



Universidad de Oviedo

Programa de Doctorado en Biomedicina y
Oncología Molecular

Marcadores moleculares del riesgo de
progresión a carcinoma en lesiones
premalinas de laringe

Gonzalo Mancebo Mata

Tesis Doctoral
2016



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Marcadores moleculares del riesgo de progresión a carcinoma en lesiones premalignas de laringe	Inglés: Molecular markers of the risk of progression to carcinoma in premalignant lesions of the larynx

2.- Autor	
Nombre: Gonzalo Mancebo Mata	DNI/Pasaporte/
Programa de Doctorado: Biomedicina y Oncología molecular	
Órgano responsable: Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias	

RESUMEN (en español)

Introducción

En los últimos 20 años el diagnóstico y tratamiento de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello (CECC) ha mejorado gracias a los esfuerzos combinados entre la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, pero la supervivencia a largo plazo sólo ha mejorado de forma marginal. Algunas lesiones precursoras de laringe progresan hacia un carcinoma epidermoide de laringe y otras no. La clasificación basada en el análisis mediante microscopio óptico realizada de rutina, tiene limitado valor para predecir la evolución de estas lesiones. Son pocos los estudios que sugieren que determinados marcadores moleculares son potenciales predictores de progresión maligna, incluyendo varios reguladores de la adhesión celular e invasión, como las proteínas cortactina y la quinasa de adhesión focal (FAK). La expresión de podoplanina está tomando interés como marcador de riesgo de cáncer en lesiones premalignas orales, similares a las de laringe. El valor predictivo de estos marcadores, de cualquier forma, debería ser confirmado en nuevos estudios prospectivos.

Objetivos

Hemos investigado la significación clínica del patrón de expresión de cortactina (CTTN), FAK y podoplanina durante el desarrollo y progresión de los carcinomas de laringe, así como la frecuencia de amplificación génica de *CTTN* y *FAK*, para establecer su papel en el proceso de transformación maligna.

Material y método

Se investigó mediante inmunohistoquímica la expresión de cortactina y FAK en muestras parafinadas de 82 pacientes con diagnóstico histopatológico de displasia de laringe, así como en el correspondiente tumor desarrollado durante el seguimiento clínico. La amplificación génica de *CTTN* y *FAK* fue analizada mediante la técnica de Q-PCR. Se investigó de la misma forma podoplanina mediante IHQ en 81 pacientes. Las alteraciones moleculares se han relacionado con los parámetros clínico-patológicos y el riesgo de progresión hacia carcinoma de laringe.



Resultados

Hemos encontrado expresión intensa de cortactina, FAK y podoplanina respectivamente en 41 (50%), 40 (49%) y 38 de las displasias de laringe estudiadas, la expresión proteica se mantuvo o aumentó en las muestras del tumor correspondiente en cada paciente. La amplificación génica de *CTTN* y *FAK* fue detectada respectivamente en 10 (12%) y 26 (32%) de las displasias laríngeas. La expresión proteica de cortactina, FAK y podoplanina se incrementaba con el grado de displasia; de cualquier forma, la sobreexpresión de cortactina, FAK y podoplanina y no el diagnóstico histopatológico se correlacionaba significativamente con el riesgo de progresión ($P = .016$; $P = .004$ y $P = .038$, respectivamente). Aquellos pacientes cuyas lesiones premalignas presentaban una expresión intensa de cortactina o FAK mostraban una incidencia de cancer significativamente mayor ($P = .006$ y $P = .001$, respectivamente; log-rank test). Además la expresión de FAK fue predictor independiente del riesgo de desarrollar un carcinoma de laringe (RR = 3.632, 95% IC 1.701-7.757; $P = .001$) y la combinación de cortactina y FAK demostró el mayor valor predictivo positivo (RR = 5.042, 95% IC 2.255-11.274; $P < .001$).

Conclusiones

Nuestros hallazgos en este proyecto apoyan el papel de cortactina, FAK y podoplanina en la transformación maligna y proporcionan evidencias originales de la potencial utilidad clínica de la expresión de cortactina y FAK como marcadores de riesgo de cáncer de laringe. La expresión de podoplanina se incrementa en los estadios iniciales de la tumorigénesis laríngea y parece asociarse también con un incremento en el riesgo de cáncer de laringe. La utilidad y poder pronóstico de estos marcadores moleculares debería ser confirmada en otros estudios prospectivos amplios, estandarizados y bien diseñados.

RESUMEN (en Inglés)

Introduction

Over the last 20 years, diagnosis and management of HNSCC have improved through combined efforts in surgery, radiotherapy and chemotherapy, but long-term survival rates have increased only marginally. Some laryngeal epithelial precursor lesions progress to invasive larynx carcinoma and others do not. Routine light microscopic classification has limited value in predicting the evolution of these lesions. Limited studies suggest that certain molecular markers are potentially reliable predictors of malignant progression, including various regulators of cell adhesion and invasion as cortactin and the focal adhesion kinase (FAK). Podoplanin expression is attracting interest as a marker for cancer diagnosis and prognosis in oral premalignant lesions, similar than those of the larynx. The predictive value of these markers, however, has yet to be confirmed in new large-scale prospective studies.

Purpose

We investigated the clinical significance of cortactin (*CTTN*), FAK and podoplanin expression pattern during the development and progression of laryngeal carcinomas,



and the frequency of *CTTN* and *FAK* gene amplification to establish their role in malignant transformation.

Patients and Methods

Cortactin and FAK protein expression was investigated by immunohistochemistry in paraffin-embedded tissue specimens from 82 patients with laryngeal dysplasia and in the corresponding patient-matched invasive tumors later developed. *CTTN* and *FAK* gene amplification was assessed using real-time PCR. Podoplanin was evaluated in the same way by IHQ in 81 patients. Molecular alterations were associated with clinicopathological parameters and laryngeal cancer risk.

Results

Increased cortactin, FAK and podoplanin expression was respectively found in 41 (50%), 40 (49%) and 38 (47%) laryngeal dysplasias, and protein expression was maintained or even further augmented in patient-matched invasive tumors. *CTTN* and *FAK* gene amplifications were respectively detected in 10 (12%) and 26 (32%) laryngeal dysplasias. Cortactin, FAK and podoplanin protein expression increased with the grade of dysplasia; however, cortactin, FAK and podoplanin expression but not histology correlated significantly with laryngeal cancer risk ($P = .016$; $P = .004$ and $P = .038$ respectively). Patients carrying strong cortactin or FAK expressing dysplastic lesions experienced a significantly higher cancer incidence ($P = .006$ and $P = .001$, respectively; log-rank test). Furthermore, FAK expression was an independent predictor of laryngeal cancer development (HR = 3.632, 95% CI 1.701 to 7.757; $P = .001$) and the combination of FAK and cortactin showed superior predictive value (HR = 5.042, 95% CI 2.255 to 11.274; $P < .001$).

Conclusion

Our findings in this project support a role for cortactin, FAK and podoplanin in malignant transformation and provide original evidence for the potential clinical utility of cortactin and FAK expression as risk markers of laryngeal cancer. Podoplanin expression increases in the early stages of laryngeal tumorigenesis and it seems to be associated with a higher laryngeal cancer risk. The utility and prognostic power of these molecular markers should be confirmed in large, well-designed, standardized prospective studies.

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA Y ONCOLOGÍA MOLECULAR

Agradecimientos,

En el instante en el que escribo estas palabras me encuentro probablemente en el mejor momento a nivel personal y profesional de mi vida, la presentación de esta tesis doctoral llega casi con cinco años de retraso desde que finalice mi periodo de residencia en el HUCA de Oviedo, en este tiempo he podido crear una preciosa familia y trabajar temporalmente en algún otro de los mejores servicios de nuestra especialidad. La presentación de esta tesis doctoral supone cerrar un fructífero ciclo académico en la institución universitaria de mi ciudad.

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todos los que han colaborado en la consecución de este trabajo y deseo no olvidarme de nadie.

En primer lugar quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mis directores de tesis:

Al Dr. Juan Pablo Rodrigo Tapia, sin la ayuda del cual este proyecto no habría sido posible, gracias por su infinita paciencia, orientación y sugerencias, por ser el mayor referente para mí en el campo de la investigación dentro de nuestra especialidad y ante todo un ejemplo de profesionalidad, dedicación y metodología científica.

A la Dra. Juana María García Pedrero, por su inestimable trabajo a la hora de la realización de todos los pasos del proceso experimental, por sus ánimos y apoyo continuo, también por la sencillez con la que consigue transmitir las bases de la investigación molecular a un novato en la materia.

Un afectuoso agradecimiento al Dr. Carlos Suárez Nieto, por haber estimulado siempre el interés por la investigación durante mi periodo formativo, dándome muchas facilidades para la realización de este trabajo. Además, por haber sido para mí un gran referente dentro de nuestra especialidad.

Quiero expresar también mi profundo agradecimiento a todos los miembros del grupo de Otorrinolaringología del Laboratorio del IUOPA, cuyo trabajo ha sido determinante en la realización de este proyecto, especialmente a la Dra. Sofía Tirados y a Eva Allonca, que han colaborado de manera fundamental en la fase de experimentación. Quisiera dar las gracias también al Dr. Manuel F. Fresno, del servicio de anatomía patológica, por haber cedido las muestras utilizadas en este trabajo.

Quiero agradecer también en esta tesis a todo el servicio de ORL del HUCA, pero sobre todo a mis compañeros de residencia, a Fernando, mi “co R” y compañero de los cursos de doctorado, Andrés, Juan Pablo, María y Carla,... Tengo que hacer en este apartado una mención especial a mis “residentes mayores”, ante todo grandes amigos: Rafa y Sergio, mis auténticos mentores en tantos aspectos de nuestra especialidad. También quisiera dar las gracias aquí a Jorge, con quien compartí sólo un año de residencia, pero hoy en día se ha convertido en el mejor amigo y compañero de trabajo diario, en la ciudad que me ha acogido durante estos tres últimos años, Vitoria-Gasteiz.

Por último, aunque en primer lugar querría dedicar esta tesis “a los míos”:

A mis padres, por habernos dado todo su cariño, por fomentar en nosotros la inquietud por descubrir nuevas cosas, el aprendizaje continuo, estimulado siempre el estudio y la lectura, conocer otros países y culturas, en definitiva, por ser el ejemplo que pretendo utilizar ahora que me toca educar a mí.

A mi hermano, por ser un referente de integridad y trabajo constante, por el cariño que les da a mis hijos, por sus ganas de intentar cambiar este mundo.

A Cinzia, el amor de mi vida, a quien debo gran parte de lo que soy, la compañera y madre ideal, a Carla y Daniel, mis “piccolos”, sois lo mejor que me ha pasado y me habéis permitido descansar durante los recesos en la realización de esta tesis, que por supuesto es vuestra.

Tabla de contenido

1-	INTRODUCCIÓN	13
1.1.	Carcinomas epidermoides de laringe	15
1.1.1.	Conceptos generales	15
1.1.2.	Modelo de carcinogénesis en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello	17
1.2.	Lesiones Premalignas de laringe	26
1.2.1	Concepto y diagnóstico	26
1.2.2	Clasificaciones: valor pronóstico	31
1.3	Marcadores moleculares estudiados	37
1.4	Selección de marcadores	41
1.4.1.	Cortactina	41
1.4.2.	Podoplanina	45
1.4.3.	Quinasa de adhesión focal (FAK)	49
1.8	Hipótesis de trabajo	51
2-	OBJETIVOS	53
3-	MATERIAL Y MÉTODOS	57
3.1.-	Selección de pacientes y muestras de tejidos	59
3.2.-	Análisis de la amplificación génica mediante PCR cuantitativa	60
3.2.1.-	Extracción de ADN genómico de tejido parafinado	62
3.2.2.-	Análisis de la amplificación de CTTN y FAK mediante PCR Cuantitativa (Q-PCR)	63
3.3.-	Análisis inmunohistoquímico	64
3.4.-	Análisis estadístico	65
4-	RESULTADOS	67
4.1.	Seguimiento clínico	69
4.2.	Análisis de la amplificación génica en lesiones premalignas	71
4.2.1.	Análisis de la amplificación de CTTN	72
4.2.2.	Análisis de la amplificación de FAK	72
4.3	Análisis de la expresión proteica en lesiones premalignas	73
4.3.1.	Análisis de la expresión de cortactina	73
4.3.1.	Análisis de la expresión de FAK	76
4.3.1.	Análisis de la expresión de podoplanina	80
4.4.	Análisis de la progresión a cáncer	83
5-	DISCUSIÓN	95
6-	CONCLUSIONES	115

7- BIBLIOGRAFÍA 119

1-INTRODUCCIÓN

1.1. Carcinomas epidermoides de laringe

1.1.1. Conceptos generales

Los carcinomas de cabeza y cuello representan a nivel mundial el quinto tipo de cáncer más común, diagnosticándose anualmente alrededor de 500.000 nuevos casos.¹

Cerca del 95% de los tumores malignos de esta región son carcinomas epidermoides.

Los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello (CECC) constituyen según el centro Nacional de Epidemiología el 5-10% de los tumores malignos diagnosticados anualmente, y causan aproximadamente el 5% de las muertes por cáncer. La localización más frecuente de estos cánceres en España es la laringe, seguida de la cavidad oral y la faringe. Aunque en la mayoría de estudios se les considera como un único tipo de carcinomas, se aprecian importantes diferencias en su comportamiento clínico y biológico dependiendo del lugar de localización del tumor en la vía aerodigestiva.

Los pacientes con CECC se han beneficiado de los últimos avances en técnicas quirúrgicas, radioterapia y quimioterapia. De cualquier manera, pese a los importantes avances en el control local y a la mejora de la calidad de vida conseguida gracias al uso de las terapias combinadas y de preservación de órgano, las tasas de supervivencia en los CECC no se han modificado significativamente en las últimas décadas.²

El carcinoma de laringe es el tumor maligno más frecuente en cabeza y cuello y, en España, uno de los países con mayor incidencia, supone entre el 2,2 y el 4,8% (según las comunidades autónomas) de todos los cánceres nuevos diagnosticados, y entre el 1,5 y el 2,5% de las muertes producidas por tumores malignos.³ El 99% de los cánceres de laringe son carcinomas escamosos o epidermoides, originados en la mucosa de la misma, el 1% restante está constituido por otros tipos histológicos como adenocarcinomas, sarcomas, linfomas, condrosarcomas.

La etiología del cáncer de laringe es desconocida. Sin embargo, diversos factores ambientales se han asociado con el mismo. Dos de forma clara y evidente: tabaco y alcohol. Otros de forma más controvertida: sustancias de exposición laboral (polvo de cemento, asbesto, barniz,...), radiación, infecciones víricas (HPV), el reflujo

gastroesofágico y factores dietéticos.⁴ Además estos últimos años ha cobrado mayor interés la influencia de la herencia.

Todos los datos epidemiológicos disponibles han demostrado una fuerte correlación entre el hábito de fumar y la aparición de este tipo de tumores⁵. Los carcinomas de laringe se presentan casi exclusivamente en pacientes fumadores siendo excepcionales en no fumadores,⁶ demostrándose además una relación dosis-efecto, es decir a mayor cantidad de tabaco fumado, mayor riesgo de desarrollar un cáncer de laringe.⁷ Apoyando el hecho del papel carcinogénico del tabaco en la génesis del tumor, se encuentra el hallazgo de cambios histológicos en la mucosa de las cuerdas vocales de los pacientes fumadores. Se ha demostrado que aproximadamente el 70% desarrollan cambios queratósicos en la mucosa laríngea, de los que aproximadamente un 20% acabarán desarrollando un cáncer, mientras que sólo un 0,3% de los no fumadores lo desarrollan. Existen evidencias de que los cambios en la mucosa inducidos por el tabaco son reversibles si el paciente deja de fumar.⁸

Se enumeran en las últimas clasificaciones de la OMS una serie de factores dietéticos y nutricionales en relación con la carcinogénesis, como los carotenoides y la vitamina C (como protectores) y las infusiones de mate, el reflujo gastroesofágico y algunas alteraciones genéticas (como promotores).⁹ Dos virus en particular se han relacionado con los carcinomas de cabeza y cuello, el virus de Epstein-Barr (EBV) y el virus del papiloma humano (HPV). El EBV es un importante factor etiológico en los carcinomas de nasofaringe,¹⁰ y el HPV es el responsable de un subgrupo de carcinomas de orofaringe.¹¹ El virus del papiloma humano (HPV) se ha demostrado en la mucosa del epitelio laríngeo, clínica e histológicamente normal (25%), también se ha estudiado su prevalencia en lesiones premalignas y cánceres escamosos, con resultados muy variables (8-54%),¹² dependiendo de la población estudiada, tipo de muestras y método de detección utilizado.¹³ Los serotipos 6 y 11 son formas de bajo riesgo mientras que el 16 es de alto riesgo.¹⁴

Desde un punto de vista de salud pública, las dos ideas más importantes sobre el cáncer de laringe son que en gran medida es un cáncer evitable y cuyo pronóstico varía en función del momento diagnóstico, dado que en los estadios iniciales el pronóstico es relativamente bueno acompañado además de una buena funcionalidad, mientras que en

los estadios avanzados el pronóstico es mediocre siendo a menudo necesario sacrificar toda la laringe.

Por ello, es fundamental identificar marcadores moleculares que permitan predecir de forma eficaz la progresión de la enfermedad a partir del análisis del tumor primario. Además de este gran valor diagnóstico, dichos marcadores tumorales podrían constituir dianas terapéuticas potenciales. De hecho, el desarrollo de nuevos fármacos antitumorales se enfoca cada vez más a la modificación de las rutas bioquímicas específicamente desreguladas en el cáncer.

1.1.2. Modelo de carcinogénesis en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello

1.1.2.1. Modelo de progresión

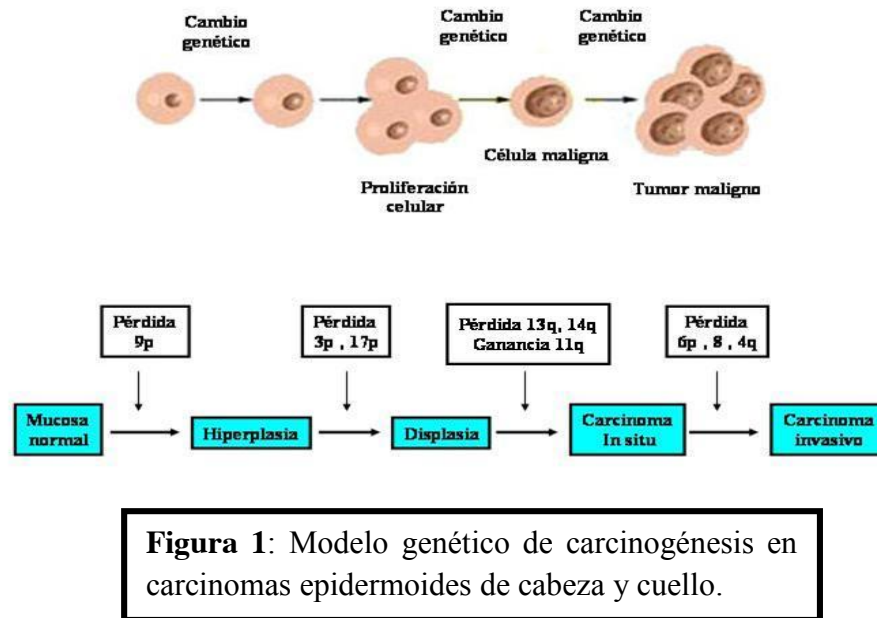
Muchos de los complejos fundamentos biológicos de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello siguen siendo poco conocidos, a pesar de los múltiples estudios. Al igual que otras neoplasias epiteliales, la carcinogénesis de los tumores de cabeza y cuello parece desarrollarse a través de un proceso con múltiples pasos que involucra cambios biomoleculares sucesivos.

Los avances en el conocimiento de las bases genéticas de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello han dado lugar a un modelo de carcinogénesis similar al conocido en otros tumores humanos, de los cuales es paradigma el del carcinoma de colon. Según este modelo, los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello surgen de la proliferación clonal de una población de células que van acumulando alteraciones genéticas de una forma progresiva.

La interacción en el epitelio laríngeo de los factores exógenos (alcohol y tabaco) y endógenos (genes) desencadena el proceso de carcinogénesis, mediante el cual las células normales adquieren de forma progresiva las características propias de las células tumorales: proliferación incontrolada, invasión de los tejidos circundantes y capacidad para dar metástasis, que les confieren una ventaja sustancial sobre el resto de células normales.

En el CECC el primer modelo diseñado corresponde a Califano,¹⁵ que basó su propuesta en otro previo desarrollado por Fearon y Vogelstein¹⁶ en el colon. Fue un avance sustancial pues en él se relacionaba la progresión de los cambios clínico-

patológicos (fenotípicos) desde la mucosa normal, pasando por hiperplasia, displasia, carcinoma in situ y cáncer invasivo, con los cambios genéticos (Figura 1).



Este modelo genético supuso una revolución y un avance sustancial para interpretar la transformación maligna y la progresión tumoral en los CECC, que podemos resumir en los siguientes puntos:

1. Los genes supresores están implicados en las fases iniciales del proceso.
2. Las alteraciones genéticas del CECC tienden a producirse en orden cronológico y determinan la progresión histopatológica. Así las pérdidas de 9p21 y 3p ya aparecen en la hiperplasia epitelial, incluso antes que las manifestaciones clínicas.
3. Es el acúmulo de alteraciones genéticas y no su orden el que determina la progresión tumoral. Hay alteraciones propias de estadios tardíos como 8p que son, en ocasiones, la única anomalía detectable en lesiones precoces.

Se ha aceptado así pues que la transición desde un epitelio normal hacia un carcinoma epidermoide de laringe es un proceso lento y en múltiples etapas, debido a la acumulación progresiva de alteraciones genéticas a partir de la selección clonal de una población de células epiteliales transformadas.¹⁷ Cada una de estas alteraciones confiere

a estas células una ventaja en su crecimiento y/o proliferación, lo que les hace progresar hacia la transformación maligna a través de unos estadios clínico patológicos bien definidos.

El proceso de tumorigénesis de los tumores sólidos, incluyendo los CECC, implica tanto la activación de los productos de los proto-oncogenes que estimulan el crecimiento, como la inactivación de los genes supresores de tumores, cuyos productos normalmente inhiben la proliferación celular. La identificación y caracterización del amplio espectro de las alteraciones moleculares asociadas con estos eventos podría dar paso al conocimiento de los mecanismos de iniciación y progresión de las neoplasias y aportar nuevas y prometedoras herramientas de diagnóstico precoz, tratamiento y prevención.

En los últimos años ha cobrado impulso la teoría del “campo de cancerización” redefinida en el modelo propuesto por Braakhuis¹⁸ en base a estudios moleculares de tejidos aparentemente sanos. El concepto se basa en una exposición continuada a carcinógenos que causa la transformación maligna independiente de múltiples células epiteliales en distintos lugares. Este segundo modelo estudia las alteraciones moleculares detectadas por pérdida de heterocigosidad (LOH) e inestabilidad de los microsatélites y establece que los cambios génicos adquiridos en los estadios precoces de la carcinogénesis se muestran en la mayoría de las células tumorales, mientras que los cambios surgidos en estadios posteriores de la evolución tumoral se restringen a determinados subclones celulares.¹⁹ Los dos modelos no son excluyentes entre sí.

Recientemente han surgido estudios sobre las células madre y su relación con el desarrollo y progresión de los CECC. Se expone la hipótesis del origen del cáncer a partir de células madre inicialmente normales. Estas células, por su capacidad de autorrenovación, tendrían una vida muy larga y mayor oportunidad de acumular mutaciones que precipitarían la carcinogénesis.²⁰ Las células madre se localizan en nichos del epitelio laríngeo a nivel de la zona suprabasal, teniendo la capacidad de migrar de un nicho a otro, según las necesidades.²¹ En la glotis, cuando las células madre localizadas en los nichos de la zona suprabasal sufren alteraciones en su ADN debido a la acción de los agentes carcinógenos, mantienen su capacidad de migración en esa región y contribuyen a formar la expansión clonal en el campo de cancerización.¹⁷

1.1.2.2. Alteraciones en cáncer

La carcinogénesis epitelial ha sido dividida en tres fases: iniciación, promoción y progresión, que implican alteraciones genéticas, disregulación de la diferenciación epitelial, proliferación anormal, y anormal expresión de factores celulares que regulan el crecimiento y desarrollo.

Estas alteraciones deben afectar a genes que codifiquen proteínas involucradas en el control del ciclo celular: Oncogenes, Genes supresores de tumores y Genes reparadores del ADN. Constituyen marcadores genéticos que señalan un estadio en la carcinogénesis entre la iniciación y el desarrollo de un tumor maligno (Figura 2).²²

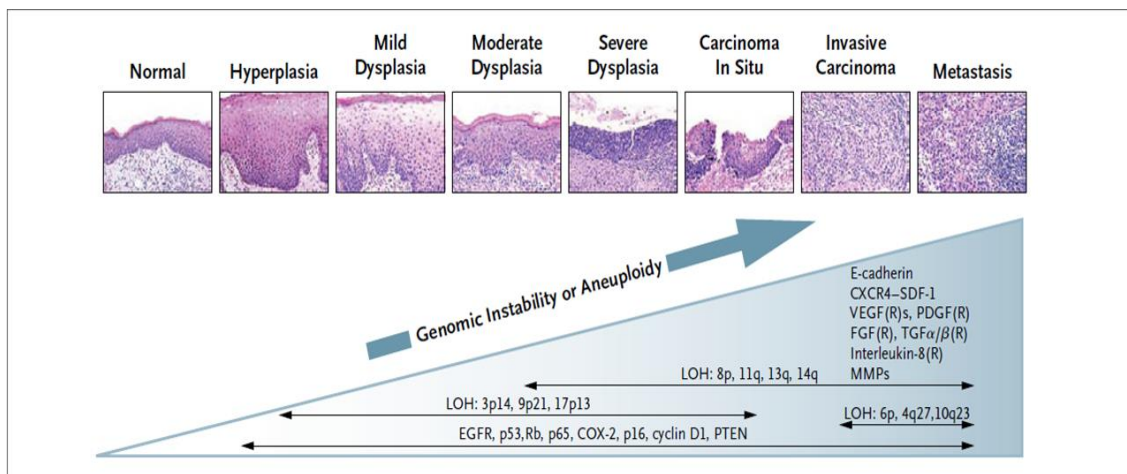


Figura 2: Principales alteraciones genéticas descritas en la progresión de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello. *Haddad RI. N Engl J Med 2008*

En primer lugar podemos situar la historia natural de la carcinogénesis laríngea en el momento que se alteran los genes de las células madre en la zona germinativa suprabasal, de forma que la alteración genética inicial se extiende a las generaciones posteriores sin que haya cambios fenotípicos en la mucosa (“normal”).

Si persiste la exposición a los carcinógenos, las alteraciones genéticas aumentan y se acumulan. Aunque se mantienen algunos mecanismos de control (desequilibrio madurativo/proliferativo leve), acontece la transformación, con manifestación fenotípica de lesión premaligna (displasia), en principio de bajo grado. Si la alteración genética es

más intensa y se modifican en profundidad los mecanismos de control celular (oncogenes, genes supresores y reparadores), se pasa a displasia de alto grado con un desequilibrio madurativo/proliferativo severo, disparando la progresión, cuando se alteran determinados genes. La progresión puede ser lenta y avanzar desde la zona germinativa hacia la superior, o muy brusca desde la zona germinativa hacia el corion, infiltrando la membrana basal en un tiempo breve, sin cubrir pasos intermedios. El distinto comportamiento podría deberse al mayor tiempo de exposición e intensidad con que actúan los carcinógenos sobre el ADN, unido a la susceptibilidad de cada individuo. Al final, la lesión premaligna se precipita de las dos formas hacia la invasión al sobrepasar la barrera de la membrana basal, sin que los mecanismos de control celular sean capaces de frenarla.

Los cambios genéticos y la secuencia de eventos génicos que subyacen en la progresión desde la mucosa normal hacia el carcinoma de laringe aun no están del todo bien definidos. Se estima que se precisan entre 6 y 10 eventos genéticos independientes en una sola célula para el desarrollo de un cáncer en el área de cabeza y cuello.²³ El tiempo de latencia entre la exposición a los carcinógenos y la aparición de la invasividad se aproxima a los 25 años.

Las alteraciones genéticas más tempranas aparecen en las regiones cromosómicas 9p21 (donde reside el gen *p16*), 3p (donde hay al menos tres loci de genes supresores) y 17p13 (donde se localiza el gen *p53*).¹⁷

Los genes supresores de tumores codifican proteínas con función inhibidora sobre el crecimiento y la proliferación celular y se consideran genes recesivos. Cuando se inactivan, la célula adquiere ventajas de crecimiento sobre las demás. Se piensa que la inactivación de los GST juega un papel más importante en la carcinogénesis que la activación de los oncogenes.

A pesar de la importancia de *p53*, la inactivación más frecuente en los carcinomas de cabeza y cuello es la del gen *p16INK4a* (también llamado *CDKN2* o *MTS1*), que se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 9 (9p21). Independientemente del mecanismo de inactivación de *p16* (delección homocigota, mutaciones o hipermetilación),²⁴ la pérdida de función de este gen es uno de los eventos más frecuentes en los carcinomas de cabeza y cuello, habiéndose encontrado ausencia de expresión de la

proteína del *p16* mediante inmunohistoquímica en el 83% de los casos analizados.²⁵ Su producto participa en la regulación del ciclo celular, inhibiendo la activación de los complejos ciclina D-CDK4 quinasa. Por tanto, la pérdida de la función del *p16* facilitaría la activación de dichos complejos ciclina D-CDK4 quinasa y la progresión del ciclo celular. La inactivación del *p16* es uno de los fenómenos más precoces en la carcinogénesis de cabeza y cuello, anterior incluso a la inactivación de *p53*.²⁶ Las pérdidas genéticas en la región cromosómica 9p21-22 ocurren previamente al desarrollo de la atipia histológica, todavía en el estado de hiperplasia epitelial, y se reconocen como un evento inicial en el desarrollo de los CECC.

Estudios adicionales de inestabilidad de microsatélites en el proceso de carcinogénesis laríngea han confirmado la relación entre la displasia y la pérdida de heterocigosidad (LOH) en 3p21, 5q21, 9p21 y 17q13.²⁷

Actualmente el gen *p53* (localizado en 17p13), que se ha encontrado mutado en una amplia variedad de tumores humanos, se considera que juega un papel crucial en la patogénesis de muchos, si no todos, los cánceres humanos. En condiciones normales *p53* funciona como un factor transcripcional y como “guardián del genoma” en el punto de control de daño del ADN en la fase G1 del ciclo celular, de manera que cuando se detecta una alteración en el ADN celular, aumentan los niveles de *p53* y se frena el sistema de replicación celular, dando tiempo a la reparación del ADN, y si ésta no es posible, conduce a la célula a la apoptosis. La inactivación de *p53* permite que se acumulen daños en el ADN, que a la larga pueden derivar en transformación maligna.

En los carcinomas de cabeza y cuello se halla una función anormal de *p53* en al menos el 50% de los casos²⁸. Las anomalías en el *p53* se cree que son un fenómeno de aparición temprana en la carcinogénesis de cabeza y cuello, apareciendo ya en lesiones displásicas.¹⁵

La correlación entre el HPV y el aumento en los niveles de *p53* en los carcinomas de laringe han dado lugar a resultados contradictorios hasta la fecha.²⁹ Se necesita un estudio multicéntrico a gran escala de casos y controles para dilucidar por completo la asociación entre el HPV y el cáncer de laringe, así como para examinar su posible relación con los otros factores de riesgo conocidos.¹⁴

Además se ha demostrado la hipótesis de que la mutación del gen *p53* constituye el evento más inicial en el desarrollo de un “campo de cancerización” en la mucosa oral, identificándose un área de células clonadas con potencial de malignización.³⁰

Aunque en el proceso de carcinogénesis de los tumores de cabeza y cuello se aprecian frecuentemente LOH en el cromosoma 3p,¹⁷ los genes localizados en esta región aún no han sido bien definidos. El gen *FHIT* (tríada de la histidina frágil) ha sido identificado en el cromosoma 3p14 como un posible GST, afectado por deleciones en distintos tumores.

Los oncogenes están presentes en la célula normal en forma de proto-oncogenes. Participan en el control positivo del ciclo celular y se consideran genes dominantes. Cuando se alteran, la proliferación celular se hace incontrolada. La amplificación genética es uno de los principales mecanismos de activación de los oncogenes.

Recientemente ha sido identificada el núcleo (“core”) de amplificación en tumores de laringe y faringe como una región de aproximadamente 1,7 Mb localizada en 11q13.3 que contiene 13 genes amplificados.³¹ Varios genes mostraron un aumento de expresión asociada a amplificación, incluyendo *Ciclina D1/PRAD1 (CCND1)*, *cortactina (CTTN)*, *TPCN2*, *FLJ42258*, *ORAOVI (TAOS1)*, *FGF19*, *FADD*, *PPFIA1*. Se ha dedicado especial atención a *CCND1* y a *CTTN*, considerados los mejores candidatos como genes responsables de la amplificación en 11q13 debido a sus características biológicas y también a su frecuente coamplificación y sobreexpresión en varios tumores. *CCND1* codifica la *Ciclina D1*, una ciclina G1 involucrada en la transición entre las fases G1 hacia S, funcionando como un regulador positivo del ciclo celular.³² La amplificación de la región 11q13 (353 genes) es la activación oncogénica más consistentemente descrita en los carcinomas de cabeza y cuello (del 30 al 60 % de los casos).³³

Hoy en día sabemos que la amplificación de 11q13 es una alteración genética muy frecuente en los CECC, observada en pacientes con enfermedad en estadios avanzados, pobre diferenciación histológica y un crecimiento infiltrante, características asociadas a su vez con un peor pronóstico. Los genes *CCND1* y *CTTN*, presentes en la región amplificada 11q13, han sido estudiados como conductores potenciales de la amplificación en varios tipos de tumores. Pese a que el papel de la amplificación de *CCND1* es aún controvertido,^{34, 35} varios trabajos han demostrado consistentemente la asociación de la

amplificación de *CTTN* con mal pronóstico y progresión tumoral en distintos tipos de cáncer.^{36, 37, 38}

Tomados en conjunto, estos datos indican que aunque la amplificación de *CCND1* y de *CTTN* podrían ser ambas características biológicas relevantes que cooperativamente contribuyen al desarrollo y progresión del cáncer, la fuerte relación entre la sobreexpresión/amplificación de *CTTN* con el pronóstico y resultado de la enfermedad refuerza el papel de *CTTN* como gen conductor de la amplificación de 11q13 en CECC. En los últimos tiempos varios estudios han demostrado la relación existente entre la amplificación de *CTTN*, la sobreexpresión de la proteína y el peor pronóstico y la reducción de la supervivencia en CECC.³⁹

La amplificación de la región cromosómica 11q13 también se ha descrito como una de las alteraciones genéticas observadas habitualmente en carcinomas epidermoides de cavidad oral, donde los genes *TAOS1* (recientemente descubierto) y *CTTN* se han mostrado como importantes conductores de la amplificación de 11q13 en estos tumores.⁴⁰

La regulación coordinada del citoesqueleto de actina es un paso central en la motilidad celular, la invasividad y el desarrollo de metástasis. En los CECC la progresión se caracteriza por la amplificación frecuente de los segmentos cromosómicos 3q26.29, 8q23.24 y 11q13, donde podemos encontrar varios genes importantes en dicho proceso regulador, eventos génicos que se relacionan con una disminución de la supervivencia en los pacientes.⁴¹

La región cromosómica 3q26.29, en la que hay 448 genes, ha sido citada como la región cromosómica más frecuentemente amplificada mediante técnicas de hibridación genómica comparativa (CGH).⁴² Se observa con mayor frecuencia en muestras tumorales con positividad para el HPV que en aquellas negativas.⁴³ La amplificación de 3q26 en CECC se considera una alteración temprana y se relaciona con un mal pronóstico.⁴⁴

La amplificación de la región 8q es también muy frecuente en los tumores de cabeza y cuello y ha sido considerada la segunda en frecuencia entre los eventos iniciales en la progresión de estos carcinomas. La más conocida es la subregión 8q23.24, donde hay 273 genes.

Otro oncogén frecuentemente activado (amplificado y/o sobreexpresado) es el *ERBB1*, localizado en la región cromosómica 7p12, que codifica el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).⁴⁵ La activación de este oncogén estimularía la proliferación celular incontrolada, independiente de la existencia de factores de crecimiento. Se han encontrado amplificaciones de este gen en un 25% de los carcinomas de laringe, y una sobreexpresión de mRNA en el 43%. La mitad de los casos con sobreexpresión ocurren en ausencia de detección de la amplificación genética. Ambas alteraciones aparecen en cánceres de laringe avanzados.⁴⁶ Además el aumento de expresión de la proteína del EGFR es un evento inicial en el proceso de carcinogénesis relacionado con el incremento de las alteraciones genéticas epiteliales, fundamentalmente en la progresión de las lesiones premalignas hacia la malignidad.⁴⁷

La vía de señalización iniciada por la fosfatidil-inositol-3 quinasa (PI3K), cuyo locus está en 3q26.3, se encuentra también frecuentemente activada en estos carcinomas. Otra molécula de esta vía es la serina treonina quinasa AKT (19q13.2). Se ha hallado amplificación y/o sobreexpresión de alguno de los componentes de esta vía en más de un 50% de los casos.⁴⁸ Recientemente se ha identificado un gen supresor *PTEN*, y se cree que mutaciones o pérdidas en él dan lugar a incrementos en los niveles de los productos de PI3K en las células que las presentan. Disregulaciones en la vía PI3K/AKT/PTEN, que promueve la supervivencia celular y la resistencia a la apoptosis, podrían contribuir a los fenómenos iniciales en la tumorigénesis de los CECC y convertirse en una potencial diana terapéutica.

También la amplificación y sobreexpresión del gen *elIF4*, localizado en el cromosoma 4q21, que codifica la proteína eIF4 (factor 4 de iniciación eucariótica), se ha asociado con el riesgo de transformación maligna en tumores de mama y en CECC.⁴⁹ El proto-oncogen *elIF4* se ha encontrado elevado en el 100% de los tumores de cabeza y cuello y se considera con valor pronóstico en la predicción de las recidivas. Varios estudios han mostrado como en los márgenes de resección aparentemente libres de tumor, puede haber un incremento en los niveles de la proteína eIF4 y ello puede predecir el riesgo de recurrencia.⁵⁰

Con menos frecuencia se ha descrito la activación de otros oncogenes como el *MYC*, *ERBB2*, la familia *RAS*, *BCL-2* y *BCL-XL*.⁵¹

La enzima telomerasa es un complejo especializado formado por varias subunidades, con la forma catalítica de la telomerasa (hTERT) actuando como transcriptasa inversa que es capaz de sintetizar el fin telomérico en cada ciclo de división celular. Se ha encontrado reactivación de la telomerasa en el 90% de los carcinomas de laringe.⁵²

No se han identificado causas directamente hereditarias de carcinoma de cabeza y cuello. Aunque hay frecuentes ejemplos de familias con múltiples miembros que desarrollan la enfermedad, los individuos con cáncer de cabeza y cuello usualmente tienen el mismo estilo de vida (es decir, factores de riesgo) a la vez que la misma herencia. Este hecho hace difícil discernir la contribución de los factores genéticos aisladamente. No obstante, los enzimas responsables del metabolismo de los carcinógenos del alcohol y el tabaco y las implicadas en la replicación y reparación del ADN son hereditarios. Esto permite una explicación teórica de una susceptibilidad heredada a padecer carcinomas de cabeza y cuello sin requerir la herencia directa de un GST o un oncogén.⁵³

1.2. Lesiones Premalignas de laringe

1.2.1 Concepto y diagnóstico

Las neoplasias intraepiteliales potencialmente invasivas, habitualmente llamadas lesiones “pre malignas” o “precancerosas”, con origen en el epitelio de las vías aerodigestivas superiores, son todavía hoy objeto de múltiples estudios, definiciones y controversias. Su diagnóstico comenzó siendo exclusivamente clínico, para después hacerse por métodos histopatológicos y morfocitométricos, hasta llegar a los actuales estudios genéticos y moleculares. Podríamos definir estas lesiones como “la forma más precoz de neoplasia maligna que con los medios disponibles somos capaces de detectar”.⁵⁴

La clasificación actual define las lesiones precursoras como alteraciones del epitelio que tienen aumentada la probabilidad de progresión hacia el carcinoma de células escamosas. El concepto de displasia es sinónimo de neoplasia intraepitelial, hiperplasia epitelial atípica, o lesiones de potencial maligno e implica cambios citológicos y arquitecturales.

La localización anatómica de las lesiones premalignas es en teoría similar a la de los CECC. En la práctica destaca su frecuencia en cavidad oral y en la laringe glótica. En la laringe supraglótica, al contrario de lo que ocurre con los carcinomas infiltrantes se detectan menos, quizás por la escasa sintomatología que producen en esta región en sus fases iniciales. En la cavidad oral la exploración es más sencilla y en la glotis dan pronto clínica de disfonía, lo que constituye el principal motivo de consulta. Se limitan principalmente a la población adulta y afectan más frecuentemente a hombres que a mujeres. El grupo de población más afectado es el de los varones de la 6ª década y el intervalo de la edad en el diagnóstico inicial de 48 a 56 años. En cuanto a su etiología la mayoría de los informes coinciden en que el tabaquismo y el abuso del alcohol, y especialmente una combinación de estos dos factores perjudiciales, son los principales factores de riesgo reconocidos en la carcinogénesis laríngea. Existiendo informaciones contradictorias sobre el papel de la polución ambiental, la alimentación, la enfermedad por reflujo gastroesofágico,⁵⁵ y de la infección por HPV. De la misma forma que en el cáncer de laringe, la prevalencia de la infección por HPV en neoplasias intraepiteliales de laringe es muy variable (0-56%), con una prevalencia media del 12,4%.⁵⁶

Las lesiones premalignas de la laringe son bilaterales en 2/3 de los casos y es rara su aparición en el borde superior y comisuras.⁹ Las lesiones pueden ser muy restringidas y crecer exofíticamente, o ser predominantemente planas y difusas, hecho en parte relacionado con el espesor de la capa de queratina. Su superficie es rugosa, pueden ser marrón oscuro a rojo (Eritroplasia), quizás debido a una vascularización más visible, o recubiertas de unas placas circunscritas o difusas blanquecinas (Leucoplasia). Algunas lesiones leucoplásicas aparecen ulceradas (6,5%) o en combinación con eritroplasia (15%).⁵⁷

Estudios realizados en nuestra región han observado cómo el grado más alto de displasia se obtiene a los 60-62 años, aproximadamente cuatro años antes del carcinoma invasor.⁵⁸ La incidencia estimada varía en todo el mundo y depende de la cantidad, forma y tipo de exposición a los diversos agentes carcinógenos.

La separación virtual entre lesión premaligna y neoplasia invasiva la constituye la capa basal, siendo la progresión natural de la displasia intraepitelial desde la zona germinativa basal hacia la zona madurativa suprabasal del epitelio. El término de neoplasia intraepitelial es el más aceptado actualmente al considerar como límite la

membrana basal, siendo su ruptura y la infiltración del tejido conjuntivo la diferencia con la neoplasia invasiva.

La Microlaringoscopia es el método estándar para el diagnóstico y tratamiento endoscópico de las lesiones premalignas de laringe. En los servicios de Anatomía Patológica de nuestros hospitales se sigue realizando de rutina el estudio clásico con hematoxilina-eosina, analizando las muestras con microscopía óptica convencional. Hay que tener en cuenta que el análisis histopatológico tiene un alto componente subjetivo en la interpretación de las muestras, tanto entre distintas personas (variabilidad interobservador), como en la misma, pero en momentos diferentes (variabilidad intraobservador), tal como han demostrado varios estudios.^{59,60}

En general se cree que las lesiones leucoplásicas tienen un bajo riesgo de transformación laríngea, la leucoeritroplasia un riesgo intermedio y las lesiones eritroplásicas puras el mayor riesgo de desarrollar un carcinoma.⁶¹ Sin embargo ninguna de estas imágenes de la laringoscopia puede ser utilizada como un indicador de los cambios en el epitelio, y el análisis histopatológico de estas lesiones es obligatorio para determinar su potencial biológico.

El estudio de las fases iniciales de la enfermedad tumoral está condicionado por la enorme dificultad de definir cuándo ocurre verdaderamente la malignización. Así pues el diagnóstico histopatológico de las lesiones premalignas en la laringe debe ser guiado por el diagnóstico clínico, tratando de descartar siempre una lesión más avanzada y buscando el estudio de una muestra lo más representativa posible.

Es básico enviar la muestra entera para el examen histopatológico, y una estrecha colaboración entre el patólogo y el clínico es necesaria para el desarrollo de métodos de clasificación más objetivos y reproducibles.⁶² Dado que hasta el momento no somos capaces de establecer con precisión el riesgo de malignidad, son necesarios nuevos estudios, incluidos genéticos, de las lesiones premalignas de laringe para adelantar cambios en su comportamiento biológico.

En fechas recientes han surgido nuevas técnicas diagnósticas como la autofluorescencia y la endoscopia de contacto en el análisis clínico para aumentar la precisión en el estudio de las biopsias laríngeas.⁶³

La autofluorescencia se basa en la capacidad de la enzima FMN (flavin mono nucleótido) para emitir en las células normales fluorescencia verde al ser expuesta a la luz ultravioleta. Se ha demostrado en ciertos trabajos que las células neoplásicas tienen una concentración de FMN significativamente menor y por lo tanto no exhiben el mismo grado de fluorescencia.⁶⁴

Para mejorar el examen de la endolaringe, desde hace ya algunos años, utilizamos de manera rutinaria endoscopios rígidos con varios ángulos. La endoscopia de contacto de la laringe es una nueva técnica endoscópica que posibilita la visualización de las células del epitelio laríngeo “in vivo” e “in situ”.⁶⁵ En la transición de la mucosa normal al cáncer es posible, con esta técnica, identificar la presencia de queratosis, las queratosis asociadas a displasia, las displasias graves, las lesiones iniciales del HPV, etc. Sin embargo se requieren más estudios para incrementar la sensibilidad y especificidad de estas pruebas, así como avances técnicos que ayuden a reducir el número de casos falsos negativos y falsos positivos. La Endoscopia compacta es la última modificación existente y combina la autofluorescencia con la endoscopia de contacto.⁶⁶

En el tratamiento de las lesiones premalignas de laringe, la estrategia terapéutica consiste en eliminar de forma completa la lesión, a ser posible garantizando la función, y evitar así la recidiva de la enfermedad. La microcirugía clásica o con láser es el tratamiento de elección. Las recidivas con la técnica de microcirugía clásica se sitúan alrededor del 14% en displasia leve, 20% en moderada y 33-35% en la severa.⁶⁷ Hoy en día con la incorporación del láser se consigue un corte más preciso, garantizando la exéresis completa y el mantenimiento de una función vocal aceptable.⁶⁸ En lesiones de alto grado e incluso en cánceres microinvasivos la cirugía láser consigue un 90% de curaciones, pero es necesario reintervenir al 24-30% de pacientes en los dos primeros años.⁶⁹ Cuando aparece una nueva lesión o una recidiva, otra intervención quirúrgica es obligatoria. En otras series las recidivas tras el láser se sitúan en el 9% y la progresión a cáncer invasivo en el 8%.⁷⁰ El láser presenta muchas ventajas, pero entre sus inconvenientes destaca el deterioro del tejido que vamos a estudiar y la tendencia a resecar más tejido del necesario al hacer un corte tangencial.⁷¹ La inyección submucosa en la cuerda vocal de una solución fisiológica facilita la excisión.⁷²

La radioterapia ha sido utilizada de manera eficaz en casos de carcinoma *in situ*, con un control local en algunos estudios del 95%,^{73,74} y buenos resultados funcionales,

aunque la radiomucositis es la regla. Sin embargo otros autores discrepan al obtener peor control local.⁷⁵ Además los pacientes tratados con radioterapia exclusiva desarrollan cáncer invasivo en el 19%, mientras que si el tratamiento es quirúrgico esta progresión se reduce al 15%.⁷⁶ No podemos desdeñar el riesgo de un cáncer radioinducido en otros lugares de la mucosa de las vías aéreas, aunque resulta difícil distinguirlo de su evolución natural.⁷⁷

Lo más adecuado sería reservar la radioterapia a un segundo escalón, después del fracaso de la microcirugía (clásica o láser), cuando existe progresión a malignidad, con el fin de preservar esa alternativa terapéutica.^{78,79} Se están desarrollando nuevas alternativas de tratamiento aún en estudios preliminares, como la terapia fotodinámica.

Como se expuso anteriormente, la carcinogénesis en los CECC es un proceso en múltiples pasos debido a la acumulación de alteraciones genéticas sucesivas que afectan el área expuesta a los carcinógenos y la Quimioprevención es la utilización de agentes sintéticos o naturales para intentar revertir el fenómeno de carcinogénesis. Se ha postulado un tratamiento médico que combina varias estrategias y emplea distintos fármacos. Los primeros utilizados en lesiones premalignas de cavidad oral fueron los retinoides sintéticos (ácido 13-cis retinoico) a dosis elevadas, aunque se han descrito frecuentes efectos secundarios.^{80,81} Recientemente se ha demostrado que pacientes con displasias laríngeas presentan niveles bajos de folatos; se han realizado estudios administrando ácido fólico durante tres meses obteniendo respuestas al tratamiento en un 72% casos (28% completas, 44% parciales), con menores efectos secundarios que los provocados por los retinoides.⁸² Se han investigado también terapias con los inhibidores selectivos de COX-2 (Celecoxib, Rofecoxib,...)⁸³ y con los inhibidores de EGFR; desarrollando anticuerpos monoclonales dirigidos contra su dominio extracelular (Cetuximab (Erbix®)), así como pequeñas moléculas inhibidoras de la actividad tirosinquinasa (Erlotinib, Gefitinib(Iressa®)). Han surgido también últimamente fármacos antiangiogénicos dirigidos frente a VEGF (Bevacizumab) que han demostrado efecto antineoplásico en modelos animales.⁸⁴ Aunque a día de hoy el lugar de la Bioquimioprevención en el tratamiento de las lesiones premalignas de laringe es limitado, parece ser un área de investigación muy prometedor y que puede dar lugar al desarrollo de un método no invasivo y efectivo de manejo de estas lesiones en el futuro.

1.2.2 Clasificaciones: valor pronóstico

Numerosos estudios y clasificaciones han intentado correlacionar los cambios fenotípicos y genéticos con el comportamiento biológico de las lesiones. Uno de los objetivos más importantes en la valoración de las lesiones premalignas de laringe es conocer el riesgo de transformación maligna de las mismas. Los datos en la literatura son controvertidos debido a la diversidad de criterios morfológicos utilizados en las diferentes clasificaciones. Es a menudo difícil para el clínico ponerse de acuerdo en la mejor opción terapéutica para un determinado grado de lesión premaligna diagnosticado mediante los medios convencionales.

En la clínica se han usado distintas clasificaciones de las lesiones premalignas sirviéndose del estudio histopatológico clásico. La primera que se propuso tenía como elemento común la queratosis, que es un término estrictamente histológico que denota la presencia de láminas de queratina en las capas superficiales del epitelio; bien como ortoqueratosis, en la que las células mantienen el núcleo, o paraqueratosis, donde lo pierden.⁵⁴ La queratina se manifiesta en la clínica como una placa blanquecina que afecta a una zona de la mucosa y se denomina leucoplasia. La mucosa de las vías aerodigestivas superiores en condiciones normales está cubierta por un epitelio no queratinizado, por lo que su presencia es anormal.

Pronto al concepto de queratosis se le añadió el de atipia, que consiste en una serie de lesiones histológicas nucleares (hipercromatismo, polimorfismo, aumento de mitosis) y tisulares con mayor relevancia. La atipia tiene tres grados (leve, moderada y severa) según el grado de espesor de epitelio al que afecte (1/3 inferior, 2/3 o todo).⁸⁵

Otros autores sugirieron un esquema similar, pero utilizando como eje central de su clasificación la hiperplasia histológica, entendida como un aumento en la altura y espesor del epitelio escamoso debido al incremento del número de células. Clínicamente la zona hiperplásica está engrosada y pierde su brillo habitual.⁸⁶

Hoy en día la clasificación más utilizada, desde que fue introducida por Hellquist⁸⁵ es la que se basa en la displasia, concepto relacionado con la atipia pero con una visión más amplia de la lesión en el tejido epitelial, uniendo a las características de la atipia celular los cambios citológicos y arquitecturales (retraso y diferenciación anormal, disqueratosis, ensanchamiento unión epitelio-estroma). La displasia se divide en tres

grados: leve (afecta 1/3 inferior o basal), moderada (1/3 basal y 1/3 medio) y severa (todo el epitelio).

Esta clasificación, recomendada por la OMS, supuso un considerable avance por tener un carácter pronóstico evolutivo hacia el carcinoma invasivo, según aumenta la gravedad de la displasia, lo cual nos da una idea de las posibilidades de progresión de las lesiones premalignas laríngeas.⁸⁷ En ella se equiparan los conceptos de displasia severa y carcinoma *in situ*, refiriéndose a una displasia que afecta a todo el espesor del epitelio pero manteniendo intacta la membrana basal. En la tabla 1 podemos ver los nuevos criterios definidos para el diagnóstico de displasia.⁹

Tabla 1: Criterios usados para el diagnóstico de displasia

Arquitectura	Citología
Estratificación irregular del epitelio	Variación anormal del tamaño nuclear (Anisocariosis)
Pérdida de polaridad de las células basales	Variación anormal de la forma nuclear (Pleomorfismo nuclear)
Crestas interpapilares delgadas y alargadas	Variación anómala del tamaño celular (Anisocitosis)
Aumento del número de figuras de mitosis	Variación anormal del tamaño celular (Pleomorfismo celular)
Mitosis en las capas superficiales	Aumento de la proporción núcleo/citoplasma
Queratinización individual (Disqueratosis)	Aumento del tamaño nuclear
Globos córneos en las crestas interpapilares	Figuras de mitosis atípicas
	Aumento del tamaño y número de los nucléolos
	Hipercromasía

La evidencia de la incapacidad de los patólogos para establecer una clasificación unificada se manifiesta en la nueva revisión de la OMS, donde se presentan simultáneamente tres esquemas histológicos de clasificación de las lesiones precursoras, que difieren conceptual y terminológicamente, y tan solo se puede establecer entre ellos una cierta analogía aproximada (Tabla 2). La más comúnmente utilizada es la

clasificación de la OMS,⁸⁸ que aplicaremos en este estudio. La clasificación de Ljubljana de las lesiones epiteliales hiperplásicas laríngeas fue originalmente propuesta en 1971.⁸⁹ Su fundamento consiste en dividir las lesiones según criterios morfológicos en dos grupos básicos: benignas (hiperplasia escamosa e hiperplasia basal/parabasal) y potencialmente malignas (hiperplasia atípica y CIS). Existe una tercera clasificación que divide las lesiones premalignas en tres subtipos, de menor a mayor grado de severidad, y las denomina neoplasias intraepiteliales escamosas (SIN):⁹⁰ SIN-1 es el equivalente a displasia leve, SIN-2 correspondería a displasia moderada y SIN-3 unificaría también los conceptos de displasia severa y carcinoma in situ.⁹¹

Tabla 2: Esquemas histológicos de clasificación de las lesiones precursoras

2005 Clasificación OMS	Neoplasia intraepitelial escamosa (SIN)	Clasificación de Ljubljana: Lesiones intraepiteliales escamosas (SIL)
Hiperplasia cels. escamosas		Hiperplasia cels. Escamosas (simple)
Displasia leve	SIN-1	Hiperplasia Basal/Parabasal
Displasia moderada	SIN-2	Hiperplasia Atípica
Displasia severa	SIN-3	Hiperplasia Atípica
Carcinoma in situ	SIN-3	Carcinoma in situ

Esta graduación se creía que tiene valor pronóstico general en la progresión de las lesiones a cáncer invasivo, y así a mayor grado de displasia, mayor probabilidad de progresión. Sin embargo, no existe una correlación individual directa entre el grado de displasia y el desarrollo del cáncer invasivo, de modo que, sólo de forma excepcional, las lesiones pasan por todos sus grados antes de romper la membrana basal e invadir el corion subyacente. Es un hecho habitual que la carcinogénesis se produzca de forma brusca y no se detecten los pasos intermedios del proceso.

Así pues se observa según avanzamos en su conocimiento cómo lesiones con un aspecto clínico inocente de leucoplasia o histopatología de displasia leve evolucionan a

neoplasias infiltrantes,⁹² e incluso lesiones con aspecto clínico-histológico de normalidad presentan alteraciones cromosómicas y moleculares precoces.⁹³ En su evolución algunos casos de lesiones premalignas de laringe son reversibles, algunas persisten y otras progresan hacia el carcinoma pese a un correcto seguimiento y tratamiento.

Es posible que haya una relación directa entre la alteración del ADN en las células madre del epitelio y la progresión histopatológica de las lesiones.^{94,95} Así, cuanto más leve sea el daño genético, más posibilidad de desarrollar una lesión premaligna al conservarse mejor los sistemas madurativos de la cinética celular. Por el contrario, cuanto más intensa sea la alteración genética, más posibilidad de una carcinogénesis explosiva, desarrollando un cáncer invasivo sin pasar por etapas intermedias.

En el epitelio normal se aprecia un equilibrio proliferación/maduración. Los agentes carcinógenos actúan sobre la capa germinativa basal del epitelio con distinta intensidad.⁹⁶ En algunos casos, la alteración genética de las células germinales en la zona basal es leve y se mantienen algunos mecanismos madurativos del epitelio normal, originándose un fenómeno de displasia. Si la carcinogénesis es brusca y se produce un desequilibrio maduración/proliferación intenso desde el primer momento, la neoplasia intraepitelial pasaría desde la zona basal al estroma directamente, debutando como carcinoma infiltrante.

La evidencia clínica muestra cómo por cada seis casos aproximadamente de carcinomas invasivos, sólo diagnosticamos uno de neoplasia intraepitelial. Posiblemente debido al tiempo que transcurre entre el inicio de la lesión y su diagnóstico. La evolución de displasia a carcinoma sólo se observa en el 10% de casos y sólo de forma excepcional se aprecia la progresión de la displasia en todos sus grados hasta la malignización.⁵⁸ La evaluación conjunta de las variables como sexo, edad, hábitos tóxicos, aspecto, localización, tratamiento, imagen clínica, evolución, presencia de disqueratosis y displasia, nos determinan el perfil de riesgo para desarrollar un cáncer invasivo. Uno de los factores de riesgo más importantes para la transformación maligna sigue siendo el no cambiar el estilo de vida, en los pacientes que mantienen el hábito tabáquico y el consumo de alcohol pueden ser estos los factores reales en el desencadenamiento de la invasividad.

Se han realizado grandes esfuerzos para correlacionar el diagnóstico histopatológico de las muestras con su posterior curso clínico. En la tabla 3 (tomada de

Gale y cols⁹⁷) podemos comparar la gran variabilidad de los datos de transformación maligna en los diferentes estudios a lo largo de las últimas décadas. Existe una gran discrepancia en lo relativo al riesgo de progresión hacia el carcinoma basándonos en la clasificación histopatológica de las lesiones premalignas de laringe: en el grupo de la hiperplasia escamosa desde el 0% hasta el 4,1%, en el grupo de la displasia leve, SIN I y LIN I desde 0% hasta 11,5%, en el grupo de la displasia moderada, SIN II y LIN II desde 4% hasta 24% y en el grupo de la displasia severa, SIN III, LIN III, hiperplasia atípica varía desde 9,3% hasta 57% en función de los distintos trabajos.

Tabla 3: Progresión de las lesiones premalignas de laringe hacia carcinoma (tomada de *Gale y cols*⁹⁷)

	Squamous hyperplasia keratosis without atypia	Mild dysplasia, SIN I, LIN I, basal-parabasal hyperplasia	Moderate dysplasia, SIN II, LIN II	Severe dysplasia, SIN III, LIN III, Atypical hyperplasia, CIS*	Total
Hellquist <i>et al.</i> (1982) ¹¹		2/98 (2%)	3/24 (12.5%)	4/39 (10.2%)	9/161 (5.6%)
Olde Kalter <i>et al.</i> (1987) ¹⁷		2/35 (6%)	12/50 (24%)	4/8 (50%)	18/93 (19.3%)
Velasco <i>et al.</i> (1987) ¹⁶	1/46 (2.2%)		6/31 (19.3%)	1/5* (20%)	8/86 (9.3%)
Sillamniku <i>et al.</i> (1989) ¹⁹	18/604 (2.9%)	15/204 (7.3%)	4/23 (17.4%)	25/90 (27.7%)	62/921 (6.7%)
Blackwell <i>et al.</i> (1995) ²²	0/6 (0%)	3/26 (11.5%)	5/15 (33.3%)	4/9* (44.4%)	12/56 (21.4%)
Plch <i>et al.</i> (1998) ¹⁸⁹	0/24 (0%)	0/63 (0%)	1/25 (4%)	4/7* (57.1%)	5/119 (4.2%)
Gallo <i>et al.</i> (2001) ²⁶	6/143 (4.1%)	4/56 (7.1%)	6/28 (21.4%)	3/32 (9.3%)	19/259 (7.3%)
Ricci <i>et al.</i> (2003) ²⁷	2/86 (2.3%)	2/44 (4.5%)	5/36 (13.9%)	3/21 (14.3%)	12/187 (6.4%)
Crissman <i>et al.</i> (1993) ⁵		7/362 (1.9%)	41/230 (17.8%)	42/367 (11.4%)	90/959 (9.3%)
Present study		12/1089 (1.1%)		17/179* (9.5%)	29/1268 (2.3%)

CIS, carcinoma *in situ*; LIN, laryngeal intraepithelial neoplasia; SIN, squamous intraepithelial neoplasia.

*CIS is not included.

Estas significativas variaciones se pueden atribuir sin duda a los distintos criterios morfológicos utilizados, tipo de tratamiento y al desigual período de seguimiento de los pacientes.

El diagnóstico histopatológico de estas lesiones y su división en distintos grados, pese a ser el más usado en la actualidad, aún no tiene la importancia pronóstica que se le ha querido dar, pues la progresión de la neoplasia intraepitelial es compleja y no sigue unos pasos lógicos. Otro punto a tener en cuenta es la dificultad para estandarizar los resultados obtenidos por observación visual, no siendo en muchos casos reproducibles por distintos patólogos, incluso por el mismo en distintos momentos.⁹⁸

De acuerdo a estudios realizados en nuestro ámbito, el 7-15% de todas las NIL (Neoplasia intraepitelial laríngea) evolucionan a cáncer invasivo, pero ni su aspecto clínico ni histopatológico permite predecir dicha progresión.⁹⁹ Algunos autores señalan que esta progresión es menor en NIL 3 (9,5%) con respecto a NIL 2 (21,5%), reduciéndose en NIL 1 (7,1%) y queratosis-hiperplasia (4,2%), debido al tratamiento más radical de la NIL de alto grado.¹⁰⁰ En el caso de aparición del cáncer invasivo en los primeros meses tras el diagnóstico de la lesión premaligna, la posibilidad de que la primera biopsia fuera tomada de un sitio inadecuado en la mucosa laríngea alterada debe ser considerada.¹⁰¹

Un meta-análisis en el que se han correlacionado datos de más de dos mil biopsias de pacientes con lesiones leucoplásicas de cuerda vocal analizadas histopatológicamente y el riesgo de transformación maligna, ha mostrado cómo más de la mitad de lesiones no presentaron displasia y pese a ello, en ciertos casos se asoció mayor riesgo de desarrollar un carcinoma invasivo. Aun así el grado de displasia presente en la biopsia inicial parece correlacionado con el riesgo de desarrollar carcinoma epidermoide.¹⁰²

Se ha sugerido también que la localización de la lesión premaligna en la glotis representa un importante factor de riesgo de progresión hacia el cáncer invasivo a pesar de un correcto tratamiento. De cualquier forma, uno de los estudios con las mayores series de displasias laríngeas existentes en la literatura no ha sugerido ningún incremento significativo del riesgo de progresión hacia carcinoma invasor en pacientes con la comisura anterior afecta en comparación con la afectación exclusiva de una cuerda vocal.¹⁰³

Tampoco el tipo de tratamiento de las displasias de laringe en las distintas series analizadas aporta datos significativos del riesgo de progresión hacia la malignidad. La mayoría de los datos disponibles se refieren a casos de displasia severa/CIS. A pesar de los importantes avances de los últimos años, las lesiones premalignas de laringe siguen dando lugar a unos índices de morbi-mortalidad similares a los conocidos desde hace décadas (Tabla 4).

Tabla 4: Evolución natural de la displasia laríngea hacia la malignidad (distintos tratamientos). *Sadri M, et al. Eur Arch Otorhinolaryngol 2006;263;843*

Author	Year	Number of patients	Grade	Intervention	Progression to invasive carcinoma	
Hellquist et al. [43]	1982	98	Keratosi with/without dysp	Further excision 23 cases	2/98 (2%)	
		24	Moderate dysp		3/24 (12.5%)	
		39	Severe dysp		8/39 (20.5%)	
Miller and Fisher [44]	1971	203	CIS	Stripping/radiotherapy Larngofissure 60, radio 43, stripping 100/203	32/203 (15.7%)	
Stenerson et al. [45]	1988	19	CIS	No treatment	46%	
		16	CIS		3/16 (19%)	
Stenerson et al. [46]	1991	16	Severe dysp/CIS	Radiotherapy	3/16 (19%)	
		41	Severe dysp/CIS		19/41 (46.5%)	
Pilch et al. ([41])	1998	63	Mild dysp	None	None	
		25	Moderate dysp		None	
		11	Severe dysp		4 cases had radiotherapy	
Hintz et al. [42]	1981	18	CIS	Radiotherapy	5/18 (28%)	
		27	CIS		Watchful observation	17/27 (63%)
Sllamniku et al. [47]	1989	204	Keratosi with	Not mentioned	15/204 (7.4%)	
		23	Mild dysp		Separately	4/23 (17.4%)
		90	Moderate dysp		25/90 (27.8%)	
Hojset et al. [48]	1989	128	Severe dysp		6/128 (4.7%)	
		9	Mild dysp		4/9 (44.5%)	
		10	Moderate dysp		4/10 (40%)	
Blackwell et al. [49]	1996	26	Severe dysp	Radiotherapy/observation	3/26 (11.5%)	
		15	Mild dysp		Endoscopic Procedure	5/15 (33%)
Olde Kalter et al. [50]	1987	38	Moderate dysp	Kleinsasser's classification	None	
		62	Simple		None	2/38 (5.2%)
		70	Hyperplasia		None	17/62 (27.5%)
			Hyperplasia with atypia	Radiotherapy 62, cordecotomy 2, 6 none	1/70 (1.5%)	

La conjunción de la observación clínica con el examen patológico y citológico, exigirá mayor colaboración entre los distintos especialistas para el estudio y orientación de las lesiones consideradas premalignas. El perfeccionamiento de los sistemas ópticos, los colorantes vitales, los marcadores celulares, las técnicas de iluminación, el láser y las técnicas de registro de imagen, contribuirán al desarrollo del estudio de las lesiones premalignas. Comparando las tres discutidas clasificaciones, es poco probable que se reúnan en un futuro reciente. Por otro lado, los futuros descubrimientos en el campo de la biología molecular podrían ser la base para la aparición de una clasificación unificada de las lesiones premalignas.

1.3 Marcadores moleculares estudiados

La forma de establecer una secuencia lógica en los cambios fenotípicos y genotípicos es a través de un modelo de progresión tumoral que simplifica el proceso de transformación y evolución de los tumores. La mayoría de estos modelos valoran la progresión espacio-temporal de las lesiones macroscópicas e histopatológicas, así como las principales entidades clínicas constatadas durante el desarrollo tumoral. Establecido el modelo clínico-patológico, sobre él se aplican y sistematizan los diversos procedimientos de investigación.

En el área de la cabeza y el cuello las lesiones precursoras avanzadas poseen anomalías genéticas cualitativas y cuantitativas similares a las del carcinoma escamoso.

Muchos de los estudios en lesiones premalignas de laringe están de acuerdo en que la severidad de las alteraciones epiteliales determina el riesgo de progresión hacia la malignidad.¹⁰⁴ Sin embargo ningún marcador ni grupo de marcadores ha sido identificado aún como un predictor válido del riesgo de progresión de estas lesiones. El papel de las proteínas reguladoras del ciclo celular como p16, p21, p27, p53, ciclina D1 ha sido extensamente estudiado en distintos trabajos en las últimas dos décadas. Pese a ello ninguno ha sido considerado un marcador de riesgo útil hasta la fecha.¹⁰⁵

Dado que la clasificación histopatológica de las alteraciones del epitelio laríngeo es altamente subjetiva, se ha intentado mediante la inmunotinción de marcadores de la entrada del ciclo celular, como la proteína-2 de mantenimiento del mini cromosoma (Mcm-2) y Ki-67, aumentar su objetividad y fiabilidad. Se encontró mínima expresión de ambos en las capas más superficiales del epitelio normal o con un grado menor de displasia, en contraste con la sobreexpresión visible en CIS y muestras de carcinoma epidermoide de laringe.¹⁰⁶ Lo que sugiere que ambos podrían ser buenos biomarcadores para diferenciar lesiones premalignas de otras lesiones invasivas.

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) es una proteína que también en varias investigaciones ha mostrado mediante IHQ altos niveles y resultados estadísticamente significativos en los casos que después evolucionaron hacia la malignidad. La displasia se asocia con un patrón de proliferación celular anormal y con una gran actividad proliferativa, de este modo la inmunotinción de PCNA surge como un posible marcador de la potencial progresión tumoral y puede ayudar por tanto en la elección de las mejores opciones terapéuticas.¹⁰⁷

También con técnicas de IHQ se evalúa la expresión de Metalotionina (MT), y su correlación con la proteína p53 y el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) en lesiones premalignas. Hay estudios que sugieren que la expresión de MT puede jugar un papel en la progresión, desde las fases iniciales del proceso de carcinogénesis, independientemente de los niveles de p53.¹⁰⁸

Un estudio en el que mediante IHQ se midió el grado de expresión de las proteínas Ki-67, PCNA y p53 en 32 lesiones premalignas de cuerda vocal concluyó que tanto Ki-

67 como PCNA son marcadores correlacionados con el grado de displasia, mientras la expresión de p53 no mostró datos estadísticamente significativos.¹⁰⁹

En otro estudio retrospectivo con IHQ para determinar la expresión del PCNA, la proteína del gen supresor de tumores *p53* y la proteína antiapoptótica *bcl-2*; apreció una correlación significativa entre los niveles de p53 y PCNA en estas lesiones, así como una sobreexpresión de *bcl-2*. La correlación entre la evolución de las displasias y el nivel de PCNA estaba en el límite de la significación estadística.¹¹⁰

Debido al aumento en los niveles de expresión de ciertos inhibidores de las ciclinas dependientes de quinasas (CDKIs), como p21 y p27 en carcinomas de laringe, se ha sugerido la existencia de un mecanismo por el que las células tumorales toleran el efecto inhibitor de estas proteínas en la progresión del ciclo celular.¹¹¹ Si bien hay investigaciones específicas en displasias laríngeas que no asocian la expresión de estos factores moleculares con la evolución a cáncer y sí observan una relación significativa entre el grado histológico y el riesgo de malignización.¹⁰⁴

La expresión inmunohistoquímica de CD44, que es una glicoproteína de membrana con diversas funciones en la interacción célula-célula y célula-substrato, fue examinada en otro estudio y correlacionada con las proteínas de los genes *Rb* y *p53*, con los índices proliferativos Ki-67 y PCNA y con los datos clínico-patológicos. Observándose que la sobreexpresión de CD44 podría formar parte de los múltiples mecanismos que contribuyen al desarrollo y evolución de las lesiones preneoplásicas de laringe y podría por tanto ser un predictor de riesgo de transformación maligna válido.¹¹²

La expresión de las proteínas alteradas de los genes *Rb* y *p53* parece intervenir activamente en el proceso de carcinogénesis del epitelio laríngeo, probablemente desde las fases iniciales y se correlacionaría con la actividad proliferativa. A su vez la sobreexpresión de *Rb* se relaciona con la progresión a cáncer y se podría considerar como un indicador de mal pronóstico en lesiones premalignas de laringe.¹¹³

La expresión de la proteína FHIT ha sido estudiada recientemente en CECC y lesiones premalignas, observándose una disminución de su expresión en el 42% de los tumores y en el 23% de las lesiones premalignas. Los resultados de este estudio indican que las alteraciones de FHIT pueden jugar un papel importante en los eventos iniciales de la carcinogénesis.¹¹⁴

Se ha demostrado la presencia de *hTERT* mRNA en el epitelio laríngeo, que se incrementa progresivamente en función del grado de anormalidades epiteliales. Estos resultados sugieren que la reactivación de la telomerasa es un evento inicial en la carcinogénesis laríngea, detectable en el estadio de lesiones premalignas de laringe. De cualquier forma, otras alteraciones genéticas parecen necesarias para la progresión hacia el carcinoma de laringe.¹¹⁵

Las moléculas de adhesión son unas proteínas responsables de la adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular, cuya pérdida de función se ha relacionado con la invasión tumoral y las metástasis. Entre las moléculas relacionadas con la adhesión celular cuya expresión se ha encontrado reducida en los carcinomas de cabeza y cuello se hallan el complejo E-cadherina-cateninas¹¹⁶ y las CD44.¹¹⁷ Por otra parte, la quinasa de adhesión focal (FAK), que transmite al núcleo las señales procedentes de las integrinas (otras moléculas de adhesión) se encuentra sobreexpresada en estos carcinomas.¹¹⁸

En otro estudio se concluyó que la Citoqueratina-17 (CK17) es un potencial marcador inmunohistoquímico de la transformación a cáncer en lesiones premalignas de laringe con un alto grado de sensibilidad y especificidad. Se baraja su futuro valor en la determinación de los bordes libres de tumor en los análisis intraoperatorios.¹¹⁹

La amplificación del oncogén *PI3KCA* ha sido estudiada en lesiones premalignas de laringe por nuestro grupo de trabajo, observándose en el 39% de muestras analizadas, aunque no se apreciaron correlaciones estadísticamente significativas con ningún parámetro clínico-patológico.⁴⁸

En 2004 se desarrolló un estudio mediante PCR cuantitativa para determinar los genes específicos de la abundancia mitocondrial en un gran espectro de lesiones precursoras de cabeza y cuello, donde se demostraba que el ADN mitocondrial es directamente proporcional al grado histopatológico. Así pues el alto contenido mitocondrial podría ser un marcador de alteración genética y una medida sustitutiva de la gradación histológica.¹²⁰

No obstante, a pesar de los múltiples marcadores analizados hasta la fecha, como se mencionó, no se hallado ningún marcador molecular que se asocie de forma consistente con el riesgo de progresión a carcinoma en las lesiones premalignas de laringe.

1.4 Selección de marcadores

1.4.1. Cortactina

Uno de los eventos moleculares que parecen estar implicados en la invasión que caracteriza a los carcinomas son los cambios en el citoesqueleto. Los cambios dinámicos en el citoesqueleto de actina son básicos en una gran variedad de eventos celulares, incluyendo la motilidad celular, la adhesión, la fagocitosis, la citoquinesis, el movimiento de las partículas intracelulares en el citoplasma y la organización de los receptores transmembrana. El citoesqueleto de actina en la periferia celular consiste en una red de filamentos de actina altamente organizados asociados con la membrana citoplasmática.

Hoy en día se sabe que las proteínas involucradas en las vías de señalización de tirosin-quinasa y la familia de Rho GTPasas juegan un importante papel cooperando en la regulación del citoesqueleto de actina. Las moléculas que intervienen en estas vías, como la cortactina (codificada por el gen *CTTN*), participan en la integración y mediación de las respuestas celulares.

La identificación de los genes reguladores del citoesqueleto de actina localizados en las regiones 3q26.29 (*PKC*, *PLD1*, *PIK3CA*, *Claudin-1*, *ACK1*,...) , 8q23.24 (*Autotaxin*, *MIMI*, *FAK*, *DDEF1*,...) y 11q13 (*CDC42EP2*, *Cofilin-1*, *FOSL1*, *RIN1*, *CTTN*, *Shank2*, *PAK1*,...) podrá ayudar a una mejor comprensión de los eventos moleculares que controlan la invasión y las metástasis en los CECC y otros tumores que contengan esas amplificaciones (Figura 3).¹²¹

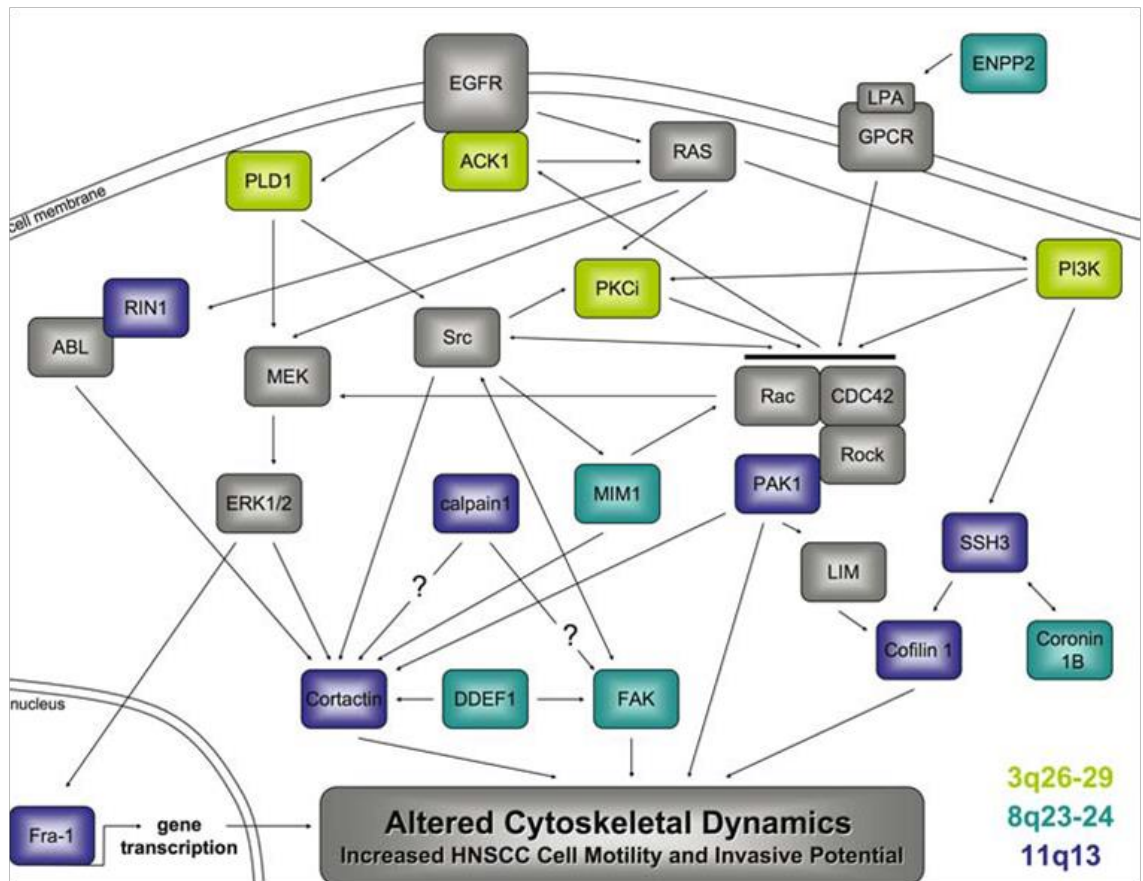


Figura 3: Proteínas celulares implicadas en las alteraciones de la dinámica del citoesqueleto. Se aprecia como cortactina juega un papel clave. Kelley LC, et al. Clin Exp Metast 2008

La cortactina es una proteína que está relacionada con la organización del citoesqueleto y las estructuras de adhesión celular, cuyo gen codificante (*CTTN*, antes *EMS1*) se encuentra en el mismo cromosoma que la ciclina D1, 11q13.¹²² Como se comentó, este gen se encuentra sobreexpresado en un 31% de tumores de cabeza y cuello, y se relaciona con un fenotipo de alta malignidad.³³

La cortactina es una proteína de unión a la actina relacionada según se ha visto con vías de señalización de tirosin-quinasas y Rho GTPasas que desembocan en cambios estructurales en el citoesqueleto que a su vez pueden dar lugar a alteraciones en la morfología celular. Así pues, estos estudios determinan que juega un importante papel en la integración y mediación de vías de señalización basadas en la fosforilación de tirosina que regulan la red de filamentos de actina, la organización de los receptores

transmembrana y las dinámicas en la membrana. Se cree que la fosforilación de cortactina es promovida directamente por la proteína Src, si bien el mecanismo exacto no ha sido del todo demostrado hasta la fecha.¹²³

La función de la cortactina es regulada por otras proteínas, y la función de estas a su vez se cree que es dependiente de los niveles relativos de expresión de cortactina. La activación de las proteínas Cdc42 y Rac interactúa con gran cantidad de reguladores de la red de filamentos de actina. Es además necesaria para la migración celular.

Algunas células malignas durante el fenómeno invasivo dan lugar a prolongaciones o pseudópodos, que no son más que estructuras ricas en actina asociadas a la degradación de la matriz extracelular, que colectivamente ayudan en la motilidad celular. Se ha descrito el papel de la cortactina como promotor de la secreción de metaloproteasas (MMPs) necesarias para la degradación de la matriz en el proceso de formación de estas estructuras, que se han visto también implicadas en el fenómeno invasivo.¹²⁴ La secreción de MMP-2 y MMP-9 es dependiente del nivel de expresión de cortactina, aunque el mecanismo exacto mediante el cual se regula deberá ser dilucidado en futuros trabajos. La aparición de estas prolongaciones también llamadas podosomas en células tumorales que sobreexpresan cortactina, sugiere que esta proteína juega un papel en la formación y regulación de estas estructuras y en las dinámicas de membrana. Ello puede ofrecer una explicación a la asociación entre la sobreexpresión de cortactina y el peor pronóstico en CECC y otros tipos de carcinomas.

Otros estudios describen la función de la cortactina como estabilizador de las redes de filamentos de actina al promover mediante la activación del complejo Arp2/3 (proteína relacionada con la actina 2/3) la polimerización de dichos filamentos. Se encarga así de la regulación de las adhesiones intercelulares,¹²⁵ proceso importante en los fenómenos de motilidad celular.

La adhesión celular a la matriz extracelular está mediada por integrinas, que agrupan filamentos de actina, proteínas de unión a la actina y proteínas de señalización, promoviendo de esta manera la formación de adhesiones focales.¹²⁶ Las uniones célula-célula mediadas por cadherina se acompañan de una profunda remodelación del citoesqueleto de actina. El complejo Arp 2/3 está implicado en la formación de contactos de adhesión basados en E-cadherina.¹²⁷

Tomados en conjunto estos resultados sugieren que la activación de Arp 2/3 y la estabilización de la red de actina es una función celular propia de la cortactina, aunque no exclusiva de ella, y su actividad está directamente relacionada con la motilidad basada en los filamentos de actina, así como indirectamente a través de la interacción de proteínas de unión a SH3 que regulan de forma dinámica la organización de proteínas transmembrana. El incremento de los niveles de cortactina demostrado en diversos trabajos en diferentes tipos de cánceres aumenta la adhesión de las células tumorales, la migración celular y facilita el fenómeno de invasividad.^{128,123} Inversamente, la disminución en la expresión de cortactina ocasiona una menor capacidad de motilidad celular e invasión.

La amplificación de la región cromosómica 11q13 se ha descrito en varios tipos de carcinomas en humanos, incluyendo aquellos de cabeza y cuello, mama, pulmón, esófago, ovario y vejiga.¹²² Esta alteración genética es una de las que con mayor frecuencia se observan en CECC (20-52%), encontrándose correlación con el crecimiento agresivo tumoral, la presencia de metástasis linfáticas y un peor pronóstico. En un estudio previo realizado en nuestro grupo se investigó el papel de *CCND1* y *CTTN* como genes conductores (“drivers”) de la amplificación en 11q13, con resultados originales que demostraban por primera vez la asociación entre la amplificación de *CTTN* (pero no *CCND1*) con un peor pronóstico y disminución de la supervivencia en pacientes con CECC³³. Sugiriendo que la amplificación de este gen, contribuye directamente a la severidad tumoral. Líneas celulares aisladas de pacientes con amplificación de la región 11q13 muestran incremento de los niveles de mRNA y de la proteína correspondiente, evidenciándose que la sobreexpresión de cortactina juega un importante papel en los tumores con amplificación de 11q13. En cuanto a *CTTN*, dado que su producto participa en la interacción celular con la matriz extracelular, como veremos más adelante, la alteración de sus propiedades podría conducir a un incremento de la invasividad y la capacidad metastásica.

La amplificación de los genes *TAOS1* y *CTTN*, ambos localizados en 11q13, ha sido analizada en muestras de lesiones premalignas orales (leucoplasias) y carcinomas epidermoides de cavidad oral, concluyendo que pueden ser un evento inicial en la carcinogénesis oral. La co-amplificación de ambos tiende a ocurrir más frecuentemente en carcinomas avanzados que en los primeros estadios.⁴⁰ Los resultados de este estudio muestran la asociación de la amplificación de estos genes con el incremento de las

metástasis linfáticas, una pobre diferenciación histológica y un estadio clínico avanzado. Así pues *TAOS1* y *CTTN* han sido considerados potenciales candidatos a biomarcadores en el diagnóstico y pronóstico de los carcinomas orales.

Basándonos en observaciones sobre la localización de cortactina y su función en células no transformadas, la sobreexpresión de dicha proteína en distintos tipos de tumores ha sido propuesta como marcador de un aumento de la migración celular y el potencial metastásico.¹²²

Aunque aún son pocos los estudios que se centran exclusivamente en el análisis de la cortactina en los CECC. En un análisis multivariante reciente, se demostraba que el estado de expresión de la proteína constituye un factor pronóstico independiente para el riesgo de recurrencia local, supervivencia total y libre de enfermedad. Se vio como un subgrupo de pacientes en los que se sobreexpresaba la cortactina y tenían bajos niveles de EGFR, presentaban cifras de supervivencia comparables a los que tenían un incremento en la expresión de ambas: EGFR y cortactina.¹²⁹ Estos hallazgos identifican a la cortactina como un marcador pronóstico que podría tener relevancia e incluso como una posible diana molecular en el desarrollo de nuevos agentes antitumorales.

Otro análisis multivariante revela que sólo la sobreexpresión de cortactina se correlaciona con la mortalidad específica de enfermedad independientemente de otras proteínas como la ciclina D1 y/o FADD. De todos los genes localizados en el amplicón 11q13, la expresión de cortactina es el mejor predictor de supervivencia reducida libre de enfermedad en estadios avanzados de los carcinomas de laringe.¹³⁰ Se plantea la posibilidad de que en un futuro los niveles de cortactina en las lesiones premalignas y en los tumores nos puedan guiar en la clínica y llegar a modificar incluso los esquemas terapéuticos.

1.4.2. Podoplanina

La Podoplanina es una pequeña (38 kDa) glicoproteína transmembrana tipo-mucinoso cuya función fisiológica concreta permanece a día de hoy desconocida. Se cree que es importante en la linfangiogénesis (no en la formación de vasos sanguíneos), proceso que se ha visto relacionado con el riesgo de progresión en carcinomas de cabeza y cuello,¹³¹ y que se expresa en el ser humano en condiciones normales en los podocitos renales, músculo esquelético, placenta, pulmón, corazón, mama, y glándulas salivares,^{132,}

¹³³. Ocasionalmente la expresión focal de podoplanina se puede apreciar en áreas circunscritas de la capa basal de la epidermis.¹³⁴

Dado que la podoplanina se expresa en los vasos linfáticos pero no en el endotelio vascular, ha sido usado con frecuencia como marcador específico para las células del endotelio linfático y la linfangiogénesis.¹³⁵

Se ha observado como la deficiencia de podoplanina dificulta la normal formación de vasos linfáticos y causa linfedema en modelos animales donde se elimina su expresión.¹³⁶ También es capaz de inducir la agregación plaquetaria *in vitro*.¹³⁷

Ha quedado comprobada su sobreexpresión en algunos tipos de tumores, incluyendo los CECC. Esta proteína se expresa en el citoplasma y en la membrana. En el epitelio escamoso histológicamente normal adyacente a los tumores sin embargo no se detectaba.¹³⁸ Lo que indica que la podoplanina podría tener funciones biológicas en células tumorales. Su expresión en los CECC es generalmente heterogénea y con dos patrones básicos: de forma difusa en muchas células tumorales y con expresión focal en la periferia proliferativa de los nidos celulares sin expresarse en las áreas centrales.

La expresión de podoplanina también se ha encontrado aumentada en el proceso de regeneración epidérmica, y se especula con el hecho de que la podoplanina forme parte de una vía que regule la migración celular en el contexto de la reparación tisular y que esa misma vía sea utilizada por las células cancerígenas durante la invasión tumoral, dando a estas células ventajas selectivas frente a las otras células epiteliales.¹³²

Durante la llamada transición epitelio-mesenquimal (EMT), propia del fenotipo migratorio, las células pierden marcadores epiteliales, como la E-cadherina y sufren la ganancia de marcadores mesenquimales, como N-cadherina y vimentina. La invasión de grandes nidos celulares en el tejido circundante, llamada habitualmente migración celular colectiva es menos conocida. Recientes estudios experimentales han demostrado que la podoplanina es mediadora en vías que posibilitan este tipo de migración celular colectiva y la invasión *in vivo* e *in vitro* (Figura 4).¹³⁹

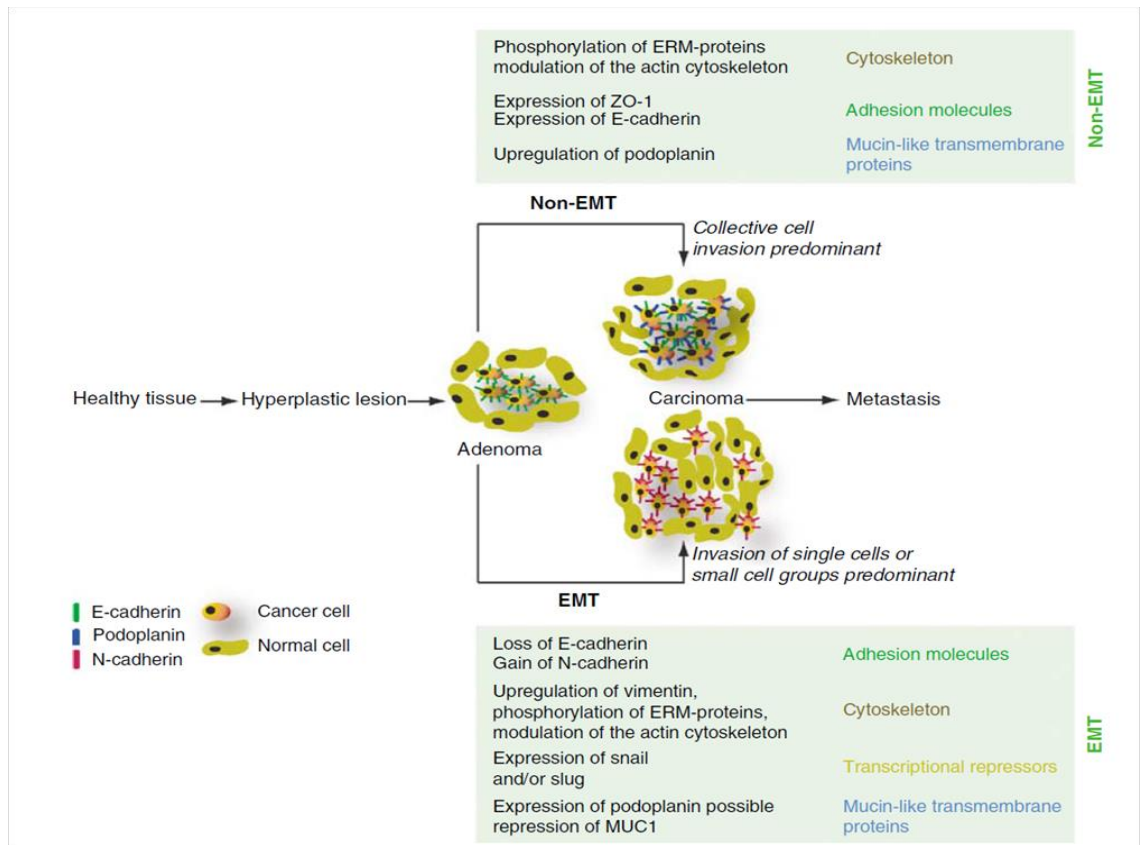


Figura 4: Mecanismos que intervienen en la migración celular. Wicki A, Christofori G. *Br J Cancer* 2007

La invasión en células que expresan podoplanina parece estar también en relación con la actividad de las metaloproteasas de la matriz (MMPs) y puede ser reprimida por TIMP2, un inhibidor de MMP.

Aunque las funciones biológicas de la podoplanina no han sido aun totalmente definidas, su sobreexpresión puede promover la formación de prolongaciones celulares e incrementar la adhesión, migración y formación de células del endotelio vascular tubulares, lo que sugiere un papel de la podoplanina en la reorganización del citoesqueleto. Se cree que interviene también en la modulación de la actividad de algunas proteínas de la familia Rho GTPasas, en particular RhoA. Además puede disminuir la capacidad de adhesión célula-célula y la expresión de E-cadherina.

Un estudio reciente ha encontrado que el anticuerpo monoclonal D2-40 reconoce de forma específica la podoplanina humana, que tiene características bioquímicas muy

similares al antígeno M2A, una glicoproteína oncofetal expresada en células neoplásicas del epitelio germinativo testicular.¹⁴⁰

La expresión de la glicoproteína podoplanina se ve aumentada en gran cantidad de diferentes tipos de cáncer en el organismo, que incluyen el carcinoma epidermoide de la cavidad oral, esófago, pulmón, cérvix y la piel, así como en disgerminomas ováricos, mesoteliomas y ciertos tumores del SNC.^{141,132} Esta proteína ha surgido como nuevo posible marcador para el diagnóstico y pronóstico en determinados tumores.

La sobreexpresión de podoplanina se ha identificado como marcador de progresión hacia la malignidad y peor pronóstico en cáncer oral, siendo considerado predictor de riesgo de metástasis linfáticas regionales y de una disminución de la supervivencia. La podoplanina no se expresaba en las células del epitelio normal de la mucosa oral pero si se detectaba en determinadas lesiones premalignas orales¹³³. Los pacientes cuyos tumores expresaban intensamente esta proteína tenían una mayor frecuencia de metástasis linfáticas en relación con aquellos cuyos tumores la expresaban de forma débil. No se encontraban en este estudio asociaciones significativas entre la expresión de podoplanina y otras características clínico-patológicas. En el análisis multivariante correspondiente tan sólo la clasificación N y podoplanina se relacionaban con una disminución específica de la supervivencia en los tumores de cavidad oral.

Otros estudios en lesiones premalignas orales,¹⁴² cuyas características y estudio histopatológico es comparable al de las lesiones premalignas de laringe, demuestran que este marcador del endotelio linfático se expresa frecuentemente en las leucoplasias orales y en conjunción con el análisis histopatológico puede servir como un valioso biomarcador para predecir el riesgo de desarrollar un cáncer en los pacientes con lesiones premalignas orales.

En las lesiones preinvasivas orales la podoplanina se expresaba en la membrana celular, predominantemente en el estrato basal, aunque en ciertas muestras se extendía a la capa suprabasal, en forma de uno o múltiples nidos. La expresión se incrementa conforme aumenta la severidad de la displasia histológica. Podoplanina ha sido considerada en este estudio el único factor pronóstico independiente para el desarrollo de un cáncer oral en el análisis multivariante, lo que sugiere que nos podría dar más

información que el examen histopatológico convencional. De cualquier forma otros factores son necesarios para promover la expansión clonal de las células alteradas.

1.4.3. Quinasa de adhesión focal (FAK)

La amplificación de la región 8q23-24 ha sido definida como un importante evento inicial en la carcinogénesis de los CECC.¹⁴³ El gen *FAK/PKT2* es uno de los más importantes de dicha región y codifica la proteína FAK (*Focal Adhesion Kinase* o quinasa de adhesión focal) que actúa como un transductor de señales hacia el núcleo desde las integrinas que son otras moléculas de adhesión.¹⁴⁴ La autofosforilación de FAK en Y397 es un evento crucial para su activación y función.

La pérdida de adhesión entre las células epiteliales y la matriz extracelular es una de las vías fundamentales que utilizan las células tumorales para favorecer la migración, invasión y metástasis. La quinasa de adhesión focal participa en el control de las interacciones entre las células y la matriz que posibilita la estabilidad de los tejidos.¹¹⁸

Hay evidencias que sugieren que la FAK es una “llave” en las vías de señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).¹⁴⁵ La identificación de la mayoría de los procesos biológicos regulados por FAK se ha hecho en células no neoplásicas, donde se ha documentado bien como la activación de FAK contribuye a la regulación de las integrinas y las señales del factor de crecimiento que promueven la adhesión celular, el anclaje independiente, la motilidad celular y la apoptosis.¹⁴⁶

La inmunotinción de FAK se demostró en la mucosa morfológicamente normal, de las vías aerodigestivas superiores, de forma débil y confinada a la capa basal del epitelio, con un patrón de expresión citoplasmático. Se ha observado tinción positiva en células del endotelio vascular y en células acinares de las glándulas seromucosas, no detectándose expresión en el estroma.

Hoy en día ha quedado claro que FAK ejerce muchos de sus efectos en la motilidad a través de la asociación quinasa-independiente con multitud de señales y proteínas efectoras. Entre ellas está la capacidad de FAK para influenciar la activación de Cdc42, Rac y Rho, ayudando a regular el citoesqueleto de actina durante el movimiento celular (Figura 3).¹²¹

Se ha logrado la disminución de la activación de FAK en líneas celulares tratadas con el inhibidor de la quinasa Src Dasatinib.¹⁴⁷

La sobreexpresión de la proteína FAK ha sido documentada en los CECC,¹⁴⁸ aunque no siempre se corresponde con una amplificación del gen *FAK*. Ocurre como evento en las primeras fases de la transformación maligna en los carcinomas epidermoides, asociándose a un aumento de la invasividad y el potencial metastásico de estos tumores. Un trabajo reciente ha demostrado que la inhibición de FAK ocasiona un bloqueo de la formación de metástasis.¹⁴⁹

En un trabajo en tumores de la región supraglótica llevado a cabo por nuestro grupo de estudio no se encontraron relaciones entre los niveles de expresión proteica de la quinasa de adhesión focal con el tamaño tumoral (T), el estadio ni el grado de diferenciación histológico. Tan sólo se asociaba la sobreexpresión con las metástasis linfáticas.¹¹⁸ Se demostraba además por primera vez que el aumento de expresión ocurría en todas las fases del proceso de tumorigénesis de los CECC.

Ha sido estudiada también la sobreexpresión de esta proteína de adhesión en otros tipos de tumores como los de mama y cérvix uterino,¹⁵⁰ siendo correlacionada la expresión proteica de FAK con el potencial invasivo de un tumor y el peor pronóstico de los pacientes en tumores como los de esófago.¹⁵¹ Se ha probado a su vez como diana molecular en algunos estudios con terapias biológicas.¹⁵²

Pese a todas estas investigaciones en distintas clases de tumores, el mecanismo responsable de esta sobreexpresión aún no ha sido determinado. Niveles elevados de FAK mRNA se detectaron en carcinomas de colon, mama, próstata y hepatocarcinomas.¹⁵³ Niveles incrementados del número de copias del gen *FAK* se han demostrado en carcinomas epidermoides y en algunas líneas celulares tumorales.¹⁵⁴ De cualquier manera en estas líneas el nivel de amplificación genética tampoco se relacionaba con el grado de expresión proteica.¹¹⁸

La amplificación de *FAK* en los CECC se ha asociado frecuentemente con ganancias en otros 2 genes de la misma región 8q24, *PTP4a3* y *KHDRBs3*,¹¹⁸ que se han encontrado co-amplificados con él en muchos casos. Sin embargo otro oncogén, *C-MYC*, uno de los más conocidos y estudiados en distintos tipos de tumores, sólo en un 30% casos se acompaña del aumento en el número de copias de *FAK*.

1.8 Hipótesis de trabajo

Hoy en día la identificación de biomarcadores moleculares para la predicción del riesgo de progresión en lesiones premalignas se ha convertido en uno de los principales desafíos en la investigación del cáncer.

La banda cromosómica 11q13 es un segmento genómico frecuentemente amplificado en un gran número de tumores del ser humano y ha sido definida como un potencial biomarcador de riesgo para el diagnóstico y pronóstico¹²². En nuestro grupo de estudio se ha demostrado esta asociación reforzando el papel central de *CTTN* en el amplicón 11q13 y en la progresión tumoral.¹⁵⁵ De cualquier forma el papel del gen y la proteína cortactina en los estadios iniciales de la tumorigénesis y su posible implicación en la transformación maligna y en la adquisición de un fenotipo invasor aún debe ser mejor investigado.

También hemos demostrado previamente que la expresión de FAK aumenta en las etapas precoces de la carcinogénesis laríngea, lo cual, sumado a su demostrado papel en los fenómenos de invasión tumoral, sugiere que FAK podría emplearse como biomarcador del riesgo de progresión de las lesiones premalignas laríngeas.¹¹⁸

La observación de que la proteína podoplanina se expresa intensamente en algunas lesiones hiperplásicas y displásicas adyacentes a los tumores primarios indica que su sobreexpresión ocurre de manera temprana en la tumorigénesis de cabeza y cuello. También existe alguna investigación previa de nuestro grupo de estudio acerca de la importancia de la linfangiogénesis en la progresión tumoral de los CECC.¹³¹ Se necesitan más estudios para determinar su papel en la iniciación y progresión de los CECC y establecer si la sobreexpresión de la podoplanina en lesiones premalignas de cabeza y cuello, como las displasias laríngeas puede servir como biomarcador inmunohistoquímico para predecir el desarrollo de un carcinoma invasivo.

Las moléculas involucradas en la alteración de la dinámica del citoesqueleto de actina (FAK y Cortactina) durante el proceso de invasión de los CECC parecen ser biomarcadores del riesgo de evolución hacia la malignidad en las lesiones preinvasivas de laringe. También la podoplanina parece estar implicada en este proceso de invasión. La determinación de la expresión de estas proteínas mediante IHQ es fácil de realizar y podría servir de ayuda en el manejo de estos pacientes.

2-OBJETIVOS

El objetivo global de este trabajo es investigar el significado biológico de la expresión de cortactina, podoplanina y FAK en lesiones premalignas laríngeas y contribuir a un mejor conocimiento de los mecanismos y consecuencias de la alteración de la expresión de estas proteínas. Consideramos que, desentrañar el impacto que la expresión de estas proteínas tiene en el desarrollo y en la invasividad de los carcinomas epidermoides de laringe, reviste interés no sólo por su contribución a un mejor conocimiento de la biología tumoral, sino porque permitiría ampliar extraordinariamente las perspectivas de descubrir nuevos marcadores pronósticos y posibles dianas moleculares para futuras terapias. El diagnóstico de las fases iniciales de la carcinogénesis laríngea podría ayudar a mejorar el control, la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes con CECC, reduciendo los costes económicos.

Planteamos los siguientes objetivos específicos:

1- Analizar la expresión de las proteínas cortactina, podoplanina y FAK en lesiones premalignas (displasias) de laringe, y en los tumores malignos de ellas derivados en los casos que progresaron, comparándola con la de los tejidos sanos adyacentes mediante técnicas de inmunohistoquímica.

2- Determinar la frecuencia de la amplificación de los genes *CTTN* y *FAK* en las mismas lesiones premalignas de laringe y tumores derivados de ellas.

3- Establecer la correlación entre el grado de expresión de cortactina, podoplanina y FAK en las lesiones premalignas con el estado genético, evolución clínica de los pacientes y el resultado de la enfermedad.

3- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- Selección de pacientes y muestras de tejidos

Para disponer de una muestra homogénea, se obtuvieron del archivo de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Central de Asturias muestras de 82 pacientes tratados quirúrgicamente en nuestro centro entre los años 1996-2004 y diagnosticados de lesiones premalignas de laringe: 12 displasias leves (15%), 26 displasias moderadas (32%), y 44 displasias severas/CIS (54%) (Tabla 5). Las muestras fueron obtenidas retrospectivamente siguiendo las guías del comité de ética del Hospital. Se seleccionaron secciones representativas de los tejidos para el estudio y el diagnóstico fue confirmado para cada lesión por un patólogo con experiencia, utilizando para ello la clasificación de la OMS de 2005.

Tabla 5: Distribución de muestras y pacientes en función del diagnóstico histopatológico

Grado histológico	Muestras	Edad media diagnóstico (años)
Displasia Leve	12	60
Displasia Moderada	26	64,3
Displasia Severa/CIS	44	65,2
Total de casos	82	64

Ninguno de los pacientes había recibido cirugía, radioterapia y/o quimioterapia previa y todos los pacientes tenían un seguimiento mínimo de 5 años o hasta que se produjo la progresión hacia la malignidad. Aquellos pacientes tratados en nuestro centro con diagnóstico de displasia laríngea y de un carcinoma laríngeo en el plazo de 6 meses fueron excluidos del estudio previamente al análisis. De aquellos pacientes que desarrollaron en la evolución posterior un carcinoma epidermoide se obtuvieron también los bloques tumorales.

Todos los pacientes, excepto dos, eran varones, y todos consumidores habituales de tabaco y alcohol. La edad media fue de 64 años (rango 36-83 años). En la tabla 5 se resumen los diagnósticos histopatológicos para las distintas muestras y pacientes, así como la edad media de diagnóstico de los mismos.

3.2.- Análisis de la amplificación génica mediante PCR cuantitativa

La PCR cuantitativa, PCR en tiempo real o Q-PCR (del inglés “Quantitative Polymerase Chain Reaction”) es una variante de la PCR utilizada para la cuantificación de ADN o de ARN mensajero (mRNA) de una muestra. Para ello emplea, del mismo modo que la PCR convencional (Figura 5), un molde de ADN, unos cebadores específicos, dNTPs, un tampón adecuado y una ADN polimerasa termoestable; a dicha mezcla se le adiciona una sustancia marcada con un fluorocromo que, en un termociclador que albergue sensores para medir fluorescencia, permite medir la tasa de generación de uno o más productos específicos para determinar el número de copias o la cantidad relativa de una determinada secuencia de ADN o ARN.

A diferencia de la PCR de punto final (PCR convencional), la PCR en tiempo real permite cuantificar el grado de producto obtenido en cualquier momento de la amplificación mediante la señal de fluorescencia.

La cuantificación del producto se produce mediante la adición de fluoróforos (como SYBR Green, que emite fluorescencia al unirse al ADN de doble cadena, como se muestra en la Figura 6) que se unen al amplicón de forma cuantitativa, de manera que a mayor producto mayor fluorescencia se emitirá. Los sistemas de PCR a tiempo real detectan la cantidad de fluorescencia producida en cada ciclo de PCR y los programas de análisis representan dicha fluorescencia gráficamente respecto al número de ciclos. La cantidad de amplicón producido es proporcional al número de moléculas de ARN/ADN iniciales.

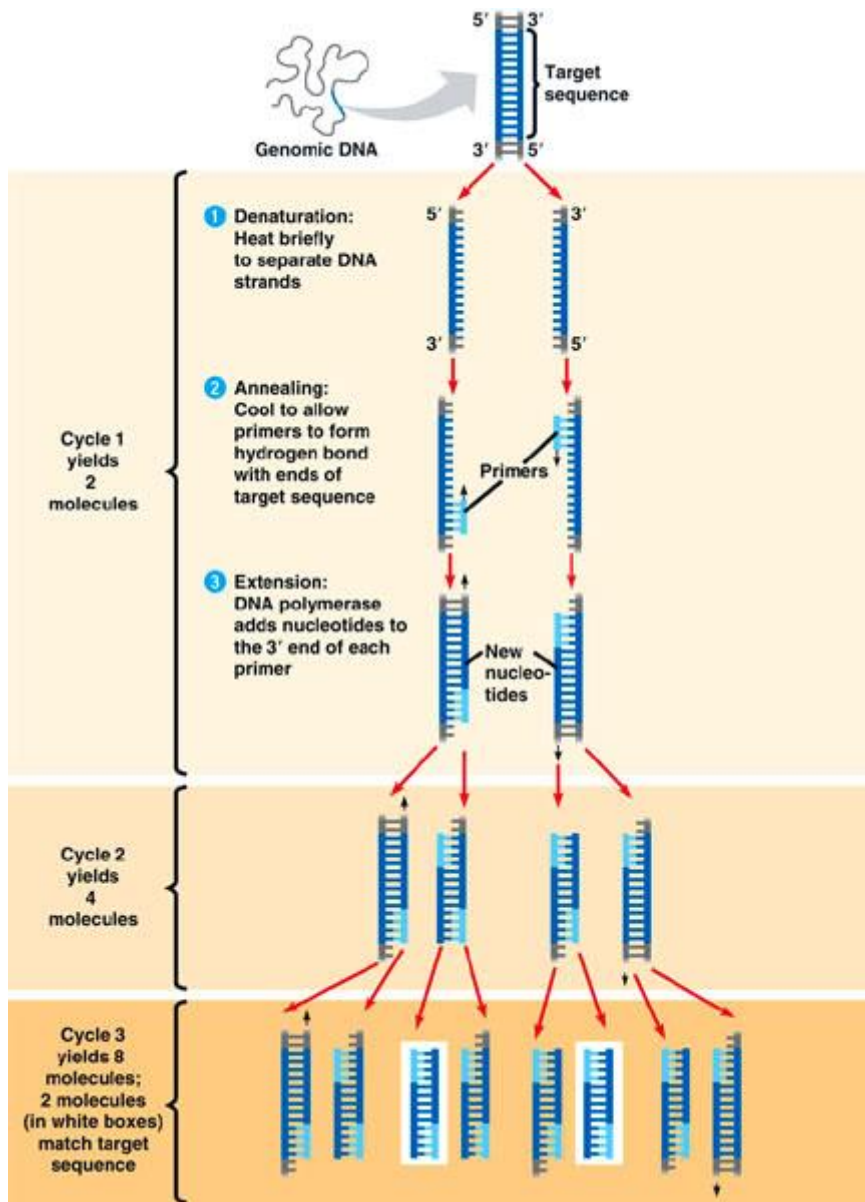


Figura 5: Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para analizar la amplificación del gen de la cortactina (*CTTN*) y del gen de la quinasa de adhesión focal (*FAK*) se extrajo ADN de muestras de tejido parafinado, que se utilizó como molde en reacciones de Q-PCR.

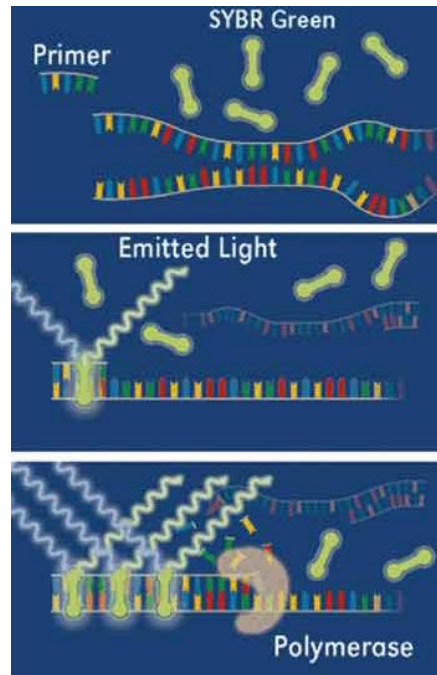


Figura 6: Esquema ilustrativo de Q-PCR utilizando SYBR Green. SYBR Green es un colorante que emite señal fluorescente al unirse al ADN de doble cadena. **A)** Cuando el ADN está desnaturalizado el colorante SYBR está libre. **B)** El colorante se une en el anillamiento de los cebadores (“primers”) y emite fluorescencia. **C)** SYBR Green se une al ADN de doble cadena producido a medida que la polimerasa va elongando y la señal fluorescente aumenta.

3.2.1.- Extracción de ADN genómico de tejido parafinado

Se tomaron 5 cortes de tejido parafinado, con un espesor de 5 μm cada uno, y se desparafinaron mediante tratamientos sucesivos con xileno (3 incubaciones de 10 min a 45°C y centrifugación), seguido de un lavado con etanol 100%. Tras centrifugar, el tejido se secó en bloque térmico a 50°C durante 30-60 min.

Tras el desparafinado, se procedió a la lisis del tejido incubando en agitación a 55°C durante toda la noche en tampón de lisis ATL (QIAGEN) al que se añadió 1 mg/ml de proteinasa K. Una vez comprobada la completa disgregación del tejido se procedió a la extracción del ADN con ayuda del sistema QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN), siguiendo los protocolos establecidos por la casa comercial. La concentración y pureza del ADN obtenido fueron evaluadas mediante medida de las absorbancias a 260 y 280

nm en un nano-espectrofotómetro TRAYCELL FIBRE-OPTIC ULTRA-MICRO CELL (Hellman®)

3.2.2.- Análisis de la amplificación de CTTN y FAK mediante PCR Cuantitativa (Q-PCR)

El análisis cuantitativo con PCR en tiempo real (Q-PCR) se llevó a cabo en un detector de secuencias del tipo ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA), utilizando Power SYBR Green PCR Master Mix, 6,25 ng de ADN molde y oligonucleótidos diseñados de acuerdo al Primer Express software v2.0 con las siguientes secuencias:

<i>CTTN</i>	Fw, 5' - GATCTCATTGACCCTGATGACATC-3'	Rv, 5'-CGTACCGGCCCTTGCA-3'
<i>FAK</i> (<i>PTK2</i>)	Fw, 5' - AATGATGTAATCGGTCGAATTGAA-3'	Rv, 5' - TGGAGGCATTGGTAATCTTTCC-3'

Y para los genes de referencia *TH* (*Tirosina hidroxilasa*, localizado en 11p15) y *PLAT* (*Plasminogen activator tissue*, localizado en 8p11):

<i>TH</i>	Fw, 5' - TGAGATTCGGGCCTTCGA-3'	Rv, 5' - GACACGAAGTAGACTGACTGGTACGT-3'
<i>PLAT</i>	Fw, 5' - ACTGACTGCCTCCTCGTCCTT-3'	Rv, 5' -CGAAACTGAGGCTGGCTGTACT-3'

Todas las muestras se ensayaron por triplicado y también se incluyó un blanco sin cDNA molde, como control negativo. Como control de tejido sano se utilizó ADN procedente de muestras de amígdala de pacientes no oncológicos (muestra calibradora). Las condiciones de PCR empleadas fueron: un paso inicial de 10 min. a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 seg. a 95°C y 1 min a 60°C. El análisis de las curvas de disociación mostró un único pico correspondiente a un único producto, cuyo tamaño se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y tinción con bromuro de etidio.

El número de copias del gen *CTTN* y *FAK* fue calculado aplicando el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$; donde $\Delta\Delta C_T$ representa la abundancia relativa de *CTTN* o *FAK* frente al gen de referencia de copia única (*TH* o *PLAT*) en la lesión premaligna respecto a la muestra calibradora control (amígdala), con $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ premaligna} - \Delta C_T \text{ amígdala}$ y $\Delta C_T = C_T$

(*CTTN*) – C_T (*TH*). Valores superiores a 2.0 fueron considerados positivos, es decir con aumento del número de copias de *CTTN* o *FAK*.

3.3.- Análisis inmunohistoquímico

Los tejidos fijados con formol e incluidos en parafina se cortaron en secciones de 3-4 μm , que fueron adheridas a portas siliconizados Flex IHC (DAKO, Carpinteria, CA, USA). Las secciones fueron desparafinadas con xileno e hidratadas en alcoholes de graduación decreciente según el modo convencional. La recuperación del antígeno fue efectuada usando tampón citrato 10 mM y calentado 10 minutos. Los portaobjetos fueron colocados durante 30 minutos en un medio de suero de cabra para bloquear uniones inespecíficas y posteriormente se incubaron a 4° C durante toda la noche con el anticuerpo monoclonal murino IgG anti-cortactina (Clon 30 de BD Biosciences Pharmingen) a una dilución de 1:200, con el anticuerpo monoclonal murino IgG anti-podoplanina (Clon D2-40, Covance Inc) a una dilución de 1:100, o con el anticuerpo monoclonal murino IgG anti-FAK (Clon 4.47 de Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) a una dilución de 1:250. La inmunodetección fue realizada con el sistema Envision Flex “anti-mouse” empleando como substrato el cromógeno diaminobenzidina (DakoCytomation).¹⁵⁶

Como último paso se contrasta la preparación mediante hematoxilina durante un minuto. Después de la tinción, las preparaciones fueron deshidratadas mediante alcoholes de graduación ascendente según el método convencional y montadas con un cubreobjetos usando un medio estándar.

Como controles positivos se emplearon muestras de carcinomas epidermoides de laringe que se sabía que expresaban las proteínas a estudio. También se emplearon controles negativos que consistieron en muestras en las que se omitió el anticuerpo primario. Los portaobjetos fueron analizados de forma aleatoria, sin datos clínicos por dos investigadores. La tinción fue predominantemente citoplasmática y de membrana.

La cuantificación de la expresión de las proteínas cortactina y FAK se realizó en función de la intensidad de la tinción, usando una escala de 0-3, estableciendo tres categorías de tinción: nula (0), baja (1+), moderada (2+) e intensa (3+), con un alto porcentaje de concordancia interobservador (>95%).

La cuantificación de la expresión de podoplanina en lesiones premalignas de laringe se realizó tal y como ha sido descrito previamente,¹⁴² también en una escala de 0-3, estableciendo varias categorías de tinción: nula (0), restringida a la capa basal del epitelio (1), expresión en las capas basal y suprabasal en al menos un área (2), expresión en las capa suprabasal en al menos dos o más áreas (3). En los carcinomas de laringe, la expresión de podoplanina se cuantificó en una escala de 0-5 según su intensidad de tinción utilizando investigaciones previas,¹³⁸ posteriormente se trasladaron los datos a una nueva escala de 0-3, estableciendo tres categorías de tinción: nula (0), baja (1+), moderada (2+) e intensa (3+).

3.4.- Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa estadístico SPSS versión 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL.). El test Chi cuadrado (χ^2) ha sido utilizado para la comparación entre variables cualitativas (con la corrección de Yates cuando era preciso) y el test T-student para variables paramétricas continuas. La correlación entre la amplificación de ADN y la expresión de la proteína se determinó mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

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

Todos los test fueron en doble sentido. Valores de $P \leq 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

4-RESULTADOS

4.1. Seguimiento clínico

En el grupo de 82 pacientes estudiados en este trabajo hemos observado a lo largo de los 5 años como mínimo de seguimiento una evolución clínica hacia la invasión, manifestada como la constatación de biopsia de carcinoma epidermoide de laringe en sus distintos grados de diferenciación en 28 (34%) pacientes. Los tumores se desarrollaban en el mismo lugar de la lesión premaligna previa y el tiempo medio hasta la progresión fue de 28 meses (rango 11-66 meses), en estos casos también se analizó una muestra representativa del tumor correspondiente. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas atribuibles a la edad ($P= 0,95$) entre el grupo de pacientes que desarrollaron cáncer (media 64 años) y el grupo que no progresó hacia la malignidad (media 63,8 años).

Tras el diagnóstico de la lesión premaligna de laringe, independientemente del grado de la misma, todos los pacientes que aún eran fumadores activos (media de consumo de 55 paquetes-año, rango 15-110 paquetes-año) recibieron las recomendaciones habituales sobre la necesidad del abandono del consumo de tabaco, pese a lo cual 17 de ellos continuaron fumando. La media de consumo de tabaco de los pacientes que acabaron desarrollando un carcinoma invasivo fue de 56,4 paquetes-año, comparándolo con 53,7 paquetes-año de aquellos que no lo desarrolló ($P= 0,56$). De la misma forma no se han encontrado diferencias estadísticas significativas en riesgo de cáncer laríngeo en el subgrupo de pacientes que continuaron fumando (6 de 17 casos, 35%) y los que habían abandonado el hábito (22 de 65 casos, 33%) ($P= 0,77$).

En cuanto a la relación entre progresión a malignidad y el diagnóstico histopatológico, de las 12 muestras informadas como displasia leve se ha comprobado evolución posterior hacia cáncer en 3 de ellos; en las 26 informadas como displasia moderada se vio como en 7 de ellos existe progresión hacia carcinoma; en las restantes 44 muestras, que corresponden a biopsias con un diagnóstico histológico de displasia severa o carcinoma in situ, hemos objetivado que 18 han progresado hacia la malignización. Aunque se aprecia como aumenta la proporción de casos que progresan a carcinoma a medida que aumenta la severidad de la displasia, especialmente en el caso de displasia severa, las diferencias no son estadísticamente significativas ($P= 0,378$; Tabla 6 y Figura 6).

Tabla 6: Evolución de los pacientes a carcinoma en función del diagnóstico histológico

Grado de displasia	Nº casos (%)	Evolución a carcinoma (%)
Leve	12 (15)	3 (25)
Moderada	26 (32)	7 (27)
Severa/CIS	44 (54)	18 (41)
Total	82	28 (34)

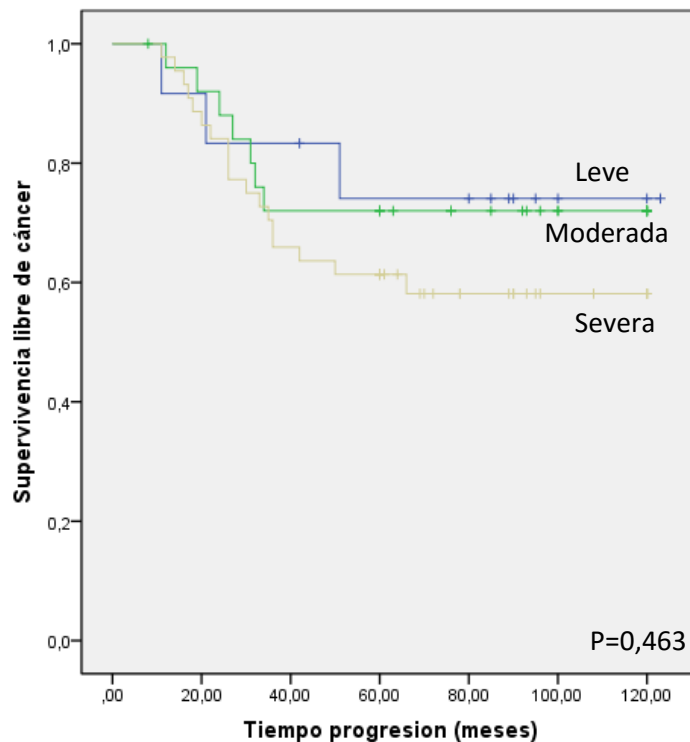


Figura 6: Supervivencia libre de cáncer en función del diagnóstico histológico (grado de displasia)

Durante el período de seguimiento, del grupo de 82 pacientes estudiados en este trabajo hubo 5 pacientes de los que disponemos de más de una muestra, pues tuvieron que ser intervenidos en más de una ocasión por presentar una nueva lesión macroscópica

en la laringe. En la Tabla 7 se resumen los diagnósticos de las diferentes muestras disponibles de un mismo paciente, así como el grado de tinción de los distintos marcadores estudiados en las mismas. Para el análisis final en estos pacientes se tomó como muestra representativa aquella de mayor grado de displasia.

Tabla 7: Pacientes con más de una muestra durante el seguimiento e inmunotinción observada en dichas muestras

Pacientes con varias muestras	Nº muestras	Histología	CTTN	FAK	Podoplanina	Progresión a carcinoma
1	2	Displasia moderada	1	0	1	1
		CIS	1	1	2	1
2	2	CIS	3	3	1	1
		Displasia moderada	1	1	0	1
3	2	CIS	1	1	0	0
		CIS	1	1	0	0
4	2	CIS	1	3	3	1
		CIS	2	1	3	1
5	2	CIS	1	3	1	1
		Displasia severa	3	3	3	1

4.2. Análisis de la amplificación génica en lesiones premalignas

La amplificación o ganancia de copias de los genes de las proteínas cortactina (*CTTN*) y FAK (gen *FAK*) fue investigada en las 82 muestras de lesiones premalignas laríngeas usando PCR en tiempo real (Q-PCR), para determinar el número de copias relativas del gen comparándolas con la correspondiente mucosa normal.

4.2.1. Análisis de la amplificación de CTTN

La amplificación del gen *CTTN*, entendida como valores $\Delta\Delta C_T$ superiores a 2, se detectó en 10 muestras (12 %) del total, correspondientes a 2 de las displasias moderadas y 8 de las displasias severas/CIS ($P=0,163$, Tabla 8). Se aprecia como la amplificación de *CTTN* aumenta con la severidad de la displasia, y además se mantenía constante en los casos en que disponíamos de distintas muestras del mismo paciente tomadas en distintos momentos de la evolución clínica.

Tabla 8: Relación entre la amplificación de *CTTN* y el diagnóstico histopatológico

Amplificación de <i>CTTN</i>	Grado de displasia (%)		
	Leve	Moderada	Severa/CIS
Negativa	0	24 (92)	36 (82)
Positiva	0	2 (8)	8 (18)
Total	12	26	44

4.2.2. Análisis de la amplificación de FAK

La amplificación del gen *FAK* fue detectada en 26 muestras (32%) del total de las 82 lesiones premalignas laríngeas, y su detección se incrementaba conforme aumenta la severidad histológica de las displasias. Observamos amplificación de *FAK* en 2 (17%) de 12 displasias leves, 6 (23%) de 26 displasias moderadas y 18 (41%) de 44 displasias severas/CIS ($P=0,145$, Tabla 9).

Tabla 9: Relación entre la amplificación de *FAK* y el diagnóstico histopatológico

Amplificación de <i>FAK</i>	Grado de displasia (%)		
	Leve	Moderada	Severa/CIS
Negativa	10 (83)	20 (77)	26 (59)
Positiva	2 (17)	6 (23)	18 (41)
Total	12	26	44

4.3 Análisis de la expresión proteica en lesiones premalignas

El análisis inmunohistoquímico de la expresión proteica de cortactina, podoplanina y FAK fue realizado en las 82 muestras de lesiones premalignas de laringe. Para conocer el patrón de expresión en el epitelio normal de la laringe se estudiaron muestras de mucosa laríngea obtenidas de cirugía no oncológica en pacientes no fumadores (pólipos vocales, nódulos...). Además, todas las secciones seleccionadas para el estudio contenían también epitelio normal como control interno.

4.3.1. Análisis de la expresión de cortactina

El epitelio normal mostró una débil tinción de cortactina, mientras que las células del estroma no mostraron expresión de la misma. La inmunotinción de cortactina (Figura 7) fue detectada preferentemente en el citoplasma de las células epiteliales, mientras que algunos casos mostraron enriquecimiento proteico en la periferia de la célula (localizado en la membrana).

Se obtuvo expresión valorable de cortactina en las 82 muestras (100%). Ninguna muestra debió ser desechada, debido a la deficiente calidad de la muestra o la tinción.

La expresión de cortactina fue débil (1+) en 41 casos (50%), moderada (2+) en 20 muestras (24%), e intensa (3+) en 21 casos (26%). Es decir, encontramos niveles incrementados de la expresión de cortactina (2+ y 3+) en 41 (50%) de las 82 lesiones premalignas estudiadas.

El análisis de muestras del mismo individuo tomadas en distintos momentos arroja como resultado que el grado de expresión de la proteína estudiada se mantiene bastante constante en el tiempo. En dos pacientes de los 5 en que disponemos de más de una muestra analizada, la expresión de cortactina permanece constante. En otros 2 se apreció aumento de la sobreexpresión con la evolución, pero sin corresponderse con un incremento del grado de displasia y en un caso se observó disminución de la expresión de cortactina y también del grado de displasia (Tabla 7).

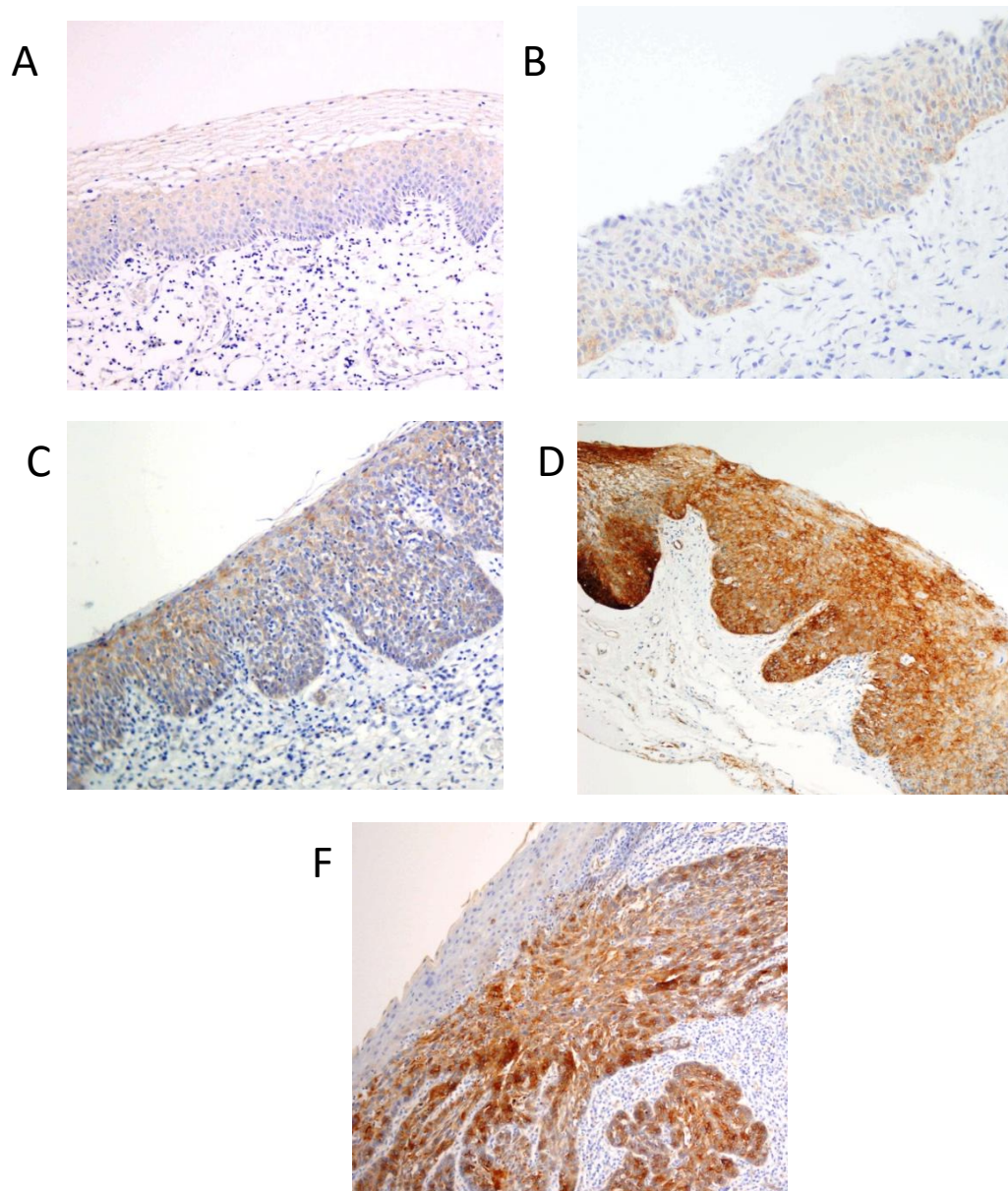


Figura 7: Ejemplos de tinción de CTTN: **A** en epitelio sano, **B** displasia tinción débil (1+), **C** moderada (2+), **D** intensa (3+) y **F** intensa en carcinoma laríngeo.

Por otra parte, hemos encontrado una correlación fuertemente positiva entre la amplificación de *CTTN* y la expresión de cortactina. Todas las displasias laríngeas con amplificación génica mostraron una expresión intensa de cortactina (puntuación 3+) lo que representa el 100% de correspondencia entre amplificación del gen y sobreexpresión a nivel de proteína (Test exacto de Fisher, $P = 0,007$; Tabla 10).

Tabla 10: Relación entre la amplificación de *CTTN* y la expresión de la proteína cortactina

Amplificación de <i>CTTN</i>	Expresión de cortactina (%)			
	Leve	Moderada	Intensa	Total
Negativa	41(57)	16 (22)	15 (21)	72
Positiva	0	0	10 (100)	10

Sin embargo, 31 lesiones en las que no se objetivó amplificación también presentaron en el análisis inmunohistoquímico sobreexpresión de cortactina de grado moderado-intenso (2+ y 3+), lo que puede indicar que la amplificación del gen sería capaz sólo en parte de explicar la sobreexpresión a nivel de la proteína que se observa durante el proceso de tumorigénesis laríngea, lo que indica que mecanismos adicionales (probablemente transcripcionales) contribuyen a la regulación de la expresión de cortactina.

Cuando estudiamos la relación entre la expresión de cortactina y la clasificación histopatológica de las lesiones premalignas apreciamos que también existe un aumento de expresión de cortactina a medida que aumenta la severidad de la displasia, aunque las diferencias no fueron significativas ($P= 0,148$; Tabla 11).

Tabla 11: Relación entre el grado histológico y la expresión de cortactina

Expresión de cortactina	Grado de displasia (%)		
	Leve	Moderada	Severa/CIS
Débil (1+)	9 (75)	13 (50)	19 (43)
Moderada (2+)	2 (17)	7 (27)	11 (25)
Intensa (3+)	1 (8)	6 (23)	14 (32)
Total	12	26	44

La expresión de cortactina fue también evaluada en 24 de los 28 carcinomas epidermoides que aparecieron a lo largo del seguimiento clínico en la cohorte de pacientes estudiados. En cada paciente, la expresión de cortactina en la muestra tumoral se comparó con la obtenida previamente en la correspondiente lesión premaligna.

Observamos sobreexpresión de cortactina (2+ y 3+) en 19 (79%) de los 24 carcinomas epidermoides estudiados. La tinción fue de grado intenso (3+) en 11 (46%) muestras. Se observó una fuerte correlación entre los niveles de expresión de cortactina en las muestras de las lesiones premalignas y los tumores laríngeos posteriormente desarrollados (Coeficiente de correlación de Spearman = 0,704; $P < 0,001$, Tabla 12). Se comprueba que la expresión de la proteína se mantiene o incrementa en el tumor con respecto a la muestra de displasia laríngea.

Tabla 12: Correlación entre la expresión de cortactina en lesiones premalignas y en los carcinomas laríngeos correspondientes

Expresión de cortactina en lesiones premalignas	Expresión de cortactina en tumores (%)			Total
	1+	2+	3+	
1+	4(50)	4(50)	0	8
2+	0	3(60)	2(40)	5
3+	1(9)	1(9)	9(82)	11

4.3.1. Análisis de la expresión de FAK

Se determinó la expresión de FAK en el total de muestras a estudio. La inmunotinción fue detectada preferentemente en el citoplasma de las células epiteliales, aunque algunos casos mostraron enriquecimiento proteico en la membrana. El epitelio normal mostró débil tinción de la proteína, limitada a la capa basal del epitelio (Figura 8).

El análisis de las diferentes muestras del mismo individuo muestra que el grado de expresión de la proteína FAK se mantiene también constante en el tiempo. En dos pacientes de los 5 en que disponemos de más de una muestra analizada, la expresión de FAK permanece constante. En uno se apreció aumento de la sobreexpresión con la evolución y también un incremento del grado de displasia y en otros 2 pacientes se observó disminución de la expresión de FAK y también en uno de estos pacientes del grado de displasia (Tabla 7).

FAK manifestaba una expresión débil en 42 casos (51%), moderada en 16 casos (20%), y fuertemente positiva en 24 pacientes (29%) (Figura 8). Es decir, encontramos sobreexpresión de la proteína (2+ y 3+) en 40 (49%) de las 82 lesiones premalignas laríngeas.

También se ha observado que existe una correlación significativa ($P= 0,023$; Tabla 13) entre la amplificación de *FAK* y la expresión de la proteína FAK, aunque no en todos los casos en los que hay una ganancia de copias del gen se encontró sobreexpresión de la proteína. Es decir, la expresión de la proteína debe estar regulada, al igual que en el caso de la cortactina, por otros mecanismos además de la amplificación del gen *FAK*.

Tabla 13: Relación entre la amplificación de *FAK* y la expresión de la proteína FAK

Amplificación de <i>FAK</i>	Expresión de FAK (%)			
	Leve	Moderada	Intensa	Total
Negativa	35 (62)	9 (16)	12 (21)	56
Positiva	7 (27)	7 (27)	12 (46)	26

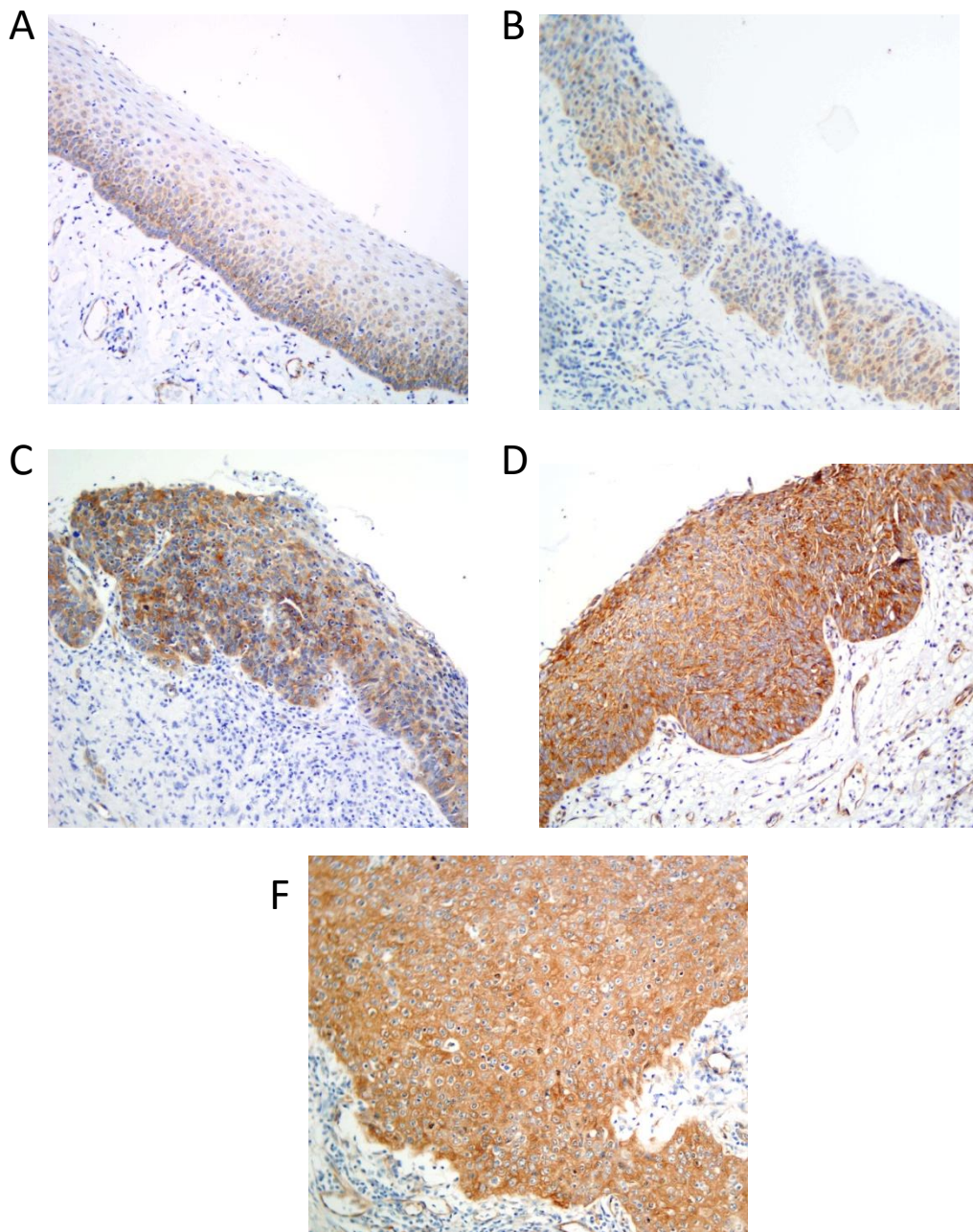


Figura 8: Ejemplos de inmunotinción de FAK: **A** en epitelio sano, **B** epitelio displásico con tinción débil (1+), **C** en displasia con tinción moderada (2+), **D** intensa (3+) y **F** carcinoma laríngeo con inmunotinción fuertemente positiva

La expresión de FAK aumentaba con la severidad de la displasia, si bien no se apreció una correlación significativa entre el grado histológico y el nivel de expresión de FAK ($P= 0,140$; Tabla 14).

Tabla 14: Relación entre el grado histológico y la expresión de FAK

Expresión de FAK	Grado de displasia (%)		
	Leve	Moderada	Severa/CIS
Débil (0/1+)	9 (75)	14 (54)	19 (43)
Moderada (2+)	2 (17)	5 (19)	10 (23)
Intensa (3+)	1 (8)	7 (27)	15 (34)
Total	12	26	44

La expresión de la proteína se analizó a su vez en 24 de los 28 carcinomas epidermoides desarrollados a lo largo de la evolución clínica en los 82 pacientes estudiados. En cada paciente, la expresión de FAK en la muestra tumoral se comparó con la obtenida previamente en la correspondiente lesión premaligna.

Se encontró sobreexpresión de FAK (2+ y 3+) en 21 (87%) de los 24 carcinomas epidermoides en los que obtuvimos resultados inmunohistoquímicos valorables. La tinción fue de grado intenso (3+) en 19 (79%) muestras. Los análisis estadísticos muestran una fuerte correlación entre los niveles de expresión de FAK en las muestras de las lesiones premalignas y los tumores laríngeos correspondientes (Coeficiente de correlación de Spearman = 0,742; $P < 0,001$, Tabla 15). Observamos que la expresión de la proteína se mantiene o incrementa en el tumor con respecto a la muestra de displasia laríngea.

Tabla 15: Correlación entre la expresión de FAK en lesiones premalignas y en los carcinomas laríngeos correspondientes

Expresión de FAK en lesiones premalignas	Expresión de FAK en tumores (%)			Total
	1+	2+	3+	
1+	3(50)	2(33)	1(17)	6
2+	0	0	5(100)	5
3+	0	0	13(100)	13

4.3.1. Análisis de la expresión de podoplanina

El análisis inmunohistoquímico de la expresión de podoplanina se realizó en las 82 lesiones premalignas, pero en un caso no fue valorable, por lo que quedaron 81 casos para el análisis. Se detectó de forma consistente su expresión en las células endoteliales de los vasos linfáticos (Figura 9A), tal y como se esperaba, dado su papel establecido como marcador linfático. En contraste, la expresión de podoplanina en el epitelio laríngeo normal fue nula o restringida a pequeños nidos celulares que mostraban exclusivamente inmunotinción citoplasmática y de membrana (Figura 9A).

La expresión de podoplanina en el epitelio laríngeo displásico fue muy variable (Figura 9 B-D), desde la tinción negativa hasta la sobreexpresión intensa (puntuación 3+), presentando preferentemente un patrón de membrana en la capa basal, que en algún caso se extiende hacia la capa suprabasal o en múltiples áreas de la muestra.

El análisis mediante IHQ de las muestras en los 5 pacientes de los que hemos analizado varias tomadas en distintos momentos, nos da como resultado que el grado de expresión de podoplanina se mantiene bastante estable en el tiempo. En dos pacientes la expresión de podoplanina permanece constante. En otros 2 se apreció aumento de la sobreexpresión durante el seguimiento clínico y en un caso se observó disminución de la expresión de podoplanina y también del grado de displasia (Tabla 7), este paciente, del que disponemos de dos muestras (1 con el diagnóstico de CIS y otra de displasia moderada) es el mismo en el que también había disminuido igualmente la expresión de los otros dos marcadores estudiados en este trabajo (cortactina y FAK).

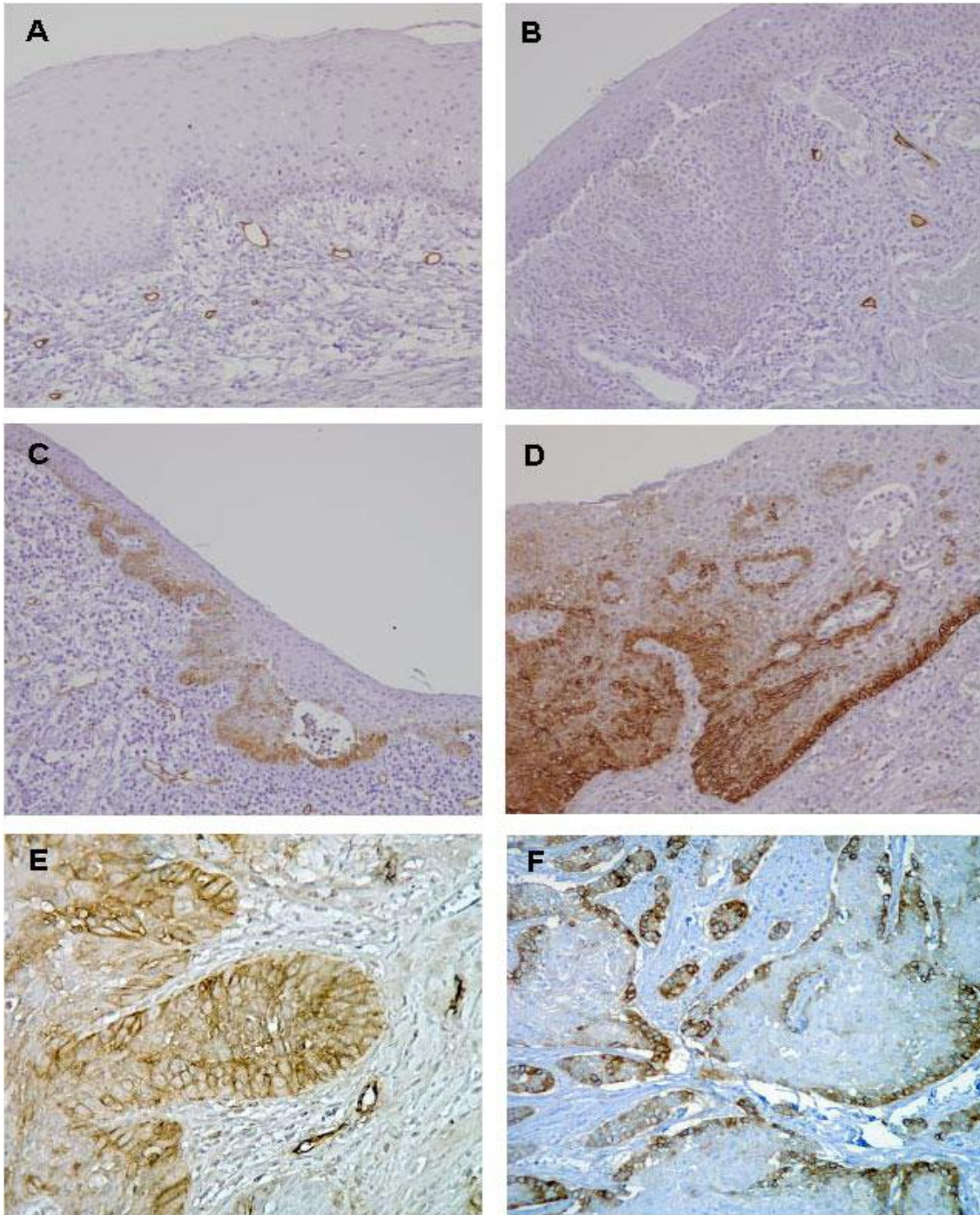


Figura 9: Ejemplos de tinción de Podoplanina: **A** en epitelio sano (se aprecia la tinción de los linfáticos subepiteliales), **B** epitelio displásico con tinción negativa (0) **C** displasia con tinción positiva débil (2+), **D** intensa (3+), **E** carcinoma laríngeo con expresión difusa de podoplanina y **F** con expresión focal.

Durante el análisis de las 82 muestras de displasia laríngea, se observó que 9 casos (11%) mostraron niveles indetectables de expresión de podoplanina en el epitelio (puntuación 0), 34 (42%) mostraron expresión sólo en determinadas células de la capa basal (puntuación 1+), 12 (15%) presentaron sobreexpresión proteica extendiéndose a la capa suprabasal en algún área (2+) y 26 (32%) en dos o más áreas (3+), de acuerdo a los criterios previamente descritos. Con fines estadísticos, consideramos expresión elevada de podoplanina los casos con puntuación 2+ y 3+, que eran 38 (47%) de las 81 lesiones premalignas laríngeas.

Al igual que en caso de cortactina y FAK, se observó que la expresión de podoplanina aumentaba con la severidad de la displasia, aunque las diferencias no alcanzaron la significación estadística (Tabla 16, $P= 0,077$).

Tabla 16: Relación entre el grado histológico y la expresión de Podoplanina

Expresión de Podoplanina	Grado de displasia (%)		
	Leve	Moderada	Severa/CIS
Negativa (0)	3 (25)	5 (19)	1 (2)
Débil (1+)	5 (42)	12 (44)	17 (40)
Moderada (2+)	3 (25)	3 (11)	6 (14)
Intensa (3+)	1 (8)	7 (26)	18 (43)
Total	12	27	42

La expresión de podoplanina también se estudió en 24 de los 28 carcinomas epidermoides desarrollados a lo largo del seguimiento en los 82 pacientes estudiados. En las muestras tumorales analizadas la proteína se expresaba generalmente de forma heterogénea, exhibiendo dos patrones bien diferenciados, de manera similar a lo observado en estudios previos en cáncer de orofaringe: 9 (38%) casos mostraban una expresión difusa en múltiples células tumorales (Figura 9E) y 15 (62%) casos mostraron una expresión focal en la periferia de los nidos tumorales sin expresión en las áreas

centrales (Figura 9F). Dado que todos los carcinomas mostraron expresión de podoplanina bien focal o difusa, no se estableció correlación entre la expresión en la lesión premaligna y el carcinoma, pero parece claro que la expresión de podoplanina es un evento molecular que se adquiere en la progresión a carcinoma.

4.4. Análisis de la progresión a cáncer

Hemos correlacionado los resultados de la expresión de las proteínas estudiadas (y amplificación en el caso de *CTTN* y *FAK*) con la progresión a cáncer de laringe en las diferentes muestras analizadas.

En el caso de la amplificación del gen de la cortactina, se apreció que se asociaba con la progresión a cáncer: de los 10 pacientes con amplificación de *CTTN*, 6 (60%) evolucionaron hacia carcinoma durante el período de seguimiento, mientras que solo progresaron a cáncer un 30% de los casos sin amplificación (Test exacto de Fisher, $P=0,083$, Tabla 17, Figura 10).

Tabla 18: Relación entre la amplificación de *CTTN* y la progresión a cáncer

Amplificación de <i>CTTN</i>	Nº de casos (%)	Progresión a cáncer (%)
Negativa	72 (88)	22 (31)
Positiva	10 (12)	6 (60)
Total	82	28

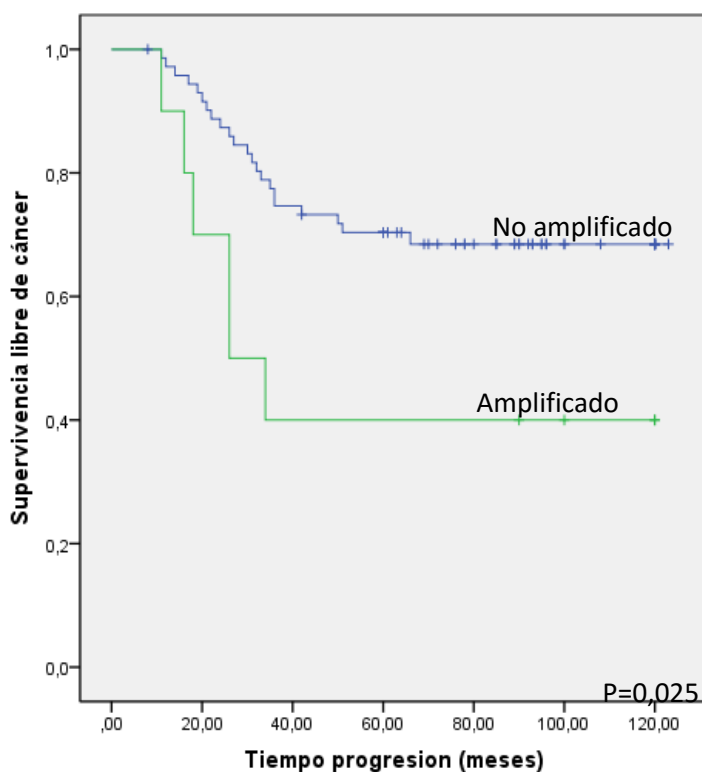


Figura 10: Supervivencia libre de cáncer en función de la amplificación del gen *CTTN*.

En cuanto a la amplificación de *FAK*, no se ha hallado asociación con la progresión a carcinoma laríngeo. De los 26 casos positivos para la amplificación, 10 (38%) evolucionaron posteriormente hacia la malignidad, frente a un 32% de los casos sin amplificación (Tabla 18, Test exacto de Fisher, $P=0,622$, Figura 11).

Tabla 18: Relación entre la amplificación de *FAK* y la progresión a cáncer

Amplificación de <i>FAK</i>	Nº de casos (%)	Progresión a cáncer (%)
Negativa	56 (68)	18 (32)
Positiva	26 (32)	10 (38)
Total	82	28

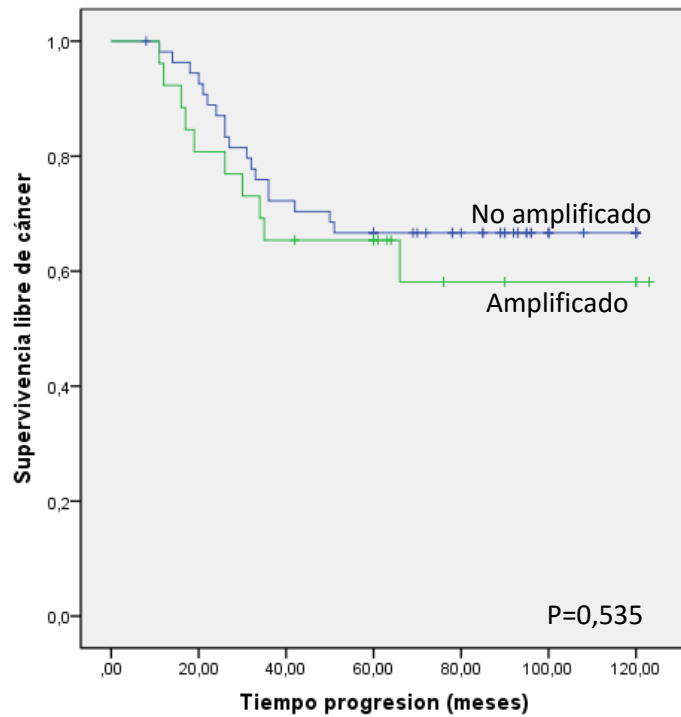


Figura 11: Supervivencia libre de cáncer en función de la amplificación del gen *FAK*.

Cuando analizamos la relación entre la expresión de cortactina y la progresión a cáncer, el análisis inicial mostró que los casos con expresión clasificada como débil y moderada presentaban un riesgo similar de progresión a cáncer (Tabla 19),

Tabla 19: Relación entre la expresión de cortactina y la progresión a cáncer

Expresión de CTTN	Progresión a cáncer (%)		Total
	SI	NO	
Baja	11 (27)	30 (73)	41
Moderada	5 (25)	15 (75)	20
Intensa	12 (57)	9 (43)	21
Total	28 (34)	54 (66)	82

Por lo que para el análisis estadístico agrupamos por una parte las lesiones que presentaron una inmunotinción de grado bajo-moderado (1+ y 2+) y por otro lado aquellas cuya expresión fue puntuada como intensa (3+). Observamos que existe una correlación significativa entre expresión intensa de cortactina y la progresión a carcinoma; 12 de 21 (57%) muestras con expresión elevada de cortactina evolucionaron frente a 16 de 61 (26%) que presentaban expresión de grado bajo-moderado, (Tabla 20, $P= 0,016$).

Tabla 20: Relación entre la expresión de cortactina y la progresión a cáncer

Expresión de cortactina	Nº de casos (%)	Progresión a cáncer (%)
Baja-moderada	61 (74)	16 (26)
Intensa	21 (26)	12 (57)
Total	82	28

Al analizar la supervivencia libre de progresión a carcinoma, también observamos como el riesgo de desarrollar un carcinoma es significativamente mayor en los casos con expresión intensa de cortactina (Figura 12, log-rank $P= 0,006$)

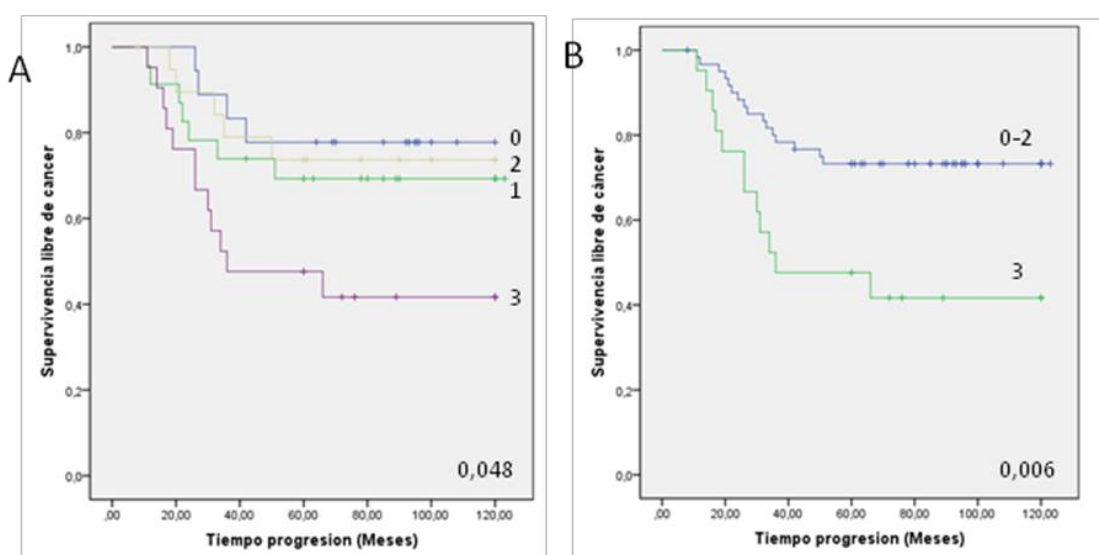


Figura 12: Supervivencia libre de cáncer en función de la expresión de cortactina. A: sin agrupar los casos. B: Agrupando los casos en tinción débil-moderada (0-2) e intensa (3).

En el caso de la expresión de FAK, también observamos que, aunque la proporción de casos que evolucionaban a carcinoma aumentaba al aumentar la expresión de FAK, no había diferencias significativas en la evolución a carcinoma de los casos con expresión débil (0/1+) o moderada (2+) (Tabla 21).

Tabla 21: Relación entre la expresión de FAK y la progresión a cáncer

Expresión de FAK	Progresión a cáncer (%)		Total
	SI	NO	
Baja	9(21)	33(79)	42
Moderada	5 (31)	11 (69)	16
Intensa	14 (58)	10 (42)	24
Total	28	54	82

De esta forma, para el análisis estadístico se agruparon los casos como en el caso de la cortactina. Se encontró una relación significativa entre la expresión de FAK y la progresión a carcinoma; 14 de 23 (61%) muestras con expresión elevada de FAK evolucionaron frente a 14 de 59 (24%) que presentaban expresión de grado bajo-moderado (Tabla 22, Test exacto de Fisher, $P= 0,004$). La supervivencia libre de carcinoma también era significativamente menor en los casos con expresión intensa de FAK (Figura 13, log-rank $P= 0,001$)

Tabla 22: Relación entre la sobreexpresión de FAK y la progresión a cáncer agrupando los casos con expresión baja y moderada.

Expresión de FAK	Nº de casos (%)	Progresión a cáncer (%)
Baja-moderada	59 (72)	14 (24)
Intensa	23 (28)	14 (61)
Total	82	28

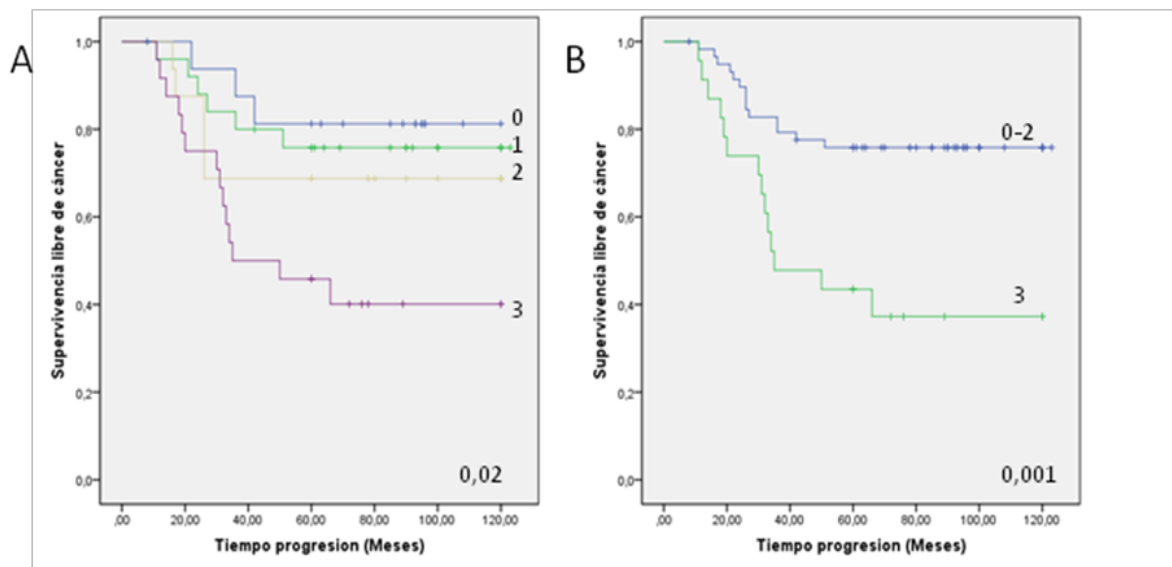


Figura 13: Supervivencia libre de cáncer en función de la expresión de FAK. A: sin agrupar los casos. B: Agrupando los casos en tinción débil-moderada (0-2) e intensa (3).

Así pues, los pacientes con displasias laríngeas que mostraron una sobreexpresión de cortactina de grado intenso tuvieron un riesgo significativamente mayor de evolucionar hacia la malignidad que aquellos en los que las muestras tenían una expresión débil o moderada (Figura 12B log-rank $P= 0,006$). También la sobreexpresión de FAK de grado 3+ se correlacionó de forma consistente con un riesgo mayor de progresión hacia carcinoma comparándola con aquellos en los que las muestras tenían una menor expresión (Figura 13B, log-rank $P= 0,001$).

La expresión de podoplanina ha sido también correlacionada con el riesgo de progresión hacia carcinoma. Comprobamos una correlación positiva entre la expresión de podoplanina y la progresión a carcinoma; 17 de 36 (47%) muestras con expresión positiva (grados 2+ y 3+) evolucionaron a cáncer frente a 11 de 45 (24%) que presentaban expresión negativa (Tabla 23, Test exacto de Fisher, $P= 0,038$).

Tabla 23: Relación entre la expresión de podoplanina y la progresión a cáncer

Expresión de Podoplanina	Nº de casos (%)	Progresión a cáncer (%)
Negativa (0 y 1+)	45 (57)	11 (24)
Positiva (2+ y 3+)	36 (43)	17 (47)
Total	82	28

En cuanto a la supervivencia libre de cáncer, se observó que el riesgo de desarrollar un carcinoma laríngeo en aquellos pacientes cuyas lesiones fueron clasificadas como negativas en el análisis inmunohistoquímico de la expresión de podoplanina fue significativamente menor que el de aquellos cuyas displasias laríngeas habían sobreexpresado intensamente la proteína, especialmente a partir de los primeros 3 años del seguimiento clínico. (Figura 15, log-rank test, $P= 0,049$).

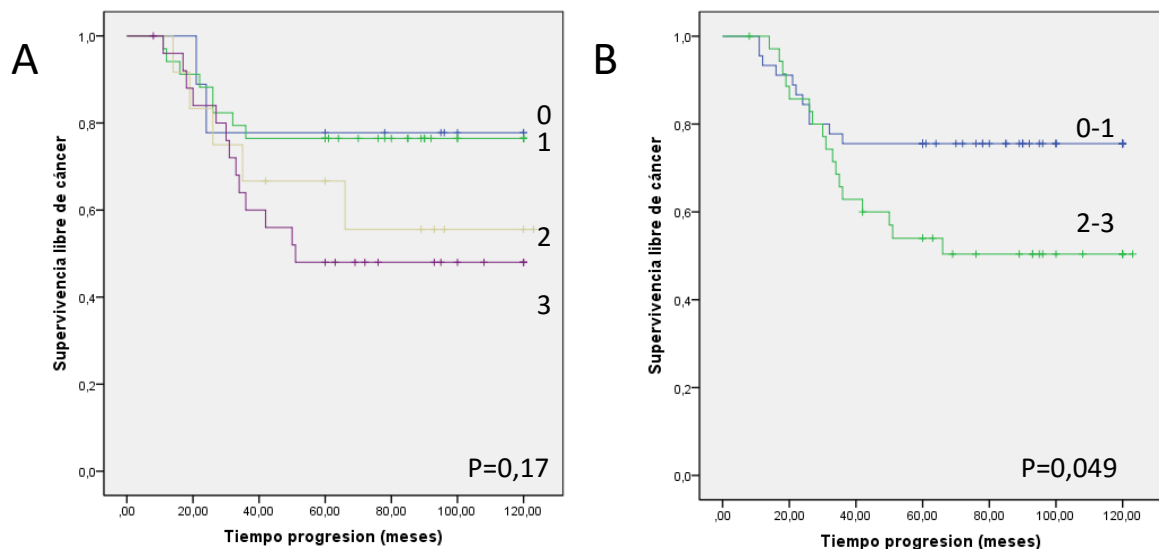


Figura 15: Supervivencia libre de cáncer en función de la expresión de podoplanina. A: sin agrupar los casos. B: Agrupando los casos en tinción negativa (0-1) y positiva (2-3).

Dado que la expresión de las 3 proteínas estudiadas se asociaba con el riesgo de desarrollar un carcinoma, posteriormente analizamos si la expresión combinada de las mismas mejoraba la capacidad pronóstica.

Cuando analizamos el potencial predictor de la expresión simultánea de cortactina y FAK, se objetiva como las lesiones con una expresión intensa (3+) de ambas o de una de las dos proteínas tienen un riesgo de evolución a cáncer significativamente mayor que aquellas sin expresión intensa de ninguna de las dos (Figura 16, log-rank $P < 0,001$). Se aprecia como la expresión intensa de ambas proteínas conjuntamente no confiere un mayor riesgo respecto a la expresión intensa de una u otra por separado (log-rank $P = 0,195$).

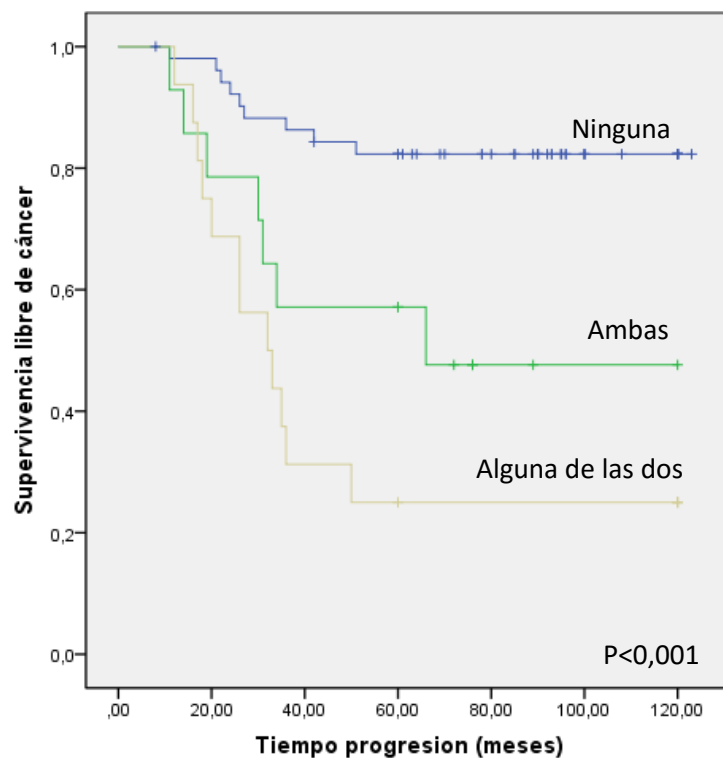


Figura 16: Supervivencia libre de cáncer según la expresión intensa de cortactina y/o FAK: ninguna con expresión intensa, ambas proteínas con expresión intensa, o alguna de las dos con expresión intensa.

Si se agrupan los casos con expresión intensa (3+) de cortactina y FAK simultáneamente o de alguna de ellas solamente, se observa la asociación más robusta con la progresión posterior hacia cáncer laríngeo (Figura 17, log-rank $P < 0,001$). A los

5 años del diagnóstico 19 (63%) de los 30 pacientes con expresión intensa de cortactina y/o FAK desarrollaron un carcinoma mientras que tan sólo 9 (17%) de los 52 pacientes con expresión débil o moderada de ambas proteínas progresaron a cáncer. (Tabla 24, $P < 0,001$).

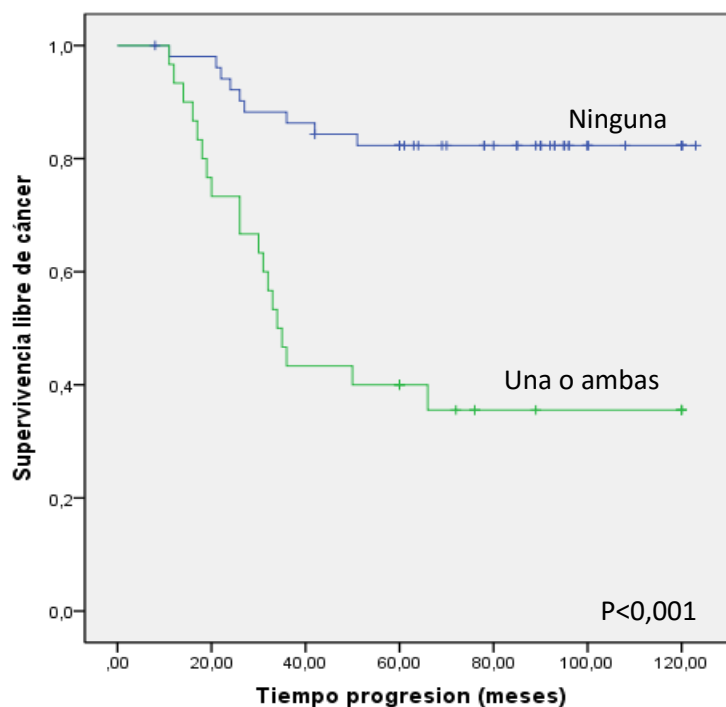


Figura 17: Supervivencia libre de cáncer según la expresión intensa de cortactina y/o FAK: ninguna de las dos proteínas con expresión intensa vs. las dos o alguna de las dos.

Tabla 24: Relación entre la sobreexpresión de cortactina y FAK y la progresión a cáncer ($P < 0,001$)

Expresión de cortactina y/o FAK	Nº de casos (%)	Progresión a cáncer (%)
Baja-moderada ambas	52 (63)	9 (17)
Intensa una o ambas	30 (37)	19 (63)
Total	82	28

Si además de la expresión de FAK y cortactina, consideramos la expresión de podoplanina se observó (Tabla 25) que no aportaba información pronóstica adicional. De los 45 casos que tenían expresión intensa (o positiva en el caso de podoplanina) de todas o alguna de las tres proteínas, 22 (49%) progresaron a carcinoma, frente a 6 de 37 casos (16%) con expresión débil-moderada (o negativa en el caso de podoplanina) de las tres ($P=0,002$). Estos resultados se confirman al analizar la supervivencia libre de cáncer en función de la expresión de las 3 proteínas (Figura 18).

Tabla 25: Relación entre la expresión de cortactina, FAK y/o podoplanina y la progresión a cáncer ($P<0,001$)

Expresión de cortactina, FAK y/o podoplanina	Nº de casos (%)	Progresión a cáncer (%)
Débil-moderada/negativa todas	37 (44)	6 (16)
Intensa/positiva todas/alguna	45 (56)	22 (49)
Total	82	28

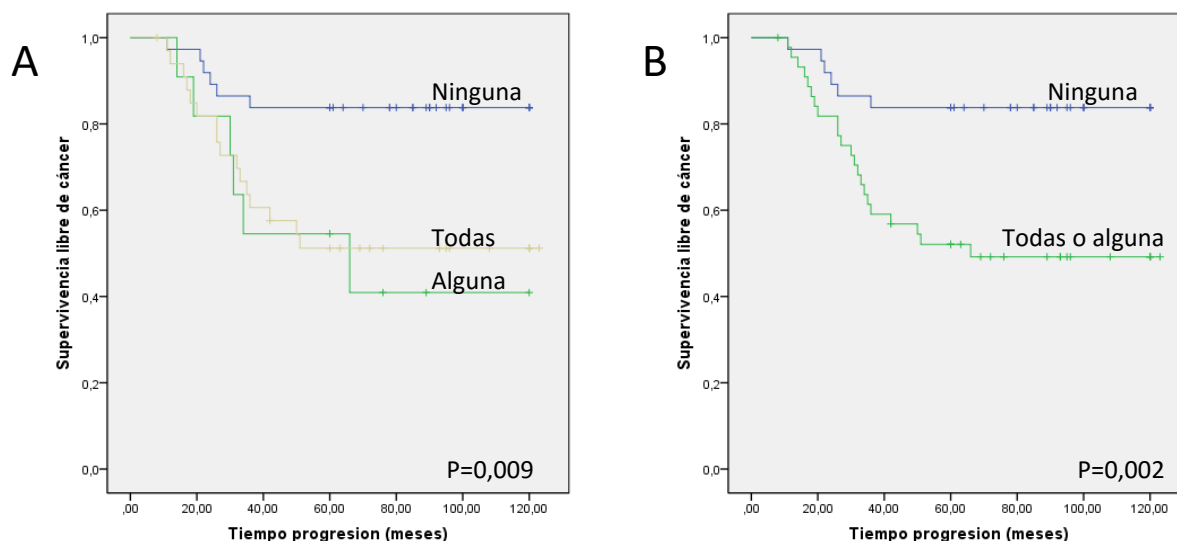


Figura 18: Supervivencia libre de cáncer según la expresión intensa de cortactina, FAK y/o podoplanina: **A:** considerando los casos sin expresión intensa/positiva de ninguna de las tres proteínas frente a los casos con expresión intensa/positiva de las tres o alguna de las tres. **B:** considerando los casos sin expresión intensa/positiva de ninguna de las tres proteínas frente a los casos con expresión intensa/positiva de las tres o alguna de las tres.

Los análisis univariantes empleando la regresión de Cox (Tabla 26) muestran como la amplificación de *CTTN* y la sobreexpresión inmunohistoquímica de las proteínas cortactina y FAK se relacionan de forma significativa con el riesgo de progresión hacia cáncer laríngeo. Además estos análisis mostraban que la combinación de FAK y cortactina (alguna positiva o ambas) era la variable que confería el mayor riesgo de progresión a cáncer. La expresión de podoplanina mostró una relación casi significativa con el riesgo de progresión. No se obtuvieron resultados significativos en la correlación entre el grado histopatológico y el riesgo de progresión.

Tabla 26: Análisis univariantes empleando la regresión de Cox para la estimación del riesgo de desarrollar cáncer laríngeo.

Característica	<i>P</i>	Riesgo relativo	Intervalo de confianza del 95%
Edad	0.919	1.039	0.494 - 2.185
Tabaco	0.532	1.270	0.600 – 2.685
Histología (displasia severa vs leve a moderada)	0.364	1.763	0.519 - 5.989
Amplificación <i>CTTN</i> (positiva vs negativa)	0.032	2.695	1.089 - 6.670
Amplificación <i>FAK</i> (positiva vs negativa)	0.537	1.276	0.589 - 2.766
Expresión de cortactina (Grado 3 vs 0-2)	0.009	2.726	1.287 - 5.774
Expresión de FAK (Grado 3 vs 0-2)	0.002	3.248	1.544 - 6.835
Expresión de podoplanina (Puntuación 2-3 vs 01)	0,059	2,099	0,973 – 4,527
Expresión de FAK y/o cortactina (Grado 3 vs 0-2)	<0,001	5.040	2.270 - 11.190
Expresión de cortactina y/o podoplanina y/o FAK	0,005	3,703	1,499 – 9,147

En los análisis multivariantes, empleando también la regresión de Cox, el único parámetro que mostró una asociación significativa con el riesgo de progresión a cáncer fue la combinación de la expresión de cortactina y FAK (riesgo relativo= 5,042; Intervalo de confianza del 95% = 2,255 – 11,274; $P < 0,001$), como era de esperar, dado que esta variable resulta de la combinación de otras variables incluidas en el análisis. Cuando se elimina esta variable del análisis, la expresión de FAK resulto el único parámetro asociado de forma independiente con el riesgo de progresión a cáncer (Riesgo relativo= 3,632; Intervalo de confianza del 95% = 1,701 - 7,757; $P= 0,001$).

5- DISCUSIÓN

Se estima que en España la incidencia de neoplasias de cabeza y cuello es de 38 pacientes por 100.000 habitantes al año. Más del 95% de la patología neoplásica que afecta a las vías aerodigestivas superiores adopta la forma histológica de carcinoma epidermoide. Detrás de esta falsa apariencia de uniformidad, se esconde una enfermedad muy heterogénea tanto en su biología como en su comportamiento y tratamientos recomendables para obtener la curación. Esa variabilidad depende de su patrón de alteraciones tanto genómicas como proteómicas, de las cuales conocemos un número escaso, y que van a determinar su fenotipo molecular.

En los últimos años hemos asistido a grandes avances en el diagnóstico y tratamiento de los CECC. Se han desarrollado sofisticados estudios de imagen, novedosas técnicas de cirugía reconstructiva y avanzados protocolos de quimiorradioterapia. Con ellos se ha logrado mejorar el control local de la enfermedad y la calidad de vida en los pacientes; sin embargo, la supervivencia no ha experimentado cambios sustanciales en las últimas décadas.¹⁵⁷ Este ha sido uno de los motivos por los que se han impulsado los estudios de biología molecular en el CECC, entre ellos el realizado en esta tesis.

El fin a conseguir es ambicioso, por un lado está conocer mejor el origen y progresión de la enfermedad, pero también desarrollar técnicas de detección precoz y determinar la posible respuesta terapéutica. En este sentido se han diseñado diversos marcadores pronósticos, la mayoría de expresión proteica por inmunohistoquímica, pero dada la complejidad molecular del cáncer no es posible obtener resultados en base a un único marcador.

Este estudio forma parte de un proyecto que desde hace años viene desarrollando nuestro grupo de investigación, con el fin de colaborar en el diseño de un modelo completo de progresión génica tumoral. En este modelo se relacionan las etapas histopatológicas de la carcinogénesis laríngea con las alteraciones genético-moleculares. La idea no es nueva pues se basa en modelos previos (*Califano y col. 1996*), pero tratando de superar las limitaciones que presentan. Por un lado, dirigimos el estudio específicamente a la carcinogénesis laríngea, no al compendio de neoplasias englobadas en el término de “Cáncer Escamoso de Cabeza y Cuello” (CECC), pues esos tumores tienen características dispares y pueden sesgar los resultados.

En este trabajo hemos combinado diferentes técnicas para tener una mayor información de las alteraciones genético-moleculares: la inmunohistoquímica (IHQ) para analizar la expresión proteica, que es adecuada para analizar muestras de tamaño reducido, típicas de estas lesiones precoces, y la PCR (Q-PCR) para estudiar el estado genético.¹⁵⁵

Al igual que en otros tumores de estirpe epitelial, el desarrollo de un carcinoma epidermoide de laringe es un proceso de múltiples pasos debido a una acumulación de alteraciones genéticas en la superficie del epitelio.^{158,15,22} La acumulación de estas alteraciones genéticas, sucesivamente, induce una progresión en fases de cambios morfológicos, que van desde la mucosa normal hasta la displasia/carcinoma in situ, progresando hacia el posterior carcinoma invasivo. Conocemos a esta fase intermedia como displasia laríngea escamosa, lesión intraepitelial laríngea, neoplasia intraepitelial laríngea, o lesión precursora del epitelio laríngeo.

Es esencial una terminología precisa y uniforme a la hora de referirnos a las lesiones premalignas de laringe para conseguir una correcta colaboración entre clínicos y patólogos, teniendo en cuenta que en las últimas décadas la terminología para referirnos a las neoplasias intraepiteliales en los distintos estudios analizados ha cambiado significativamente⁹⁷. Como hemos intentado resumir en la introducción de este trabajo, varios sistemas de clasificación se han desarrollado en un intento de describir y cuantificar las muestras histológicas de las lesiones precursoras del epitelio laríngeo.

La última revisión de la OMS (2005),⁸⁸ nos dice que en la caracterización de las lesiones premalignas laríngeas se reconocen tres esquemas histológicos diferenciados: la clasificación de displasia, la clasificación de neoplasia intraepitelial escamosa,⁹¹ y la clasificación de Ljubljana.⁸⁹ De ellas la más comúnmente utilizada como sistema de graduación es la de displasia, pero el valor de esta y otras clasificaciones se ha visto limitado por dos factores. Primero, el diagnóstico histopatológico en las lesiones premalignas de laringe no es altamente reproducible, tanto la reproducibilidad inter como intra-observador es baja, normalmente asociada a bajo valor del factor estadístico kappa (κ).^{159,60,60} Segundo, la presencia y el grado de displasia no predice realmente el comportamiento biológico posterior.

Algunas lesiones precursoras laríngeas progresan hacia carcinoma invasivo y otras no. Según distintas series, las displasias de laringe como grupo progresan hacia carcinoma epidermoide de laringe con una frecuencia estimada que varía entre el 11 y el 32%.⁹⁷ La clasificación de displasia que gradúa a las lesiones en leves, moderadas o severas/CIS en base al espesor del epitelio laríngeo implicado, unido a la acumulación de fenómenos de atipia celular derivada del estudio de rutina mediante microscopio óptico, tiene como hemos dicho un limitado valor a la hora de predecir la evolución posterior de esas lesiones. En ocasiones lesiones con cambios displásicos leves progresan, y por el contrario la mayoría de las lesiones displásicas severas nunca acaban desarrollando un carcinoma invasivo. La pobre reproducibilidad del diagnóstico histológico y la difícil predicción de los cambios biológicos implicados hacen que las conocidas clasificaciones histológicas tengan una utilidad limitada a la dirigir estrategias terapéuticas diferenciadas.^{160,63,90}

Consecuentemente, necesitamos nuevos marcadores que puedan ser analizados por distintos laboratorios con una reproducibilidad adecuada y que puedan realmente identificar aquellas lesiones premalignas que tengan mayor riesgo de progresión a carcinoma invasivo. Una identificación y caracterización precisa de las alteraciones moleculares asociadas con el desarrollo del carcinoma epidermoide de laringe, puede ser una herramienta de diagnóstico para determinar el riesgo de malignización de las lesiones premalignas de laringe y puede incluso ayudar a la realización de una clasificación más unificada que las existentes hoy en día.

Como ya hemos visto, el análisis histopatológico de la lesión constituye el marcador de progresión a cáncer más usado habitualmente en la clínica, pues es el único que se realiza de forma rutinaria en todos los centros. En los últimos tiempos han aparecido muchas investigaciones sobre nuevos predictores de la evolución en el proceso de carcinogénesis de las lesiones premalignas de laringe que puedan distinguir diferencias en la condición tumoral y aumentar así el valor predictivo de los marcadores clínicos habituales. En estudios previos se han analizado diversos marcadores genéticos para evaluar el riesgo de transformación neoplásica.

Tal y como se ha mostrado cuando se hablaba del seguimiento clínico de los pacientes, el diagnóstico histopatológico de las lesiones premalignas de laringe no parece ser en este estudio el más adecuado a la hora de valorar las posibilidades de progresión

de una determinada lesión hacia el carcinoma invasivo, aunque sí que se observó que las displasias severas tenían el mayor riesgo de evolución a carcinoma. La inesperada alta proporción de displasias leves que progresaron hacia carcinoma de laringe (25%) en la cohorte de pacientes a estudio puede ser debida a una casualidad dado al limitado número de pacientes con este diagnóstico (12), aunque de cualquier modo esto también pone de relieve el escaso valor de la clasificación histopatológica para predecir el riesgo de malignización.

Los resultados obtenidos en este estudio del análisis de la cortactina, FAK y podoplanina en 82 pacientes con lesiones premalignas de laringe, han demostrado que estos marcadores son mejores predictores del riesgo de progresión a cáncer que el grado de displasia histológica.

Son pocos los estudios que sugieren que determinados biomarcadores son potenciales predictores de progresión maligna. Se refieren sobre todo a varios reguladores de la adhesión celular e invasión (p.ej. osteopontina y CD44v6) y a varios marcadores asociados a la proliferación como TGF- β RII y Kv3.4. El valor predictivo de estos marcadores ha sido sugerido en varios estudios prospectivos. De cualquier forma, aunque son las proteínas asociadas con la proliferación y con el control del ciclo celular (PCNA, Ki67, p53, p16, p21, p27 y ciclina D1) los marcadores con mayor frecuencia estudiados, ninguno ha demostrado consistentemente su relación con la progresión invasiva en una revisión sistemática de los múltiples estudios existentes.¹⁰⁵ Varios biomarcadores han demostrado tener un potencial valor pronóstico y podrían ser clínicamente relevantes. La utilidad y poder pronóstico de estos biomarcadores debería ser confirmada en estudios prospectivos amplios, estandarizados y bien diseñados.

Uno de los puntos clave del proceso de tumorigénesis es la capacidad de las células tumorales para conseguir una proliferación desregulada. La detección de la actividad proliferativa en lesiones premalignas del epitelio laríngeo ha sido empleada como marcador pronóstico en varios estudios mediante análisis inmunohistoquímico de los antígenos PCNA¹⁶¹ y Ki67,¹⁶² aunque ningún estudio las ha analizado simultáneamente.

Ki67 es una proteína asociada al ciclo celular y marcador de proliferación,¹⁶³ del que se han obtenido resultados contradictorios.¹⁶⁴ PCNA es una proteína nuclear cuya

expresión se asocia a las fases tardías (G1 y S) del ciclo celular. La expresión de PCNA ha sido correlacionada positivamente con el grado histológico en dos estudios.^{107,110}

El papel de las proteínas reguladoras del ciclo celular ha sido también ampliamente estudiado en la iniciación y progresión de los carcinomas epidermoides de laringe. Varios trabajos se han centrado en investigar la inactivación del gen supresor de tumores *TP53* mediante la determinación inmunohistoquímica de los niveles de su proteína p53,¹⁶⁵ de hecho esta proteína ha sido considerada probable biomarcador del riesgo de cáncer de laringe en lesiones premalignas de laringe.

Además de la proteína p53, la expresión de la proteína MDM-2, capaz de unirse e inactivar a p53 también ha sido estudiada en lesiones precursoras de laringe, pese a que su sobreexpresión no se correlaciona con la progresión; más bien al contrario, eran los casos con expresión negativa de MDM-2 los que exhibían un riesgo de progresión más alto.¹⁶⁵

La amplificación de *CCND1/PRAD-1* (región cromosómica 11q13) hace que se sobreexpresen la proteína ciclina D1, hecho relacionado según algunas publicaciones con la progresión de la displasia.^{166,167} La ciclina D1 se expresa en el 76 % de las displasias, aunque débilmente, sobre todo en el estrato suprabasal. La ciclina D1 es una proteína relacionada con el ciclo celular cuya expresión elevada se ha relacionado con progresión maligna en un estudio prospectivo.¹⁶⁸ En contraste un estudio retrospectivo no pudo demostrar dicha asociación y en otro estudio no se pudieron demostrar lesiones con positividad para ciclina D1.¹⁶⁴ No obstante, hay gran variación en la expresión de ciclina D1, faltando en ocasiones en NIL de bajo grado con progresión. La expresión de ciclina D1 también se ha visto aumentada en los márgenes de la displasia o epitelio normal que rodea a los tumores, con un comportamiento similar a p53.¹⁰⁴ Sin embargo, su tinción muy positiva sólo se ha demostrado en displasias y cáncer, siendo negativa en el epitelio normal de sujetos sanos y en lesiones benignas. Cuando la NIL de bajo grado expresa ciclina D1, EGFR (2/3 del epitelio) y tinción basal lineal de p53, los pacientes tienen alto riesgo de progresión, siendo esa batería descrita como un marcador precoz.¹⁶⁹

Como parte también de la familia de las proteínas relacionadas con el ciclo celular, los inhibidores de ciclina dependientes de quinasa (CDKI) p16, p21 y p27 son

importantes mediando en la progresión desde la fase G0 hacia G1 durante la mitosis, la expresión de dichas proteínas ha sido investigada en otros artículos retrospectivos, aunque ninguna de estas proteínas se ha asociado con progresión maligna.^{170,104}

Otras vías de investigación en las lesiones premalignas de laringe se basan en las posibles alteraciones genéticas (pérdida de heterocigosidad, inestabilidad de microsatélites) que se producen durante la carcinogénesis y progresión del cáncer laríngeo, analizando con técnicas de PCR el desequilibrio alélico en determinados cromosomas (3p, 9p, 17p).^{171,172} Algunos trabajos determinaron mediante análisis con PCR del tejido tumoral y mucosa normal adyacente del mismo paciente diagnosticado de CECC, que la ganancia de material genómico (por ejemplo en 3q26) puede ser un indicador potencial de la transformación oncogénica.¹⁷³

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es un receptor transmembrana tirosin-quinasa que participa en procesos de división celular, migración, adhesión, diferenciación y apoptosis. EGFR se ha encontrado sobreexpresado en muchos casos de carcinomas epidermoides de cabeza y cuello.^{174,158,169} Otro factor, esta vez inhibitorio es el factor de crecimiento β (TGF- β) cuya vía de activación se ha visto implicada en los CECC, varios estudios han demostrado que la expresión de este factor se encuentra disminuida en muchos carcinomas epidermoides y esto puede dar lugar a una resistencia a la mediación del TGF- β en la supresión del crecimiento tumoral, sugiriendo que la baja expresión de TGF- β RII, cuya función es mediar en la inhibición de la proliferación, puede facilitar la progresión de lesiones precancerosas laríngeas hacia el carcinoma invasivo.¹⁷⁵

Con respecto a otros receptores como el canal de potasio (K⁺) de tipo A llamado Kv3.4, perteneciente a la subfamilia Kv, implicada según varios estudios en la proliferación de una gran variedad de células malignas y también en la tumorigénesis, su expresión de forma aberrante ha sido descrita en múltiples cánceres humanos.¹⁷⁶ La expresión de la subunidad del canal Kv3.4 ha sido determinada recientemente en nuestro grupo de estudio en una muestra de displasias de laringe. En este estudio retrospectivo los pacientes con lesiones con positividad para Kv3.4 tuvieron un riesgo de incidencia de cáncer de laringe significativamente mayor que aquellos con lesiones negativas.¹⁷⁷

Bajo estas bases previas, la biología molecular emerge como una alternativa potencial excelente que podría ser utilizada por un lado para proporcionarnos marcadores más objetivos y consistentes para la identificación de las lesiones con alto riesgo de progresión y por otro para mejorar la evaluación pronóstica de las lesiones premalignas de laringe bajo criterios clínicos e histológicos lo más actualizados posible. Desde que se propuso el modelo de progresión genética en los CECC,^{15,158} aún permanecen desconocidos los eventos moleculares específicos que promueven la evolución desde las lesiones displásicas hacia el carcinoma invasivo. Como se ha comentado, hasta la fecha, ningún marcador genético o molecular ha mostrado una asociación consistente con el riesgo de progresión de las displasias de laringe.¹⁰⁵

Tanto las interacciones célula-célula como las de las células con el estroma juegan un importante papel durante la carcinogénesis. Alteraciones en proteínas implicadas en la regulación de estas interacciones son frecuentes en los CECC y han sido utilizadas también como marcadores de riesgo de cáncer en lesiones premalignas de laringe. La Osteopontina (OP) es una fosfoproteína que funciona como molécula de adhesión celular y como citoquina, interviniendo en la proliferación celular, la quimiotaxis, el anclaje y la migración de muchos tipos celulares. CD44 es una glicoproteína de superficie celular que se relaciona también con la regulación de las interacciones célula-célula y célula-matriz, la migración, el crecimiento tumoral y la progresión. Es considerado un marcador de diferenciación de células madres pluripotenciales.¹⁷⁸ Algún estudio ha sugerido la sobre-regulación del eje OPN/CD44v6 como un evento inicial durante la progresión de las displasias de laringe y podría ser utilizado como marcador predictivo en dichas lesiones.¹⁷⁹

La amplificación de 11q13 es una alteración genética prevalente en los CECC, los casos con amplificación desarrollan con mayor frecuencia recidivas y tienen un incremento del riesgo de muerte asociado al tumor.^{180,181} Los genes *CCND1* y *CTTN*, localizados en la región amplificada 11q13, han sido intensamente estudiados por nuestro grupo de trabajo como conductores potenciales de esta amplificación.^{33,122,155} Mientras que el papel de la amplificación de *CCND1* no está del todo claro³⁵ varios trabajos han demostrado la asociación de la amplificación de *CTTN* con el crecimiento agresivo tumoral, la presencia de metástasis linfáticas y un peor pronóstico en distintos tipos de carcinomas.^{37,38,38,40}

En un estudio del año 2000 realizado en nuestro laboratorio se había investigado el papel de *CCND1* y *CTTN* como genes responsables de la amplificación de 11q13, encontrando evidencias de la asociación entre la amplificación de *CTTN* con un peor pronóstico y supervivencia reducida en pacientes con CECC³³. Dichos resultados han sido confirmados recientemente en un nuevo trabajo, reforzando el papel central de *CTTN* en el amplicón 11q13 y en la progresión tumoral.¹⁵⁵ Como dato importante, la amplificación de *CTTN* sólo se encontró en displasias de alto grado que progresaron a carcinoma invasivo. El estado del gen *CTTN* estaba fuertemente correlacionado con el mRNA y la expresión proteica. Además la sobreexpresión de cortactina se correlacionó significativamente con la disminución de la supervivencia y resultó ser un factor pronóstico independiente en un análisis multivariante. Estos antecedentes indicaban que la cortactina se asociaba con invasividad y sugerían que podría emplearse también como marcador de la evolución a cáncer en lesiones premalignas de laringe, tal como se ha demostrado en este trabajo.

La cortactina puede ser un buen marcador de progresión a cáncer debido a sus múltiples funciones biológicas. Participa en la regulación de los receptores transmembrana y las dinámicas en la membrana celular, la estabilización de redes de enlaces de actina, la adhesión y la degradación de la matriz extracelular, favoreciendo la migración celular y el fenómeno invasivo. La cortactina es una proteína de unión a la actina relacionada, como hemos comentado previamente, con vías de señalización de tirosin-quinasa y Rho GTPasa que desembocan en cambios estructurales en el citoesqueleto¹²¹. Se ha descrito también el papel de la cortactina como promotor de la secreción de metaloproteasas (MMPs) necesarias para la degradación de la matriz, y en el proceso de formación de prolongaciones de la membrana celular ricas en actina (pseudópodos e invadopodios), importantes en el fenómeno invasivo¹²⁴.

Otra función de la cortactina es como estabilizador de las redes de filamentos de actina al facilitar la polimerización de dichos filamentos a través de la activación del complejo Arp2/3. Se encarga así de la regulación de las adhesiones intercelulares¹²⁵. El incremento en los niveles de expresión de cortactina se relaciona con un aumento de la adhesión entre sí de las células tumorales, implicando en ello a cambios en el complejo Arp2/3. La remodelación del citoesqueleto de actina es un mecanismo importante para la capacidad celular de migración, colabora en la adhesión celular y facilita el proceso de invasión tumoral y metástasis. Así pues, debido a estas funciones, esta proteína

reguladora podría tener un papel importante durante la tumorigénesis, lo cual parece confirmar nuestro estudio. Como hemos descrito, la expresión incrementada de cortactina y la amplificación de su gen se asociaba a un mayor riesgo de desarrollo de carcinoma, lo que sugiere su implicación en las fases iniciales de la tumorigénesis.

Los estudios *in vitro* han contribuido enormemente a caracterizar las funciones biológicas de la cortactina en procesos relativos a la tumorigénesis y a identificar las asociaciones de la misma. Se ha mostrado cómo la sobreexpresión de cortactina incrementa la migración celular y la invasión en gran variedad de tumores,^{182,183,184} apoya la activación de señalización desde el EGFR y la resistencia a la apoptosis vía PI3K/Akt.⁴⁸ Además, la sobreexpresión de cortactina ha sido ligada a la resistencia al inhibidor de la quinasa EGFR (Gefitinib),¹⁸⁵ subrayando que la cortactina también puede tener un importante papel en la respuesta terapéutica de los CECC.

En los últimos tiempos varios estudios han demostrado la relación existente entre la amplificación de *CTTN*, la sobreexpresión de la proteína y el peor pronóstico y la reducción de la supervivencia en CECC.^{40,122,155} Estos datos destacan el potencial de la cortactina como un marcador de riesgo cancerígeno y su utilidad en la estratificación del riesgo de los pacientes. De acuerdo con este potencial, en este trabajo hemos hallado que tanto la amplificación del gen *CTTN* como la sobreexpresión de cortactina se correlacionan con el riesgo de progresión de las lesiones premalignas de laringe a carcinoma invasivo. Dado que la determinación mediante inmunohistoquímica de la expresión de cortactina es un procedimiento sencillo, nuestros resultados sugieren que sería un marcador útil en la evaluación de los pacientes diagnosticados de displasia laríngea, para ayudar en la decisión terapéutica (los pacientes con expresión elevada de cortactina podrían beneficiarse de un seguimiento más estricto o mayor agresividad en el tratamiento).

No obstante la implantación rutinaria en nuestros hospitales del análisis de cortactina como biomarcador de riesgo de cáncer de laringe, requiere confirmar estos hallazgos en otros estudios prospectivos amplios y bien diseñados. Sería interesante valorar también extender las investigaciones al área de las lesiones premalignas orales, como parece que de hecho ya se está haciendo,⁴⁰ dada la mayor frecuencia de estas en la práctica clínica.

La identificación de la mayoría de los procesos biológicos regulados por FAK se ha hecho en células no neoplásicas. La activación de FAK contribuye a la regulación de las señales procedentes de las integrinas y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que promueven la adhesión celular, el crecimiento independiente del anclaje, la motilidad celular y la apoptosis.^{144,145,146}

Se ha considerado a la proteína FAK un factor clave en la regulación de las interacciones de la matriz extracelular. Esta proteína intracelular de la familia tirosinquinasa se localiza preferentemente en los lugares donde existe contacto celular focal. Los estudios nos sugieren también que FAK es un componente fundamental de las vías de señalización del factor de crecimiento plaquetario (PDGF) y del factor de crecimiento epidérmico (EGF).¹⁸⁶ Estos hechos apoyan la investigación de esta proteína también como potencial marcador de riesgo hacia la malignidad en lesiones preinvasivas.

La amplificación de la región 8q23-24 es la segunda más estudiada y ha sido definida como un importante evento inicial en la carcinogénesis de los CECC, y el gen *FAK/PKT2* uno de los más importantes de dicha región.¹⁴³ La sobreexpresión de la proteína FAK aunque no siempre se corresponde con una amplificación del gen *FAK*, ha sido documentada en los CECC.^{118,121,148} Ocurre como evento en las primeras fases de la transformación maligna en los carcinomas epidermoides, asociándose a un aumento de la invasividad y el potencial metastásico de estos tumores. En estudios previos en nuestro laboratorio se ha demostrado la sobreexpresión de FAK en lesiones premalignas de laringe adyacentes a carcinomas epidermoides, por lo que dado su papel en la invasión tumoral, podría ser útil como marcador de aquellas lesiones que tienen un mayor riesgo de progresar a carcinoma.

Como sucede con otros factores, el mecanismo genético responsable de la sobreexpresión de FAK todavía no ha sido determinado, se han encontrado en investigaciones en distintos tumores como hepatocarcinomas, niveles elevados de amplificación genética del gen *FAK/PKT2* sin correlacionarse de manera significativa con el grado de expresión proteica.¹⁵³ Ha sido estudiada también la sobreexpresión de esta proteína de adhesión en otros tipos de tumores como los de mama y cérvix uterino^{150,151} y se ha probado a su vez como diana molecular en algunos estudios con terapias biológicas.¹⁵²

En este trabajo hemos hallado que la amplificación de *FAK* no se asociaba de forma consistente con el riesgo de progresión. Sin embargo, la sobreexpresión de *FAK* sí que se correlacionaba con el riesgo de progresión de las lesiones premalignas de laringe a carcinoma invasivo, siendo el factor individual de mayor valor predictivo en el estudio univariante y el único en el multivariante. Por tanto, parece que también la desregulación de *FAK* se halla implicada en las fases iniciales de la carcinogénesis laríngea y que es un potencial marcador del riesgo de malignización.

A pesar de que la función fisiológica de la podoplanina permanece aún desconocida, se sabe que actúa como un marcador específico de la linfangiogénesis¹³⁹ debido a su expresión específica en el endotelio linfático y no en los vasos sanguíneos. Recientes resultados experimentales han demostrado que esta glicoproteína transmembrana tipo-mucínica participa en vías que facilitan la migración celular colectiva y la invasión tumoral a través de la regulación de la actividad de una pequeña familia de Rho GTPasas.¹³² Estos hallazgos sugieren un papel de la podoplanina en el crecimiento y reparación de los tejidos, así como en la carcinogénesis y el proceso de transformación maligna.

La deficiencia de podoplanina causaba la muerte a varios especímenes animales en una investigación debido a un fallo respiratorio, exhibiendo un fenotipo con una dilatación generalizada y malfuncionamiento del sistema linfático, manifestada como linfedema,¹³⁶ también se ha visto relacionada con la activación de la agregación plaquetaria.¹³⁷

Estudios recientes describen la frecuente expresión de este marcador del endotelio linfático en distintos tipos de tumores.^{132,133} Si bien pocos trabajos se centran en el área de cabeza y cuello.¹³¹ Ha quedado demostrado como la podoplanina se expresa frecuentemente en las leucoplasias orales y en conjunción con el análisis histopatológico puede servir como un valioso biomarcador para predecir el riesgo de desarrollar un cáncer de cavidad oral.^{138,142}

Podoplanina ha sido identificada también como un marcador de las células iniciadoras de tumores (TICs), también conocidas como células madre tumorales, en los CECC. La tumorigénesis y la capacidad de desarrollar carcinomas epidermoides son propiedades de las TICs. Las lesiones premalignas con expresión de podoplanina en la

capa basal pueden representar lesiones neoplásicas iniciales, enriquecidas en TICs y con un alto riesgo de progresión hacia cáncer invasivo.¹⁸⁷ Además de los mecanismos intrínsecos, el ambiente también ejerce influencia en la capacidad de las TICs para generar tumores.

Otro de los mecanismos por los que la podoplanina podría constituir un marcador de riesgo de progresión útil, es el hecho de que su expresión se ha visto incrementada en el proceso de regeneración epidérmica y esto podría estar relacionado con una vía que regule la migración celular durante la reparación tisular y esta vía participe de alguna forma aún desconocida en el fenómeno de invasión confiriendo a las células tumorales ventajas respecto a otras células epiteliales adyacentes.¹³²

Durante el proceso de migración de las células cancerígenas se ha descrito la transición epitelio-mesenquimal y se ha encontrado relación entre la expresión de podoplanina y la llamada migración celular colectiva.¹³⁹ También se ha sugerido un papel de esta en la reorganización del citoesqueleto de actina.

En este trabajo hemos podido confirmar este potencial de la podoplanina como marcador de riesgo de malignización en lesiones premalignas de laringe. Aunque tanto cortactina como FAK parecen ser mejores predictores independientes del riesgo de progresión.

En relación al posible papel de la podoplanina en la progresión tumoral, ha sido descrito que la sobreexpresión de podoplanina se asocia de forma significativa con las metástasis linfáticas y una reducción de la supervivencia en los carcinomas epidermoides orales.¹³⁸ En contraste con estos hallazgos, no hemos encontrado en estudios previos una relación significativa entre la expresión de podoplanina y las metástasis ganglionares ni el peor pronóstico en el cáncer de laringe. La expresión de esta proteína fue considerablemente más frecuente en tumores glóticos, que suelen ser de menor tamaño y diagnosticados en un estadio más precoz, que en los tumores supraglóticos. Así pues, la expresión de podoplanina parece ser un evento precoz en la carcinogénesis laríngea, pudiendo facilitar la iniciación tumoral y la invasión, pero no parece tener papel en la progresión una vez iniciado el tumor.

Nuestros hallazgos indican que con frecuencia también la podoplanina se sobreexpresa anormalmente en los estadios iniciales de la tumorigénesis laríngea y los

36 (45%) pacientes cuyas lesiones displásicas fueron podoplanina positivas (2+ y 3+) mostraron una mayor incidencia de cáncer de laringe que los pacientes con expresión negativa (47% Vs 24%). Dado que la expresión de esta glicoproteína mucinosa no se relaciona con el grado de severidad histopatológico, esta tendencia hacia el peor pronóstico en los pacientes con lesiones que muestran sobreexpresión de podoplanina sugiere un papel de esta proteína en el desarrollo del cáncer de laringe.

De cualquier forma la expresión de podoplanina por sí sola no es suficiente para promover la tumorigénesis dado que un alto porcentaje de lesiones que progresaron a carcinoma (39%) mostraban expresión en la capa de células basales (grado 1), hecho independiente del grado de severidad histopatológico. Así pues se necesitan otros factores para promover la expansión clonal de las células tumorales.

En esta tesis hemos analizado por primera vez de manera conjunta el papel de la expresión de cortactina, FAK y podoplanina en la transformación maligna de las lesiones premalignas de laringe, relacionando los datos de expresión con los parámetros clínico-patológicos y el pronóstico (evolución de las lesiones). Nuestros hallazgos demuestran que todas estas proteínas se expresan de forma anormal en los estadios iniciales de la tumorigénesis laríngea y que los pacientes de este estudio cuyas displasias laríngeas expresaban de forma intensa en el análisis mediante inmunohistoquímica cualquiera de ellas, mostraban un riesgo significativamente mayor de desarrollar un carcinoma epidermoide en ese mismo lugar durante el seguimiento posterior que aquellos pacientes en cuyas muestras se apreciaba una expresión de grado débil-moderado.

De acuerdo a nuestros datos, tanto cortactina, como FAK y podoplanina parecen mostrarse como marcadores biológicos relevantes que contribuyen al desarrollo de cáncer laríngeo. Aunque hay una tendencia al incremento de la expresión de estas proteínas en displasias severas/CIS, el diagnóstico histopatológico de estas lesiones no parece jugar un importante papel en el riesgo de progresión hacia la malignidad en la cohorte de pacientes de este estudio. En contraste, la sobreexpresión intensa de dichos marcadores moleculares mostró una asociación robusta con un incremento del riesgo de cáncer de laringe y de forma más significativa la sobreexpresión de FAK sola o en combinación con las otras fue predictor independiente del riesgo en el análisis multivariante. De esta forma, los pacientes con expresión intensa de FAK presentaban un riesgo 3 veces superior de desarrollar un carcinoma.

Es más, la combinación de cortactina y FAK fue superior en términos de valor predictivo y sensibilidad, y por tanto sería recomendable su uso como marcadores complementarios. En este sentido, hemos visto como la expresión simultánea de ambas proteínas no es superior en términos de valor predictivo a la expresión de cada una de ellas independientemente, pero combinando su expresión somos capaces de detectar más casos con riesgo de progresar a carcinoma que si sólo se usa una de ellas. Es decir, la expresión intensa de cada una de estas proteínas independientemente señala un riesgo aumentado de evolución a carcinoma invasivo, y aunque en muchos casos ambas se hallan sobreexpresadas simultáneamente, existen otros que sólo tienen sobreexpresión de una de las dos, de forma que la determinación de ambas nos aumenta nuestra capacidad de detectar los casos con riesgo aumentado. Sin embargo, la adicción de la determinación de podoplanina no nos aumenta nuestra capacidad predictiva.

El diagnóstico histopatológico de las lesiones premalignas de laringe es el “gold standard” usado en la práctica clínica diaria para determinar el riesgo de progresión hacia carcinoma epidermoide y la toma de decisiones en lo relativo al seguimiento y control más o menos exhaustivo de los pacientes. Dado que el análisis mediante técnicas de inmunohistoquímica de cortactina y FAK es relativamente sencillo, barato y fácil de interpretar para cualquier servicio de anatomía patológica de nuestros hospitales, parece razonable que sea recomendado como test molecular en las displasias de laringe.

De cualquier forma la utilización de forma rutinaria de estos biomarcadores del riesgo de progresión a cáncer de laringe requiere confirmar estos datos obtenidos con más estudios prospectivos y con un número mayor de pacientes. Sería interesante además extender esta línea de investigación hacia estudios en otras localizaciones dentro del área de cabeza y cuello, por ejemplo en la cavidad oral, donde las leucoplasias orales son lesiones premalignas frecuentemente diagnosticadas muy similares histopatológicamente de las displasias laríngeas y habría que presumir que posiblemente también en el plano molecular existan estas similitudes.

Además de analizar la expresión proteica, en el caso de cortactina y FAK, dado que sus genes se hallan con frecuencia amplificados en los carcinomas de laringe, se estudió el número de copias de los mismos. En nuestra serie, hemos hallado que la amplificación de *CTTN* y *FAK* estaba presente en el 12% y 32% respectivamente de

muestras. Pero a diferencia de las proteínas, sólo la amplificación genética de *CTTN* predice la progresión a carcinoma epidermoide.

La información genética complementó el análisis de la expresión de cortactina utilizando las mismas muestras. Encontramos que todos los casos con amplificación de *CTTN* se acompañaban del incremento de la expresión proteica de forma significativa, pero hay muchos casos sin amplificación con sobreexpresión, lo cual indica que la amplificación de *CTTN* no es el único mecanismo responsable de la sobreexpresión de la cortactina. Mecanismos adicionales (probablemente transcripcionales) contribuyen a la regulación de la expresión de cortactina. Además observamos que la sobreexpresión de cortactina, precede frecuentemente a la amplificación genética durante el proceso de tumorigénesis laríngea: la amplificación de *CTTN* sólo fue observada en displasias de alto grado (2 displasias moderadas y 8 displasias severas/CIS) y la expresión intensa de cortactina se detectó también en displasias leves. Estos resultados concuerdan con estudios previos realizados en nuestro grupo sobre la progresión de los CECC^{33, 155}. Por otro lado, nuestros hallazgos de que 6 (60%) de los pacientes en los que se apreció amplificación de *CTTN* progresaron hacia carcinoma infiltrante refuerzan el papel de *CTTN* en la transformación maligna y en la adquisición del fenotipo invasivo en el carcinoma de laringe, si bien no parece ser una alteración genética frecuente en lesiones premalignas de laringe.

También en el caso de FAK la amplificación del gen *FAK* se correlacionaba con el grado de expresión proteica, aunque había casos con amplificación que no mostraban sobreexpresión de la proteína, por lo que al igual que en el caso de cortactina, la amplificación genética no debe ser el único mecanismo responsable de la sobreexpresión, tal y como se demostraba en investigaciones previas de nuestro grupo¹⁵⁵. Además la frecuencia de amplificación de *FAK* se incrementaba con el grado de severidad de la displasia, pero sin embargo, no se correlacionaba con el riesgo de progresión a carcinoma. Esto confirma que los mecanismos responsables de la sobreexpresión de FAK implicados en la progresión de los carcinomas de laringe deben ser otros diferentes a la amplificación del gen, siendo probablemente mecanismos de regulación transcripcional.

Esta tesis también nos revela información sobre la frecuencia y temporalidad de los cambios moleculares durante los diferentes estadios de la tumorigénesis laríngea. Así, se detecta sobreexpresión de cortactina y FAK en las fases iniciales (desde displasia leve)

y su frecuencia aumenta con la severidad de la displasia. También se aprecia como la frecuencia de la amplificación de *CTTN* y *FAK* aumenta con la severidad de la displasia, y que para cada grado de displasia es mayor el porcentaje de casos con sobreexpresión proteica que con amplificación génica, lo cual indica que la sobreexpresión precede a la amplificación. Estas observaciones son concordantes con nuestros hallazgos previos en los CECC.¹⁵⁵

De igual manera que cuando nos referíamos a la expresión de podoplanina, la sobreexpresión de cortactina y *FAK* pueden no ser suficientes para promover el inicio de la tumorigénesis, dado que 9 (32%) de los casos que evolucionaron a carcinoma se desarrollaron sobre lugares donde la displasia previa había mostrado una expresión débil-moderada de ambas proteínas. Es posible, de cualquier modo, que las lesiones premalignas hubieran sido biopsiadas previamente a que se produjera el evento molecular, o bien que los tumores se hubieran originado a partir de lesiones clínicamente no visibles en el momento de la toma de la biopsia, y por tanto no analizadas.

De acuerdo a estos datos, encontramos 8 pacientes que muestran una sobreexpresión intensa de cortactina y/o *FAK* en la muestra tumoral, mientras que en la correspondiente muestra de lesión premaligna previa la expresión de ambas proteínas fue débil – moderada. Además nuestros hallazgos confirman que la expresión de cortactina y *FAK* se mantiene o incrementa en el tumor con respecto a la lesión premaligna en todos los casos estudiados. Todo ello apoya el importante papel biológico y clínico de cortactina y *FAK* en el desarrollo y progresión del cáncer de laringe.

Estas alteraciones moleculares surgen como unos marcadores válidos a la hora de identificar una subpoblación de pacientes con un riesgo aumentado de desarrollar cáncer que podría beneficiarse de un tratamiento y seguimiento más exhaustivo. Dado que el tratamiento de los tumores laríngeos ocasiona repercusiones funcionales considerables, los nuevos marcadores de riesgo indudablemente mejorarán el control local, la supervivencia total y contribuirán a la reducción de la mortalidad y a la conservación de la función del órgano.

Por otra parte, al estar incrementada su expresión, estas proteínas son potenciales dianas terapéuticas. En los últimos años están surgiendo investigaciones con pequeñas moléculas inhibitoras de las proteínas con actividad Src quinasa (como Dasatinib y

Saracatinib), que se han demostrado como inhibidores efectivos de la invasión y metástasis en los CECC en estudios preclínicos, mediante la inhibición de la fosforilación de substratos de Src como cortactina y FAK, importantes en la formación de pseudópodos y en la degradación de la matriz extracelular.^{188,189,190,153} Estos hallazgos están siendo evaluados en ensayos clínicos en curso actualmente.¹⁹¹

Parece razonable así pues la recomendación de combinar el diagnóstico histopatológico en las lesiones premalignas de laringe, el “gold standard” hasta la fecha en la práctica clínica para la toma de decisiones y el asesoramiento al paciente sobre el riesgo de cáncer, con el análisis inmunohistoquímico de la expresión proteica de marcadores de progresión para adjuntar al informe anatomopatológico rutinario. De cualquier forma el análisis de la expresión requiere por el momento su validación y los resultados obtenidos pueden aún mostrar mucha variabilidad inter e intra-observador. La implementación de rutina en nuestros centros sanitarios de biomarcadores prometedores de predicción de riesgo de cáncer precisa todavía la confirmación en estudios prospectivos, amplios y bien estandarizados. Este es el siguiente paso que nos hemos propuesto y que se halla en proceso de realización.

6- CONCLUSIONES

1.- Cortactina y FAK se expresan débilmente en el epitelio normal de la laringe. La inmunotinción de cortactina y FAK fue detectada preferentemente en el citoplasma de las células epiteliales, mientras que algunos casos mostraron enriquecimiento proteico en la periferia de la célula (tinción de membrana).

2.- La podoplanina no se expresa habitualmente, o sólo en forma de células sueltas en la capa basal, en el epitelio laringe normal. Si se expresa en las células endoteliales de los vasos linfáticos de la submucosa laríngea.

3.- La expresión de cortactina, FAK y podoplanina se encuentra aumentada en diferentes grados en un porcentaje importante de las áreas del epitelio con displasia, así como en los carcinomas de laringe.

4.- La amplificación del gen *CTTN* es una alteración genética poco frecuente en lesiones premalignas laríngeas. Se correlaciona con un aumento de la expresión de la cortactina, aunque no explica todos los casos con sobreexpresión de la proteína.

5.- La amplificación del gen *FAK* es relativamente frecuente en displasias laríngeas, y también se correlaciona con la sobreexpresión de FAK, aunque tampoco explica todos los casos con sobreexpresión de esta proteína.

6.- La expresión intensa, de forma individual, de las proteínas cortactina, FAK y podoplanina se asocia con una mayor frecuencia de malignización de las lesiones premalignas de laringe, pudiendo servir como marcadores de la evolución y pronóstico de estas lesiones.

7.- La amplificación del gen *CTTN* se asocia con un mayor riesgo de cáncer en displasias laríngeas. Esta asociación no se encuentra para la amplificación del gen *FAK*.

8.- La expresión intensa de la proteína FAK es el marcador individual que se asocia de forma independiente con un mayor riesgo de progresión en las lesiones premalignas de laringe.

9.- La combinación de la expresión de FAK y cortactina muestra un mayor valor predictivo que cualquiera de los marcadores individualmente. Sin embargo, si se suma además la expresión de podoplanina no se obtiene un aumento de la capacidad predictiva.

7- BIBLIOGRAFÍA

-
- ¹ Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC.
- ² Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D: Head-and-neck cancer. *N Engl J Med* 2001, 345:1890-1900.
- ³ Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Storm H (eds.). *Cancer Incidence in Five Continents: vol I, to VIII. IARC Cancer Base, No 7, Lyon, 2005.*
- ⁴ Quer Agustí M, López Vila M. Características clínicas de los tumores de laringe. En: Suárez C. *Tratado de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello. Capítulo 230. 2ª edición, tomo IV. Madrid, Editorial Panamericana, 2009:3515-3527.*
- ⁵ Burch JD, Howe GR, Miller AB, Smenciw R. Tobacco, alcohol, asbestos and nickel in the etiology of cancer of the larynx: a case-control study. *J Natl Cancer Inst* 1981; 67:1219-1224.
- ⁶ Quer M, León X, Orús C., Recher K., Gras JR. Análisis de 2500 Carcinomas escamosos de cabeza y cuello en el Servicio de ORL del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2001;52:201-205.
- ⁷ Morales MM, Llopis A, Moreno E, Martínez MI, Vitoria I, Gisbert V. Hábitos tóxicos en relación con el cáncer de laringe. *Acta Otorrinolaringol Esp* 1997; 48:145-150.
- ⁸ Müller KM, Krohn BR. Smoking habits and their relationship to precancerous lesions of the larynx. *J Cancer Res Clin Oncol* 1980;96:211-217.
- ⁹ Ereño Zárata Cosme. La nueva clasificación de la OMS 2005. Lesiones precursoras y los tumores de la laringe, hipofaringe y traquea. *Rev Esp Patol* 2007;vol 40,1:3-10.
- ¹⁰ Raab-Traub N. Epstein-Barr virus and nasopharyngeal carcinoma. *Semin Cancer Biol* 1992;3:297-307.
- ¹¹ Rodrigo JP, Heideman DA, García-Pedrero JM, Fresno MF, Brakenhoff RH, Díaz Molina JP, Snijders PJ, Hermsen MA. Time trends in the prevalence of HPV in oropharyngeal squamous cell carcinomas in northern Spain (1990-2009). *Int J Cancer*. 2014 ;134:487-92.
- ¹² Leena-Maija A, Heikki R, Antti V. Human papillomavirus in larynx. *Laryngoscope* 2002; 112:700-707.
- ¹³ Torrente MC, Ojeda JM. Exploring the relation between human papiloma virus and larynx cancer. *Acta Otolaryngol* 2007; 127:900-906.
- ¹⁴ Hobbs CGL, Birchall MA. Human papillomavirus infection in the etiology of laryngeal carcinoma. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 12:88-92.
- ¹⁵ Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 1996;56: 2488-2492.
- ¹⁶ Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61:759-767.
- ¹⁷ Ha PK, Califano J. The molecular biology of laryngeal cancer. *Otolaryngol. Clin. North Am.* 2002; 3; 993-1012.
- ¹⁸ Braakhuis BJ, Leemans CR, Brakenhoff RH. Expanding fields of genetically altered cells in head and neck squamous carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 2005; 15:113-120.

-
- ¹⁹ Braakhuis BJM, Tabor MP, Leemans R, van der Waal I, Snow GB, Brakenhoff RH. Second primary tumor and field cancerization in oral and oropharyngeal cancer: Molecular techniques provide new insights and definitions. *Head Neck* 2002; 24:198-206.
- ²⁰ Tan BT, Park CY, Ailles LE, Weissman JL. The cancer Stem cell hypothesis a work in progress. *Lab invest* 2006; 86:1203-1207.
- ²¹ Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* 2006;441:1075-1079.
- ²² Haddad RI, Shin DM. Recent advances in head and neck cancer. *N Engl J Med* 2008.; 359:1143-1154
- ²³ Renan MJ. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog* 1993;7:139-146.
- ²⁴ Merlo A, Herman JG, Mao L et al. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat. Med.* 1995; 1; 686-692.
- ²⁵ Reed AL, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, Ahrendt S, Eby Y, Sewell D, Nawroz H, Bartek J, Sidransky D. High frequency of p16^{CDKN2/MTS-1/INK4A} inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1996;56:3630-3633.
- ²⁶ Van der Riet P, Nawroz H, Hruban RH, Corio R, Tokino K, Koch W, Sidransky D. Frequent loss of chromosome 9p21-22 early in head and neck cancer progression. *Cancer Res* 1994;54:1156-1158.
- ²⁷ Sanz-Ortega J, Valor C, Saez MC et al. 3p21,5q21,9p21 and 17p13 allelic deletions accumulate in the dysplastic spectrum of laryngeal carcinogenesis and precede malignant transformation. *Histol Histopathol.* 2003; 18:1053-1057.
- ²⁸ Rodrigo JP, Coto E, González MV, Maldonado M, Suárez C. P53 allelic loss and the outcome of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2001;258:255-258.
- ²⁹ Westra WH, Taube JM, Poeta ML, Begum S, Sidransky D, Koch WM. Inverse relationship between human papillomavirus-16 infection and disruptive p53 gene mutations in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14:366-369.
- ³⁰ Braakhuis BJ, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res.* 2003; 63; 1727-1730.
- ³¹ Gibcus JH, Menkema L, Mastik MF, et al: Amplicon mapping and expression profiling identify the Fas-associated death domain gene as a new driver in the 11q13.3 amplicon in laryngeal/pharyngeal cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13:6257-6266.
- ³² Baldin V, Lukas J, Marcote MJ et al : Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell-cycle progression in G1 . *Genes Dev* 1993;7:812-821.
- ³³ Rodrigo JP, Garcia LA, Ramos S, Lazo PS, Suárez C. EMS1 amplification correlates with poor prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Cancer Res.* 2000;6:3177-3182.
- ³⁴ Jares P, Fernandez PL, Campo E, et al. PRAD-1/Cyclin D1 gene amplification correlates with messenger RNA overexpression and tumor progression in human laryngeal carcinomas. *Cancer Res,* 1994;54:4813-4817.
- ³⁵ Callender T, El-Naggar AK, Lee MS, et al. PRAD-1 (CCND1)/CyclinD1 oncogene amplification in primary head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 1994;74:152-158.

-
- ³⁶ Luo ML, Shen XM, Zhnag Y, et al. Amplification and overexpression of CTTN (EMS1) contribute to the metastasis of esophageal squamous cell carcinoma by promoting cell migration and anoikis resistance. *Cancer Res* 2006;66:11690-11699.
- ³⁷ Hui R, Ball JR, Macmillan RD, et al. EMS1 gene expression in primary breast cancer. Relationship to cyclin D1 and oestrogen receptor expression and patient survival. *Oncogene* 1998;17 :1053-1059.
- ³⁸ Yuan BZ, Zhou X, Zimonjic DB, et al. Amplification and overexpression of the EMS1 Oncogene, a possible prognostic marker, in human hepatocellular carcinoma. *J Mol Diagn* 2003;5 :48-53.
- ³⁹ Clark ES, Brown B, Whigham AS et al. Aggressiveness of HNSCC tumors depend on expression levels of cortactin, a gene in the 11q13 amplicon. *Oncogene* 28:431-444, 2009.
- ⁴⁰ Juan Xia, Qianming Chen, Bingqi Li, Xin Zeng. Amplifications of TAOS1 and EMS1 genes in oral carcinogenesis: association with clinicopathological features. *Oral Oncology* 2007;43:508-514.
- ⁴¹ Bockmuhl U, Schluns K, Schmidt S, Matthias S, Petersen I (2002) Chromosomal alterations during metastasis formation of head and neck squamous cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 33(1):29–35.
- ⁴² Singh B, Gogineni SK, Sacks PG et al (2001) Molecular cyto-genetic characterization of head and neck squamous cell carcinoma and refinement of 3q amplification. *Cancer Res* 61(11):4506–4513.
- ⁴³ Slebos RJ, Yi Y, Ely K et al (2006) Gene expression differences associated with human papillomavirus status in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 12(3 Pt 1):701–709.
- ⁴⁴ Singh B, Stoffel A, Gogineni S et al (2002) Amplification of the 3q26.3 locus is associated with progression to invasive cancer and is a negative prognostic factor in head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Pathol* 161(2):365–371.
- ⁴⁵ Rodrigo JP, Ramos S, Lazo PS, Alvarez I, Suárez C. Amplification of ERBB oncogenes in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Eur. J. Cancer* 1996;32A:2004-2010.
- ⁴⁶ Pomerantz RG, Grandis JR. The epidermal growth factor receptor signaling network in head and neck carcinogenesis and implications for targeted therapy. *Semin. Oncol.* 2004; 31:734–443.
- ⁴⁷ Gale N, Zidar N, Kambic V, Poljak M, Cör A. Epidermal growth factor receptor, c-erbB-2 and p53 overexpressions in epithelial hyperplastic lesions of the larynx. *Acta Otolaryngol.* 1997; 527(Suppl.):105–110.
- ⁴⁸ García-Pedrero J, García-Carracedo D, Muñoz Pinto C, Herrero A, Rodrigo JP, Suárez C, González Meana MV. Frequent genetic and biochemical alterations of the PI 3-K/AKT/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2005;114:242-248.
- ⁴⁹ Sorrells DL Jr, Ghali GE, De Benedetti A, Nathan CA, Li BD. Progressive amplification and overexpression of the eukaryotic initiation factor 4E gene in different zones of head and neck cancers. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 1999; 57; 294–299.
- ⁵⁰ Nathan CO, Amirghahri N, Rice C, Abreo FW, Shi R, Stucker FJ. Molecular analysis of surgical margins in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Laryngoscope* 2002; 112:2129–2140.
- ⁵¹ Rodrigo JP, González MV, Lazo PS, Ramos S, Coto E, Alvarez I, García LA, Suárez C. Genetic alterations in squamous cell carcinomas of the hypopharynx with correlations to clinicopathological features. *Oral Oncology* 2002;38:357-363.
- ⁵² Luzar B, Poljak M, Marin IJ, Fischinger J, Gale N. Quantitative measurement of telomerase catalytic subunit (hTERT) mRNA in laryngeal squamous cell carcinomas. *Anticancer Res.* 2001;21:4011–

- ⁵³ Koch WM, McQuone S. Clinical and molecular aspects of squamous cell carcinoma of the head and neck in the nonsmoker and nondrinker. *Curr Opin Oncol* 1997; 9:257-261.
- ⁵⁴ Álvarez-Marcos C, Dominguez Iglesias F, Sampedro Nuño A. Aspectos clínicos de las neoplasias intraepiteliales potencialmente invasivas de cabeza y cuello. en Suárez C. *Tratado de Otorrinolaringología y Cirugía de cabeza y cuello, 2ª Edición, Tomo 4, Madrid, Editorial panamericana* 2009; 229:3489-3514.
- ⁵⁵ Vaezi MF, Qadeer MA, Lopez R, Colabianchi N. Laryngeal cancer and gastroesophageal reflux disease: a case-control study. *Am. J. Med.* 2006; 119:768-776.
- ⁵⁶ Poljak M, Gale N, Kambic V. Human papillomaviruses: a study of their prevalence in the epithelial hyperplastic lesions of the larynx. *Acta Otolaryngol.* 1997; 527(Suppl.); 66-99.
- ⁵⁷ Bouquot JE, Gnepp DR. Laryngeal precancer: a review of the literature, commentary, and comparison with oral leukoplakia. *Head Neck* 1991; 13; 488-497.
- ⁵⁸ Riera Velasco JR, Suárez Nieto C, Pedrero C, Álvarez-Marcos C. Premalignant lesions of the larynx: pathological prognostic factors. *J Otolaryngol* 1987;16:367-370.
- ⁵⁹ Fleskens SA, Bergshoeff VE, Voogd AC et al. Interobserver variability of laryngeal mucosal premalignant lesions: a histopathological evaluation. *Mod Pathol* 2011; 24:892-898.
- ⁶⁰ Sarioglu S, Cakalagaoglu F, Elagoz S et al. Inter-observer agreement in laryngeal pre-neoplastic lesions. *Head Neck Pathol* 2010; 4: 276-280.
- ⁶¹ Wenig BM. Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: precursors and problematic variants. *Mod. Pathol.* 2002;15:229-254.
- ⁶² Lubsen H, Olde Kalter PH. Premalignant laryngeal lesions. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 1992;46:117-126.
- ⁶³ Sadri M, McMahon J, Parker A. Management of laryngeal dysplasia: a review. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2006 Sep;263:843-852.
- ⁶⁴ Baletic N, Petrovic Z, Pendjer I, Malicevic H. Autofluorescent diagnostics in laryngeal pathology. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2004; 261: 233-237.
- ⁶⁵ Andrea M, Dias O, Santos A. Contact endoscopy: A new technique for endoscopic examination of the larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995; 104:333-339.
- ⁶⁶ Arens C, Glanz H, Dreyer T, Malzhan K. Compact Endoscopy of the larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2003; 112:113-119.
- ⁶⁷ Crissman JD, Zarbo RJ, Drozowicz S, Jacobs J, Ahmad K, Weaver A. Carcinoma in situ and microinvasive squamous carcinoma of the laryngeal glottis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1988; 114:299-303.
- ⁶⁸ Roquette J. Microcirugía laríngea con láser CO2 en el cáncer de cuerda vocal. En Alvarez Vicent JJ, Sacristán Alonso T (eds), *Cáncer de cuerda vocal.* 214-227. Editorial Garsi. Madrid, 1995.
- ⁶⁹ García-Tapia Urrutia R. El láser en la fonocirugía. En: García-Tapia Urrutia R, Cobeta Marco I (eds), *Diagnóstico y tratamiento de los trastornos de voz.* 323-331. Editorial Garsi. Madrid, 1996.
- ⁷⁰ Koufman JA. The endoscopic management of early squamous carcinoma of the vocal cord with the carbon dioxide surgical laser: Clinical experience and proposed subclassification. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1986; 95:531-537.

-
- ⁷¹ Hirano M, Sato K. Laser surgery for epithelial hyperplasia of the vocal fold. *Ann Otol Rhinol* 1993; 102:85-91.
- ⁷² Kambic V. Difficulties in management of vocal cord precancerous lesions. *J. Laryngol. Otol.* 1978; 92:305-315.
- ⁷³ Small W Jr, Mittal BB, Brand WN, Shetty RM, Rademaker AW, Beck GG; Hoover SV. Role of radiation therapy in management of carcinoma in situ of the larynx. *Laryngoscope* 1993; 103:663-667.
- ⁷⁴ Mendenhall WM, Parsons J, Stringer SP, Cassisi NJ. Management of Tis; T1 and T2 squamous cell carcinoma of the glottic larynx. *Am J Otolaryngol* 1994; 15:250-257.
- ⁷⁵ Stenersen TC, Hoel PS, Boysen M. Carcinoma in situ of the larynx: an evaluation of its natural clinical course. *Clin Otolaryngol* 1991; 16:358-363.
- ⁷⁶ Murty G, Diver JP, Bradley PJ. Carcinoma in situ of the glottis: radiotherapy or excision biopsy? *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1993; 102:592-595.
- ⁷⁷ Nigam A, Campbell JB, Das Gupta AR. Radiation induced tumours of the pharynx- can they be avoided? *J Laryngol Otol* 1990; 104:129-130.
- ⁷⁸ Ferlito A, Polidoro F, Rossi M. Pathological basis and clinical aspects of treatment policy of carcinoma in situ of the larynx. *J Laryngol Otol* 1981; 95:141-154.
- ⁷⁹ Stenersen TC, Hoel PS, Boysen M. Carcinoma in situ of the larynx: Results with different methods of treatment. *Acta Otolaryngol Suppl (Stock)* 1988; 449:131-133.
- ⁸⁰ Lippman SM, Batsakis JG, Thot BB, Weber RS, Lee JJ, Martin JW, Hays GL, Goepfert H, Hong WK. Comparison of low-dose isotretinoin with beta carotene to prevent oral carcinogenesis. *N Engl J Med* 1993; 328:15-20
- ⁸¹ Lotan R, Xu XC, Lippman SM, Ro JY, Lee JS, Lee JJ, Hong WK. Suppression of retinoic acid-receptor beta in premalignant oral lesions and its up-regulation by isotretinoin. *N Engl J Med* 1995; 332:1405-1410.
- ⁸² Almadori G. Pilot phase IIA study for evaluation of the efficacy of folic acid in the treatment of laryngeal leukoplakia. *Cancer* 2006; 107:328-336.
- ⁸³ Perag D, Lishner M. Non steroidal anti-inflammatory drugs for the prevention and treatment of cancer. *J International Med* 2005; 258:115-123.
- ⁸⁴ Caponigro F, Formato F, Caraglia M, Normanno N, Laffaioli RV. Monoclonal antibodies targeting epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor with a focus in head and neck tumors. *Curr Opin Oncol* 2005; 17:212-217.
- ⁸⁵ Hellquist H, Lundgren J, Olofsson J. Hyperplasia, keratosis, dysplasia and carcinoma in situ of the vocal cords a follow-up study. *Clin Otolaryngol* 1982;7:11-27.
- ⁸⁶ Olde Kalter P, Lubsen H, Delemarre JFM, Snow G. Squamous cell hyperplasia of the larynx. A clinical follow-up study. *J Laryngol Otol* 1987; 101: 579-588.
- ⁸⁷ Blackwell KE, Fu YS, Calcaterra TC. Laryngeal dysplasia. A clinicopathologic study. *Cancer* 1995;75:457-463.
- ⁸⁸ Barnes L, Eveson JW, Reichard P, Sidransky D. Pathology and genetics of head and neck tumours. WHO classification of tumours, 2005; IARC Press, Lyon, 177-180.
- ⁸⁹ Gale N, Kambic V, Michaels L, Cardesa A, Hellquist H, Zidar N, Poljac M. The Ljubljana classification. *Adv Anat Pathol* 2000; 7:240-251.

-
- ⁹⁰ Ferlito A, Devaney KO, Woolgar JA et al. Squamous epithelial changes of the larynx: diagnosis and therapy. *Head Neck* 2011; 46: 234-245.
- ⁹¹ Friedmann I, Ferlito A. *Granulomas and neoplasms of the larynx*. Churchill Livingstone, Edinburgh 1988; p 111-122.
- ⁹² Brenan JA, Mao L, Hruban RH, Boyle JO. Molecular assessment of histopathological staging in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 1995; 332:429-35.
- ⁹³ Barrera JE, Ai H, Pan Z, Meyers A, Varela-García M. Malignancy detection by molecular cytogenetics in clinically normal mucosa adjacent to head and neck tumors. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;124:847-851.
- ⁹⁴ Chao DL, Eck JT, Brash DE, Maley CC, Luebeck EG. Preneoplastic lesion growth driven by the death of adjacent normal stem cells. *PNAS* 2008; 105:15034-15039.
- ⁹⁵ Cabanillas R, Llorente JL. The Stem Cell Network model: clinical implications in cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2009; 266:161-170.
- ⁹⁶ Lydiatt WM, Anderson PE, Barzana T, Casale M, et al. Molecular support for field cancerization in the head and neck. *Cancer* 1998;82:1376-1380.
- ⁹⁷ Gale N, Michaels L, Luzar B, Poljak M, Zidar N, Fischinger J & Cardesa A. Current review on squamous intraepithelial lesions of the larynx. *Histopathology* 2009; 54:639-656.
- ⁹⁸ Böcking A, Chatelain R, Homge M, Daniel R, Gillisen A, Wholtman D. Representativity and reproductibility of DNA malignancy grading in different carcinomas. *Anal Quant Cytol Histol* 1989; 11:81-86.
- ⁹⁹ Álvarez C, Martínez JP, Noval J, Hevia RM, Suárez C, Sampedro A, Riera JR. Escala clínico-histológica en el pronóstico de las lesiones preinvasivas de laringe. *Acta Otorrinolaring Esp* 1996; 47:33-37.
- ¹⁰⁰ Gallo A, de Vincentiis M, Della Rocca C, Moi R, Simonelli M, Minh A, Shaha AR. Evolution of precancerous laryngeal lesions: a clinicopathologic study with long-term follow-up on 259 patients. *Head Neck* 2001; 23:42-47.
- ¹⁰¹ Ricci G, Molini E, Faralli M, Simoncelli C. Retrospective study on precancerous laryngeal lesions: long-term follow-up. *Acta Otorhinolaryngol. Ital.* 2003; 23; 362–367.
- ¹⁰² Isenberg JS, Crozier DL, Dailey SH. Institutional and comprehensive review of laryngeal leukoplakia. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2008 Jan;117:74-79.
- ¹⁰³ Sllamniku B, Bauer W, Painter C, Sessions D. The transformation of laryngeal keratosis into invasive carcinoma. *Am J Otolaryngol* 1989; 10:42-54.
- ¹⁰⁴ Jeannon JP, Soames JV, Aston V, et al. Molecular markers in dysplasia of the larynx: expression of cyclin-dependent kinase inhibitors p21, p27 and p53 tumour suppressor gene in predicting cancer risk. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 2004;29(6):698-704.
- ¹⁰⁵ Rodrigo JP, García-Pedrero J, Suarez Nieto C et al. Biomarkers predicting malignant progression of laryngeal epithelial precursor lesions: a systematic review. *Eur Arch Oto* 2012; 269:1073-1083.
- ¹⁰⁶ Chatrath P, Scott IS, Morris LS, Davies RJ et al. Aberrant expression of minichromosome maintenance protein-2 and Ki67 in laryngeal squamous epithelial lesions. *Br J Cancer*, 2003;89(6):1048-1054.
- ¹⁰⁷ Zhao R, Hirano M, Kurita S. Expression of proliferating cell nuclear antigen in premalignant lesions of the larynx. *Am J Otolaryngol*, 1996;17(1):36-44.

-
- ¹⁰⁸ Ioachim E, Assimakopoulos D, Peschos D et al. Immunohistochemical expression of metallothionein in benign, premalignant and malignant epithelium of the larynx: correlation with p53 and proliferative cell nuclear antigen. *Pathol Res Pract*, 1999; 195(12):809-814.
- ¹⁰⁹ Anghelina F, Ionita E, Popescu CF et al. Clinical, morphological and immunohistochemical aspects in laryngeal premalignant lesions. *Rom J Morphol Embryol*, 2006;47(2):169-174.
- ¹¹⁰ Krecicki T, Jelen M, Szajowski K et al. Immunohistochemically stained markers (p53, PCNA, bcl-2) in dysplastic lesions of the larynx. *Cancer Lett*, 1999;143(1):23-28.
- ¹¹¹ Peschos D, Tsanou E, Stefanou D et al. Expression of cyclin-dependent kinases inhibitors p21(WAF1) and p27(KIP1) in benign, premalignant and malignant laryngeal lesions, correlation with cell cycle regulatory proteins. *In vivo*, 2004;18(6):719-724.
- ¹¹² Ioachim E, Assimakopoulos D, Goussia AC, Peschos D et al. Glycoprotein CD44 expression in benign, premalignant and malignant epithelial lesions of the larynx: an immunohistochemical study including correlation with Rb, p53, Ki-67 and PCNA. *Histol Histopathol*, 1999;14(4):1113-1118.
- ¹¹³ Ioachim E, Assimakopoulos D, Agnantis NJ et al. Altered patterns of retinoblastoma gene product expression in benign, premalignant and malignant epithelium of the larynx: an immunohistochemical study including correlation with p53, bcl-2 and proliferating indices. *Anticancer Res*, 1999;19(1A):541-545.
- ¹¹⁴ Yuge T, Nibu K, Kondo K, Shibahara J, Tayama N, Sugasawa M. Loss of FHIT expression in squamous cell carcinoma and premalignant lesions of the larynx. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol*. 2005; 114; 127–131.
- ¹¹⁵ Luzar B, Poljak M, Marin IJ, Gale N. Telomerase reactivation is an early event in laryngeal carcinogenesis. *Mod. Pathol*. 2003;16:841–848.
- ¹¹⁶ Rodrigo JP, Domínguez F, Alvarez C, Manrique C, Herrero A, Suárez C. Expression of E-cadherin in squamous cell carcinomas of the supraglottic larynx with correlations to clinicopathological features. *Eur J Cancer* 2002;38:1059-1064.
- ¹¹⁷ Rodrigo JP, Domínguez F, Alvarez C, González MV, Herrero A, Suárez C. Clinicopathologic significance of expression of CD44s and CD44v6 isoforms in squamous cell carcinoma of the supraglottic larynx. *Am J Clin Pathol* 2002;118:67-72.
- ¹¹⁸ Canel M, Secades P, Rodrigo JP, Cabanillas R, Herrero A, Suárez C, Chiara MD. Overexpression of focal adhesion kinase in head and neck squamous cell carcinoma is independent of FAK gene copy number. *Clin Cancer Res* 2006; 12:3272-3279.
- ¹¹⁹ Cohen-Kerem R, Madah W, Sabo E et al. Cytokeratin-17 as a potential marker for squamous cell carcinoma of the larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2004;113(10):821-827.
- ¹²⁰ Kim MM, Clinger JD, Masayeva BG et al. Mitochondrial DNA quantity increases with histopathologic grade in premalignant and malignant head and neck lesions. *Clin. Cancer Res*. 2004;10:8512–8515.
- ¹²¹ Laura C. Kelley, Sohrab Shahab, Scott A. Weed. Actin cytoskeletal mediators of motility and invasion amplified and overexpressed in head and neck cancer. *Clin Exp Metastasis* 2008;9:154-60.
- ¹²² Schuurin E. The involvement of the chromosome 11q13 region in human malignancies: cyclin D1 and EMS1 are two new candidate oncogenes- a review. *Gene* 1995;159:83-96.
- ¹²³ Weed SA, Parsons JT. Cortactin: coupling membrane dynamics to cortical actin assembly. *Oncogene* 2001;20:6418-6434.

¹²⁴ Clark ES, Whigham AS, Yarbroug WG, et al: Cortactin is an essential regulator of matrix metalloproteinase secretion and extracellular matrix degradation in invadopodia. *Cancer Res* 2007;67:4227-4235.

¹²⁵ Van Rossum AG, Moolenaar WH, Schuurig E: Cortactin affects cell migration by regulating intercellular adhesion and cell spreading. *Exp CellRes* 2006;312:1658-1670.

¹²⁶ R.O. Hynes. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 2002; 637-687.

¹²⁷ F.M. Helwani, E.M. Kovacs, S.A. Weed et al. Cortactin is necessary for E-cadherin-mediated contact formation and actin reorganization. *J Cell Biol*, 2004; 164:899-910.

¹²⁸ A.G. van Rossum, J.H. De Graaf, E Schuurig et al. Alternative splicing of the actin binding domain of human cortactin affects cell migration. *J Biol Chem*, 2003; 45:672-679.

¹²⁹ Hofman P, Butori C, Havet K et al. Prognostic significance of cortactina levels in head and neck squamous cell carcinoma: comparison with epidermal growth factor receptor status. *British Journal of cancer* 2008;2:1-9.

¹³⁰ Gibcus JH, Mastik MF, Menkema L, et al: Cortactin expression predicts poor survival in laryngeal carcinoma. *Br J Cancer* 2008; 98:950-955.

¹³¹ Garcia-Carracedo D, Rodrigo JP, Astudillo A, Nieto CS, Gonzalez MV. Prognostic significance of lymphangiogenesis in pharyngolaryngeal carcinoma patients. *BMC Cancer* 2010; 10:416.

¹³² Wicki A, Christofori G. The potential role of Podoplanin in tumor invasion. *British Journal of cancer* 2007;96:1-5.

¹³³ Ordonez NG. Podoplanin: a novel diagnostic immunohistochemical marker. *Adv Anat Pathol* 2006;13:83-88.

¹³⁴ Schacht V, Dadras SS, Johnson LA et al Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin type transmembrana glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am J Pathol* 2005; 166:913-921.

¹³⁵ Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H et al. Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. *Am J Pathol* 1999;154:385-394.

¹³⁶ Schacht V, Ramirez MI, Hong YK, et al. T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *EMBO J*. 2003;22:3546–3556.

¹³⁷ Kaneko M, Kato Y, Kitano T, Osawa M (2006) Conservation of a platelet activating domain of Aggrus/Podoplanin as a platelet aggregation- inducing factor. *Gene* 378: 52 – 57

¹³⁸ Yuan P, Temam S, El-Naggar AK et al. Overexpression of Podoplanin in oral cancer and its association with poor Clinical outcome. *Cancer* 2006;107:563-569.

¹³⁹ Wicki A, Lehembre F, Wick N et al. Tumor invasión in the absence of epithelial-mesenchymal transition: Podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer cell* 2006;9:261-272.

¹⁴⁰ Marks A, Sutherland DR, Bailey D, et al. Characterization and distribution of an oncofetal antigen (M2A antigen) expressed on testicular germ cell tumours. *Br J Cancer*. 1999;80:569–578.

¹⁴¹ Martin Villar E, Scholl FG, Gamallo C et al. Characterization of human PA 2.26 antigen (T1 alpha-2, podoplanin), a small membrane mucin induced in oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2005;113:899-910.

¹⁴² Kawaguchi H, El-Naggar AK, PapadimitrakapouloVet al. Podoplanin: A novel marker for oral cancer risk in patients with oral premalygnancy. *J Clin Oncol* 2008;26:354-360.

-
- ¹⁴³ Huang Q, Yu GP, McCormick SA et al. Genetic differences detected by comparative genomic hybridization in head and neck squamous cell carcinomas from different tumor sites: construction of oncogenetic trees for tumor progression. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 34: 224-233.
- ¹⁴⁴ Gabarra-Niecko V, Schaller MD, Dunty JM. FAK regulates biological processes important for the pathogenesis of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2003;22:359-374.
- ¹⁴⁵ Sieg DJ, Hauck CR, Ilic D et al. FAK integrates growth factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol* 2000; 2:249-56.
- ¹⁴⁶ Parsons TJ, Martin KH, Slack JK, Taylor JM, Weed SA. Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene* 2000;19:5606-5613.
- ¹⁴⁷ Johnson FM, Saigal B, Talpaz M, Donato NJ (2005) Dasatinib (BMS-354825) tyrosine kinase inhibitor suppresses invasion and induces cell cycle arrest and apoptosis of head and neck squamous cell carcinoma and non-small cell lung cancer cells. *Clin Cancer Res* 11(19 Pt 1):6924–6932.
- ¹⁴⁸ Canel M, Secades P, Garzón –Arango M et al. Involvement of focal adhesion kinase in cellular invasion of head and neck squamous cell carcinomas via regulation of MMP-2 expression. *Br J Cancer* 2008;98:1274-1284.
- ¹⁴⁹ Van Nimwegen MJ, Verkoeijen S, Van Buren L. et al. Requirement for focal adhesion kinase in the early phase of mammary adenocarcinoma lung metastasis formation. *Cancer Res* 2005; 65:4698-706.
- ¹⁵⁰ Oktay MH, Oktay K, Hamele-Bena D et al. Focal adhesion kinase as a marker of malignant phenotype in breast and cervical carcinomas. *Hum Pathol* 2003;34:240-245.
- ¹⁵¹ Miyazaki t, Kato H, Nakajima M et al. FAK overexpression is correlated with tumour invasiveness and lymph node metastasis in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2003;89:140-145.
- ¹⁵² Van Nimwegen MJ, van de Water B. Focal adhesion kinase: a potential target in cancer therapy. *Biochem Pharmacol* 2007;73(5):597-609.
- ¹⁵³ Weiner TM, Liu ET, Craven RJ, Cance W. Expression of focal adhesion kinase gene and invasive cancer. *Lancet* 1993;342:1024-1025.
- ¹⁵⁴ Agochiya M, Brunton VG, Owens DW et al. Increased dosage and amplification of the focal adhesion kinase gene in human cancer cells. *Oncogene* 1999;18:5646-5653.
- ¹⁵⁵ Rodrigo JP, García-Carracedo D, García LA et al. Distinctive clinicopathological associations of amplification of the cortactin gene at 11q13 in head and neck squamous cell carcinomas. *J Pathol* 2009;217:516-523.
- ¹⁵⁶ Sabattini E, Bisgaard K, Ascani S, Poggi S, Piccioli M, Ceccarelli C, Pieri F, Fraternali-Orcioni G, Pileri SA. The EnVisionTM+ system: a new immunohistochemical method for diagnostics and research. Critical comparison with the APAAP, ChemMateTM, CSA, LABC and SABC techniques. *J Clin Pathol* 1998;51:506-511.
- ¹⁵⁷ Hoffman HT, Porter K, Karnell LH, Cooper JS, Weber RS, Langer C, Ang KK, Gay G, Stewart A, Robinson RA. Laryngeal cancer in the United States: changes in demographics, patterns of care and survival. *Laryngoscope* 2006; 116(suppl 111):1-13.
- ¹⁵⁸ Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 2011; 11:9-22.
- ¹⁵⁹ Mc Laren KM, Burnett RA, Goodlad JR et al. Consistency of histopathological reporting of laryngeal dysplasia. *Histopathology* 2000; 37:460-463.

-
- ¹⁶⁰ Mehanna H, Paleri V, Robson A, Wight R, Helliwell T. Consensus statement by otorhinolaryngologist and pathologist on the diagnosis and management of laryngeal dysplasia. *Clin Otolaryngol* 2010; 35:170-176.
- ¹⁶¹ Munck-Wikland E, Edström S, Jungmark E, Kuylenstierna R, Lindholm J, Auer G. Nuclear DNA content, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and p53 immunostaining in predicting progression of laryngeal cancer in situ lesions. *Int J Cancer* 1994; 56:95-99.
- ¹⁶² Mirza S, Jeannon JP, Soames J, Wilson JA. Is Ki67 a marker for the transformation of laryngeal dysplasia to carcinoma?. *Acta Otolaryngol* 2006; 126:418-421.
- ¹⁶³ Gerdes J, Becker MH, Key G, Cattoretti G. Immunohistochemical detection of tumour growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin-fixed and routinely processed tissues. *J Pathol* 1992; 168:85-86
- ¹⁶⁴ Gallo O, Franchi A, Chiarelli I et al. Potential biomarkers in predicting progression of epithelial hyperplastic lesions of the larynx. *Acta Otolaryngol Suppl* 1997; 527:30-38.
- ¹⁶⁵ Pignataro L, Capaccio P, Pruneri G et al (1998) The predictive value of p53, MDM-2, cyclin D1 and Ki67 in the progression from low-grade dysplasia towards carcinoma of the larynx. *J Laryngol Otol* 1998; 112:455-459.
- ¹⁶⁶ Jeannon JP, Wilson JA. Cyclins, cyclin-dependent kinases, cyclin-dependent kinase inhibitors and their role in head and neck cancer. *Clin Otolaryngol* 1998; 23:420-424.
- ¹⁶⁷ Nishimura G, Tsukuda M, Zhou LX, Furukawa S, Baba Y. Cyclin D1 expression as a prognostic factor in advanced hypopharyngeal carcinoma. *J Laryngol Otol* 1999; 112:552-555.
- ¹⁶⁸ Papadimitrakopoulou V, Izzo JG, Liu DD et al. Cyclin D1 and cancer development in laryngeal premalignant patients. *Cancer Prev Res* 2009; 2:14-21.
- ¹⁶⁹ Uhlman DL, Adams G, Knapp D, Aeppli DM, Niehams D. Immunohistochemical staining for markers of future neoplastic progression in the larynx. *Cancer Res* 1996; 56:2199-2205.
- ¹⁷⁰ Gallo O, Santucci M, Franchi A. Cumulative prognostic value of p16/CDKN2 and p53 oncoprotein expression in premalignant laryngeal lesions. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89:1161-1163.
- ¹⁷¹ Guo T, Sun JW, Lv QP, Li XG. Allelic imbalance on chromosomes 3p, 9p and 17p in malignant progression of laryngeal mucosa. *J Laryngol Otol* 2008;122(1):72-77
- ¹⁷² Kleist B, Poetsch M. Divergent patterns of allelic alterations in premalignant laryngeal lesions indicate differences in the impact of morphological grading characteristics. *Oncology*, 2004;67(5):420-427.
- ¹⁷³ Brieger J, Kastner J, Gosepath J, Mann WJ. Evaluation of microsatellite amplifications at chromosomal locus 3q26 as surrogate marker for premalignant changes in mucosa surrounding head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 2006 May;167:26-31.
- ¹⁷⁴ Muro-Cacho CA, Anderson M, Cordero J, Muñoz-Antonia T. Expression of transforming growth factor beta type II receptors in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999; 5:1243-1248.
- ¹⁷⁵ Franchi A, Gallo O, Sardi I, Santucci M. Downregulation of transforming growth factor beta type II receptor in laryngeal carcinogenesis. *J Clin Pathol* 2001; 54:201-204.
- ¹⁷⁶ Pardo LA, Contreras-Jurado C, Zientkowska M, Alves F, Stühmer W. Role of voltage-gated potassium channels in cancer. *J Membr Biol* 2005; 205:115-124.
- ¹⁷⁷ Menéndez ST, Rodrigo JP, Allonca E et al. Expression and clinical significance of the Kv3.4 potassium channel subunit in the development and progression of head and neck squamous cell carcinomas. *J Pathol* 2010; 221:402-410

-
- ¹⁷⁸ Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:973–978.
- ¹⁷⁹ Staibano S, Merolla F, Testa D et al. OPN/CD44v6 overexpression in laryngeal dysplasia and correlation with clinical outcome. *Br J Cancer* 2007; 97:1545–1551.
- ¹⁸⁰ Meredith SD, Levine PA, Burns JA, et al: Chromosome 11q13 amplification in head neck squamous cell carcinoma. Association with poor prognosis. *Arch OtolaryngolHead Neck Surg* 121:790-794,1995.
- ¹⁸¹ Muller D,Millon R, Velten M, et al: Amplification of 11q13DNA markers in head and nek squamous cell carcinomas: correlation with clinical outcome. *Eur J Cancer* 33:2203-2210, 1997.
- ¹⁸² Rosthschild BL, Shim AH, Ammer Ag; et al: Cortactin overexpression regulates actin-related protein 2/3complex activity, motility, and invasion in carcinomas with chromosome 11q13 amplification. *Cancer Res* 2006;66:8017-8025.
- ¹⁸³ Yamaguchi H, Condeelis J:Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773:642-652.
- ¹⁸⁴ Hill A, McFarlane S, Mulligan K, et al: Cortactin underpins CD44-Promoted invasion and adhesion of breast cancer cells to bone marrow endothelial cells. *Oncogene* 2006;25:6079-6091.
- ¹⁸⁵ Timpson p, Wilson As, Lehrbach GM, et al: Aberrant expression of cortactin in head and neck squamous cell carcinoma cells is associated with enhanced cell proliferation and resistance to the epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib. *Cancer Res* 2007;67:9304-9314.
- ¹⁸⁶ McLean GW, Carragher NO, Avizienyte E, Evans J, Brunton VG, Frame MC. The role of focal-adhesion kinase in cáncer a new therapeutic opportunity. *Nat Rev Cancer*.2005; 5:505–515.
- ¹⁸⁷ Atsumi N, Ishii G, Kojima M, Sanada M, Fujii S, Ochiai A: Podoplanin, a marker of tumor-initiating cells in human squamous cell carcinoma A431. *Biochem Biophys Res Commun*2008,373:36-41.
- ¹⁸⁸ Summy JM, Gallick GE: Treatment for advanced tumors: SRC reclaims center stage. *Clin Cancer Res* 12:1398–1401, 2006.
- ¹⁸⁹ Green TP, Fennell M, Whittaker R, et al: Pre-clinical anticancer activity of the potent, oral Src inhibitor AZD0530. *Mol Oncol* 3:248-261, 2009.
- ¹⁹⁰ Ammer AG, Kelley LC, Hayes KE, et al: Saracatinib impairs head and neck squamous cell carcinoma invasion by disrupting invadopodia function. *J Cancer Sci Ther* 1:52-61, 2009.
- ¹⁹¹ Kopetz S, Shah AN, Gallick GE: Src continues aging: current and future clinical directions. *Clin Cancer Res* 13:7232–7236, 2007.





8- ANEXOS



RESEARCH

Open Access

Podoplanin expression in the development and progression of laryngeal squamous cell carcinomas

Juan P Rodrigo^{1*}, Dario García-Carracedo¹, María V González¹, Gonzalo Mancebo¹, Manuel F Fresno², Juana García-Pedrero¹

Abstract

Background: Podoplanin expression is attracting interest as a marker for cancer diagnosis and prognosis. We therefore investigated the expression pattern and clinical significance of podoplanin during the development and progression of laryngeal carcinomas.

Results: Podoplanin expression was determined by immunohistochemistry in paraffin-embedded tissue specimens from 84 patients with laryngeal premalignancies and 53 patients with laryngeal squamous cell carcinomas. We found podoplanin expression extending from the basal to the suprabasal layer of the epithelium in 37 (44%) of 84 dysplastic lesions, whereas normal epithelium showed negligible expression. Patients carrying podoplanin-positive lesions had a higher laryngeal cancer incidence than those with negative expression reaching borderline statistical significance (51% versus 30%, $P = 0.071$). Podoplanin expression in laryngeal carcinomas exhibited two distinct patterns. 20 (38%) cases showed diffuse expression in most tumour cells and 33 (62%) focal expression at the proliferating periphery of tumour nests. High podoplanin expression was inversely correlated with T classification ($P = 0.033$), disease stage ($P = 0.006$), and pathological grade ($P = 0.04$). There was a trend, although not significant, towards reduced disease-specific survival for patients with low podoplanin levels ($P = 0.31$) and diffuse expression pattern ($P = 0.08$).

Conclusions: Podoplanin expression increases in the early stages of laryngeal tumourigenesis and it seems to be associated with a higher laryngeal cancer risk. Podoplanin expression in laryngeal squamous cell carcinomas, however, diminishes during tumour progression. Taken together, these data support a role for podoplanin expression in the initiation but not in the progression of laryngeal cancers.

Background

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is the fifth most common cancer worldwide. Although in most studies HNSCC is considered as a single type of carcinoma, important differences in the clinical and biological behaviour have been observed depending on the location of the tumours (i. e. oral cavity, oropharynx, hypopharynx and larynx). Patients with HNSCC have benefited greatly from the latest advances in surgical techniques, radiation therapy and chemotherapy. However, despite the advancements in local control and overall quality-of-life

achieved with the use of combined modality therapies, the survival rates for HNSCC have not improved significantly over the past two decades [1]. Hence, novel methods of cancer detection and prognostication need to be developed. Recent advances in genomic and basic research have increased our understanding of the molecular processes governing tumour formation and progression. HNSCC is a heterogeneous disease involving dysregulation of multiple pathways linked to cellular differentiation, cell cycle control, apoptosis, angiogenesis, and metastasis [2]. Thus, much work is focused on the identification of better biologic and molecular factors that may serve as prognostic and predictive markers [3].

Human podoplanin is a 38-kDa mucin-type transmembrane glycoprotein consisting of 162 amino acids.

* Correspondence: juanpablo.rodrigo@sespa.princast.es

¹Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Hospital Universitario Central de Asturias, Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias, Universidad de Oviedo, Oviedo, Asturias, Spain

In normal tissues, podoplanin is expressed in kidney podocytes [4], skeletal muscle, placenta, lung and heart [5], in myofibroblasts of the breast and salivary glands, in osteoblasts and mesothelial cells [6]. Occasionally, focal expression of podoplanin can be found in circumscribed areas of the basal layer of the human epidermis [7]. As podoplanin is expressed on lymphatic but not on blood vessel endothelium, it has been widely used as a specific marker for lymphatic endothelial cells and lymphangiogenesis in many species [4], including HNSCC [8].

The expression of podoplanin is up-regulated in a number of different human cancers, including squamous cell carcinoma of the oral cavity, the lung, the cervix, the oesophagus, and the skin, in dysgerminomas of the ovary and granulosa cell tumours, in mesothelioma, and in many tumours of the central nervous system (CNS) [5,7,9-12]). In addition, recent experimental results have demonstrated that podoplanin mediates a pathway leading to collective cell migration and invasion *in vivo* and *in vitro* [12].

The expression of podoplanin in human cancers and its relationship with tumour invasion raises the possibility that podoplanin expression could be used as a biomarker for diagnosis and prognosis. Supporting this notion, podoplanin has been identified as a marker of malignant transformation and poor prognosis in oral cancer [13,14]. Since HNSCC may behave differently depending on the tumour site, in this work we analysed podoplanin expression in a series of squamous cell carcinomas and premalignant lesions of the larynx to ascertain the role of podoplanin in both malignant transformation and tumour progression and its clinical significance in laryngeal cancer.

Methods

Patients and Tissue Specimens

Surgical tissue specimens from 84 patients with premalignant lesions of the larynx and 53 patients with laryngeal squamous cell carcinomas who underwent surgical treatment at the Hospital Universitario Central de Asturias between 1996 and 2004 were retrospectively collected, following institutional review board guidelines. Informed consent was obtained from each patient. Representative tissue sections were obtained from archival, paraffin-embedded blocks and the histological diagnosis was confirmed by an experienced pathologist (M. F.F.). The sections were selected for study as follows: In premalignant lesions, the entire lesion was included in one block and therefore the section used for histological diagnosis was subsequently stained and evaluated. In carcinomas, one representative section from the middle of the tumour that also included the tumour border (containing interfaces between the tumour nests and

stroma) and normal adjacent epithelium was selected for staining.

Premalignant lesions were classified into the categories of mild, moderate or severe dysplasia following the WHO classification [15]. Fourteen (17%) lesions were classified as mild dysplasia, 26 (31%) as moderate dysplasia, and 44 (52%) as severe dysplasia/carcinoma "in situ" (CIS). All patients were men, with a mean age of 64 years (range 36-83 years). All of them were smokers, and 43 were also habitual alcohol drinkers. The patients with a diagnosis of premalignant lesion and cancer within the next six months were excluded from the study. All patients were treated by excisional biopsy using stripping microflap excision with cold instruments. A complete macroscopic exeresis of the lesion was performed in all cases, but the microscopic margins were not addressed. Patients were followed-up for a minimum of 60 months or until progression to malignancy occurs.

All patients with laryngeal squamous cell carcinoma included in this study were surgically treated. All had a single primary tumour, microscopically clear surgical margins and received no treatment prior to surgery. A total of 14 (26%) patients received post-operative radiotherapy (this was administered to stage IV patients). All but one of the patients were male, the mean age was 63 years (range 33 to 86 years). All of them were smokers and 45 were also habitual alcohol drinkers. The characteristics of the patients studied and the clinico-pathological features of their tumours are shown in Table 1. The stage of the disease was determined after the surgical resection of the tumour according to the Tumor, Lymph Node, Metastases TNM system of the International Union Against Cancer (6th edition). The histological grade was determined according to the degree of differentiation of the tumour (Broders' classification).

Patients were followed up for at least 36 months.

Immunohistochemistry

The formalin-fixed, paraffin-embedded tissues were cut into 4- μ m sections and dried on capillary-gap glass slides (DakoCytomation). The sections were deparaffinized with standard xylene and hydrated through graded alcohols into water. Antigen retrieval was performed by heating 5 minutes in a pressure cooker with citrate buffer (pH 6.0). Tissue slides were incubated overnight at 4°C in a humid chamber with mouse IgG anti-podoplanin monoclonal antibody (clone D2-40, Covance Inc. formerly Signet Catalog No. 730-01) at 1:100 dilution and staining was done by using the DakoCytomation Envision Plus peroxidase mouse system and diaminobenzidine chromogen as substrate (DakoCytomation).

Counterstaining with haematoxylin for 1 minute was the final step. After staining, the slides were dehydrated through graded alcohols and mounted with a cover slip

Table 1 Clinico-pathological characteristics of the laryngeal squamous cell carcinomas and correlations with podoplanin expression.

Parameter	No (%)	Low podoplanin expression (%)	High podoplanin expression (%)	P
Tumour site				
- Supraglottis	23 (43)	19 (83)	4 (17)	0.01
- Glottis	30 (57)	14 (47)	16 (53)	
pT classification				
- T1	14 (26)	5 (36)	9 (64)	0.033
- T2	13 (25)	7 (54)	6 (46)	
- T3	17 (32)	13 (76)	4 (24)	
- T4	9 (17)	8 (89)	1 (11)	
pN classification				
- N0	38 (72)	23 (61)	15 (39)	0.53
- N1-3	15 (28)	10 (67)	5 (33)	
Disease stage				
- I	16 (30)	5 (31)	11 (69)	0.006
- II	9 (17)	5 (56)	4 (44)	
- III	10 (19)	7 (70)	3 (30)	
- IV	18 (34)	16 (89)	2 (11)	
Degree of differentiation				
- Well differentiated	32 (60)	16 (50)	16 (50)	0.04
- Moderately differentiated	16 (30)	13 (81)	3 (19)	
- Poorly differentiated	5 (10)	4 (80)	1 (20)	
Recurrence				
- No recurrence	42 (79)	25 (60)	17 (40)	0.42
- Loco-regional recurrence	7 (13)	4 (57)	3 (43)	
- Distant metastasis	4 (8)	4 (100)	0 (0)	

using a standard medium. Expression of podoplanin in lymphatic endothelial cells within the stroma served as an internal positive control. Negative controls with an omission of the antiserum from the primary incubation were also included. The slides were analysed randomly by three of the authors, blinded to clinical data.

To allow for a comparison between the results from this study and those previously reported [13,14], two different scoring systems were used to evaluate podoplanin expression in laryngeal premalignant lesions and laryngeal carcinomas. In premalignant lesions, immunostaining was scored using a similar scoring system to that described by Kawaguchi *et al* [14], as follows: (0) if no expression was observed in any part of the epithelium, (1) expression restricted to the basal layer of the epithelium, (2) expression in the basal and suprabasal layers at one area, and (3) suprabasal layer expression at two or more areas.

In laryngeal carcinomas, podoplanin expression was scored as described by Yuan *et al*: [13]: quantity scores from 0 to 5 were respectively assigned if 0%, 1% to 10%, 11% to 30%, 31% to 50%, 51% to 80%, and 81% to 100% of the tumour cells were positive. The staining intensity was rated on a scale of 0 to 3 (0 = negative, 1 = weak, 2 = moderate, and 3 = strong). The raw data were then converted to a German Immunoreactive Score (IRS) by multiplying the quantity and staining intensity scores. Theoretically, the scores could range from 0 to 15. An IRS score above the median (7 or higher) was considered high reactivity and 0 to 6 weak. The consensus opinions were used to assign final IRS scores to the disputed cases before data analysis.

Statistical analyses

All statistical analyses were performed using the SPSS statistical software version 8.0 (SPSS Inc., Chicago, IL., USA). The χ^2 test or Fisher's exact test were used for comparison between categorical variables and Student's t-test for parametric continuous variables. Time-to-event analyses were calculated using the Kaplan-Meier product-limit estimate. Differences between times were analysed by the log-rank method. Multivariate Cox proportional hazards models were used to examine the relative impact of either variables demonstrated to be statistically significant in univariate analysis or those variables likely to have an effect on outcome. All tests were two-sided. *P* values of ≤ 0.05 were considered statistically significant.

Results

Podoplanin expression during laryngeal tumourigenesis

Podoplanin expression was consistently detected with high immunoreactivity in endothelial cells of lymphatic vessels, as expected according to its established role as lymphatic marker. In contrast, podoplanin expression in normal laryngeal epithelium was negligible or restricted to small clusters of cells within the basal layer that showed mainly membranous and cytoplasmic staining (Fig. 1A). Podoplanin expression in dysplastic laryngeal epithelium was highly variable, from no expression (Fig. 1B) to high expression (Fig. 1C), yielding a predominant membranous pattern at the basal layer. In some cases, the expression extended to suprabasal layer or above at one or multiple areas (Fig. 1C-1D).

Among the 84 dysplastic lesions analysed, 10 cases (12%) showed no detectable podoplanin expression in the epithelium (scored as 0), 37 (44%) showed podoplanin expression only in certain basal cells (scored as 1), 12 (14%) podoplanin expression extending to suprabasal layer at one area (scored as 2), and 25 (30%) at two or more areas (scored as 3), as illustrated in Figure 1. According to the criteria previously described [13],

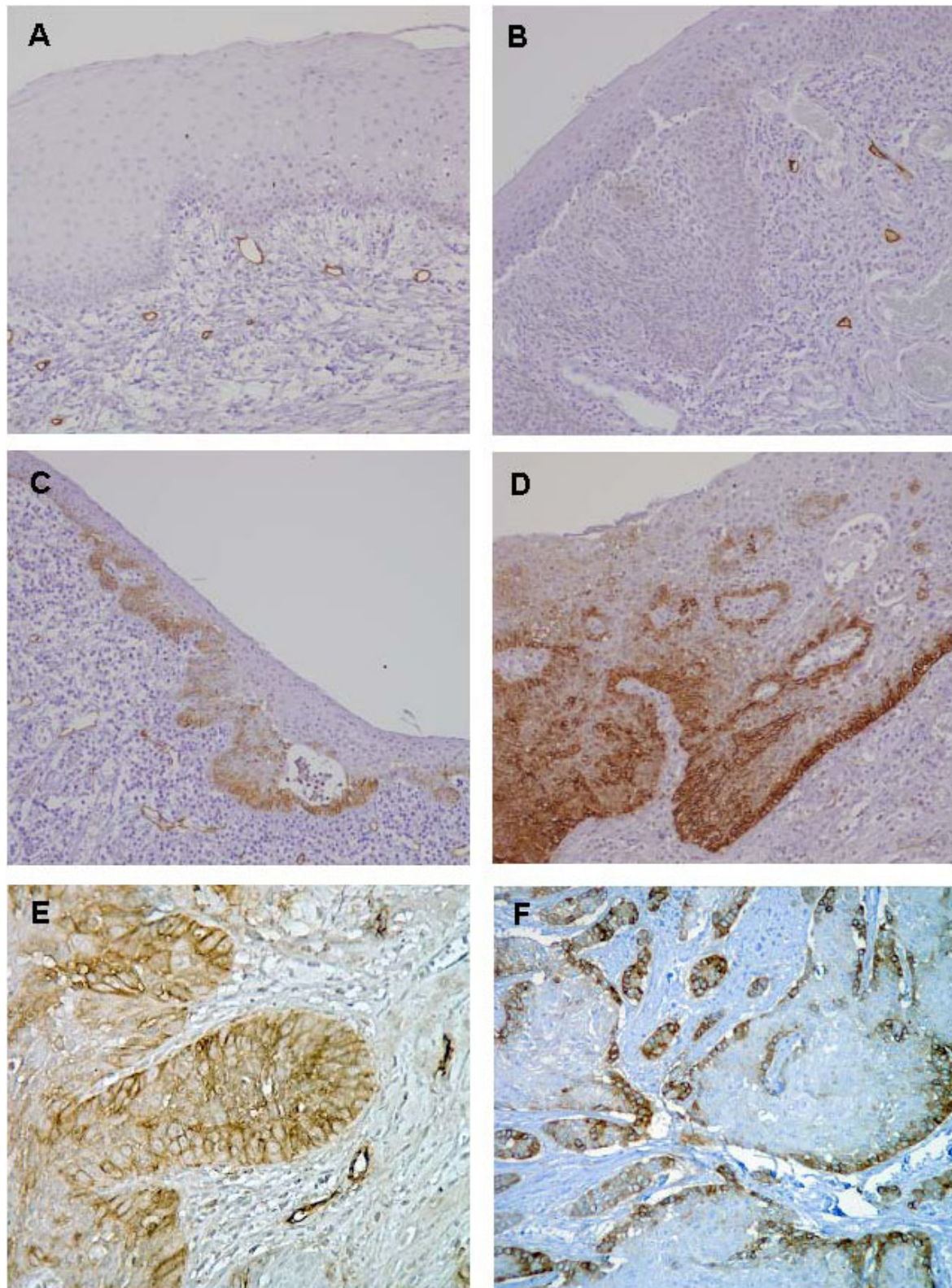


Figure 1 Immunohistochemical analysis of podoplanin expression. Representative examples of podoplanin expression in normal laryngeal epithelium (A), dysplastic epithelium with negative podoplanin staining (B), dysplastic epithelium with positive podoplanin staining scored as 2 (C) and 3 (D), laryngeal carcinomas showing diffuse podoplanin expression (E) and focal expression (F).

lesions with scores ≥ 2 were considered as podoplanin-positive based on the notion that lesions with extensive podoplanin expression beyond the basal layer may reflect clonal expansion and are more prone to progression. Thus, 37 (44%) of the 84 lesions were classified as podoplanin-positive and the remaining 47 (56%) lesions were considered podoplanin-negative.

There was no statistically significant correlation between podoplanin status and the severity of dysplasia: 5 (36%) of the 14 lesions with mild dysplasia, 9 (35%) of the 26 lesions with moderate dysplasia, and 23 (52%) of the 44 lesions with severe dysplasia/carcinoma “in situ” exhibited positive podoplanin expression ($P = 0.28$).

The expression of podoplanin in the dysplastic lesions was correlated with the risk of progression to laryngeal cancer (Table 2). During the follow-up period, 33 of the 84 patients (39%) developed an invasive carcinoma at the same site of the previous premalignant lesion. The

evolution to invasive carcinoma in relation to the histopathological diagnosis is shown in Table 2. In this cohort study, the group of patients with mild dysplasia showed the highest rate of progression to malignancy although the differences were not statistically significant. The mean time to cancer diagnosis in the cases that progressed was 28 months (range 11 to 66 months).

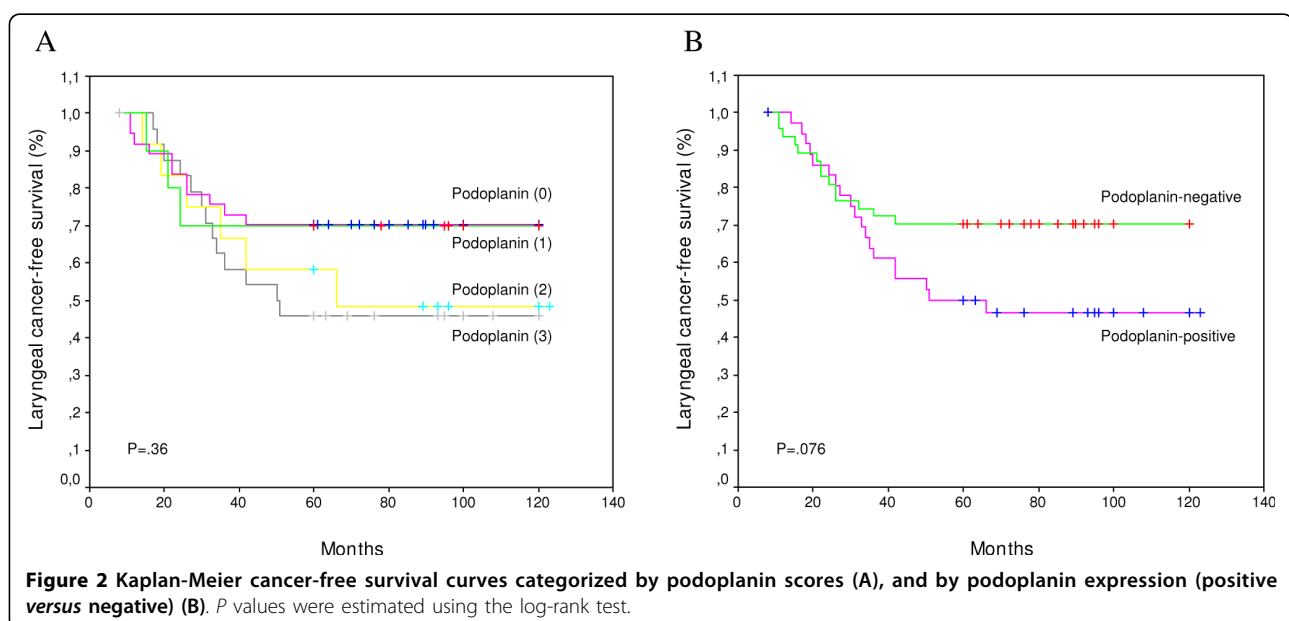
The risk for laryngeal cancer development in patients whose lesions scored 0 or 1 seems lower than in those whose lesions scored 2 or 3, especially after the first 3 years of follow-up (Fig. 2A). Consistent with these results, patients with podoplanin-positive lesions had a higher laryngeal cancer incidence than did those with podoplanin-negative lesions (Fig. 2B), although the differences did not reach statistical significance (HR = 1.84; 95%CI, 0.92-3.68; $P = 0.076$). At 5 years after the patients were diagnosed, 30% of the patients with negative podoplanin expression developed laryngeal cancer compared with 51% of the patients with positive podoplanin expression ($P = 0.071$; Table 2).

Table 2 Evolution of the premalignant lesions in relation to histopathological diagnosis and podoplanin expression

Characteristic	No. of cases	Progression to carcinoma (%)	P
Histopathological diagnosis			
- Mild dysplasia	14	7 (50)	0.27
- Moderate dysplasia	26	7 (27)	
- Severe dysplasia	44	19 (43)	
Podoplanin expression			
- Negative (scores 0-1)	47	14 (30)	0.071
- Positive (scores 2-3)	37	19 (51)	

Podoplanin expression in laryngeal squamous cell carcinomas

As expected podoplanin was highly expressed in lymphatic endothelial cells, whereas in histologically normal squamous epithelium adjacent to the tumours podoplanin expression was not detectable or extremely low in some basal cells. In laryngeal carcinomas, podoplanin expression was generally heterogeneous and exhibited two different patterns, similar to previous observations in oral cancer [12]: 20 (38%) cases showed diffuse expression in most tumour cells (Fig. 1E) and 33 (62%) cases showed focal expression at the proliferating

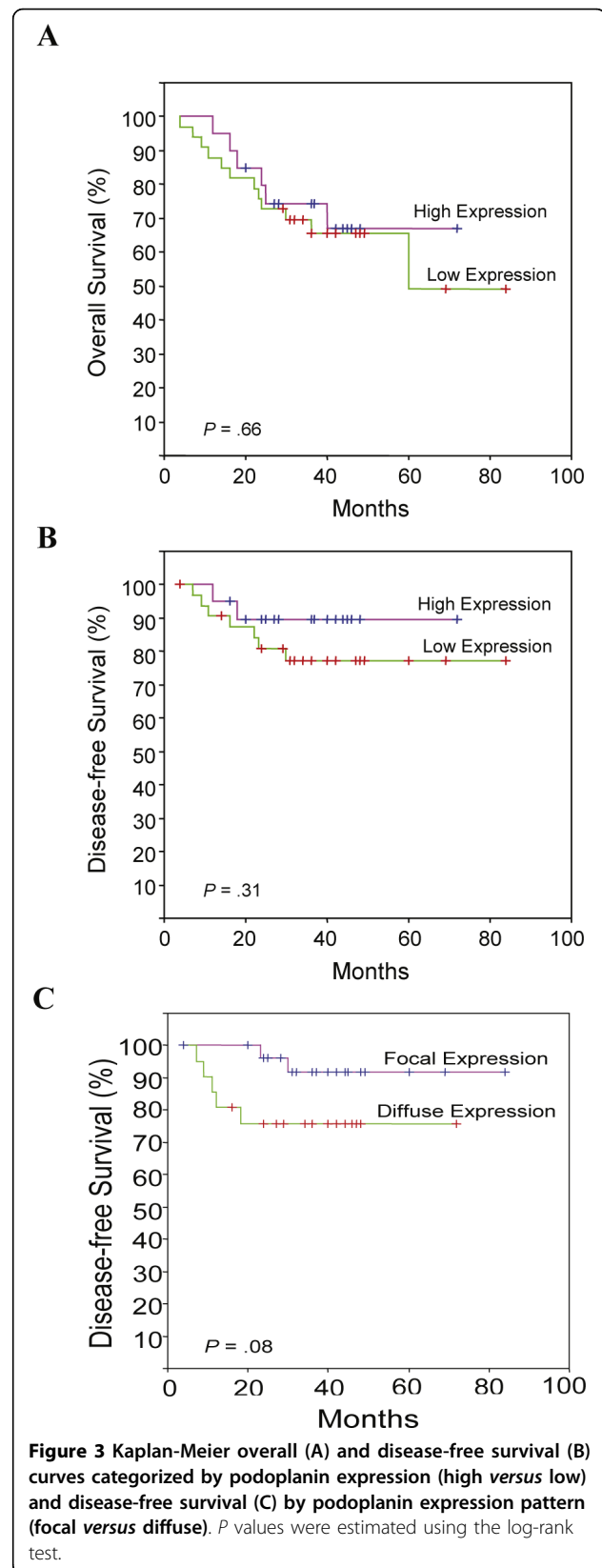


periphery of the tumour cell nests with no expression in the central areas (Fig. 1F). In the latter cases the central areas often contained more differentiated cells, mimicking the pattern seen in the dysplastic epithelium. Two (4%) of the tumours showed no podoplanin expression, 31 (58%) had weak or moderate expression (IRS scores 1-6), and 20 (38%) had high expression (scores 7-15). For statistical purposes, tumours with scores equal or lower than 6 (median value) were considered to have low podoplanin expression, whereas those with scores higher than 6 were considered high expression.

The relationships between podoplanin expression and the clinico-pathological variables are shown in Table 1. Higher levels of podoplanin expression were observed in glottic carcinomas ($P = 0.01$). Podoplanin expression significantly decreased as T classification increased ($P = 0.033$) and in consequence there was also a significant inverse association of podoplanin expression with disease stage ($P = 0.006$), with most stage IV tumours showing low podoplanin expression. Moreover, well-differentiated carcinomas exhibited significantly higher levels of podoplanin, compared to moderately or poorly differentiated carcinomas ($P = 0.04$). No correlation between podoplanin expression and nodal metastasis was observed ($P = 0.53$).

Patients were followed-up for a minimum of 36 months. The median follow-up of the whole series was 36 months (range, 4-84 months), and the median follow-up of the patients alive at the last visit was 43 months (range, 36-84 months). During this follow-up period, seven (13%) cases developed loco-regional recurrence, and 4 (8%) cases distant metastasis. Podoplanin expression was not associated with tumour recurrence ($P = 0.42$, Table 1) and no significant differences in overall survival were observed when comparing patients with high *versus* low podoplanin expression (Log-rank test, $P = 0.66$; Fig 3A). Nevertheless, patients with low levels of podoplanin had a poorer disease-specific survival, although this difference did not reach significance (Log-rank Test, $P = 0.31$; Fig. 3B). Furthermore, those cases showing diffuse podoplanin staining had a poorer disease specific survival than the cases that displayed a focal expression pattern in the periphery of tumour nests, but there was only a borderline statistical difference (Log-rank test, $P = 0.08$; Fig 3C).

Multivariate analysis using the Cox proportional hazards model included tumour site, T classification, nodal metastasis, stage, and degree of differentiation and podoplanin expression. This model showed that only the presence of cervical lymph node metastasis was a significant independent predictor of reduced disease-specific



survival (HR = 13; 95%CI, 2.7-63; $P = 0.0014$) or overall survival (HR = 6; 95%CI, 2.3-15.6; $P = 0.0002$).

Discussion

The physiological function of podoplanin is still unknown. Podoplanin-deficient mice die at birth owing to respiratory failure exhibiting a phenotype of dilated, malfunctioning lymphatic vessels and lymphoedema [16]. In addition, podoplanin can induce platelet aggregation *in vitro* [17]. In the pathological situations studied thus far, the mouse homologue of podoplanin (PA2.26, OTS-8) is induced in mouse skin during tissue regeneration after wounding and treatment with carcinogenic phorbol 12-myristate 13-acetate [18]. OTS-8 is also induced by 12-Otetradecanoylphorbol-13-acetate in mouse osteoblastic cells and is constitutively expressed in oncogenic Ras-transformed cells [19]. Podoplanin has also been found to promote tumour cell invasion by inducing collective cell migration via the down-regulation of the activities of small Rho family GTPases [20]. These findings suggest a role of podoplanin in tissue development and repair as well as in carcinogenesis and malignant progression.

In this study we found that podoplanin is expressed in a high percentage of dysplastic lesions and squamous cell carcinomas of the larynx. This is not surprising since podoplanin expression is mainly detected in squamous cell cancers, CNS tumours and germinal neoplasia; in contrast, expression of podoplanin has not been found in the majority of adenocarcinomas, including lung, colon and prostate cancers [20]. Podoplanin expression has been previously explored in other head and neck squamous cell carcinomas, such as oral and hypopharyngeal carcinomas [13], as well as in oral premalignancies [14]. However, our study is the first to analyse podoplanin expression in both laryngeal premalignant lesions and laryngeal carcinomas and its relationship with clinico-pathological parameters and prognosis.

In oral leukoplakia, high podoplanin expression has been associated with an increased risk of progression to invasive cancer, suggesting that podoplanin could serve as a powerful biomarker to predict the risk for oral cancer development in patients with oral leukoplakia [14]. This evidence supports the importance of podoplanin in oral tumourigenesis and malignant transformation. Similarly, our findings indicate that podoplanin is also frequently abnormally expressed in the early stages of laryngeal tumourigenesis and patients carrying podoplanin-positive dysplastic lesions (scores 2-3) exhibit a higher incidence of laryngeal cancer than patients with negative expression (51% versus 30%), although these differences did not reach statistical significance ($P = 0.071$). Since podoplanin expression was not associated

with the severity of dysplasia, this trend towards a poorer prognosis for patients with podoplanin-positive dysplasias suggests a role for podoplanin in the progression to laryngeal cancer. In this study cohort, the histology of the lesions does not have a significant role in assessing laryngeal cancer risk, and podoplanin seems a stronger predictor. The unexpected high proportion of mild dysplasias with progression to laryngeal carcinoma in our cohort could be due to pure chance, given the limited number of patients with this diagnosis. However, this also underscores the limited value of histopathological classification in predicting outcome. These data suggest the utility of podoplanin as a biomarker for cancer risk assessment providing additional value beyond current clinical and histopathological evaluations.

Nevertheless, podoplanin expression alone may not be sufficient to promote tumourigenesis because many of the lesions (44%) exhibit protein expression only in the basal layer cells, and this was independent of the severity of the dysplasia. Other factors are therefore needed to promote clonal expansion of the abnormal cells. The upward clonal expansion of the podoplanin-expressing cells in the epithelial layers supports this notion. Indeed, lesions with such clonal expansion carry a higher risk of laryngeal cancer development. The ability to detect the cells expanding beyond basal layers may allow us to visualise potential clonal expansion, possibly from stem-cell clones, during tumourigenesis [14]. In fact, podoplanin has been identified as a marker of tumour-initiating cells (TICs) in squamous cell carcinomas [21]. Tumourigenicity and capability of recapitulating human SCC are by definition properties of TICs. Premalignant lesions with podoplanin expression beyond the basal cell layer may represent truly early neoplastic lesions, enriched in TICs and with a higher risk of progression to invasive cancer.

In relation to the possible role of podoplanin in tumour progression, it has been reported that high podoplanin expression significantly associates with nodal metastasis and reduced survival in oral squamous cell carcinomas [13]. In marked contrast to these findings, we did not find a significant association of podoplanin expression with lymph node metastasis nor poor prognosis in laryngeal cancer. On the contrary, patients with high podoplanin expression showed a better disease-specific survival. This could be explained by the fact that podoplanin expression was higher in early-stage tumours and, interestingly, all cases that developed distant metastasis showed low podoplanin expression. Indeed, we found a significant inverse association of podoplanin expression with disease stage and T classification. Podoplanin expression was also significantly more frequent in glottic tumours, which are generally smaller and detected at an earlier stage than supraglottic

tumours. Our results showing that podoplanin expression levels decreased with primary tumour size evidence a higher proportion of podoplanin-positive cells in small tumours and podoplanin-positive staining in those tumours could reflect a higher proportion of TICs, rather than a higher invasive potential. In addition, podoplanin expression was also significantly higher in well-differentiated tumours, which are usually less invasive than those poorly differentiated. We also observed a trend towards better disease-specific survival for patients with a focal expression of podoplanin in the periphery of tumour nests, defined in some works as the invasive edge of the tumours [20]. There are contradictory data regarding the clinical significance and biological role of podoplanin expression in squamous cancers, with contrasting results depending on the tumour sites studied. Thus, in squamous cell carcinoma of the uterine cervix, low levels of podoplanin were significantly associated with the presence of lymphatic invasion and lymph node metastasis, as well as with shorter survival and higher risk of tumour recurrence [22,23]. In addition, tumour emboli within lymphatic spaces as well as metastatic cells from lymph nodes showed no podoplanin immunostaining in the vast majority of tumours, even in those cases with positive expression in the main tumour mass [23]. In squamous cell carcinomas of the lung [24], patients who had podoplanin-positive tumours, and especially those with focal expression in the periphery of tumour nests (named hierarchical distribution pattern by the authors) showed a significantly better overall survival than those with podoplanin-negative tumours. In addition, podoplanin expression in these tumours inversely correlated with lymphatic invasion and lymph node metastasis. This is in marked contrast to the observations made by Yuan *et al* [13] in oral squamous cell carcinomas, although in good agreement with the results presented herein. The results presented by Shimada *et al* [24] and our results suggest that squamous cell carcinomas with focal expression of podoplanin in the periphery of tumour nests (which is equivalent to the hierarchical distribution pattern) may indicate lower biological aggressiveness. According to this, it is plausible that squamous cell carcinomas showing focal expression pattern represent a well-organised tumour group based on the TICs concept, whereas squamous cell carcinomas with a diffuse expression pattern could reflect disordered tumours in terms of the developmental hierarchy.

Hence the role of podoplanin in tumour initiation and progression remains elusive. Its involvement in tumour metastasis, however, has been demonstrated in an experimental model to be due to its platelet aggregation-inducing activity leading to pulmonary retention of CHO cells that overexpress podoplanin [25]. It has also been demonstrated that podoplanin contributes to

tumour invasion by binding ERM proteins to activate RhoA resulting in epithelial-mesenchymal transition [26]. Although podoplanin-positive TICs in squamous cell carcinomas may use these mechanisms to initiate and sustain tumour growth, they may also proliferate rapidly through the activation of the SHH signalling pathway [21]. In addition to these intrinsic mechanisms, the microenvironment also influences the ability of TICs to generate tumours [21]. Considering their localization, it has been proposed that TICs may be regulated by stromal cells, which is comparable to the regulation of stem cells by their environmental niche [21]. Histologically, podoplanin-positive cells were specifically located in most cases at the basal region of squamous cell carcinoma tumour nests, close to the surrounding stromal cells and the tumour-microenvironment interaction plays a decisive role in cancer progression. It has been recently described that positive podoplanin expression in stromal fibroblasts exerts a protective role against cell invasion and is a significant indicator of good prognosis in patients with advanced colorectal cancer [27].

Conclusions

We have demonstrated for the first time that podoplanin is expressed in a high percentage of laryngeal dysplasias and laryngeal squamous cell carcinomas. Podoplanin-positive dysplasias had a higher risk of progression to invasive carcinoma than those with negative expression, although the differences did not reach statistical significance. Prospective studies involving larger numbers of patients are needed to further evaluate the clinical utility of podoplanin as a biomarker for laryngeal cancer risk assessment providing additional value beyond the clinical and histological markers. Podoplanin expression in laryngeal squamous cell carcinomas, however, diminishes during tumour progression and does not correlate with invasive potential. Taken together, these data support a role for podoplanin expression in the initiation rather than in the progression of laryngeal cancers.

Declaration of Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

This work was supported by Fondo de Investigación Sanitaria Grants 07/0777 (JPR) and CP07/00032 (JMGP); Programa Ramón y Cajal, Ministerio de Educación y Ciencia (MVG); ISCIII, RTICC (RD06/0020/0034) and Obra Social Cajastur-IUOPA.

We would like to thank Eva Allonca, Olivia García Suárez and Marta Sánchez Pitiot for excellent technical assistance.

Author details

¹Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Hospital Universitario Central de Asturias, Instituto Universitario de Oncología del

Principado de Asturias, Universidad de Oviedo, Oviedo, Asturias, Spain.
²Department of Pathology, Hospital Universitario Central de Asturias, Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias, Universidad de Oviedo, Oviedo, Asturias, Spain.

Authors' contributions

JPR conceived of the study, and participated in its design and coordination, in the quantification of the immunostainings and drafted the manuscript. DG participated in the quantification of the immunostainings and in the statistical analysis. MVG participated in the design of the study and in the acquisition of the clinical and pathological data. GM participated in the acquisition of the clinical data and in the immunohistochemical staining. MFF participated in the histological analysis of the samples and in the quantification of immunostainings. JGP participated in the design of the study, in the statistical analysis and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Received: 3 December 2009

Accepted: 2 March 2010 Published: 2 March 2010

References

- Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D: **Head-and-neck cancer.** *N Engl J Med* 2001, **345**:1890-1900.
- Kim MM, Califano JA: **Molecular pathology of head and neck cancer.** *Int J Cancer* 2004, **112**:545-553.
- Rodrigo JP, Ferlito A, Suárez C, Shaha AR, Silver CE, Devaney KO, Bradley PJ, Bocker JM, McLaren KM, Grénman R, Rinaldo A: **New molecular diagnostic methods in head and neck cancer.** *Head Neck* 2005, **27**:995-1003.
- Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H, Horvat R, Amann G, Kriehuber E, Diem K, Weninger W, Tschachler E, Alitalo K, Kerjaschki D: **Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium.** *Am J Pathol* 1999, **154**:385-394.
- Martin-Villar E, Scholl FG, Gamallo C, Yurrita MM, Munoz-Guerra M, Cruces J, Quintanilla M: **Characterization of human PA2.26 antigen (T1alpha-2, podoplanin), a small membrane mucin induced in oral squamous cell carcinomas.** *Int J Cancer* 2005, **113**:899-910.
- Ordóñez NG: **Podoplanin: a novel diagnostic immunohistochemical marker.** *Adv Anat Pathol* 2006, **13**:83-88.
- Schacht V, Dadrás SS, Johnson LA, Jackson DG, Hong YK, Detmar M: **Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors.** *Am J Pathol* 2005, **166**:913-921.
- Bolzoni Villaret A, Schreiber A, Facchetti F, Fisogni S, Lonardi S, Lombardi D, Cocco D, Redaelli de Zinis LO, Nicolai P: **Immunostaining patterns of CD31 and podoplanin in previously untreated advanced oral/oropharyngeal cancer: Prognostic implications.** *Head Neck* 2009, PMID: 19890908.
- Kato Y, Kaneko M, Sata M, Fujita N, Tsuruo T, Osawa M: **Enhanced expression of Aggrus (T1alpha/podoplanin), a platelet-aggregation-inducing factor in lung squamous cell carcinoma.** *Tumour Biol* 2005, **26**:195-200.
- Kimura N, Kimura I: **Podoplanin as a marker for mesothelioma.** *Pathol Int* 2005, **55**:83-86.
- Shibahara J, Kashima T, Kikuchi Y, Kunita A, Fukayama M: **Podoplanin is expressed in subsets of tumors of the central nervous system.** *Virchows Arch* 2005, **448**:493-499.
- Wicki A, Lehembre F, Wick N, Hantusch B, Kerjaschki D, Christofori G: **Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton.** *Cancer Cell* 2006, **9**:261-272.
- Yuan P, Temam S, El-Naggar A, Zhou X, Liu DD, Lee JJ, Mao L: **Overexpression of podoplanin in oral cancer and its association with poor clinical outcome.** *Cancer* 2006, **107**:563-569.
- Kawaguchi H, El-Naggar AK, Papadimitrakopoulou V, Ren H, Fan YH, Feng L, Lee JJ, Kim E, Hong WK, Lippman SM, Mao L: **Podoplanin: A novel marker for oral cancer risk in patients with oral premalignancy.** *J Clin Oncol* 2008, **26**:354-360.
- Gale N, Pilch BZ, Sidransky D, Westra WH, Califano J: **Epithelial precursor lesions.** *World Health Organization classification of tumour. Pathology and genetics of head and neck tumours* Lyon: IARC/Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D 2005, 140-143.
- Schacht V, Ramirez MI, Hong YK, Hirakawa S, Feng D, Harvey N, Williams M, Dvorak AM, Dvorak HF, Oliver G, Detmar M: **T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema.** *EMBO J* 2003, **22**:3546-3556.
- Kaneko M, Kato Y, Kitano T, Osawa M: **Conservation of a platelet activating domain of Aggrus/Podoplanin as a platelet aggregation inducing factor.** *Gene* 2006, **378**:52-57.
- Gandarillas A, Scholl FG, Benito N, Gamallo C, Quintanilla M: **Induction of PA2.26, a cell-surface antigen expressed by active fibroblasts, in mouse epidermal keratinocytes during carcinogenesis.** *Mol Carcinog* 1997, **20**:10-18.
- Nose K, Saito H, Kuroki T: **Isolation of a gene sequence induced later by tumor-promoting 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in mouse osteoblastic cells (MC3T3-E1) and expressed constitutively in ras transformed cells.** *Cell Growth Differ* 1990, **1**:511-518.
- Wicki A, Christofori G: **The potential role of podoplanin in tumour invasion.** *Br J Cancer* 2007, **96**:1-5.
- Atsumi N, Ishii G, Kojima M, Sanada M, Fujii S, Ochiai A: **Podoplanin, a novel marker of tumor-initiating cells in human squamous cell carcinoma A431.** *Biochem Biophys Res Commun* 2008, **373**:36-41.
- Dumoff KL, Chu C, Xu X, Pasha T, Zhang PJ, Acs G: **Low D2-40 immunoreactivity correlates with lymphatic invasion and nodal metastasis in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix.** *Mod Pathol* 2005, **18**:97-104.
- Dumoff KL, Chu CS, Harris EE, Holtz D, Xu X, Zhang PJ, Acs G: **Low podoplanin expression in pretreatment biopsy material predicts poor prognosis in advanced-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated by primary radiation.** *Mod Pathol* 2006, **19**:708-716.
- Shimada Y, Ishii G, Nagai K, Atsumi N, Fujii S, Yamada A, Yamane Y, Hishida T, Nishimura M, Yoshida J, Ikeda N, Ochiai A: **Expression of podoplanin, CD44, and p63 in squamous cell carcinoma of the lung.** *Cancer Sci* 2009, **100**:2054-2059.
- Kunita A, Kashima TG, Morishita Y, Fukayama M, Kato Y, Tsuruo T, Fujita N: **The platelet aggregation-inducing factor Aggrus/Podoplanin promotes pulmonary metastasis.** *Am J Pathol* 2007, **170**:1337-1347.
- Martin-Villar E, Megias D, Castel S, Yurrita MM, Vilaro S, Quintanilla M: **Podoplanin binds ERM proteins to activate RhoA and promote epithelial-mesenchymal transition.** *J Cell Sci* 2006, **119**:4541-4553.
- Yamanashi T, Nakanishi Y, Fujii G, Akishima-Fukasawa Y, Moriya Y, Kanai Y, Watanabe M, Hirohashi S: **Podoplanin expression identified in stromal fibroblasts as a favorable prognostic marker in patients with colorectal carcinoma.** *Oncology* 2009, **77**:53-62.

doi:10.1186/1476-4598-9-48

Cite this article as: Rodrigo et al.: Podoplanin expression in the development and progression of laryngeal squamous cell carcinomas. *Molecular Cancer* 2010 **9**:48.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Research Article

Cortactin and Focal Adhesion Kinase as Predictors of Cancer Risk in Patients with Laryngeal Premalignancy

Juan P. Rodrigo¹, Gustavo Álvarez-Alija¹, Sofía Tirados Menéndez¹, Gonzalo Mancebo¹, Eva Allonca¹, Darío García-Carracedo¹, Manuel Florentino Fresno², Carlos Suárez¹, and Juana María García-Pedrero¹

Abstract

Novel markers are needed to accurately predict the risk of malignant transformation in laryngeal premalignancies. We therefore investigated the clinical significance of cortactin (CTTN) and focal adhesion kinase (FAK) during laryngeal tumorigenesis and their potential utility as cancer risk markers. CTTN and FAK protein expression and gene amplification were assessed in 82 patients with laryngeal dysplasia and correlated with clinicopathologic parameters and laryngeal cancer risk. Increased CTTN and FAK expression was found respectively in 41 (50%) and 40 (49%) of 82 laryngeal dysplasias; protein expression was maintained or further augmented in the corresponding patient-matched invasive tumors subsequently developed. *CTTN* and *FAK/PTK2* gene amplifications were respectively detected in 10 (12%) and 26 (32%) laryngeal dysplasias. Both CTTN and FAK protein expression increased with the grade of dysplasia; however, CTTN and FAK expression but not histology correlated significantly with increased laryngeal cancer risk ($P = 0.009$ and $P = 0.002$, respectively). Patients carrying strong CTTN- or FAK-expressing dysplastic lesions experienced a significantly higher cancer incidence ($P = 0.006$ and $P = 0.001$, respectively; log-rank test). Furthermore, FAK expression was an independent predictor of laryngeal cancer development (HR = 3.706, 95% CI: 1.735–7.916; $P = 0.001$) and the combination of FAK and CTTN showed superior predictive value (HR = 5.042, 95% CI: 2.255–11.274; $P < 0.001$). Taken together, our findings support the involvement of CTTN and FAK in malignant transformation and provide original evidence for their potential clinical utility as biomarkers for the risk of developing laryngeal cancer. *Cancer Prev Res*; 4(8); 1333–41. ©2011 AACR.

Introduction

Like other epithelial cancers, head and neck carcinogenesis seems to evolve through a multistep process that involves biomolecular changes caused by carcinogen exposure, ensuing premalignant lesions, and consequent invasive carcinoma (1–3). The spectrum of histologic changes occurring in this process has been cumulatively designated squamous intraepithelial lesions (SIL), ranging from squa-

mous hyperplasia to carcinoma *in situ* (CIS; refs. 4, 5). One of the most important issues of SILs is the risk of malignant transformation. In their evolution, some SILs are self-limiting and reversible, some persist, and some progress to squamous carcinoma despite careful follow-up and treatment. Although lesions with dysplastic features are thought to be at a higher cancer risk, some cancers develop from lesions lacking dysplastic changes. Hence, it is often difficult for clinicians to agree on the most appropriate therapeutic option for a particular grade of SIL diagnosed. Additional objective and reliable markers are therefore needed to identify high-risk lesions to improve the prognostic evaluation of SILs beyond current clinical and histopathologic criteria (3).

Recurrent chromosomal aberrations, such as amplifications or deletions, often harbor genes that participate in tumor development and progression. Amplification of the chromosomal regions 8q23-24 and 11q13 are two of the most frequent genetic alterations in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC), events that have been associated with invasive disease and poor patient prognosis (6). Amplification of the 11q13 region has been recognized as a major event driving HNSCC invasion and metastasis, occurring in 20% to 52% of tumors (7). Within the 11q13

Authors' Affiliations: ¹Servicio de Otorrinolaringología, Hospital Universitario Central de Asturias and Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias; and ²Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain

Note: Supplementary material for this article is available at Cancer Prevention Research Online (<http://cancerprevres.aacrjournals.org/>).

G. Alvarez-Alija and S.T. Menendez contributed equally to this work.

Corresponding Author: Juana María García-Pedrero, Hospital Universitario Central de Asturias and Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias, Laboratorio 2 ORL-IUOPA, 33006 Oviedo, Spain. Phone: 34-985107956; Fax: 34-985108015; E-mail: juanagg@ficyt.es

doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-10-0338

©2011 American Association for Cancer Research.

amplicon, *CCND1* and *CTTN* (formerly *EMS1*) have been considered to be the best candidate genes responsible for the 11q13-associated tumor aggressiveness on the basis of their biological roles and also their frequent coamplification and overexpression in various cancers (8, 9). *CTTN* encodes the actin-binding protein cortactin that regulates membrane dynamics, actin network assembly, cell–cell adhesion, invadopodia formation, and matrix degradation, thereby promoting cell motility and invasion (10–12). We and others have consistently shown that *CTTN* gene amplification and protein overexpression correlated with poor prognosis and reduced patient survival in HNSCC (13–15) and other carcinomas (16–18), thus reinforcing the central role of *CTTN* in the 11q13 amplicon and also in tumor progression. Nevertheless, the role of *CTTN*/cortactin in the early stages of tumorigenesis and its possible implication in malignant transformation and acquisition of an invasive phenotype remains to be determined.

8q23-24 amplification has been defined as an important early chromosomal event in HNSCC progression (19). *FAK*/*PTK2* is one of the most prominent genes located within this region, which encodes the focal adhesion kinase (*FAK*). *FAK* overexpression has been well documented in HNSCC and other types of tumors, corresponding to increased invasive and metastatic potential (20–23). In addition, *FAK* overexpression has also been implicated in malignant transformation of breast and cervical epithelia (24).

In this article, we investigated the role of *CTTN* and *FAK* in laryngeal tumorigenesis and established their potential utility as cancer risk markers. *CTTN* and *FAK* protein expression and gene amplification were analyzed in a large series of laryngeal dysplasias and their correlations with clinicopathologic parameters and the risk of progression to laryngeal cancer.

Materials and Methods

Patients and tissue specimens

Surgical tissue specimens from patients who were diagnosed of laryngeal dysplasia at the Hospital Universitario Central de Asturias between 1996 and 2004 were retrospectively collected, following Institutional Review Board guidelines. Patients must meet the following criteria to be included in the study: (i) pathologic diagnosis of laryngeal dysplasia, (ii) with lesions of the vocal folds, (iii) no previous history of head and neck cancer, (iv) complete excisional biopsy of the lesion, and (v) a minimum follow-up of 5 years (or until progression to malignancy occurred). A total of 95 patients who met these criteria were included in this study. Patients were followed up every 2 months in the first 6 months after completing the treatment, every 3 months until the second year, and every 6 months thereafter.

Excisional biopsy of lesions was carried out by using stripping microflap technique with cold instruments. A complete macroscopic exeresis of the lesion was done in all cases, but the microscopic margins were not addressed. Representative tissue sections were obtained from archival,

paraffin-embedded blocks and the histologic diagnosis was confirmed by an experienced pathologist (M.F.F.). The premalignant lesions were classified into the categories of mild, moderate, or severe dysplasia following the WHO classification (5). Tumor blocks were also obtained from those patients who developed an invasive carcinoma. Normal laryngeal epithelium obtained from nononcologic surgery (phonosurgery) was used as control.

Gene amplification analysis

The protocol for DNA extraction from paraffin-embedded tissue sections has been described elsewhere (25). DNA extracted from normal mucosa obtained from nononcologic patients was used as calibrator sample. Gene amplification was evaluated by real-time PCR (Q-PCR) in an ABI PRISM 7500 Sequence Detector (Applied Biosystems) by using Power SYBR Green PCR Master Mix and oligonucleotides with the following sequences: for *CTTN* gene, Fw, 5'-GATCTCATTTGACCCTGATGACATC-3' and Rv, 5'-CGTACCGGCCCTTGCA-3'; for the *CCND1* gene, Fw, 5'-GGAAGATCGTCGCCACCTG-3' and Rv, 5'-GAAACGTGGGTCTGGGCAAC-3'; for *FAK* (*PTK2*) gene, Fw, 5'-AATGATGTAATCGGTCCAATTGAA-3' and Rv, 5'-TGGAGGCATTGTAATCTTTCC-3', and for the reference genes *TH* (Tyrosine Hydroxylase, located at 11p15), Fw, 5'-TGAGATTCGGGCCCTTCGA-3' and Rv, 5'-GACACGAAGTAGACTGACTGGTACGT-3' and *PLAT* (Plasminogen activator, tissue, located at 8p11), Fw, 5'-ACTGACTGCCTCCTCGTCCTT-3' and Rv, 5'-CGAAACTGAGGCTTGCTGTACT-3'. The relative gene copy number for *CTTN* and *FAK* was calculated by using the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. The $\Delta\Delta C_T$ represents the difference between ΔC_T of dysplasia and ΔC_T of normal mucosa, with ΔC_T being the average C_T for the target gene (*CTTN*, *CCND1* or *FAK*) minus the average C_T for the reference gene (*TH* or *PLAT*, respectively). Values higher than 2.0 were considered positive for gene amplification.

Immunohistochemistry

The formalin-fixed, paraffin-embedded tissues were cut into 3- μ m sections and dried on Flex IHC microscope slides (Dako). The sections were deparaffinized with standard xylene and hydrated through graded alcohols into water. Antigen retrieval was done by using Envision Flex Target Retrieval solution, high pH (Dako). Staining was done at room temperature on an automatic staining workstation (Dako Autostainer Plus) with mouse anti-cortactin monoclonal antibody Clone 30 (BD Biosciences Pharmingen) at 1:200 dilution, mouse anti-Cyclin D1 monoclonal antibody DCS-6 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. sc-20044) at 1:100 dilution, or mouse anti-*FAK* monoclonal antibody Clone 4.47 (Upstate Biotechnology) at 1:250 dilution by using the Dako EnVision Flex + Visualization System (Dako Autostainer). Counterstaining with hematoxylin was the final step.

Because *CTTN* and *FAK* staining showed a homogeneous distribution, a semiquantitative scoring system based on staining intensity was applied, as previously reported

(13, 21). Immunostaining was scored blinded to clinical data by 2 independent observers as negative (0), weak (1), moderate (2), and strong protein expression (3), with a high level of interobserver concordance (>95%). Cyclin D1 staining was evaluated as the percentage of cells with nuclear staining in the dysplastic epithelium. Cyclin D1 staining scores were classified as negative or positive staining on the basis of values below or above the median value of 10%.

Statistical analysis

The χ^2 test and Fisher's exact test were used for comparison between categorical variables and Spearman's non-parametric correlation coefficient for comparison between protein expression in premalignant lesions and the invasive tumors subsequently developed. For time-to-event analysis, Kaplan–Meier curves were plotted. Differences between survival times were analyzed by the log-rank method. Cox proportional hazards models were utilized for univariate and multivariate analyses. The HR with 95% CI and *P* values were reported. All tests were 2-sided. The values of $P \leq 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Patient characteristics

All patients were men, with a mean age of 64 years (range 36–83 years). All of them were active or old smokers, and 43 were also habitual alcohol drinkers. The mean tobacco consumption was 55 packs-year (range 15–110 packs-year). After the diagnosis, all the patients that were active smokers received smoking cessation advice; however, 17 of them continued smoking. Of the 95 patients included in the study, 10 patients with a diagnosis of premalignant lesion and cancer within the next 6 months were excluded from the study and 3 additional patients were also excluded because of the lack of tissue block/quality. For the remaining 82 patients, 12 (15%) lesions were classified as mild dysplasia, 26 (32%) as moderate dysplasia, and 44 (54%) as severe dysplasia/carcinoma "in situ" (CIS). During the follow-up period, 28 (34%) of 82 patients developed an invasive carcinoma at the biopsy site and 12 patients (15%) required repeat resection of laryngeal dysplasias (Supplementary Table S1). All available tissue blocks were collected for analysis.

The mean time to cancer diagnosis in the cases that progressed was 28 months (range 11–66 months). No significant differences attributable to age were observed ($P = 0.95$) between the group of patients who developed cancer (mean, 64 years) and those who did not (mean, 63.8 years). The mean tobacco consumption for patients who developed an invasive carcinoma was 56.4 packs-year, compared with 53.7 packs-year for those who did not develop cancer ($P = 0.56$). Similarly, no significant differences in laryngeal cancer risk were observed ($P = 0.77$) between the subgroup of patients who continued smoking (35%, 6 of 17 cases) and those who ceased smoking (33%, 22 of 65 cases).

CTTN and FAK protein expression in the early stages of laryngeal tumorigenesis

Immunohistochemical analysis of CTTN and FAK protein expression was done on a set of 82 laryngeal dysplasias. Sections selected for study also contained normal epithelia as internal controls. Normal epithelia showed weak CTTN staining in the most differentiated layers, whereas positive FAK expression was restricted to the basal cell layer (Fig. 1A and B). The expression of both proteins was negligible in stromal cells. Forty-one (50%) and 40 (49%) of the 82 laryngeal lesions respectively displayed increased CTTN and FAK expression (scored as 2 and 3) in the dysplastic areas, compared with the corresponding normal epithelia

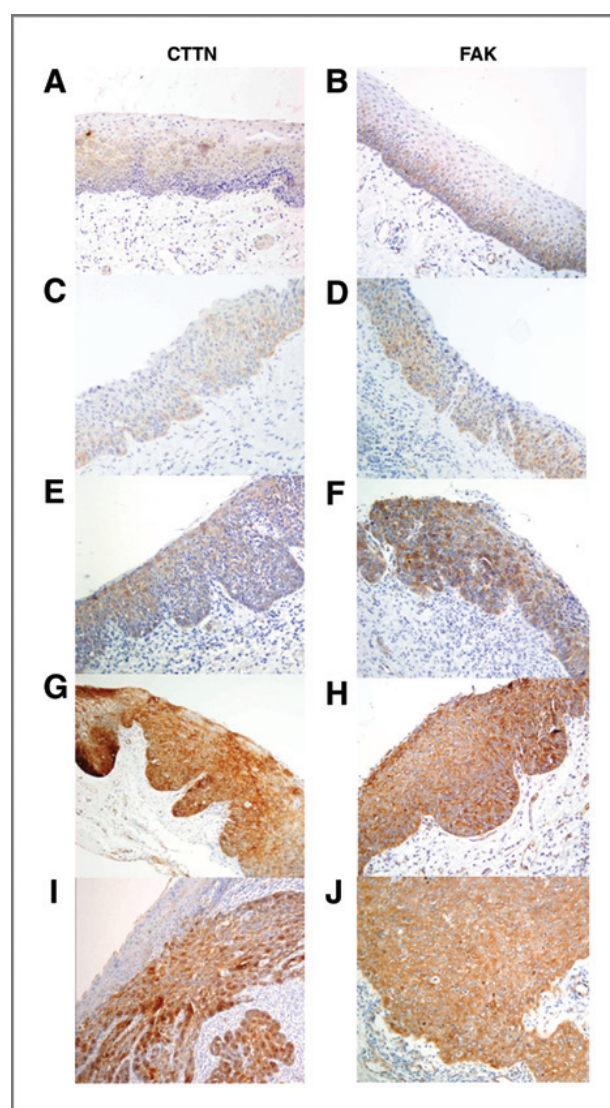


Figure 1. Immunohistochemical analysis of CTTN and FAK expression in laryngeal dysplasias. Normal adjacent epithelia showed negative staining (A and B). Representative examples of laryngeal dysplasias showing weak (C and D), moderate (E and F), and strong positive staining (G and H) and invasive tumors with strong protein expression (I and J). Original magnification $\times 200$.

(Fig. 1C–H). Strong CTTN and FAK expression was respectively detected in 21 (26%) and 23 (28%) laryngeal dysplasias (Fig. 1G and H). CTTN and FAK immunostaining preferentially yielded a cytoplasmic pattern, although some cases also exhibited protein enrichment at the cell periphery.

The expression status was analyzed in relation to the histopathologic classification of the laryngeal lesions. We found that both CTTN and FAK protein expression increased with the grade of dysplasia, although differences did not reach statistical significance. Thus, 3 (25%) of the 12 lesions with mild dysplasia, 13 (50%) of the 26 lesions with moderate dysplasia, and 25 (57%) of the 44 lesions with severe dysplasia/CIS exhibited increased CTTN protein expression ($\chi^2 P = 0.148$), whereas 3 (25%) lesions with mild dysplasia, 12 (46%) with moderate dysplasia, and 25 (57%) with severe dysplasia/CIS showed increased FAK expression ($\chi^2 P = 0.140$).

CTTN and FAK protein expression was also evaluated in 24 of the 28 invasive tumors developed in our cohort. For each patient, protein expression in the invasive tumor was compared with that of the corresponding previous premalignant lesion. Increased CTTN and FAK expression (scored as 2 and 3) was respectively observed in 19 (79%) and 21 (87%) of the 24 invasive tumors, with strong positive staining in 11 (46%) and 19 (79%) cases (Fig. 1I and J).

Statistical analysis revealed a strong positive correlation between CTTN expression in patient-matched premalignant lesions versus invasive tumors (Spearman's correlation coefficient 0.704; $P < 0.001$; Table 1). FAK expression also correlated significantly (Spearman's correlation coefficient 0.742; $P < 0.001$; Table 1). Overall, we observed that CTTN and FAK expression was maintained or further augmented in the tumor compared with the patient-matched preinvasive lesion (Table 1 and Supplementary Table S1). In addition, a high level of concordance was found when comparing CTTN and FAK protein scores in patients who developed various laryngeal lesions (Supple-

mentary Table S1). In those cases with discordant data, the highest score was assigned as final score.

CTTN and FAK gene amplification during laryngeal tumorigenesis

CTTN and FAK amplifications were both detected in early stages of laryngeal tumorigenesis, although with clear differences in both timing and frequency as summarized in Figure 2. FAK gene amplification was found in 26 (32%) of 82 laryngeal dysplasias, and its detection increased with the severity of the lesions: 2 (17%) of 12 mild dysplasia, 6 (23%) of 26 moderate dysplasias, and 18 (41%) of 44 severe dysplasia/CIS harbored FAK amplification ($P = 0.145$). CTTN amplification was detected in 10 (12%) of 82 laryngeal lesions, and although its frequency also increased with the grade of dysplasia, it was only observed in moderate (8%, 2 of 26 cases) and high-grade dysplasias (18%, 8 of 44 cases; $P = 0.163$).

In addition, we found a strong positive relationship between CTTN gene amplification and protein expression ($P = 0.007$; Supplementary Table S2). All laryngeal dysplasias harboring CTTN gene amplification showed strong CTTN expression (score 3). However, 31 amplification-negative lesions also showed increased protein expression (scores 2 and 3), indicating that gene amplification may only partially explain CTTN overexpression observed in laryngeal tumorigenesis. Even though FAK amplification correlated significantly with protein expression ($P = 0.023$; Supplementary Table S3), gene amplification did not lead to FAK protein overexpression in all cases.

Because *cyclin D1* gene (*CCND1*) is located in close proximity to CTTN within the 11q13 amplicon, we also explored its possible contribution to malignant transformation. Thus, *CCND1* amplification was detected in 13 (16%) of 80 laryngeal dysplasias (8%, 1 of 12 mild dysplasias; 4%, 1 of 25 moderate dysplasias; and 26%, 11 of 43 severe dysplasias). Eight (62%) of the 13 *CCND1*-amplified cases also showed coamplification of CTTN gene.

Table 1. Cross-tab to evaluate correlations between CTTN and FAK protein expression in premalignant lesions and patient-matched invasive tumors

CTTN expression in premalignant lesion (%)	CTTN protein expression in tumor (%)			No. of cases
	Weak	Moderate	Strong	
Weak	4 (50)	4 (50)		8
Moderate		3 (60)	2 (40)	5
Strong	1 (9)	1 (9)	9 (82)	11
FAK expression in premalignant lesion (%)	FAK protein expression in tumor (%)			No. of cases
	Weak	Moderate	Strong	
Weak	3 (50)	2 (33)	1 (17)	6
Moderate			5 (100)	5
Strong			13 (100)	13

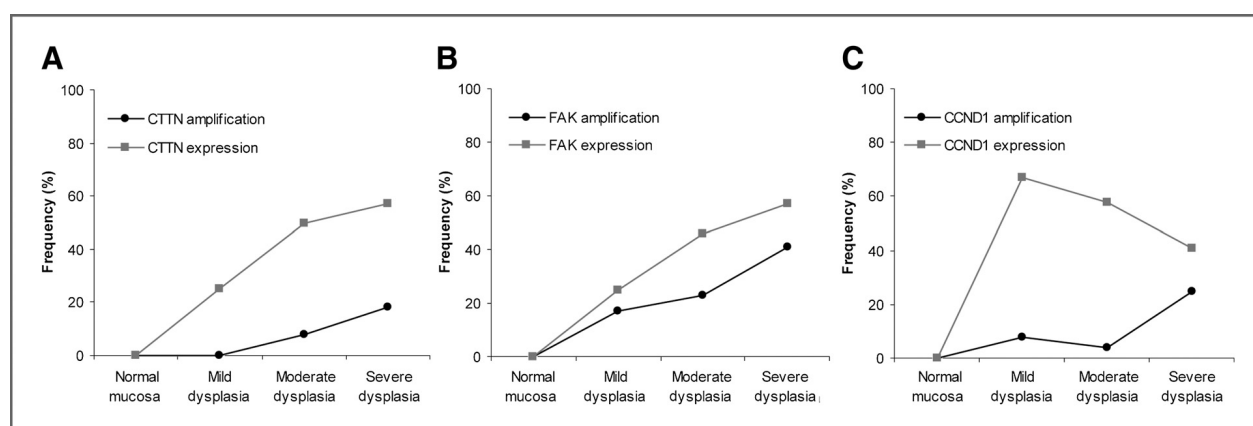


Figure 2. Frequencies of CTTN (A), FAK (B), and CCND1 (C) protein expression and gene amplification in the different stages of laryngeal tumorigenesis.

Furthermore, *CCND1* amplification significantly correlated with cyclin D1 protein expression ($P = 0.003$). However, increased cyclin D1 expression was detected at a high rate along the different stages of laryngeal tumorigenesis (67%, 8 of 12 mild dysplasias; 58%, 15 of 26 moderate dysplasias; and 42%, 18 of 43 severe dysplasias; Fig. 2C and Supplementary Data S4).

Associations with laryngeal cancer risk

There was no statistically significant correlation in this cohort between the histopathologic grade and the risk of progression to laryngeal cancer ($P = 0.378$; Table 2), although severe dysplasias showed a higher cancer risk (HR = 1.763, 95% CI: 0.519–5.989; $P = 0.364$; Table 3).

Table 2. Evolution of the premalignant lesions in relation to histopathologic diagnosis, *CTTN*, *CCND1* and *FAK* gene amplification, and protein expression

Characteristic	No of cases (%)	Progression to carcinoma (%)	P
Histopathologic diagnosis			
Mild dysplasia	12 (15)	3 (25)	0.378 ^a
Moderate dysplasia	26 (32)	7 (27)	
Severe dysplasia	44 (54)	18 (41)	
<i>CTTN</i> gene amplification			
Negative	72 (88)	22 (31)	0.083 ^b
Positive	10 (12)	6 (60)	
<i>FAK</i> gene amplification			
Negative	56 (68)	18 (32)	0.622 ^b
Positive	26 (32)	10 (38)	
<i>CCND1</i> gene amplification			
Negative	67 (88)	19 (28)	0.009 ^b
Positive	13 (12)	9 (69)	
<i>CCND1</i> protein expression			
Negative	40 (49)	12 (30)	0.485 ^b
Positive (>10% stained nuclei)	41 (51)	16 (39)	
<i>CTTN</i> protein expression			
Weak-Moderate (scores 0–2)	61 (74)	16 (26)	0.016 ^b
Strong (score 3)	21 (26)	12 (57)	
<i>FAK</i> protein expression			
Weak-Moderate (scores 0–2)	59 (72)	14 (24)	0.004 ^b
Strong (score 3)	23 (28)	14 (61)	
<i>CTTN</i> and/or <i>FAK</i> expression			
Weak-Moderate (scores 0–2)	52 (63)	9 (17)	<0.001 ^b
Strong (score 3)	30 (37)	19 (63)	

^a χ^2 and ^bFisher's exact tests.

Table 3. Univariate Cox proportional hazards model to estimate laryngeal cancer risk

Characteristic	P	HR	95% CI
Age (above vs. below the mean)	0.919	1.039	0.494–2.185
Smoking (above vs. below the mean)	0.532	1.270	0.600–2.685
Histology (severe vs. mild to moderate dysplasia)	0.364	1.763	0.519–5.989
<i>CTTN</i> amplification (positive vs. negative)	0.032	2.695	1.089–6.670
<i>FAK</i> amplification (positive vs. negative)	0.537	1.276	0.589–2.766
<i>CCND1</i> amplification (positive vs. negative)	0.002	3.438	1.545–7.652
<i>CTTN</i> expression (score 3 vs. 0–2)	0.009	2.726	1.287–5.774
<i>FAK</i> expression (score 3 vs. 0–2)	0.002	3.248	1.544–6.835
<i>CCND1</i> expression (positive vs. negative)	0.344	1.435	0.679–3.036
<i>CTTN</i> and/or <i>FAK</i> expression (score 3 vs. 0–2)	<0.001	5.040	2.270–11.190

Interestingly, we found that increased *CTTN* and *FAK* protein scores (from 0–3) significantly correlated with an increased laryngeal cancer risk (log-rank $P = 0.048$ and $P = 0.020$, respectively; Fig. 3A and B). Because lesions with strong *CTTN* and *FAK* expression (score 3) showed the highest risk of progression, this was used as a cutoff point in our subsequent analyses ($P = 0.016$ and $P = 0.004$, respectively; Table 2). Consistent with these results, patients carrying strong *CTTN*-expressing lesions and strong *FAK*-expressing lesions experienced a significantly higher laryngeal cancer incidence than those with weak to moderate expression (log-rank $P = 0.006$ and $P = 0.001$, respectively; Fig. 3C and D). The simultaneous analysis of *CTTN* and *FAK* as predictive markers revealed that lesions with strong expression of either one (group 1) or both proteins (group 2) reflected a significantly higher cancer risk than those with weak to moderate expression (group 0; log-rank $P = 0.008$, group 2 vs. 0; $P < 0.001$, group 1 vs. 0; Fig. 3E); however, strong expression of both proteins together did not correspond to a higher cancer risk compared with a single protein (log-rank $P = 0.195$, group 2 vs. 1; Fig. 3E). Strong expression of *CTTN* and/or *FAK* showed the most robust association with laryngeal cancer risk (log-rank $P < 0.001$; Fig. 3F). Five years after the patients were diagnosed, 19 (63%) of the 30 patients with strong expression of *CTTN* and/or *FAK* developed laryngeal cancer, whereas only 9 (17%) of the 52 patients with weak to moderate expression of these 2 proteins progressed to invasive carcinoma ($P < 0.001$; Table 2). In addition, we also found that *CCND1* gene amplification, but not protein expression, significantly associated with a higher risk of progression ($P = 0.009$; Table 2).

Univariate Cox analysis showed that *CTTN* and *CCND1* gene amplification and *CTTN* and *FAK* expression, but not histologic grading, were significantly associated with laryngeal cancer risk (Table 3). In multivariate stepwise analysis including histology, *CTTN* and *FAK* expression, and *CTTN* and *CCND1* gene amplification, only *FAK* expression (HR = 3.517, 95% CI: 1.656–7.472; $P = 0.001$) and *CCND1* gene amplification

(HR = 3.909, 95% CI: 1.733–8.817; $P = 0.001$) were significant independent predictors of laryngeal cancer development. When *CTTN* and/or *FAK* expression was included in the analysis, this combined factor (HR = 4.472, 95% CI: 1.995–10.023; $P < 0.001$) and *CCND1* gene amplification (HR = 2.763, 95% CI: 1.223–6.240; $P = 0.014$) were the only significant independent predictors of cancer development.

Discussion

This study is the first to investigate *CTTN* and *FAK* protein expression and gene status in laryngeal tumorigenesis to ascertain their role in malignant transformation. Our findings show that *CTTN* and *FAK* are both frequently abnormally expressed in the early stages of laryngeal tumorigenesis and that patients carrying strong *CTTN*- or *FAK*-expressing dysplastic lesions exhibit a significantly higher cancer incidence than those with weak to moderate expression. In the light of our data, *CTTN* and, more strongly, *FAK* seem to be both biologically relevant features that contribute to laryngeal cancer development and although the expression of both proteins does not seem to confer an additional advantage to tumor formation, the combination of *CTTN* and *FAK* evaluation was statistically significantly superior in terms of predictive value and also sensitivity, therefore recommending their use as complementary markers.

Given that *CCND1* gene is located close to *CTTN* and both genes are commonly coamplified in HNSCC (13, 14), we also compared their contribution to malignant transformation by using the same series of laryngeal dysplasias. We found that *CCND1* amplification strongly correlated with increased laryngeal cancer risk; however, it is still difficult to dissect the impact of each gene when 8 (62%) of 13 positive cases showed *CTTN* coamplification. Nevertheless, *CTTN* protein expression but not *CCND1* expression increased with the histologic grade and correlated significantly with the risk of progression, thus supporting a role for *CTTN* in malignant

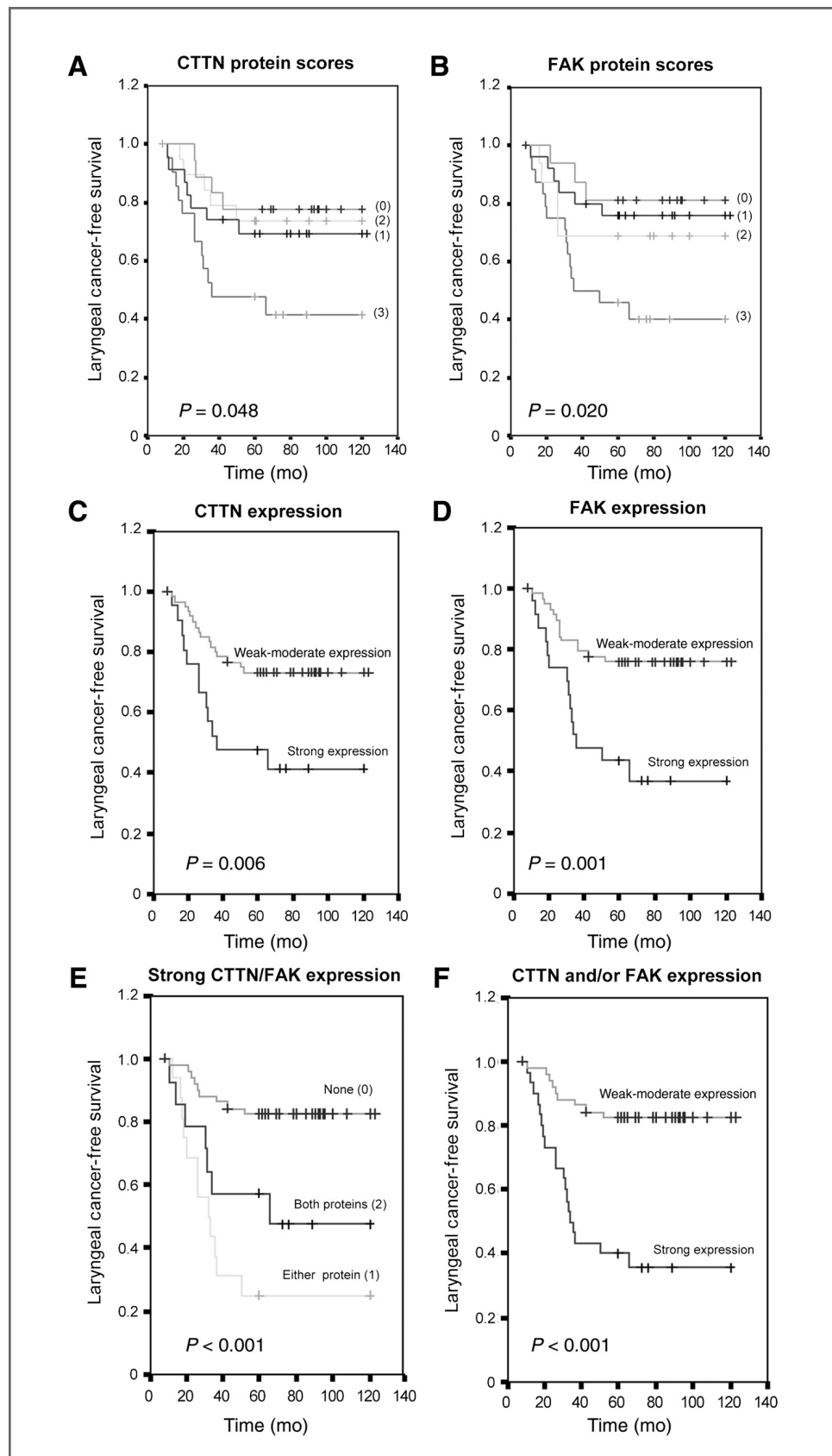


Figure 3. Kaplan-Meier cancer-free survival curves in patients with laryngeal dysplasias categorized by CTTN (A) and FAK (B) protein scores; CTTN (C) and FAK (D) protein expression dichotomized as score 3 (strong) versus scores 0 to 2 (weak-moderate); (E) CTTN and FAK expression grouped as strong expression of either one protein (1), both proteins (2), or none (0); and (F) CTTN and/or FAK protein expression dichotomized as strong versus weak to moderate. P values were estimated by using the log-rank test.

transformation. In addition, the early changes observed in CCND1 expression could also reflect functional differences between the 2 genes during laryngeal tumorigenesis, according to our previous findings during HNSCC progression (14). Thus, it has been reported that CCND1 overexpression during tumorigenesis precedes and probably enables gene amplification by dysregulation of cell proliferation that results in genomic instability (26).

Despite the fact that patients with severe dysplasia were at a higher risk of malignant progression (HR = 1.763), histology did not show a significant role in assessing laryngeal cancer risk in this cohort. In contrast, strong expression of CTTN and/or FAK showed robust associations with an increased laryngeal cancer risk and, more importantly, expression of FAK alone or CTTN and/or FAK were independent predictors in multivariate analysis. These data underscore the limited value of histopathologic classification in predicting outcome and suggest that CTTN and FAK protein evaluation may provide additional information beyond histologic features. Because histopathologic diagnosis of SILs is the gold standard in clinical practice for cancer risk assessment and decision making and immunohistochemical analysis of CTTN and FAK is relatively simple and easy to interpret, it seems reasonable to recommend this molecular test to be included. Nevertheless, routine implementation of CTTN and FAK expression as biomarkers for cancer risk assessment will require further confirmation in large prospective studies. It would also be of interest to delineate whether these findings could extend to other sites in the head and neck area, such as oral cavity, a location with a high rate of premalignancies (oral leukoplakias) diagnosed.

Nonetheless, CTTN or FAK expression may not be sufficient to promote tumorigenesis, because 9 (17%) cancers developed from lesions with weak-moderate expression of both proteins. Alternatively, it is also plausible that these lesions were biopsied before the abnormality occurred, or that cancers were originated from lesions not clinically visible at the time of biopsy and therefore unexamined. Consistent with this notion, we found 8 patients showing strong expression of CTTN and/or FAK in the invasive tumor with weak-moderate protein expression in the corresponding premalignant lesion previously biopsied. In addition, our observation that CTTN and FAK expression is maintained or even augmented in invasive tumors further supports the role of CTTN and FAK in both the development and progression of laryngeal cancer. Various studies have shown the fundamental role of CTTN and FAK in processes of invasion and metastasis in HNSCC and other cancers (10–12, 16, 20–23, 27). Overexpression of CTTN and FAK has been associated with tumor aggressiveness and poor prognosis (9, 13–18, 22, 27). CTTN overexpression has also been linked to resistance to the epidermal growth factor receptor kinase inhibitor gefitinib (28). Therefore, in addition to the role of CTTN and FAK as prognostic and/or cancer risk markers, these data also reflect that they both may

represent promising therapeutic targets in the prevention and treatment of HNSCC. Interestingly, small molecules targeting Src kinase activity have proved to be effective inhibitors of HNSCC invasion and metastasis in preclinical settings by impairing phosphorylation of Src substrates, such as CTTN and FAK, important for invadopodia formation and ECM degradation (29–32). These compounds are currently being evaluated in clinical trials (33).

Our study also revealed important temporal and mechanistic information when comparing the timing and frequency of molecular changes along the different stages of laryngeal tumorigenesis. The overexpression of both CTTN and FAK was detected at early stages and their frequency increased with the grade of dysplasia. Furthermore, we found that CTTN overexpression precedes and occurs at a higher frequency than gene amplification during laryngeal tumorigenesis, indicating that additional mechanisms must be contributing to CTTN expression. FAK overexpression also occurred more frequently; however, in this case, FAK amplification did not perfectly match with protein expression and only showed a partial contribution. These results are in agreement with our previous observations in HNSCC progression (14, 21).

Taken together, our results indicate that CTTN and FAK are both biologically and clinically important in laryngeal tumorigenesis and in malignant transformation and provide original evidence of their potential utility as biomarkers for cancer risk assessment. Given that the treatment of laryngeal tumors presents formidable functional consequences, new molecular markers of risk will undoubtedly improve local control, overall survival, reduction of morbidity, and preservation of organ function.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

We thank Pablo Martínez-Cambor (Oficina de Investigación Biosanitaria, OIB) for his assistance with statistical analyses, Teresa Ortega Montoliu and OIB staff for the administrative support, and Dr. Regginald O. Morgan for corrections of the manuscript.

Grant Support

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III and Fondos FEDER (CP07/00032 and PI10/00157 to J.M. García-Pedrero, and PI07/0777 to J.P. Rodrigo); Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer, ISCIII (RD06/0020/0034); Fundación para el Fomento en Asturias de la Investigación Científica Aplicada y la Tecnología (FICYT IB09-068 to J.M. García-Pedrero); and Obra Social Cajastur-IUOPA. S.T. Menendez was the recipient of a fellowship from FICYT (BP08-007) and G. Alvarez-Alija recipient of a fellowship from ISCIII (FI09/00343).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received November 17, 2010; revised April 20, 2011; accepted May 23, 2011; published OnlineFirst June 6, 2011.

References

- Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 1996;56:2488–92.
- Haddad RI, Shin DM. Recent advances in head and neck cancer. *N Engl J Med* 2008;359:1143–54.
- Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D. Head-and-neck cancer. *N Engl J Med* 2001;345:1890–900.
- Gale N, Michaels L, Luzar B, Poljak M, Zidar N, Fischinger J, et al. Current review on squamous intraepithelial lesions of the larynx. *Histopathology* 2009;54:639–56.
- Gale N, Pilch BZ, Sidransky D, El Naggar A, Westra W, Califano J, et al. Epithelial precursor lesions. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editors. *Pathology and genetics of head and neck tumours*. Lyon: IARC Press-WHO Press; 2005. p. 177–9.
- Meredith SD, Levine PA, Burns JA, Gaffey MJ, Boyd JC, Weiss LM, et al. Chromosome 11q13 amplification in head and neck squamous cell carcinoma. Association with poor prognosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;121:790–94.
- Bockmühl U, Schlüns K, Schmidt S, Matthias S, Petersen I. Chromosomal alterations during metastasis formation of head and neck squamous cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;33:29–35.
- Schuuring E. The involvement of the chromosome 11q13 region in human malignancies: cyclin D1 and EMS1 are two new candidate oncogenes—a review. *Gene* 1995;159:83–96.
- Clark ES, Brown B, Whigham AS, Kocharshvili A, Yarbrough WG, Weaver AM. Aggressiveness of HNSCC tumors depends on expression levels of cortactin, a gene in the 11q13 amplicon. *Oncogene* 2009;28:431–44.
- Weed SA, Parsons JT. Cortactin. coupling membrane dynamics to cortical actin assembly. *Oncogene* 2001;20:6418–34.
- Rothschild BL, Shim AH, Ammer AG, Kelley LC, Irby KB, Head JA, et al. Cortactin overexpression regulates actin-related protein 2/3 complex activity, motility, and invasion in carcinomas with chromosome 11q13 amplification. *Cancer Res* 2006;66:8017–25.
- Clark ES, Whigham AS, Yarbrough WG, Weaver AM. Cortactin is an essential regulator of matrix metalloproteinase secretion and extracellular matrix degradation in invadopodia. *Cancer Res* 2007;67:4227–35.
- Rodrigo JP, García-Carracedo D, García LA, Menéndez S, Allonca E, González MV, et al. Distinctive clinicopathological associations of amplification of the cortactin gene at 11q13 in head and neck squamous cell carcinomas. *J Pathol* 2009;217:516–23.
- Rodrigo JP, García LA, Ramos S, Lazo PS, Suárez C. EMS1 gene amplification correlates with poor prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2000;6:3177–82.
- Gibcus JH, Mastik MF, Menkema L, de Bock GH, Kluin PM, Schuurung E, et al. Cortactin expression predicts poor survival in laryngeal carcinoma. *Br J Cancer* 2008;98:950–5.
- Luo ML, Shen XM, Zhang Y, Wei F, Xu X, Cai Y, et al. Amplification and overexpression of CTTN (EMS1) contribute to the metastasis of esophageal squamous cell carcinoma by promoting cell migration and anoikis resistance. *Cancer Res* 2006;66:11690–9.
- Hui R, Ball JR, Macmillan RD, Kenny FS, Prall OW, Campbell DH, et al. EMS1 gene expression in primary breast cancer: relationship to cyclin D1 and oestrogen receptor expression and patient survival. *Oncogene* 1998;17:1053–9.
- Yuan BZ, Zhou X, Zimonjic DB, Durkin ME, Popescu NC. Amplification and overexpression of the EMS1 oncogene, a possible prognostic marker, in human hepatocellular carcinoma. *J Mol Diagn* 2003;5:48–53.
- Huang Q, Yu GP, McCormick SA, Mo J, Datta B, Mahimkar M, et al. Genetic differences detected by comparative genomic hybridization in head and neck squamous cell carcinomas from different tumor sites: construction of oncogenetic trees for tumor progression. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;34:224–33.
- Gabarra-Niecko V, Schaller MD, Dunty JM. FAK regulates biological processes important for the pathogenesis of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2003;22:359–74.
- Canel M, Secades P, Rodrigo JP, Cabanillas R, Herrero A, Suarez C, et al. Overexpression of focal adhesion kinase in head and neck squamous cell carcinoma is independent of fak gene copy number. *Clin Cancer Res* 2006;12:3272–9.
- McLean GW, Carragher NO, Avizienyte E, Evans J, Brunton VG, Frame MC. The role of focal-adhesion kinase in cancer—a new therapeutic opportunity. *Nat Rev Cancer* 2005;5:505–15.
- Canel M, Secades P, Garzón-Arango M, Allonca E, Suarez C, Serrels A, et al. Involvement of focal adhesion kinase in cellular invasion of head and neck squamous cell carcinomas via regulation of MMP-2 expression. *Br J Cancer* 2008;98:1274–84.
- Oktay MH, Oktay K, Hamele-Bena D, Buyuk A, Koss LG. Focal adhesion kinase as a marker of malignant phenotype in breast and cervical carcinomas. *Hum Pathol* 2003;34:240–5.
- Pedrero JM, Carracedo DG, Pinto CM, Zapatero AH, Rodrigo JP, Nieto CS, et al. Frequent genetic and biochemical alterations of the PI 3-K/AKT/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2005;114:242–8.
- Izzo JG, Papadimitrakopoulou VA, Li XQ, Ibarquien H, Lee JS, Ro JY, et al. Dysregulated cyclin D1 expression early in head and neck tumorigenesis: *in vivo* evidence for an association with subsequent gene amplification. *Oncogene* 1998;17:2313–22.
- Kelley LC, Shahab S, Weed SA. Actin cytoskeletal mediators of motility and invasion amplified and overexpressed in head and neck cancer. *Clin Exp Metastasis* 2008;25:289–304.
- Timpson P, Wilson AS, Lehrbach GM, Sutherland RL, Musgrove EA, Daly RJ. Aberrant expression of cortactin in head and neck squamous cell carcinoma cells is associated with enhanced cell proliferation and resistance to the epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib. *Cancer Res* 2007;67:9304–14.
- Summy JM, Gallick GE. Treatment for advanced tumors: SRC reclaims center stage. *Clin Cancer Res* 2006;12:1398–401.
- Green TP, Fennell M, Whittaker R, Curwen J, Jacobs V, Allen J, et al. Preclinical anticancer activity of the potent, oral Src inhibitor AZD0530. *Mol Oncol* 2009;3:248–61.
- Ammer AG, Kelley LC, Hayes KE, Evans JV, Lopez-Skinner LA, Martin KH, et al. Saracatinib impairs head and neck squamous cell carcinoma invasion by disrupting invadopodia function. *J Cancer Sci Ther* 2009;1:52–61.
- Johnson FM, Saigal B, Talpaz M, Donato N. Dasatinib (BMS-354825) tyrosine kinase inhibitor suppresses invasion and induces cell cycle arrest and apoptosis of head and neck squamous cell carcinoma and non-small cell lung cancer cells. *Clin Cancer Res* 2005;11:6924–32.
- Kopetz S, Shah AN, Gallick GESrc continues aging: current and future clinical directions. *Clin Cancer Res* 2007;13:7232–6.