

**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

Programa de Doctorado “Investigación en Cirugía y Especialidades  
Médico-Quirúrgicas”



Universidad de Oviedo

TESIS DOCTORAL:

**“MARCADORES MOLECULARES DE METÁSTASIS A  
DISTANCIA EN CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE  
HIPOFARINGE Y LARINGE”**

AUTOR:

**Dña. PATRICIA MARTÍNEZ GONZÁLEZ**

DIRECTORES:

**Dr. D. JUAN PABLO RODRIGO TAPIA  
Dra. D. JUANA MARIA GARCIA PEDRERO**



**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

Programa de Doctorado “Investigación en Cirugía y Especialidades  
Médico-Quirúrgicas”



Universidad de Oviedo

TESIS DOCTORAL:

**“MARCADORES MOLECULARES DE METÁSTASIS A  
DISTANCIA EN CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE  
HIPOFARINGE Y LARINGE”**

AUTOR:

**Dña. PATRICIA MARTÍNEZ GONZÁLEZ**

DIRECTORES:

**Dr. D. JUAN PABLO RODRIGO TAPIA  
Dra. D. JUANA MARIA GARCIA PEDRERO**

Oviedo, Septiembre 2014





## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

| 1.- Título de la Tesis  |  |
|---|--|
| Español/Otro Idioma: : “Marcadores Moleculares de Metástasis a Distancia en Carcinoma Epidermoide de Hipofaringe y Laringe” | Inglés: “Molecular markers of distant metastasis in squamous cell carcinoma of the larynx and the hypopharynx” |

| 2.- Autor   |                          |
|---|--------------------------|
| Nombre: Patricia Martínez González  | DNI/Pasaporte/NIE: _____ |
| Programa de Doctorado: : Investigación en Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas |                          |
| Organo responsable: Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas       |                          |

### RESUMEN (en español)

**INTRODUCCIÓN:** El carcinoma escamoso de cabeza y cuello (CECC) es una enfermedad con afectación loco-regional principalmente, pero una de las principales causas de muerte son las metástasis a distancia (MD). El tratamiento sistémico ha demostrado disminuir el porcentaje de MD. Estas terapias conllevan importante toxicidad; de ahí, el gran interés en establecer factores de riesgo para limitar al grupo de paciente que pudieran beneficiarse, pero las características clínico-patológicas son poco precisas.

El objetivo es analizar si la expresión de proteínas potencialmente implicadas en el proceso de metástasis puede predecir y seleccionar tumores con mayor riesgo de desarrollar MD.

**MATERIAL Y MÉTODOS:** Estudio retrospectivo de casos y controles en relación al desarrollo de MD. 88 pacientes con carcinoma epidermoide de hipofaringe y laringe (44 sin MD y 44 con MD) en estadio IV, balanceando las variables clínicas. Se determina la expresión de proteínas relacionadas con la cascada metastásica: E-Cadherina,  $\beta$ -catenina, p120- catenina, ANXA2, FAK, Cortactina, EGFR, AKT, AMAP, HERG1, p53 y p16.

**RESULTADOS:** La pérdida de expresión de ANXA2 ( $p=0,06$ ) y E-Cadherina ( $p=0,007$ ) era significativamente más frecuente en los casos con MD. La expresión de Cortactina y FAK no se relacionó con las MD. En el análisis multivariante, la pérdida combinada de ambas proteínas no mostró mayor poder predictivo que la pérdida aislada de E-Cadherina. La expresión de ninguna de las otras proteínas del estudio presentaron asociación con el desarrollo de MD.

**CONCLUSIONES:** De acuerdo con nuestros datos, la pérdida de adhesión epitelial parece tener una función clave en el desarrollo de MD en los CECC, y la evaluación mediante inmunohistoquímica de las proteínas que intervienen en la regulación de la adhesión celular, tales como E-cadherina podría representar una herramienta útil para evaluar fácilmente el riesgo metastásico.



## RESUMEN (en Inglés)

### Introduction

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) survival hasn't substantially improved over the past decade. We managed to change the manner of death of patients; we achieved better rates of loco-regional control but we are failing to control distant metastasis (DM). It is important to better predict whether a patient will develop DM during follow-up, as this influences the decision on how to treat the patient. Unfortunately, clinic-pathological features are still of little predictive value for the individual risk, and therefore more accurate and reliable markers are needed.

The aim of this study was to investigate the ability of various molecular markers present in primary tumors to predict the risk of developing distant metastasis.

### Method:

Restrictive clinical criteria were applied for patient selection in order to carry out a case-control study with comparable clinical features on a group-wide basis and a similar risk of metastasis. 88 patients with squamous cell carcinoma of the larynx and the hypopharynx (44 with DM and 44 without DM). Immunohistochemical analysis was performed for a panel of proteins known to participate in cellular processes relevant to metastatic dissemination: E-Cadherin,  $\beta$ -catenin, p120-catenin, ANXA2, FAK, Cortactin, EGFR, AKT, AMAP, HERG1, p53 and p16.

### Results:

The loss of E-cadherin expression was significantly correlated with the risk of distant metastasis ( $p = 0.002$ ), while the loss of annexin A2 expression was nearly statistically significant ( $p = 0.06$ ), but the combination of the expression of E-cadherin and annexin A2 (loss of both proteins) was not superior to the expression of E-cadherin alone in predicting distant metastasis (HR=2.19, 95% CI 1.18 to 4.04;  $p = 0.012$ ).

None of the other protein markers assessed were associated with the development of distant metastasis.

### Conclusions

According to our data the loss of epithelial adhesion seems to play a central role in the development of metastasis in HNSCC, and more importantly, immunohistochemical assessment of key proteins involved in cell adhesion regulation, such as E-cadherin could represent a useful tool to evaluate easily and routinely the metastatic potential of these carcinomas.



Vicerrectorado de Internacionalización  
y Postgrado  
Universidad de Oviedo



# AGRADECIMIENTOS

---

Este trabajo de tesis doctoral es el producto de muchas horas de esfuerzo y dedicación, pero no sólo mío, si no también de muchas otras personas sin los cuales este trabajo no hubiera sido posible, y que desde estas líneas debo y quiero dar las GRACIAS.

GRACIAS a mis tutores, Juana García Pedrero, siempre disponible para ayudarme a resolver cientos (o miles) de dudas, siempre con una sonrisa y palabras amables; y al Dr. Juan Pablo Rodrigo Tapia, por ser un ejemplo a seguir en la clínica y en el laboratorio, pero sin duda su mejor valor es su interés y su capacidad de enseñar, y me siento muy afortunada de haber podido formar parte de sus pupilos.

GRACIAS a todos los compañeros del IUOPA por su trabajo desinteresado, su paciencia y sus enseñanzas a esta novata en el difícil mundo del laboratorio.

GRACIAS al servicio de ORL del HUCA, a maestros y “residentes conspiradores”, cuyas lecciones y experiencias me permitieron formarme y prepararme para los retos profesionales, y en especial a “El Jefe”, Dr. Carlos Suarez Nieto, por transmitir e impulsar el espíritu de conocimiento, de saber y de investigar.

GRACIAS a Pedro, por estar hay en cada momento, por creer en mí (en ocasiones más que yo misma), sentirse orgulloso y seguir creciendo juntos.

Y mi especial GRACIAS, a mi padre y a mi madre, por animarme, empujarme, y enseñarme a seguir siempre hacia adelante, cualquiera de mis logros será siempre parte suya también.



# INDICE

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| <b>1.</b> | <b>INTRODUCCIÓN.....</b>  | <b>5</b>  |
| 1.1       | CARCINOMA EPIDERMOIDE DE CABEZA Y CUELLO .....  | 7         |
| 1.1.1     | <i>Epidemiología.....</i>   | 7         |
| 1.1.2     | <i>Etiología.....</i>   | 7         |
| 1.1.3     | <i>Clínica y diagnóstico .....</i>  | 8         |
| 1.1.4     | <i>Estadificación .....</i>   | 9         |
| 1.1.5     | <i>Tratamiento .....</i>  | 9         |
| 1.1.6     | <i>Pronóstico.....</i>  | 11        |
| 1.2       | CARCINOGENÉISIS .....   | 12        |
| 1.2.1     | INVASIÓN Y METASTASIS.....  | 14        |
| 1.2.1.1   | MODELO DE PROGRESIÓN: .....   | 16        |
| 1.2.1.2   | MODELO DE "STEM CELL" .....   | 18        |
| 1.3       | BIOMARCADORES EN CECC.....  | 19        |
| 1.3.1     | <i>Biomarcadores de metástasis en los CECC.....</i>   | 20        |
| <b>2.</b> | <b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>  | <b>27</b> |
| <b>3.</b> | <b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>  | <b>31</b> |
| 3.1       | SELECCIÓN DE PACIENTES.....   | 33        |
| 3.2       | ELABORACIÓN DE MATRICES DE TEJIDO ("TISSUE ARRAYS").....  | 35        |
| 3.3       | ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO .....   | 35        |
| 3.4       | ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....  | 39        |
| <b>4.</b> | <b>RESULTADOS.....</b>  | <b>41</b> |
| 4.1       | EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS ESTUDIADAS EN LOS CARCINOMAS DE HIPOFARINGE Y LARINGE .....              | 43        |
| 4.2       | EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS ESTUDIADAS EN RELACIÓN CON EL DESARROLLO DE METÁSTASIS A DISTANCIA ..... | 49        |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| <b>5.</b> | <b>DISCUSIÓN .....</b>   | <b>57</b> |
| 5.1       | BIOMARCADORES DE ADHESIÓN CELULAR .....                          | 60        |
| 5.1.1     | <i>E-Cadherina</i> .....   | 61        |
| 5.1.2     | <i>β – catenina</i> .....  | 63        |
| 5.1.3     | <i>p120-catenina</i> .....                                       | 65        |
| 5.1.4     | <i>Anexina A2</i> .....  | 66        |
| 5.2       | BIOMARCADORES DE MOTILIDAD E INVASIÓN .....                      | 67        |
| 5.2.1     | <i>Quinasa de adhesión focal (FAK)</i> .....                     | 68        |
| 5.2.2     | <i>Cortactina</i> .....  | 69        |
| 5.3       | BIOMARCADORES DE PROLIFERACIÓN Y CONTROL DEL CICLO CELULAR ..... | 71        |
| 5.3.1     | <i>Vía de EGFR-PI3K-AKT</i> .....                                | 71        |
| 5.3.2     | <i>Vía EGFR-GEP100-Arf6-AMAP1</i> .....                          | 70        |
| 5.3.3     | <i>Proteína p16</i> .....  | 74        |
| 5.3.4     | <i>HERG1</i> .....   | 75        |
| 5.3.5     | <i>p53</i> .....   | 77        |
| 5.4       | LOS BIOMARCADORES DE CECC EN LA PRÁCTICA CLÍNICA .....           | 78        |
| <b>6.</b> | <b>CONCLUSIONES .....</b>  | <b>81</b> |
| <b>7.</b> | <b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>   | <b>85</b> |

# 1. INTRODUCCIÓN



## 1.1 CARCINOMA EPIDERMOIDE DE CABEZA Y CUELLO

### 1.1.1 Epidemiología

El carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (CECC) es el sexto tumor más frecuente en el mundo<sup>1</sup>, cada año se diagnostican aproximadamente medio millón de nuevos casos de CECC, que viene a representar entre el 5-10% de todos los tumores malignos.

La mayoría de los tumores de cabeza y cuello se originan en las vías aerodigestivas superiores (VAS), siendo el órgano más afectado la laringe (50%), seguido de la cavidad oral (30%) y faringe (10-15%), mientras que el resto de localizaciones son excepcionales. Dentro de la laringe predomina la localización supraglótica (70%), mientras que los glóticos son menos frecuentes (30%) y los subglóticos muy raros. En la faringe destacan orofaringe e hipofaringe, con una incidencia similar, mientras que los tumores de rinofaringe son escasos.

Los CECC son tumores de predominio masculino (95%), con una edad media entre los 60 y 70 años, aunque la edad de aparición en laringe y faringe disminuye en pacientes inmunodeprimidos<sup>2</sup>.

### 1.1.2 Etiología

La etiología del CECC es desconocida, pero existen factores ambientales y genéticos relacionados con su aparición.

El consumo de tabaco presenta una más que demostrada relación dosis-efecto, con un riesgo 6-15 veces superior de padecer CECC en fumadores. El consumo de alcohol también se

asocia a este tipo de tumor, sobre todo en cavidad oral, faringe y supraglotis, y potencia el efecto del tabaquismo<sup>3</sup>.

El virus del papiloma humano (VPH) se ha relacionado con el desarrollo de tumores malignos orofaríngeos siendo los isotipos más comunes en CECC 16 y 18<sup>4</sup>. La integración del ADN vírico en las células epiteliales produce la sobreexpresión de las proteínas E6 y E7 que inactivan los genes supresores p53 y Rb y favorece la progresión maligna<sup>5</sup>.

El CECC no se considera un tumor hereditario, aunque sí se han observado antecedentes familiares en casi el 50% de los casos, sobre todo en asociación a neoplasias pulmonares. Esta predisposición se relaciona con una mayor susceptibilidad a los carcinógenos ambientales al tener reducida su capacidad genética para reparar el ADN.

### 1.1.3 Clínica y diagnóstico

La clínica es muy variada y depende de la localización del tumor primario. Los tumores glóticos se manifiestan de forma precoz por disfonía, por lo que su detección se realiza en fases tempranas con escaso número de metástasis ganglionares (<20%); sin embargo los tumores faríngeos y supraglóticos presentan una clínica inespecífica, por lo que su detección se retrasa en el tiempo y muchos ya presentan metástasis ganglionares en el momento diagnóstico (50%-70%).

El diagnóstico se basa en la inspección por visión directa o fibroendoscopio y mediante palpación cervical, complementándose con pruebas de imagen (TAC, RMN, PET) que permiten conocer la extensión tumoral e identificar la presencia de adenopatías sospechosas.

El estudio histopatológico es imprescindible para el diagnóstico definitivo, ya que permite conocer la estirpe y planificar el tratamiento. Se obtiene mediante biopsias del tumor primario o PAAF dirigida a la adenopatía metastásica, y según el grado de diferenciación, pleomorfismo y actividad mitótica se clasifican en: bien, moderada o pobremente diferenciados. Se atribuye mayor agresividad a los tumores poco diferenciados, lo cual no siempre se relaciona con peor supervivencia. Existen múltiples sistemas de clasificación histopatológica, pero en todos ellos se comprueba que tumores similares tienen distinta evolución clínica, por lo que de modo permanente se intenta validar nuevos modelos más precisos y fiables<sup>6</sup>.

### 1.1.4 Estadificación

El sistema TNM se utiliza como clasificación uniforme y consensuada de los CECC, se basa en el tamaño (T) y extensión tumoral, la presencia de adenopatías (N) y metástasis a distancia (M)<sup>7</sup>; es muy útil para estandarizar resultados terapéuticos y comparar estudios. Sin embargo se basa únicamente en información anatómica, y está limitado para establecer el resultado y pronóstico individual del paciente, pues no contempla valores como la respuesta inmunitaria, agresividad intrínseca del tumor, estado general del paciente, etc. Se estudia incluir nuevos criterios, factores biológicos y ambientales que permitan mejorar el poder predictivo de TNM<sup>8</sup>.

### 1.1.5 Tratamiento

La cirugía es el método terapéutico de elección en la mayoría de los CECC, tanto del tumor como de las metástasis ganglionares. La resección del tumor se realiza con márgenes

amplios para conseguir unos márgenes libres, lo cual reduce el porcentaje de recidiva local. Debido al elevado número de metástasis ocultas clínicamente pero presentes en el estudio histopatológico (una media de 15-20%, con gran variación según la localización) es frecuente realizar un vaciamiento cervico-ganglionar profiláctico de tipo selectivo. Una manera de indicar el vaciamiento de forma personalizada sería mediante la técnica del ganglio centinela, tan utilizado en tumores de otras localizaciones; sin embargo la mayoría de los CECC no son susceptibles de esta técnica y sólo zonas muy accesibles como la cavidad oral se benefician actualmente de su empleo<sup>9</sup>.

La radioterapia se utiliza de modo radical en tumores T1 y T2 de cavidad oral, faringe y laringe; y de modo complementario a la cirugía cuando existen bordes afectados o dudosos, metástasis ganglionares (N2+) o rotura capsular.

La quimioterapia tiene interés, en combinación con la radioterapia, en los protocolos de conservación de órgano, que se presentan ante pacientes muy seleccionados como alternativa a la cirugía en grandes tumores que precisan técnicas muy agresivas y en los pacientes con importante diseminación metastásica. Estas terapéuticas no quirúrgicas están obteniendo muy buenos resultados<sup>10</sup>, e incluso algunos han demostrado reducir el desarrollo de metástasis a distancia (MD)<sup>11</sup>, pero tienen asociados importantes efectos secundarios, que incluso limitan el perfil de paciente seleccionado, que precisa de un estadio clínico y analítico adecuado para soportar el tratamiento.

En los últimos años y gracias a un mayor conocimiento de la biología molecular de los CECC se ha introducido la terapia con fármacos biológicos, tipo anticuerpos monoclonales e inhibidores tirosinquinasa. El uso de estos fármacos, en combinación con los tratamientos

previamente descritos, ha demostrado mejoras en el control local y la supervivencia libre de enfermedad, pero un escaso aumento de la supervivencia global<sup>12</sup>.

## 1.1.6 Pronóstico

A pesar de los avances en diagnóstico y tratamiento de las últimas décadas, la supervivencia de los pacientes afectados de CECC no ha experimentado grandes cambios. La mayoría de las defunciones se deben a recidivas regionales durante los primeros años. También es frecuente la aparición de segundos tumores sincrónicos o metacrónicos en VAS, esófago o pulmón (10-40%). Otra importante causa de muerte se asocia al pobre control en el desarrollo de enfermedad metastásica a distancia. Las MD ocurren en el 10-20% de los pacientes con CECC<sup>13 14</sup>; y se cree que esta incidencia aumentará en el futuro<sup>15</sup>.

Aunque las nuevas técnicas diagnósticas han mejorado la detección de las metástasis en la evaluación inicial; estas aparecen durante el seguimiento de los pacientes. El 50% de las MD se detectan clínicamente en los primeros nueve meses de tratamiento; y el 80% dentro de los primeros dos años<sup>16</sup>.

La aparición de MD implica importantes consecuencias para el paciente, ya que empobrece mucho la supervivencia, y será necesario la combinación efectiva de un tratamiento local y un tratamiento sistémico adyuvante, con la asociada toxicidad a corto y largo plazo que ello supone.

Se han identificado algunas características clínico-patológicas que se relacionan con mayor o menor incidencia de MD. Los factores de riesgo más comúnmente identificados son: localización primaria, estadio avanzado, edad joven, y sobre todo, la presencia de adenopatías

y la extensión extracapsular<sup>17 18 19 20</sup>; en pacientes con múltiples adenopatías metastásica, especialmente más de 3 y bilaterales, el riesgo de desarrollar MD es mayor al 50%<sup>21 22</sup>. Pero estos factores clínicos han demostrado ser poco precisos y eficaces para evaluar el riesgo de cada paciente de manera individualizada, pues menos del 50% de este grupo tendrá MD.

## 1.2 CARCINOGENESIS

El desarrollo carcinogénico es un proceso multietapa en que la célula va acumulando mutaciones para adquirir las funciones biológicas necesarias para promover el crecimiento y desarrollo tumoral.

Clásicamente se describen seis funciones biológicas adquiridas durante varios pasos<sup>23</sup> (Figura 1):

- Mantenimiento de las señales de proliferación
- Bloqueo de señales supresoras
- Resistencia a la apoptosis
- Inmortalidad replicativa
- Inducción de angiogénesis
- Activación de invasión y metástasis

Y durante la última década este modelo se ha revisado añadiendo otras características emergentes<sup>24</sup> (Figura 2):

- Evasión de la respuesta inmunológica
- Reprogramación del metabolismo energético
- Inestabilidad genómica
- Activación de fenómenos inflamatorios

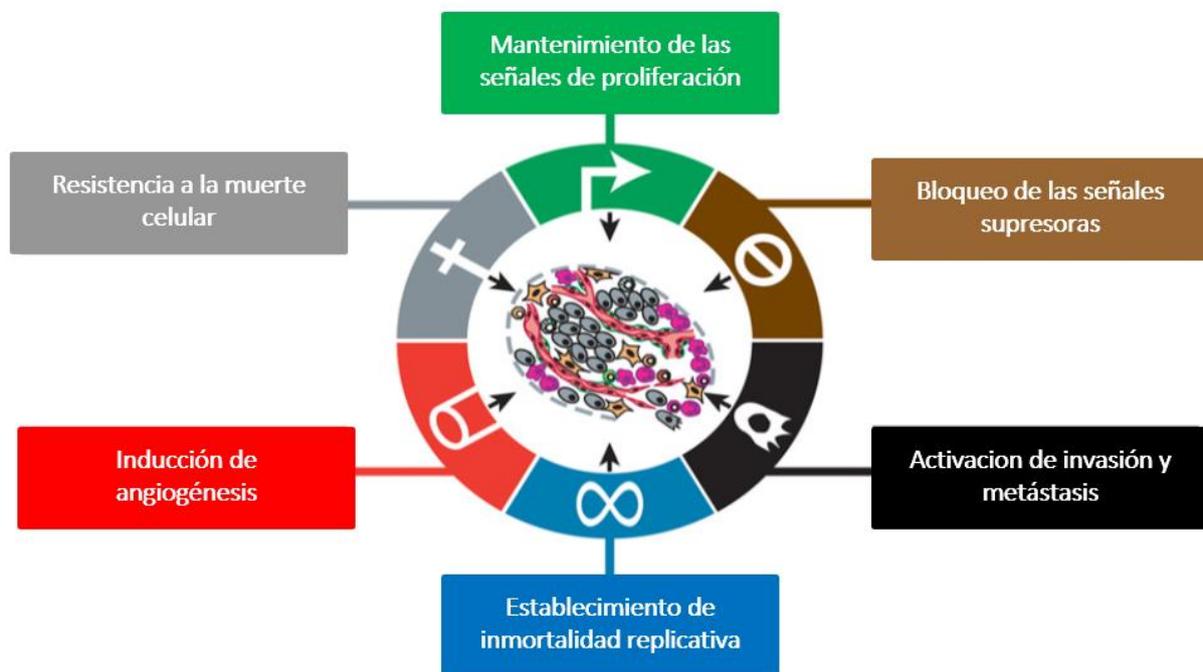


Figura 1: Capacidades biológicas clásicas de las células tumorales  
*D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000 ; 100:57-70)*

(Hanahan

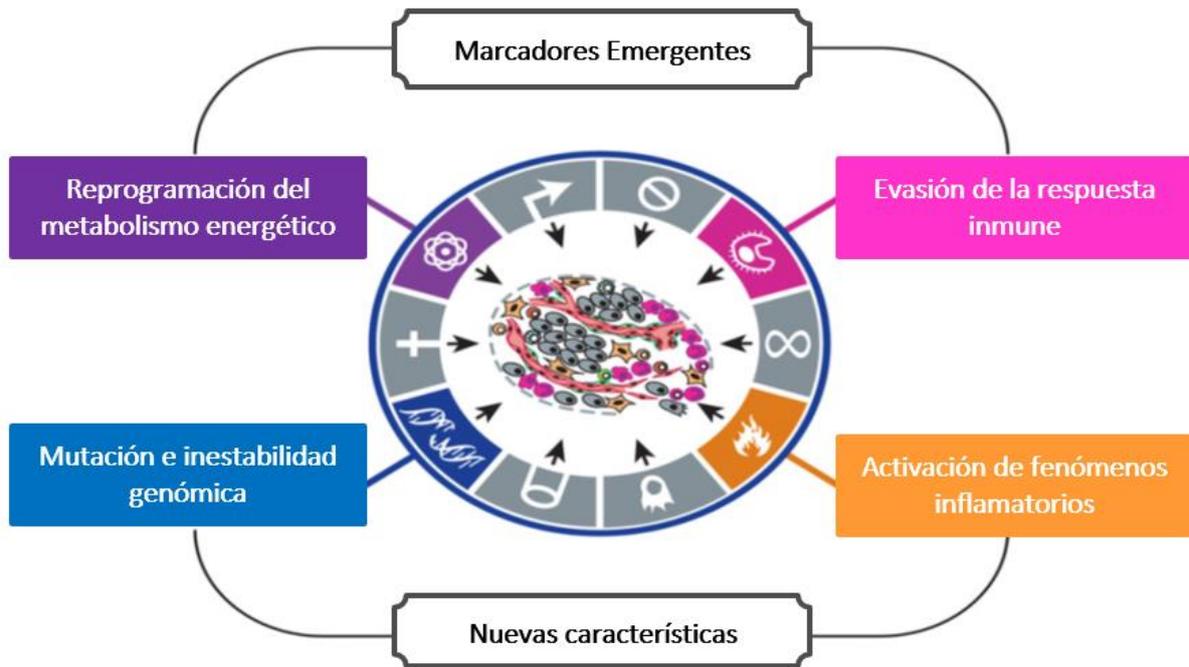


Figura 2: Capacidades biológicas emergentes de las células tumorales  
 (Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011; 144:646-74)

## 1.2.1 INVASIÓN Y METÁSTASIS

Actualmente más del 95% de las muertes por cáncer se producen por sus metástasis. En comparación con la alta frecuencia de MD en otros tumores malignos como pulmón, mama, páncreas, riñón o estómago, la incidencia de MD en pacientes con CECC es relativamente baja, entre el 4 –20% según series. La mayoría de las metástasis ocurren dentro de los dos primeros años desde el momento del diagnóstico, y tras su desarrollo la probabilidad de curación es muy baja y la supervivencia disminuye drásticamente, incluso con diagnóstico precoz.

La capacidad de identificar pacientes con alto riesgo para el desarrollo de MD, permitiría dirigirse a ellos con tratamientos adyuvantes como radioterapia o quimioterapia, o una mayor agresividad terapéutica justificada.

Existen tres modelos de explicación del desarrollo de metástasis:

- Modelo de progresión: como consecuencia del acúmulo del daño las células adquieren la capacidad de metastatizar.
- Modelo de iniciación: Desde el principio y según el tipo de daño inicial, un tumor tiene potencial metastático o no.
- Modelo de predisposición: Son las características del paciente las que llevan a tener metástasis o no.

Según modelos, hay que considerar las metástasis como proceso tardío y raro en la evolución tumoral, o un acontecimiento temprano mostrado por la totalidad de las células del tumor<sup>25</sup>. Así los tumores podrían clasificarse por grupos de acuerdo a su expresión génica: los que no metastatizan o los que sí. Existe un modelo intermedio, según el cual hay alteraciones oncogénicas desde el principio, pero la población celular no es homogénea, con distintos patrones de expresión que hacen que el tumor tenga preferencia por unos u otros tejidos<sup>26</sup>.

La sobreexpresión de un único gen no es suficiente para causar metástasis. Para alcanzar el “fenotipo metastático” se debe producir la alteración de una serie de genes (pérdida de función de genes supresores y activación de proto-oncogenes), los cuales a su vez producen cambios en la expresión proteica, y como consecuencia se alteran una serie de funciones celulares. Puede llegarse por diferentes genes a alterar la misma ruta y alcanzar dicho fenotipo. Esto dificulta tanto el diagnóstico, ya que será necesario más de un marcador para valorar el riesgo individual, como el tratamiento, ya que una sola molécula que bloquee una sola vía no será suficiente para impedir las metástasis.

### ***1.2.1.1 MODELO DE PROGRESIÓN:***

Es el modelo más aceptado, un proceso de carcinogénesis en varias etapas, que requiere una serie de cambios biológicos celulares en cascada para que ocurra la invasión y posterior metástasis<sup>24 27</sup> (Figura 3):

- Invasión local
- Intravasación de las células a sangre y vasos linfáticos cercanos
- Circulación por el sistema linfático y hematógeno
- Extravasación de las células al parénquima en tejidos distantes
- Pequeños nódulos de células cancerosas (Micrometástasis)
- Crecimiento de la lesión

Para llevar a cabo cada una de estas etapas la célula debe adquirir capacidades nuevas como: degradación de la membrana basal, pérdida de la adhesión celular, migración, linfangiogénesis y la capacidad de sobrevivir en el nuevo ambiente metastásico. Además, algunas de estas habilidades deben ir cambiando con el tiempo, por ejemplo, la adhesión celular debe disminuir para permitir a la célula migrar, pero necesita incrementarse de nuevo para colonizar el órgano diana.

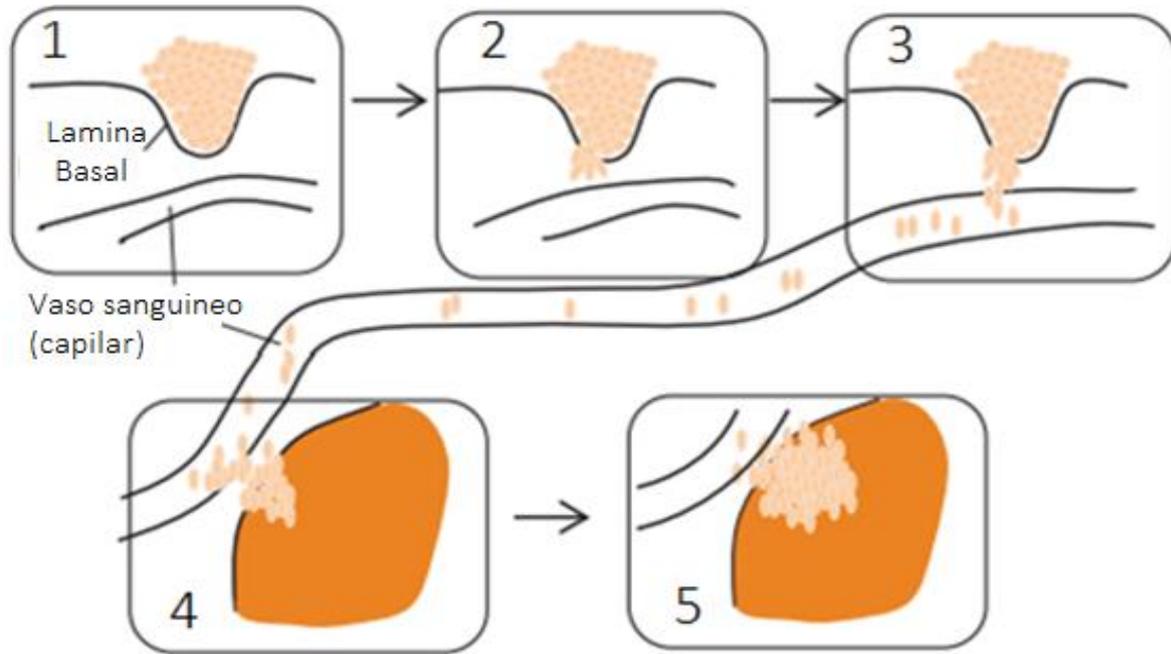


Figura 1: Etapas del desarrollo de metástasis

1. *Crecimiento del tumor en la localización primaria: La activación de los oncogenes o la pérdida de un gen supresor supone la pérdida de control del ciclo celular, la apoptosis y la senescencia.*
2. *Adquisición de propiedades invasivas que permiten al tumor degradar la matriz extracelular y el activar el fenómeno de transición epitelio-mesénquima.*
3. *Cambios en las propiedades de invasión y migración permiten al tumor penetrar en el vaso y entrar en la circulación, formando un embolo tumoral.*
4. *Las nuevas capacidades de invasión permiten a la célula tumoral la adhesión a la membrana basal del nuevo tejido y la extravasación hacia la localización secundaria.*
5. *Depósito metastásico, crecimiento y supervivencia del tumor en la localización secundaria*

De tal modo que, conociendo las mutaciones genéticas relacionadas con cada uno de estos pasos, y los cambios en la expresión proteica que éstos producen, que se pueden conocer mediante técnicas de laboratorio, se podría predecir y seleccionar aquellos tumores con mayor riesgo metastásico, y realizar un tratamiento directamente proporcional al riesgo, combinando modalidades terapéuticas.

### **1.2.1.2 MODELO DE "STEM CELL"**

Esta hipótesis se basa en la premisa de que la formación de tumores, el crecimiento y metástasis son dependientes de una subpoblación distinta de células cancerosas. Las primeras "Cancer Stem Cell" (CSC) fueron descritas en 1994 en leucemia<sup>28</sup>, y posteriormente se han identificado en carcinomas de mama, sistema nervioso central, mesénquima, gastrointestinales, páncreas, próstata, y cabeza y cuello.

Esta teoría se apoya en tres puntos clave<sup>29</sup>:

- Sólo una minoría de células de cada tumor está dotada de potencial carcinogénico cuando se trasplanta a ratones inmunodeficientes
- Estas células presentan marcadores de superficie diferentes del resto, que permite aislarlas mediante citometría de flujo
- Los tumores con origen en estas células presentan la heterogeneidad fenotípica completa del tumor primario.

Las células madre normales y las CSC comparten ciertas características como la autorenovación, la quiescencia, la multipotencialidad y la resistencia a fármacos; pero las CSC poseen un descontrol proliferativo, y la capacidad de invadir y propagarse. Aún no está claro si la CSC surge de una célula madre normal o si es una célula tumoral que adquiere las modificaciones de célula madre.

El modelo tradicional de progresión no es contradictorio con esta nueva hipótesis, pues las células madre son células de larga vida y por tanto con mayor capacidad de acumular las mutaciones necesarias para hacerlas carcinogénicas<sup>30</sup>.

Algunos grupos de investigación defienden también el concepto de “ Stem cell Network”<sup>31</sup>, que defiende que las células madre están funcionalmente relacionadas con una región anatómica, que se define durante el desarrollo embrionario (en ocasiones no coincidente con la anatomía convencional), y cuyo tamaño es inversamente proporcional al grado de complejidad morfológica o funcional del tejido; y dentro de la misma zona existirían marcadores comunes para las células madre que las permiten migrar de un lugar a otro. Bajo esta hipótesis se explican algunos fenómenos característicos de los CECC, difíciles de explicar de modo clásico, como que tumores de gran tamaño de pared posterior de hipofaringe no invaden el seno piriforme contiguo, o la ausencia de beneficio de programas de detección precoz en fumadores o bebedores.

### 1.3 BIOMARCADORES EN CECC

Los marcadores moleculares podrán ser útiles en múltiples objetivos en la práctica clínica como la detección temprana de los CECC, por ejemplo el enjuague bucal para detectar CD44 soluble mediante ELISA; bioquimioprevención, por ejemplo los retinoides; pero sobre todo, para la evaluación del riesgo y estadificación molecular.

La mayoría de los diagnósticos de CECC se realizan en estadios de enfermedad localmente avanzada, por lo que el tratamiento con intención curativa requiere un enfoque multidisciplinar, obteniendo tasas de curación aceptables pero que conllevan importante toxicidad a corto y largo plazo.

De ahí, que existe gran interés en la correcta selección de pacientes, para evitar tratamientos innecesarios. Adaptar el tratamiento según el perfil genético y molecular de un tumor en cada paciente individualmente, permitiría mejorar la supervivencia, complicaciones y evitar intervenciones innecesarias; por ejemplo, en los cuellos clínicamente N0, determinar los pacientes con alto riesgo de metástasis ganglionares ocultas y realizar un vaciamiento selectivo sólo en éstos; o como es el objetivo de este estudio, determinar qué pacientes presentan alto riesgo de desarrollar MD y será beneficioso el tratamiento sistémico; evitando el sobretratamiento y la morbilidad asociada en el resto de los pacientes.

### 1.3.1 Biomarcadores de metástasis en los CECC

La identificación de marcadores biológicos útiles clínicamente en los CECC no está tan bien definida como en otros tumores, como cáncer de mama o cáncer de pulmón, que nos han acercado a una medicina más personalizada.

Hay un número creciente de marcadores moleculares que potencialmente podrían utilizarse en los CECC. La mayoría de los estudios correlacionan la expresión de estas proteínas, determinado mediante inmunohistoquímica (IHQ), con la presencia metástasis linfáticas<sup>32</sup> pero son muy escasos los artículos centrados en la correlación de la expresión proteica con el desarrollo de MD.

Para el presente estudio se seleccionaron algunas proteínas cuya alteración de su función, por pérdida o por exceso, es clave en la cascada metastásica:

1. *Proteínas relacionadas con la pérdida de adhesión celular:*

- ✓ ***E-Cadherina:*** Miembro de la familia de cadherinas de tipo 1. Se encuentra en las uniones adherentes entre las células de tipo epitelial. Es una glicoproteína transmembrana que establece interacciones homofílicas calcio dependientes con las moléculas de la célula contigua. Su dominio citoplasmático se une a los miembros de la familia de las proteínas cateninas<sup>33</sup>. La expresión de E-cadherina o su localización en la superficie celular a menudo se pierde en los tumores avanzados y se ha relacionado en algunos casos a una mayor incidencia de metástasis y recurrencia tumoral.
  
- ✓ ***β – catenina y p-120 catenina:*** Interaccionan con el dominio citoplasmático de E-cadherina para unir el complejo multiproteína con el citoesqueleto de actina a través de α-catenina (Figura 4). La unión de β – catenina se produce poco después de la síntesis de E-cadherina y actúa con transporte de ésta a la membrana plasmática<sup>34</sup>; por el contrario la labor de p-120 es estabilizar los niveles de E-cadherina en la superficie celular controlando el tráfico a través de la membrana<sup>35</sup>. La disminución en la expresión de estas cateninas se ha encontrado en diferentes tipos tumorales asociada con mal pronóstico, ya sea relacionado a la pérdida E-cadherina o de modo independiente.

- ✓ **Anexina A2:** De la familia de las Anexinas, se caracteriza por su capacidad de unión a fosfolípidos en presencia de iones calcio. Se localiza como monómero libre en el citoplasma, en asociación con membranas intracelulares o en conexión con la cara externa de la membrana plasmática. Está implicada en múltiples funciones celulares fisiológicas<sup>36</sup>, por lo que su alteración también se ha relacionado con muchas patologías, entre ellas en la progresión tumoral, en los procesos de migración, invasión, adhesión y angiogénesis, tanto por defecto como por exceso de expresión.

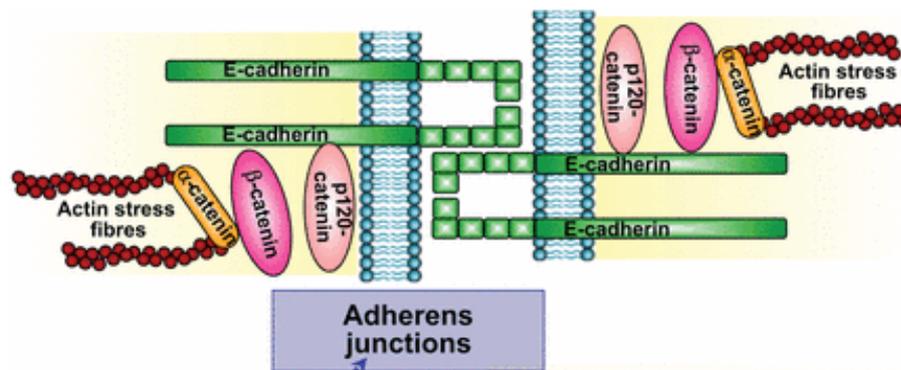


Figura 4: Complejo E-cadherina – Cateninas en la superficie de las células epiteliales

(Canel M. et al. E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. J Cell Sci. 2013 Jan 15;126 :393-401)

2. **Proteínas relacionadas con el aumento de la motilidad y la invasión:** Son las proteínas encargadas de la regulación del citoesqueleto de actina.

- ✓ **Quinasa de adhesión focal (FAK):** Receptor tirosin-quinasa citoplasmático, es considerado el mediador central de la familia de las integrinas, lo que permite el acoplamiento de éstas al citoesqueleto y la regulación de la migración celular. Pero en sus múltiples dominios, también interacciona con otras moléculas como

las metaloproteasas (MMP), por lo que participa en la degradación de la matriz extracelular; o en procesos de proliferación, angiogénesis a través de EGFR, p53, PI3K, VEGFR, etc. Los tejidos normales tienen baja expresión de FAK, mientras que los tumores primarios y metastásico sobreexpresan significativamente esta proteína. Datos previos del grupo ya demostraron FAK como marcador de metástasis ganglionares<sup>37</sup> y regulador de la invasión celular<sup>38</sup>.

- ✓ **Cortactina:** Proteína citoplasmática presente en todos los tipos celulares, tras activarse mediante la fosforilación, se une y estabiliza el complejo Arp 2/3 preexistente en los filamentos de actina ramificados dinámicos que se sitúan polarizados en la periferia de célula, permitiendo la migración celular, formación de lamelipodia e invadiopodia<sup>39</sup>. Cortactina se sobreexpresa en muchos tipos de cánceres humanos, lo más frecuente en asociación a la amplificación de la región cromosómica 11q13, que ocurre en el 30%-40% de los CECC, y se correlaciona con mal pronóstico del paciente, y disminución de la supervivencia<sup>40</sup>. En un estudio prospectivo realizado en nuestro grupo se demostró que tanto la expresión como la amplificación del número de copias génicas se asocian con invasión loco-regional y presencia de metástasis ganglionares<sup>41</sup>. Más recientemente hemos sido pioneros demostrando el papel de Cortactina en etapas tempranas de la carcinogénesis y su potencial como marcador de riesgo de cáncer<sup>42</sup>.

- ✓ **AMAP1:** Es una proteína efectora con actividad GTPasa que se une a los sitios de activación de Arf6 en la membrana y en las vesículas citoplasmáticas cuando se activa por EGF, y el conjunto participa en fenómenos de invasión<sup>43</sup>. La sobreexpresión de AMAP1 se ha detectado en cáncer con patrón de alta agresividad y alteración de la vía EGFR-GEP100-Arf6-AMAP1-Cortactina en los CECC como marcador de mal pronóstico<sup>44</sup>.

### 3. *Proteínas relacionadas con la proliferación y el control del ciclo celular:*

- ✓ **EGFR:** Receptor del factor de crecimiento epitelial, es una tirosin-quinasa miembro de la familia ErbB, que trasmite señales de crecimiento cuando es estimulado por alguno de sus ligandos (TGF $\alpha$  o EGF). En los tejidos sanos la disponibilidad de ligandos está estrictamente regulada para asegurar que la proliferación celular coincida con los requisitos necesarios de los tejidos, pero en el cáncer EGFR se mantiene estimulada de manera perpetua, o por una sobreproducción de ligandos en el microambiente del tumor o por una mutación del propio EGFR que lo mantiene constitutivamente activo. El aumento de su actividad incrementa el crecimiento tumoral, la invasión y metástasis<sup>45</sup>; la expresión aberrante de EGFR en los tumores produce un fenotipo más agresivo. Por su implicación general en la carcinogénesis EGFR se ha convertido en una de las principales dianas terapéuticas en CECC y otros cánceres.

- ✓ **AKT:** También denominada protein-quinasa B (PKB), funciona como molécula de señalización intermedia que regula la supervivencia celular, proliferación e invasión, así como el metabolismo de la glucosa y la angiogénesis. Muchas investigaciones implican la desregulación de AKT en tumores sólidos, tumores hematológicos e incluso en síndromes de predisposición al cáncer de herencia dominante<sup>46</sup>. AKT interacciona con múltiples moléculas, pero es conocido por ser componente central de la vía de señalización EGFR-PI3K-AKT-mTOR, que controla el crecimiento celular mediante la regulación de la biogénesis ribosomal y la traducción del ARNm<sup>47</sup>. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio demuestran que esta vía es una de las más frecuentemente alteradas en CECC<sup>48</sup>. Además AKT puede promover la transición epitelio-mesénquima (EMT) e inducir la invasión y metástasis por la secreción de metaloproteasas de la matriz<sup>49</sup>.
  
- ✓ **Proteína p16:** Codificada por el gen supresor de tumores *CDKN2A* localizado en el cromosoma 9p21, reduce la tasa del ciclo celular mediante la inactivación de complejos específicos de quinasa dependientes de proteínas ciclina, como CDK4 y CDK6. Las CDK fosforilan la proteína del retinoblastoma (pRb), lo que resulta en un cambio conformacional que conduce a la progresión del ciclo celular. La inactivación de cualquiera de ambas proteínas, p16 o pRb, permite a la célula entrar en fase S después de sólo una pausa en el punto de control G1<sup>50</sup>. En los CECC relacionados con el tabaco generalmente existe una pérdida de expresión por hipermetilación, sin embargo en los relacionados con el VPH la expresión de

p16 se halla aumentado por pérdida de la regulación negativa de pRb. Cambios en la expresión de p16 determinan importante valor pronóstico<sup>51</sup>.

- ✓ **P53:** Aproximadamente la mitad de los CECC tienen mutaciones en el gen supresor de tumores *TP53*, situado en el cromosoma 17p13. Desde hace años se conoce su papel en la regulación del ciclo celular; su principal función es la detención del ciclo celular en G1 en caso de daño en el ADN para intentar la reparación y si el daño no puede ser reparado dirigir la célula a la apoptosis o la senescencia. Actualmente algunos estudios han relacionado la pérdida de expresión de p53 como promotor de la invasión y migración de las células tumorales, fundamentalmente por mutaciones de p53 con capacidad para inhibir otras proteínas de la misma familia, como p63 y p73<sup>52</sup>.
  
- ✓ **HERG1:** Es la versión humana de ERG, una de las subunidades que comprende la familia EAG de canales de potasio dependientes de voltaje<sup>53</sup>. En los últimos años se ha demostrado la importancia de los canales de potasio en relación a múltiples patologías<sup>54</sup>; entre ellas, el desarrollo y progresión del cáncer, ya que promueve la proliferación celular y la invasividad; además de controlar cascadas de señalización intracelular. Nuestro grupo ha sido pionero demostrando el papel de HERG1 en el inicio y progresión tumoral en CECC. Su expresión se asocia con agresividad tumoral (metástasis ganglionares, recurrencias) y menor supervivencia<sup>55</sup>.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



Asumiendo que el fenómeno metastásico es un proceso multietapa, al igual que la carcinogénesis, el conocimiento de las alteraciones moleculares implicadas en cada uno de los pasos de este proceso nos permitiría identificar biomarcadores en el tumor primario que indicasen el mayor o menor riesgo de desarrollar metástasis a distancia. Esto permitiría una selección más adecuada de pacientes, para adaptar el tratamiento y el seguimiento de modo individualizado, evitando intervenciones y toxicidades innecesarias.

El objetivo general de este trabajo es identificar, mediante el estudio de la expresión proteica de varias moléculas implicadas en etapas claves del proceso metastásico, posibles biomarcadores de alto riesgo de desarrollo de metástasis a distancia en los carcinomas epidermoides de laringe e hipofaringe. Esto se desarrollará en los siguientes objetivos específicos:

1. Estudio de la expresión de las proteínas E-cadherina,  $\beta$  – catenina, p120 catenina, Anexina A2, FAK, Cortactina, EGFR, AKT, AMAP1, HERG1, p53 y p16; en dos grupos de pacientes con carcinoma epidermoide de laringe y de hipofaringe que hayan desarrollado o no metástasis a distancia.
2. Análisis de la expresión de las proteínas estudiadas en relación con el desarrollo de metástasis a distancia.
3. Identificación de un perfil de expresión proteica indicativo de un mayor riesgo de metástasis a distancia.



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS



## 3.1 Selección de pacientes

Se planteó un estudio de casos y controles retrospectivo, seleccionando un grupo de pacientes que desarrollaron MD durante el seguimiento (casos), y comparándolo con otro libre de metástasis durante un mínimo de 3 años (controles).

Los criterios básicos de inclusión en el estudio fueron: pacientes diagnosticados de carcinoma epidermoide de hipofaringe y de laringe en estadio IV (según la clasificación TNM recomendada por la "International Union Against Cancer" en su 7ª edición de 2010), tratados quirúrgicamente, y con márgenes negativos, y que no hubiesen recibido tratamiento previo con radioterapia y/o quimioterapia.

De un total de 494 pacientes con CECC intervenidos entre enero de 1999 y diciembre del 2006 en el servicio de ORL del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), se seleccionaron 44 para el grupo de casos, y otros 44 para formar el grupo control. Del total de 88 pacientes seleccionados, cinco eran mujeres, la edad media era de 59 años (rango 36-80 años) y con la distribución de las características clinicopatológicas que se recoge en la Tabla 1. En la selección del grupo control se procuró que fuese similar en características al grupo casos, prestándose especial atención a la clasificación N, pues es la característica patológica que más influencia tiene en el desarrollo de MD.

El Comité de Ética del Hospital Universitario Central de Asturias aprobó el protocolo del estudio, y todos los pacientes prestaron el consentimiento informado por escrito.

Durante el seguimiento, los pacientes se revisaron mensualmente durante los 6 primeros meses después de finalizar el tratamiento, cada 2 meses hasta finalizar el primer año,

cada 3 meses hasta el tercer año y posteriormente una revisión cada 6 meses. En las revisiones se les realizaba una exploración física, y radiografía de tórax, realizándose otras pruebas como ecografía hepática, TC o RMN según la situación clínica del paciente.

Ante la sospecha de lesión tumoral en diferente localización, si era posible, se recogieron muestras histológicas para estudio anatomopatológico. Definiendo como MD aquellas con el mismo tipo celular, o cuando no existía evidencia de otro tumor primario.

*Tabla 1: Distribución las variables clínico- patológicas de los pacientes*

| Características<br>Histopatológicas | Grupo CASOS<br>(MD) | Grupo CONTROL<br>(No MD) | $p < 0,05$ |
|-------------------------------------|---------------------|--------------------------|------------|
| <b>Localización</b>                 |                     |                          |            |
| Hipofaringe                         | 31 (70%)            | 24 (54%)                 | 0,19       |
| Laringe                             | 13 (30%)            | 20 (64%)                 |            |
| <b>Clasificación T</b>              |                     |                          |            |
| T1-T2                               | 8 (18%)             | 11 (25%)                 | 0,34       |
| T3                                  | 15 (34%)            | 9 (20%)                  |            |
| T4                                  | 21 (47%)            | 24 (55%)                 |            |
| <b>Clasificación N</b>              |                     |                          |            |
| N0                                  | 5 (11%)             | 6 (14%)                  | 0,9        |
| N1-3                                | 39 (89%)            | 38 (86%)                 |            |
| <b>Clasificación G</b>              |                     |                          |            |
| G1                                  | 6 (14%)             | 12 (27%)                 | 0,26       |
| G2                                  | 22 (50%)            | 20 (46%)                 |            |
| G3                                  | 16 (36%)            | 12 (27%)                 |            |

## 3.2 Elaboración de matrices de tejido ("Tissue Arrays")

Con el soporte técnico de la Unidad de Apoyo de Anatomía Patológica del IUOPA se elaboraron matrices de tejido ("tissue arrays") a partir de bloques de tejido parafinado de la serie de 88 carcinomas epidermoides faringolaríngeos. Para ello, a partir de tinciones simples de hematoxilina-eosina sobre cortes completos de cada bloque de tejido parafinado, se seleccionaron las áreas más representativas del tumor. Los "tissue arrays" se construyeron tomando tres cilindros (1 mm de diámetro) de cada bloque de parafina para insertarlos de forma precisa en un bloque receptor de parafina, agrupando unos 30 casos en cada bloque. Como control, cada "array" también incluía muestras de epitelio sano. El análisis inmunohistoquímico se realizó en secciones seriadas de 3 micras y el resultado de la cuantificación fue el promedio de la tinción observada en las tres áreas representativas de cada tumor.

## 3.3 Análisis Inmunohistoquímico

Secciones seriadas de 3  $\mu\text{m}$  de cada "tissue array" fueron adheridas en portas Flex IHC microscope (Dako), desparafinadas con xileno e hidratadas en concentraciones graduales decrecientes de alcohol y agua. A continuación se llevó a cabo el desenmascaramiento de los antígenos utilizando: solución EnVision Flex Retrieval (Dako) a pH bajo (pH 6.1) en el PT Link para ANXA2 y p120; proteínasa K para EGFR, AMAP1 y HERG1; y solución EnVision Flex Retrieval (Dako) a pH alto (pH 9.0) para el resto de proteínas. La tinción de las secciones se realizó a temperatura ambiente en una estación de trabajo automatizada (Dako Autostainer Plus) utilizando los anticuerpos primarios comerciales y diluciones recogidos en la Tabla 2, y como

sistema de visualización el kit EnVision Flex+ (Dako). Como último paso se contrasta la preparación mediante hematoxilina durante 8 minutos. Después de la tinción, las preparaciones fueron deshidratadas mediante alcoholes de graduación ascendente según el método convencional y montadas con un cubreobjetos usando un medio estándar.

*Tabla 2: Anticuerpos y diluciones utilizados en el análisis inmunohistoquímico*

| <u>PROTEINA</u>                             | <u>Anticuerpo primario (casa comercial)</u>             | <u>Dilución</u> |
|---|---|-----------------|
| EGFR  | PharmDx kit (Dako)                                      | Prediluido      |
| p53   | Monoclonal de ratón Clon DO-7 (Dako)                    | 1:10            |
| Cortactina                                  | Monoclonal de ratón Clon 30 (BD Biosciences Pharmingen) | 1:200           |
| ANXA2                                       | Monoclonal de ratón Clon 5 (BD Biosciences Pharmingen)  | 1:450           |
| E-cadherina                                 | Monoclonal de ratón Clon NCH-38 (Dako)                  | 1:25            |
|   | Ig de ratón G2a (BD Biosciences)                        | 1:4000          |
| $\beta$ – catenina (nuclear/<br>membranosa) | Ig de ratón G1 (BD Biosciences)                         | 1:200           |
| p120  | Ig de ratón G1 (BD Biosciences)                         | 1:100           |
| FAK   | Monoclonal de ratón Clon 4.47 (Upstate Biotechnology)   | 1:250           |
| AMAP1                                       | Anti-ASAP1 policlonal de conejo (Abcam)                 | 1:750           |
| p-AKT                                       | Monoclonal de conejo Clon 14-5 (Dako)                   | 1:20            |
| p16   | Anti- p16 INK4a humano (CINTEC)                         | Prediluido      |
| HERG1                                       | Policlonal de conejo pan (CT) (Enzo Life Sciences)      | 1:200           |

La inmunotinción fue valorada sin datos clínicos y de forma independiente por dos investigadores. Actualmente no existe ningún método validado para cuantificar e interpretar los resultados del análisis de la expresión proteica mediante IHQ en el caso de los marcadores seleccionados.

Dado que la expresión de Cortactina, AMAP1, FAK y HERG1 mostraba un patrón de distribución citoplasmático homogéneo, se empleó un sistema semicuantitativo para valorar la inmunotinción, en base a la intensidad de la tinción como negativa (0), débil (1+), moderada (2+) o intensa (3+). Posteriormente se dicotomizó en casos con expresión negativa (0/1) y casos positivos (2/3).

En p16 la escala de intensidad de tinción sólo constaba de 3 valores: negativo (0, ausencia de tinción), débil (1, tinción nuclear débil) e intenso (2, tinción nuclear y citoplasmática intensa en más del 75% de las células).

La expresión de EGFR se cuantificó en una escala de 0 a 4 según el porcentaje de células tumorales positivas de 0-25%, de 26-50%, de 51-75% y de 76-100%, respectivamente; y la intensidad de la tinción en una escala de 0 a 3 (0= negativo, 1= débil, 2= moderado, 3= intenso). Estos datos se convirtieron en un IRS (del inglés "Immunoreactive Score") multiplicando el porcentaje por la intensidad de la tinción, obteniendo valores entre 0 y 12 puntos. De modo final, una puntuación IRS por encima de la mediana (5 o superior) se consideró alta inmunorreactividad, y IRS por debajo (5 o inferior) baja inmunorreactividad.

Para p53, p-AKT, E-cadherina,  $\beta$  – catenina, p120 y ANXA2, se utilizó una escala semicuantitativa en función del porcentaje de células teñidas (0%, <10%, de 10 a 50%, >50%). En el caso de p53 se consideró valorable la tinción nuclear, en el de p-AKT la tinción citoplasmática, y en el resto a nivel de membrana. Para realizar el análisis estadístico, la

expresión se divide escogiendo como punto de corte el 10% de células teñidas. En el caso de  $\beta$  – catenina se cuantifico además la ausencia o presencia de tinción nuclear, considerándose también positivos los casos con más del 10% de células con esta tinción. En la Tabla 3 se resumen los criterios de cuantificación empleados.

Tabla 3: Escalas de cuantificación de la expresión proteica mediante IHQ

| <u>Proteína</u>                          | <u>Escala de Cuantificación</u>   |
|--|---|
| Cortactina                               | Escala semicuantitativa según intensidad de tinción:<br><br>0-negativa/ 1-debil<br><br>2- moderada/3-intensa<br><br><i>Expresión positiva: 2-3</i>          |
| AMAP1                                    |   |
| FAK                                      |   |
| HERG1                                    |   |
| EGFR                                     | Escala según % células teñidas (0-4)<br><br>Escala según % Intensidad de tinción (0-3)<br><br>Escala: IRS (0-12)<br><br><i>Expresión positiva: IRS&gt;5</i> |
| p53                                      | Escala semicuantitativa según % células teñidas:<br><br>(0%, <10%, de 10 a 50%, >50%)<br><br><i>Expresión positiva si &gt;10% tinción</i>                   |
| p-AKT                                    |   |
| E- Cadherina                             |   |
| $\beta$ - catenina (nuclear/ membranosa) |   |
| p120                                     |   |
| ANXA2                                    | Escala semicuantitativa según intensidad de tinción :<br><br>0-negativa/ 1-debil/ 2- intensa<br><br><i>Expresión positiva: 2</i>                            |
| p16                                      |   |

## 3.4 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa estadístico SPSS versión 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL.). El test Chi-cuadrado ha sido utilizado para la comparación entre variables cualitativas (con la corrección de Yates cuando era preciso) y el test T-student para variables paramétricas continuas.

Para los análisis de los eventos en relación al tiempo se ha empleado el método de Kaplan-Meier. Las diferencias entre las curvas de Kaplan-Meier se analizaron mediante el método de rangos logarítmicos. Para valorar el impacto relativo de las variables que resultaron significativas en el estudio univariante se realizó un estudio multivariante empleando los modelos de regresión de Cox.

Todos los test fueron bilaterales. Valores de  $p \leq 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.



## 4. RESULTADOS



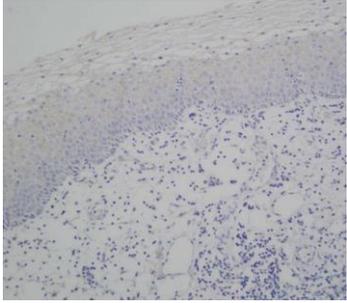
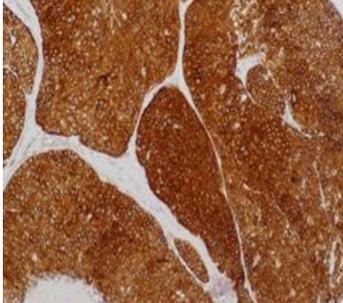
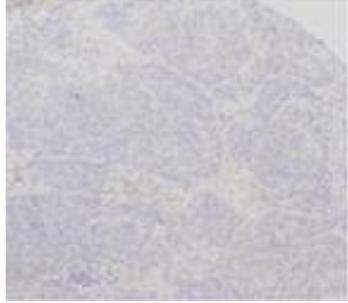
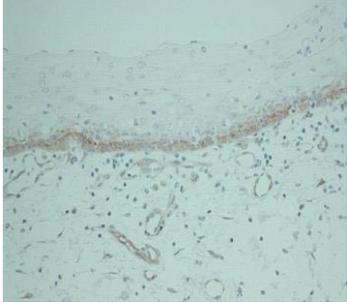
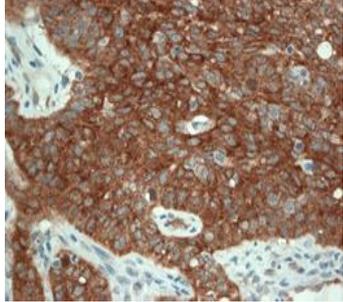
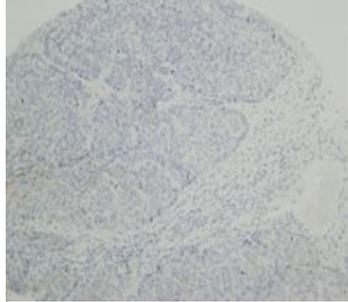
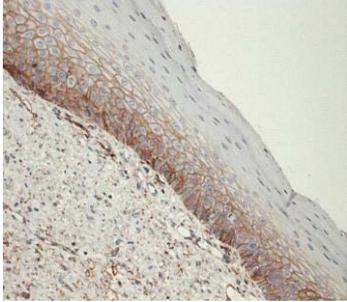
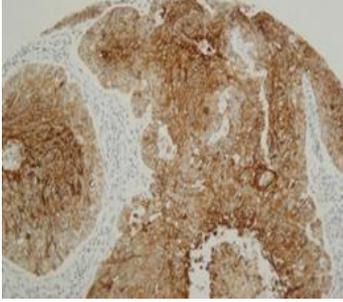
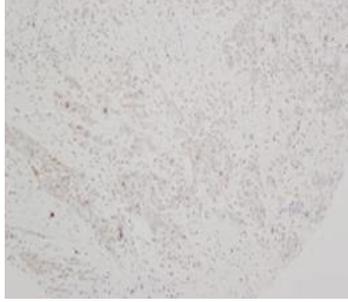
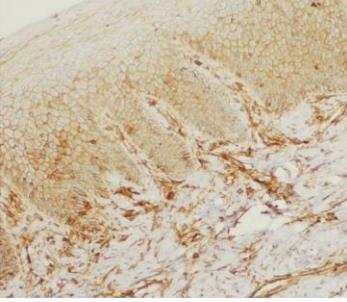
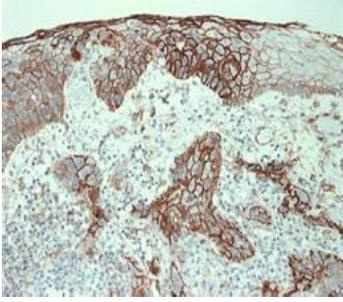
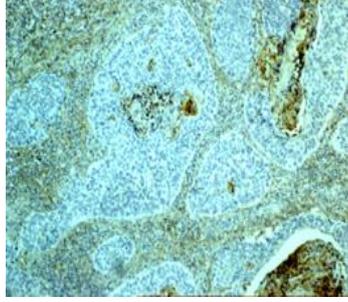
## 4.1 Expresión de las proteínas estudiadas en los carcinomas de hipofaringe y laringe

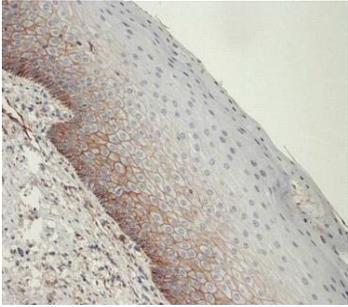
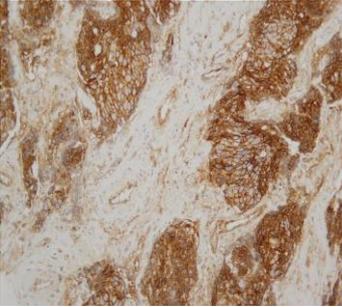
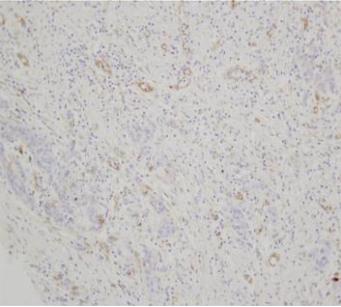
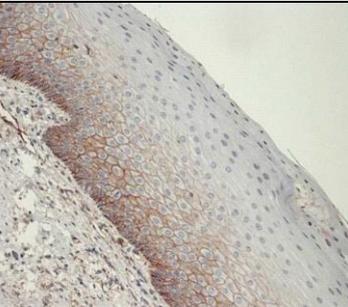
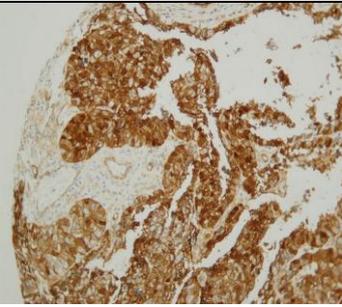
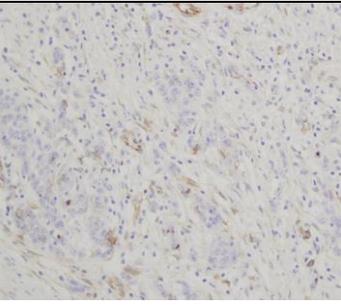
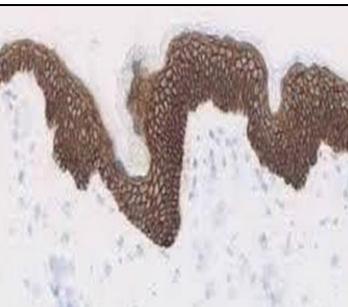
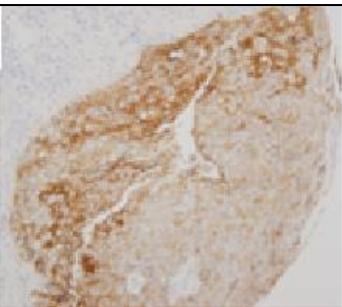
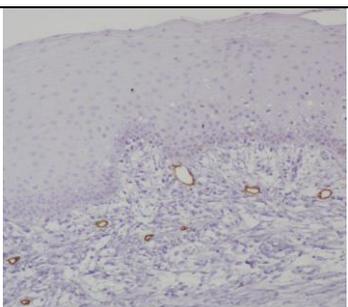
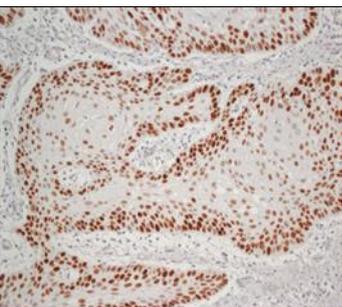
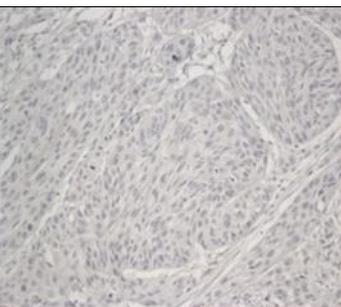
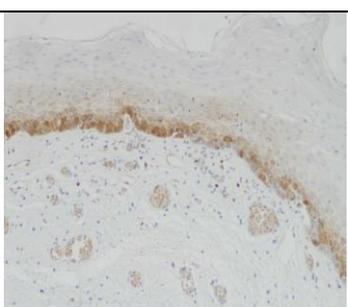
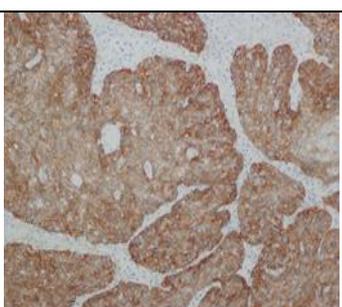
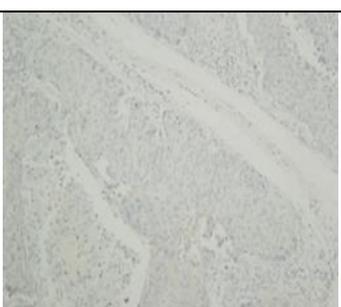
En el tejido tumoral, Cortactina, AMAP1 y FAK presentaron una tinción fundamentalmente citoplasmática, y de modo ocasional también en la membrana, de forma generalmente homogénea, mientras que en la mucosa sana faríngea la expresión de estas proteínas era débil en la capa basal y suprabasal y negativa en las capas superficiales más diferenciadas (Figura 5). Patrón inverso al mostrado por EGFR, con tinción fundamentalmente en membrana y de modo ocasional en citoplasma; en la mucosa normal esta proteína muestra una expresión débil en las células basales.

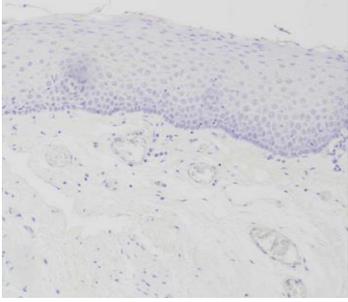
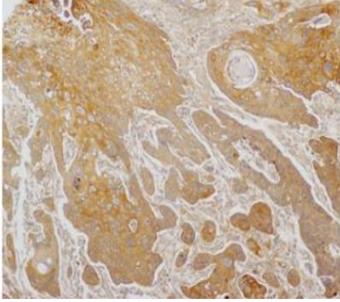
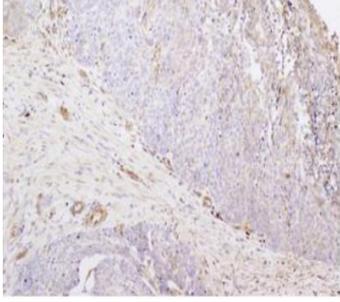
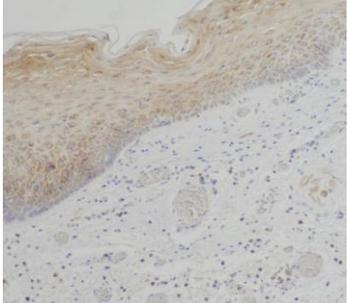
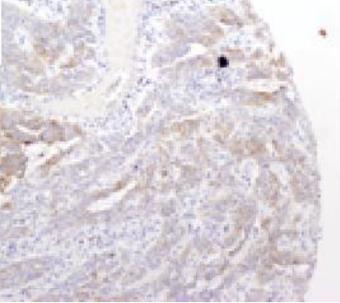
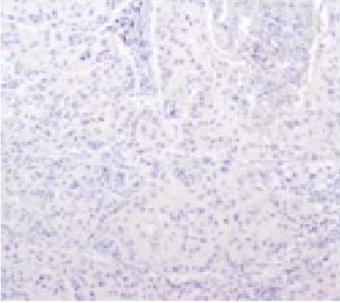
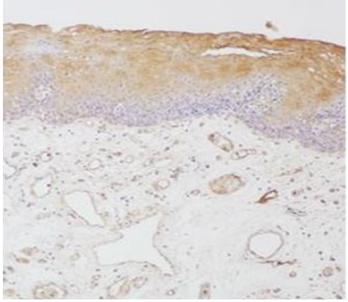
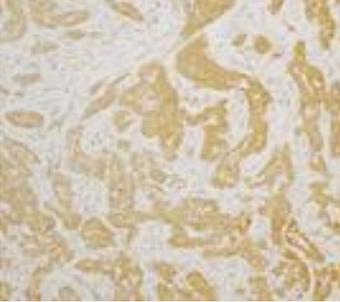
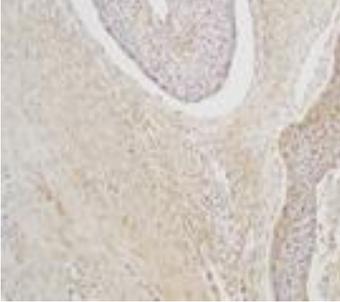
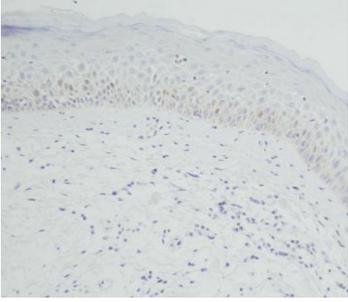
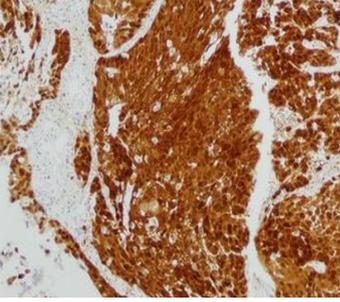
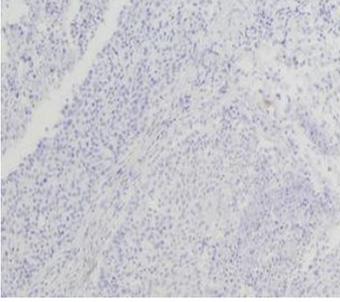
Las proteínas E- Cadherina,  $\beta$ - catenina, p120, y ANXA2 mostraron un patrón de tinción membranoso en las células tumorales, característicamente heterogéneo, mientras que en el epitelio normal estas proteínas se expresan en células de capas basales y suprabasales, con falta de tinción en capas más externas y diferenciadas (Figura 5). En el caso de la  $\beta$ - catenina, algunos tumores mostraban tinción nuclear, generalmente coincidente con una ausencia de tinción membranosa.

La proteína p53 presentó una tinción nuclear heterogénea en la masa tumoral, y no se expresaba en la mucosa faríngea normal; p-AKT mostraba una tinción citoplasmática también heterogénea, con ausencia de expresión en el epitelio normal (Figura 5); y p16 una tinción nuclear y citoplasmática en el tumor, mientras el epitelio normal mostraba una tinción nuclear débil en capas suprabasales.

Figura 5: Imágenes de IHQ representativas de la expresión positiva/negativa de las proteínas estudiadas.

| PROTEINA                 | MUCOSA NORMAL   | EXPRESIÓN POSITIVA   | EXPRESIÓN NEGATIVA  |
|--------------------------|---|--|---|
| CORTACTINA               |    |    |    |
| FAK                      |   |   |   |
| E-CADHERINA<br>(Dako Ac) |  |  |  |
| ANXA2                    |  |  |  |

|   |   |  |   |
|---|---|--|---|
| <p><math>\beta</math>-CATENINA<br/>membranosa</p> |    |    |    |
| <p><math>\beta</math>-CATENINA<br/>nuclear</p>    |    |    |    |
| <p>p120</p>                                       |   |   |   |
| <p>p53</p>  |  |  |  |
| <p>EGFR</p>                                       |  |  |  |

|       |   |  |   |
|-------|---|--|---|
| AMAP1 |    |    |    |
| p-AKT |    |    |    |
| HERG1 |   |   |   |
| p16   |  |  |  |

La expresión de estas proteínas en los casos analizados fue dicotomizada según lo descrito previamente, y los resultados se muestran en la Tabla 5. Hay que tener en cuenta que para algunas proteínas no se dispone de resultados para todos los casos por problemas con la calidad de la tinción y/o integridad del tejido, por lo que fueron consideradas no valorables.

Tabla 5: Resultados de la expresión de las proteínas estudiadas en el total de la serie

| Expresión Proteica                           | Total de eventos | % de expresión |
|--|------------------|----------------|
| <b>Cortactina</b>                            |                  |                |
| - <i>Negativa</i> : Nula/Débil               | 39               | 45%            |
| - <i>Positiva</i> : Moderada/Intensa         | 47               | 55%            |
| <b>FAK</b>                                   |                  |                |
| - <i>Negativa</i> : Nula/Débil               | 24               | 28%            |
| - <i>Positiva</i> : Moderada/Intensa         | 63               | 72%            |
| <b>AMAP1</b>                                 |                  |                |
| - <i>Negativa</i> : Nula/Débil               | 35               | 41%            |
| - <i>Positiva</i> : Moderada/Intensa         | 51               | 59%            |
| <b>EGFR</b>                                  |                  |                |
| - <i>Negativa</i> : IRS $\leq$ 5             | 57               | 64%            |
| - <i>Positiva</i> : IRS $>$ 5                | 31               | 35%            |
| <b>E-cadherina</b>                           |                  |                |
| - <i>Negativa</i> : Menos del 10% de células | 24               | 27%            |
| - <i>Positiva</i> : Más del 10% de células   | 64               | 73%            |
| <b>ANXA2</b>                                 |                  |                |
| - <i>Negativa</i> : Menos del 10% de células | 42               | 50%            |
| - <i>Positiva</i> : Más del 10% de células   | 43               | 50%            |
| <b>p53</b>                                   |                  |                |
| - <i>Negativa</i> : Menos del 10% de células | 37               | 43%            |
| - <i>Positiva</i> : Más del 10% de células   | 50               | 57%            |

|  |    |     |
|--|----|-----|
| <b>p-AKT</b>                                 |    |     |
| - <i>Negativa</i> : Menos del 10% de células | 42 | 51% |
| - <i>Positiva</i> : Más del 10% de células   | 40 | 49% |
| <b>HERG1</b>                                 |    |     |
| - <i>Negativa</i> : Nula/Débil               | 4  | 5%  |
| - <i>Positiva</i> : Moderada/Intensa         | 82 | 95% |
| <b>p16</b>                                   |    |     |
| - <i>Negativa</i> : Nula/Débil               | 79 | 92% |
| - Positivo: Intenso                          | 7  | 8%  |
| <b>β – catenina (nuclear)</b>                |    |     |
| - <i>Negativa</i> : Menos 10% de células     | 79 | 90% |
| - <i>Positiva</i> : Más del 10% de células   | 9  | 10% |
| <b>β – catenina (membranosa)</b>             |    |     |
| - <i>Negativa</i> : Menos del 10% de células | 21 | 24% |
| - <i>Positiva</i> : Más del 10% de células   | 67 | 76% |
| <b>p120</b>                                  |    |     |
| - <i>Negativa</i> : Menos del 10% de células | 14 | 16% |
| - <i>Positiva</i> : Más del 10% de células   | 74 | 84% |

Estos resultados demuestran que además de diferencias en los patrones de expresión entre tejido sano y tejido tumoral, para las proteínas analizadas también existen importantes diferencias cuantitativas. Así la expresión de HERG1 fue moderada o intensa en casi la totalidad de las muestras tumorales; caso contrario al de p16 cuya expresión resultó negativa en más del 90% de las muestras. En el caso de β – catenina, observamos importantes diferencias dependiendo de la localización de la tinción, predominantemente membranosa (76%) y muy

escasa en el núcleo (10%). Encontramos niveles similares de  $\beta$  – catenina membranosa y p120 catenina, lo cual resulta lógico dada la relación funcional que existe entre ambas proteínas.

## 4.2 Expresión de las proteínas estudiadas en relación con el desarrollo de metástasis a distancia

Se analizó la expresión, dicotomizada según se explicó de cada una de las proteínas seleccionadas, correlacionándolo con el desarrollo o no de MD durante el seguimiento del paciente; los resultados se recogen en la Tabla 6.

Tabla 6: Relación de la expresión de cada proteína y el desarrollo de MD.

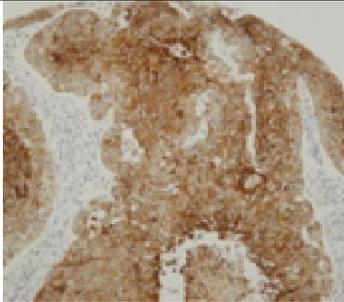
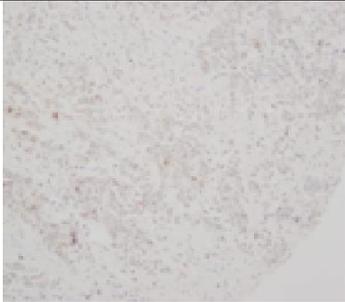
| <u>Expresión Protéica</u>                  | <u>Casos</u>  | <u>Controles</u> | <u>p</u> |
|--|---------------|------------------|----------|
|  | <u>Con MD</u> | <u>Sin MD</u>    |          |
| <b>Cortactina</b>                          |               |                  |          |
| - <i>Negativa</i> : Nula/Débil             | 21 (49%)      | 18 (42%)         | 0,66     |
| - <i>Positiva</i> : Moderada/Intensa       | 22 (51%)      | 25 (58%)         |          |
| <b>FAK</b>                                 |               |                  |          |
| - <i>Negativa</i> : Nula/Débil             | 10 (23%)      | 14 (32%)         | 0,47     |
| - <i>Positiva</i> : Moderada/Intensa       | 33 (76%)      | 30 (68%)         |          |
| <b>AMAP1</b>                               |               |                  |          |
| - <i>Negativa</i> : Nula/Débil             | 19 (44%)      | 16 (37%)         | 0,66     |
| - <i>Positiva</i> : Moderada/Intensa       | 24 (56%)      | 27 (63%)         |          |
| <b>EGFR</b>                                |               |                  |          |
| - <i>Negativa</i> : IRS ≤ 5                | 26 (60%)      | 30 (68%)         | 0,51     |
| - <i>Positiva</i> : IRS > 5                | 17 (40%)      | 14 (32%)         |          |
| <b>E-cadherina (Dako)</b>                  |               |                  |          |
| - <i>Negativa</i> : Menos 10% de células   | 16 (37%)      | 8 (18%)          | 0,057    |
| - <i>Positiva</i> : Más del 10% de células | 27 (63%)      | 36 (82%)         |          |
| <b>E- Cadherina (BD)</b>                   |               |                  |          |
| - <i>Negativa</i> : Menos 10% de células   | 13 (30%)      | 4 (9%)           | 0,029    |
| - <i>Positiva</i> : Más del 10% de células | 31 (70%)      | 40 (90%)         |          |
| <b>ANXA2</b>                               |               |                  |          |
| - <i>Negativa</i> : Menos 10% de células   | 26 (60%)      | 16 (38%)         | 0,052    |
| - <i>Positiva</i> : Más del 10% de células | 17 (40%)      | 26 (62%)         |          |

|  |          |          |       |
|--|----------|----------|-------|
| <b>p53</b>                                 |          |          |       |
| - <i>Negativa</i> : Menos 10% de células   | 19 (47%) | 23 (55%) | 0,66  |
| - <i>Positiva</i> : Más del 10% de células | 21 (53%) | 19 (45%) |       |
| <b>p-AKT</b>                               |          |          |       |
| - <i>Negativa</i> : Menos 10% de células   | 20 (45%) | 17 (39%) | 0,66  |
| - <i>Positiva</i> : Más del 10% de células | 24 (55%) | 26 (41%) |       |
| <b>HERG1</b>                               |          |          |       |
| - <i>Negativa</i> : Nula/Débil             | 1 (2%)   | 3 (7%)   | 0,61  |
| - <i>Positiva</i> : Moderada/Intensa       | 42 (98%) | 40 (93%) |       |
| <b>p16</b>                                 |          |          |       |
| - <i>Negativa</i> : Nula/Débil             | 39 (91%) | 40 (93%) | 1     |
| - <i>Positiva</i> : Intensa                | 4 (9%)   | 3 (7%)   |       |
| <b>β – catenina (nuclear)</b>              |          |          |       |
| - <i>Negativa</i> : Menos 10% de células   | 38 (86%) | 41 (93%) | 0,484 |
| - <i>Positiva</i> : Más del 10% de células | 6 (14%)  | 3 (7%)   |       |
| <b>β – catenina (membranosa)</b>           |          |          |       |
| - <i>Negativa</i> : Menos 10% de células   | 13 (30%) | 8 (18%)  | 0,317 |
| - <i>Positiva</i> : Más del 10% de células | 31 (70%) | 36 (82%) |       |
| <b>p120</b>                                |          |          |       |
| - <i>Negativa</i> : Menos 10% de células   | 10 (23%) | 4 (9%)   | 0,143 |
| - <i>Positiva</i> : Más del 10% de células | 34 (77%) | 40 (91%) |       |

Como se aprecia en la tabla, la mayoría de estas proteínas no mostraron relación con el desarrollo de MD, sólo la pérdida de expresión de E- Cadherina; y la pérdida de expresión de ANXA2 (considerando como tal la expresión en menos del 10% de las células), presentaron una asociación con el desarrollo de MD muy cercana a la significación estadística ( $p < 0,05$ ).

Para corroborar los resultados obtenidos en esta primera fase, se repitió el análisis inmunohistoquímico de la proteína E-Cadherina utilizando un anticuerpo diferente, de BD Biosciences (Figura 6). Este anticuerpo reconoce específicamente el dominio intracelular de E-Cadherina, que se considera implicado funcionalmente en la regulación de la migración celular y transición epitelio-mesénquima (EMT).

*Figura 6: Imágenes de IHQ para E-Cadherina (BD Biosciences)*

| PROTEINA                | EXPRESIÓN POSITIVA  | EXPRESIÓN NEGATIVA   |
|-------------------------|---|--|
| E- CADHERINA<br>(BD Ac) |  |  |

Los resultados obtenidos con este nuevo anticuerpo confirmaron la asociación estadísticamente significativa entre la pérdida de E-Cadherina y el desarrollo de MD ( $p = 0,029$ ), Tabla 6. También se encontró una correlación significativa al comparar la expresión de E-Cadherina detectada con ambos anticuerpos (Spearman rho 0,54,  $p < 0,001$ ).

Además la expresión de E-Cadherina correlacionaba significativamente con la expresión de  $\beta$  - catenina y p120 (Spearman rho  $p < 0,001$ ), como cabía esperar dada la relación funcional entre estas tres proteínas.

Posteriormente, se analizó mediante gráficas de Kaplan-Meier la relación entre la expresión de cada una de las proteínas y la supervivencia libre de metástasis a distancia, confirmando los resultados obtenidos previamente. Así, solamente, la pérdida de expresión de E-cadherina mostró una fuerte asociación con una menor supervivencia libre de metástasis a distancia, tanto con el anticuerpo Dako, con un valor de  $p = 0,007$  (Figura 7), como con el anticuerpo BD, con un valor de  $p = 0,002$  (Figura 8). La pérdida de Anexina A2 también mostraba una asociación próxima a la significación estadística, con  $p = 0,06$  (Figura 9).

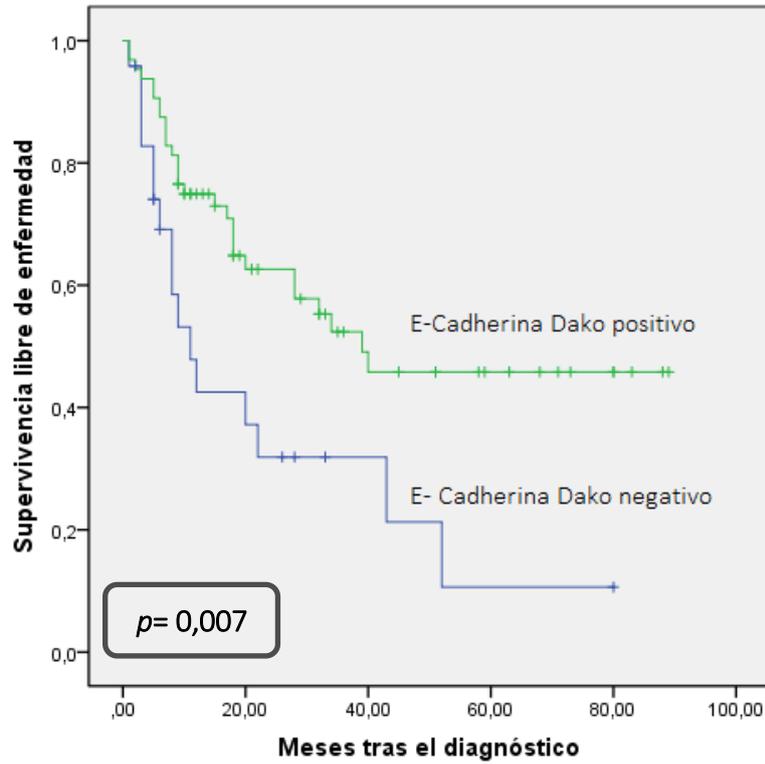


Figura 7: Supervivencia libre de MD en función de la expresión de E-Cadherina (Acs Dako)

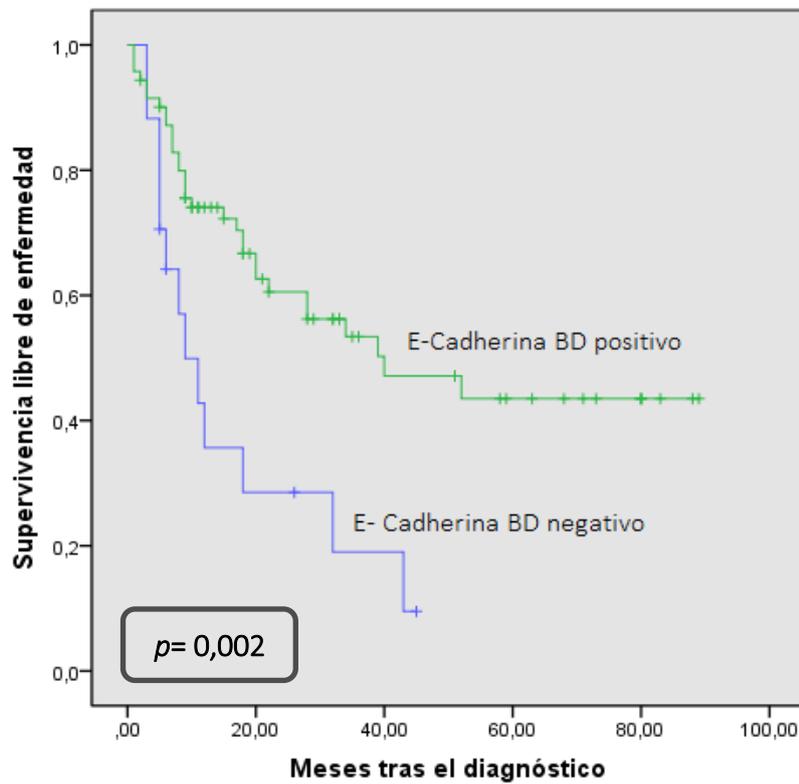


Figura 8: Supervivencia libre de MD en función de la expresión de E-Cadherina (Acs de BD)

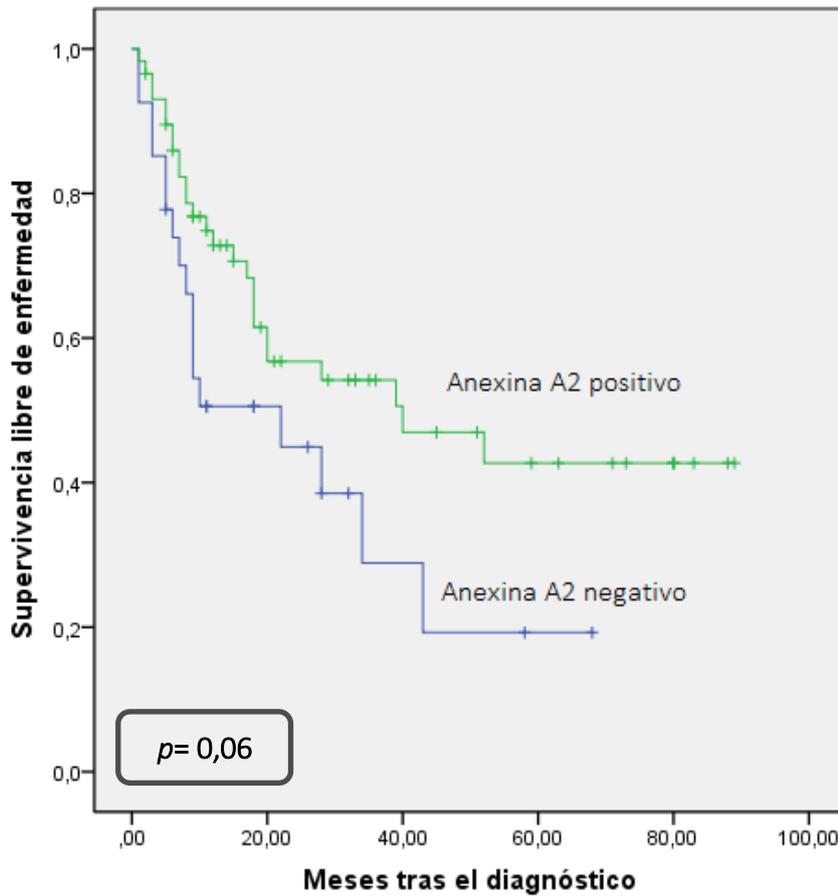


Figura 9: Supervivencia libre de MD en función de la expresión de ANXA2

Sin embargo al aplicar el análisis multivariante a estos datos, el único parámetro que se correlacionó de modo significativo con mayor riesgo de desarrollo de MD fue la pérdida de expresión de E-Cadherina (RR=2,65, 95% IC 1,34 a 5,22;  $p=0,005$ ). La combinación de la pérdida de expresión de ambas proteínas E- Cadherina y ANXA2 no demostró ser superior a la pérdida individual de E-Cadherina como predictor de MD (RR=2,3; 95% IC 1,25 a 4,21;  $p=0,007$ ) (Figura 10).

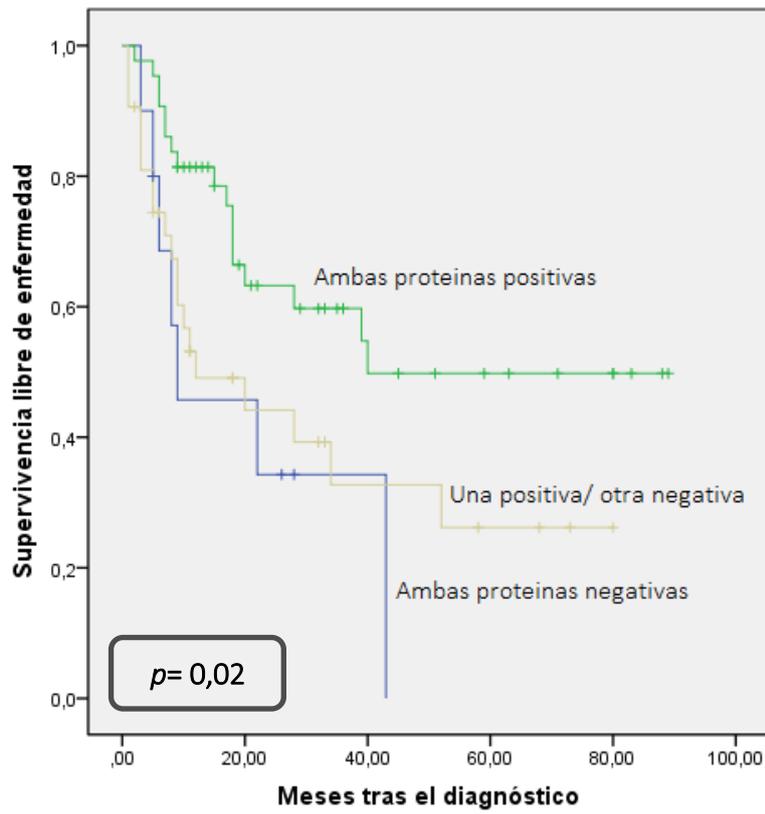


Figura 10: Supervivencia libre de MD en función de la expresión combinada de E-cadherina y ANXA2

## 5. DISCUSIÓN



El CECC es el sexto cáncer más frecuente en el mundo. En los Estados Unidos supone más muertes al año que el cáncer de cuello de útero, melanoma o linfoma de Hodking. Los pacientes con CECC en estadios avanzados presentan una supervivencia a los 5 años inferior al 50%, que se puede atribuir a la alta frecuencia de recurrencia local, desarrollo de segundos primarios, y metástasis a distancia<sup>56</sup>.

En los CECC los pacientes con enfermedad metastásica (entre un 5-26% según las series), presentan muy mal pronóstico (menos de 10% de supervivencia a 5 años), y muy escasas opciones de tratamiento, fundamentalmente quimioterapia, que puede tener importantes efectos secundarios. Por ello, es de gran interés poder identificar el grupo de pacientes con alto riesgo de desarrollar MD, los cuales constituirían el grupo diana para recibir las terapias adyuvantes y evitar el sobretratamiento y los efectos adversos asociados en el resto de pacientes.

Se han identificado varios factores de riesgo de MD clínico-patológicos<sup>17-20</sup> como localización del tumor primario (mayor frecuencia de MD en los localizados en la hipofaringe), estadio avanzado, edad temprana al diagnóstico, metástasis ganglionares, o extensión extracapsular. Sin embargo, estos factores han demostrado ser poco precisos para evaluar individualmente el riesgo de MD de cada paciente. De hecho, menos del 50% de los pacientes que cumplen estas características desarrollarán MD.

Nuestro estudio trata de identificar a los pacientes en riesgo de desarrollar MD estudiando patrones específicos de expresión proteica en el tumor primario, mediante técnicas de inmunohistoquímica, relativamente sencillas de realizar en las biopsias diagnósticas y de fácil incorporación a la rutina hospitalaria.

Los cambios genéticos producen cambios en la expresión de las proteínas relacionadas y permiten a la célula adquirir un fenotipo metastásico. Estas proteínas claves podrían representar biomarcadores útiles para identificar a los pacientes con alto riesgo de MD en los CECC. Estudios previos mostraron que estas alteraciones son un evento precoz de la carcinogénesis y ya están presentes en el tumor primario y se mantienen en los ganglios metastásicos<sup>57</sup>.

Para el estudio, se seleccionaron un conjunto de proteínas implicadas en distintos procesos celulares claves para la diseminación metastásica: proliferación, apoptosis, adhesión celular, invasión y migración.

### 5.1 Biomarcadores de adhesión celular

Las células cancerosas pueden invadir, ya sea como células individuales o colectivamente como grupos de células<sup>58</sup>. Ambos tipos de invasión requieren un debilitamiento de los contactos célula-célula y un cambio en la forma celular.

Las cadherinas y cateninas forman uniones adherentes, que son los mediadores centrales de la adhesión célula-célula en los epitelios. La expresión de estas proteínas disminuye a menudo en los tumores lo cual conlleva una pérdida de la adhesión celular, y la reconstitución de estas uniones adherentes puede revertir el fenotipo invasivo de las células cancerosas.

### 5.1.1 E- Cadherina

E- Cadherina es la proteína principal de las uniones adherentes entre las células epiteliales. Una glicoproteína transmembrana que se caracteriza por 5 dominios extracelulares que establecen uniones homofílicas calcio-dependientes con las moléculas contrapuestas en las células adyacentes; en su dominio citoplasmático se une a  $\beta$ -catenina, p120-catenina y  $\alpha$ -catenina, complejo proteico por el cual se relaciona con el citoesqueleto de actina.

Múltiples mecanismos pueden producir la inactivación del sistema E- cadherina-catenina<sup>59</sup>: como resultado de mutación en el gen *CDH1* o deleciones en su región cromosómica 16q22.1; por un mecanismo epigenético de metilación en la región promotora del gen; como resultado de modificaciones post-traducción; por la unión de represores transcripcionales como ZEB1/ZEB2, Snail, Slug, etc.; o como resultado de un aumento de la endocitosis y proteólisis.

La expresión de E-Cadherina se reduce durante el desarrollo embrionario, la fibrosis tumoral, la progresión del cáncer y en el fenómeno de transición epitelio- mesénquima (EMT). La EMT es un complejo fenómeno biológico, reversible, y de significado aún incierto, en que las células epiteliales alteran su polaridad y unión para adquirir un fenotipo tipo mesénquima, caracterizado por un aumento en la capacidad de invasión - migración, remodelación del citoesqueleto y resistencia a la apoptosis. En 2009, Kalluri y Weinberg<sup>60</sup> clasificaron la EMT en cáncer como tipo 3, comparándola en fluidez e idiosincrasia a la de los fibroblastos (EMT tipo 2) o la de procesos de transición (EMT tipo 1). Las moléculas relacionadas con este fenómeno facilitan la diseminación de las células tumorales en los CECC<sup>61</sup>.

De tal modo que la alteración de la expresión de E-Cadherina se ha relacionado con patrones de mayor invasividad y metástasis en el laboratorio<sup>62</sup>, donde las líneas de células epiteliales bien diferenciadas y con correcta expresión de E-cadherina no tenían patrón invasor, mientras que líneas de células fibroblásticas que mostraban falta de expresión de E-cadherina presentaban mayor invasividad. Y en la clínica, se ha demostrado que la pérdida de expresión de E-cadherina es un fenómeno común y frecuente en múltiples cánceres humanos: cáncer de pulmón<sup>63</sup>, cáncer de páncreas<sup>64</sup>, carcinoma colorrectal<sup>65</sup> o cáncer de próstata<sup>66</sup>.

En los CECC, estudios previos han investigado la correlación entre la disminución de la expresión de E-cadherina y el desarrollo de metástasis ganglionares. En el carcinoma de laringe, a nivel supraglótico, ya se han encontrado diferencias significativas, e incluso se propone como factor de riesgo para valorar pacientes con cuello NO clínicamente, pero con posibles metástasis ocultas<sup>37 67 68 69</sup>. También se ha establecido su relación con tumores poco diferenciados y menor supervivencia<sup>70</sup>.

La relación entre la pérdida de expresión de E-Cadherina y el desarrollo de MD en los CECC ha sido poco investigada. Recientemente un estudio de Nijkamp y col.<sup>71</sup>, ha encontrado también una asociación significativa; sin embargo, se trataba de una muestra muy reducida, de sólo 26 pacientes y con un grupo muy heterogéneo, incluyendo desde el estadio II al IV, lo cual puede actuar como factor de confusión. Nuestros resultados confirman estos hallazgos, pero con mayor número de pacientes, y criterios de selección muy estrictos, que permitieron configurar 2 grupos bien balanceados, y sin diferencias en los factores clinicopatológicos para evitar sesgos de selección, especialmente debidos a la clasificación N, que pudiera influir como factor de riesgo para el desarrollo MD.

En conjunto, nuestros resultados y los de estudios previos sugieren que la pérdida de adhesión epitelial provocada por la disminución de la expresión de E-cadherina puede tener un papel fundamental en el proceso de diseminación metastásica, tanto a nivel ganglionar como a distancia. Por tanto, la determinación de la expresión de E-cadherina en el tumor primario podría ser un biomarcador útil para evaluar el riesgo de desarrollar metástasis, individual y propio de cada paciente.

### 5.1.2 $\beta$ – catenina

$\beta$  – catenina es una proteína multifuncional que desempeña un doble papel en las células: como componente estructural de las uniones adherentes celulares mediante su interacción con cadherinas tipo I, lo que permite a E-cadherina su anclaje al citoesqueleto, y como molécula de señalización en la ruta Wnt<sup>72</sup>. En la pérdida de la adhesión celular, durante la endocitosis de E-cadherina,  $\beta$  – catenina se libera de la membrana al citoplasma. Posteriormente se trasloca al núcleo para promover la transcripción de genes relacionados con el fenómeno EMT. Además  $\beta$  – catenina nuclear es un co-activador transcripcional con el factor de células T (TCF) y el factor linfoide de unión (LEF) que controla la transcripción de SNAIL1 y otros genes<sup>60</sup>.

Es la diferente localización de  $\beta$  – catenina lo que parece tener un papel clave en el desarrollo oncogénico. Mientras que en el epitelio de la mucosa sana se localiza exclusivamente a nivel de la membrana celular, en las células neoplásicas  $\beta$  – catenina va disminuyendo o está ausente en la membrana y aumentando su localización intracelular. En los últimos años también se está dando gran valor a la acumulación nuclear de  $\beta$  – catenina, e incluso a la proporción entre  $\beta$  – catenina nuclear/ citoplasmática, que parece ser un mecanismo

epigenético clave para la metilación de inhibidores en la vía Wnt y por tanto la activación de la misma<sup>73</sup>.

La sobreexpresión de  $\beta$  – catenina se ha encontrado relacionada con MD en diferentes tipos de cáncer: de próstata<sup>74</sup>, de mama<sup>75</sup>, y destaca el caso del osteosarcoma, en el cual se ha relacionado con las metástasis pulmonares<sup>76</sup> y ya se estudian posibles líneas farmacológicas para su bloqueo<sup>77</sup>.

En los CECC la mutación del gen es un evento poco frecuente<sup>78</sup>, pero la acumulación global de  $\beta$  – catenina intracelular ha demostrado relevancia en la progresión y mayor potencial maligno tumoral. La mayoría de los estudios se focalizan en el carcinoma epidermoide de cavidad oral y orofaringe<sup>79 80 81 82</sup>, incluidas grandes series como la de Santoro y cols.<sup>83</sup> con 374 casos; en todos ellos, los tumores con alteración en  $\beta$  – catenina se caracterizan por peor pronóstico, mayor tendencia a la recidiva y más desarrollo de metástasis ganglionares.

En las escasas investigaciones de  $\beta$  – catenina a nivel de hipofaringe y laringe, la acumulación de  $\beta$  – catenina nuclear se asocia con un comportamiento más agresivo de las lesiones premalignas<sup>84</sup>, con menor grado de diferenciación tumoral<sup>85</sup>, y menor supervivencia global.

En nuestra serie sólo en 9 de las 88 muestras mostraban expresión de  $\beta$  - catenina nuclear y la pérdida de  $\beta$  - catenina a nivel de membrana solo ocurrió en el 23% de los casos, datos comparables a los de estudios previos<sup>79</sup>. En concordancia con estos estudios, observamos que tanto la pérdida de expresión de membrana de  $\beta$  - catenina como su expresión nuclear era más frecuente en los casos con MD, aunque las diferencias no fueron significativas, lo cual podría deberse a los pocos casos que poseen estas alteraciones.

### 5.1.3 p120-catenina

**p120** es una catenina, codificada por el gen *CTNND* localizado en el cromosoma 11, que se une a la E-cadherina en una región diferente a  $\beta$  – catenina, y actúa como cofactor en la adhesión entre las células epiteliales. Además de actuar como regulador de uniones celulares, afecta a la actividad de las GTPasas, RhoA, Rac1 y Cdc42 que desempeñan un papel central en la regulación del citoesqueleto, y también actúan como reguladores de la invasión y motilidad<sup>86</sup>.

Varios estudios han demostrado que la pérdida o reducción de la expresión de p120 se asocia frecuentemente con alto grado de malignidad y estadios avanzados en varios tumores<sup>87</sup>. Resultados análogos a los obtenidos en cabeza y cuello: en el carcinoma nasofaríngeo, se encontró relación con las metástasis ganglionares<sup>88</sup>; en el carcinoma epidermoide de cavidad oral, la alteración en la inmunoreactividad fisiológica de p120 se presentaba hasta en el 96% de los casos<sup>89</sup>, y también en las lesiones displásicas orales, incluso con valor predictivo de progresión a cáncer<sup>90</sup>. Por su interacción funcional se ha descrito frecuentemente asociada a una pérdida concomitante de E-Cadherina, pero también como marcador independiente de mal pronóstico<sup>90</sup>.

En nuestra serie, también observamos una correlación entre los niveles de expresión de E-cadherina y p120, así como una mayor incidencia de MD en los casos con pérdida de expresión de p120. Sin embargo, en contraste con la E-cadherina, las diferencias no fueron significativas. Estos resultados son opuestos a los hallados por otros investigadores en líneas celulares de cáncer de próstata<sup>91</sup>, lo cual sugiere que las diferentes cadherinas y cateninas tienen relevancia variable según el tipo celular.

## 5.1.4 Anexina A2

El gen de la **Anexina A2 (ANXA2)** se localiza en el cromosoma 15 (región 15q21), y como toda la familia de anexinas desde el punto de vista estructural se caracteriza por un núcleo formado por dominios repetitivos homólogos de 70 aminoácidos y capacidad de unión a fosfolípidos de carga negativa en presencia de ion calcio<sup>92</sup>.

En la mayoría de las células ANXA2 está presente en tres formas: un monómero; un heterodímero, compuesto de una ANXA2 y una subunidad de 3-fosfoglicerato quinasa; y un heterotetrámero, dos subunidades de ANXA2 unidas a un dímero de S100A10 (también conocido como p11). El porcentaje en que se distribuyen cada una de estas formas varía según la función de la célula o tejido, desde el 100% heterotetramérico en el epitelio intestinal al 50% en monómero en los fibroblastos<sup>93</sup>. La ANXA2 se expresa abundantemente en las células con alta velocidad de regeneración, como fibroblastos, células endoteliales, o las células epiteliales del pulmón o tracto gastrointestinal, pero no en las células en reposo como plaquetas, miocitos, hepatocitos, etc<sup>94</sup>.

Se han sugerido multitud de funciones para ANXA2<sup>95</sup>: mediador calcio-dependiente de procesos de exocitosis y endocitosis; modulación en la organización del sarcolema durante la contracción de las células de musculo liso; regulación de canales iónicos; receptor para proteasas (la catepsina B, el plasminógeno y el activador tisular del plasminógeno) y proteínas de la matriz extracelular (colágeno y tenascina C); adhesión celular; síntesis de ADN y proliferación celular.

Por tanto, al estar implicada en tantas funciones celulares ANXA2 también se ha encontrado alterada en múltiples patologías, como fenómenos de hemostasia y trombosis

(síndrome anti fosfolípido, preclampsia, trombosis cerebral...), neoangiogénesis (retinopatías), y carcinogénesis (leucemia promielocítica aguda y tumores sólidos).

Su expresión varía en los diferentes tipos de cáncer: sobreexpresado por ejemplo, en leucemias<sup>96</sup>, carcinoma colorrectal<sup>97</sup> o en cáncer de pulmón, en éste alcanzando incluso valor pronóstico<sup>98</sup>; pero disminuido en cáncer de próstata<sup>99</sup>, en adenocarcinoma nasosinusal<sup>100</sup> y en CECC<sup>101</sup>, de ahí que sea objetivo de este estudio.

La pérdida de ANXA2 se ha encontrado en los carcinomas epidermoides de laringe y de cavidad oral, y se ha relacionado de modo inverso con el grado histopatológico, tumores poco diferenciados, más metástasis linfáticas y menor supervivencia<sup>102 103 104</sup>.

Estos datos de mayor agresividad tumoral concuerdan con lo obtenido en este estudio, donde observamos que la pérdida de expresión de ANXA2 era más frecuente en pacientes que desarrollaron MD, siendo las diferencias casi significativas ( $p=0,052$ ). Aunque al aplicar el análisis multivariante se comprobó que la capacidad de predicción conjunta de E-cadherina y ANXA2 no era superior a la primera de modo individual.

## 5.2 Biomarcadores de Motilidad e Invasión

Tras la pérdida de adhesión, la motilidad celular y la capacidad de invasión son pasos claves en la cascada metastásica. Así, alteraciones en las proteínas encargadas de la regulación del citoesqueleto de actina, tales como Cortactina, FAK y AMAP, podrían ser básicas para el proceso.

## 5.2.1 Quinasa de adhesión focal (FAK)

La **quinasa de adhesión focal (FAK)** es una proteína tirosin-quinasa clave en la interacción célula-matriz extracelular. Descubierta al inicio de la década de los 90, rápidamente se estableció su relación con los procesos de invasión y metástasis<sup>105</sup>. La autofosforilación de FAK en Tyr397 inicia una cascada de trasducción de señales que da como resultado la fosforilación de residuos de tirosina posteriores como Tyr 576, Tyr 577, Tyr 861 y Tyr 925, convirtiéndola en una molécula completamente activa. Su activación desencadena una serie de procesos biológicos celulares, incluyendo la unión a la matriz extracelular, la migración, invasión, proliferación y supervivencia, y el fenómeno EMT<sup>106</sup>.

Un gran número de artículos describen un aumento de la expresión de la proteína FAK en una gran variedad de cánceres humanos<sup>107</sup>. Además, la sobreexpresión de FAK se ha correlacionado con potencial invasivo del tumor y mal pronóstico del paciente.

Más específicamente en cabeza y cuello, las lesiones displásicas premalignas con sobreexpresión de FAK presentan mayor tendencia a la malignización; en las lesiones laríngeas, como factor predictor independiente<sup>42</sup>, y en las lesiones orales, asociado a Cortactina<sup>108</sup>. Así mismo, la sobreexpresión de FAK se ha relacionado con recurrencia local, metástasis ganglionares y menor supervivencia en el carcinoma epidermoide oral<sup>109</sup>, de lengua<sup>110</sup> y de laringe<sup>37</sup>. Estudios previos ya encontraron asociación de FAK con el desarrollo de MD en el carcinoma gástrico<sup>111</sup>, hepatocarcinoma<sup>112</sup>, o carcinoma adenoide quístico<sup>113</sup>.

Actualmente se están llevando a cabo investigaciones sobre su valor terapéutico, el bloqueo de FAK mediante inmunoterapia o mediante “moléculas de pequeño tamaño” limitaría

el crecimiento y desarrollo tumoral con mínimo efecto sobre el tejido sano<sup>114</sup>. Los primeros éxitos en este campo se están alcanzando en el tratamiento del cáncer de ovario<sup>115 116</sup>.

## 5.2.2 Cortactina

La **Cortactina**, codificada por el gen *CTTN* (antes *EMS1*), localizado en la región 11q13.3, es una proteína del citoesqueleto, que actúa como un regulador de la polimerización de la actina mediada por ARP2/3. La región 11q13.3 esta frecuentemente amplificada en los CECC, entre el 30-40% de los casos<sup>117</sup>. En ella también se localizan otros genes importantes como *CCND1* (que codifica la Ciclina D1), *FGF19* o *FADD*, lo que produce la sobreexpresión de los mismos. Esta amplificación se ha relacionado con peor pronóstico, menor supervivencia, y mayor incidencia de metástasis<sup>118 119</sup>. La agresividad tumoral se atribuía principalmente a la sobreexpresión de ciclina D1; pero estudios recientes realizados por nuestro grupo y otros, analizaron ambas de modo independiente y encontraron la amplificación y sobreexpresión de *CTTN/EMS1* como marcador independiente de mal pronóstico, sobre todo en los carcinomas de laringe<sup>40 41 120</sup>.

Además del efecto sobre la migración y adhesión celular por su acción sobre la actina, la Cortactina también parece clave en la resistencia a anoikis, muerte celular programada que ocurre en el proceso de separación de la célula de la matriz extracelular, paso básico en el fenómeno de metástasis ya que permite a la célula tumoral sobrevivir al liberarse del tumor primario<sup>121</sup>.

La sobreexpresión de Cortactina se ha relacionado con mayor incidencia metástasis ganglionares y a distancia en el carcinoma de esófago<sup>122</sup>, mama<sup>123</sup> y hepatocarcinoma<sup>124</sup>. Sin embargo, en este trabajo no hemos hallado una asociación entre la expresión de FAK y/o

Cortactina y el desarrollo de MD. Como se ha mencionado, estas proteínas se han implicado en procesos que facilitan una mayor invasividad local y regional; el hecho de que en nuestro estudio hayamos seleccionado un grupo de pacientes equilibrado en cuanto al tamaño tumoral y la presencia de metástasis ganglionares, puede explicar estas discrepancias. Estos resultados indican que, aunque Cortactina y FAK podrían estar implicados en la invasión y metástasis loco-regional de los CECC, no lo estarían en el desarrollo de MD. Es posible que la relación de FAK y Cortactina con metástasis en estudios previos se deba a su asociación con los parámetros patológicos que se asocian con las mismas.

### 5.2.3 Vía EGFR-GEP100-Arf6-AMAP1.

La proteína **AMAP1**, esta codificada por el gen *DDEF1* que se localiza en 8q24, región frecuentemente alterada en CECC y asociada a mal pronóstico. AMAP1 es una proteína Arf-GTPasa situada en la membrana celular para catalizar la hidrolisis de esta que desempeña un papel importante en la remodelación de la membrana, la organización del citoesqueleto, la migración celular y se ha descrito que AMAP1 forma complejos con Cortactina y FAK para regular la invasión tumoral<sup>125 126</sup>.

Hasta ahora, la mayoría de la investigación se ha centrado en el cáncer de mama, donde se sobreexpresa 10 veces más en líneas celulares altamente invasivas<sup>127</sup>, y se ha propuesto como diana molecular terapéutica<sup>128</sup>. Se sobreexpresa en el 80% de los cánceres de próstata primarios y su expresión es sustancialmente mayor en las lesiones metastásicas de éstos<sup>129</sup>.

En los CECC, se describe hasta un 100% de amplificación en el carcinoma oral<sup>130</sup>. Y en una pequeña serie de 20 pacientes con carcinoma de lengua, Sato y cols.<sup>44</sup> relacionan la sobreexpresión de AMAP1, y la sobreexpresión combinada con EGFR, con menor supervivencia

libre de enfermedad. En la serie aquí recogida de carcinomas epidermoides de hipofaringe y laringe encontramos expresión de AMAP1 en el 58% de los casos y al igual que en el caso de Cortactina y FAK, no se han detectado diferencias de sobreexpresión de AMAP1 entre los dos grupos comparados, ni asociación con el desarrollo de MD.

## 5.3 Biomarcadores de proliferación y control del ciclo celular

### 5.3.1 Vía de EGFR-PI3K-AKT-mTOR

La **vía de EGFR-PI3K-AKT-mTOR**, se ha encontrado alterada en la fisiopatología de múltiples neoplasias. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio revelaron que es una de las vías más frecuentemente desreguladas en los CECC, por lo que se ha convertido en un foco de gran interés. Esta compleja vía regula la expresión de muchas proteínas relacionadas con el fenómeno EMT por lo que podría estar relacionada con el desarrollo de MD.

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (**EGFR**) es una proteína transmembrana que genera una cascada de señalización intracelular que tiene como resultado la proliferación celular en respuesta a la unión con sus ligandos: el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ). Las células que adquieren la capacidad para sobreproducir estos ligandos o aumentar el número de EGFR en su superficie crean una señal de crecimiento autocrino, lo que lleva a un crecimiento incontrolado.

La sobreexpresión de EGFR se ha encontrado hasta en un 80% de los casos de CECC<sup>131</sup>, aunque en nuestra serie no fue un evento tan frecuente, y solamente estaba presente en el 35% de pacientes. También se ha encontrado altos niveles de expresión de EGFR en la mucosa normal de pacientes con CECC, lo que sugiere que se trata de un evento temprano en la carcinogénesis y puede ayudar a explicar la alta incidencia de enfermedad sincrónica y metacrónica observada en este tipo de cáncer<sup>132</sup>.

Desde finales de los noventa se describió la sobreexpresión en la expresión de EGFR como factor pronóstico negativo en los CECC: disminución de la supervivencia, resistencia a la radioterapia, fracaso en el tratamiento locorregional y aumento de las tasas de MD<sup>133 134 135</sup>. En base a esos datos se realizaron ensayos clínicos con fármacos inhibidores de EGFR, tipo inhibidores de tirosin-quinasa, como gefitinib (Iressa) y erlotinib (Tarceva), o anticuerpos monoclonales, como cetuximab (Erbix). Estos fármacos obtuvieron una escasa tasa de respuesta (entre el 5 a 10%) en el tratamiento del CECC recurrente o metastásico<sup>136 137</sup>. Pero la asociación de cetuximab y radioterapia mejoró el control local, la supervivencia libre de enfermedad, y aumentó un 10% la supervivencia global respecto a la radioterapia sola<sup>12</sup>. En los estudios no se correlacionaba la expresión de EGFR con el estadio tumoral o metástasis. Posteriormente se describió la existencia de mutaciones, como EGFRVIII hallada hasta en el 42% de los casos, las cuales si presentaron mayor correlación con la evolución del tumor y el desarrollo de metástasis linfáticas<sup>138</sup>.

La investigación sobre **AKT** es más escasa. AKT es una serina/treonina quinasa, también conocido como PKB, ejerce actividad anti-apoptótica y favorece la proliferación celular. Su activación se sitúa como un evento temprano en respuesta a la exposición a carcinógenos del tabaco, sobre todo a la nicotina y el NNK en las células epiteliales de la vía aérea<sup>139</sup>.

Estudios recientes demostraron ya sobreexpresión y activación de Akt en los CECC<sup>140</sup>, Pedrero y cols. lo describieron hasta en un 17% de los casos, sobre todo en los tumores de sublocalización faríngea, y que se asocia a un fenotipo tumoral más agresivo con disminución de la apoptosis y de la diferenciación<sup>48</sup>. El grado de activación de AKT se correlaciona bien con el grado de progresión de la enfermedad, mostrando diferencias significativas entre displasia, carcinoma *in situ* y carcinoma invasivo. Específicamente, en el carcinoma de lengua<sup>141</sup>, cavidad oral<sup>142</sup> y orofaringe<sup>143</sup> se ha descrito en tumores con un comportamiento clínico más agresivo y como factor de mal pronóstico independiente.

Se están realizando estudios preclínicos con un inhibidor de Akt, *perifosina*, en líneas celulares de CECC, que aunque muestra una potente actividad antiproliferativa *in vitro*, en un estudio de fase II carecía de actividad antitumoral como agente único en el CECC recurrente o metastásico<sup>144</sup>.

En nuestra serie la fosforilación de AKT (expresión de p-Akt) se observó en el 23% del total de pacientes, pero al igual que con EGFR, no se encontró relación estadísticamente significativa entre la sobreexpresión de estas proteínas y el desarrollo de MD, tampoco se encontró relación con la expresión de E-Cadherina. Ante los resultados clínicos y de laboratorio, aunque esta vía parece clave en el proceso de proliferación y crecimiento local de los CECC, su papel no es determinante en la fase de diseminación y metástasis.

## 5.3.2 Proteína p16

La pérdida de la expresión p16, por delección homóloga, por mutación puntual o por metilación se ha observado en múltiples tumores, y parece ser un evento temprano de la carcinogénesis, ya que la supresión de al menos una copia es bastante elevada en las lesiones premalignas, lo que da ventaja selectiva a las células neoplásicas<sup>145</sup>.

En los últimos años la proteína p16 ha adquirido gran relevancia como marcador en los casos de CECC- VPH positivos, especialmente de orofaringe. Aunque el porcentaje varía según los diferentes países (en USA se sitúa entre el 40-80% y en Alemania entre 30-40%) en global se estima en un 15-25%<sup>146</sup>. En nuestra serie sólo 7 de los 88 pacientes con CECC de hipofaringe y laringe fueron p16 positivos, porcentaje concordante con la localización en estudio y las características de los pacientes, de edad avanzada, y factores de riesgo clásicos (tabaco/alcohol), perfil de paciente predominante en Europa y Latinoamérica<sup>147</sup>. En contraposición con los pacientes con CECC VPH/ p16 positivos que son generalmente más jóvenes, de localización orofaríngea y con escasa relación con tabaco o alcohol.

Su valor es controvertido, pues aunque algunos estudios han encontrado la mutación de p16 como factor predictivo de recidiva tumoral<sup>148</sup>, estudios mediante IHQ no han hallado correlación entre la expresión de p16 y el desarrollo de metástasis ganglionares<sup>149</sup>. Sin embargo, por su papel de marcador indirecto de infección por el VPH, su valor como marcador de mejor pronóstico en los CECC, parece estar demostrado, sobre todo en relación a una mejor respuesta a los tratamientos adyuvantes<sup>51 150 151</sup>.

La metilación de p16 se ha detectado en el suero de los pacientes con carcinoma colorrectal metastásico y podría ser utilizado en esta patología como método de cribado<sup>152</sup>. En

los CECC, Namazie y cols. mediante la técnica de hibridación *in situ* (FISH) encontraron relación entre la delección genómica de p16 con el desarrollo de MD<sup>153</sup>, pero los últimos artículos que investigan la relación de p16 con las MD no han encontrado diferencias a nivel de orofaringe<sup>154</sup>. Estos resultados están en consonancia con los de nuestro estudio, que tampoco detectó diferencias a nivel de hipofaringe y laringe. Aunque la tasa MD sigue siendo equivalente entre los dos grupos, se ha descrito que los CECC p16 positivos podrían presentar un patrón de MD diferente, con mayor afinidad a la implantación ósea<sup>155 156</sup>.

### 5.3.3 HERG1

En los últimos años, la alteración de la actividad de diferentes canales iónicos se ha demostrado implicada en las diferentes etapas de la carcinogénesis. El potencial oncogénico del canal de potasio HERG1 se relaciona con el control de la proliferación celular y apoptosis, la regulación de la capacidad de invasión y metástasis, mediante mecanismos aún no bien conocidos. Algunas hipótesis sugieren que podría estar relacionado con el reordenamiento del citoesqueleto durante la fase de mitosis celular<sup>157</sup> y la regulación de la homeostasis en hipoxia, induciendo la angiogénesis<sup>158</sup>.

La sobreexpresión de HERG1 se ha encontrado con frecuencia en diversos tipo de cáncer: cáncer de endometrio, de mama, de pulmón, cáncer gástrico, carcinoma de células escamosas de esófago y cáncer colorrectal, y se correlaciona con agresividad tumoral, mal pronóstico y enfermedad metastásica<sup>159</sup>.

Debido a la limitada distribución de HERG1 en los tejidos sanos, destaca su potencial como marcador de diagnóstico precoz. Estudiado fundamentalmente en el carcinoma de cuello uterino, por la fácil obtención de biopsias y su relación con la infección por el VPH (los

queratinocitos con alta expresión de E6 y E7 muestran alta expresión de HERG1), ha obtenido muy buenos resultados, superiores a los del método tradicional de Papanicolaou<sup>160</sup>. Esto sugiere la extensión del estudio de HERG1 en tumores de características similares como el cáncer de orofaringe. Se ha propuesto también como nueva diana terapéutica, obteniendo con su inhibición una reducción significativa del crecimiento del tumor<sup>161 162</sup>, sin embargo su uso está limitado por su gran cardiotoxicidad<sup>163</sup>.

Aunque la investigación de su papel en los CECC es incipiente, algunos artículos describen que la alteración de su expresión se presenta casi en más del 80% de los CECC<sup>55</sup>, concordante con los datos de nuestra serie donde fue del 97%. Se relaciona con estadios avanzados de la enfermedad, recurrencia tumoral, reducción de la supervivencia específica e incluso con el desarrollo de metástasis linfáticas y a distancia. En las etapas iniciales de la carcinogénesis HERG1 se ha detectado hasta en un 41% de las displasias laríngeas, y su expresión se asoció con el riesgo de progresión a carcinoma<sup>55</sup>.

Aunque la expresión positiva de HERG1 se encontró en casi la totalidad de muestras del estudio, estos se distribuyeron de modo homogéneo entre los casos y los controles ( $p=0.61$ ). Los datos de este estudio no demostraron relación entre HERG1 y las MD en los carcinomas epidermoides de hipofaringe y laringe, por lo que su valor parece ser más interesante como marcador diagnóstico que pronóstico, y en todo caso como predictor del riesgo de cáncer.

### 5.3.4 p53

En la investigación también se incluyó p53, codificada por el gen supresor *TP53*, muy estudiado por ser una de las mutaciones más frecuentes en los cánceres humanos. Así en los CECC entre el 60-80% presentan mutaciones somáticas en este gen<sup>164</sup>. Desde hace más de 20 años se han realizado múltiples estudios sobre p53 como biomarcador de riesgo en los CECC.

En las lesiones premalignas orales, la expresión de la proteína p53 en las capas suprabasales puede tener valor predictivo de transformación maligna, identificándolo así como un evento temprano en la carcinogénesis. En los CECC, tanto las mutaciones del gen *TP53* como la sobreexpresión de p53 mutado, se asocia con mayor recurrencia tumoral y peor tasa de supervivencia libre de enfermedad y global, sobre todo en los en los carcinomas de localización laríngea<sup>165 166</sup>. Uno de los últimos grandes análisis multicéntricos de tipo prospectivo fue el de Poeta ML y cols.<sup>167</sup> que analizaron el ADN de 420 pacientes con CECC, encontrando menor supervivencia en caso de mutaciones, y peor aún si estas eran de alto grado. Sin embargo la correlación entre la expresión de p53 y el resultado clínico es aún dudosa, ya que existen también estudios en los que el estado de p53 no demostró ser predictor independiente<sup>168 169 170</sup>.

Estas discrepancias se deben a que es muy difícil unificar resultados, ya que los estudios mezclan tumores de diferente localización primaria y de diferente estadio TNM, que tendrán diferente comportamiento biológico y de respuesta al tratamiento. También hay variabilidad en el método de análisis: la técnica más utilizada es la IHQ, pero varía el anticuerpo e incluso el punto de dicotomización. Actualmente su valor como marcador pronóstico continúa siendo incierto, centrando los esfuerzos futuros en mejorar la calidad de estas evidencias<sup>171</sup>.

La función de p53 como regulador del ciclo celular y la apoptosis es bien conocida, pero en los últimos años ha destacado el papel de los mutantes de p53 como supresor de la migración y la invasión celular, por la interacción de manera directa o indirecta con múltiples moléculas implicadas en el proceso de metástasis, fundamentalmente en el fenómeno EMT y en la degradación de la matriz extracelular (MEC)<sup>172</sup>. Se han detectado mutaciones de *TP53* en metástasis de cáncer de mama, pulmón, carcinoma gastrointestinal y células tumorales circulantes de cáncer de colón<sup>173</sup>.

En esta investigación se estableció el punto de corte en una tinción celular superior al 10%, de modo tal que el 57% de nuestras muestras mostraban pérdida de expresión de p53, este porcentaje se sitúa en el rango descrito en las publicaciones, que oscila entre el 50 – 70%<sup>174</sup>. En cuanto a su relación con el desarrollo de MD, la expresión de p53 no mostró diferencias ( $p=0,66$ ) entre los casos y los controles, dato que no es posible contrastarlo con el de otros grupos, ya que la investigación sobre el papel de p53 en el desarrollo de las metástasis está comenzando, y no existen aún datos publicados sobre su valor en los CECC.

## 5.4 Biomarcadores de CECC en la práctica clínica

El CECC es una enfermedad heterogénea producida por la alteración en la regulación de múltiples rutas celulares implicadas en la diferenciación celular, el control del ciclo celular, la apoptosis, la angiogénesis y la migración celular. Los avances en genómica y proteómica han permitido descubrir nuevos y potenciales marcadores para mejorar las pruebas diagnósticas y pronósticas.

Dos de los principales campos de investigación son la detección precoz del cáncer, y la detección de las células tumorales diseminadas, que originan las metástasis ganglionares y a distancia, siendo este último el objetivo de este trabajo de investigación.

Es importante valorar la complejidad molecular de los CECC al tratar de identificar marcadores que permitan predecir mejor la evolución y pronóstico de los pacientes. Así, dos tumores fenotípicamente idénticos se pueden desarrollar a partir de la alteración de diferentes vías, con alteraciones genéticas muy diferentes, y como consecuencia diferente curso clínico. Es poco probable que un único factor pueda determinar el comportamiento completo del tumor, sino que más bien dependerá de la compleja interacción entre múltiples oncogenes y genes supresores de tumores, y finalmente de la expresión proteica de éstos.

Se ha utilizado la tecnología de los “microarrays” de ADN, que permite el análisis simultáneo de la expresión de miles de genes; sin embargo esta tecnología es compleja, de elevado coste económico y de difícil interpretación, lo que hace muy complicado su implantación de rutina en la práctica clínica. La IHQ analiza directamente la expresión final de la proteína y puede ser determinada fácilmente en las muestras parafinadas utilizadas para el estudio anatomopatológico rutinario de la pieza quirúrgica, sin añadir un gran coste adicional ni precisar de grandes infraestructuras.

Son las proteínas relacionadas con el fenómeno EMT, sobre todo aquellas que regulan la adhesión celular, las que parecen tener un papel clave en el fenómeno de las metástasis en los CECC. Según nuestros resultados, el análisis mediante IHQ de las proteínas implicadas en la adhesión celular, como E-Cadherina, podría ser útil como parámetro adicional para estimar el potencial metastásico de los carcinomas de hipofaringe y laringe. Y en combinación con los parámetros clinopatológicos conocidos, mejorar la selección de pacientes con alto riesgo de

desarrollar MD y con necesidad de tratamientos sistémicos. No obstante, estos resultados y la utilidad de estos biomarcadores requieren ser validados en ensayos clínicos prospectivos.

## 6. CONCLUSIONES



De la interpretación de nuestros resultados y de su discusión obtenemos las siguientes conclusiones:

1. La pérdida de expresión de E-Cadherina presentó una asociación estadísticamente significativa con el desarrollo de metástasis a distancia, siendo además un predictor independiente en el análisis multivariante.
2. La pérdida de expresión de ANXA2 presentó una asociación muy cercana a la significación estadística con el desarrollo de metástasis a distancia.
3. La expresión de ninguna de las otras proteínas del estudio ( $\beta$  – catenina, p120- catenina, FAK, Cortactina, EGFR, p-Akt, AMAP, HERG1, p53 y p16) mostró asociación con el desarrollo de metástasis a distancia.
4. El análisis combinado de la pérdida de expresión de E- Cadherina y Anexina A2 no demostró ser superior a la pérdida aislada de E-Cadherina como predictor pronóstico independiente de metástasis a distancia.



## 7. BIBLIOGRAFÍA



- <sup>1</sup> Pisani P, Bray F, Parkin DM. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int J Cancer* 2002;97:72–81
- <sup>2</sup> Boyle P, Ferlay J. Cancer incidencie and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol.* 2005;16:481-8
- <sup>3</sup> Sturgis EM. The International Head and Neck Cancer Epidemiology consortium. *Head Neck.* 2011;33:141
- <sup>4</sup> Torrente MC, Rodrigo JP, Haigentz M Jr, Dikkers FG, Rinaldo A, Takes RP, Olofsson J, Ferlito A. Human papillomavirus infections in laryngeal cancer. *Head Neck.* 2011;33:581-6
- <sup>5</sup> Rautava J, Syrjänen S. Biology of human papillomavirus infections in head and neck carcinogenesis. *Head Neck Pathol.* 2012;6 Suppl 1:S3-15
- <sup>6</sup> Brandwein-Gensler M, Smith RV, Wang B, Penner C, Theilken A, Broughel D, Schiff B, Owen RP, Smith J, Sarta C, Hebert T, Nason R, Ramer M, DeLacure M, Hirsch D, Myssiorek D, Heller K, Prystowsky M, Schlecht NF, Negassa A. Validation of the histologic risk model in a new cohort of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2010;34:676-88
- <sup>7</sup> National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Head and Neck Cancers. V 1.2012
- <sup>8</sup> Takes RP, Rinaldo A, Silver CE, Piccirillo JF, Haigentz M Jr, Suárez C, Van der Poorten V, Hermans R, Rodrigo JP, Devaney KO, Ferlito A. Future of the TNM classification and staging system in head and neck cancer. *Head Neck.* 2010;32:1693-711
- <sup>9</sup> Stoeckli SJ, Alkureishi LW, Ross GL. Sentinel node biopsy for early oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2009;266:787-93

<sup>10</sup> Díaz-Molina JP, Rodrigo JP, Alvarez-Marcos C, Blay P, de la Rúa A, Estrada E, Alonso R. Functional and oncological results of non-surgical vs surgical treatment in squamous cell carcinomas of the oropharynx. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2012;63:348-54

<sup>11</sup> American Society of Clinical Oncology, Pfister DG, Laurie SA, Weinstein GS, Mendenhall WM, Adelstein DJ, Ang KK, Clayman GL, Fisher SG, Forastiere AA, Harrison LB, Lefebvre JL, Leupold N, List MA, O'Malley BO, Patel S, Posner MR, Schwartz MA, Wolf GT. American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline for the use of larynx-preservation strategies in the treatment of laryngeal cancer. *J Clin Oncol.* 2006;24:3693-704.

<sup>12</sup> Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, Jones CU, Sur R, Raben D, Jassem J, Ove R, Kies MS, Baselga J, Youssoufian H, Amellal N, Rowinsky EK, Ang KK. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 2006;354:567–578.

<sup>13</sup> Al-Othman MO, Morris CG, Hinerman RW, et al. Distant metastases after definitive radiotherapy for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 2003;25:629–33

<sup>14</sup> Leemans CR, Tiwari R, Nauta JJ, et al. Regional lymph node involvement and its significance in the development of distant metastases in head and neck carcinoma. *Cancer* 1993;71:452–6.

<sup>15</sup> Taneja C, Allen H, Koness RJ, et al. Changing patterns of failure of head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002;128:324–7

<sup>16</sup> Merino OR, Lindberg RD, Fletcher GH. An analysis of distant metastases from squamous cell carcinoma of the upper respiratory and digestive tracts. *Cancer* 1977;40:145–51

<sup>17</sup> Li X, Di B, Shang Y, Zhou Y, Cheng J, He Z. Clinicopathologic risk factors for distant metastases from head and neck squamous cell carcinomas. *Eur J Surg Oncol.* 2009; 35:1348-53

- <sup>18</sup> Coca-Pelaz A, Rodrigo JP, Suárez C. Clinicopathologic analysis and predictive factors for distant metastases in patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck*. 2012; 34:771-5
- <sup>19</sup> Ferlito A, Shaha AR, Silver CE, Rinaldo A, Mondin V. Incidence and sites of distant metastases from head and neck cancer. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 2001; 63:202-7
- <sup>20</sup> Leon X, Quer M, Orus C, del Prado Venegas M, Lopez M. Distant metastases in head and neck cancer patients who achieved loco-regional control. *Head Neck*. 2000; 22:680-686
- <sup>21</sup> De Bree R, Deurloo EE, Snow GB, Leemans CR. Screening for distant metastases in patients with head and neck cancer. *Laryngoscope* 2000;110:397–401
- <sup>22</sup> Alvi A, Johnson JT. Development of distant metastasis after treatment of advanced-stage head and neck cancer. *Head Neck* 1997;19:500–5
- <sup>23</sup> Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100:57-70
- <sup>24</sup> Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144:646-74
- <sup>25</sup> Bernards R, Weinberg RA. A progression puzzle. *Nature* 2002;418:823
- <sup>26</sup> Vanharanta S, Massagué J. Origins of metastatic traits. *Cancer Cell*. 2013;24:410-21
- <sup>27</sup> Liotta LA. Cancer cell invasion and metastasis. *Sci Am* 1992;266:54–59, 62–63
- <sup>28</sup> Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994;367:645-8

<sup>29</sup> Chen Z. The cancer stem cell concept in progression of head and neck cancer. *Journal of Oncology*. 2009;2009:8

<sup>30</sup> Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:895-902

<sup>31</sup> Cabanillas R, Llorente JL. The Stem Cell Network model: clinical implications in cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2009;266:161-70

<sup>32</sup> Takes RP, Rinaldo A, Rodrigo JP, Devaney KO, Fagan JJ, Ferlito A. Can biomarkers play a role in the decision about treatment of the clinically negative neck in patients with head and neck cancer? *Head Neck*. 2008 Apr;30(4):525-38

<sup>33</sup> Van Roy F, Berx G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65:3756-88

<sup>34</sup> Chen YT, Stewart DB, Nelson WJ. Coupling assembly of the E-cadherin/beta-catenin complex to efficient endoplasmic reticulum exit and basal-lateral membrane targeting of E-cadherin in polarized MDCK cells. *J Cell Biol*. 1999;144:687-99

<sup>35</sup> Davis MA, Ireton RC, Reynolds AB. A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J Cell Biol*. 2003;163:525-34

<sup>36</sup> Rescher U, Gerke V. Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions. *J Cell Sci*. 2004;117:2631-9

<sup>37</sup> Rodrigo JP, Dominguez F, Suárez V, Canel M, Secades P, Chiara MD. Focal adhesion kinase and E-cadherin as markers for nodal metastasis in laryngeal cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2007;133:145-50

<sup>38</sup> Canel M, Secades P, Garzón-Arango M, Allonca E, Suarez C, Serrels A, Frame M, Brunton V, Chiara MD. Involvement of focal adhesion kinase in cellular invasión of head and neck squamous cell carcinomas via regulation of MMP-2 expression. *Br J Cancer*. 2008;98:1274-84

<sup>39</sup> Kellye C Kirkbride, Bong Hwan Sung, Seema Sinha, Alissa M Weaver. Cortactin: A multifunctional regulator of cellular invasiveness. *Cell Adh Migr*. 2011; 5:187–198.

<sup>40</sup> Rodrigo JP, García LA, Ramos S, Lazo PS, Suárez C. EMS1 gene amplification correlates with poor prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Cancer Res*. 2000;6:3177-82.

<sup>41</sup> Rodrigo JP, García-Carracedo D, García LA, Menéndez S, Allonca E, González MV, Fresno MF, Suárez C, García-Pedrero JM. Distinctive clinicopathological associations of amplification of the cortactin gene at 11q13 in head and neck squamous cell carcinomas. *J Pathol*. 2009;217:516-23

<sup>42</sup> Rodrigo JP, Álvarez-Alija G, Menéndez ST, Mancebo G, Allonca E, García-Carracedo D, Fresno MF, Suárez C, García-Pedrero JM. Cortactin and focal adhesion kinase as predictors of cancer risk in patients with laryngeal premalignancy. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011;4:1333-41

<sup>43</sup> Hashimoto S, Hashimoto A, Yamada A, Onodera Y, Sabe H. Assays and properties of the ArfGAPs, AMAP1 and AMAP2, in Arf6 function. *Methods Enzymol*. 2005; 404:216–231

<sup>44</sup> Sato H, Hatanaka KC, Hatanaka Y, Hatakeyama H, Hashimoto A, Matsuno Y, Fukuda S, Sabe H. High level expression of AMAP1 protein correlates with poor prognosis and survival after surgery of head and neck squamous cell carcinoma patients. *Cell Commun Signal*. 2014;12:12:17

- <sup>45</sup> Normanno N, de Luca A, Bianco C, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*. 2006;366:2–16.
- <sup>46</sup> Bellacosa A, Kumar CC, Di Cristofano A, Testa JR. Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Adv Cancer Res*. 2005;94:29–86
- <sup>47</sup> Ciuffreda L, Di Sanza C, Incani UC, Milella M. The mTOR pathway: a new target in cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets*. 2010;10:484–495
- <sup>48</sup> Pedrero JM, Carracedo DG, Pinto CM, Zapatero AH, Rodrigo JP, Nieto CS, Gonzalez MV. Frequent genetic and biochemical alterations of the PI 3-K/AKT/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2005; 114: 242–248
- <sup>49</sup> Larue L, Bellacosa A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene*. 2005;24:7443–7454
- <sup>50</sup> Rayess H, Wang MB, Srivatsan ES. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *Int J Cancer*. 2012;130:1715-25
- <sup>51</sup> Silva SD, Nonogaki S, Soares FA, Kowalski LP. p16 (INK4a) has clinicopathological and prognostic impact on oropharynx and larynx squamous cell carcinoma. *Braz J Med Biol Res*. 2012;45:1327-33
- <sup>52</sup> Vousden KH. Outcomes of p53 activation—spoilt for choice. *J Cell Sci*. 2006;119:5015–20
- <sup>53</sup> Warmke JW, Ganetzky B. A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3438–3442
- <sup>54</sup> Niemeyer BA, Mery L, Zawar C, et al. Ion channels in health and disease. *EMBO Rep* 2001;2:568–573

<sup>55</sup> Menéndez ST, Rodrigo JP, Alvarez-Teijeiro S, Villaronga MÁ, Allonca E, Vallina A, Astudillo A, Barros F, Suárez C, García-Pedrero JM. Role of HERG1 potassium channel in both malignant transformation and disease progression in head and neck carcinomas. *Mod Pathol.* 2012;25:1069-78

<sup>56</sup> Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin.* 2011;61:212-36

<sup>57</sup> Rodrigo JP, Cabanillas R, Chiara MD, García Pedrero J, Florentino Fresno M, Suárez Nieto C. Molecular alterations in nodal metastases and its primary tumors in squamous cell carcinomas of the larynx. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2008;59:114-9

<sup>58</sup> Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:362–374

<sup>59</sup> Berx G, van Roy F. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1:a003129

<sup>60</sup> Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009;119:1420-8

<sup>61</sup> Smith A, Teknos TN, Pan Q. Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2013;49:287-92

<sup>62</sup> Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Löchner D, Birchmeier W. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol.* 1991;113:173-85

<sup>63</sup> Yoo JY, Yang SH, Lee JE, Cho DG, Kim HK, Kim SH, Kim IS, Hong JT, Sung JH, Son BC, Lee SW. E-cadherin as a predictive marker of brain metastasis in non-small-cell lung cancer, and its regulation by pioglitazone in a preclinical model. *J Neurooncol.* 2012;109:219-227

<sup>64</sup> Von Burstin J, Eser S, Paul MC, Seidler B, Brandl M, Messer M, von Werder A, Schmidt A, Mages J, Pagel P, Schnieke A, Schmid RM, Schneider G, Saur D. E-cadherin regulates metastasis of pancreatic cancer in vivo and is suppressed by a SNAIL/HDAC1/HDAC2 repressor complex. *Gastroenterology.* 2009;137:361-71, 371

<sup>65</sup> Chen X, Wang Y, Xia H, Wang Q, Jiang X, Lin Z, Ma Y, Yang Y, Hu M. Loss of E-cadherin promotes the growth, invasion and drug resistance of colorectal cancer cells and is associated with liver metastasis. *Mol Biol Rep.* 2012;39:6707-14

<sup>66</sup> Fan L, Wang H, Xia X, Rao Y, Ma X, Ma D, Wu P, Chen G. Loss of E-cadherin promotes prostate cancer metastasis via upregulation of metastasis-associated gene 1 expression. *Oncol Lett.* 2012;4:1225-1233

<sup>67</sup> Rodrigo JP, Domínguez F, Alvarez C, Manrique C, Herrero A, Suárez C. Expression of E-cadherin in squamous cell carcinomas of the supraglottic larynx with correlations to clinicopathological features. *Eur J Cancer.* 2002;38:1059-64

<sup>68</sup> Paksoy M, Hardal U, Caglar C. Expression of cathepsin D and E-cadherin in primary laryngeal cancers correlation with neck lymph node involvement. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2011;137:1371-7

<sup>69</sup> Sun C, Xin D, Wang Y. The expression of MMP-2, E-cadherin in supraglottic carcinoma and their relationship with cervical lymph node metastasis. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi.* 2007;21:834-7

<sup>70</sup> Bosch FX, Andl C, Abel U, et al. E-cadherin is a selective and strongly dominant prognostic factor in squamous cell carcinoma: a comparison of E-cadherin with desmosomal components. *Int J Cancer*. 2005;114:779–790

<sup>71</sup> Nijkamp MM, Span PN, Hoogsteen IJ, van der Kogel AJ, Kaanders JH, Bussink J. Expression of E-cadherin and vimentin correlates with metastasis formation in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Radiother Oncol*. 2011;99:344-8

<sup>72</sup> Wheelock MJ, Johnson KR. Cadherins as modulators of cellular phenotype. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2003;19:207-35

<sup>73</sup> Pannone G, Bufo P, Santoro A, et al. WNT pathway in oral cancer: epigenetic inactivation of WNT-inhibitors. *Oncology Reports*. 2010;24:1035–1041

<sup>74</sup> Chen G, et al. Up-regulation of Wnt-1 and beta-catenin production in patients with advanced metastatic prostate carcinoma: potential pathogenetic and prognostic implications. *Cancer* 2004;101:1345-1356

<sup>75</sup> Bukholm IK, Nesland JM, Borresen-Dale AL. Re-expression of E-cadherin, alpha-catenin and beta-catenin, but not of gamma-catenin, in metastatic tissue from breast cancer patients. *J Pathol*. 2000; 190: 15–19

<sup>76</sup> Iwaya K, Ogawa H, Kuroda M, Izumi M, Ishida T, Mukai K. Cytoplasmic and/or nuclear staining of beta-catenin is associated with lung metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2003;20:525-9.

<sup>77</sup> Kidani T, Nakamura A, Kamei S, Norimatsu Y, Miura H, Masuno H. Overexpression of cytoplasmic  $\beta$ -catenin inhibits the metastasis of the murine osteosarcoma cell line LM8. *Cancer Cell Int*. 2014;14:31.

<sup>78</sup> Gonzalez MV, Pello MF, Ablanado P, Suarez C, Alvarez V, Coto E. Chromosome 3p loss of heterozygosity and mutation analysis of the FHIT and  $\beta$ -cat genes in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pathol* 1998;51:520–4.

<sup>79</sup> Pukkila MJ, Virtaniemi JA, Kumpulainen EJ, et al. Nuclear  $\beta$ -catenin expression is related to unfavourable outcome in oropharyngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol* 2001;54:42

<sup>80</sup> 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;31:385–94.

<sup>81</sup> Cai Z-G, Shi X-J, Gao Y, Wei M-J, Wang C-Y, Yu G-Y.  $\beta$ -catenin expression pattern in primary oral squamous cell carcinoma. *Chinese Medical Journal*. 2008;121:1866–1870.

<sup>82</sup> Papagerakis P, Pannone G, Shabana AH, et al. Aberrant beta-catenin and LEF1 expression may predict the clinical outcome for patients with oropharyngeal cancer. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 2012;25:135–146.

<sup>83</sup> Santoro A, Pannone G, Papagerakis S, McGuff HS, Cafarelli B, Lepore S, De Maria S, Rubini C, Mattoni M, Staibano S, Mezza E, De Rosa G, Aquino G, Losito S, Loreto C, Crimi S, Bufo P, Lo Muzio L. Beta-catenin and epithelial tumors: a study based on 374 oropharyngeal cancers. *Biomed Res Int*. 2014;2014:948264.

<sup>84</sup> López F, Alvarez-Marcos C, Alonso-Guervós M, Domínguez F, Suárez C, Hermsen MA, Llorente JL. From laryngeal epithelial precursor lesions to squamous carcinoma of the larynx: the role of cell cycle proteins and  $\beta$ -catenin. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2013;270:3153-62.

- <sup>85</sup> Lopez-Gonzalez JS, Cristerna-Sanchez L, Vazquez-Manriquez ME, Jimenez-Orci G, Aguilar-Cazares D. Localization and level of expression of  $\beta$ -catenin in human laryngeal squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;130:89–93.
- <sup>86</sup> Schackmann RC, Tenhagen M, van de Ven RA, Derksen PW. p120-catenin in cancer mechanisms, models and opportunities for intervention. *J Cell Sci.* 2013;126:3515-25.
- <sup>87</sup> Van Hengel J, van Roy F. Diverse functions of p120ctn in tumors. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1773:78-88.
- <sup>88</sup> Ye H, Zhang X, Ou H, Huang Z. Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou. *Jing Wai Ke Za Zhi.* Expression of E-cadherin and P(120ctn) in nasopharyngeal carcinoma and their relationship. 2009;23:646-8.
- <sup>89</sup> Lo Muzio L, Pannone G, Santarelli A, Bambini F, Mascitti M, Rubini C, Testa NF, Dioguardi M, Leuci S, Bascones A, Reynolds AB, Marigliò MA. Is expression of p120ctn in oral squamous cell carcinomas a prognostic factor? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2013;115:789-98.
- <sup>90</sup> Ma, L.W., Zhou, Z.T., He, Q.B., and Jiang, W.W. Phosphorylated p120-catenin expression has predictive value for oral cancer progression. *J Clin Pathol.* 2012; 65: 315–319.
- <sup>91</sup> Kümper S, Ridley AJ. p120ctn and P-cadherin but not E-cadherin regulate cell motility and invasion of DU145 prostate cancer cells. *PLoS One.* 2010;5:e11801.
- <sup>92</sup> Rescher U, Gerke V. Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions. *J Cell Sci.* 2004;117:2631-9.
- <sup>93</sup> Waisman DM. Annexin II tetramer: structure and function. *Mol Cell Biochem.* 1995 Aug-Sep;149-150:301-22.

<sup>94</sup> Q. Ling, A.T. Jacovina, A. Deora, et al., Annexin II regulates fibrin homeostasis and neoangiogenesis in vivo, *J.Clin. Invest.* 2004; 113: 38–48.

<sup>95</sup> Hedhli N, Falcone DJ, Huang B, Cesarman-Maus G, Kraemer R, Zhai H, Tsirka SE, Santambrogio L, Hajjar KA. The annexin A2/S100A10 system in health and disease: emerging paradigms. *J Biomed Biotechnol.* 2012; 2012:406273.

<sup>96</sup> Menell JS, Cesarman GM, Jacovina BS, McLaughlin MA, Lev EA, Hajjar KA. Annexin II and bleeding in acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med.* 1999; 340:994-1004.

<sup>97</sup> Emoto K, Yamada Y, Sawada H, Fujimoto H, Ueno M, Takayama T, et al. Annexin II overexpression correlates with tenascin-C overexpression. A prognostic marker in colorectal carcinoma. *Cancer.* 2001; 92:1419-26.

<sup>98</sup> Luo CH, Liu QQ, Zhang PF, Li MY, Chen ZC, Liu YF. Prognostic significance of annexin II expression in non-small cell lung cancer. *Clin Transl Oncol.* 2013; 15:938-46.

<sup>99</sup> Liu JW, Shen JJ, Tanzillo-Swartz A, Maldonado CM, Person MD, Lau SS, et al. Annexin II expression is reduced or lost in prostate cancer cells and its re-expression inhibits prostate cancer cell migration. *Oncogene.* 2003; 22:1475-85.

<sup>100</sup> Rodrigo JP, García-Pedrero JM, Llorente JL, Fresno MF, Allonca E, Suarez C, Hermsen M. Down-regulation of annexin A1 and A2 protein expression in intestinal-type sinonasal adenocarcinomas. *Hum Pathol.* 2011; 42:88-94.

<sup>101</sup> Rodrigo Tapia JP, Pena Alonso E, García-Pedrero JM, Florentino Fresno M, Suárez Nieto C, Owen Morgan R, Fernández MP. Annexin A2 expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2007; 58:257-62.

<sup>102</sup> Pena-Alonso E, Rodrigo JP, Parra IC, Pedrero JM, Meana MV, Nieto CS, Fresno MF, Morgan RO, Fernandez MP. Annexin A2 localizes to the basal epithelial layer and is down-regulated in dysplasia and head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 2008; 263:89-98.

<sup>103</sup> Rodrigo JP, Lequerica-Fernández P, Rosado P, Allonca E, García-Pedrero JM, de Vicente JC. Clinical significance of annexin A2 downregulation in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2011; 33:1708-14.

<sup>104</sup> De Oliveira MV, de Carvalho Fraga CA, Barros LO, Pereira CS, Santos SH, Basile JR, Gomez RS, Guimarães AL, De-Paula AM. High expression of S100A4 and endoglin is associated with metastatic disease in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Exp Metastasis*. 2014; 31:639-49.

<sup>105</sup> Kornberg LJ. Focal adhesion kinase and its potential involvement in tumor invasion and metastasis. *Head Neck*. 1998; 20:745-52.

<sup>106</sup> Gabarra-Niecko V, Schaller MD, Dunty JM. FAK regulates biological processes important for the pathogenesis of cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2003;22:359–374.

<sup>107</sup> 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; 5:505–515.

<sup>108</sup> de Vicente JC, Rodrigo JP, Rodriguez-Santamarta T, Lequerica-Fernández P, Allonca E, García-Pedrero JM. Cortactin and focal adhesion kinase as predictors of cancer risk in patients with premalignant oral epithelial lesions. *Oral Oncol*. 2012; 48:641-6.

<sup>109</sup> de Vicente JC, Rosado P, Lequerica-Fernández P, Allonca E, Villallaín L, Hernández-Vallejo G. Focal adhesion kinase overexpression: correlation with lymph node metastasis and shorter survival in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2013; 35:826-30.

<sup>110</sup> 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; 136:1295-302.

<sup>111</sup> Park JH, Lee BL, Yoon J, Kim J, Kim MA, Yang HK, Kim WH. Focal adhesion kinase (FAK) gene amplification and its clinical implications in gastric cancer. *Hum Pathol.* 2010; 41:1664-73.

<sup>112</sup> Von Sengbusch A, Gassmann P, Fisch KM, Enns A, Nicolson GL, Haier J. Focal adhesion kinase regulates metastatic adhesion of carcinoma cells within liver sinusoids. *Am J Pathol.* 2005; 166:585-96.

<sup>113</sup> Chen D, Zhang B, Kang J, Ma X, Lu Y, Gong L. Expression and clinical significance of FAK, ILK, and PTEN in salivary adenoid cystic carcinoma. *Acta Otolaryngol.* 2013;133:203-8.

<sup>114</sup> Schwock J, Dhani N, Hedley DW. Targeting focal adhesion kinase signaling in tumor growth and metastasis. *Expert Opin Ther Targets.* 2010; 14:77-94.

<sup>115</sup> Ward KK, Tancioni I, Lawson C, Miller NL, Jean C, Chen XL, Uryu S, Kim J, Tarin D, Stupack DG, Plaxe SC, Schlaepfer DD. Inhibition of focal adhesion kinase (FAK) activity prevents anchorage-independent ovarian carcinoma cell growth and tumor progression. *Clin Exp Metastasis.* 2013;30:579-94

<sup>116</sup> Stone RL, Baggerly KA, Armaiz-Pena GN, Kang Y, Sanguino AM, Thanapparasr D, Dalton HJ, Bottsford-Miller J, Zand B, Akbani R, Diao L, Nick AM, Degeest K, Lopez-Berestein G, Coleman RL, Lutgendorf S, Sood AK. Focal adhesion kinase: An alternative focus for anti-angiogenesis therapy in ovarian cancer. *Cancer Biol Ther.* 2014; 15:919-29.

<sup>117</sup> Williams M. E., Gaffey M. J., Weiss L. M., Wilczynski S. P., Schuurin E., Levine P. A. Chromosome 11q13 amplification in head and neck squamous cell carcinoma. Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 1993; 119:1238-43.

<sup>118</sup> Meredith SD, Levine PA, Burns JA, Gaffey MJ, Boyd JC, Weiss LM, Erickson NL, Williams ME. Chromosome 11q13 amplification in head and neck squamous cell carcinoma. Association with poor prognosis. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1995; 121:790–794.

<sup>119</sup> Hermsen M, Alonso GM, Meijer G, van DP, Suarez NC, Marcos CA, Sampedro A. Chromosomal changes in relation to clinical outcome in larynx and pharynx squamous cell carcinoma. Cell Oncol. 2005;27:191–198.

<sup>120</sup> Gibcus JH, Mastik MF, Menkema L, de Bock GH, Kluin PM, Schuurin E, van der Wal JE. Cortactin expression predicts poor survival in laryngeal carcinoma. Br J Cancer. 2008;98:950-5.

<sup>121</sup> Kim YN, Koo KH, Sung JY, Yun UJ, Kim H. Anoikis resistance: an essential prerequisite for tumor metastasis. Int J Cell Biol. 2012; 2012:306879.

<sup>122</sup> Luo ML, Shen XM, Zhang Y, Wei F, Xu X, Cai Y, Zhang X, Sun YT, Zhan QM, Wu M, Wang MR. Amplification and overexpression of CTTN (EMS1) contribute to the metastasis of esophageal squamous cell carcinoma by promoting cell migration and anoikis resistance. Cancer Res. 2006;66:11690-9.

<sup>123</sup> Li Y, Tondravi M, Liu J, Smith E, Haudenschild CC, Kaczmarek M, Zhan X. Cortactin potentiates bone metastasis of breast cancer cells. Cancer Res. 2001;61:6906-11.

<sup>124</sup> Chuma M, Sakamoto M, Yasuda J, Fujii G, Nakanishi K, Tsuchiya A, Ohta T, Asaka M, Hirohashi S. Overexpression of cortactin is involved in motility and metastasis of hepatocellular carcinoma. J Hepatol. 2004; 41:629-36.

<sup>125</sup> Furman C, Short SM, Subramanian RR, Zetter BR, Roberts TM. DEF-1/ASAP1 is a GTPase-activating protein (GAP) for ARF1 that enhances cell motility through a GAP-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2002; 277:7962-9.

<sup>126</sup> Randazzo PA, Andrade J, Miura K, Brown MT, Long YQ, Stauffer S, Roller P, Cooper JA. The Arf GTPase-activating protein ASAP1 regulates the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97:4011-6.

<sup>127</sup> Sabe H, Hashimoto S, Morishige M, Ogawa E, Hashimoto A, Nam JM, Miura K, Yano H, Onodera Y. The EGFR-GEP100-Arf6-AMAP1 signaling pathway specific to breast cancer invasion and metastasis. *Traffic.* 2009; 10:982-93.

<sup>128</sup> Onodera Y, Hashimoto S, Hashimoto A, Morishige M, Mazaki Y, Yamada A, Ogawa E, Adachi M, Sakurai T, Manabe T, Wada H, Matsuura N, Sabe H. Expression of AMAP1, an ArfGAP, provides novel targets to inhibit breast cancer invasive activities. *EMBO J.* 2005;24:963–973.

<sup>129</sup> Lin D, Watahiki A, Bayani J, Zhang F, Liu L, Ling V, Sadar MD, English J, Fazli L, So A, Gout PW, Gleave M, Squire JA, Wang Y-Z. ASAP1, a gene at 8q24, is associated with prostate cancer metastasis. *Cancer Res.* 2008; 68:4352–4359.

<sup>130</sup> Cha JD, Kim HJ, Cha IH. Genetic alterations in oral squamous cell carcinoma progression detected by combining array-based comparative genomic hybridization and multiplex ligation-dependent probe amplification. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011;111:594-607.

<sup>131</sup> Rubin Grandis J, Melhem MF, Gooding WE, Day R, Holst VA, Wagener MM, Drenning SD, Tweardy DJ. Levels of TGF-alpha and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst.* 1998; 90:824–832.

<sup>132</sup> Maurizi M, Almadori G, Ferrandina G, Distefano M, Romanini ME, Cadoni G, Benedetti-Panici P, Paludetti G, Scambia G, Mancuso S. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 1996; 74:1253-7.

<sup>133</sup> Ang KK, Berkey BA, Tu X, Zhang HZ, Katz R, Hammond EH, Fu KK, Milas L. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res*. 2002; 62:7350-6.

<sup>134</sup> Temam S, Kawaguchi H, El-Naggar AK, Jelinek J, Tang H, Liu DD, Lang W, Issa JP, Lee JJ, Mao L. Epidermal growth factor receptor copy number alterations correlate with poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25:2164–217.

<sup>135</sup> Chiang WF, Liu SY, Yen CY, Lin CN, Chen YC, Lin SC, Chang KW. Association of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene copy number amplification with neck lymph node metastasis in areca-associated oral carcinomas. *Oral Oncol*. 2008; 44:270–276.

<sup>136</sup> Soulieres D, Senzer NN, Vokes EE, Hidalgo M, Agarwala SS, Siu LL. Multicenter phase II study of erlotinib, an oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent or metastatic squamous cell cancer of the head and neck. *J Clin Oncol*. 2004;22(1):77–85.

<sup>137</sup> Baselga J, Trigo JM, Bourhis J, Tortochaux J, Cortes-Funes H, Hitt R, Gascon P, Amellal N, Harstrick A, Eckhardt A. Phase II multicenter study of the antiepidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab in combination with platinum-based chemotherapy in patients with platinum-refractory metastatic and/or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol*. 2005; 23:5568–5577.

<sup>138</sup> Sok JC, Coppelli FM, Thomas SM, Lango MN, Xi S, Hunt JL, Freilino ML, Graner MW, Wikstrand CJ, Bigner DD, Gooding WE, Furnari FB, Grandis JR. Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting. *Clin Cancer Res.* 2006; 12:5064–5073.

<sup>139</sup> West KA, Brognard J, Clark AS, Linnoila IR, Yang X, Swain SM, Harris C, Belinsky S, Dennis PA. Rapid Akt activation by nicotine and a tobacco carcinogen modulates the phenotype of normal human airway epithelial cells. *J Clin Invest.* 2003; 111:81–90.

<sup>140</sup> Amornphimoltham P, Sriuranpong V, Patel V, Benavides F, Conti CJ, Sauk J, et al. Persistent activation of the Akt pathway in head and neck squamous cell carcinoma: A potential target for UCN-01. *Clinical Cancer Research.* 2004; 10:4029–37.

<sup>141</sup> Massarelli E, Liu DD, Lee JJ, El-Naggar AK, Lo Muzio L, Staibano S, De Placido S, Myers JN, Papadimitrakopoulou VA. Akt activation correlates with adverse outcome in tongue cancer. *Cancer* 2005; 104:2430-6.

<sup>142</sup> Lim J, Kim JH, Paeng JY, Kim MJ, Hong SD, Lee JI, Hong SP. Prognostic value of activated Akt expression in oral squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol* 2005; 58:1199–205.

<sup>143</sup> Yu Z, Weinberger PM, Sasaki C, Egleston BL, Speier WF 4th, Haffty B, Kowalski D, Camp R, Rimm D, Vairaktaris E, Burtness B, Psyrri A. Phosphorylation of Akt (Ser473) predicts poor clinical outcome in oropharyngeal squamous cell cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007; 16:553-8.

<sup>144</sup> Argiris A, Cohen E, Karrison T, Esparaz B, Mauer A, Ansari R, et al. A phase II trial of perifosine, an oral alkylphospholipid, in recurrent or metastatic head and neck cancer. *Cancer Biol Ther.* 2006; 5:766–70.

<sup>145</sup> Rocco JW, Sidransky D. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res.* 2001;264:42–55.

<sup>146</sup> Wittekindt C, Wagner S, Mayer CS, Klusmann JP. Basics of tumor development and importance of human papilloma virus (HPV) for head and neck cancer. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg.* 2012;11:Doc09.

<sup>147</sup> Ribeiro KB, Levi JE, Pawlita M, Koifman S, Matos E, Eluf-Neto J, Wunsch-Filho V, Curado MP, Shangina O, Zaridze D, Szeszenia-Dabrowska N, Lissowska J, Daudt A, Menezes A, Bencko V, Mates D, Fernandez L, Fabianova E, Gheit T, Tommasino M, Boffetta P, Brennan P, Waterboer T. Low human papillomavirus prevalence in head and neck cancer: results from two large case-control studies in high-incidence regions. *Int J Epidemiol.* 2011; 40:489–502.

<sup>148</sup> Bazan V, Zanna I, Migliavacca M, Sanz-Casla M, et al. Prognostic significance of p16INK4a alterations and 9p21 loss of heterozygosity in locally advanced laryngeal squamous cell carcinoma. *JCell Physiol.* 2002; 192:286–293.

<sup>149</sup> Yuen PW, Man M, Lam KY, Kwong YL. Clinicopathological significance of p16 gene expression in the surgical treatment of head and neck squamous cell carcinomas. *J. Clin. Pathol.* 2002;55:58–60.

<sup>150</sup> Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Lu C, Kim H, Axelrod R, Silverman CC, Redmond KP, Gillison ML. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med.* 2010; 363:24-35.

<sup>151</sup> Fischer CA, Kampmann M, Zlobec I, Green E, Tornillo L, Lugli A, Wolfensberger M, Terracciano LM. p16 expression in oropharyngeal cancer: its impact on staging and prognosis compared with the conventional clinical staging parameters. *Ann Oncol.* 2010;21:1961–1966.

<sup>152</sup> Hibi K, Mizukami H, Saito M, Kigawa G, Nemoto H. p16 Methylation is frequently detected in the serum of metastatic colorectal cancer patients. *Hepatogastroenterology.* 2014;61:354-6

<sup>153</sup> Namazie A, Alavi S, Olopade OI, et al. Cyclin D1 amplification and P16 (MTS1/CDK4I) deletion correlate with poor prognosis in head and neck tumors. *Laryngoscope.* 2002; 112:472–81.

<sup>154</sup> Sinha P, Thorstad WT, Nussenbaum B, Haughey BH, Adkins DR, Kallogjeri D, Lewis, JS Jr. Distant metastasis in p16-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: a critical analysis of patterns and outcomes. *Oral Oncol.* 2014; 50:45-51.

<sup>155</sup> Huang SH P-OB, Liu FF, Waldron J, Ringash J, Irish J, Cummings B, Siu LL, Kim J, Weinreb I, Hope A, Gullane P, Brown D, Shi W, O’Sullivan B. Atypical clinical behavior of p16 confirmed HPV-Related oropharyngeal squamous cell carcinoma treated with radical radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012; 82:276–83.

<sup>156</sup> Müller S, Khuri FR, Kono SA, Beitler JJ, Shin DM, Saba NF. HPV positive squamous cell carcinoma of the oropharynx. Are we observing an unusual pattern of metastases? *Head Neck Pathol.* 2012; 6:336-44.

<sup>157</sup> Camacho J., Sánchez A., Pardo L.A., Stühmer W. Cytoskeletal interactions determine the electrophysiological properties of human EAG potassium channels. *Pflügers Arch.* 2000;441:167–174.

<sup>158</sup> Downie B.R., Sánchez A., Knötgen H., Contreras-Jurado C., Gymnopoulos M., Weber C., Stühmer W., Pardo L.A. Eag1 expression interferes with hypoxia homeostasis and induces angiogenesis in tumors. *J. Biol. Chem.* 2008; 283:36234–36230.

<sup>159</sup> Rodríguez-Rasgado JA, Acuña-Macías I, Camacho J. Eag1 channels as potential cancer biomarkers. *Sensors (Basel)*. 2012; 12:5986-95.

<sup>160</sup> Farías L.M.B., Ocaña D.B., Díaz L., Larrea F., Ávila-Chávez E., Cadena A., Hinojosa L.M., Lara G., Villanueva L.A., Vargas C., et al. Ether à go-go potassium channels as human cervical cancer markers. *Cancer Res.* 2004; 64:6996–7001.

<sup>161</sup> Shao XD, Wu KC, Hao ZM, et al. The potent inhibitory effects of cisapride, a specific blocker for human ether-a-go-go-related gene (HERG) channel, on gastric cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2005;4:295–301.

<sup>162</sup> Pillozzi S, Brizzi MF, Balzi M, et al. HERG potassium channels are constitutively expressed in primary human acute myeloid leukemias and regulate cell proliferation of normal and leukemic hemopoietic progenitors. *Leukemia* 2002; 16:1791–1798.

<sup>163</sup> Sanguinetti MC, Tristani-Firouzi M. hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature* 2006; 440:463–469.

<sup>164</sup> Field JK, Pavelic ZP, Spandidos DA, Stambrook PJ, Jones AS, Gluckman JL. The role of the p53 tumor suppressor gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1993; 119:1118-22.

<sup>165</sup> De Vicente C, Junquera Gutierrez L, Zapatero A, et al. Prognostic significance of p53 expression in oral squamous cell carcinoma without neck node metastases. *Head Neck.* 2004;26:22–30.

- <sup>166</sup> Nylander K, Dabelsteen E, Hall PA. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. *J. Oral Pathol. Med.* 2000; 29:413–425.
- <sup>167</sup> Poeta ML, Manola J, Goldwasser MA, Forastiere A, Benoit N, Califano JA, Ridge JA, Goodwin J, Kenady D, Saunders J, Westra W, Sidransky D, Koch WM. TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 2007; 357:2552-61.
- <sup>168</sup> Friedman M, Lim J, Manders E, et al. Prognostic significance of Bcl-2 and p53 expression in advanced laryngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2001; 23:280–285
- <sup>169</sup> Smardova J, Ksicova K, Binkova H, et al. Analysis of tumor suppressor p53 status in head and neck squamous cell carcinoma. *OncolRep.* 2004; 11:923–929.
- <sup>170</sup> Pukkila M, Kumpulainen E, Virtaniemi J, et al. Nuclear and cytoplasmic p53 expression in pharyngeal squamous cell carcinoma: prognostic implications. *Head Neck.* 2002; 24:784–791.
- <sup>171</sup> Tandon S, Tudur-Smith C, Riley RD, Boyd MT, Jones TM. A systematic review of p53 as a prognostic factor of survival in squamous cell carcinoma of the four main anatomical subsites of the head and neck. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010 Feb; 19(2):574-87.
- <sup>172</sup> Powell E, Piwnica-Worms D, Piwnica-Worms H. Contribution of p53 to metastasis. *Cancer Discov.* 2014; 4:405-14.
- <sup>173</sup> Peller S, Halevy A, Slutzki S, Kopilova Y, Rotter V. p53 mutations in matched primary and metastatic human tumors. *Mol Carcinog* 1995; 13:166 – 72.
- <sup>174</sup> Edstrom S, Cvetkovska E, Westin T, Young C. Overexpression of p53-related proteins predicts rapid growth rate of head and neck cancer. *Laryngoscope.* 2001;111:124–130.

# ANEXO

## Immunohistochemical markers of distant metastasis in laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinomas

Juan P. Rodrigo · Patricia Martínez · Eva Allonca ·  
Laura Alonso-Durán · Carlos Suárez · Aurora Astudillo ·  
Juana María García-Pedrero

Received: 24 May 2013 / Accepted: 13 December 2013 / Published online: 27 December 2013  
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

**Abstract** Metastasis remains a major cause of mortality in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). Current clinicopathological features have shown limited predictability for the risk of distant metastasis in individual patients, and therefore more accurate and reliable markers are needed. The aim of this study was to investigate the ability of various molecular markers present in primary tumors to predict the risk of developing distant metastasis. Restrictive clinical criteria were applied for patient selection in order to carry out a case–control study with comparable clinical features on a group-wide basis and a similar risk of metastasis. All patients were surgically treated (with postoperative radiotherapy when appropriate) and classified as stage IV disease. Immunohistochemical analysis was performed for a panel of proteins known to participate in cellular processes relevant to metastatic dissemination (E-cadherin, annexin A2, cortactin, FAK, EGFR, p53, and p-AKT). Results showed that the loss of E-cadherin expression was significantly correlated with the risk of distant metastasis ( $P = 0.002$ ; log-rank test), while the loss of annexin A2 expression was nearly statistically

significant ( $P = 0.06$ ). None of the other protein markers assessed were associated with the development of distant metastasis. Therefore, according to our data the loss of epithelial adhesion seems to play a central role in the development of metastasis in HNSCC, and more importantly, immunohistochemical assessment of key proteins involved in cell adhesion regulation, such as E-cadherin could represent a useful tool to evaluate easily and routinely the metastatic potential of these carcinomas.

**Keywords** Head and neck cancer · Metastasis · Markers · Immunohistochemistry

### Introduction

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is mainly a loco-regional disease. Despite significant advances in surgery and (chemo)radiotherapy treatment protocols, patient survival has only substantially improved over the past decade for those affected by tonsil and base of the tongue cancers, compared to other sites [1]. This improvement has been attributed to a change in the natural history of the disease (increased frequency of HPV-related cancers) instead of better treatment outcomes. We have managed to achieve better rates of loco-regional control, but still failing to control distant metastasis.

Distant metastasis (DM) are defined as tumor spread to other organ systems. Lung, liver, and bone are the most common sites for hematogenous metastasis of head and neck carcinoma. DM rates vary between 4 and 26 % depending on the different series [2–9]. The majority of DM occur within the first 2 years from the initial diagnosis, and as DM develop, the chance of cure is very low and survival decreases dramatically even with an early

J. P. Rodrigo (✉) · P. Martínez · E. Allonca · L. Alonso-Durán ·  
C. Suárez · J. M. García-Pedrero (✉)  
Laboratorio 2 ORL, Department of Otolaryngology, Hospital  
Universitario Central de Asturias, Instituto Universitario de  
Oncología del Principado de Asturias (IUOPA), Universidad de  
Oviedo, 33006 Oviedo, Spain  
e-mail: juanpablo.rodrigo@sespa.principales

J. M. García-Pedrero  
e-mail: juanagp@ficyt.es

A. Astudillo  
Department of Pathology, Hospital Universitario Central de  
Asturias, Instituto Universitario de Oncología del Principado de  
Asturias, Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain

diagnosis. It is therefore of great importance to predict which patients will develop DM during follow-up, as this may influence the decision on the respective treatment options for the initial HNSCC. It has been demonstrated a reduction of DM occurrence with systemic treatment (chemotherapy) in some larynx-preservation trials and in few series of concurrent chemo-radiotherapy trials [10]. Nevertheless, systemic therapy protocols cannot be widely applied to entire patient populations, since only a small proportion of patients with HNSCC will eventually develop DM. Hence, the identification of possible risk factors to predict DM is essential to delineate the subset of patients who could benefit from systemic therapy. This would be particularly important in surgically treated patients given that the addition of chemotherapy to their treatment will result in a significant increase in severe adverse effects.

Various studies have evaluated the clinicopathological risk factors associated with the development of DM in HNSCC patients. The most common risk factors involved are the primary site (hypopharynx), advanced stage, younger age at diagnosis, loco-regional control, metastatic lymph nodes and extracapsular lymph node extension [3–5, 7, 8]. In a recent work, we have also found that patients with pharyngeal poorly differentiated tumors with multiple or bilateral nodal metastases are at greater risk of DM [9]. However, unfortunately, these clinicopathological features still have limited predictability for individual patients, as less than 40 % of patients fulfilling these characteristics will develop DM. Thus, novel markers are needed to reliably and accurately predict the risk of DM in individual patients during the course of their disease.

Metastasis formation requires the spreading of cancer cells from their primary site to secondary locations in the body, the reattachment and growth at the new location. Numerous cellular processes, including cell adhesion, apoptosis, invasion, and migration, are required to be co-opted by metastatic tumor cells in order to successfully establish metastatic disease [11]. Biomarkers reflecting molecular alterations of these processes at the primary tumor could yield valuable information about its metastatic potential and potentially enable pathologists and clinicians to estimate individually the chance of DM in HNSCC patients. Few reports have described biomarkers useful to predict the metastatic potential of HNSCC [12–14] and the molecular mechanisms mediating DM remain largely unknown.

The aim of this study was to investigate the ability of various molecular markers present in primary tumors to predict the risk of developing DM in a series of patients treated with complete surgical resection (and adjuvant therapy when appropriate). To accomplish this, we selected a panel of proteins that participate in various cellular processes potentially implicated in the metastatic

dissemination, such as cell adhesion (E-cadherin, annexin A2), invasion and migration (cortactin, FAK), apoptosis (p53) and proliferation (EGFR, p-AKT). The influence of possible confounding factors was avoided by applying very restrictive clinical criteria for patient selection and also two well-balanced groups of HNSCC patients who developed or not DM.

**Methods**

**Patients**

Two groups of HNSCC patients were selected for study, consisting of patients who developed DM during follow-up (case group) or who remained metastasis-free for a minimum follow-up period of 3 years (control group; Table 1). Further selection criteria were surgically treated tumors with negative surgical margins, pathological stage IV disease, localization in the hypopharynx or larynx, and no recurrent disease other than DM. This selection was applied to perform a case-control study with comparable clinical features on a group-wide basis and a similar risk of developing DM. Special care was taken to match the groups in relation with N classification, since this pathological parameter is the strongest predictor of DM and poor outcome.

**Table 1** Clinicopathological characteristics of the patients and their tumors

| Characteristic        | Distant metastasis group | No distant metastasis group | P value |
|-----------------------|--------------------------|-----------------------------|---------|
| Age (years, mean)     | 60.9                     | 57.3                        | 0.098*  |
| Localization          |                          |                             | 0.19*   |
| Larynx                | 13                       | 20                          |         |
| Hypopharynx           | 31                       | 24                          |         |
| T classification      |                          |                             | 0.34*   |
| T1–T2                 | 8                        | 11                          |         |
| T3                    | 15                       | 9                           |         |
| T4                    | 21                       | 24                          |         |
| N classification      |                          |                             | 0.9*    |
| N0                    | 5                        | 6                           |         |
| N1–3                  | 39                       | 38                          |         |
| Differentiation grade |                          |                             | 0.26*   |
| Well                  | 6                        | 12                          |         |
| Moderately            | 22                       | 20                          |         |
| Poorly                | 16                       | 12                          |         |

\* t test

\* Chi square test

Of a total of 494 patients with primary HNSCC who were surgically treated at the Department of Otorhinolaryngology of the Hospital Universitario Central de Asturias from January 1999 to December 2006, 44 patients were found eligible for the case group and other 44 cases were selected for the control group (Table 1). All but five patients were men, and the mean age was 59 years (range 36–80 years). The Institutional Review Board of our Hospital approved the study protocol, and written informed consent was obtained from all the patients. The tumor stage was determined according to the TNM classification recommended by the International Union Against Cancer (7th Edition, 2010). Patients were followed up every month in the first 6 months after completing the treatment, every 2 months until the first year, every 3 months until the third year, and every 6 months thereafter. Follow-up consisted of physical examination and chest radiography; other investigations, such as liver ultrasonography, computed tomographic or magnetic resonance imaging scan, or bone scintigraphy were performed when clinically indicated. If cancers occurred in other sites, efforts were made to obtain histological specimens. Cancers were tabulated as DM when there were nodules of the same cell type or when histological findings were unavailable and no evidence of other primary tumors was present.

#### Tissue microarrays

HNSCC tissue microarrays (TMAs) were constructed as previously described [15]. The TMAs were built with institutional review board approval from archived formalin-fixed, paraffin-embedded squamous cell carcinoma tissue samples (Department of Pathology at the Hospital Universitario Central de Asturias) from the above-mentioned 88 surgical patients. The original archived hematoxylin-eosin-stained slides were reviewed by a pathologist. Three cores of morphologically representative non-necrotic tumor areas were taken from donor tissue blocks to fully represent each case. In addition, each TMA also contained three cores of normal pharyngeal epithelium as an internal control. In order to check the histopathological diagnosis and the adequacy of tissue sampling, a section from each microarray was stained with hematoxylin and eosin and examined by light microscopy.

#### Immunohistochemistry

3- $\mu$ m-thick TMA sections were cut and dried on Flex IHC microscope slides (Dako). The sections were deparaffinized with standard xylene and hydrated through graded alcohols into water. Antigen retrieval was performed using Envision Flex Target Retrieval solution (Dako), high pH, low pH (for annexin A2 and p120) or with proteinase K

(for EGFR). Staining was done at room temperature on an automatic staining workstation (Dako Autostainer Plus) using the Dako EnVision Flex + Visualization System (Dako). The antibodies and dilutions used are shown in Table 2. Counterstaining with hematoxylin was the final step.

The slides were viewed randomly, without clinical data, by two of the authors. At present, there are no validated scoring systems for interpreting immunohistochemical staining of the studied proteins. Since cactactin and FAK staining showed a homogeneous distribution, a semiquantitative scoring system based on staining intensity was applied, and immunostaining was thus scored as negative (0), weak (1), moderate (2) and strong protein expression (3). For statistical purposes, staining data were dichotomized as negative-weak expression (scores 0–1) versus moderate-strong expression (scores 2–3).

EGFR immunostaining was quantified as follows: quantity scores from 0 to 4 were respectively assigned if 0 to 25, 26 to 50, 51 to 75, and 76 to 100 % of the tumor cells were positive. The staining intensity was rated on a scale of 0–3 (0 = negative, 1 = weak, 2 = moderate, and 3 = strong). The raw data were then converted to a German Immunoreactive Score (IRS) by multiplying the quantity and staining intensity scores. Theoretically, the scores could range from 0 to 12. An IRS score above the median (five or higher) was considered high reactivity and 0 to 4 weak.

Immunostaining for p53, p-AKT, E-cadherin, annexin A2,  $\beta$ -catenin and p120 was evaluated using a semi-

**Table 2** Antibodies used in the immunohistochemical analysis of protein expression

| Protein      | Primary antibody (manufacturer)               | Antibody Dilution      |
|--------------|---|------------------------|
| Contactin    | Mouse Monoclonal Clone 30 (BD Biosciences)    | 1:200                  |
| FAK          | Mouse Monoclonal Clone 4.47 (Upstate Biotech) | 1:250                  |
| p53          | Mouse Monoclonal Clone DO-7 (Dako)            | 1:10                   |
| p-AKT        | Rabbit Monoclonal Clone 14-5 (Dako)           | 1:20                   |
| E-cadherin   | Mouse Monoclonal Clone NCH-38 (Dako)          | 1:25                   |
| Annexin A2   | Mouse Monoclonal (BD Biosciences)             | 1:450                  |
| EGFR         | PharmDx kit (Dako)                            | Following instructions |
| E-cadherin   | Mouse IgG2a (BD Biosciences)                  | 1:4000                 |
| Beta-catenin | Mouse IgG1 (BD Biosciences)                   | 1:200                  |
| p120         | Mouse IgG1 (BD Biosciences)                   | 1:100                  |

quantitative scale (0, <10, 10–50, or >50 % positive tumor cells). For statistical analysis, an overexpression of p53 or p-AKT was considered present if >10 % of the malignant cells showed nuclear (p53) or nuclear/cytoplasmatic (p-AKT) positivity. For E-cadherin, annexin A2,  $\beta$ -catenin (nuclear or membranous) and p120 the staining data were dichotomized as negative expression (0–10 % stained cells) versus positive expression (>10 % stained cells).

#### Statistical analysis

$\chi^2$  and Fisher's exact tests were used for comparison between categorical variables. For time-to-event analysis, Kaplan–Meier curves were plotted. Cox proportional hazards models were utilized for univariate and multivariate analyses. The hazard ratios (HR) with 95 % confidence interval (CI) and *P* values were reported. All tests were two-sided. *P* values of  $\leq 0.05$  were considered statistically significant.

## Results

#### Protein expression analysis in laryngeal and hypopharyngeal carcinomas

Representative examples of the immunohistochemical expression analysis of the various proteins studied in our series of HNSCC TMA's are shown in Fig. 1. Cortactin and FAK staining was cytoplasmic, with occasional membrane enhancement (Fig. 1a–d). p-AKT staining was also cytoplasmic (Fig. 1e, f). Normal epithelia showed negligible expression of these proteins. EGFR staining was mainly membranous but also cytoplasmic (Fig. 1g, h) in the tumor whereas normal mucosa displayed weak expression in the basal cell layer. P53 staining was nuclear in the tumor areas (Fig. 1i, j), with negligible expression in normal mucosa. E-cadherin and annexin A2 showed a membranous pattern in the tumor areas (Fig. 1k–n). In normal mucosa, these proteins were expressed in basal and suprabasal cells layers of epithelium, with a lack of staining in the most external and differentiated layers. No correlations were observed between the expression of the different proteins studied in our series of HNSCC included in the TMA's.

#### Relationship between protein expression and the development of distant metastasis

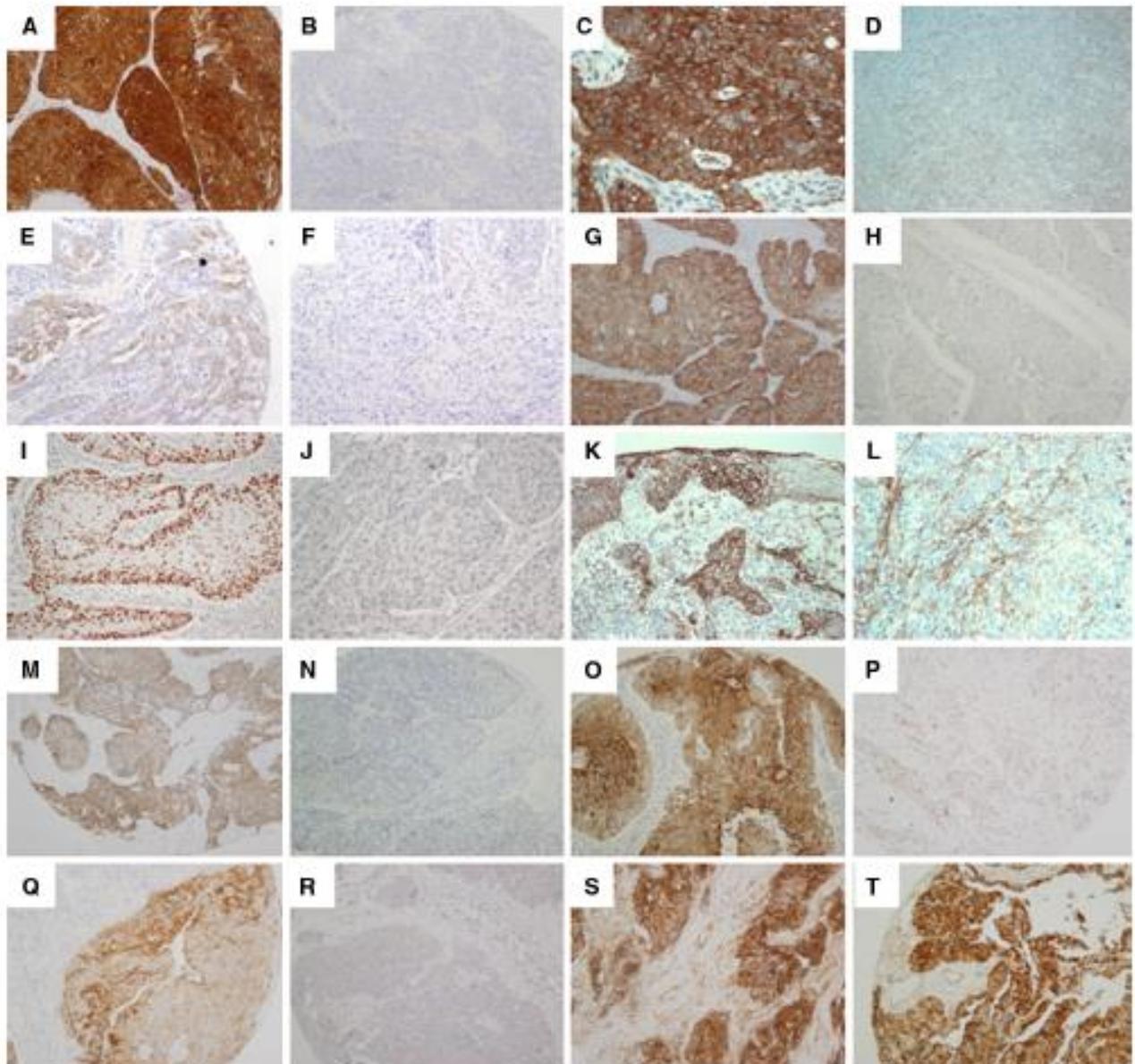
Table 3 shows the expression of the protein markers investigated in relation to the development of DM. The loss of E-cadherin expression and the loss of annexin A2 expression (which means expression in less than 10 % tumor cells) were more frequent in cases with distant

metastasis, with differences almost attaining statistical significance. None of the other protein markers assessed were associated with the development of DM. To further confirm these results we repeated the immunohistochemical analysis of E-cadherin expression using a different antibody (from BD Biosciences) targeting specifically the intracellular domain of E-cadherin, considered to be functionally involved in the regulation of cell migration and epithelial-mesenchymal transition (EMT) (Fig. 1o, p). A significant association was observed between the loss of E-cadherin expression and distant metastasis using this antibody ( $P = 0.029$ ; Table 3). We also found a significant correlation between the expressions of E-cadherin detected with both antibodies (Spearman's rho 0.541,  $P < 0.001$ ). In addition, two well-known proteins related (i.e.  $\beta$ -catenin and p120) were included for analysis. The expression of both  $\beta$ -catenin and p120 significantly correlated with that of E-cadherin ( $P < 0.001$ ). p120 staining was predominantly membranous (Fig. 1q, r), whereas  $\beta$ -catenin exhibited two distinct expression patterns (nuclear and membranous) in the tumor areas (Fig. 1s, t). We found that low  $\beta$ -catenin expression, nuclear  $\beta$ -catenin, and low p120 expression were more frequent in patients who developed DM, although differences did not reach statistical significance (Table 3).

Furthermore, Univariate Cox regression analysis showed that the loss of E-cadherin expression was significantly correlated with the risk of DM with either Dako antibody ( $P = 0.007$ , Fig. 2a) or BD antibody ( $P = 0.002$ , Fig. 2b), while the association of the loss of annexin A2 expression with DM was nearly statistically significant ( $P = 0.06$ , Fig. 2c). In multivariate analysis, the only parameter significantly associated with a higher risk of DM was the loss of E-cadherin expression (HR = 2.65, 95 % CI 1.34–5.22;  $P = 0.005$ ). The combination of both the loss of E-cadherin and annexin A2 expression was not superior to the loss of E-cadherin expression alone in predicting DM (HR = 2.3, 95 % CI 1.25–4.21;  $P = 0.007$ ).

## Discussion

Metastasis remains a major cause of mortality in patients with HNSCC. Patients with metastatic disease have extremely poor prognosis and limited treatment options. It would be of great interest to identify the subset of patients who are at high risk of DM to target them with adjuvant treatments like chemotherapy. The lack of accurate and reliable predictors of DM often prevents the use of different therapeutic strategies, thus highlighting the importance of defining risk factors for DM in these patients. We hypothesized that specific patterns of protein expression in the primary tumor may be required to promote a metastatic phenotype in HNSCC and these key proteins could



**Fig. 1** Representative examples of positive and negative expression for the protein markers tested. **a, b** Cortactin; **c, d** FAK; **e, f** p-AKT; **g, h** EGFR; **i, j** p53; **k, l** annexin A2; **m, n** E-cadherin (Dako

antibody); **o, p** E-Cadherin (BD); **q, r** p120; **s** β-catenin membranous; **t** β-catenin nuclear. Original magnification ×100

represent useful biomarkers to identify patients at high risk of developing DM. On this basis, we selected for analysis a panel of proteins known to participate in various cellular processes potentially implicated in the metastatic dissemination: cell adhesion (E-cadherin, annexin A2), invasion and migration (cortactin, FAK), apoptosis (p53) and proliferation (EGFR, p-AKT). From the proteins studied, only one of them (E-cadherin loss) was significantly associated with metastatizing tumors and another protein marker (annexin A2) showed a near-statistical association.

An intact E-cadherin–catenin complex is required for maintenance of normal intercellular adhesion. According to this, several groups have proposed that E-cadherin functions as an invasion suppressor molecule in carcinomas, and such that its loss facilitates or enhances the invasion of adjacent normal tissues [16]. Various data support this hypothesis. In vitro studies have shown that human cancer cell lines with an epithelioid, differentiated morphology express E-cadherin and are generally non-invasive, whereas cancer cells with a fibroblast-like morphology

**Table 3** Relationship between protein expression and distant metastasis

| Protein expression            | Total cases | Distant metastasis cases | No distant metastasis cases | <i>P</i> value* |
|-------------------------------|-------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------|
| <b>Cortactin</b>              |             |                          |                             | 0.66            |
| None-weak                     | 39          | 21                       | 18                          |                 |
| Moderate-strong               | 47          | 22                       | 25                          |                 |
| <b>FAK</b>                    |             |                          |                             | 0.47            |
| None-weak                     | 24          | 10                       | 14                          |                 |
| Moderate-strong               | 63          | 33                       | 30                          |                 |
| <b>EGFR</b>                   |             |                          |                             | 0.51            |
| Below the median              | 57          | 26                       | 31                          |                 |
| Above the median              | 31          | 17                       | 14                          |                 |
| <b>Annexin A2</b>             |             |                          |                             | 0.052           |
| Less 10 % cells               | 42          | 26                       | 16                          |                 |
| More 10 % cells               | 43          | 17                       | 26                          |                 |
| <b>p-AKT</b>                  |             |                          |                             | 0.66            |
| Less 10 % cells               | 42          | 19                       | 23                          |                 |
| More 10 % cells               | 40          | 21                       | 19                          |                 |
| <b>P53</b>                    |             |                          |                             | 0.66            |
| Less 10 % cells               | 37          | 20                       | 17                          |                 |
| More 10 % cells               | 50          | 24                       | 26                          |                 |
| <b>E-cadherin (Dako)</b>      |             |                          |                             | 0.057           |
| Less 10 % cells               | 25          | 17                       | 8                           |                 |
| More 10 % cells               | 63          | 27                       | 36                          |                 |
| <b>E-cadherin (BD)</b>        |             |                          |                             | 0.029           |
| Less 10 % cells               | 17          | 13                       | 4                           |                 |
| More 10 % cells               | 71          | 31                       | 40                          |                 |
| <b>β-catenin (membranous)</b> |             |                          |                             | 0.317           |
| Less 10 % cells               | 21          | 13                       | 8                           |                 |
| More 10 % cells               | 67          | 31                       | 36                          |                 |
| <b>β-catenin (nuclear)</b>    |             |                          |                             | 0.484           |
| Less 10% cells                | 79          | 38                       | 41                          |                 |
| More 10% cells                | 9           | 6                        | 3                           |                 |
| <b>p120</b>                   |             |                          |                             | 0.143           |
| Less 10 % cells               | 14          | 10                       | 4                           |                 |
| More 10 % cells               | 74          | 34                       | 40                          |                 |

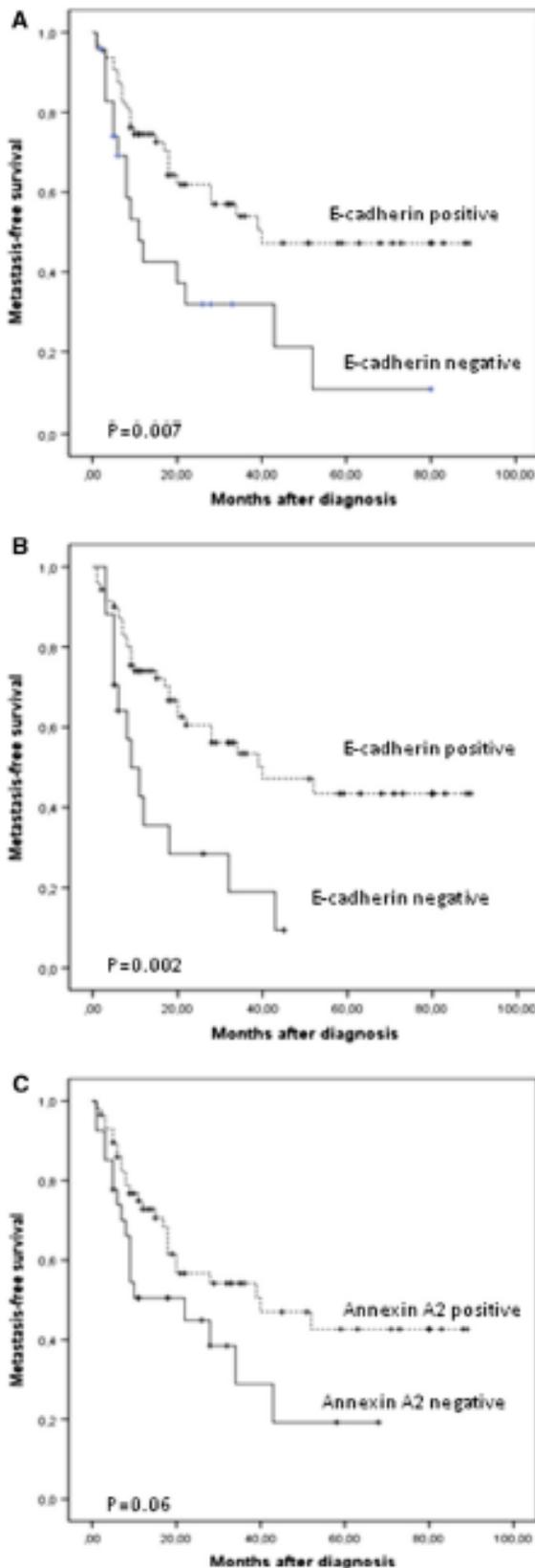
For some markers not all the cases were evaluable due to technical reasons

\* Chi square test

often show lack of E-cadherin expression and invasive phenotype [17]. The loss of E-cadherin expression has been associated with the EMT. Even though the exact role of EMT in tumor progression is still under debate, EMT is yet thought to be particularly important in cancers with single cell migration and early dissemination of tumor cells [18]. In addition, abnormal expression of E-cadherin has been correlated with invasiveness and metastasis in several human carcinomas [19–23]. In the context of HNSCC, it has been previously demonstrated a correlation between reduced E-cadherin expression, aggressive behavior and nodal metastases [24–27]. Furthermore, a recent study also described an association between the loss of E-cadherin expression and increased risk of DM in a heterogeneous group of 26 HNSCC patients [12]. Our results confirm

these findings using a large and well-balanced group of patients, carefully selected to avoid the influence of clinicopathological risk factors (especially N classification) in the development of metastasis. These results indicate that the determination of E-cadherin expression in the primary tumor could be useful in clinical practice as a biomarker to predict the metastatic potential in individual patients with HNSCC.

Annexin A2 forms a 36 kDa multifunctional protein capable of binding acidic phospholipids and actin with significant affinity. As a signaling molecule, annexin A2 is known to be involved in membrane trafficking and fusion affecting cell adhesion and migration [28, 29]. Current understanding about the physiological roles of annexin A2 in cell membrane morphology, adhesion and migration has



**Fig. 2** Metastasis-free survival curves according to E-cadherin/Dako (a), E-cadherin/BD (b), and annexin A2 (c) expression. *P* values were estimated using the log-rank test

prompted new focus on its importance in the formation and remodeling of epithelial tissue barriers. Annexin A2 exists as a monomer in the cytoplasm, or as a heterotetramer (A2t) complexed with the S100A10 (p11 light chain), thereby resulting in its association with the plasma membrane [30]. The A2t heterotetramer complex may be involved in the formation of E-cadherin-based adherens junctions in epithelial cells [29]. The stabilization of membrane micro-domain organization by interaction with the underlying actin cytoskeleton appears to be regulated by annexin A2 [31], which is recruited to actin-rich membrane areas characterized by high cholesterol and phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate content. Thus, the loss of annexin A2 expression could also be associated with an EMT phenotype, and consequently with metastatic dissemination. In good agreement with these data, we have previously reported that the loss of annexin A2 expression is found frequently in laryngeal and oral squamous cell carcinomas, associated with poorly differentiated tumors and presence of nodal metastasis [32, 33].

Coordinated regulation of the actin cytoskeleton is central to cell motility, invasion and metastasis. Multiple proteins have been implicated in cancer cell motility and invasion, including cortactin and FAK [34]. Overexpression of these proteins has been correlated with a more aggressive clinical course and nodal metastasis [35, 36]. However, in the present study we did not find an association with DM. In addition, we have previously described that overexpression of cortactin and FAK is frequent in laryngeal and oral premalignancies, and more importantly overexpression of both proteins predicts malignant transformation [37, 38]. Altogether, these results indicate that cortactin and FAK might be implicated in loco-regional invasion but not in metastatic dissemination.

Previous studies indicate that EGFR signaling pathways, including PIK3/AKT pathway, can regulate the expression of proteins involved in EMT in several tumor types [39–41]. In addition, EGFR overexpression has been related to more aggressive tumor behavior and correlated with poor prognosis in HNSCC patients [42, 43]. AKT activation (phosphorylation) has also been associated with more aggressive clinical course in tongue carcinomas [44]. In the present study, however, neither EGFR overexpression nor p-AKT significantly correlated with the development of DM. Furthermore, no associations were observed between the expression of E-cadherin and EGFR or p-AKT. Therefore, the suggested association of an activated EGFR signaling pathway with EMT phenotype could not be confirmed in our HNSCC series.

In conclusion, our results indicate that the loss of epithelial adhesion seems to play a central role in the development of metastasis in HNSCC. The immunohistochemical expression analysis of proteins involved in cell adhesion, such as E-cadherin could be a useful tool to evaluate the metastatic potential of these carcinomas. This determination could be easily and routinely performed on standard paraffin-embedded pathology specimens, making feasible the inclusion of this molecular marker in the diagnostic work-up and treatment planning of these tumors. Nevertheless, these results will require confirmation in large patient cohorts and independent validation studies.

**Acknowledgments** This work was supported by grants from Fondo de Investigación Sanitaria CP07/00032 and PI10/00157 (to JMGP) and PI11/00929 (to CS) ISCIII, Fondos FEDER, RTICC (RD12/0036/0015) and Obra Social Cajastar-UOPA.

## References

- Pulte D, Bønner H (2010) Changes in survival in head and neck cancers in the late 20th and early 21st century: a period analysis. *Oncologist* 15:994–1001
- Calhoun KH, Fulmer P, Weiss R, Hokanson JA (1994) Distant metastases from head and neck squamous cell carcinomas. *Laryngoscope* 104:1199–1205
- Kowalski LP, Carvalho AL, Martins Priante AV, Magrin J (2005) Predictive factors for distant metastasis from oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oncol Oncol* 41:534–541
- Ferlito A, Shaha AR, Sliver CE, Rinaldo A, Mondin V (2001) Incidence and sites of distant metastases from head and neck cancer. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 63:202–207
- Li X, Di B, Shang Y, Zhou Y, Cheng J, He Z (2009) Clinicopathologic risk factors for distant metastases from head and neck squamous cell carcinomas. *Eur J Surg Oncol* 35:1348–1353
- Bhatia R, Bahadur S (1987) Distant metastasis in malignancies of the head and neck. *J Laryngol Otol* 101:925–928
- Alvi A, Johnson JT (1997) Development of distant metastases after treatment of advanced stage head and neck cancer. *Head Neck* 19:500–505
- Leon X, Quer M, Orús C, del Prado Venegas M, Lopez M (2000) Distant metastases in head and neck cancer patients who achieved loco-regional control. *Head Neck* 22:680–686
- Coca-Pelaz A, Rodrigo JP, Suárez C (2012) Clinicopathologic analysis and predictive factors for distant metastases in patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck* 34:771–775
- Pfister D, Laurie SA, Weinstein GS et al (2006) American Society of Clinical Oncology Practice Guidelines for the use of larynx preservation strategies in the treatment of laryngeal cancer. *J Clin Oncol* 24:3604–3693
- Bhave SL, Teknos TN, Pan Q, James AG, Solove RJ (2011) Molecular parameters of head and neck cancer metastasis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 21:143–153
- Nijkamp MM, Span PN, Hoogsteen IJ, van der Kogel AJ, Kanders JH, Bussink J (2011) Expression of E-cadherin and vimentin correlates with metastasis formation in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Radiother Oncol* 99:344–348
- Braakhuis BJM, Senft A, de Bree R, de Vries J, Ylstra B, Cloos J, Kuik DJ, Leemans CR, Brakenhoff RH (2006) Expression profiling and prediction of distant metastases in head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol* 59:1254–1260
- Bleijerveld OB, Brakenhoff RH, Schaaij-Visser TB, Damen JM, Alelaar AF, Heck AJ, Leemans CR, Slijper M (2011) Protein signatures associated with tumor cell dissemination in head and neck cancer. *J Proteomics* 74:558–566
- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärndt M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP (1998) Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 4:844–847
- Hirohashi S (1998) Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol* 153:333–339
- Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Löchner D, Birchmeier W (1991) E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* 113:173–185
- Thiery JP (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2:442–454
- Onder TT, Gupta PB, Mami SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA (2008) Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res* 68:3645–3654
- Yoo JY, Yang SH, Lee JE, Cho DG, Kim HK, Kim SH, Kim IS, Hong JT, Sung JH, Son BC, Lee SW (2012) E-cadherin as a predictive marker of brain metastasis in non-small-cell lung cancer, and its regulation by pioglitazone in a preclinical model. *J Neurooncol* 109:219–227
- Chen X, Wang Y, Xia H, Wang Q, Jiang X, Lin Z, Ma Y, Yang Y, Hu M (2012) Loss of E-cadherin promotes the growth, invasion and drug resistance of colorectal cancer cells and is associated with liver metastasis. *Mol Biol Rep* 39:6707–6714
- von Burstin J, Eser S, Paul MC, Seidler B, Brandl M, Messer M, von Werder A, Schmidt A, Mages J, Pagel P, Schnieke A, Schmid RM, Schneider G, Saur D (2009) E-cadherin regulates metastasis of pancreatic cancer in vivo and is suppressed by a SNAIL/HDAC1/HDAC2 repressor complex. *Gastroenterology* 137:361–371
- Fan L, Wang H, Xia X, Rao Y, Ma X, Ma D, Wu P, Chen G (2012) Loss of E-cadherin promotes prostate cancer metastasis via upregulation of metastasis-associated gene 1 expression. *Oncol Lett* 4:1225–1233
- Muller S, Su L, Tighiouart M, Saba N, Zhang H, Shin DM, Chen Z (2008) Distinctive E-cadherin and epidermal growth factor receptor expression in metastatic and nonmetastatic head and neck squamous cell carcinoma: predictive and prognostic correlation. *Cancer* 113:97–107
- Mandal M, Myers JN, Lippman SM, Johnson FM, Williams MD, Rayala S, Ohtshiro K, Rosenthal DI, Weber RS, Gallick GE, El-Naggar AK (2008) Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous carcinoma: association of Src activation with E-cadherin down-regulation, vimentin expression, and aggressive tumor features. *Cancer* 112:2088–2100
- Bosch FX, Andl C, Abel U, Kartenbeck J (2005) E-cadherin is a selective and strongly dominant prognostic factor in squamous cell carcinoma: a comparison of E-cadherin with desmosomal components. *Int J Cancer* 114:779–790
- Rodrigo JP, Domínguez F, Alvarez C, Manrique C, Hemero A, Suárez C (2002) Expression of E-cadherin in squamous cell carcinomas of the supraglottic larynx with correlations to clinicopathological features. *Eur J Cancer* 38:1059–1064
- Chung CY, Murphy-Ullrich JE, Erickson HP (1996) Mitogenesis, cell migration, and loss of focal adhesions induced by tenascin-C interacting with its cell surface receptor, annexin II. *Mol Biol Cell* 7:883–892
- Yamada A, Irie K, Hirata T, Ooshio T, Fukuhara A, Takai Y (2005) Involvement of the annexin II-S100A10 complex in the

- formation of E-cadherin-based adherens junctions in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 280:6016–6027
30. Waisman DM, Annexin II (1995) Tetramer: structure and function. *Mol Cell Biochem* 149–150:301–322
  31. Hayes MJ, Shao D, Bailly M, Moss SE (2006) Regulation of actin dynamics by annexin 2. *EMBO J* 25:1816–1826
  32. Pena-Alonso E, Rodrigo JP, Parra IC, Pedrero JM, Meana MV, Nieto CS, Fresno MF, Morgan RO, Fernandez MP (2008) Annexin A2 localizes to the basal epithelial layer and is down-regulated in dysplasia and head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 263:89–98
  33. Rodrigo JP, Lequerica-Fernández P, Rosado P, Allonca E, García-Pedrero JM, de Vicente JC (2011) Clinical significance of annexin A2 downregulation in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 33:1708–1714
  34. Kelley LC, Shahab S, Weed SA (2008) Actin cytoskeletal mediators of motility and invasion amplified and overexpressed in head and neck cancer. *Clin Exp Metastasis* 25:289–304
  35. Rodrigo JP, García-Carracedo D, García LA, Menéndez S, Allonca E, González MV, Fresno MF, Suárez C, García-Pedrero JM (2009) Distinctive clinicopathological associations of amplification of the contactin gene at 11q13 in head and neck squamous cell carcinomas. *J Pathol* 217:5123–5165
  36. Canel M, Secades P, Rodrigo JP, Cabanillas R, Herrero A, Suarez C, Chiara MD (2006) Overexpression of focal adhesion kinase in head and neck squamous cell carcinoma is independent of fak gene copy number. *Clin Cancer Res* 12:3272–3279
  37. Rodrigo JP, Álvarez-Alija G, Menéndez ST, Mancebo G, Allonca E, García-Carracedo D, Fresno MF, Suárez C, García-Pedrero JM (2011) Contactin and focal adhesion kinase as predictors of cancer risk in patients with laryngeal premalignancy. *Cancer Prev Res* 4:1333–1341
  38. de Vicente JC, Rodrigo JP, Rodríguez-Santamaría T, Lequerica-Fernández P, Allonca E, García-Pedrero JM (2012) Contactin and focal adhesion kinase as predictors of cancer risk in patients with premalignant oral epithelial lesions. *Oral Oncol* 48:641–646
  39. Lee MY, Chou CY, Tang MJ, Shen MR (2008) Epithelial-mesenchymal transition in cervical cancer: correlation with tumor progression, epidermal growth factor receptor overexpression, and snail up-regulation. *Clin Cancer Res* 14:4743–4750
  40. Gan Y, Shi C, Inge L, Hibner M, Balducci J, Huang Y (2010) Differential roles of ERK and Akt pathways in regulation of EGFR-mediated signaling and motility in prostate cancer cells. *Oncogene* 29:4947–4958
  41. Wang H, Fan L, Wei J, Weng Y, Zhou L, Shi Y, Zhou W, Ma D, Wang C (2012) Akt mediates metastasis-associated gene 1 (MTA1) regulating the expression of E-cadherin and promoting the invasiveness of prostate cancer cells. *PLoS ONE* 7:e46888
  42. Ang KK, Berkey BA, Tu X, Zhang HZ, Katz R, Hammond EH, Fu KK, Milas L (2002) Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res* 62:7350–7356
  43. Rubin Grandis J, Melhem MF, Gooding WE, Day R, Holst VA, Wagener MM, Drenning SD, Tweardy DJ (1998) Levels of TGF- $\alpha$  and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst* 90:824–832
  44. Massarelli E, Liu DD, Lee JJ, El-Naggar AK, Lo Muzio L, Staibano S, De Placido S, Myers JN, Papadimitrakopoulou VA (2005) Akt activation correlates with adverse outcome in tongue cancer. *Cancer* 104:2430–2436

