



Universidad de Oviedo

Instituto Universitario de Oncología del Principado de
Asturias

“Análisis del gen SOX2 en carcinoma escamoso de cabeza y cuello”

Tesis doctoral

Rocío González Márquez

2014



Universidad de Oviedo

Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias

**“Análisis del gen SOX2 en
carcinoma escamoso de cabeza y
cuello”**

TESIS DOCTORAL

(Que opta al grado de Doctor por la Universidad de Oviedo)

Autora

Dña. Rocío González Márquez

Directores

D. José Luis Llorente Pendás

D. Mario Hermsen



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Análisis del gen SOX2 en carcinoma escamoso de cabeza y cuello	Inglés: SOX2 analysis in head and neck squamous cell cancer
2.- Autor	
Nombre: Rocío González Márquez	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: Programa de doctorado en Investigación en Cáncer	
Órgano responsable: Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias	

RESUMEN (en español)

El carcinoma escamoso de cabeza y cuello es la sexta neoplasia más frecuente en el mundo, siendo la histología más frecuente el carcinoma epidermoide. El origen de dichos tumores implica gran número de alteraciones genéticas y moleculares. De entre ellos, un gen recientemente estudiado en carcinoma epidermoide es el gen SOX2, implicado en la embriogénesis y desdiferenciación celular. Su papel en cabeza y cuello está aún por definir, y los estudios realizados hasta el momento son contradictorios.

En nuestro trabajo se estudiaron las muestras procedentes de 220 pacientes con carcinoma escamoso de cabeza y cuello, teniendo en cuenta las siguientes localizaciones: hipofaringe, laringe y senos paranasales. Se emplearon las técnicas de inmunohistoquímica y FISH. En este estudio se analizaron no solo variables clínico-patológicas, sino también la relación con otros genes conocidos: cMYC, B-catenina y p53.

El estudio de concordancia entre FISH e inmunohistoquímica mostró una elevada concordancia en tumores nasosinusales, no así en tumores de hipofaringe, lo cual parece indicar que en el caso de estos últimos parece haber otras rutas sin origen ni causa génica que causen sobreexpresión de dicha proteína. La ganancia de función de SOX2 no tuvo asociación significativa con las variables clínico-patológicas.

En el estudio inmunohistoquímico apareció un grado de sobreexpresión similar en tumores faríngeos y laringeos, con bastante menor sobreexpresión en tumores nasosinusales. Al estudiar las tres localizaciones de forma conjunta, se objetivó relación significativa con dos variables clínicas: diferenciación histológica pobre o moderada y avanzada clasificación N. Ninguno de estos datos tuvo implicaciones pronósticas.

Las conclusiones extraídas de nuestro grupo de casos no permiten conocer el papel exacto de SOX2 en la aparición y desarrollo tumoral, aunque al analizar los datos, ni el gen ni la proteína parecen jugar un papel fundamental en la oncogénesis. Por este motivo, por el momento SOX2 no parece ser una diana terapéutica destacada en casos de tumores epidermoides de cabeza y cuello.



RESUMEN (en Inglés)

Head and neck squamous cell cancer is the sixth most frequent neoplasia worldwide, and corresponding most of cases to squamous cell cancer. The origin of these neoplasms implies many genetic and molecular changes.

A recently studied gene involved in squamous cell cancer is SOX2, with a role in embryogenesis and cellular stemness. His role in head and neck cancer remains unclear, and the small number of published studies reached contradictory conclusions.

In our work we studied 220 samples from patients diagnosed of head and neck squamous cell cancer, implying the following sublocations: hypopharynx, larynx and paranasal sinuses. The techniques used were FISH and immunohistochemistry, and we analysed both clinicopathological features and the relationship of SOX2 with other well-known oncogenes: cMyc, B-catenin and p53.

Concordance studies between immunohistochemistry and FISH showed high concordance between amplification of gene SOX2 and proteic expression for sinonasal cancer, but not for hypopharyngeal cases. This could indicate that in these last cases there may be another routes for overexpression that do not involve origin or genetic cause. These SOX2 gaining did not have any association with the clinicopathological features.

Immunohistochemistry showed a similar overexpression of the SOX2 protein for laryngeal and hypopharyngeal cancer, significantly higher than the observed in paranasal sinuses. When all locations taken, there were two variables significantly associated to SOX2 overexpression: histological grade (moderate and poor) and advanced N stage. None of them had prognostic relevance.

Our conclusions from the studied serie do not allow us to know the role of SOX2 in the tumor origin and development, but if we analyse data, neither the gene nor the protein seem to play an important role in oncogenesis. For all of these reasons, in this moment we cannot assevere that SOX2 is an important target of therapy in head and neck squamous cell cancer

A mi familia

Agradecimientos

Tras haber terminado tanto la carrera de Medicina como los años de especialización, la siguiente meta a alcanzar era la presentación y lectura de esta Tesis doctoral, por este motivo el estar en estos momentos redactando los agradecimientos de la misma supone un momento muy señalado tanto en mi vida profesional como en la personal. Tras varios años de elaboración de esta Tesis, alcanzar el grado de Doctor en Medicina supone para mí tanto un motivo de orgullo como mi manera particular de agradecer a quienes, de un modo u otro, habéis ayudado en que pudiera llegar este momento. Sin vosotros no habría sido posible, así que, desde lo más profundo de mi corazón, gracias.

En primer lugar, creo que corresponde agradecer su esfuerzo a las dos personas que más se han esforzado en que este trabajo saliera adelante, mis dos directores de tesis:

Al prof. **Dr. José Luis Llorente Pendás**, quien me ha aportado valiosas lecciones no solo en el ámbito profesional sino también en el personal, de tal modo que ha colaborado enormemente a enriquecer mi visión en todos los aspectos. Su trayectoria como médico es desde luego difícil de igualar, y la confianza que ha depositado en mí y en mi trabajo le hace merecedor de mi más sincero agradecimiento.

Al **Dr. Mario Hermsen**, quien desde el principio de mi formación tomó parte muy activa en mi trayectoria en el ámbito de la investigación. A pesar de estar inmerso en gran número de proyectos, sin su paciencia y dedicación este trabajo no habría llegado a desarrollarse como lo ha hecho.

Al prof. **Dr. Carlos Suárez Nieto**, que ha sido para mí un auténtico referente en el ámbito profesional, así como la piedra angular de mi formación como otorrinolaringóloga. Es a él y su trabajo a quien debo gran parte de la profesional que soy hoy día, y espero transmitir a quienes me acompañen en mi vida laboral los sólidos valores que él me ha enseñado en los primeros pasos de la mía.

A todos los integrantes del Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Central de Asturias, en especial al prof. **Dr. Juan Pablo Rodrigo Tapia**,

quien guió mis primeros pasos en la publicación de artículos científicos, y me enseñó el valor de la investigación clínica. No solo quiero agradecer su labor a los médicos en mi aprendizaje, sino también al personal auxiliar y de enfermería, quienes con su dedicación y paciencia han contribuido de manera muy importante a que me sintiera en casa durante los años que duró mi formación.

A los miembros del grupo de **Otorrinolaringología del Laboratorio del IUOPA**, quienes me ayudaron de una manera extraordinaria durante el trabajo de laboratorio que ha dado como fruto esta tesis doctoral. Especial mención merecen por ello Eva Allonca y Sira Potes, sin cuya ayuda y dedicación no estaría en estos momentos escribiendo estas líneas.

También quiero agradecer el apoyo y la confianza que he recibido por parte de los integrantes del **Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Fundación Jiménez Díaz (Madrid) y Hospital Infanta Elena (Valdemoro)**, en especial al **Prof. Dr. Carlos Cenjor Español, Prof. Dr. José Miguel Villacampa Aubá y Dra. María José Hernández García**. Pese a llevar pocos meses trabajando con ellos y con el resto del equipo, siempre me he sentido apoyada y alentada en cuanto a alimentar mis aspiraciones profesionales. Es un orgullo formar parte de dichos Servicios, y espero seguir haciéndolo durante mucho tiempo.

Por último, aunque no por ello menos importante, quiero dedicar esta tesis de manera especial a los integrantes de **mi familia**. A lo largo de toda mi vida han sabido apoyarme incluso en los momentos más difíciles y de mayor desánimo, poniendo a mi disposición todos los medios posibles para llegar a ser la persona y profesional que soy hoy día. Por ello el mayor esfuerzo y objetivo de mi vida no son otros más que ser merecedora de todo lo que me han dado, y hacerles sentirse orgullosos de mí como yo lo estoy de tenerles a ellos.

A mis **padres**, gracias por estar siempre a mi lado, por apoyarme y por corregirme cuando estaba equivocada. Su ayuda y apoyo incondicional siempre han estado presentes en mi vida, y es por ellos que esta tesis va dedicada a ellos especialmente.

A mis **tíos y mi primo Pablo**, que han sido más que cercanos durante toda mi vida y siempre han estado a mi lado en buenos y malos momentos.

A mi **abuela**, que siempre ha buscado la parte positiva de todo cuanto he hecho, y ha sido mi admiradora incondicional durante todos estos años. A mi **tío y mi abuelo**, con quienes tristemente solo pude compartir unos años de mi vida, pero influyeron muy profunda y positivamente en la persona que soy hoy.

A **Pedro Gato**, que ha vivido esta Tesis en su última etapa, y quizás una de las más arduas. Gracias por tu paciencia y por creer en mí incluso en los momentos en los que el desánimo me ha hecho mella.

Tabla de contenido

BASES PREVIAS	6
ABREVIATURAS	8
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 EPIDEMIOLOGÍA.....	10
1.1.1 <i>Carcinoma de hipofaringe</i>	10
1.1.2 <i>Carcinoma de senos paranasales</i>	11
1.1.3 <i>Carcinoma de laringe</i>	12
1.2 FACTORES ETIOLÓGICOS CONOCIDOS	12
1.2.1 <i>Carcinoma de hipofaringe</i>	12
1.2.2 <i>Carcinoma de senos paranasales</i>	13
1.2.3 <i>Carcinoma de laringe</i>	14
1.3 CLÍNICA	15
1.3.1 <i>Carcinomas de hipofaringe</i>	15
1.3.2 <i>Carcinomas nasosinusales</i>	15
1.3.3 <i>Carcinomas de laringe</i>	16
1.4 DIAGNÓSTICO	17
1.5 TRATAMIENTO	18
1.5.1 <i>Carcinomas faringolaríngeos</i>	18
1.5.2 <i>Carcinomas nasosinusales</i>	19
1.6 PRONÓSTICO	20
1.6.1 <i>Carcinomas faringolaríngeos</i>	20
1.6.2 <i>Carcinomas nasosinusales</i>	20
1.7 ANOMALÍAS GENÉTICAS EN EL CARCINOMA ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO	21
1.8 EL PAPEL DE SOX2 EN ONCOGÉNESIS.....	26
2. HIPÓTESIS	32
3. OBJETIVOS	34
4. MATERIAL Y MÉTODO	36
4.1 SUJETOS A ESTUDIO.....	37
4.2 RECOGIDA DE LAS MUESTRAS.....	37
4.3 TÉCNICA DE “TISSUE ARRAYS”	38
4.3.1 <i>Requerimientos mínimos estándar del “tissue array”</i>	39
4.4 TÉCNICA DE FISH	40
4.4.1 <i>Preparación de la muestra</i>	41
4.4.2 <i>Pretratamiento</i>	41
4.4.3 <i>Hibridación</i>	42
4.4.4 <i>Contraste Fluorescente</i>	42
4.5 INMUNOHISTOQUÍMICA	42
4.5.1 <i>Interpretación de la inmunohistoquímica</i>	44
4.6 DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES.....	45
4.6.1 <i>Variables clínico-patológicas</i>	45

4.6.2	<i>Variables génicas</i>	45
4.6.3	<i>Variables en inmunohistoquímica</i>	45
4.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	46
5.	RESULTADOS	47
5.1	ASPECTOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS.....	48
5.1.1	<i>Carcinoma epidermoide de hipofaringe</i>	48
5.1.2	<i>Carcinoma epidermoide nasosinusal</i>	50
5.1.3	<i>Carcinoma epidermoide de laringe</i>	51
5.2	ANÁLISIS DEL NÚMERO DE COPIAS DEL GEN <i>SOX2</i>	53
5.2.1	<i>Análisis de la ganancia/amplificación de SOX2</i>	53
5.2.2	<i>Relación entre la ganancia/amplificación de SOX2 y las variables clínico-patológicas</i> 54	
5.3	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA	57
5.3.1	<i>Relación de la expresión de SOX2 con las variables clínico-patológicas</i>	59
5.3.2	<i>Relación de la expresión de SOX2 con la supervivencia</i>	63
5.3.3	<i>Relación de la expresión del resto de proteínas con las variables clínico-patológicas</i> 65	
5.3.4	<i>Relación de la expresión de SOX2 con el resto de variables IHQ</i>	65
5.4	RELACIÓN ENTRE LA GANANCIA/AMPLIFICACIÓN GÉNICA Y LA SOBREENPRESIÓN DE LA PROTEÍNA <i>SOX2</i>	68
6.	DISCUSIÓN	70
6.1	JUSTIFICACIÓN	71
6.2	ASPECTOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS.....	71
6.3	ASPECTOS GENÉTICOS	73
6.3.1	<i>SOX2</i>	73
6.3.2	<i>Resto de variables inmunohistoquímicas</i>	77
6.3.3	<i>Relación de la expresión de SOX2 con el resto de variables inmunohistoquímicas</i>	79
6.4	<i>SOX2 COMO DIANA TERAPÉUTICA</i>	79
7.	CONCLUSIONES	81
8.	PROYECTO FUTURO	83
9.	BIBLIOGRAFÍA	85

Bases previas

Esta tesis doctoral es fruto de la línea de investigación sobre carcinomas epidermoides de cabeza y cuello que el grupo de Otorrinolaringología del Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA) ha desarrollado en los últimos años. Sus resultados están apoyados por sucesivas aportaciones científicas que se exponen a continuación por orden cronológico.

Comunicaciones a Congresos

1. Título:SOX2 in squamouscell carcinoma of the head and neck.

Autor/es:R. González Márquez, J. L. Llorente Pendás,, J. P. Díaz Molina, M. Costales Marcos, M. Morato Galán, C. Suárez Nieto, M. Hermsen.

Congreso:1stCongress of SE-ORL-HNS, 62 Congreso Nacional de la SEORL-PCF.

Lugar y fecha:Barcelona, 2011

2. Título:Análisis de la expresión de SOX2 en carcinoma escamoso de cabeza y cuello

Autor/es:R. González Márquez, J. L. Llorente Pendás, M. Hermsen, J. P. Rodrigo Tapia, J. M. García Pedrero, C. Suárez Nieto.

Congreso:63 Congreso Nacional de la SEORL-PCF.

Lugar y fecha:Oviedo Asturias,Octubre de 2012.

Artículos

Gonzalez-Marquez R, Llorente JL, Rodrigo JP, Garcia-Pedrero JM, Alvarez-Marcos C, Suarez C, Hermsen MA: **SOX2 expression in hypopharyngeal, laryngeal, and sinonasal squamous cell carcinoma.** *Hum Pathol* 2014, **45**(4):851-857.

Abreviaturas

CECC: Carcinoma escamoso de cabeza y cuello

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico (*“Epidermal Growth Factor Receptor”*). El gen se denomina también *HER1* y *ERbB1*

FISH: Hibridación in situ con fluorescencia (*“Fluorescent in situ Hybridization”*)

IHQ: Inmunohistoquímica

OMS: Organización Mundial de la Salud

ORF: Open reading frame

p53: Proteína tumoral 53 (*“Tumor protein 53”*). También puede encontrarse como TP53

QT: Quimioterapia

RT: Radioterapia

SOX: Genes relacionados con la región determinante del sexo del cromosoma Y (SRY), en la región que codifica la región de alta movilidad (*“high mobility group box”* o HMG-box)

TA: *“Tissue array”*

1. Introducción

El carcinoma escamoso de cabeza y cuello es la sexta neoplasia más frecuente en el mundo [2]. Aparece con mayor frecuencia en el sexo masculino, con una incidencia que según las regiones, puede ser superior al 20/100.000 habitantes; sin embargo se está incrementando su incidencia en el sexo femenino, principalmente por el aumento del hábito tabáquico en dicho sexo. El 90-95% de las veces aparece en la cavidad oral y la laringe. La histología más frecuente es el carcinoma de células escamosas, que representa cerca de un 95% de los casos. También pueden aparecer sarcomas, condrosarcomas, adenocarcinoma, linfomas, etc.

1.1 Epidemiología

La epidemiología de los tumores estudiados en esta tesis (hipofaringe, laringe y senos paranasales) es como sigue:

1.1.1 Carcinoma de hipofaringe

En el caso del cáncer de hipofaringe, la mayor parte de las bases de datos suelen considerarlo conjuntamente con el cáncer de esófago cervical o la orofaringe, dada la proximidad anatómica de ambas estructuras. En la base de datos mundial Globocan de la OMS de 2008 el cáncer de hipofaringe es considerado junto con el orofaríngeo a efectos epidemiológicos. Globalmente y para ambos sexos, la tasa de incidencia es de 2 casos por cada 100.000 habitantes/año, siendo mucho más frecuente en países desarrollados [2]. De todo el mundo, es en Europa donde se registra la incidencia más alta (2.6 casos/100.000 hab./año), presentando Hungría, Luxemburgo y Francia las tasas más altas. Por el contrario, la tasa de mortalidad es más alta en los países poco desarrollados: 1.5 muertes/100.000 habitantes/año frente a 1.2 muertes/100.000 hab./año en los países desarrollados.

Nuestro país presenta una incidencia relativamente baja al compararla con el resto de Europa. La tasa de incidencia ajustada por edad es de 2.7 casos por cada 100.000 habitantes/año para ambos sexos, y la tasa de mortalidad ajustada por edad es de 1.3 casos por cada 100.000 habitantes/año.

Como ocurre con otros tumores relacionados con los hábitos de vida, la incidencia es notoriamente mayor en hombres que en mujeres, con una proporción estimada de 4:1, aunque esta diferencia ha disminuido por el aumento del tabaquismo en

mujeres[3]. Esto no se cumple para los tumores retrocricoides, que predominan en el género femenino [4] y en cuya etiología se ha descrito una importante relación con el síndrome de Plummer-Vinson. La baja incidencia en mujeres puede retrasar el diagnóstico por el bajo índice de sospecha, con las consecuentes implicaciones negativas en el pronóstico [5].

Estos tumores se presentan típicamente entre la quinta y sexta década de la vida[4], y se ha descrito un pico de incidencia entre los 59-60 años [5].

1.1.2 Carcinoma de senos paranasales

Las neoplasias nasosinusales son tumores poco frecuentes y representan aproximadamente el 0,2-0,8% del total de tumores malignos de la especie humana y el 3-6% de los tumores de cabeza y cuello [6-8]. En las fosas y senos paranasales se originan tumores con una gran variedad de tipos histológicos, aunque predominan los de estirpe epitelial (más del 75%). En la mayoría de las series el más frecuente es el carcinoma epidermoide (CENS), que representa entre el 40-80% del total [8, 9].

En nuestro ámbito la incidencia es de 0,8-1 caso por 100.000 habitantes y año [7]. Los CENS se presentan con mayor frecuencia en varones, con una relación de 2-3/1. Esta proporción es menor que en el resto de neoplasias de cabeza y cuello, probablemente porque en las fosas y senos paranasales los factores de riesgo típico, como alcohol y tabaco, no tienen un potencial carcinogénico tan demostrado como en el resto de la vía aerodigestiva superior [8].

La edad de aparición se sitúa entre la sexta y séptima década de la vida, aumentando a partir de ese momento el número de casos de forma gradual [8].

El lugar más habitual de origen de los CENS es la cavidad nasal, siendo el seno maxilar la segunda localización más frecuente. No obstante, dada la proximidad de estas regiones anatómicas y que, frecuentemente, los CENS se presentan en estadios avanzados, no es fácil identificar el lugar exacto de su origen. Además, un número significativo de tumores afecta a más de un sitio contiguo en el momento del diagnóstico.

Dentro de los tumores estrictamente sinusales los más frecuentes son los tumores del seno maxilar, constituyendo el 60-80% de los CENS[6, 10]. Los tumores etmoidales les siguen en frecuencia y los frontales y esfenoidales son excepcionales.

1.1.3 Carcinoma de laringe

El carcinoma de laringe supone un 0,8% de todos los cánceres diagnosticados [11] y es el tumor más frecuente en el área de cabeza y cuello ocupando el sexto lugar entre las neoplasias malignas del sexo masculino. España presenta una incidencia elevada con una tasa en varones de 18 casos/100.000 habitantes/año y en mujeres de 4 casos/100.000 habitantes/año. La mortalidad es paralela a la incidencia con 10 casos/100.000 habitantes/año, aunque se ha producido un ligero descenso en el último decenio. La edad de máxima incidencia se sitúa entre los 60 y 70 años y la supervivencia global estimada a los 5 años es del 67% [12]. A pesar de la sofisticación de las técnicas diagnósticas y de los procedimientos terapéuticos de los últimos años el diagnóstico sigue siendo tardío y la supervivencia se ha modificado poco, no alcanzando las expectativas previstas. La variable que más influye en la supervivencia es la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos locorregionales y es frecuente el desarrollo de segundas neoplasias en la vía aerodigestiva, pulmón y esófago en probable relación con la existencia de un campo de cancerización [13].

1.2 Factores etiológicos conocidos

1.2.1 Carcinoma de hipofaringe

Como en la mayor parte de los carcinomas de cabeza y cuello, el factor de riesgo más importante es el consumo de alcohol y de tabaco, aunque también influyen factores ocupacionales, genéticos y alimentarios.

En diversos estudios se ha sugerido que el consumo de bebidas alcohólicas parece ser el más importante de dichos factores de riesgo, haciendo que el riesgo relativo de padecer cáncer de cavidad oral o faringe sea hasta 13 veces superior a los no bebedores [14], y aumentando según la cantidad de alcohol ingerida [15]. El consumo combinado de tabaco y alcohol puede aumentar el riesgo de cáncer del tracto aerodigestivo superior hasta 100 veces [3]. La hipótesis más consistente es que el alcohol de por sí, y

no el resto de componentes de las bebidas, es el responsable directo de la carcinogénesis [16].

El tabaquismo se considera el factor de riesgo más importante en los carcinomas de cabeza y cuello, dado el efecto carcinogénico tanto de sus componentes como del humo inhalado. Existe una relación directa entre el riesgo de desarrollar un tumor y la cantidad de tabaco consumido y la duración del hábito tabáquico [15], así como con la asociación con otros factores de riesgo (exposición a asbesto [17], alcoholismo [18]). El cese de su consumo reduce gradualmente el riesgo de cáncer [15, 19], pero este efecto no se ha confirmado en el consumo de alcohol [20].

Existen diversos estudios que han demostrado un aumento del riesgo de carcinoma escamoso de hipofaringe en trabajadores de la industria del metal, construcción, alimentaria y trabajadores de la madera [21, 22]; así como una probable relación entre el desarrollo de cáncer y la exposición a disolventes orgánicos, asbestos, carbón y formaldehídos [23, 24].

La relación entre el carcinoma de hipofaringe y la infección por el virus del papiloma humano ha sido mencionada por diversos autores [25, 26], aunque en todo caso, su papel sería notablemente menos importante que en el carcinoma de orofaringe.

1.2.2 Carcinoma de senos paranasales

El mecanismo etiopatogénico exacto de los CENS es desconocido, aunque se han descrito diferentes agentes carcinogénicos en relación a su desarrollo. El riesgo relativo de padecer un CENS aumentaría en aquellas personas con exposición crónica al polvo de maderas blandas (abeto, pino) [27, 28]. Diversos agentes químicos como el asbesto, los cromatos, el níquel y el arsénico podrían estar también implicados [29, 30]. Así por ejemplo, se calculó que la exposición al níquel incrementaría 900 veces el riesgo de desarrollar un CENS respecto a la población no expuesta [31, 32]. Otros agentes como las fibras de algodón y algunas harinas de cereales, cuando están retenidas en la mucosa nasal, podrían favorecer la aparición de los CENS [31]. No obstante, el tiempo de latencia entre la exposición al carcinógeno y la aparición del tumor suele ser de más de 30 años [7, 29].

A diferencia del resto de los CECC, especialmente en faringe y laringe, el alcohol y el tabaco no parecen jugar un papel importante en el desarrollo de los CENS. No obstante, hay cierta relación epidemiológica [33, 34] y en algunos estudios se indica que los grandes fumadores desarrollan un carcinoma epidermoide con un riesgo triple que en la población general [33, 34].

El Virus del Papiloma Humano (VPH), sobretodo los serotipos 16 y 18 y, en menor medida los serotipos 6 y 11, han sido aislados en el tejido tumoral de los CENS. Esta asociación se ha intentado demostrar en el proceso de malignización de los papilomas invertidos a carcinoma escamoso, hallándose en el mejor de los estudios una implicación del VPH del 10% [34-38]. Por ello el papel del VPH en la carcinogénesis de los CENS no parece tener gran importancia, aunque en aquellos tumores que lo presentan el pronóstico a 5 años es mejor [39]. Otro virus relacionado como el de Epstein-Barr parece tener aún menos importancia [40, 41].

Otro factor que sí parece tener especial relevancia en la génesis de los CENS es el antecedente de patología nasosinusal previa, observándose hasta en el 25% de los casos. Una posible explicación a esta relación sería la metaplasia escamosa del epitelio respiratorio y su posterior progresión a carcinoma epidermoide ante el estímulo inflamatorio crónico.

1.2.3 Carcinoma de laringe

Son múltiples los factores que se han relacionado con la etiología del cáncer de laringe. Así, se ha estudiado el papel del reflujo gastroesofágico, algunas infecciones virales, el abuso de bebidas alcohólicas, la dieta, factores ocupacionales y hormonales, factores inmunológicos y sobre todo y fundamentalmente el hábito tabáquico.

El tabaco es el factor etiológico que parece tener más relación con la aparición del cáncer de laringe y por lo tanto el más estudiado. Se estima que un 90% de los pacientes que presentan esta neoplasia son fumadores de cigarrillos, y que el consumo superior a 40 cigarrillos/día puede aumentar el riesgo de desarrollar cáncer de laringe 13 veces respecto a un no fumador. El riesgo se mantiene elevado hasta los 10 años de haber abandonado el consumo de tabaco, y los fumadores pasivos también pueden tener aumentado el riesgo de cáncer de laringe [42]. Al lado del tabaco ha aparecido

siempre el consumo de alcohol como otro factor favorecedor del CECC. La mayoría de estudios demuestran una mayor incidencia de cáncer de laringe en las personas que, además de ser fumadoras, tienen alta ingesta de alcohol [43].

Las diferencias a nivel geográfico en la incidencia del cáncer de laringe se deben a algo más que a la variabilidad en los factores de riesgo descritos. Se cree que existen otros factores etiológicos implicados en la génesis tumoral, como la exposición laboral a ciertas sustancias entre las que destacan el polvo y gas de las minas de carbón, polvo de madera, fibras de vidrio y textiles, barnices y pinturas. Además la susceptibilidad a la acción mutagénica de los carcinógenos ambientales puede ser variable de unos individuos a otros [44], lo que explicaría por ejemplo el desarrollo de tumores en pacientes jóvenes no fumadores, a diferencia de otros grandes fumadores que nunca llegan a desarrollar una neoplasia.

1.3 Clínica

1.3.1 Carcinomas de hipofaringe

Suelen ser asintomáticos durante largo tiempo, con lo que la mayor parte de los pacientes que se diagnostican ya tienen afectación linfática o tumores muy avanzados. Muy a menudo, la única clínica que aparece es dolor de garganta, disfagia leve o sensación de cuerpo extraño, síntomas todos ellos altamente inespecíficos y que pueden confundirse con la enfermedad por reflujo gastroesofágico.

Al crecer la lesión, puede haber disfagia más grave acompañada de pérdida ponderal. La afectación laríngea puede conllevar disfonía o disnea. Asimismo, la aparición de hemoptisis o signos de obstrucción de las vías aéreas se consideran como síntomas de mal pronóstico, al estar la neoplasia en estado más avanzado.

1.3.2 Carcinomas nasosinuales

Los CENS en los estadios iniciales (mientras están confinados en la cavidad del seno) no suelen dar síntomas que permitan sospechar una neoplasia y pueden simular un proceso inflamatorio: dolor local, rinorrea, epistaxis, hiposmia y sensación de presión y ocupación facial. Sólo cuando alcanzan dimensiones significativas o se extienden a estructuras vecinas como la piel de la mejilla, la mucosa oral, la órbita, la

fosa infratemporal y la cavidad craneal aparece clínica más llamativa. Ésta consiste en tumoración y deformidad facial, úlceras palatinas, desviación ocular y algias o parálisis de pares craneales [6]. Por ello, debido su clínica inicial silente, los CENS se diagnostican frecuentemente en estadios avanzados (más del 50% T3 y T4) [6, 45].

La afectación ganglionar al diagnóstico es poco frecuente (2-12%) [6, 45-51]. De igual modo, la recidiva a nivel regional es infrecuente (5-15%) [6, 9, 50, 51], siendo excepcionales las recidivas en los ganglios linfáticos con la enfermedad controlada a nivel local (menos del 5%).

1.3.3 Carcinomas de laringe

La laringe se divide en tres zonas tomando como referencia la parte central, que son las cuerdas vocales: la región supraglótica, la glotis propiamente dicha y la subglotis. Se consideran tumores transglóticos aquellos que afectan al menos a dos de los tres niveles de la laringe. En el caso de estos tumores la intensidad y tiempo de aparición de la sintomatología depende de la localización del tumor primario [52]:

- Tumores glóticos: El 99% se presentan como disfonía persistente y progresiva en pacientes con factores de riesgo. Si se diagnostica en estadios avanzados, puede haber disnea asociada, hemoptisis y estridor. Estos tumores producen adenopatías en aproximadamente el 3% de los casos.
- Tumores supraglóticos: predominan los síntomas deglutorios, que orientan hacia afectación del vestíbulo laríngeo, sobre los fonatorios, cuya aparición debe hacer sospechar infiltración del pie de la epiglotis y los ventrículos laríngeos. Presentan afectación linfática en el momento de diagnóstico en el 40% de las ocasiones.
- Tumores subglóticos: Es la localización menos frecuente, con una clínica inicial de disnea. Al ser muy progresiva, en el momento del diagnóstico suele aparecer infiltración en profundidad y aparecer metástasis ganglionares en el 50%, afectando tanto a ganglios cervicales como paratraqueales y mediastínicos.
- Carcinomas transglóticos: Se denomina así a los tumores con afectación de los planos glótico y supraglótico. Su clínica inicial suele ser disfonía por afectación de las cuerdas vocales, presentando la cuarta parte de ellos adenopatías en el momento del diagnóstico.

1.4 Diagnóstico

Ya hemos referido previamente que la clínica puede ser muy inespecífica, siendo por ello muy importante la sospecha clínica, sobre todo en pacientes con factores de riesgo conocidos (historia previa de tabaquismo, enolismo o ambos) en los que debe descartarse una neoplasia. En todo caso, existe un predominio de lesiones avanzadas justificable por el retraso en el diagnóstico [6].

La fibroendoscopia permite la visualización de cavidad nasal, nasofaringe, base de la lengua, hipofaringe y laringe. Así, también es útil para valorar la movilidad de las cuerdas vocales y la permeabilidad de las vías aéreas.

Los estudios de imagen (TC, RMN, PET) son útiles para determinar la extensión del tumor así como afectación linfática [53]. Otra técnica de imagen válida es la tomografía por emisión de positrones (PET), que detecta los estadios primarios tumorales mediante la distribución de un radiotrazador, el FDG, basándose en el mayor consumo de glucosa de los tejidos tumorales respecto de los inmediatamente adyacentes. La PET es al menos tan sensible y específica como TC y RMN para detectar el tumor primario de cabeza y cuello, así como superior en el diagnóstico de metástasis ganglionares ocultas y segundos tumores primarios [53-55].

La combinación de PET con TC ha demostrado clara superioridad al uso de TC, RMN y PET aislados, según diversos estudios [56-58], sirviendo además para detectar metástasis cervicales ganglionares ocultas, metástasis a distancia y lesiones sincrónicas. La PET y la PET-TC podrían además ser útiles para evaluar la eficacia del tratamiento en cuanto a persistencia o recurrencia de la enfermedad.

Finalmente, el diagnóstico histológico es imprescindible para conocer la estirpe histológica y planificar el tratamiento. En el caso de la aparición de masas cervicales, puede emplearse la punción-aspiración con aguja fina (PAAF), que cuenta con una sensibilidad y especificidad que oscilan entre el 89-98% según los estudios [59, 60]

Para clasificar estos tumores se siguen de modo habitual las directrices del American Joint Committee on Cancer (AJCC), quienes recientemente han publicado su

séptima edición [61]. Se basa en tres categorías: extensión tumoral (T), afectación de ganglios linfáticos regionales (N) y existencia de metástasis a distancia (M).

Una de las líneas de investigación más prometedoras es la investigación sobre marcadores tumorales. Diferencias en la expresión de ciertos genes podría hacer cambiar la clasificación, pronóstico y tratamiento de gran parte de estas neoplasias. Existen algunos estudios [62, 63] que sugieren que los tumores primarios de cabeza y cuello podrían tener ciertos cambios moleculares que induzcan mayor susceptibilidad a la invasión tumoral o a la diseminación linfática.

1.5 Tratamiento

1.5.1 Carcinomas faringolaríngeos

En general, el tratamiento estándar para tumores en estadios iniciales (I y II) consiste en cirugía o radioterapia, sin que se hayan constatado diferencias en cuanto a la supervivencia entre estos tratamientos [64]. A pesar de que suele alcanzarse un buen control locorregional de la enfermedad las recurrencias son frecuentes, siendo predominantemente locales en tumores tratados con radioterapia y regionales en tumores tratados quirúrgicamente. Las recurrencias a nivel ganglionar también son frecuentes [65].

En estadios avanzados (III y IV) clásicamente el tratamiento ha sido eminentemente quirúrgico, siendo precisa la realización de una laringectomía total, en muchos casos acompañada de faringectomía, dependiendo siempre de la extensión tumoral. Sin embargo, en los últimos años han cobrado importancia las terapias que permiten la conservación laríngea, con la consecuente mejora en la calidad de vida pero sin resultados superiores en cuanto a supervivencia. Sin embargo, una posible excepción son los tumores que invadan cartílago (estadio IVa), en los que se ha descrito que dicha invasión puede comprometer la eficacia del tratamiento conservador e incrementar la probabilidad de radionecrosis, con lo que estaría recomendada una técnica quirúrgica radical [66, 67]. Sin embargo, otros estudios más recientes [68-70]restan importancia a estos hallazgos y siguen recomendando las técnicas conservadoras como tratamiento estándar, dejando la laringectomía total como opción de rescate.

Las técnicas conservadoras más empleadas son la quimiorradioterapia (concurrente o secuencial) y técnicas quirúrgicas conservadoras, como la cirugía parcial o la cirugía mínimamente invasiva, que pueden ser combinadas o no con quimio y radioterapia dependiendo de las condiciones del paciente. Sin embargo, en pacientes ancianos o pluripatológicos la toxicidad y comorbilidad asociadas a las técnicas conservadoras pueden hacer que se prefiera la realización de una laringectomía total[71-74], seguida de radioterapia en caso de bordes quirúrgicos afectados, invasión vascular o perineural o afectación ganglionar.

En los tumores avanzados el riesgo de metástasis ganglionar es elevado, con lo que se recomienda el tratamiento del cuello, bien mediante vaciamiento ganglionar o mediante radioterapia.

1.5.2 Carcinomas nasosinuales

No hay un consenso establecido respecto del tratamiento óptimo de los CENS. Esta situación se debe a varios motivos entre los que destacan el reducido número de pacientes, la gran variedad histológica de los tumores nasosinuales y, por último, que la complejidad anatómica de la región hace que los tratamientos generen casi siempre morbilidad asociada, lo que condiciona sus continuos replanteamientos [8].

La opción terapéutica más utilizada es la cirugía seguida de la RT postoperatoria [6, 50]. En los CENS es imprescindible el control local de la enfermedad mediante su exéresis amplia con unos márgenes de seguridad suficientes [10]. Los abordajes quirúrgicos varían en función de la localización tumoral, de su extensión y de las posibilidades reconstructivas [51].

La RT se utiliza, sobre todo, tras la cirugía debido a que la mayor parte de los pacientes presentan tumores en estadios avanzados y al reducido control de los márgenes quirúrgicos. Algunos autores no aconsejan su uso en estadios precoces [75], pero los pacientes con tumores T3 ó T4 se beneficiarían de su aplicación postoperatoria [45].

Existen estudios [76-78] , hechos en Japón donde la incidencia de los CENS es más elevada, que defienden el uso de la QT en diversos esquemas de administración, intra-

arterial o sistémica y neoadyuvante o concomitante. Estos autores propugnan que su uso, aunque aumenta la supervivencia, permite mejores resultados funcionales y estéticos.

La presencia de adenopatías en los CENS, como se ha dicho, es infrecuente y el tratamiento del cuello de manera profiláctica es controvertido. Los pacientes N0 al diagnóstico se beneficiarían de un tratamiento profiláctico con RT si el riesgo de enfermedad cervical subclínica excediese el 15-20%, es decir si se afectara la mucosa oral, mejilla, rinofaringe o fosa infratemporal [50]. En los pacientes con ganglios positivos el tratamiento quirúrgico, con RT o combinado del cuello es obligatorio [79].

1.6 Pronóstico

1.6.1 Carcinomas faringolaríngeos

El carcinoma de hipofaringe tiene mal pronóstico, con una supervivencia a los 5 años que oscila entre el 17 y el 30% [3, 61]. A pesar de las diversas técnicas de tratamiento, dado el aumento de la incidencia del carcinoma de hipofaringe también está aumentando la mortalidad por el mismo. A este aumento de la mortalidad contribuye el diagnóstico tardío, ya que se ha descrito [3] que aproximadamente el 75% de los pacientes se diagnostican en estadios III-IV.

La supervivencia a 5 años del cáncer de laringe en su conjunto es del 76% para el estadio I, 66% para el estadio II, 52 % para el estadio III y 35% para el estadio IV [61]. En pronóstico generalmente es mejor para los tumores localizados en la glotis, dado que la manifestación clínica es más precoz (por la afectación temprana de cuerdas vocales) y por tanto el diagnóstico se realiza más frecuentemente en estadios iniciales.

1.6.2 Carcinomas nasosinuales

El pronóstico [6, 10, 50, 51, 76] de los CENS en su conjunto es malo, con una supervivencia global a los 5 años del 30-50%. A diferencia de otros tipos histológicos, los pacientes fallecen tempranamente pues la recidiva local, generalmente, no puede ser controlada.

El peor pronóstico [6] aparece en el carcinoma epidermoide etmoidal con una supervivencia del 48% a los 5 años, frente al 62% en el seno maxilar y al 77% en la fosa

nasal. La mayor supervivencia en el carcinoma de fosas nasales está relacionada con su diagnóstico precoz [45].

La supervivencia a 5 años está íntimamente relacionada con el tamaño tumoral: 80-90% para los T1, 55% para los T2, 50% para los T3 y 27% para los T4, aunque las cifras varían según las series publicadas [6, 51]. La invasión de la base del cráneo, cavum y pterigoides se considera de mal pronóstico [7, 10, 50, 80]. La presencia de metástasis ganglionares es un factor de muy mal pronóstico con supervivencias de 6 a 12 meses [10, 50].

Las metástasis a distancia son excepcionales (menos del 5%), siendo su pronóstico ominoso [51].

1.7 Anomalías genéticas en el carcinoma escamoso de cabeza y cuello

La carcinogénesis de los tumores escamosos de cabeza y cuello consta de un gran número de alteraciones genéticas y moleculares, que afectan a múltiples oncogenes, genes supresores de tumores y genes que intervienen en la reparación del DNA, pudiendo citar como ejemplos genes que regulan el ciclo celular (*Ciclina D1*, *p53* o *cMyc*), mitogénesis (*EGFR*, *HER2*), angiogénesis (*VEGF*), diferenciación (*e-cadherina*), muerte celular (regulación al alza de *Bcl-xL* y *Bcl-2*) o metaloproteasas de matriz extracelular (*MMP2*, *MMP9*).

Es por eso que se han realizado gran número de estudios buscando qué genes son los que se alteran en estos casos, prestando especial atención a los oncogenes y genes supresores de tumores, creándose multitud de modelos [81, 82]. Sin embargo, en el caso de laringe y faringe, no se ha encontrado relación entre anomalías cromosómicas y supervivencia libre de enfermedad, estadio clínico o afectación linfática, excepto *11q13*, siendo este un factor pronóstico negativo [83].

Se considera que la afectación tisular consta de varias fases: metaplasia, hiperplasia, displasia, carcinoma in situ y carcinoma invasivo, pudiendo identificarse mediante técnicas de Anatomía Patológica en tejidos adyacentes al tumor que aparentemente son normales. En las zonas displásicas, que frecuentemente presentan

las mismas alteraciones moleculares que las del tumor macroscópico, existe una elevada probabilidad de desarrollar una neoplasia durante los siguientes meses/años [84]. Se cree que en estos cambios podría necesitarse que haya alteraciones en 10 o más genes para una progresión maligna completa.

La activación de *11q13* es la más consistentemente descrita, llegando a estar presente hasta en un 78% de los casos, y podría explicar el comportamiento más agresivo de estos tumores, considerándose como la alteración genética más significativa [85]. En esta región hay varios oncogenes: *HST1* e *INT2* (ambos relacionados con factores de crecimiento fibroblástico), *CCND1/PRAD1* (que codifica la ciclina D1) y *CTTN*, que codifica para una proteína de adhesión celular denominada cortactina. De todos ellos, los más probablemente implicados son los dos últimos. La ciclina *D1* es un oncogén ya conocido, implicado en el ciclo celular en el paso de fase G1 a S. *CCND1* está amplificada y sobreexpresada, sobre todo en casos avanzados. En cuanto al gen *CTTN*, por relacionarse a la cortactina con los procesos de interacción celular, se cree que su alteración en este tipo de tumores podría implicar un incremento en la capacidad metastásica.

Se sabe que la pérdida la región cromosómica *9p21* es la alteración más frecuente en los CECC (70% casos), produciéndose precozmente en la progresión tumoral. En esta región se sitúan diversos genes supresores de tumor como *p14*, *p15* y *p16* (*CDKN2A*) relacionados con la progresión del ciclo celular y los fenómenos de senescencia; su pérdida facilita por tanto la progresión hacia fenotipos de malignidad desde la hiperplasia epitelial. La pérdida de función de *p16* se ha encontrado hasta en un 83% de los casos analizados.

Un oncogén frecuentemente amplificado y/o sobreexpresado en los CECC es el *ERBB1*, que codifica para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). La activación de este oncogén podría estimular el crecimiento y la proliferación celular incontrolada. Las distintas cascadas de señalización originadas en este receptor están mediadas asimismo por oncogenes (ej. *PI3K*, *STAT3*), que pueden estar activados de forma independiente; así, se ha hallado amplificación y/o sobreexpresión de alguno de los componentes de estas vías en más del 50% de los casos.

El oncogén *ERBB2* codifica para un receptor asociado a tirosín-quinasa y pertenece a la misma familia de receptores que el EGFR. Su alteración es frecuente en carcinomas de mama y en algunos carcinomas de pulmón. Dentro de los CECC se ha visto alterado en el 40% de los carcinomas epidermoides de cavidad oral.

También se han descrito, aunque con menos frecuencia, activaciones de otros oncogenes como *MYC*, la familia *RAS*, *BCL-2* y *BCL-X1*, de vías como la *WNT/β-catenina* y ganancias en regiones cromosómicas como *3q*, *5p* y *20q*.

El oncogén *MYC* se sobreexpresa en la mayor parte de las neoplasias humanas, y juega un papel importante en al menos el 40% de los tumores. Al regular varios grupos de genes, entre las funciones de cMyc se encuentran el aumento de la población celular como respuesta a señales extracelulares [86] así como funciones en el metabolismo celular, diferenciación y apoptosis [87]; se considera que su interviene en el origen de las neoplasias mediante el aumento de la celularidad y la disminución de la apoptosis [86, 87]. En los tumores de cabeza y cuello aparece amplificado con frecuencia, llegando a sobreexpresarse hasta en el 40% de los carcinomas escamosos orales. En dichos tumores se ha propuesto que su expresión elevada junto con la de p53 podría emplearse para la detección de lesiones premalignas [88].

B-catenina, por su parte, juega un papel dual en la carcinogénesis dependiendo de la localización en la que se exprese. Si aparece en membrana, la proteína se une al dominio citoplasmático de las cadherinas tipo I y mediante esta unión regula la adhesión celular. Cuando se expresa en el núcleo celular causa la degradación de la subunidad 26S del proteasoma, lo cual es inhibido por la ruta de señalización Wnt así como por mutaciones en la propia B-catenina. Esto produce la acumulación de B-catenina nuclear, lo cual desencadena la expresión de genes diana como la ciclina D1. En los CECC las mutaciones en B-catenina se consideran eventos poco frecuentes, siendo la expresión en membrana de la B-catenina la más frecuentemente asociada a progresión tumoral y malignidad de los tumores de esta localización: una pobre expresión de B-catenina en membrana se ha asociado en diversos estudios a menor diferenciación tumoral, mayor probabilidad de metástasis y menor supervivencia global [89, 90]. Del mismo modo, aparecen estudios que relacionan la expresión nuclear de B-catenina con mal pronóstico en tumores de hipofaringe [91]. En el caso de la

laringe se ha asociado la expresión de B-catenina citoplasmática a las lesiones premalignas con mayores probabilidades de evolución a carcinoma escamoso [92].

El gen supresor de tumores *TP53* (17p13) se ha encontrado mutado en una gran variedad de tumores humanos y se considera que juega un papel crucial en la patogénesis de muchos, o quizás de todos, los cánceres humanos. En los CECC se halla una función anormal de *TP53* hasta en el 13-50% de los casos, siendo además un fenómeno de aparición temprana en la carcinogénesis de estos tumores, pues ya se observa en lesiones displásicas [93]. Como ocurre en otras neoplasias humanas, en un 75% de los casos aparece una mutación *dep53* en el dominio de unión, y se produce, por lo general, una ganancia de función, aunque aún no se ha llegado a conocer del todo el mecanismo de dicha ganancia [94]. En la mayor parte de los tumores en los que dicha mutación no aparece, la función de *p53* puede estar inactivada por otros mecanismos tales como la sobreexpresión o amplificación de *MDM2* y la expresión de la proteína E6 del virus del papiloma humano, responsables ambas de degradación proteasómica de *p53*. En general, se admite que la vía de *p53* está regulada a la baja en al menos el 80% de los CECC [95]. Además de su papel en el inicio de la tumorigénesis, la inactivación de *TP53* contribuye al comportamiento clínico de los tumores causando resistencia a la quimioterapia; por tanto la disrregulación de *TP53* se asocia a peor supervivencia tanto en tumores tratados quirúrgicamente como con quimio o radioterapia [96, 97].

Además de las alteraciones descritas en los mencionados genes supresores, también se ha demostrado la existencia de regiones frecuentemente delecionadas en los CECC, lo que hace suponer que en ellas se localicen genes supresores de tumores. En el carcinoma escamoso de hipofaringe también se ha descrito mediante técnicas moleculares un descenso del número de copias en el cromosoma 18 en un 15% de casos, así como deleciones en el segmento 18q22-q23 hasta en un 55% de los casos [98, 99]. Otras regiones con pérdidas descritas son 3p14-21 (*FHIT*, *RASSF1A9*), 4q26-28, 6p, 8p21-23, 11q22-24, 13q14-21 y 14q31-32. Sin embargo, estas son más frecuentes en cáncer de laringe, y raramente ocurren en tumores de oro o hipofaringe [100].

Aparte de las alteraciones en oncogenes y genes supresores descritas, existen otras alteraciones frecuentes en los CECC que intervienen en el proceso de la carcinogénesis.

Así, por ejemplo, es frecuente la sobreexpresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el cual se induce en condiciones de hipoxia y estimula la angiogénesis, favoreciendo la progresión y la metástasis tumoral. También ha sido descrita una reducción en la expresión de ciertas moléculas relacionadas con la adhesión celular como CD44 y el complejo E-cadherina-cateninas y la sobreexpresión de otras como la quinasa de adhesión focal (FAK1, así como un incremento en la expresión de moléculas necesarias para la invasión tumoral como las colagenasas y las metaloproteasas.

Junto con todos estos cambios genéticos, cada vez cobra más fuerza la hipótesis de que las *stem cells* pluripotentes pueden tener un importante papel en la carcinogénesis mediante las llamadas *cancer stem cells*, las cuales tienen capacidad de autorrenovación y son las responsables de la persistencia tumoral y las metástasis a distancia [101]. Otra cualidad de las *cancer stem cells* consiste en la posibilidad de realizar la transición epitelio-mesénquima, fundamental para la embriogénesis, pero causante de invasión tisular y metástasis en los tejidos ya desarrollados. Sin embargo y como ocurre en el resto de procesos de la carcinogénesis, también juegan un importante papel el medio ambiente, el envejecimiento celular y los cambios epigenéticos, como la metilación del DNA (Figura 1). También la hipoxia resulta relevante en este proceso: la baja concentración de oxígeno, y con ella un elevado nivel del factor inducido por hipoxia (HIF) aumenta la expresión de marcadores de pluripotencia (Sox2, Oct4 y Nanog) en *stem cells* tumorales [102].

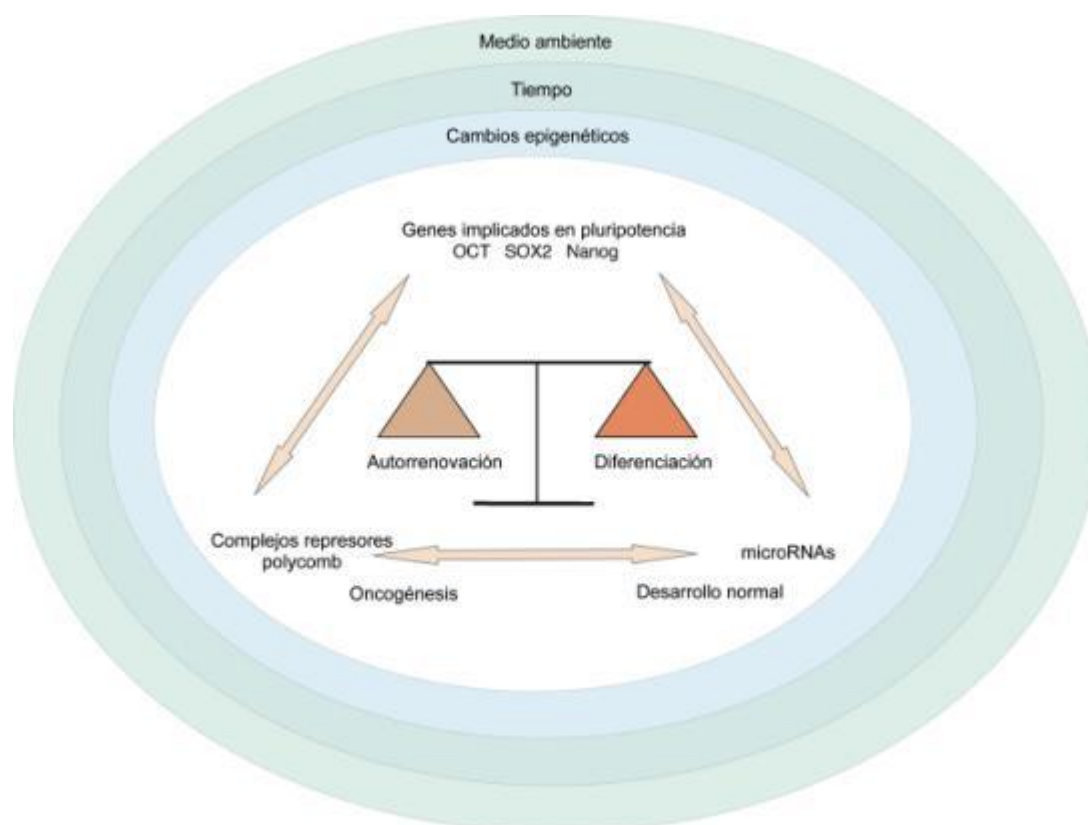


Figura 1: Esquema de los factores implicados en la autorrenovación celular y la diferenciación [1]

1.8 El papel de SOX2 en oncogénesis

El gen que determina el sexo en mamíferos, *SRY*, codifica para una proteína que incluye la secuencia *HMG-box* [103], responsable de la unión específica al DNA de la proteína *SRY*. La *HMG-box* se encuentra en gran número de proteínas que se unen al DNA, incluyendo factores de transcripción [104].

La familia *SOX* (*SRY-relatedHMG-box genes*) consiste en un grupo de genes relacionados con el *SRY*, en la región que codifica la *HMG box*, y que fueron descritos en ratones por primera vez por el grupo de Gubbay en 1990, describiéndose 4 genes *SOX* [105]. La *HMG box* actúa como dominio de unión que se une en el surco menor de la hélice de DNA, y reconoce específicamente variaciones en la secuencia consenso CTTTGTT [106] Se han identificado al menos 24 miembros de la familia *SOX*, expresados en diversas células y tejidos, y que se subdividen en subgrupos basados en la mayor o menos homología fuera del dominio HMG.

Todos los genes *SOX* tienen un papel durante la embriogénesis definido, relacionándose con la especificidad celular y la diferenciación [107, 108]. Como ocurre [26]

con otros factores reguladores del desarrollo, la disfunción de los genes *SOX* se sabe que está implicada en diversas neoplasias, pero cómo ejercen su función oncogénica no está definido con claridad. Se acepta que, en general, las proteínas de la familia *SOX* no poseen la afinidad necesaria para unirse al DNA, con lo que debe unirse a otras proteínas para crear y estabilizar los complejos de iniciación de la transcripción. Por ello, la especificidad funcional de cada proteína *SOX* está definida por su interacción con otras proteínas tisulares [107, 108].

SOX2 está codificado por un cDNA de 1085 pares de bases, con un ORF (*open readingframe*) de 317 aminoácidos, que consta de un solo exón. Se encuentra en el brazo largo del cromosoma 3, en la localización 3q26.3-27 [109], dentro del intrón de otro gen que se denomina *SOX2OT* (*SOX2overlappingtranscript*) [110]. *SOX2OT* es un gen no codificante que carece de ORF. Se cree que podría estar implicado en la regulación transcripcional de *SOX2* [110].

Este gen es uno de los factores de transcripción fundamentales que se requieren en la inducción de *stem cells* pluripotentes. Para regular la transcripción, *SOX2* forma un complejo con el dominio POU de *Oct1*, que se une al surco mayor de la hélice de DNA y reconoce la secuencia ATGCTAAT [111]. Diversos autores creen que el papel principal de *SOX2* en estas células es controlar la expresión de *Oct4* [112, 113], con quien forma heterodímeros para controlar de modo sinérgico la expresión de genes específicos de células *stem*, como *UTF1*, *Fgf4* [114] y *Fbx15* [115]. Por tanto, *SOX2* es un factor fundamental en la indiferenciación celular, siendo crítico para la regulación transcripcional del fenotipo *stem* de las células *stem* embrionarias normales, ya que controla la autorrenovación y los procesos de diferenciación [116].

Al ser un factor de transcripción, la proteína *SOX2* necesita unirse a otras para regular la transcripción del DNA, como ocurre con *Oct4* (también denominada POU5F1) [117]. La relación entre ambas proteínas es fundamental para el desarrollo embrionario, pero también para la regulación de la expresión génica y el mantenimiento de la pluripotencia en las *cancer stem cells* [118]. Se cree que *SOX2* y *Oct4* regulan positivamente su propia expresión, y actúan sinérgicamente para potenciar o reprimir la expresión de sus genes diana (figura 2).

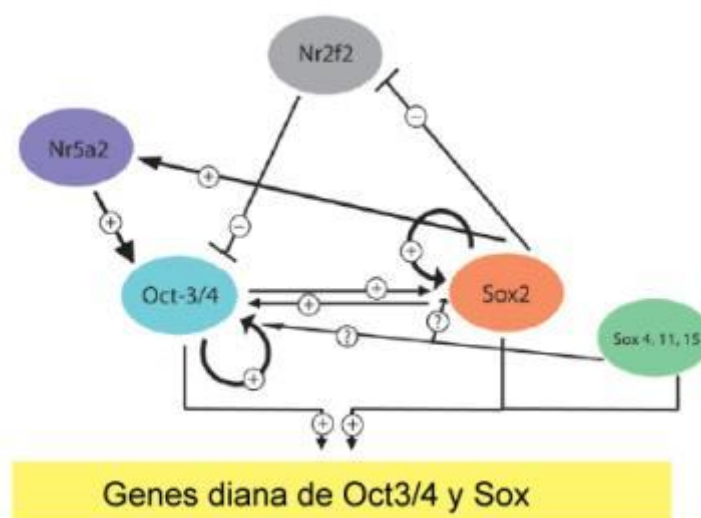


Figura 2: Se cree que *Oct 3/4* ejercen su acción junto con diversos genes de la familia SOX. Aún no se ha determinado si SOX4, SOX11 o SOX15 ejercen alguna influencia en la expresión de los genes *Oct 3/4* y *SOX2*. [1]

SOX2 es uno de los tres genes imprescindibles que cooperan entre sí para reprogramar células diferenciadas y llevarlas a un fenotipo de *stem cells* pluripotentes: *Oct4*, *SOX2* y *Nanog*. Además, dentro de su ruta tienen como objetivos cientos de genes en las *stem cells*, que pueden ser transcripcionalmente activos o inactivos. Además de otros factores de transcripción, también se induce la expresión de genes implicados en la transducción de señales, incluyendo componentes de la ruta del $TGF\beta$ (*TDGF1*) y la *Wnt* (*DKK1*) [119-121], que a su vez contribuyen asimismo a la pluripotencia celular. Sin embargo, aquellos que están implicados en la diferenciación (*PAX6*, *MYF5*) están inactivos, lo cual implica que la pérdida de expresión de *SOX2*, *Nanog* y *Oct4* supone el aumento de los genes necesarios para el desarrollo celular [122].

Esta relación con las vías de indiferenciación celular podría tener implicaciones pronósticas, ya que conlleva al desarrollo de tumores más resistentes al tratamiento [123, 124] y un descenso en la supervivencia, tanto media como libre de enfermedad en los carcinomas escamosos de cabeza y cuello [125].

Durante el desarrollo embrionario, *SOX2* se expresa en el endodermo del intestino anterior, desde los arcos faríngeos hasta lo que será el estómago, así como en varios

órganos que derivan del mismo [126]. Es por ello necesario para la diferenciación adecuada de las células escamosas esofágicas y células respiratorias, manteniendo su expresión en el esófago, tráquea y vías aéreas del adulto, donde es imprescindible para la proliferación celular y la respuesta al daño [126]. También está implicado en la diferenciación de las células *stem* neurales durante el desarrollo del cerebro, así como en la regulación de la diferenciación de las células sensitivas en el neuroepitelio de la retina y el oído interno [127-129].

SOX2 es el único gen que, hasta la fecha, se conoce que causa anoftalmia y microftalmia [110, 130], apareciendo pérdidas de heterocigosidad en un 10-20% de los casos, asociándose con él la mutación en *PAX6* y *OTX2* [131, 132]. Niveles reducidos de *SOX2* también se relacionan con atresia de esófago y reducción de las células basales positivas para p63 [126], así como el síndrome AEG (anophthalmia-esophageal-genital), que se asocia con atresia esofágica y fístula traqueoesofágica [133].

En cada vez más estudios se resalta la relación entre *SOX2* y las diferentes neoplasias humanas, aunque la principal atención se focaliza en su papel exacto en el desarrollo embrionario y las *stem cells*. Mediante técnicas inmunohistoquímicas, se ha mostrado que *SOX2* está involucrado en fases tardías de la carcinogénesis, como invasión y metástasis en cáncer de páncreas [134], estando también presente en cáncer gástrico, de próstata y de mama [135-138], aunque en ninguno de los casos se trata de tumores escamosos. Cabe destacar un reciente estudio en glioblastoma [139], en el que se constató un descenso de la expresión de *SOX2* tras el tratamiento con Sorafenib, al inhibir este fármaco de modo selectivo las *cancer stem cells*.

En general, se afirma que en los carcinomas de células escamosas las alteraciones en el cromosoma 3 son las más prevalentes, siendo lo más significativo deleciones en el brazo corto y ganancias en el brazo largo [140, 141]. El mayor número de referencias a la implicación de *SOX2* en carcinogénesis se encuentra en investigación acerca del carcinoma escamoso de pulmón, en el que se ha llegado a afirmar que el mayor pico de amplificación se encuentra en 3q26.33, sobreexpresándose en el 40-90% de los tumores, de un modo mucho más significativo en el carcinoma escamoso que en el adenocarcinoma, y en fumadores respecto de no fumadores [142, 143]. En general, se admite que la frecuencia de la amplificación de *SOX2* es similar a la que se observa en

otros oncogenes clásicos, como *EGFR*, *ERBB2* o *c-Myc* [144]. Por otra parte, se constató asimismo que la amplificación de *SOX2* no era suficiente para producir malignidad, determinándose como los genes más relacionados *FOXE1* y *FGFR2*, pero también otros genes que producen proteínas marcadoras de diferenciación a carcinoma de células escamosas, como *TP63* y *KRT6A* (que codifican para p53 y citoqueratina 6A, respectivamente). Esta importante presencia de *SOX2* en los carcinomas escamosos de pulmón podría justificarse por la presencia de un elevado número de *stem cells* embrionarias en los mismos, que puede estudiarse mediante el análisis de la expresión de *OCT4/SOX2/NANOG* [142, 143, 145]. Se demostró que la sobreexpresión de *SOX2* aumenta el crecimiento de colonias y la capacidad de migración celular, siendo imposible la supervivencia de las mismas si se inhibe su expresión [145]. Sin embargo, la sobreexpresión de *SOX2* parece ser más frecuente en tumores escamosos de pulmón que tienen un comportamiento poco agresivo, logrando relacionarse dicha expresión con mayor supervivencia [144, 146]. No se hallaron diferencias significativas entre la expresión de *SOX2* y el grado de diferenciación tumoral.

También se ha encontrado relación entre la expresión de *SOX2* y carcinomas escamosos del tracto gastrointestinal (TGI) [143, 147], encontrándose en el carcinoma de esófago como uno de los genes más amplificados, junto con *CCND1* (el gen de ciclina D1), *EGFR*, *FGFR1*, y 8q24.21 (cerca de *MYC* y *POU5FB1*) [143]. Se ha demostrado que los niveles de *SOX2* en neoplasias escamosas esofágicas y anales son paralelos a los niveles de p63 en la tumorigénesis a este nivel, lo cual sugiere la existencia de un mecanismo de interacción entre ambas, aún desconocido. También en esta localización se ha constatado un aumento de expresión de *SOX2* en tumores escamosos, pero no en adenocarcinomas [147]. Todos los anteriores estudios han llevado incluso a que algunos autores consideren la amplificación y expresión de *SOX2* como un hallazgo común en los carcinomas escamosos [148].

Finalmente, y centrándonos en los carcinomas escamosos de cabeza y cuello, existen muy pocas publicaciones acerca de la expresión o la correlación clínica con este gen. En carcinomas de la cavidad oral se ha constatado un aumento del número de copias del gen, lo cual se traduce en aumento de la expresión del factor de transcripción *SOX2* en aproximadamente un 50-60% de los casos [149, 150]. Esta

expresión se ha relacionado con tumores sin afectación ganglionar [150], así como con peor pronóstico en estos casos [151].

En tumores de hipofaringe existe un único estudio hasta la fecha [117], que analiza la relación entre la expresión de SOX2 y la de Oct4 con parámetros clínico-patológicos. En esta serie de pacientes se relacionó la presencia de la proteína SOX2 con carcinomas escamosos bien y moderadamente diferenciados, y la expresión conjunta de SOX2 y Oct4 (aunque no de SOX2 aislado) con mejor supervivencia a los 5 años. Aún no existen estudios acerca del papel de SOX2 en pacientes con carcinomas epidermoides de laringe.

Cabe destacar un reciente estudio publicado que analiza la relación entre los tumores nasosinuales y la expresión de SOX2 [152], siendo esta de más de 1/3 de los casos de neoplastias nasosinuales de histología escamosa e indiferenciada, así como en el caso de tumores procedentes de papilomas invertidos malignizados. En el análisis de los datos se refleja que aquellos pacientes con sobreexpresión de SOX2 presentaron un mayor índice de recurrencias, por lo que los autores lo señalan como un posible factor pronóstico en tumores de esta localización.

2. Hipótesis

En nuestra investigación hemos intentado clarificar el papel que tienen tanto el gen como la proteína SOX2 en los carcinomas epidermoides de hipofaringe, nasosinuales y laríngeos. A pesar de estar su papel estudiado en carcinomas epidermoides de pulmón y esófago, apenas había sido estudiado en carcinomas epidermoides de cabeza y cuello. Por el momento su interés es solamente pronóstico, dada la ausencia de inhibidores específicos. Para ello nos hemos apoyado en las siguientes premisas:

1. Se ha demostrado que la amplificación del gen SOX2 es un evento frecuente en carcinomas epidermoides, sugiriéndose además una implicación pronóstica en otras localizaciones (pulmón, lengua...)
2. Al relacionarse SOX2 con la desdiferenciación de las *stem cells* pluripotentes, podría ser determinante para la aparición o persistencia de *cancer stem cells*, responsables de la resistencia a tratamientos con quimio y radioterapia, así como del desarrollo de metástasis a distancia.
3. Dado su diferente origen embrionario, la amplificación de SOX2 y su expresión proteica podrían ser diferentes en carcinomas epidermoides nasosinuales, laríngeos y de hipofaringe, dado que estos 3 tipos de tumor tienen unas características biológicas propias y un comportamiento clínico-epidemiológico distinto.
4. El grado de amplificación del gen SOX2 y de su expresión proteica en tumores epidermoides de hipofaringe, laringe y nasosinuales, así como su correlación con diversas variables clínico-patológicas podría afectar al grado de agresividad de esta neoplasia y por tanto su conocimiento podría servir para seleccionar aquellos casos que se beneficiarían de potenciales terapias contra este gen y su proteína.
5. Las diferencias pronósticas entre los carcinomas de hipofaringe, laringe y senos paranasales podrían deberse a cambios en la expresión no solo de SOX2, sino de otras oncoproteínas ya conocidas, así como de la expresión conjunta de varias de ellas.

3. Objetivos

1. Describir los aspectos clínico-patológicos más importantes de nuestra población de pacientes con carcinoma escamoso de hipofaringe, laringe y nasosinusales.
2. Identificar los casos con alteraciones en el número de copias del gen *SOX2* mediante FISH (hibridación *in situ* con fluorescencia), en las muestras tumorales de los pacientes con carcinoma hipofaríngeo y nasosinusal.
3. Determinar, mediante IHQ, la expresión de *SOX2* en muestras procedentes de tumores localizados en hipofaringe, laringe y senos paranasales
4. Determinar también por IHQ la expresión de los productos de otros oncogenes ya conocidos, tales como: β -catenina, cMyc, y p53.
5. Relacionar las alteraciones en el número de copias de *SOX2* con la expresión proteica.
6. Relacionar las alteraciones génicas y los patrones de expresión proteica con las variables clínico-patológicas, especialmente con el pronóstico de la enfermedad y la supervivencia de los pacientes.

4. Material y método

4.1 Sujetos a estudio

Se estudiaron de forma retrospectiva 220 pacientes que presentaron un carcinoma epidermoide tratados en el Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), según la siguiente localización: 102 pacientes tenían un carcinoma epidermoide de hipofaringe, 67 pacientes un carcinoma epidermoide de laringe y 51 pacientes con un carcinoma epidermoide de senos paranasales.

Todos los pacientes fueron intervenidos con fines curativos entre noviembre de 2002 y abril de 2010, decidiendo entonces, según la estadificación tumoral y del resultado quirúrgico, la necesidad o no de recibir tratamientos complementarios (RT, QT o cirugía). Ninguno de los pacientes había recibido tratamiento previo para su patología.

En todos los pacientes se constató un historial clínico bien documentado y el diagnóstico anatomopatológico de carcinoma epidermoide fue realizado sobre la pieza de resección quirúrgica por un patólogo experimentado en cabeza y cuello en el Servicio de Anatomía Patológica.

El seguimiento mínimo fue de 12 meses o hasta la muerte del paciente, con una mediana de 14 meses (rango 1-95 meses) en el caso de los pacientes con carcinoma de hipofaringe; de 18 (rango 1-211 meses) en el caso de los pacientes con cáncer de senos paranasales y de 37 meses (rango 1-97 meses) para aquellos pacientes con cáncer de laringe.

4.2 Recogida de las muestras

Las muestras estudiadas procedían en todos los casos de carcinomas epidermoides: 102 de hipofaringe, 51 senos paranasales y 67 laríngeos, todos ellos tumores primarios. El trabajo de laboratorio se realizó en el Laboratorio de Otorrinolaringología del Instituto Universitario de Oncología de la Universidad de Oviedo (IUOPA).

Para el estudio génico se realizó la técnica de FISH en 56 muestras de los tumores localizados en hipofaringe (56 de 102: 55%) y en la totalidad de casos de tumores de región nasosinusal (n=51) con el fin de identificar las posibles ganancias y/o

amplificaciones en el gen SOX2. No se realizó FISH en los tumores laríngeos por motivos técnicos.

Tras el estudio a nivel genético se hicieron estudios de expresión proteica de SOX2 en todos los casos, además de estudiarse la expresión de otras proteínas probablemente relacionadas con estos tumores: Myc, p53 y β -catenina. La inmunohistoquímica se llevó a cabo mediante la realización de un "tissue array".

Para la realización tanto de la FISH como de la inmunohistoquímica todas las muestras del tumor primario fueron obtenidas a partir de los bloques de tejido parafinado una vez procesada la pieza para su estudio histopatológico en el Servicio de Anatomía Patológica del HUCA. Para determinar el tejido tumoral en el bloque, se hizo un corte de 5 μ m para tinción con hematoxilina-eosina que, observado al microscopio óptico permite marcar la zona tumoral en el porta y seleccionarla en los cortes posteriores, evitando la necrosis y los tejidos sanos peritumorales.

4.3 Técnica de "tissue arrays"

La técnica conocida hoy como "Tissue microarrays" fue introducida en 1998 por Kononen et al. [153]. Se trata de una técnica automatizada que utiliza un sencillo aparato denominado "tissue arrayer". La técnica consiste en pinchar con una aguja de pequeño diámetro (2mm, 1mm o 0,6 mm) un bloque de parafina y extraer un diminuto cilindro de tejido que se coloca en el bloque denominado "receptor" en el que se disponen de forma matricial un gran número de cilindros. Esta técnica permite realizar, además de la inmunohistoquímica, otros procedimientos técnicos la hibridación in situ (ISH) y la hibridación in situ fluorescente (FISH).

La principal ventaja de esta técnica es la reducción significativa de tiempo, coste y tejido. Una de las desventajas es el reducido tamaño del tumor que se va a analizar, representando sólo aproximadamente en 0,3% del tumor. Así como los inconvenientes de índole técnica: rotura del bloque, tinción heterogénea, pérdida de cilindros en el procesamiento, ausencia de tinción en algunos cilindros y selección incorrecta del tejido.

La elaboración de los TA depende del aparato utilizado (tissue arrayer), y es importante haber elaborado un esquema para la colocación de los cortes de tejido a estudiar. Una vez elaborado, se debe de homogenizar el bloque calentándolo y enfriándolo a temperatura ambiente y en la nevera antes de cortarlo.

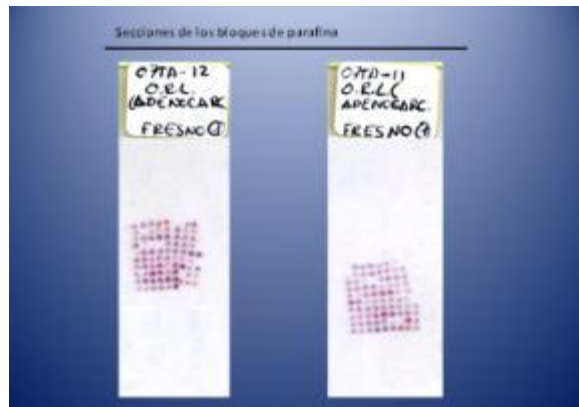


Figura 3: Tinción hematoxilina-eosina de control

Es recomendable a la hora de seccionar los bloques hacerlos de forma homogénea en una sola tanda, para evitar la pérdida de tejido que supone reorientar el bloque. El calibre de los cortes más recomendado es de 3 μ m. Es preciso realizar una tinción de hematoxilina-eosina de control en el primer corte útil y un corte de control teñido con hematoxilina-eosina cada 20 secciones (figura 3). En aquellas situaciones en las que las secciones no se van a utilizar de inmediato, es recomendable cubrir los portaobjetos con una fina capa de parafina y almacenar a -3°C .

4.3.1 Requerimientos mínimos estándar del "tissue array"

Para que la técnica de tissue array sea considerada como correcta es necesario cumplir con los siguientes requisitos de calidad:

- Que todos los tumores muestreados estén representados en las secciones, o al menos en un número superior al 90%.
- Que los cilindros una vez seccionados estén intactos o si se han perdido algunos, que esté representado al menos el 50% del caso.
- Cuando el número de casos perdidos fuese superior a 3 es recomendable repetir el "Tissue- array".

4.4 Técnica de FISH

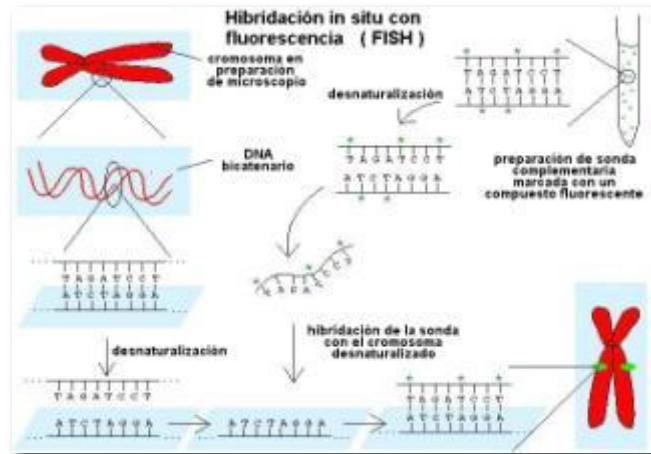


Figura 4. Técnica de FISH

La FISH nos da información sobre el número de copias de regiones cromosómicas específicas. Consiste una sonda de ADN normal de secuencia conocida, marcada con fluorescencia, que hibrida sobre la muestra problema revelando la posición de dicha zona en el cromosoma. Las sondas pueden marcar cromosomas completos, centrómeros, telómeros, regiones específicas e incluso genes (Figura 4).

La FISH fue realizada en muestras obtenidas de bloques de parafina para detectar posibles ganancias y/o amplificaciones de SOX2. Para ello se usó una sonda comercial para SOX2, procedente de la casa KreatechDiagnostics® y se realizó sobre muestras de tejido tumoral colocadas en un "tissue-array".

Las sondas están diseñadas para detectar el número de copias del oncogén (rojo), respecto al número de copias del cromosoma en el que se localiza (verde). Consideramos que existe una ganancia génica cuando hay más señales rojas que verdes y una amplificación cuando la ratio rojo/verde es 2,5 ó más, o cuando la señal roja es más fuerte de lo normal (Figuras 11 y 12).

El protocolo de FISH sobre tejidos embebidos en parafina ha sido llevado a cabo siguiendo las recomendaciones de la casa comercial VITRO®.

4.4.1 Preparación de la muestra

Se utilizaron muestras de tejido tumoral colocadas en un "tissue-array" fijadas en formol al 10% y embebidas en parafina, que se cortaron en secciones de 5 μm y se aplicaron en portaobjetos salinizados. Los cortes se adhirieron al cristal mediante calentamiento en estufa. Los cortes se desparafinaron mediante inmersión en xylol a temperatura ambiente durante 10 minutos y dos lavados de 5 minutos en etanol al 100%. Posteriormente se introdujeron las muestras en concentraciones decrecientes de etanol al 80 y al 70%, durante 5 minutos cada una, para seguidamente lavarlas con agua destilada durante 40 a 60 minutos. A continuación se sumergen las preparaciones en una jarra Coplin con ácido clorhídrico 0,2N durante 20 minutos a temperatura ambiente y luego se lavan con agua destilada durante 3 minutos.

4.4.2 Pretratamiento

El pretratamiento de las muestras consiste en adecuarlas para poder llevar a cabo una buena hibridación. Está basado en la digestión proteica de las secciones para facilitar tanto la desnaturalización del ADN como el acceso de la sonda al núcleo celular.

- Pretratamiento del tejido. Se colocan los portas en una solución de tiocianato de sodio al 8% a 80°C durante 30 minutos manteniendo la temperatura. Después se lavan con el tampón 2xSSC durante 3 minutos a temperatura ambiente.
- Digestión. Se prepara en una jarra Coplin una solución de trabajo de pepsina al 10% y se calienta a 37°C durante al menos 30 minutos antes de meter las muestras. Inmediatamente después, se sumergen las preparaciones en la solución de pepsina, calentándola a 37°C, durante 10 minutos. Tras la digestión, las preparaciones se lavan en 2xSSC durante 5 minutos, se deshidratan en 70%, 80% y 100% de etanol a temperatura ambiente durante 3 minutos cada vez y, finalmente, se dejan secar al aire.

4.4.3 Hibridación

La sonda se precalienta a 37°C durante 5 minutos. Se colocan 10 µl de la sonda en un tubo dependiendo de la superficie a hibridar.

Procedimiento. Se coloca la sonda sobre la muestra del tejido y se cubre con un cubreobjetos de cristal. El conjunto se coloca en una placa térmica a 75°C durante 10 minutos. De ahí, tras envolver el porta en parafilm, se pasa a una cámara húmeda donde se incuban a 37°C durante 16 horas. Se retira el cubreobjetos sumergiendo los portas en una solución de lavado posthibridación a temperatura ambiente y, posteriormente se lava a 75°C en la solución de lavado precalentada durante 2 minutos. Finalmente se lava sumergiendo en un Coplin las preparaciones en agua destilada, a temperatura ambiente y se deja secar a oscuras.

4.4.4 Contraste Fluorescente

Las preparaciones se tiñen con DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol, 350ng/mL) disuelto en AntiFade (Vectashield, Vector Laboratories) y se procede a su observación al microscopio óptico equipado con luz fluorescente y dotado de los filtros adecuados.

4.5 Inmunohistoquímica

Los tejidos fijados en formol e incluidos en parafina se cortan en secciones de 3 µm que son adheridos a portas siliconados (Dako® S2024) y se dejan en la estufa a 56°C-58°C (mínimo 2 horas y máximo 18).

Después se realiza el desparafinado de las muestras con xilol y su hidratación con alcoholes de graduación decreciente. A continuación se efectúa el desenmascaramiento antigénico con solución recuperadora de antígenos en el Ptlink de Dako® a 95° durante 20 minutos, manteniendo las preparaciones dentro de la solución recuperadora de antígenos hasta que baje la temperatura a 60°C. Posteriormente se colocan las preparaciones en un recipiente que contenga un buffer de lavado.

A partir de este paso, la técnica se realiza en el InmunoteñidorAutostainer plus de Dako®. En primer lugar se introducen las muestras en un buffer de lavado y en una solución bloqueante de peroxidasa durante 5 minutos. Se añade el anticuerpo

monoclonal primario dirigido hacia la proteína que deseamos detectar durante un tiempo variable, según el tipo de anticuerpo utilizado.

La inmunodetección fue realizada con el sistema EnVision Plus “anti-mouse” empleando como sustrato el cromógeno diaminobenzidina (DakoCytomation).

Las técnicas inmunohistoquímicas realizadas se desglosan en detalle en la tabla 1.

MARCADOR	SRA*	AP**	D***	TI****
p53	pH9	Clon Do7 (Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca)	1/100	15'
B-catenina	pH9	Clon β -catenina-1 (Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca)	1/200	25'
C-myc	pH9	9E10 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)	1/50	20'
SOX2	pH9	AB5603 (Millipore Ibérica SA Madrid, España)	1/1000	25'

*SRA**: Solución recuperadora de antígenos; *AP***: Anticuerpo primario; *D****: Dilución; *TI*****: Tiempo de incubación

Tabla 1: Técnicas IHQ realizadas

Un paso clave para que los resultados sean reproducibles, comparables y de una calidad apropiada, es la elección del método de detección. En nuestro estudio, se ha utilizado el sistema de polímeros de dextrano EnVision™ Plus (PDE) Dako, una técnica IHQ desarrollada recientemente. El sistema EnVision™ Plus es una técnica de tinción en dos pasos en la que al anticuerpo primario le sigue un polímero conjugado. Este es un polímero de alto peso molecular, el dextrano, al que se conjugan de manera covalente un gran número de moléculas de enzima (por ejemplo la peroxidasa de rábano) y de anticuerpo secundario. Este sistema aumenta la sensibilidad, lo que

permite incrementar las diluciones del anticuerpo primario y produce menos fondo que las técnicas tradicionales de avidina-biotina.

Como último paso se contrasta la preparación mediante hematoxilina durante un minuto. Tras la tinción, las preparaciones se deshidratan mediante alcoholes de graduación ascendente y se montan con un cubreobjetos.

4.5.1 Interpretación de la inmunohistoquímica

4.5.1.1 SOX2

Tinción del núcleo celular sin tinción del citoplasma. Aquellas tinciones intensas con más de un 5% de células teñidas fueron consideradas como positivas, en tanto que las tinciones con intensidad débil o porcentaje celular teñido menor al 5% fueron consideradas como negativas.

4.5.1.2 B-catenina

Tinción de membrana citoplasmática con o sin tinción del citoplasma. Se discriminó entre los negativos o débilmente teñidos y los que presentaban un nivel de tinción intenso fueron considerados como positivos.

Asimismo, y de manera diferenciada, también se estudiaron aquellos casos en los que B-catenina presentaba una tinción nuclear positiva.

4.5.1.3 cMyc

Tinción del núcleo celular con o sin tinción del citoplasma, considerándose positiva aquella tinción con más de un 10% de células tumorales teñidas. Se discriminó entre los negativos o débilmente teñidos y los que presentaban un nivel de tinción intenso fueron considerados como positivos.

4.5.1.4 p53

Tinción del núcleo celular. Aquellas muestras en las que aparecía teñida de manera intensa más del 10% de la muestra se consideraron positivas, siendo el resto negativas.

4.6 Descripción de las variables

4.6.1 Variables clínico-patológicas

Las variables clínico-patológicas que se seleccionaron y estudiaron fueron:

- Edad
- Sexo
- Categoría T: T inicial (T1-T2) y T avanzado (T3-T4)
- Categoría N: N inicial (N0-N1) y N avanzado (N2-N3)
- Estadio TNM: I, II, III y IV. Agrupación I-II y III-IV
- Aparición de recidiva: Local, regional, locorregional, metástasis a distancia
- Tiempo libre de enfermedad
- Supervivencia global
- Estado del paciente: Vivo sin tumor, vivo con tumor, éxitus por tumor, éxitus por otras causas.

4.6.2 Variables génicas

Las variables génicas estudiadas por FISH fueron la ganancia o amplificación de *SOX2*. Cuando se observan más señales rojas que verdes se interpreta como ganancia. Si la relación señales rojas/verdes es de 2,5 ó más, o cuando la señal roja es mucho más intensa de lo normal, se interpreta como amplificación.

4.6.3 Variables en inmunohistoquímica

En el caso de B-catenina, la variable estudiada fue la positividad o negatividad de la tinción. En relación a cMyc, p53 y *SOX2* se estudió no solo la positividad o no de la tinción, sino la intensidad de la misma, considerándose dos variables: ausencia o tinción débil y tinción intensa.

4.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico sobre las distintas variables estudiadas se ha llevado mediante el programa informático SPSS (“StatisticalPackagefor Social Science”), versión 20.0 para Mac (SPSS® Inc. Illinois, EE.UU).

La asociación de caracteres cualitativos se llevó a cabo mediante la prueba de correlación χ^2 de Pearson o la prueba del estadístico exacto de Fisher. El nivel de significación se fijó para una $p \leq 0,05$.

Para estimar la supervivencia se utilizaron las curvas Kaplan-Meier, comparando las distribuciones de supervivencia mediante la Prueba del Logaritmo del Rango «Log-Rank Test». Los valores con una $p \leq 0,05$ fueron considerados significativos.

5. Resultados

5.1 Aspectos clínico-patológicos

Las variables descritas clínico-patológicas descritas no tratan de definir los aspectos generales de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello, sino las características de los sujetos seleccionados para ver si se ajustan o desvían de lo esperado en este tipo de tumores. También tienen interés para intentar establecer asociaciones con el resto de variables obtenidas por medio de las técnicas de biología molecular utilizadas.

5.1.1 Carcinoma epidermoide de hipofaringe

De los 102 pacientes incluidos en nuestro estudio, 99 eran varones (97.1%) y 3 eran mujeres (2.9%). La media de edad era de 59 años, teniendo el paciente más joven diagnosticado 43 años y el de mayor edad, 84 años.

La estadificación y las categorías tumorales T, N y M, así como el grado histológico, se exponen con detalle en la tabla 2.

		n (%)
Clasificación T	T1-2	29 (28.4)
	T3-4	73 (71.6)
Clasificación N	N0-1	16 (15.7)
	N2-3	86 (84.3)
Clasificación M	M0	102 (100)
	M+	0 (0)
Estadificación	I-II	7 (6.9)
	III-IV	95 (93.1)
Grado histológico	Bien diferenciado	23 (22.5)
	Moderadamente diferenciado	41 (40.2)
	Pobrementemente diferenciado	38 (37.3)

Tabla 2: Características clínico-patológicas de los pacientes.

Además del tratamiento quirúrgico, 75 pacientes (73.5%) recibieron tratamiento complementario con radioterapia.

El 61.8% de los pacientes presentaron una recidiva en el transcurso del seguimiento, y el 40.2% desarrollaron metástasis a distancia.

La supervivencia libre de enfermedad fue del 29% a los tres años y del 23% a los cinco años (Figura 5A). Actualmente, 35 pacientes (34%) permanecen libres de enfermedad

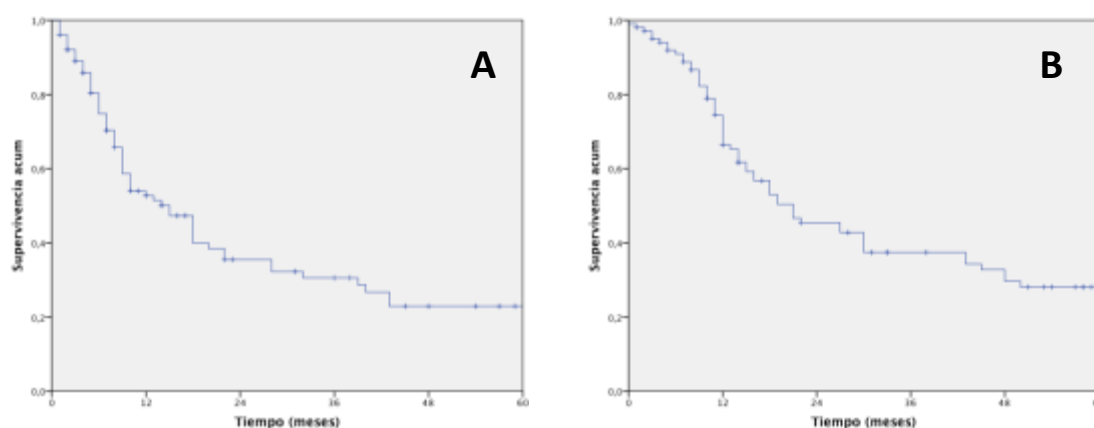


Figura 5: Supervivencia libre de enfermedad (A) y supervivencia global (B) en los carcinomas epidermoides de hipofaringe

La supervivencia global de los pacientes fue del 24.6% a los cinco años de seguimiento (Figura 5B). La principal causa de muerte en nuestra serie fue la presencia de recidiva locorregional irreseccable o la aparición de metástasis a distancia. Sin embargo, 8 de los pacientes fallecieron debido a procesos intercurrentes, y 9 se perdieron a lo largo del seguimiento.

De las variables clínico patológicas estudiadas, solamente la presencia de un estadio N avanzado (N2-3) se relacionó negativamente con la supervivencia ($p=0.029$), así como el estadio global III y IV, aunque este último sin presentar relación estadísticamente significativa ($p=0.054$).

5.1.2 Carcinoma epidermoide nasosinusal

Nuestra serie de 51 pacientes estaba compuesta de 37 varones (72.5%) y 14 mujeres (27.5%). El rango de edad osciló entre 47 y 91 años, siendo la media de 66.

Al igual que se hizo con los carcinomas epidermoides de hipofaringe, las características clínico-patológicas de los pacientes con carcinoma epidermoide de senos paranasales se exponen en la tabla 3.

		n (%)
Clasificación T	T 1-2	5 (9.8)
	T 3-4	46 (90.2)
Clasificación N	N 0-1	38 (74.5)
	N 2-3	13 (25.5)
Clasificación M	M0	51 (100)
	M+	0 (0)
Estadificación	I-II	4 (7.8)
	III-IV	47 (92.2)
Grado histológico	Bien diferenciado	18 (35.3)
	Moderadamente diferenciado	10 (19.6)
	Pobrementemente diferenciado	23 (45.1)

Tabla 3: Características clínico-patológicas de los pacientes con carcinoma epidermoide nasosinusal

Como tratamiento complementario a la cirugía, 39 pacientes (76.5%) recibieron radioterapia tras la misma.

42 de los 51 pacientes estudiados (82.4%) presentaron recidiva de su enfermedad a lo largo del seguimiento, en tanto que 5 pacientes (9.8%) desarrollaron metástasis a distancia. La supervivencia libre de enfermedad fue del 12.6% tanto a los 3 como a los 5 años de seguimiento (Figura 6A).

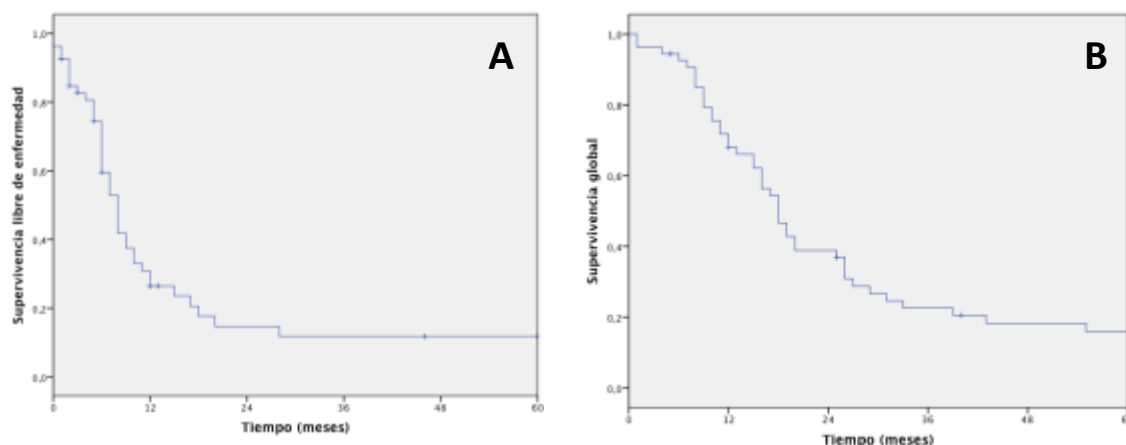


Figura 6: Supervivencia libre de enfermedad (A) y supervivencia global (B) en los carcinomas epidermoides nasosinuales

La supervivencia global (figura 6B) en esta serie de pacientes fue del 17% a los cinco años de seguimiento. La principal causa de fallecimiento es la aparición de recidiva local o metástasis a distancia, falleciendo 6 de los pacientes por otros motivos.

Ninguna de las variables clínico-patológicas estudiadas presentaba una relación estadísticamente significativa con la supervivencia, si bien la presencia de estadio T ($p=0.15$) o N avanzados ($p=0.821$) se correspondían con peor supervivencia. Como cabe esperar, aquellos pacientes que durante el seguimiento presentaban recidiva ($p=0.017$) presentaron una peor supervivencia que aquellos pacientes que no lo hicieron.

5.1.3 Carcinoma epidermoide de laringe

La muestra de carcinoma epidermoide de laringe estuvo compuesta de 67 pacientes, todos ellos varones, con edades comprendidas entre los 36 y los 86 años (media 61 años). En la tabla 4 se exponen el resto de variables clínicas de esta cohorte de pacientes.

Tras el tratamiento quirúrgico, 31 pacientes (46.3%) presentaron una recidiva a lo largo del seguimiento. Asimismo, 18 pacientes (27%) desarrollaron metástasis a distancia.

		n (%)
Clasificación T	T 1-2	21 (31.3)
	T 3-4	46 (68.7)
Clasificación N	N 0-1	33 (49.3)
	N 2-3	34 (50.7)
Clasificación M	M0	0 (0)
	M1	1 (100)
Estadificación	I-II	13 (19.4)
	III-IV	54 (80.6)
Grado histológico	Bien diferenciado	25 (37.3)
	Moderadamente diferenciado	30 (44.8)
	Pobrementemente diferenciado	12 (17.9)

Tabla 4: Características clínico-patológicas de los carcinomas epidermoides de laringe

En este grupo de pacientes, la supervivencia global fue del 64.3% a los tres años y del 57% a los cinco años (figura 7B). La principal causa de muerte de los pacientes fue la reaparición de su tumor primario o existencia de metástasis a distancia, falleciendo 9 pacientes por otros motivos.

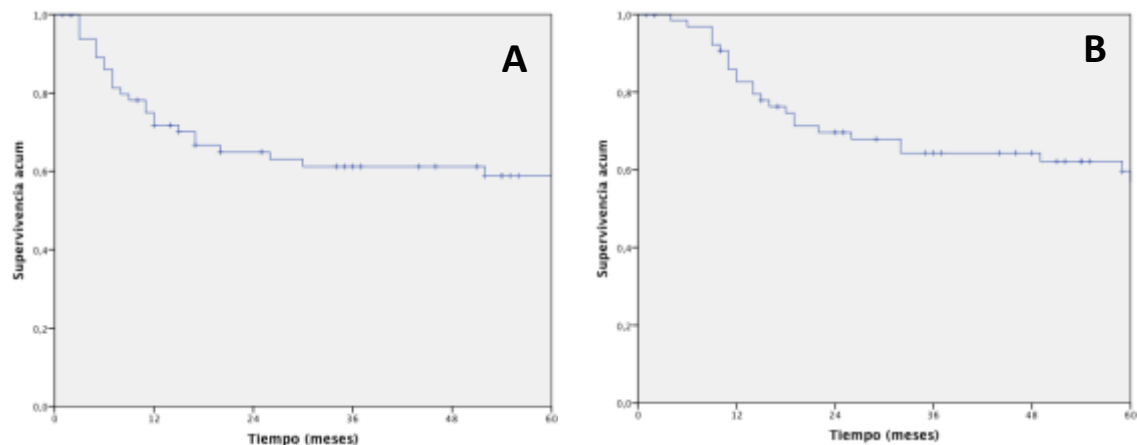


Figura 7: Curva de Kaplan-Meier para la supervivencia libre de enfermedad (A) y global (B) de los pacientes con cáncer de laringe

De las variables clínico-patológicas estudiadas, guardaron relación estadísticamente significativa con una mejor supervivencia el diagnóstico en estadios T y N iniciales ($p=0.025$ y $p<0.001$, respectivamente), así como aquellos tumores en estadio global I y II ($p=0.012$). Se pudo observar también que el pronóstico del paciente era peor cuanto más pobre era su diferenciación histológica ($p=0.036$).

La supervivencia libre de enfermedad fue del 61.2% a los 3 años y del 58.8% a los cinco años (figura 7A). Las variables clínico-patológicas que guardaron relación estadísticamente significativa con un mayor tiempo libre de enfermedad fueron clasificación T inicial ($p=0.045$), N inicial ($p=0.002$), estadio global I o II ($p=0.019$). En este caso, el grado de diferenciación del tumor y el tiempo libre de enfermedad no guardaron una relación significativa.

5.2 Análisis del número de copias del gen SOX2

5.2.1 Análisis de la ganancia/amplificación de SOX2

5.2.1.1 Carcinoma epidermoide hipofaringe

La técnica de análisis génico con FISH fue realizada en los 56 casos, obteniendo resultados válidos en 55 casos, pues en el caso restante no fue concluyente por falta de representación adecuada en los TMAs.

Mediante este estudio observamos una ganancia de SOX2 en 34 de las 55 muestras (61.8%), presentando 14 de ellas amplificación de dicho gen (25.4%).

5.2.1.2 Carcinoma epidermoide de senos paranasales

Se realizó análisis genético con FISH en la totalidad de las muestras de carcinoma epidermoide nasosinusal, obteniendo resultados válidos en 32 de las muestras estudiadas. En dicho análisis se apreció ganancia de SOX2 en el 50% de las muestras (16 casos), correspondiendo 4 de dichos casos a una amplificación del gen (12.5%).

5.2.2 Relación entre la ganancia/amplificación de SOX2 y las variables clínico-patológicas

Decidimos estudiar las ganancias y amplificaciones de SOX2 conjuntamente. Las correlaciones entre la ganancia/amplificación de SOX2 y la categoría T, categoría N, estadio tumoral, grado histológico e índice de metástasis se exponen en la tabla 5 en el caso del carcinoma epidermoide de hipofaringe, y en la tabla 6 para los tumores de localización en senos paranasales.

En un análisis por localización, los tumores de menor estadio tumoral y categorías T y N tenían más tendencia a tener ganancia/amplificación del gen, sin llegar ésta a ser significativa. Se observó así mismo que, la mayor parte de los pacientes con tumores con ganancia/amplificación de SOX2, no desarrollaron metástasis a distancia (68%), aunque sin alcanzar estos datos valores significativos.

Variable		n	Ganancia/amplificación de SOX2		p
			Negativa	Positiva	
Categoría T	T1-2	14	5 (24%)	9 (26%)	0.544
	T3-4	41	16 (76%)	25 (74%)	
Categoría N	N0-1	7	3 (14%)	4 (12%)	0.546
	N2-3	48	18 (86%)	30 (88%)	
Estadio	I-II	2	2 (10%)	0 (0%)	0.141
	III-IV	53	19 (90%)	34 (100%)	
Grado histológico	Bien	12	3 (15%)	9 (27%)	0.302
	Moderado	21	7 (34%)	14 (41%)	
	Pobre	22	11 (52%)	11 (32%)	
Metástasis	No	39	16 (76%)	23 (68%)	0.556
	Sí	16	5 (24%)	11 (32%)	

Tabla 5: Relación entre la ganancia/amplificación de SOX2 y las variables clínico-patológicas en tumores con localización en hipofaringe

Variable		n	<u>Ganancia/amplificación de SOX2</u>		p
			Negativa	Positiva	
Categoría T	T1-2	3	0 (0)	3 (18.75)	0.226
	T3-4	29	16 (100)	13 (81.25)	
Categoría N	N0-1	22	12 (75)	10 (62.5)	0.704
	N2-3	10	4 (25)	6 (37.5)	
Estadio	I-II	2	0 (0)	2 (12.5)	0.484
	III-IV	30	16 (100)	14 (87.5)	
Grado histológico	Bien	12	8 (50)	4 (25)	0.29
	Moderado	6	3 (18.75)	3 (18.75)	
	Pobre	14	5 (31.25)	9 (56.25)	
Metástasis	No	28	12 (75)	16 (100)	0.101
	Sí	4	4 (25)	0 (0)	

Tabla 6: Relación entre la ganancia/amplificación de SOX2 y las variables clínico-patológicas en tumores de senos paranasales

Una vez estudiados los casos con tumor localizado en senos paranasales, y aunque ninguna de las variables clínico-patológicas presentó de nuevo correlación estadísticamente significativa con la ganancia o amplificación de SOX2, cabe destacar que ninguno de los casos con ganancia del gen correspondía a pacientes que desarrollaron metástasis a distancia durante el seguimiento.

Si tomamos las dos localizaciones de manera conjunta, como se hace en la tabla 7, tampoco aparece relación significativa con ninguna de las variables clínico-patológicas analizadas en nuestro estudio.

Variable		n	<u>Ganancia/amplificación de SOX2</u>		P
			Negativa	Positiva	
Categoría T	T1-2	17	5 (14%)	12 (24%)	0.172
	T3-4	70	32 (86%)	38 (76%)	
Categoría N	N0-1	29	15 (41%)	14 (28%)	0.159
	N2-3	58	22 (59%)	36 (72%)	
Estadio	I-II	4	2 (5%)	2 (4%)	0.571
	III-IV	83	35 (95%)	48 (96%)	
Grado histológico	Bien	24	11 (30%)	13 (26%)	0.781
	Moderado	27	10 (27%)	17 (34%)	
	Pobre	36	16 (43%)	20 (40%)	
Metástasis	No	67	28 (77%)	39 (78%)	0.458
	Sí	20	9 (23%)	11 (22%)	

Tabla 7: Relación entre la ganancia/amplificación de SOX2 y las variables clínico-patológicas en tumores nasosinuales e hipofaríngeos

5.2.2.1 Relación entre la ganancia/amplificación de SOX2 y el curso clínico

En el grupo analizado de 55 pacientes con tumores en hipofaringe en los que estudiamos la ganancia/amplificación de SOX2, 13 permanecían vivos y sin tumor al final del seguimiento, 28 fallecieron a causa del tumor y 12 lo hicieron por otras causas, no hallándose diferencias significativas entre estos grupos y la ganancia/amplificación de SOX2 ($p=0,246$).

No observamos diferencias significativas ($p=0,375$) entre la supervivencia global de los pacientes y la ganancia/amplificación de SOX2 (Figura 8A). Sin embargo, sí observamos que los pacientes con ganancia/amplificación de SOX2 suelen tener mejor supervivencia, observándose esta diferencia durante los primeros 36 meses de seguimiento. Por otra parte, no apreciamos una correlación significativa entre la ganancia/amplificación de SOX2 y la aparición de recidivas tumorales ($p=0,259$), ni tampoco con la aparición de metástasis a distancia ($p=0.757$).

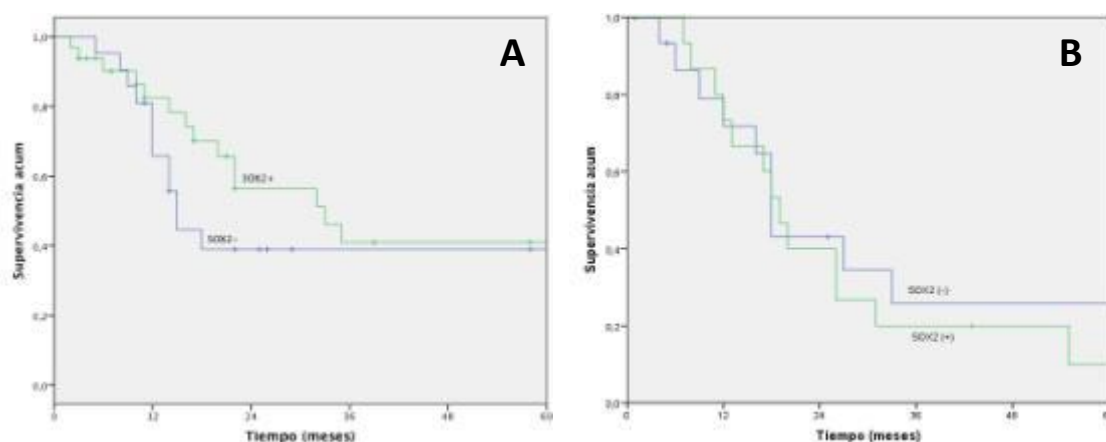


Figura 8: Supervivencia global en ca. epidermoide de hipofaringe (A) y de senos paranasales (B) según la ganancia/amplificación de SOX2

Para los 32 pacientes con tumor localizado en senos paranasales, 5 permanecían vivos y sin tumor al final del seguimiento, 24 fallecieron a causa del tumor y 3 lo hicieron por otras causas, sin que se apreciase una correlación estadísticamente significativa con la función génica ($p=0.677$). En el caso de la supervivencia específica para tumor, no apreciamos diferencias estadísticamente significativas entre los casos con ganancia/amplificación de SOX2 y los que no lo presentaban ($p=0.677$) (figura 8B), tanto a los 3 como a los 5 años de seguimiento. Además tampoco observamos una correlación significativa entre los casos con ganancia/amplificación de SOX2 y la aparición de recidiva locorregional ($p=0.333$) o de metástasis a distancia ($p=0.101$).

5.3 Análisis de la expresión proteica

Se analizó la expresión de las proteínas SOX2, p53, cMyc, y B-catenina mediante IHQ en el grupo completo de 102 pacientes con tumores de hipofaringe, 51 de senos paranasales y 67 localizados en laringe.

Todas las muestras tumorales analizadas fueron satisfactoriamente teñidas y mostraban algún grado de expresión de dichas proteínas, salvo en dos tinciones de p53 y una de B-catenina para los tumores de hipofaringe. Por otra parte, en el caso de tumores laríngeos, 8 muestras no fueron válidas para el análisis en el caso de p53, y lo mismo ocurrió en 5 muestras teñidas para mostrar la expresión de B-catenina. La tinción en la masa tumoral en cada caso era homogénea.

La figura 9 muestra dos ejemplos de positividad inmunohistoquímica para la proteína SOX2, pudiendo diferenciarse en dicha figura una tinción fuertemente positiva (9A y 9C) y otra débilmente positiva (9B y 9D).

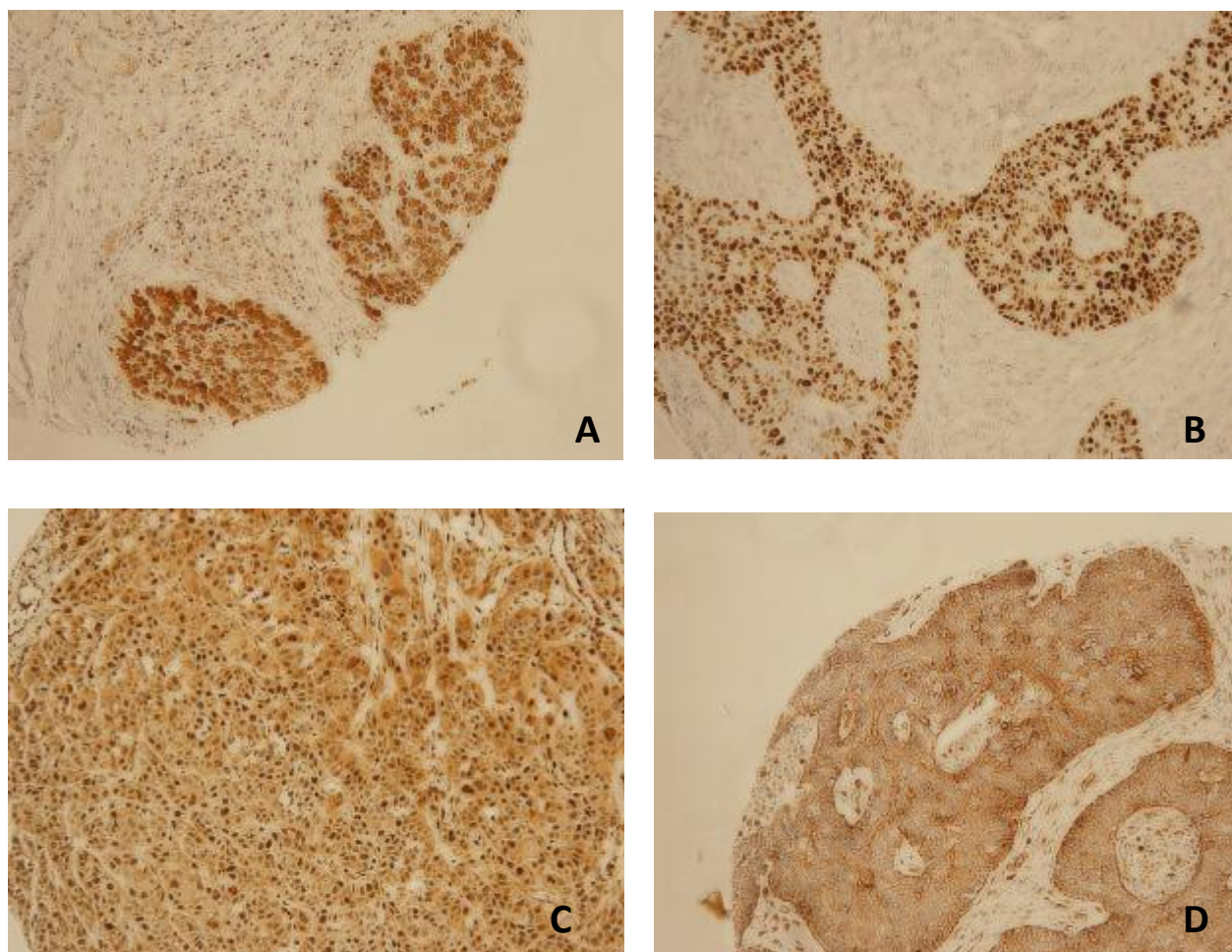


Figura 9: Ejemplos de la tinción inmunohistoquímica positiva en carcinoma epidermoide de hipofaringe: A: SOX2; B: p53; C: C-myc y D: β -catenina

Si se analiza la expresión de las distintas proteínas, destaca el porcentaje similar de casos que expresan SOX2 en hipofaringe y laringe, que es notoriamente superior que en los tumores localizados en senos paranasales (38 y 42% frente a 14%). Esto no ocurre con el resto de oncoproteínas, con un porcentaje de expresión similar para las tres localizaciones, salvo en el caso de cMyc, que se sobreexpresó en menor porcentaje de casos de tumores laríngeos (45%) que de hipofaringe o nasosinusales (62% y 59% respectivamente). Los resultados de la tinción inmunohistoquímica se reflejan en la tabla 8.

	Hipofaringe	Nasosinusal	Laringe
B-catenina (membrana)	86 (84.2)	43 (84.3)	51 (82.3)
B-catenina (núcleo)	5 (5)	1 (2)	3 (4.8)
SOX2	39 (38.2)	7 (13.7)	28 (41.8)
cMyc	63 (61.8)	30 (58.8)	30 (44.8)
p53	67 (67)	31 (60.8)	36 (61)

Tabla 8: Resultados de la IHQ en carcinomas epidermoides de cabeza y cuello. En la tabla se reflejan únicamente aquellos casos con tinción positiva

5.3.1 Relación de la expresión de SOX2 con las variables clínico-patológicas

5.3.1.1 Tumores de hipofaringe

Variable		n	Expresión de SOX2		p
			Negativa	Positiva	
Categoría T	T1-2	29	17	12	0.822
	T3-4	73	46	27	
Categoría N	N0-1	16	10	6	1
	N2-3	86	53	33	
Estadio	I-II	7	6	1	0.246
	III-IV	95	57	38	
Grado histológico	Bien	23	16	7	0.169
	Moderado	41	28	13	
	Pobre	38	19	19	
Metástasis	No	61	39	22	0.679
	Sí	41	24	17	

Tabla 9: Relación entre la expresión de SOX2 y las variables clínico-patológicas

En la tabla9 se muestra la correlación entre la expresión proteica de SOX2 y las variables clínico-patológicas categoría T y N, estadio global de la enfermedad, grado histológico y desarrollo de metástasis a distancia en los tumores de hipofaringe. Ninguna de las variables clínico-patológicas estudiadas mostró una relación estadísticamente significativa con la expresión proteica de SOX2.

Como puede apreciarse en dicha tabla, no hemos encontrado relación estadísticamente significativa con la expresión de SOX2 en la categorías T y N, estadio global de la enfermedad o desarrollo de metástasis a distancia. Sin embargo, se observa que aquellos pacientes con expresión positiva de SOX2 presentan unas categorías T y N menores, y también se encuentran en un estadio precoz de la enfermedad (I-II).

5.3.1.2 Tumores de senos paranasales

En la tabla 10 se muestra la correlación entre la expresión proteica de SOX2 y las variables clínico-patológicas estudiadas.

En ningún caso se encontró una relación estadísticamente significativa entre la expresión de SOX2 y las variables clínico-patológicas, sin embargo, sí cabe remarcar que los pacientes con tumores clasificados en estadios iniciales de la enfermedad presentaban más frecuentemente expresión positiva de SOX2.

Variable		n	Expresión de SOX2		p
			Negativa	Positiva	
Categoría T	T1-2	5	4	1	0.538
	T3-4	46	40	6	
Categoría N	N0-1	38	34	4	0.352
	N2-3	13	10	3	
Estadio	I-II	4	3	1	0.457
	III-IV	47	41	6	
Grado histológico	Bien	18	16	2	0.8
	Moderado	10	8	2	
	Pobre	23	20	3	
Metástasis	No	46	39	7	1
	Sí	5	7	0	

Tabla 10: Relación de la expresión de SOX2 con las variables clínico-patológicas en los carcinomas escamosos nasosinuales

5.3.1.3 Tumores de laringe

Se estudió para este grupo de pacientes la expresión inmunohistoquímica de SOX2 en relación con el resto de variables: clasificaciones T y N, estadio global, grado de diferenciación tumoral y presencia de metástasis a distancia. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 11.

Se observa que, al igual que ocurrió en la serie de pacientes con tumores localizados en hipofaringe, aparece una relación estadísticamente significativa entre la positividad inmunohistoquímica de SOX2 y el grado de diferenciación tumoral, siendo más frecuente su expresión en tumores moderada y pobremente diferenciados.

Variable		n	Expresión de SOX2		p
			Negativa	Positiva	
Categoría T	T1-2	21	13	8	0.792
	T3-4	46	26	20	
Categoría N	N0-1	33	21	12	0.460
	N2-3	34	18	16	
Estadio	I-II	13	9	4	0.533
	III-IV	54	30	24	
Grado histológico	Bien	25	20	5	0.011
	Moderado	30	12	18	
	Pobre	12	7	5	
Metástasis	No	49	29	20	0.788
	Sí	18	10	8	

Tabla 11: Relación entre la expresión de SOX2 y las variables clínicas

5.3.1.4 Total de los casos

Al estudiar todos los casos de manera conjunta, como se muestra en la tabla 12, se vuelve a apreciar la relación estadísticamente significativa que presentan los tumores con tinción positiva para SOX2 y aquellos casos con un grado de diferenciación moderado.

Asimismo aparece una relación que no observamos si tomamos las tres localizaciones por separado: la expresión de SOX2 es positiva de forma mucho más frecuente en aquellos casos con metástasis ganglionares avanzadas (grado N2 y N3), siendo esta relación significativa. Si tomamos estos datos junto con la mayor frecuencia (aunque no con una p menor de 0.05) de expresión de SOX2 en aquellos casos con categorías T y estadio global avanzado, parece que la expresión de SOX2 aumenta conforme progresa la neoplasia inicial.

Variable		n	Expresión de SOX2		p
			Negativa	Positiva	
Categoría T	T1-2	55	34	21	0.253
	T3-4	165	112	53	
Categoría N	N0-1	87	65	22	0.023
	N2-3	133	81	52	
Estadio	I-II	24	18	6	0.239
	III-IV	196	128	68	
Grado histológico	Bien	66	52	14	0.034
	Moderado	81	48	33	
	Pobre	73	46	27	
Metástasis	No	156	107	49	0.175
	Sí	64	39	25	

Tabla 12: Relación entre la expresión de SOX2 y las variables clínicas

5.3.2 Relación de la expresión de SOX2 con la supervivencia

No hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la expresión de SOX2 entre aquellos pacientes que había fallecido a causa del tumor y aquellos que seguían vivos al final del seguimiento en ninguno de los tres tumores estudiados ($p=0.645$ en tumores de hipofaringe, $p=0.739$ en senos paranasales y $p=0.965$) (figura 10A-C).

Del mismo modo, tampoco se estableció correlación estadísticamente significativa entre la expresión de SOX2 y el desarrollo de recidiva y/o metástasis a distancia ni la aparición de metástasis a distancia de forma aislada para ninguna de las tres localizaciones.

Sin embargo, cabe destacar que, aunque no alcanzó significación estadística ($p=0.283$) al analizar la relación entre la expresión proteica de SOX2 y el tiempo libre de enfermedad en pacientes con tumor localizado en senos paranasales se encontró que los pacientes con expresión positiva de SOX2 presentaban una reaparición de su enfermedad más tardíamente que aquellos tumores con expresión negativa (figura 10D-F).

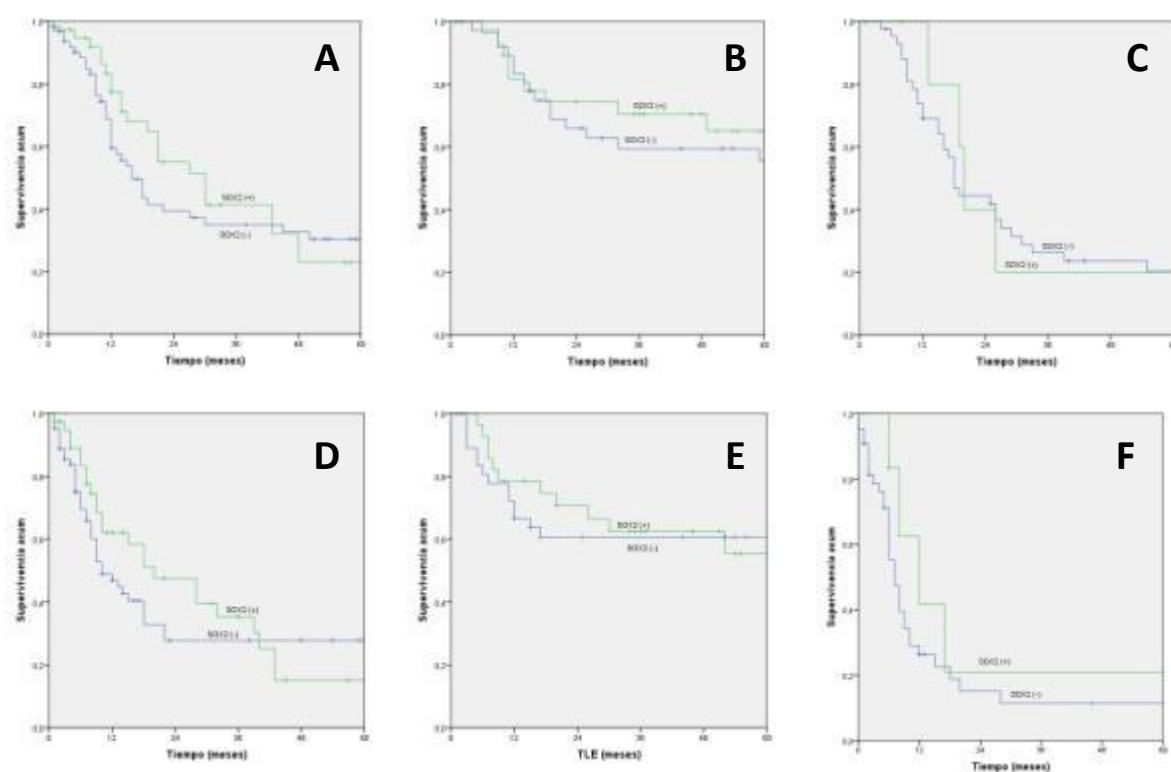


Figura 10: Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia global en los casos de tumor hipofaríngeo (A), laríngeo (B) y nasosinusal (C). Curva de Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad de los casos con tumores hipofaríngeos (D), laríngeos (E) y de senos paranasales (G)

Para los tumores laríngeos, aunque la relación entre supervivencia libre de enfermedad con la expresión de SOX2 no alcanzó significación estadística ($p=0.864$), los pacientes con expresión positiva de SOX2 parecían presentar menor índice de recidiva tumoral hasta los 24 meses de seguimiento, momento a partir del cual la frecuencia de recidiva tiende a igualarse a aquellos pacientes sin positividad inmunohistoquímica para SOX2.

5.3.3 Relación de la expresión del resto de proteínas con las variables clínico-patológicas

Al estudiar no solamente el porcentaje de muestras con sobreexpresión proteica del resto de variables IHQ sino también su relación con las variables clínico-patológicas, solamente encontramos dos asociaciones significativas: en el caso de los tumores de hipofaringe aparece relación estadísticamente significativa entre la expresión nuclear de B-catenina y los estadios de la enfermedad ($p=0.02$); por otra parte, en los tumores nasosinusales la tinción negativa de p53 era más frecuente en tumores pobremente diferenciados ($p=0.011$). En ninguna de las tres localizaciones apareció relación entre las oncoproteínas estudiadas y la supervivencia.

5.3.4 Relación de la expresión de SOX2 con el resto de variables IHQ

5.3.4.1 Tumores de hipofaringe

Variable		n	Expresión de SOX2		p
			Débil	Fuerte	
p53	Negativo	33	5	9	0.854
	Positivo	67	10	15	
cMyc	Negativo	39	4	10	0.599
	Positivo	63	11	14	
B-catenina (membrana)	Negativo	16	1	0	0.013
	Positivo	85	14	24	
B-catenina (núcleo)	Negativo	96	14	21	0.107
	Positivo	5	1	3	

Tabla 13: Relación de SOX2 con el resto de variables IHQ

En este caso decidimos estudiar no únicamente la relación entre las oncoproteínas estudiadas (p53, cMyc, B-catenina) con la positividad o negatividad de SOX2, sino también la relación que presentaban con la intensidad de la tinción de SOX2

en aquellos casos en que fuera positiva. Únicamente la presencia de B-catenina en membrana presentó una relación estadísticamente significativa con la expresión de SOX2, tanto si analizamos la expresión global de SOX2 ($p=0.004$) como si subclasificamos en expresión negativa, débil o intensa ($p=0.013$) (tabla 13).

Cabe destacar que esta asociación entre B-catenina y SOX2 no tiene implicaciones pronósticas, ni tampoco tiene correlación significativa con las variables clínico-patológicas de nuestro estudio.

5.3.4.2 Tumores de senos paranasales

En el caso de los carcinomas epidermoides nasosinusales, no se encontró relación estadísticamente significativa entre la expresión proteica de SOX2 y el resto de variables inmunohistoquímicas estudiadas (p53, cMyc y B-catenina en membrana). Sin embargo, sí que apareció una relación significativa entre la expresión de SOX2 y la expresión de B-catenina en el núcleo celular

Los resultados obtenidos, así como el grado de significación, se muestran en la tabla 14.

Variable		n	Expresión de SOX2		p
			Débil	Fuerte	
p53	Negativo	20	1	1	0.630
	Positivo	31	1	4	
cMyc	Negativo	21	0	2	0.478
	Positivo	30	2	3	
B-catenina (membrana)	Negativo	8	0	0	0.470
	Positivo	43	2	5	
B-catenina (núcleo)	Negativo	50	1	5	<0.001
	Positivo	1	1	0	

Tabla 14: Relación entre la expresión de SOX2 y el resto de variables inmunohistoquímicas

5.3.4.3 Tumores laríngeos

Se estudió la relación entre la intensidad de la expresión proteica de SOX2 con el resto de variables inmunohistoquímicas: p53, B-catenina y cMyc; en aquellos casos en los que ambas tinciones resultaron aptas para su análisis.

La tabla 13 muestra los resultados que se obtuvieron de dicho análisis. Al igual que ocurrió en las otras series de pacientes, ni p53 ni cMyc presentaron una relación significativa con la expresión de SOX2. No alcanzó tampoco significación estadística la expresión positiva de B-catenina, aunque en este caso el valor de p fue notablemente más próximo a la significación necesaria.

Variable		n	Expresión de SOX2		p
			Débil	Fuerte	
p53	Negativo	23	7	6	0.305
	Positivo	36	7	10	
cMyc	Negativo	37	5	8	0.428
	Positivo	30	7	8	
B-catenina (membrana)	Negativo	11	2	0	0.073
	Positivo	51	10	16	
B-catenina (núcleo)	Negativo	59	11	16	0.545
	Positivo	3	1	0	

Tabla 15: Relación de la expresión de SOX2 con el resto de variables en IHQ

5.3.4.4 Total de los casos

Dado que el estudio de las rutas de señalización y factores genéticos no suele tener relación con la localización tumoral, se estudió de modo global la relación entre la expresión de SOX2 con el resto de variables inmunohistoquímicas, presentándose los resultados en la tabla 16.

En dicha tabla cabe destacar que aparece una relación estadísticamente significativa entre la expresión fuerte de SOX2 con la de B-catenina en membrana, relación que ya objetivamos previamente en el caso de los tumores de hipofaringe. Asimismo, aunque sin encontrar relación estadísticamente significativa, sí se aproxima a dicha significación la relación de SOX2 con la expresión de B-catenina nuclear.

Variable		n	Expresión de SOX2		p
			Débil	Fuerte	
<i>p53</i>	Negativo	76	13	15	0.577
	Positivo	134	16	29	
<i>cMyc</i>	Negativo	97	9	20	0.305
	Positivo	123	20	25	
<i>B-catenina</i> (membrana)	Negativo	35	3	0	0.001
	Positivo	179	26	45	
<i>B-catenina</i> (núcleo)	Negativo	205	26	42	0.088
	Positivo	3	3	3	

Tabla 16: Relación de la expresión de SOX2 con el resto de variables en IHQ

5.4 Relación entre la ganancia/amplificación génica y la sobreexpresión de la proteína SOX2

Para determinar si el mecanismo responsable de la sobre-expresión de SOX2 en los carcinomas de hipofaringey nasosinusales era la amplificación de su gen, se compararon los resultados obtenidos del análisis génico de SOX2 mediante FISH con los datos obtenidos de la expresión proteica mediante IHQ. Para realizar dicha comparación se seleccionaron los casos con resultados válidos para ambas pruebas, siendo 87 casos en total (55 de hipofaringe y 32 de senos paranasales).

Después de analizar los datos obtenidos del estudio IHQ y del estudio génico, los resultados revelan que existe una correlación entre la expresión proteica de SOX2 y la ganancia del gen SOX2 ($p=0,005$). Solamente 8 de los casos con tinción positiva no presentaban alteraciones génicas, en tanto que 21 de los 50 casos con ganancia del gen (42%) presentaban sobreexpresión, siendo ésta fuerte en la mayor parte de los casos (Tabla 17).

<u>Expresión de SOX2 (IHO)</u>	<u>Número de copias del gen</u>		Total
	<i>No ganancia</i>	<i>Ganancia</i>	
Negativa	29	29	58
Expresión débil	6	4	10
Expresión fuerte	2	17	19
Total	37	50	87

Tabla 17. Comparación entre la expresión de la proteína SOX2 y los niveles de la ganancia génica.

6. Discusión

6.1 Justificación

Los CECC son la sexta neoplasia más frecuente en el mundo, localizándose en su mayoría en cavidad oral o laringe. El retraso en el diagnóstico (por manifestaciones clínicas tardías) y la tendencia a la recidiva precoz suelen hacer su tratamiento desalentador, con secuelas físicas y psicológicas para la mayor parte de los pacientes. A pesar de que en las últimas décadas se han realizado importantes esfuerzos por conocer la enfermedad y en introducir nuevas orientaciones terapéuticas (técnicas quirúrgicas, modalidades de RT, protocolos de QT) la alta morbimortalidad que generan hace nos planteemos desarrollar nuevos métodos diagnósticos, pronósticos y terapéuticos basados en la biología molecular.

Hasta la fecha se han realizado varios estudios acerca de la importancia de SOX2 en los carcinomas escamosos, sin embargo cabe destacar la escasa cantidad de publicaciones acerca de su papel en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello, siendo prácticamente inexistente en los tumores faringolaríngeos o nasosinuales. El presente estudio pretende contribuir al conocimiento acerca de la biología molecular de este tipo de tumores para mejor comprensión de su comportamiento.

Refiriéndonos ya de forma concreta al propio trabajo, podemos decir que el número de pacientes estudiados, constituye una de las mayores series publicadas en la literatura en las tres localizaciones tumorales.

6.2 Aspectos clínico-patológicos

El estudio de estas variables clínico-patológicas en un número limitado de carcinomas de cabeza y cuello no pretende establecer resultados de tipo epidemiológico, sino definir la muestra estudiada y comprobar que se ajusta a las características descritas para estos tumores en series más amplias.

Las variables epidemiológicas, clínicas y patológicas estudiadas en los 220 pacientes concuerdan, en general, con los rasgos descritos en otras series de casos previamente publicadas [2, 3, 5, 6].

Así, la mayor parte de los pacientes diagnosticados con cáncer de faringe o laringe eran varones en la quinta y sexta décadas de la vida, siendo en su mayoría

consumidores habituales de tabaco y alcohol. El grado de diferenciación histológica predominante era moderado. En el caso de los pacientes con carcinoma sinusal había un mayor porcentaje de mujeres diagnosticadas de esta patología (aunque fue igualmente más frecuente en el sexo masculino), y en la mayor parte de los casos se trataba de tumores pobremente diferenciados.

Otro de los rasgos clínicos encontrados, que también ha sido previamente reseñado [3, 6, 65, 154], es que la mayoría de los casos se diagnostican en estadios avanzados, apareciendo esta característica en las tres localizaciones estudiadas. El hecho de realizar diagnósticos con la enfermedad avanzada ha condicionado que, en nuestra serie, la mayor parte de los pacientes recibiese radioterapia postoperatoria. Aunque nuestro estudio no muestra que la radioterapia postoperatoria aumente la supervivencia de forma significativa se debe tener en cuenta que nuestros resultados podrían estar sesgados, ya que los casos con estadios más avanzados son aquellos donde con más frecuencia se indica dicho tratamiento.

La supervivencia en general, quizás por razones de sesgo de la muestra, es inferior a las series específicas. La supervivencia específica de los pacientes de nuestra muestra en el caso de los carcinomas de hipofaringe fue del 24.6% a los 5 años de seguimiento, similar a la publicada en otras series [3, 65, 155, 156]. En el caso de los tumores nasosinusales la supervivencia a los cinco años fue del 19%, inferior por tanto a la reseñada en otras series [6, 10]; esto mismo ocurrió en el caso del cáncer de laringe, en el que nuestro ratio de supervivencia (56% a los 5 años) es inferior al de otras series reseñadas (en torno al 65% a los 5 años) [2].

La mayor parte de los pacientes presentaron recidivas locorregionales de forma precoz, que son la causa principal de muerte, siendo el desarrollo de metástasis a distancia un hecho bastante frecuente (39% en el caso de los pacientes con cáncer de hipofaringe), dato que también coincide con lo publicado [51, 154-156].

En el grupo de pacientes con neoplasias situadas en el hipofaringe, observamos algunas tendencias que relacionan a los pacientes con tumores de mayor tamaño (T3 y T4) y avanzada afectación ganglionar al diagnóstico (N2 y 3) con una peor supervivencia, aunque sin alcanzar significación estadística en ninguno de estos

aspectos. Otros autores sí encuentran significativos estos datos al presentar series más amplias [156]. En nuestra serie cabe destacar que, al igual que los citados autores, la clasificación N parece estar más en relación con el pronóstico que la clasificación T, si bien como ya se ha reseñado ninguna de las dos alcanza significación estadística. Esto mismo ocurrió para los pacientes con tumores situados en los senos paranasales. Sin embargo, en el grupo con tumores localizados en laringe el estadio tumoral, las clasificaciones T y N, y el grado de diferenciación histológica sí guardaron relación con la supervivencia, de manera que era mayor en aquellos pacientes en estadios, T y N iniciales, así como en aquellos pacientes con tumores bien y moderadamente diferenciados.

Por todo anteriormente expuesto consideramos que nuestra serie es representativa de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello, ya que las variables estudiadas se ajustan, en líneas generales, a lo esperado y exhiben las tendencias habituales en estos tumores.

6.3 Aspectos genéticos

6.3.1 SOX2

Los factores de transcripción de la familia *SOX* (y en especial *SOX2*), además de su ya conocido papel en la embriogénesis, han sido implicados en la progresión tumoral y en el pronóstico de una gran variedad de carcinomas humanos, como los del tracto gastrointestinal [143, 147], páncreas [134], mama [101, 137], pulmón [142-146], próstata [138, 157] y de cabeza y cuello [5, 117, 124, 149-151].

Este papel en la oncogénesis se atribuye a su implicación en la aparición y mantenimiento de las Cancer Stem Cells [142, 143], si bien los mecanismos aún no son del todo conocidos. Se ha demostrado su expresión en carcinomas epidermoides de los órganos derivados del intestino anterior embrionario, si bien apenas existen estudios en carcinoma epidermoide de cabeza y cuello.

Con el fin de aportar mayor conocimiento de la acción de este gen en la carcinogénesis y progresión de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello, además de explorar sus posibilidades como marcadores pronósticos y terapéuticos, realizamos estudios de amplificación génica y de expresión proteica en muestras de

esos tumores. Las localizaciones que escogimos para nuestro estudio fueron tres: hipofaringe, laringe y tracto nasosinusal, siendo nuestro objetivo establecer diferencias entre las mismas que pudiesen condicionar los cambios de comportamiento clínico y pronóstico que de forma clásica se describen en dichas localizaciones.

El estudio génico mediante FISH de *SOX2* trató de demostrar la existencia de la ganancia/amplificación del gen que justificara el aumento de su expresión (tabla 17). Esta ganancia se observó en 32 casos de los 55 casos localizados en hipofaringe (60%), 14 de los cuales mostraron amplificación. Además, en 14 casos en los que se observó ganancia/amplificación de *SOX2*, la proteína estaba además sobre-expresada, mostrando globalmente una concordancia del 44%. Esto parece significar que, además de la ganancia génica, podría existir otra/s ruta/s mediante la cual se exprese la proteína *SOX2* sin origen o causa génica. En el caso de los tumores nasosinuales, 16 casos (50%) mostraron ganancia, y de estos casos, 6 mostraron expresión proteica. En esta localización cabe destacar que en ningún caso la proteína se expresó sin que hubiese ganancia o amplificación de la función de *SOX2*, lo cual parece indicar la ausencia de otras rutas que produzcan expresión proteica. Si lo comparamos otros estudios, aparece un porcentaje de ganancia similar al descrito en cavidad oral (52%) [149]. Motivos técnicos impidieron la realización de la FISH en tumores de laringe, sin embargo y dados los resultados obtenidos en hipofaringe y la proximidad de ambas localizaciones, sería interesante en un futuro realizar esta técnica en pacientes con tumores localizados en la laringe.

La ganancia de *SOX2* no se relacionó significativamente con ninguna de las variables clínico-patológicas estudiadas, aunque sí se observó mayor ganancia/amplificación del gen en aquellos casos que correspondían a estadios precoces de la enfermedad, tanto globalmente como en las clasificaciones T y N. Esto ocurrió tanto para la localización nasosinusal como en hipofaringe.

En nuestro estudio los pacientes con ganancia/amplificación de *SOX2* tuvieron una supervivencia más elevada a corto-medio plazo que aquellos pacientes con función normal del gen. Estos datos también coinciden con los publicados en los carcinomas epidermoides de pulmón [144, 146].

Asimismo estudiamos la expresión de SOX2 en las tres localizaciones, observando su sobre-expresión en el 38% (39 de 102 casos) de los tumores de hipofaringe, cifra inferior a la publicada donde se llega al 78% de los casos [117]. En los tumores de hipofaringe no existen estudios concluyentes acerca de la participación de la expresión de SOX2 en la carcinogénesis y sólo el trabajo de *Ge et al.* demostró su sobre-expresión en una serie de 85 pacientes [117], aunque la expresión no se correlacionaba con ninguna característica clínica ni patológica. Sin embargo, aquellos pacientes en los que se asociaba la sobreexpresión de SOX2 con la de Oct4 presentaban mejor supervivencia específica de la enfermedad.

En nuestro caso, además, se relacionó la expresión de SOX2 con la de B-catenina, aunque esta relación no demostró ninguna implicación pronóstica.

En el caso de los tumores nasosinuales la sobre-expresión apareció en el 14% de los casos (7 de 51 casos válidos para el análisis), sin que tampoco apareciese ninguna asociación con las variables clínico-patológicas, al contrario que ocurre en el análisis realizado por el grupo de Schrock [152], en el que aparecía relación con mayor número de recurrencias. Sin embargo, cabe destacar de esta publicación tanto el elevado número de casos estudiados (119 casos, de los que 59 eran tumores epidermoides) como la heterogeneidad de los grupos estudiados (neoplasias escamosas, indiferenciadas, carcinoma adenoide-quístico y tumores procedentes de papilomas invertidos malignizados), todo ello hace necesario diseñar estudios más homogéneos para poder obtener conclusiones válidas.

El grado de sobreexpresión de SOX2 fue del 42% (28 de 67 casos estudiados) en el grupo de pacientes con neoplasias laríngeas, apareciendo significación estadística al analizar la relación entre la expresión proteica y el grado de diferenciación tumoral: en aquellos tumores con diferenciación moderada o pobre SOX2 apareció más frecuentemente sobreexpresado. En los resultados de un reciente estudio [158] se constató una sobreexpresión proteica hasta en el 55% de los casos, así como relación con diversas variables clínico-patológicas (clasificaciones T y N, estadio clínico y riesgo de recidiva), que conllevaban una implicación pronóstica de SOX2, siendo la sobreexpresión proteica de SOX2 un factor de mal pronóstico en carcinoma laríngeo. A diferencia de esta publicación, nuestro número de casos estudiados es algo menor, por

lo que sería recomendable en un futuro analizar muestras procedentes de un mayor número de pacientes para poder extraer conclusiones más sólidas.

Cuando hemos estudiado en conjunto las tres localizaciones, cabe destacar que se estableció una relación significativa con dos factores: uno de ellos era la diferenciación histológica ($p=0.034$), predominando la sobreexpresión de SOX2 con aquellos tumores con diferenciación histológica pobre y moderada. El otro era la clasificación ganglionar ($p=0.023$), de tal modo que se objetivó que a mayor clasificación N, mayor sobreexpresión proteica (25% en N0-1 vs 39% en N2-3). No se estudió de forma global la supervivencia por corresponder a tres localizaciones tumorales que presentan índices de supervivencia a 5 años muy diferentes, tanto por la localización tumoral como por los factores etiológicos implicados.

Nuestros datos asimismo contrastan con los obtenidos en la expresión proteica en cavidad oral. Por un lado, el estudio de Freier atribuye una sobreexpresión del 18% [149], en tanto que el grupo de Du han observado, en esta misma localización una sobreexpresión en el 62.2% de los casos [151]. Sin embargo, al no haber estudiado dicha localización y ser sus factores de riesgo diferentes en las diversas poblaciones (por ejemplo, por la creciente influencia del papilomavirus humano), estos datos no son comparables a los obtenidos en nuestra serie.

Al analizar el conjunto de datos clínico-patológicos con los génicos e inmunohistoquímicos vemos que, pese a haber un cierto grado de amplificación génica y sobreexpresión proteica en un número significativo de pacientes en las tres localizaciones, esto no se deriva en cambios en el desarrollo y pronóstico de la enfermedad, lo cual puede hacernos suponer que, al menos en nuestro grupo de pacientes, la expresión proteica de SOX2 no juega un papel significativo en la carcinogénesis.

Comparando nuestros datos con los de los escasos estudios realizados hasta el momento en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello, comprobamos que las conclusiones obtenidas por diferentes autores acerca del valor pronóstico de la sobreexpresión de SOX2 son diversas. Mientras algunos autores concluyen que la expresión de SOX2 no se relaciona con las variables clínico-patológicas clásicas, pero sí

empobrece el pronóstico en un determinado subgrupo de pacientes [151], otros sí la correlacionan con un buen pronóstico, siempre y cuando se sobreexpresen junto con Oct4 [117]. Estos datos contradictorios hacen necesarios más estudios para intentar aclarar el papel definitivo de la expresión de SOX2 en la biología molecular de estos tumores.

Nuestro grupo de pacientes por su manejo terapéutico habitual no eran subsidiarios de tratamiento con quimio o radioterapia, al contrario que ocurre en la mayor parte de estudios realizados en otras localizaciones, como en pulmón. Dada la existencia de un estudio en el que se describió un descenso en la expresión de SOX2 en pacientes con glioblastoma tratados con sorafenib [139], quizás futuros estudios deberían centrarse en grupos de pacientes no solo primarios, sino recidivas en pacientes tratados con quimioterapia o agentes biológicos.

6.3.2 Resto de variables inmunohistoquímicas

6.3.2.1 Tumores de hipofaringe

De todas las oncoproteínas estudiadas, la más sobreexpresada en nuestra serie de pacientes fue B-catenina en membrana citoplasmática, que llegó a ser positiva en el 84% de los casos (86 casos de 102), en tanto que la expresión nuclear de la misma proteína fue del 5%, una cifra notablemente inferior al 23% que refiere el grupo de Pukkila [91], y sin que la expresión en una u otra localización se relacionen con cambios en la supervivencia, a diferencia de otros estudios ya publicados acerca de esta misma proteína en carcinomas de cabeza y cuello [91, 159]. Únicamente la expresión de B-catenina en el núcleo tuvo relación significativa con estadios iniciales de la enfermedad ($p=0.02$), sin embargo y por ser muy bajo el porcentaje de casos con tinción nuclear positiva este dato debe ser interpretado con cautela.

Myc y p53 se sobreexpresaron también de forma importante, siendo sus porcentajes del 63 y el 67%, respectivamente. Contrariamente a lo previamente publicado [85, 160], tampoco la expresión de ninguna de las dos proteínas presentó relación alguna con la supervivencia global o el tiempo libre de enfermedad, así como tampoco con ninguna de las variables clínico-patológicas.

6.3.2.2 Tumores nasosinusales

En el caso de los tumores nasosinusales nuevamente aparece una importante sobreexpresión de B-catenina en membrana, que se determinó en un 82% de los casos, a diferencia de la expresión nuclear, que solamente apareció en aproximadamente un 5% de los mismos. En la literatura la mayor parte de referencias se asocian a los adenocarcinomas nasosinusales (en los que aparece tinción nuclear hasta en un 30% de los casos) [161] sin que haya apenas referencias en carcinoma epidermoide. Sin embargo sí se ha asociado una menor expresión de B-catenina en membrana en papilomas invertidos con evolución a carcinoma escamoso [162].

p53, por su parte, apareció sobreexpresado en un 60% de los casos, siendo este dato concordante con otras series publicadas [97] aunque, a diferencia de las mismas, dicha sobreexpresión no planteó implicaciones pronósticas. Sin embargo, sí encontramos una asociación positiva entre el grado de diferenciación tumoral y la expresión de p53, de modo que a mayor desdiferenciación apareció mayor expresión proteica.

cMyc apareció sobreexpresado en un 45% de los casos, sin que haya series en la literatura con las que comparar dicha tasa de expresión proteica en esta sublocalización.

6.3.2.3 Tumores laríngeos

Del mismo modo que en nuestras otras series de casos, la proteína más comúnmente sobreexpresada fue la B-catenina en membrana, teniendo la B-catenina nuclear una mínima tasa de expresión (2%, únicamente uno de los casos estudiados). Aunque en nuestra serie no encontramos implicaciones pronósticas, sí se ha descrito que, en el caso de los tumores laríngeos la expresión de p53 y B-catenina se asocia a peor pronóstico [163]. Se ha intentado estudiar la relación entre la localización tumoral y el grado de expresión nuclear y membranosa de B-catenina, encontrándose que la expresión en membrana es más frecuente en tumores glóticos, y la expresión conjunta en supraglóticos [164, 165]. Las tasas de sobreexpresión de dicha proteína en nuestro estudio coinciden, por lo general, con las series publicadas [164].

Tanto cMyc como p53 tuvieron una tasa de sobreexpresión en torno al 60% tasa que para p53 se asemeja a las previamente publicadas [166-168]. En el análisis conjunto de dicha sobreexpresión y las variables clínico-patológicas no se halló relación entre la expresión de p53 con ninguna de las mismas, sin embargo, diversas series publicadas recientemente han llegado a esta misma conclusión [169-171]. Del mismo modo, nuestros resultados en torno a expresión y valor pronóstico de c-myc en cáncer laríngeo son comparables a los de otros estudios [172, 173].

6.3.3 Relación de la expresión de SOX2 con el resto de variables inmunohistoquímicas

En nuestro grupo de pacientes únicamente la expresión en membrana de B-catenina apareció relacionada de modo significativo con la expresión nuclear de SOX2 ($p=0.001$), especialmente con aquellas muestras en las que había expresión fuerte de la misma. Esta misma relación apareció en un análisis por subgrupos en tumores de hipofaringe ($p=0.013$) y alcanzó valores próximos a la significación en tumores laríngeos ($p=0.073$).

En el caso de los tumores de senos paranasales, fue con la B-catenina nuclear y no de membrana con la que apareció relación estadística ($p<0.001$), sin que la hubiera en el resto de localizaciones ni tampoco en el análisis global.

Sin embargo, y pese a presentar estas asociaciones, ninguna de ellas tuvo relevancia en cuanto a pronóstico en nuestro grupo de pacientes, ni una explicación carcinogénica clara.

6.4 SOX2 como diana terapéutica

Aunque el uso de fármacos que inhiban la función de SOX2 ya se ha sugerido tanto en el glioblastoma [139] como en el cáncer de pulmón [174], la heterogeneidad en las conclusiones de los estudios realizados hasta la fecha no permite establecer claramente el papel de SOX2 en la oncogénesis, motivo por el cual existe un bajo número de estudios publicados acerca del uso de fármacos antineoplásicos que inhiban la función de dicho gen [139, 175].

Las conclusiones extraídas de nuestro grupo de casos no permiten tampoco conocer el papel exacto de *SOX2* en la aparición y desarrollo tumoral, aunque al analizar los datos, ni el gen ni la proteína parecen jugar un papel fundamental en la oncogénesis. Por este motivo, por el momento *SOX2* no parece ser una diana terapéutica destacada en casos de tumores epidermoides de cabeza y cuello.

7. Conclusiones

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

1. Los pacientes de nuestra serie con carcinoma escamoso de hipofaringe, laringe y nasosinusal tenían unas características clínico-patológicas similares a las descritas en la literatura
2. Los carcinomas epidermoides de nuestra serie presentaron una ganancia o amplificación del gen *SOX2* en el 60% de los casos de tumores de hipofaringe y en el 30% de los casos de tumores de senos paranasales.
3. La sobreexpresión de la proteína *SOX2* se demostró en el 38% de nuestra muestra de pacientes con tumores localizados en hipofaringe, en el 14% de los tumores nasosinuales y en el 42% de los pacientes con neoplasias laríngeas.
4. La ganancia o amplificación de *SOX2* se relaciona significativamente con la sobreexpresión de la proteína.
5. En nuestro grupo de pacientes ni la ganancia o amplificación de *SOX2*, así como la expresión proteica, guardaron relación con las variables clínico-patológicas ni el curso clínico de la enfermedad, con la única excepción de los tumores laríngeos, en los que se apreció una relación significativa entre la expresión de *SOX2* y el grado de diferenciación tumoral (pobre).
6. Nuestros resultados en cuanto al resto de las variables inmunohistoquímicas estudiadas (*p53*, *c-myc*, *B-catenina*) son comparables al resto de estudios publicados sin que aparezca relación con las variables clínicas ni el pronóstico.
7. De entre el resto de proteínas estudiadas, únicamente apareció relación entre la expresión de *SOX2* y la de β -*catenina* en membrana, tanto en tumores hipofaríngeos como al tomar las tres localizaciones en conjunto. Esta coexpresión tampoco mostró implicaciones pronósticas.

8. Proyecto futuro

Como ya se indicó en las bases previas, esta tesis doctoral es el producto de una línea de investigación iniciada por nuestro grupo en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello. Sin embargo, la línea de investigación lógicamente no se termina aquí, siendo este trabajo una etapa más que ha sido cubierta.

El paso siguiente en futuras investigaciones, ya que parece no tener un papel claro en el pronóstico de los carcinomas primarios, podría ser el estudio de la expresión génica y proteica en aquellos pacientes que han recidivado tras tratamientos con quimio y radioterapia. Quizás genes relacionados con la desdiferenciación puedan tener algún papel en la quimio y radioresistencia.

Por último, se ha de señalar que en los últimos años se ha dado un importante papel a las células madre pluripotentes en la oncogénesis y el desarrollo de metástasis a distancia, publicándose gran cantidad de artículos a este respecto. La comprensión del papel que juegan estas células pasa asimismo por el estudio exhaustivo del papel que juegan los factores de transcripción que inducen la desdiferenciación, entre los que se encuentran SOX2, Oct4 y Nanog. Es por tanto obligado, aunque complejo, incorporar a nuestra línea de trabajo el estudio de las *cancer stem cells* y los diversos factores que las inducen, tanto mediante el uso de modelos experimentales *in vitro* (líneas celulares) como *in vivo* (modelos animales).

9. Bibliografía

1. Tysnes BB: **Tumor-initiating and -propagating cells: cells that we would like to identify and control.** *Neoplasia* 2010, **12**(7):506-515.
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM: **Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008.** *International journal of cancer Journal internationale du cancer* 2010, **127**(12):2893-2917.
3. Popescu CR, Bertesteanu SV, Mirea D, Grigore R, Ionescu D, Popescu B: **The epidemiology of hypopharynx and cervical esophagus cancer.** *Journal of medicine and life* 2010, **3**(4):396-401.
4. Rhys Evans PH, Montgomery PQ, Gullane PJ: **Principles and practice of head and neck oncology.** London: Dunitz; 2003.
5. Uzcudun AE, Bravo Fernandez P, Sanchez JJ, Garcia Grande A, Rabanal Retolaza I, Gonzalez Baron M, Gavilan Bouzas J: **Clinical features of pharyngeal cancer: a retrospective study of 258 consecutive patients.** *The Journal of laryngology and otology* 2001, **115**(2):112-118.
6. Dulguerov P, Jacobsen MS, Allal AS, Lehmann W, Calcaterra T: **Nasal and paranasal sinus carcinoma: are we making progress? A series of 220 patients and a systematic review.** *Cancer* 2001, **92**(12):3012-3029.
7. Nunez F, Suarez C, Alvarez I, Losa JL, Barthe P, Fresno M: **Sino-nasal adenocarcinoma: epidemiological and clinico-pathological study of 34 cases.** *The Journal of otolaryngology* 1993, **22**(2):86-90.
8. Gras Cabrerizo JR, Sarandeses Garcia A, Montserrat IGJR, Orus Dotu C: **[Revision of carcinomas in paranasal sinuses].** *Acta otorrinolaringologica espanola* 2007, **58**(6):266-275.
9. Giri SP, Reddy EK, Gemer LS, Krishnan L, Smalley SR, Evans RG: **Management of advanced squamous cell carcinomas of the maxillary sinus.** *Cancer* 1992, **69**(3):657-661.
10. Alvarez I, Suarez C, Rodrigo JP, Nunez F, Caminero MJ: **Prognostic factors in paranasal sinus cancer.** *American journal of otolaryngology* 1995, **16**(2):109-114.
11. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ: **Cancer statistics, 2009.** *CA: a cancer journal for clinicians* 2009, **59**(4):225-249.
12. Lopez-Abente G, Pollan M, Aragonés N, Perez Gomez B, Hernandez Barrera V, Lope V, Suarez B: **[State of cancer in Spain: incidence].** *Anales del sistema sanitario de Navarra* 2004, **27**(2):165-173.
13. Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W *et al*: **Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization.** *Cancer research* 1996, **56**(11):2488-2492.
14. Turati F, Garavello W, Tramacere I, Bagnardi V, Rota M, Scotti L, Islami F, Corrao G, Boffetta P, La Vecchia C *et al*: **A meta-analysis of alcohol drinking and oral and pharyngeal cancers. Part 2: results by subsites.** *Oral Oncol* 2010, **46**(10):720-726.
15. Doll R, Peto R, Boreham J, Sutherland I: **Mortality from cancer in relation to smoking: 50 years observations on British doctors.** *Br J Cancer* 2005, **92**(3):426-429.

16. Talamini R, Franceschi S, Barra S, La Vecchia C: **The role of alcohol in oral and pharyngeal cancer in non-smokers, and of tobacco in non-drinkers.** *International journal of cancer Journal internationale du cancer* 1990, **46**(3):391-393.
17. Institute of Medicine (U.S.). Committee on Asbestos: Selected Health Effects., Institute of Medicine (U.S.). Board on Population Health and Public Health Practice.: **Asbestos : selected cancers.** Washington, D.C.: National Academies Press; 2006.
18. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF, Jr.: **Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer.** *Cancer research* 1988, **48**(11):3282-3287.
19. Bosetti C, Negri E, Franceschi S, Conti E, Levi F, Tomei F, La Vecchia C: **Risk factors for oral and pharyngeal cancer in women: a study from Italy and Switzerland.** *Br J Cancer* 2000, **82**(1):204-207.
20. Franceschi S, Levi F, Dal Maso L, Talamini R, Conti E, Negri E, La Vecchia C: **Cessation of alcohol drinking and risk of cancer of the oral cavity and pharynx.** *International journal of cancer Journal internationale du cancer* 2000, **85**(6):787-790.
21. Marchand JL, Luce D, Leclerc A, Goldberg P, Orłowski E, Bugel I, Brugere J: **Laryngeal and hypopharyngeal cancer and occupational exposure to asbestos and man-made vitreous fibers: results of a case-control study.** *Am J Ind Med* 2000, **37**(6):581-589.
22. Laforest L, Luce D, Goldberg P, Begin D, Gerin M, Demers PA, Brugere J, Leclerc A: **Laryngeal and hypopharyngeal cancers and occupational exposure to formaldehyde and various dusts: a case-control study in France.** *Occup Environ Med* 2000, **57**(11):767-773.
23. Berrino F, Richiardi L, Boffetta P, Esteve J, Belletti I, Raymond L, Troschel L, Pisani P, Zubiri L, Ascunce N *et al*: **Occupation and larynx and hypopharynx cancer: a job-exposure matrix approach in an international case-control study in France, Italy, Spain and Switzerland.** *Cancer Causes Control* 2003, **14**(3):213-223.
24. Boffetta P, Richiardi L, Berrino F, Esteve J, Pisani P, Crosignani P, Raymond L, Zubiri L, Del Moral A, Lehmann W *et al*: **Occupation and larynx and hypopharynx cancer: an international case-control study in France, Italy, Spain, and Switzerland.** *Cancer Causes Control* 2003, **14**(3):203-212.
25. Tyan YS, Liu ST, Ong WR, Chen ML, Shu CH, Chang YS: **Detection of Epstein-Barr virus and human papillomavirus in head and neck tumors.** *J Clin Microbiol* 1993, **31**(1):53-56.
26. Clayman GL, Stewart MG, Weber RS, el-Naggar AK, Grimm EA: **Human papillomavirus in laryngeal and hypopharyngeal carcinomas. Relationship to survival.** *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994, **120**(7):743-748.
27. Wolf J, Schmezer P, Fengel D, Schroeder HG, Scheithauer H, Woeste P: **The role of combination effects on the etiology of malignant nasal tumours in the wood-working industry.** *Acta oto-laryngologica Supplementum* 1998, **535**:1-16.

28. Demers PA, Kogevinas M, Boffetta P, Leclerc A, Luce D, Gerin M, Battista G, Belli S, Bolm-Audorf U, Brinton LA *et al*: **Wood dust and sino-nasal cancer: pooled reanalysis of twelve case-control studies**. *Am J Ind Med* 1995, **28**(2):151-166.
29. Gotte K, Hormann K: **Sinonasal malignancy: what's new?***ORL; journal for oto-rhino-laryngology and its related specialties* 2004, **66**(2):85-97.
30. Luce D, Leclerc A, Begin D, Demers PA, Gerin M, Orłowski E, Kogevinas M, Belli S, Bugel I, Bolm-Audorff U *et al*: **Sinonasal cancer and occupational exposures: a pooled analysis of 12 case-control studies**. *Cancer Causes Control* 2002, **13**(2):147-157.
31. Holt GR: **Sinonasal neoplasms and inhaled air toxics**. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 1994, **111**(1):12-14.
32. Kenady DE: **Cancer of the paranasal sinuses**. *The Surgical clinics of North America* 1986, **66**(1):119-131.
33. t Mannetje A, Kogevinas M, Luce D, Demers PA, Begin D, Bolm-Audorff U, Comba P, Gerin M, Hardell L, Hayes RB *et al*: **Sinonasal cancer, occupation, and tobacco smoking in European women and men**. *Am J Ind Med* 1999, **36**(1):101-107.
34. Zheng W, McLaughlin JK, Chow WH, Chien HT, Blot WJ: **Risk factors for cancers of the nasal cavity and paranasal sinuses among white men in the United States**. *American journal of epidemiology* 1993, **138**(11):965-972.
35. Weber RS, Shillitoe EJ, Robbins KT, Luna MA, Batsakis JG, Donovan DT, Adler-Storthz K: **Prevalence of human papillomavirus in inverted nasal papillomas**. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1988, **114**(1):23-26.
36. Yamaguchi KT, Shapshay SM, Incze JS, Vaughan CW, Strong MS: **Inverted papilloma and squamous cell carcinoma**. *The Journal of otolaryngology* 1979, **8**(2):171-178.
37. Brandwein M, Steinberg B, Thung S, Biller H, Dilorenzo T, Galli R: **Human papillomavirus 6/11 and 16/18 in Schneiderian inverted papillomas. In situ hybridization with human papillomavirus RNA probes**. *Cancer* 1989, **63**(9):1708-1713.
38. Batsakis JG, Suarez P: **Schneiderian papillomas and carcinomas: a review**. *Advances in anatomic pathology* 2001, **8**(2):53-64.
39. Alos L, Moyano S, Nadal A, Alobid I, Blanch JL, Ayala E, Lloveras B, Quint W, Cardesa A, Ordi J: **Human papillomaviruses are identified in a subgroup of sinonasal squamous cell carcinomas with favorable outcome**. *Cancer* 2009, **115**(12):2701-2709.
40. Leung SY, Yuen ST, Chung LP, Kwong WK, Wong MP, Chan SY: **Epstein-Barr virus is present in a wide histological spectrum of sinonasal carcinomas**. *The American journal of surgical pathology* 1995, **19**(9):994-1001.
41. Dunn ST, Clark GD, Cannon TC, Min KW: **Survey of sinonasal inverted papillomata for Epstein-Barr virus**. *Head & neck* 1997, **19**(2):98-106.
42. Morales Suarez-Varela MM, Llopis Gonzalez A, Moreno Guillem E, Martinez Selva MI, Vitoria Minana I, Gisbert V: **[Toxic habits in relation to cancer of the larynx]**. *Acta otorrinolaringologica espanola* 1997, **48**(1):45-50.

43. Hunter KD, Parkinson EK, Harrison PR: **Profiling early head and neck cancer.** *Nature reviews Cancer* 2005, **5**(2):127-135.
44. Schantz SP, Zhang ZF, Spitz MS, Sun M, Hsu TC: **Genetic susceptibility to head and neck cancer: interaction between nutrition and mutagen sensitivity.** *The Laryngoscope* 1997, **107**(6):765-781.
45. Bhattacharyya N: **Factors affecting survival in maxillary sinus cancer.** *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 2003, **61**(9):1016-1021.
46. Gras Cabrerizo JR, Orus Dotu C, Montserrat Gili JR, Fabra Llopis JM, Leon Vintro X, De Juan Beltran J: **[Epidemiologic analysis of 72 carcinomas of the nasal cavity and paranasal sinuses].** *Acta otorrinolaringologica espanola* 2006, **57**(8):359-363.
47. Tiwari R, Hardillo JA, Mehta D, Slotman B, Tobi H, Croonenburg E, van der Waal I, Snow GB: **Squamous cell carcinoma of maxillary sinus.** *Head & neck* 2000, **22**(2):164-169.
48. Le QT, Fu KK, Kaplan MJ, Terris DJ, Fee WE, Goffinet DR: **Lymph node metastasis in maxillary sinus carcinoma.** *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2000, **46**(3):541-549.
49. Kim GE, Chung EJ, Lim JJ, Keum KC, Lee SW, Cho JH, Lee CG, Choi EC: **Clinical significance of neck node metastasis in squamous cell carcinoma of the maxillary antrum.** *American journal of otolaryngology* 1999, **20**(6):383-390.
50. Nazar G, Rodrigo JP, Llorente JL, Baragano L, Suarez C: **Prognostic factors of maxillary sinus malignancies.** *American journal of rhinology* 2004, **18**(4):233-238.
51. Dulguerov P, Allal AS: **Nasal and paranasal sinus carcinoma: how can we continue to make progress?** *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery* 2006, **14**(2):67-72.
52. Quer Agustí M, Lopez Vila M: **Características clínicas de los tumores de la laringe.** In: *Tratado de Otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello. Volume IV, 2ª edn.* Edited by Suarez Nieto C, Gil-Carcedo L: Panamericana; 2008: 3515-3527.
53. Dammann F, Horger M, Mueller-Berg M, Schlemmer H, Claussen CD, Hoffman J, Eschmann S, Bares R: **Rational diagnosis of squamous cell carcinoma of the head and neck region: comparative evaluation of CT, MRI, and 18FDG PET.** *AJR Am J Roentgenol* 2005, **184**(4):1326-1331.
54. Adams S, Baum RP, Stuckensen T, Bitter K, Hor G: **Prospective comparison of 18F-FDG PET with conventional imaging modalities (CT, MRI, US) in lymph node staging of head and neck cancer.** *Eur J Nucl Med* 1998, **25**(9):1255-1260.
55. Hannah A, Scott AM, Tochon-Danguy H, Chan JG, Akhurst T, Berlangieri S, Price D, Smith GJ, Schelleman T, McKay WJ *et al*: **Evaluation of 18 F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography and computed tomography with histopathologic correlation in the initial staging of head and neck cancer.** *Ann Surg* 2002, **236**(2):208-217.

56. Goshen E, Davidson T, Yahalom R, Talmi YP, Zwas ST: **PET/CT in the evaluation of patients with squamous cell cancer of the head and neck.** *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006, **35**(4):332-336.
57. Kau RJ, Alexiou C, Laubenbacher C, Werner M, Schwaiger M, Arnold W: **Lymph node detection of head and neck squamous cell carcinomas by positron emission tomography with fluorodeoxyglucose F 18 in a routine clinical setting.** *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1999, **125**(12):1322-1328.
58. Schoder H, Yeung HW, Gonen M, Kraus D, Larson SM: **Head and neck cancer: clinical usefulness and accuracy of PET/CT image fusion.** *Radiology* 2004, **231**(1):65-72.
59. Pisharodi LR: **False-negative diagnosis in fine-needle aspirations of squamous-cell carcinoma of head and neck.** *Diagn Cytopathol* 1997, **17**(1):70-73.
60. Tandon S, Shahab R, Benton JI, Ghosh SK, Sheard J, Jones TM: **Fine-needle aspiration cytology in a regional head and neck cancer center: comparison with a systematic review and meta-analysis.** *Head & neck* 2008, **30**(9):1246-1252.
61. Edge SB, American Joint Committee on Cancer.: **AJCC cancer staging manual**, 7th edn. New York: Springer; 2010.
62. Klerer CG, Teknos TN, Islam M, Marcus B, Lee JS, Pan Q, Merajver SD: **RhoC GTPase expression as a potential marker of lymph node metastasis in squamous cell carcinomas of the head and neck.** *Clin Cancer Res* 2006, **12**(15):4485-4490.
63. Roepman P, Wessels LF, Kettelarij N, Kemmeren P, Miles AJ, Lijnzaad P, Tilanus MG, Koole R, Hordijk GJ, van der Vliet PC *et al*: **An expression profile for diagnosis of lymph node metastases from primary head and neck squamous cell carcinomas.** *Nat Genet* 2005, **37**(2):182-186.
64. Hall SF, Groome PA, Irish J, O'Sullivan B: **Radiotherapy or surgery for head and neck squamous cell cancer: establishing the baseline for hypopharyngeal carcinoma?** *Cancer* 2009, **115**(24):5711-5722.
65. Hall SF, Groome PA, Irish J, O'Sullivan B: **The natural history of patients with squamous cell carcinoma of the hypopharynx.** *The Laryngoscope* 2008, **118**(8):1362-1371.
66. **Induction chemotherapy plus radiation compared with surgery plus radiation in patients with advanced laryngeal cancer. The Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Study Group.** *N Engl J Med* 1991, **324**(24):1685-1690.
67. Becker M: **Neoplastic invasion of laryngeal cartilage: radiologic diagnosis and therapeutic implications.** *Eur J Radiol* 2000, **33**(3):216-229.
68. Worden FP, Moyer J, Lee JS, Taylor JM, Urba SG, Eisbruch A, Teknos TN, Chepeha DB, Prince ME, Hogikyan N *et al*: **Chemoselection as a strategy for organ preservation in patients with T4 laryngeal squamous cell carcinoma with cartilage invasion.** *The Laryngoscope* 2009, **119**(8):1510-1517.
69. Rodriguez CP, Adelstein DJ, Rybicki LA, Saxton JP, Lorenz RR, Wood BG, Strome M, Esclamado RM, Lavertu P, Carroll MA: **Clinical predictors of larynx preservation after multiagent concurrent chemoradiotherapy.** *Head & neck* 2008, **30**(12):1535-1542.

70. Knab BR, Salama JK, Solanki A, Stenson KM, Cohen EE, Witt ME, Haraf DJ, Vokes EE: **Functional organ preservation with definitive chemoradiotherapy for T4 laryngeal squamous cell carcinoma.** *Ann Oncol* 2008, **19**(9):1650-1654.
71. Silver CE, Beitler JJ, Shaha AR, Rinaldo A, Ferlito A: **Current trends in initial management of laryngeal cancer: the declining use of open surgery.** *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2009, **266**(9):1333-1352.
72. Chen AY, Halpern M: **Factors predictive of survival in advanced laryngeal cancer.** *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2007, **133**(12):1270-1276.
73. Lango MN: **Multimodal treatment for head and neck cancer.** *The Surgical clinics of North America* 2009, **89**(1):43-52, viii.
74. Agrawal N, Goldenberg D: **Primary and salvage total laryngectomy.** *Otolaryngol Clin North Am* 2008, **41**(4):771-780, vii.
75. Cantu G, Bimbi G, Miceli R, Mariani L, Colombo S, Riccio S, Squadrelli M, Battisti A, Pompilio M, Rossi M: **Lymph node metastases in malignant tumors of the paranasal sinuses: prognostic value and treatment.** *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2008, **134**(2):170-177.
76. Konno A, Ishikawa K, Terada N, Numata T, Nagata H, Okamoto Y: **Analysis of long-term results of our combination therapy for squamous cell cancer of the maxillary sinus.** *Acta oto-laryngologica Supplementum* 1998, **537**:57-66.
77. Nishino H, Miyata M, Morita M, Ishikawa K, Kanazawa T, Ichimura K: **Combined therapy with conservative surgery, radiotherapy, and regional chemotherapy for maxillary sinus carcinoma.** *Cancer* 2000, **89**(9):1925-1932.
78. Nibu K, Sugawara M, Asai M, Ichimura K, Mochiki M, Terahara A, Kawahara N, Asato H: **Results of multimodality therapy for squamous cell carcinoma of maxillary sinus.** *Cancer* 2002, **94**(5):1476-1482.
79. Mendenhall WM, Amdur RJ, Morris CG, Kirwan J, Malyapa RS, Vaysberg M, Werning JW, Mendenhall NP: **Carcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses.** *The Laryngoscope* 2009, **119**(5):899-906.
80. Lund VJ, Howard DJ, Wei WI, Cheesman AD: **Craniofacial resection for tumors of the nasal cavity and paranasal sinuses--a 17-year experience.** *Head & neck* 1998, **20**(2):97-105.
81. Ha PK, Benoit NE, Yochem R, Sciubba J, Zahurak M, Sidransky D, Pevsner J, Westra WH, Califano J: **A transcriptional progression model for head and neck cancer.** *Clin Cancer Res* 2003, **9**(8):3058-3064.
82. Van Dyke DL, Worsham MJ, Benninger MS, Krause CJ, Baker SR, Wolf GT, Drumheller T, Tilley BC, Carey TE: **Recurrent cytogenetic abnormalities in squamous cell carcinomas of the head and neck region.** *Genes Chromosomes Cancer* 1994, **9**(3):192-206.
83. Hermsen M, Alonso Guervos M, Meijer G, van Diest P, Suarez Nieto C, Marcos CA, Sampedro A: **Chromosomal changes in relation to clinical outcome in larynx and pharynx squamous cell carcinoma.** *Cell Oncol* 2005, **27**(3):191-198.
84. Bosatra A, Bussani R, Silvestri F: **From epithelial dysplasia to squamous carcinoma in the head and neck region: an epidemiological assessment.** *Acta oto-laryngologica Supplementum* 1997, **527**:47-48.

85. Rodrigo JP, Gonzalez MV, Lazo PS, Ramos S, Coto E, Alvarez I, Garcia LA, Suarez C: **Genetic alterations in squamous cell carcinomas of the hypopharynx with correlations to clinicopathological features.** *Oral Oncol* 2002, **38**(4):357-363.
86. Amati B, Alevizopoulos K, Vlach J: **Myc and the cell cycle.** *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 1998, **3**:d250-268.
87. Lowe SW, Lin AW: **Apoptosis in cancer.** *Carcinogenesis* 2000, **21**(3):485-495.
88. Papakosta V, Vairaktaris E, Vylliotis A, Derka S, Nkenke E, Vassiliou S, Lazaris A, Mourouzis C, Rallis G, Spyridonidou S *et al*: **The co-expression of c-myc and p53 increases and reaches a plateau early in oral oncogenesis.** *Anticancer research* 2006, **26**(4B):2957-2962.
89. Bankfalvi A, Krassort M, Vegh A, Felszeghy E, Piffko J: **Deranged expression of the E-cadherin/beta-catenin complex and the epidermal growth factor receptor in the clinical evolution and progression of oral squamous cell carcinomas.** *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* 2002, **31**(8):450-457.
90. Yu Z, Weinberger PM, Provost E, Haffty BG, Sasaki C, Joe J, Camp RL, Rimm DL, Psyrri A: **beta-Catenin functions mainly as an adhesion molecule in patients with squamous cell cancer of the head and neck.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**(7):2471-2477.
91. Pukkila MJ, Virtaniemi JA, Kumpulainen EJ, Pirinen RT, Johansson RT, Valtonen HJ, Juhola MT, Kosma VM: **Nuclear beta catenin expression is related to unfavourable outcome in oropharyngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinoma.** *Journal of clinical pathology* 2001, **54**(1):42-47.
92. Lopez F, Alvarez-Marcos C, Alonso-Guervos M, Dominguez F, Suarez 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**(12):3153-3162.
93. Thompson L: **World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of head and neck tumours.** *Ear, nose, & throat journal* 2006, **85**(2):74.
94. Olivier M, Hollstein M, Hainaut P: **TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use.** *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2010, **2**(1):a001008.
95. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH: **The molecular biology of head and neck cancer.** *Nature reviews Cancer* 2011, **11**(1):9-22.
96. Poeta ML, Manola J, Goldwasser MA, Forastiere A, Benoit N, Califano JA, Ridge JA, Goodwin J, Kenady D, Saunders J *et al*: **TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck.** *N Engl J Med* 2007, **357**(25):2552-2561.
97. Bandoh N, Hayashi T, Kishibe K, Takahara M, Imada M, Nonaka S, Harabuchi Y: **Prognostic value of p53 mutations, bax, and spontaneous apoptosis in maxillary sinus squamous cell carcinoma.** *Cancer* 2002, **94**(7):1968-1980.
98. Jin Y, Mertens F, Jin C, Akervall J, Wennerberg J, Gorunova L, Mandahl N, Heim S, Mitelman F: **Nonrandom chromosome abnormalities in short-term cultured**

- primary squamous cell carcinomas of the head and neck.** *Cancer research* 1995, **55**(14):3204-3210.
99. Carey TE, Van Dyke DL, Worsham MJ: **Nonrandom chromosome aberrations and clonal populations in head and neck cancer.** *Anticancer research* 1993, **13**(6B):2561-2567.
100. Poetsch M, Kleist B, Lorenz G, Herrmann FH: **Different numerical chromosomal aberrations detected by FISH in oropharyngeal, hypopharyngeal and laryngeal squamous cell carcinoma.** *Histopathology* 1999, **34**(3):234-240.
101. Chen C, Wei Y, Hummel M, Hoffmann TK, Gross M, Kaufmann AM, Albers AE: **Evidence for epithelial-mesenchymal transition in cancer stem cells of head and neck squamous cell carcinoma.** *PLoS One* 2011, **6**(1):e16466.
102. Mathieu J, Zhang Z, Zhou W, Wang AJ, Heddleston JM, Pinna CM, Hubaud A, Stadler B, Choi M, Bar M *et al*: **HIF Induces Human Embryonic Stem Cell Markers in Cancer Cells.** *Cancer research* 2011, **71**(13):4640-4652.
103. Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN: **A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif.** *Nature* 1990, **346**(6281):240-244.
104. Ner SS: **HMGs everywhere.** *Curr Biol* 1992, **2**(4):208-210.
105. Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Munsterberg A, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R: **A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes.** *Nature* 1990, **346**(6281):245-250.
106. Dailey L, Basilico C: **Coevolution of HMG domains and homeodomains and the generation of transcriptional regulation by Sox/POU complexes.** *J Cell Physiol* 2001, **186**(3):315-328.
107. Kamachi Y, Uchikawa M, Kondoh H: **Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development.** *Trends Genet* 2000, **16**(4):182-187.
108. Wilson M, Koopman P: **Matching SOX: partner proteins and co-factors of the SOX family of transcriptional regulators.** *Curr Opin Genet Dev* 2002, **12**(4):441-446.
109. Stevanovic M, Zuffardi O, Collignon J, Lovell-Badge R, Goodfellow P: **The cDNA sequence and chromosomal location of the human SOX2 gene.** *Mamm Genome* 1994, **5**(10):640-642.
110. Fantes J, Ragge NK, Lynch SA, McGill NI, Collin JR, Howard-Peebles PN, Hayward C, Vivian AJ, Williamson K, van Heyningen V *et al*: **Mutations in SOX2 cause anophthalmia.** *Nat Genet* 2003, **33**(4):461-463.
111. Williams DC, Jr., Cai M, Clore GM: **Molecular basis for synergistic transcriptional activation by Oct1 and Sox2 revealed from the solution structure of the 42-kDa Oct1.Sox2.Hoxb1-DNA ternary transcription factor complex.** *J Biol Chem* 2004, **279**(2):1449-1457.
112. Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, Okochi H, Okuda A, Matoba R, Sharov AA *et al*: **Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells.** *Nat Cell Biol* 2007, **9**(6):625-635.

113. Zhao R, Daley GQ: **From fibroblasts to iPS cells: induced pluripotency by defined factors.** *J Cell Biochem* 2008, **105**(4):949-955.
114. Ambrosetti DC, Basilico C, Dailey L: **Synergistic activation of the fibroblast growth factor 4 enhancer by Sox2 and Oct-3 depends on protein-protein interactions facilitated by a specific spatial arrangement of factor binding sites.** *Mol Cell Biol* 1997, **17**(11):6321-6329.
115. Yuan H, Corbi N, Basilico C, Dailey L: **Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3.** *Genes Dev* 1995, **9**(21):2635-2645.
116. Ivanova N, Dobrin R, Lu R, Kotenko I, Levorse J, DeCoste C, Schafer X, Lun Y, Lemischka IR: **Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference.** *Nature* 2006, **442**(7102):533-538.
117. Ge N, Lin HX, Xiao XS, Guo L, Xu HM, Wang X, Jin T, Cai XY, Liang Y, Hu WH *et al*: **Prognostic significance of Oct4 and Sox2 expression in hypopharyngeal squamous cell carcinoma.** *J Transl Med* 2010, **8**:94.
118. Rizzino A: **Sox2 and Oct-3/4: a versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells.** *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2009, **1**(2):228-236.
119. Sinner D, Rankin S, Lee M, Zorn AM: **Sox17 and beta-catenin cooperate to regulate the transcription of endodermal genes.** *Development* 2004, **131**(13):3069-3080.
120. Takash W, Canizares J, Bonneaud N, Poulat F, Mattei MG, Jay P, Berta P: **SOX7 transcription factor: sequence, chromosomal localisation, expression, transactivation and interference with Wnt signalling.** *Nucleic Acids Res* 2001, **29**(21):4274-4283.
121. Zhang C, Basta T, Jensen ED, Klymkowsky MW: **The beta-catenin/VegT-regulated early zygotic gene Xnr5 is a direct target of SOX3 regulation.** *Development* 2003, **130**(23):5609-5624.
122. Scheper W, Copray S: **The molecular mechanism of induced pluripotency: a two-stage switch.** *Stem Cell Rev* 2009, **5**(3):204-223.
123. Glinsky GV: **"Stemness" genomics law governs clinical behavior of human cancer: implications for decision making in disease management.** *J Clin Oncol* 2008, **26**(17):2846-2853.
124. Carina V, Zito G, Pizzolanti G, Richiusa P, Criscimanna A, Rodolico V, Tomasello L, Pitrone M, Arancio W, Giordano C: **Multiple Pluripotent Stem Cell Markers in Human Anaplastic Thyroid Cancer: The Putative Upstream Role of Sox-2.** *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 2013.
125. Bockmuhl U, Schluns K, Kuchler I, Petersen S, Petersen I: **Genetic imbalances with impact on survival in head and neck cancer patients.** *Am J Pathol* 2000, **157**(2):369-375.
126. Que J, Okubo T, Goldenring JR, Nam KT, Kurotani R, Morrissey EE, Taranova O, Pevny LH, Hogan BL: **Multiple dose-dependent roles for Sox2 in the patterning and differentiation of anterior foregut endoderm.** *Development* 2007, **134**(13):2521-2531.

127. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG *et al*: **Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells**. *Cell* 2005, **122**(6):947-956.
128. Kiernan AE, Pelling AL, Leung KK, Tang AS, Bell DM, Tease C, Lovell-Badge R, Steel KP, Cheah KS: **Sox2 is required for sensory organ development in the mammalian inner ear**. *Nature* 2005, **434**(7036):1031-1035.
129. Taranova OV, Magness ST, Fagan BM, Wu Y, Surzenko N, Hutton SR, Pevny LH: **SOX2 is a dose-dependent regulator of retinal neural progenitor competence**. *Genes Dev* 2006, **20**(9):1187-1202.
130. Verma AS, Fitzpatrick DR: **Anophthalmia and microphthalmia**. *Orphanet J Rare Dis* 2007, **2**:47.
131. Fitzpatrick DR, van Heyningen V: **Developmental eye disorders**. *Curr Opin Genet Dev* 2005, **15**(3):348-353.
132. Sisodiya SM, Ragge NK, Cavalleri GL, Hever A, Lorenz B, Schneider A, Williamson KA, Stevens JM, Free SL, Thompson PJ *et al*: **Role of SOX2 mutations in human hippocampal malformations and epilepsy**. *Epilepsia* 2006, **47**(3):534-542.
133. Williamson KA, Hever AM, Rainger J, Rogers RC, Magee A, Fiedler Z, Keng WT, Sharkey FH, McGill N, Hill CJ *et al*: **Mutations in SOX2 cause anophthalmia-esophageal-genital (AEG) syndrome**. *Hum Mol Genet* 2006, **15**(9):1413-1422.
134. Sanada Y, Yoshida K, Ohara M, Oeda M, Konishi K, Tsutani Y: **Histopathologic evaluation of stepwise progression of pancreatic carcinoma with immunohistochemical analysis of gastric epithelial transcription factor SOX2: comparison of expression patterns between invasive components and cancerous or nonneoplastic intraductal components**. *Pancreas* 2006, **32**(2):164-170.
135. Chen Y, Shi L, Zhang L, Li R, Liang J, Yu W, Sun L, Yang X, Wang Y, Zhang Y *et al*: **The molecular mechanism governing the oncogenic potential of SOX2 in breast cancer**. *J Biol Chem* 2008, **283**(26):17969-17978.
136. Li XL, Eishi Y, Bai YQ, Sakai H, Akiyama Y, Tani M, Takizawa T, Koike M, Yuasa Y: **Expression of the SRY-related HMG box protein SOX2 in human gastric carcinoma**. *Int J Oncol* 2004, **24**(2):257-263.
137. Rodriguez-Pinilla SM, Sarrio D, Moreno-Bueno G, Rodriguez-Gil Y, Martinez MA, Hernandez L, Hardisson D, Reis-Filho JS, Palacios J: **Sox2: a possible driver of the basal-like phenotype in sporadic breast cancer**. *Mod Pathol* 2007, **20**(4):474-481.
138. Sattler HP, Lensch R, Rohde V, Zimmer E, Meese E, Bonkhoff H, Retz M, Zwergel T, Bex A, Stoeckle M *et al*: **Novel amplification unit at chromosome 3q25-q27 in human prostate cancer**. *Prostate* 2000, **45**(3):207-215.
139. Carra E, Barbieri F, Marubbi D, Pattarozzi A, Favoni RE, Florio T, Daga A: **Sorafenib selectively depletes human glioblastoma tumor-initiating cells from primary cultures**. *Cell Cycle* 2013, **12**(3).
140. Balsara BR, Testa JR: **Chromosomal imbalances in human lung cancer**. *Oncogene* 2002, **21**(45):6877-6883.
141. Gebhart E, Liehr T: **Patterns of genomic imbalances in human solid tumors (Review)**. *Int J Oncol* 2000, **16**(2):383-399.

142. Yuan P, Kadara H, Behrens C, Tang X, Woods D, Solis LM, Huang J, Spinola M, Dong W, Yin G *et al*: **Sex determining region Y-Box 2 (SOX2) is a potential cell-lineage gene highly expressed in the pathogenesis of squamous cell carcinomas of the lung.** *PLoS One* 2010, **5**(2):e9112.
143. Bass AJ, Watanabe H, Mermel CH, Yu S, Perner S, Verhaak RG, Kim SY, Wardwell L, Tamayo P, Gat-Viks I *et al*: **SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas.** *Nat Genet* 2009, **41**(11):1238-1242.
144. Hussenet T, du Manoir S: **SOX2 in squamous cell carcinoma: Amplifying a pleiotropic oncogene along carcinogenesis.** *Cell Cycle* 2010, **9**(8).
145. Hussenet T, Dali S, Exinger J, Monga B, Jost B, Dembele D, Martinet N, Thibault C, Huelsken J, Brambilla E *et al*: **SOX2 is an oncogene activated by recurrent 3q26.3 amplifications in human lung squamous cell carcinomas.** *PLoS One* 2010, **5**(1):e8960.
146. Lu Y, Futtner C, Rock JR, Xu X, Whitworth W, Hogan BL, Onaitis MW: **Evidence that SOX2 overexpression is oncogenic in the lung.** *PLoS One* 2010, **5**(6):e11022.
147. Long KB, Hornick JL: **SOX2 is highly expressed in squamous cell carcinomas of the gastrointestinal tract.** *Hum Pathol* 2009, **40**(12):1768-1773.
148. Maier S, Wilbertz T, Braun M, Scheble V, Reischl M, Mikut R, Menon R, Nikolov P, Petersen K, Beschoner C *et al*: **SOX2 amplification is a common event in squamous cell carcinomas of different organ sites.** *Hum Pathol* 2011.
149. Freier K, Knoepfle K, Flechtenmacher C, Pungs S, Devens F, Toedt G, Hofele C, Joos S, Lichter P, Radlwimmer B: **Recurrent copy number gain of transcription factor SOX2 and corresponding high protein expression in oral squamous cell carcinoma.** *Genes Chromosomes Cancer* 2010, **49**(1):9-16.
150. Zullig L, Roessle M, Weber C, Graf N, Haerle SK, Jochum W, Stoeckli SJ, Moch H, Huber GF: **High sex determining region Y-box 2 expression is a negative predictor of occult lymph node metastasis in early squamous cell carcinomas of the oral cavity.** *Eur J Cancer* 2013, **49**(8):1915-1922.
151. Du L, Yang Y, Xiao X, Wang C, Zhang X, Wang L, Li W, Zheng G, Wang S, Dong Z: **Sox2 nuclear expression is closely associated with poor prognosis in patients with histologically node-negative oral tongue squamous cell carcinoma.** *Oral Oncol* 2011, **47**(8):709-713.
152. Schrock A, Goke F, Wagner P, Bode M, Franzen A, Braun M, Huss S, Agaimy A, Ihrler S, Menon R *et al*: **Sex determining region Y-box 2 (SOX2) amplification is an independent indicator of disease recurrence in sinonasal cancer.** *PLoS One* 2013, **8**(3):e59201.
153. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP: **Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens.** *Nat Med* 1998, **4**(7):844-847.
154. Sasaki CT, Jassin B: **Cancer of the pharynx and larynx.** *The American journal of medicine* 2001, **111 Suppl 8A**:118S-123S.

155. Hoffman HT, Karnell LH, Shah JP, Ariyan S, Brown GS, Fee WE, Glass AG, Goepfert H, Ossoff RH, Fremgen AM: **Hypopharyngeal cancer patient care evaluation.** *The Laryngoscope* 1997, **107**(8):1005-1017.
156. Sewnaik A, Hoorweg JJ, Knegt PP, Wieringa MH, van der Beek JM, Kerrebijn JD: **Treatment of hypopharyngeal carcinoma: analysis of nationwide study in the Netherlands over a 10-year period.** *Clinical otolaryngology : official journal of ENT-UK ; official journal of Netherlands Society for Oto-Rhino-Laryngology & Cervico-Facial Surgery* 2005, **30**(1):52-57.
157. Kregel S, Kiriluk KJ, Rosen AM, Cai Y, Reyes EE, Otto KB, Tom W, Paner GP, Szmulewitz RZ, Vander Griend DJ: **Sox2 is an androgen receptor-repressed gene that promotes castration-resistant prostate cancer.** *PLoS One* 2013, **8**(1):e53701.
158. Tang XB, Shen XH, Li L, Zhang YF, Chen GQ: **SOX2 overexpression correlates with poor prognosis in laryngeal squamous cell carcinoma.** *Auris, nasus, larynx* 2013, **40**(5):481-486.
159. Zheng Z, Pan J, Chu B, Wong YC, Cheung AL, Tsao SW: **Downregulation and abnormal expression of E-cadherin and beta-catenin in nasopharyngeal carcinoma: close association with advanced disease stage and lymph node metastasis.** *Hum Pathol* 1999, **30**(4):458-466.
160. Pukkila MJ, Kumpulainen EJ, Virtaniemi JA, Johansson RT, Halonen PM, Kellokoski JK, Kosunen AS, Nuutinen J, Kosma VM: **Nuclear and cytoplasmic p53 expression in pharyngeal squamous cell carcinoma: prognostic implications.** *Head & neck* 2002, **24**(8):784-791.
161. Diaz-Molina JP, Llorente JL, Vivanco B, Martinez-Cambolor P, Fresno MF, Perez-Escuredo J, Alvarez-Marcos C, Hermsen MA: **Wnt-pathway activation in intestinal-type sinonasal adenocarcinoma.** *Rhinology* 2011, **49**(5):593-599.
162. Koo BS, Jung BJ, Kim SG, Liang ZL, Yeong MK, Rha KS: **Altered expression of E-cadherin and beta-catenin in malignant transformation of sinonasal inverted papillomas.** *Rhinology* 2011, **49**(4):479-485.
163. Alvarez-Marcos C, Lopez F, Alonso-Guervos M, Dominguez F, Suarez C, Hermsen MA, Llorente JL: **Genetic and protein markers related to laryngeal epithelial precursor lesions and their neoplastic progression.** *Acta otolaryngologica* 2013, **133**(3):281-290.
164. Galera-Ruiz H, Rios-Moreno MJ, Gonzalez-Campora R, Ortega I, Fernandez A, Garcia-Escudero A, Galera-Davidson H: **The cadherin-catenin complex in laryngeal squamous cell carcinoma.** *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2012, **269**(4):1183-1188.
165. Goulioumis AK, Varakis J, Goumas P, Papadaki H: **Differential beta-catenin expression between glottic and supraglottic laryngeal carcinoma.** *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2010, **267**(10):1573-1578.
166. Ashraf MJ, Maghbul M, Azarpira N, Khademi B: **Expression of Ki67 and P53 in primary squamous cell carcinoma of the larynx.** *Indian journal of pathology & microbiology* 2010, **53**(4):661-665.
167. Rodrigues RB, Motta Rda R, Machado SM, Cambuzzi E, Zettler EW, Zettler CG, Jotz GP: **Prognostic value of the immunohistochemistry correlation of Ki-67**

- and p53 in squamous cell carcinomas of the larynx. *Brazilian journal of otorhinolaryngology* 2008, **74**(6):855-859.
168. Pastuszewski W, Dziegiel P, Krecicki T, Podhorska-Okolow M, Ciesielska U, Gorzynska E, Zabel M: **Prognostic significance of metallothionein, p53 protein and Ki-67 antigen expression in laryngeal cancer.** *Anticancer research* 2007, **27**(1A):335-342.
169. Rodrigo JP, Martinez P, Allonca E, Alonso-Duran L, Suarez C, Astudillo A, Garcia-Pedrero JM: **Immunohistochemical markers of distant metastasis in laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinomas.** *Clinical & experimental metastasis* 2014, **31**(3):317-325.
170. Bradford CR, Kumar B, Bellile E, Lee J, Taylor J, D'Silva N, Cordell K, Kleer C, Kupfer R, Kumar P *et al*: **Biomarkers in advanced larynx cancer.** *The Laryngoscope* 2014, **124**(1):179-187.
171. Nankivell P, Weller M, McConkey C, Paleri V, Mehanna H: **Biomarkers in laryngeal dysplasia: a systematic review.** *Head & neck* 2011, **33**(8):1170-1176.
172. Krecicki T, Fraczek M, Jelen M, Zatonski T, Szkudlarek T, Dus D: **Expression of c-myc oncoprotein in laryngeal squamous cell carcinoma.** *Acta otolaryngologica* 2004, **124**(5):634-637.
173. Ozdek A, Sarac S, Akyol MU, Sungur A, Yilmaz T: **c-myc and bcl-2 Expression in supraglottic squamous cell carcinoma of the larynx.** *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 2004, **131**(1):77-83.
174. Teicher BA: **Targets in small cell lung cancer.** *Biochemical pharmacology* 2014, **87**(2):211-219.
175. Yeh CT, Su CL, Huang CY, Lin JK, Lee WH, Chang PM, Kuo YL, Liu YW, Wang LS, Wu CH *et al*: **A preclinical evaluation of antimycin a as a potential antilung cancer stem cell agent.** *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2013, **2013**:910451.
-