; 95(1): 24-9.

Mahomed F, Altini M, Meer S. Altered E-cadherin/beta-catenin expression in oral squamous carcinoma with and without nodal metastasis. *Oral Dis* 2007; 13(4): 386-92.

Mao EJ, Oda D, Haigh WG, Beckmann AM. Loss of the adenomatous polyposis coli gene and human papillomavirus infection in oral carcinogenesis. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1996; 32B(4): 260-3.

Mao EJ, Schwartz SM, Daling JR, Beckmann AM. Loss of heterozygosity at 5q21-22 (adenomatous polyposis coli gene region) in oral squamous cell carcinoma is common and correlated with advanced disease. *J Oral Pathol Med* 1998; 27(7): 297-302.

Margulis A, Zhang W, Alt-Holland A, Crawford HC, Fusenig NE, Garlick JA. E-cadherin suppression accelerates squamous cell carcinoma progression in three-dimensional, human tissue constructs. *Cancer Res* 2005 1; 65(5): 1783-91.

Marsh D, Suchak K, Moutasim KA, Vallath S, Hopper C, Jerjes W, Upile T, Kalavrezos N, Violette SM, Weinreb PH, Chester KA, Chana JS, Marshall JF, Hart IR, Hackshaw AK, Piper K, Thomas GJ. Stromal features are predictive of disease mortality in oral cancer patients. *J Pathol* 2011; 223(4): 470-81.

Mashberg A, Samit A. Early Diagnosis of Asymptomatic Oral and Oropharyngeal Squamous Cancers. *CA Cancer J Clin* 1995; 45: 328-51.

Mattijssen V, Peters H, Schalkwijk L. E-cadherin expression in head and neck squamous cell carcinomas is associated with clinical outcome. *Int J Cancer* 1993; 55: 580-85.

McLean GW, Carragher NO, Avizienyte E, Evans J, Brunton VG, Frame MC. The role of focal-adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity. *Nat Rev Cancer* 2005; 5(7): 505-15.

Ministerio de Sanidad y Consumo. La situación del cáncer en España. Disponible en: <http://www.mspsi.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfNoTransmisibles/docs/situacionCancer.pdf>

Miyazaki T, Kato H, Nakajima M, Sohda M, Fukai Y, Masuda N, Manda R, Fukuchi M, Tsukada K, Kuwano H. Fak overexpression is correlated with tumour invasiveness and lymph node metastasis in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2003; 89(1): 140-5.

Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet* 2004; 5(9): 691-701.

Moore C, Flynn MB, Greenberg RA. Evaluation of size in prognosis of oral cancer. *Cancer* 1986; 58(1): 158-62.

Moore S, Johnson N, Pierce A, Wilson D. The epidemiology of lip cancer: a review of global incidence and aetiology. *Oral Dis* 1999; 5(3): 185-95.

Moore SR, Johnson NW, Pierce AM, Wilson DF. The epidemiology of mouth cancer: a review of global incidence. *Oral Dis* 2000; 6(2): 65-74.

Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW.

Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 1997; 275: 1787-90.

Munemitsu S, Albert I, Rubinfeld B, Polakis P. Deletion of an amino-terminal sequence beta-catenin in vivo and promotes hyperphosphorylation of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 4088-94.

Myers JN, Elkins T, Roberts D, Byers RM. Squamous cell carcinoma of the tongue in young adults: increasing incidence and factors that predict treatment outcomes. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000; 122(1): 44-51.

N

Nakayama S, Sasaki A, Mese H, Alcalde RE, Tsuji T, Matsumura T. The E-cadherin gene is silenced by CpG methylation in human oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2001; 93(5): 667-73.

Napgal JK, Das BR. Oral cancer: reviewing the present understanding of its molecular mechanism and exploring the future directions for its effective management. *Oral Oncol* 2003; 39: 213-21.

Nass SJ, Herman JG, Gabrielson E, Iversen PW, Parl FF, Davidson NE, Graff JR. Aberrant methylation of the estrogen receptor and E-cadherin 5' CpG islands increases with malignant progression in human breast cancer. *Cancer Res* 2000; 60(16): 4346-8.

Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin* 2002; 52: 195-215.

O

Odajima T, Sasaki Y, Tanaka N, Kato-Mori Y, Asanuma H, Ikeda T, Satoh M, Hiratsuka H, Tokino T, Sawada N. Abnormal beta-catenin expression in oral cancer with no gene mutation: correlation with expression of cyclin D1 and epidermal growth factor receptor, Ki-67 labeling index, and clinicopathological features. *Hum Pathol* 2005; 36(3): 234-41.

Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res* 2008; 68(10): 3645-54.

Ozawa M, Kemler R. Molecular organization of the uvomorulin-catenin complex. *J Cell Biol* 1992; 116(4): 989-96.

P

Pazouki S, Chisholm DM, Adi MM, Carmichael G, Farquharson M, Ogden GR, Schor SL, Schor AM. The association between tumour progression and vascularity in the oral mucosa. *J Pathol* 1997; 183(1): 39-43.

Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 2007; 7(6): 415-28.

Peinado H, Portillo F, Cano A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol* 2004; 48(5-6): 365-75.

Pignatelli M, Ansari TW, Gunter P, Lui D, Hirano S, Tachiechi M, Kloppel G, Lemonine NR. Loss of membranous E-cadherin expression in pancreatic cancer: correlation with lymph node metastasis, high grade, and advanced stage. *J Pathol* 1994; 174: 243–8.

Polakis P. The many ways of Wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2007; 17: 45–51.

Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, Weissman IL, Clarke MF, Ailles LE. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(3): 973-8.

Pyo SW, Hashimoto M, Kim YS, Kim CH, Lee SH, Johnson KR, Wheelock MJ, Park JU. Expression of E-cadherin, P-cadherin and N-cadherin in oral squamous cell carcinoma: correlation with the clinicopathologic features and patient outcome. *JCraniomaxillofac Surg* 2007; 35(1): 1-9.

Q

Qian X. L., Karpova T., Sheppard A. M., McNally J. and Lowy D. R. (2004) E-cadherin-mediated adhesion inhibits ligand-dependent activation of diverse receptor tyrosine kinases. *Embo J* 23, 1739–48.

R

Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* 2003; 33(1): 49-54.

Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Clegg L, Edwards BK. SEER Cancer Statistics Review. National Cancer Institute. Disponible en: http://seer.cancer.gov/Publications/CSR1973_1998/.

Rimm DL, Morrow JS. Molecular cloning of human E-cadherin suggests a novel subdivision of the cadherin superfamily. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 200(3): 1754-61.

Roepman P, de Jager A, Groot Koerkamp MJ, Kummer JA, Slootweg PJ, Holstege FC. Maintenance of head and neck tumor gene expression profiles upon lymph node metastasis *Cancer Res* 2006; 66: 11110-4.

Ross DT, Scherf U, Eisen MB, Perou CM, Rees C, Spellman P, Iyer V, Jeffrey SS, Van de Rijn M, Waltham M, Pergamenschikov A, Lee JC, Lashkari D, Shalon D, Myers TG, Weinstein JN, Botstein D, Brown PO. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet* 2000; 24: 227-35.

Rovin JD, Frierson HF Jr, Ledinh W, Parsons JT, Adams RB. Expression of focal adhesion kinase in normal and pathologic human prostate tissues. *Prostate* 2002; 53(2): 124-32.

Rubinfeld B, Robbins P, El-Gamil M, Albert I, Porfiri E, Polakis P. Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* 1997; 275: 1790-2.

S

Saito Y, Takazawa H, Uzawa K, Tanzawa H, Sato K. Reduced expression of E-cadherin in oral squamous cell carcinoma: relationship with DNA methylation of 5' CpG island. *Int J Oncol* 1998; 12(2): 293-8.

Sasaki CY, Lin H, Morin PJ, Longo DL. Truncation of the extracellular region abrogates cell contact but retains the growth-suppressive activity of E-cadherin. *Cancer Res* 2000; 60: 7057-65.

Sato K, Okazaki Y, Tonogi M, Tanaka Y, Yamane GY. Expression of beta-catenin in rat oral epithelial dysplasia induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *Oral Oncol* 2002; 38(8): 772-8.

Schliephake H. Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer- A review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003; 32: 233-45.

Schneider GB, Kurago Z, Zaharias R, Gruman LM, Schaller MD, Hendrix MJ. Elevated focal adhesion kinase expression facilitates oral tumor cell invasion. *Cancer* 2002 15; 95(12): 2508-15.

Schmidt M, Fung G, Rosales R. Fast Optimization Methods for L1 Regularization: A Comparative Study and Two New Approaches. *Proceedings of the 18th European conference on Machine Learning* 2007;

Schwock J, Bradley G, Ho JC, Perez-Ordóñez B, Hedley DW, Irish JC, Geddie WR. SNAI1 expression and the mesenchymal phenotype: an immunohistochemical study performed on 46 cases of oral squamous cell carcinoma. *BMC Clin Pathol* 2010; 10: 1.

Shaw RJ, McGlashan G, Woolgar JA, Lowe D, Brown JS, Vaughan ED, Rogers SN. Prognostic importance of site in squamous cell carcinoma of the buccal mucosa. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2009; 47(5): 356-9.

Shen Y, Hirsch DS, Sasiela CA, Wu WJ. Cdc42 regulates E-cadherin ubiquitination and degradation through an epidermal growth factor receptor to Src-mediated pathway. *J Biol Chem* 2008; 283(8): 5127-37.

Sieg DJ, Hauck CR, Ilic D, Klingbeil CK, Schaefer E, Damsky CH, Schlaepfer DD. Fak integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol* 2000; 2(5): 249-56.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Silverman S Jr. Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers. The outcomes, the trends, the challenge. *J Am Dent Assoc* 2001; 132 Suppl: 7S-11S.

Sobin LH, Witterkind CH. TNM classification of malignant tumors. 6ª Edición. Editorial Wiley. New York, 1997.

Sogabe Y, Suzuki H, Toyota M, Ogi K, Imai T, Nojima M, Sasaki Y, Hiratsuka H, Tokino T. Epigenetic inactivation of SFRP genes in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2008; 32(6): 1253-61.

Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 1130-4.

Strassburg M, Knolle G. Mucosa oral. Atlas a color de enfermedades. 3ª edición. Editorial Marbán. Madrid, 1996.

Strumane K, Berx G, Van Roy F. Cadherins in cancer. *Handb Exp Pharmacol* 2004; 165: 69-103.

Su JM, Gui L, Zhou YP, Zha XL. Expression of focal adhesion kinase and alpha5 and beta1 integrins in carcinomas and its clinical significance. *World J Gastroenterol* 2002; 8(4): 613-8.

Supić G, Kozomara R, Branković-Magić M, Jović N, Magić Z. Gene hypermethylation in tumor tissue of advanced oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol* 2009; 45(12): 1051-7.

SEER. Surveillance epidemiology and end results. Cancer statistics review 1975-2004. National Cancer Institute. Disponible en: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/oralcav>.

T

Takes RP, Baatenburg De Jong RJ, Alles MJ, Meeuwis CA, Marres HA, Kneegt PP, De La Riviere GB, De Wilde PC, Mooi WJ, Hermans J, Van Krieken JH. Markers for nodal

metastasis in head and neck squamous cell cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002; 128(5): 512-8.

Takkunen M, Grenman R, Hukkanen M, Korhonen M, García de Herreros A, Virtanen I. Snail-dependent and -independent epithelial-mesenchymal transition in oral squamous carcinoma cells. *J Histochem Cytochem* 2006; 54(11): 1263-75.

Tanaka N, Odajima T, Ogi K, Ikeda T, Satoh M. Expression of E-cadherin, alpha-catenin, and beta-catenin in the process of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2003; 89(3): 557-63.

Tandle A, Sanghavi V, Saranath D. Infrequent loss of heterozygosity at adenomatous polyposis coli gene locus in Indian oral cancers. *Cancer Lett* 2000; 157(2): 155-60.

Tian Z, Guo W, Zhang WG. The expression of E-cadherin in oral cancer with different biological behavior. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue* 2002; 11(4): 350-2.

Tralongo V, Rodolico V, Luciani A, Marra G, Daniele E. Prognostic Factors in Oral Squamous Cell Carcinoma. A Review of the Literature. *Anticancer Res* 1999; 19: 3503-10.

Troyanovsky RB, Laur O, Troyanovsky SM. Stable and unstable cadherin dimers: mechanisms of formation and roles in cell adhesion. *Mol Biol Cell* 2007; 18(11): 4343-52.

Tsuchiya R, Yamamoto G, Nagoshi Y, Aida T, Irie T, Tachikawa T. Expression of adenomatous polyposis coli (APC) in tumorigenesis of human oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2004; 40(9): 932-40.

U

Ueda G, Sunakawa H, Nakamori K, Shinya T, Tsuhako W, Tamura Y, Kosugi T, Sato N, Ogi K, Hiratsuka H. Aberrant expression of beta- and gamma-catenin is an independent prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006; 35(4): 356-61.

V

van den Breckel MWM, Bindels EMJ, Balm AJM. Prognostic factors in head and neck cancer. *Eur J Cancer* 2002; 38: 1041-3.

van Diese PJ, Brugal G, Baak JPA. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *J Clin Pathol* 1998; 51: 716-24.

van Hengel J, van Roy F. Diverse functions of p120ctn in tumors. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773(1): 78-88.

Vandewalle C, Comijn J, De Craene B, Vermassen P, Bruyneel E, Andersen H, Tulchinsky E, Van Roy F, Berx G. SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. *Nucleic Acids Res* 2005; 33(20):6566-78.

Vapnik V, Lerner A. Pattern recognition using generalized portrait method. *Automation and Remote Control* 1963; 24: 774–80.

Vleminckx K, Vakaet L Jr, Mareel M, Fiers W, van Roy F. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 1991; 66(1): 107-19.

Viswanathan M, Tsuchida N, Shanmugam G. Promoter hypermethylation profile of tumor-associated genes p16, p15, hMLH1, MGMT and E-cadherin in oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2003; 105(1): 41-6.

Voeller H, Truica C, Gelmann E. Beta-catenin mutations in human prostate cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 2520–3.

Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK. Head and neck cancer. *N Engl J Med* 1993; 328(3): 184-94.

W

Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2009; 45(4-5): 309-16.

Williams HK. Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2000; 53: 165-72.

Woolgar JA, Rogers S, West CR, Errington RD, Brown JS, Vaughan ED. Survival and patterns of recurrence in 200 oral cancer patients treated by radical surgery and neck dissection. *Oral Oncol* 1999; 35(3): 257-65.

Wu W, Tang X, Hu W, Lotan R, Hong WK, Mao L. Identification and validation of metastasis-associated proteins in head and neck cancer cell lines by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Clin Exp Metastasis* 2002; 19: 319-26.

X

Xin W, Rhodes DR, Ingold C, Chinnaiyan AM, Rubin MA. Dysregulation of the annexin family protein family is associated with prostate cancer progression. *Am J Pathol* 2003; 162: 255-61.

Xing E, Jordan M, Karp R. Feature selection for high-dimensional genomic microarray data. *Proceedings of the Eighteenth International Conference on Machine Learning* 2001: 601-8.

Y

Yamada K, Jordan R, Mori M, Speight PM. The relationship between E-cadherin expression, clinical stage and tumour differentiation in oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis* 1997; 3(2): 82-5.

Yanagawa S, Matsuda Y, Lee JS, Matsubayashi H, Sese S, Kadowaki T, Ishimoto A. Casein kinase I phosphorylates the Armadillo protein and induces its degradation in *Drosophila*. *Embo J* 2002; 21: 1733-42.

Yang JY, Zong CS, Xia W, Wei Y, Ali-Seyed M, Li Z, Broglio K, Berry DA, Hung MC. MDM2 promotes cell motility and invasiveness by regulating E-cadherin degradation. *Mol Cell Biol* 2006; 26(19): 7269-82.

Yang Y, Pedersen JP. A Comparative Study on Feature Selection in Text Categorization. Proceedings of the Fourteenth International Conference on Machine Learning 1997: 412-20.

Yeh KT, Chang JG, Lin TH, Wang YF, Chang JY, Shih MC, Lin CC. Correlation between protein expression and epigenetic and mutation changes of Wnt pathway-related genes in oral cancer. *Int J Oncol* 2003; 23(4): 1001-7.

Yost C, Torres M, Miller JR, Huang E, Kimelman D, Moon RT. The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev* 1996; 10: 1443-54.

Z

Zhao J, Guan JL. Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2009; 28(1-2): 35-49.

Zhao JH, Reiske H, Guan JL. Regulation of the cell cycle by focal adhesion kinase. *J Cell Biol* 1998; 143(7): 1997-2008.

Zhao XJ, Li H, Chen H, Liu YX, Zhang LH, Liu SX, Feng QL. Expression of e-cadherin and beta-catenin in human esophageal squamous cell carcinoma: relationships with prognosis. *World J Gastroenterol* 2003; 9(2): 225-32.

Zhang Y, Lu H, Dazin P, Kapila Y. Squamous cell carcinoma cell aggregates escape suspension-induced, p53-mediated anoikis: fibronectin and integrin α v mediate survival signals through focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 2004; 279(46): 48342-9.

Zhong LP, Zhou XJ, Wei KJ, Yang X, Ma CY, Zhang CP, Zhang ZY. Application of serum tumor markers and support vector machine in the diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue* 2008; 17(5): 457-60.