



Universidad de Oviedo
Instituto Universitario de Oncología del
Principado de Asturias

“La Ruta Wnt en los Adenocarcinomas Nasosinusales”

Juan Pablo Díaz Molina

Tesis doctoral



Universidad
de Oviedo





Universidad de Oviedo
Instituto Universitario de Oncología del
Principado de Asturias

“La Ruta Wnt en los Adenocarcinomas Nasosinusales”

Tesis doctoral

Autor

D. Juan Pablo Díaz Molina

Directores

Dr. José Luis Llorente Pendás

Dr. Mario Hermsen

Dr. César Álvarez Marcos



Universidad
de Oviedo





Dedicatoria

A Claudia y Sofía:

Por ser la motivación que me anima a intentar ser mejor cada día.



Universidad
de Oviedo





Agradecimientos

Escribir los agradecimientos de una tesis doctoral significa la conclusión de un intenso trabajo realizado en colaboración con múltiples profesionales que no han tenido inconveniente en compartir su tiempo y conocimientos conmigo. Mi agradecimiento y reconocimiento a todos ellos porque son una parte fundamental de este trabajo.

A mis tres directores de tesis: Dr. César Álvarez Marcos por brindarme su valiosa colaboración a la hora de ordenar, redactar e interpretar los resultados del presente escrito, así como su inestimable guía en todas las horas que compartimos juntos, su colaboración fue sin duda uno de los cimientos más importantes sobre los que se edificó esta tesis doctoral.

Al Dr. José Luis Llorente Pendás por ofrecerme este desafío y su confianza para llevarlo a cabo, por haberme brindado la oportunidad de ser parte del grupo de investigación de los adenocarcinomas nasosinusales, tener la visión para emprender este tema de investigación y por su constante apoyo para recopilar las bases científicas que fundamentan nuestros hallazgos.

Al Dr. Mario Hermsen por la gran paciencia que ha tenido a la hora de guiarme por el campo de la genética, por su ayuda a la hora de elaborar los experimentos que fundamentan los resultados de esta investigación y por su colaboración en la elaboración de los artículos científicos fruto de esta tesis doctoral.

Dra. Blanca Vivanco y al Dr. Florentino Fresno (Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Central de Asturias), cuyo trabajo a la hora de la elaboración e interpretación de los “tissue arrays” fue inestimable.

A mis compañeros de los Servicios de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Central de Asturias (Oviedo), por guiarme en mis primeros pasos en



la especialidad y por permitirme el tiempo de trabajar en la tesis doctoral, algunas veces a costa de recargarles la carga asistencial del día a día.

A los miembros del Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias, quienes me apoyaron constantemente a la hora de realizar los experimentos del presente trabajo y resolver las innumerables dudas que me surgían, en especial a Sira Potes y Eva Allonca quienes tuvieron el detalle de trabajar conmigo, incluso fuera de su horario laboral.

A las encargadas de la biblioteca del Hospital Universitario Central de Asturias por su apoyo en la búsqueda de la documentación que aparece en este trabajo y encontrar lo que parecía imposible conseguir.

A Silvia (Secretaria del Instituto Universitario Central de Asturias) por su eficiente guía en los trámites burocráticos que conlleva una tesis doctoral.

A mis padres por inculcar en mí los principios de disciplina, perseverancia y dedicación, tienen el mérito de cada uno de mis logros pues me han dado todas las oportunidades a su alcance y han confiado incondicionalmente en mi trabajo.

A mi amada esposa Claudia María Sigüenza Tobías que entendió lo importante que era este proyecto para mí, muchas de las horas invertidas en este trabajo se las he robado a ella y a mi bebe Sofía. Han mostrado una paciencia infinita conmigo y me han motivado y animado cada vez que he tenido un momento de frustración en la elaboración de la presente tesis doctoral.

Al Dr. Carlos Suárez Nieto por haber inculcado el hábito de investigación en nuestro servicio de Otorrinolaringología y por haber confiado en mí durante estos cuatro años, que he tenido el gusto de trabajar y compartir a su lado.

Al resto de mi familia y amigos que fueron fundamentales en este viaje.

Todos ellos contribuyeron con su apoyo a dar forma a este trabajo y sin ellos no hubiera sido posible.



Abreviaturas

- **ACNS:** adenocarcinomas nasosinusales
- **ACCR:** adenocarcinomas colorrectales
- **CECC:** carcinomas escamosos de cabeza y cuello
- **CENS:** carcinomas escamosos nasosinusales
- **CGH:** hibridación genómica comparativa (*“Comparative Genomic Hybridization”*)
- **FISH:** hibridación *in situ* fluorescente
- **FN:** fosas nasales
- **IHQ:** inmunohistoquímica
- **ISH:** hibridación *in situ*
- **ITAC:** variante de adenocarcinoma nasal (*“Intestinal Type-AdenoCarcinoma”*)
- **m-CGH:** “microarray-CGH”
- **MLPA:** amplificación múltiple de sondas dependiente de ligación (*“Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification”*)
- **MLPA-MS:** amplificación múltiple de sondas dependiente de ligación (*“Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification”*) metilación específica
- **SP:** senos paranasales
- **TA:** “tissue array”
- **TCFs:** factor de degradación de células T
- **Wnt:** ruta Wnt/ β -catenina



Universidad
de Oviedo





Glosario

- **Supervivencia global:** porcentaje de pacientes vivos en un tiempo X , independientemente de cuál haya sido la causa de muerte.
- **Supervivencia específica de la enfermedad:** porcentaje de pacientes vivos en un tiempo X , excluyéndose aquellos pacientes que hayan muerto a causa de otra enfermedad.
- **Supervivencia libre de enfermedad:** porcentaje de pacientes vivos que en un tiempo X , no hayan desarrollado recidivas ni metástasis.
- **Mortalidad por tumor:** porcentaje de pacientes que mueren como consecuencia de un tumor X o de las metástasis derivadas de este.
- **Ganancia en m-CGH:** aumento en el número de copias de un gen X con respecto a los controles procedentes de individuos sanos; se define como desviaciones superiores a 0,2 ó más del \log_2 de índices = 0.
- **Pérdida en m-CGH:** disminución en el número de copias de un gen X con respecto a controles procedentes de individuos sanos; se define como desviaciones inferiores a 0,2 ó más del \log_2 de índices = 0.
- **Amplificación:** aumento importante en el número de copias de un gen X con respecto a los controles procedentes de individuos sanos; se considera amplificación cuando al menos dos clones vecinos alcanzan un \log_2 índice de 1,0 ó mayor.
- **Ganancia en MLPA:** aumento en el número de copias de un gen X con respecto a los controles procedentes de individuos sanos; se define como ganancia cuando la relación tumor/control es mayor a 1,2 y la desviación estándar es > 1 .
- **Pérdida en MLPA:** disminución en el número de copias de un gen X con respecto a controles procedentes de individuos sanos; se



define como pérdida cuando la relación tumor/control es menor a 0,8 y la desviación estándar es $< a 1$.

- **Amplificación:** aumento importante en el número de copias de un gen X con respecto a los controles procedentes de individuos sanos; se considera amplificación cuando la relación tumor/control es mayor a 2 y la desviación estándar es $> a 1$.
- **Expresión:** detección de una proteína mediante reacciones de inmunohistoquímica.
- **Sobreexpresión:** detección de una proteína en más del 50% de las células tumorales mediante técnicas de inmunohistoquímica.



Bases previas

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

Comunicaciones a Congresos

1. Título: Análisis genético y molecular de la ruta Wnt en adenocarcinomas nasosinusales.

Autor/es: J.P. Díaz Molina, J. L. Llorente Pendás, B. Vivanco, C. Álvarez Marcos, M. Costales, C. García Inclán, C. Suárez Nieto, M. Hermsen.

Congreso: 61 Congreso Nacional de la SEORL-PCF

Lugar y fecha: Valencia, 2010 (Foro de Investigación).

2. Título: Análisis genético y molecular de la ruta Wnt en adenocarcinomas nasosinusales.

Autor/es: J.P. Díaz Molina, J. L. Llorente Pendás, B. Vivanco, C. Álvarez Marcos, M. Costales, C. García Inclán, C. Suárez Nieto, M. Hermsen.

Congreso: XIV Reunión de residentes del H.U.C.A.

Lugar y fecha: Oviedo Asturias, Mayo 2011 (Premio a la comunicación científica mas relevante).

3. Título: Wnt pathway activation in sinonasal adenocarcinomas.

Autor/es: J.P. Díaz Molina, M. Hermsen, B. Vivanco, C. Alvarez Marcos, M. Costales, Rocío Gonzalez, Marta Morato, C. Suárez Nieto, J. L. Llorente Pendás.

Congreso: 1st Congress of CE-ORL-HNS, 62 Congreso Nacional de la SEORL-PCF

Lugar y fecha: Barcelona, 2011.



Artículos

1. Título: Wnt-pathway activation in intestinal-type sinonasal adenocarcinoma.

Autor/es: J.P. Díaz Molina, J. L. Llorente Pendás, B. Vivanco, M. L. Fresno, J. Pérez-Escuredo, C. Alvarez Marcos, M. Hermsen.

Revista: Rhinology.

Número y fecha: Epub ahead of print.



ÍNDICE

1. ANTECEDENTES	1
1.1 Introducción	2
1.2 Adenocarcinomas nasosinusales	3
1.2.1 <i>Epidemiología</i>	3
1.2.2 <i>Factores etiológicos</i>	5
1.2.3 <i>Histopatología</i>	6
1.2.4 <i>Clínica</i>	9
1.2.5 <i>Diagnóstico</i>	10
1.2.6 <i>Estadificación</i>	11
1.2.7 <i>Tratamiento</i>	15
1.2.8 <i>Pronóstico</i>	16
1.3 Alteraciones genéticas en adenocarcinomas nasosinusales	17
1.4 Ruta WNT en adenocarcinomas	19
1.5 Modelo teórico	26
2. HIPÓTESIS	29
3. OBJETIVOS	31
4. MATERIAL Y MÉTODOS	33
4.1 Selección de pacientes. Diseño del estudio	34
4.2 Recogida de la muestra	35
4.2.1 <i>Extracción del ADN</i>	37
4.3 Microarray de CGH	38
4.3.1 <i>Fundamentos de la técnica</i>	38
4.3.2 <i>Pasos del experimento</i>	39
4.3.3 <i>Interpretación de datos</i>	40



4.4 MLPA	41
4.4.1 <i>Fundamentos de la técnica</i>	41
4.4.2 <i>Tipos de sondas</i>	43
4.4.3 <i>Pasos del experimento</i>	48
4.4.4 <i>Interpretación de datos</i>	51
4.5 MLPA de metilación	53
4.5.1 <i>Fundamentos de la técnica</i>	53
4.5.2 <i>Tipos de sondas</i>	55
4.5.3 <i>Pasos del experimento</i>	57
4.5.4 <i>Interpretación de resultados de MLPA-MS</i>	58
4.6 Tissue array	59
4.6.1 <i>Fundamentos de la técnica</i>	59
4.6.2 <i>Pasos del experimento</i>	61
4.6.3 <i>Interpretación de datos</i>	63
4.7 Inmunohistoquímica	63
4.7.1 <i>Fundamentos de la técnica</i>	63
4.7.2 <i>Pasos de la técnica</i>	64
4.7.3 <i>Tipos de reactivos</i>	65
4.7.4 <i>Interpretación de datos</i>	69
4.8 Descripción de las variables	70
4.9 Análisis estadístico	72
5. RESULTADOS	75
5.1 Aspectos clínico-patológicos	76
5.1.1 <i>Datos descriptivos de los ACNS</i>	76
5.1.2 <i>Relaciones de las variables clínico-patológicas con la supervivencia en los ACNS</i>	81
5.1.3 Análisis multivariante de las variables clínicas que influyen en la Supervivencia	89



5.2 Aspectos genéticos	91
5.2.1 <i>Datos descriptivos de los ACNS</i>	91
5.2.2 <i>Relaciones génicas</i>	96
5.3 Expresión proteica	99
5.3.1 <i>Datos descriptivos de los ACNS</i>	99
5.3.2 <i>Relaciones en la expresión proteica</i>	102
5.3.3 <i>Análisis multivariante de las variables genéticas y de expresión que influyen en la supervivencia específica de la enfermedad</i>	106
5.4 Concordancia y discordancia de las variables de expresión en los ACNS	107
5.4.1 <i>Análisis de concordancia entre E-cadherina y β-catenina</i>	108
5.4.2 <i>Análisis de concordancia entre β-catenina de membrana y nuclear</i>	108
5.4.3 <i>Análisis de concordancia entre β-catenina y C-Myc</i>	109
5.4.4 <i>Análisis de concordancia entre Ciclina D1 y β-catenina</i>	109
5.4.5 <i>Análisis de concordancia entre β-catenina y p16</i>	110
5.4.6 <i>Análisis de concordancia entre E2F1 y β-catenina</i>	111
5.4.7 <i>Análisis de concordancia entre E2F1 y pRb</i>	111
5.4.8 <i>Análisis de concordancia entre E2F1 y CDK8</i>	112
6. DISCUSIÓN	113
6.1 Justificación	114
6.2 Aspectos clínico-patológicos	115
6.3 Aspectos genéticos-moleculares	117
6.4 Similitudes y diferencias clínico-patológicas y genético-moleculares entre los ACNS y los ACCR	132
7. CONCLUSIONES	140
8. PROYECTO FUTURO	144
9. BIBLIOGRAFÍA	148



10. ANEXOS



Universidad
de Oviedo





1. ANTECEDENTES



1.1. Introducción

Los tumores malignos de las fosas nasales (FN) y senos paranasales (SP) tienen una epidemiología, histopatología y características clínicas marcadamente diferentes a las del resto de neoplasias malignas de cabeza y cuello. Se indican algunos puntos importantes que determinan estas diferencias y que han contribuido a seleccionar este tema para mi proyecto de investigación:

1) Por un lado existe gran diversidad de tipos histopatológicos, aunque predominan los de origen epitelial, como son el carcinoma escamoso, el adenocarcinoma y el carcinoma indiferenciado. Otros tumores menos frecuentes son el neuroestesioblastoma originado en el epitelio olfatorio, el carcinoma adenoide quístico de las glándulas salivares menores, el linfoma, melanoma, hemangipericitoma maligno y plasmocitoma.

2) La localización nasosinusal, donde tienen su origen, es anatómicamente compleja (macizo centrofacial), próxima a estructuras de importantes como son los globos oculares y el cerebro. Este hecho condiciona su comportamiento, desde la clínica hasta el pronóstico, con repercusión en su tratamiento, al ser éste agresivo, pudiendo ocasionar serias deformidades estéticas¹.

3) Son tumores con baja incidencia/prevalencia y las series recopiladas suelen tener pocos casos. Sus características heterogéneas y su difícil manejo hacen que los estudios de referencia disponibles, en relación con su clasificación, evolución, pronóstico y tratamiento (respuesta, resultados funcionales), sean escasos^{1,2}. En los últimos años la concentración de pacientes en centros especializados ha permitido desarrollar técnicas quirúrgicas avanzadas con extirpaciones más amplias y seguras, reconstrucciones complejas, así como introducir nuevas modalidades de radioterapia.

4) Otra de sus peculiaridades es que, aunque su patogenia es desconocida, ciertos carcinógenos ambientales como virus y polvo de madera están implicados



en su etiología. Por el contrario, en su génesis no estarían involucrados los factores de riesgo clásicos (alcohol y tabaco) que aparecen en el resto de neoplasias de cabeza y cuello.

5) En la mayoría de las ocasiones, las lesiones se diagnostican en un estadio avanzado, debido a que ocasionan síntomas inespecíficos, similares a los de la patología inflamatoria crónica. Por ello, es frecuente que en el momento del diagnóstico se observe invasión de estructuras complejas, como son la órbita y/o las fosas infratemporal y craneal anterior, cuya resección conlleva una alta morbilidad².

6) Por todas estas circunstancias el pronóstico de estos tumores es desfavorable, pues va ligado al control local de la enfermedad y muchas veces no es posible el tratamiento con intención curativa^{1,3}. De ahí la importancia que tiene del diagnóstico precoz.

7) Por último, no se ha establecido un modelo de carcinogénesis progresiva desde lesiones preinvasivas, ni determinado algún marcador genético-molecular en las rutas metabólicas de su carcinogénesis, que sea capaz de pronosticar esta progresión y su posterior evolución.

El presente estudio se realizará sobre adenocarcinomas nasosinuales (ACNS) de tipo intestinal (ITAC), los cuales deben su nombre a la similitud histopatológica con los adenocarcinomas colorrectales (ACCR).

1.2. Adenocarcinomas nasosinuales

1.2.1. Epidemiología

Las neoplasias nasosinuales son poco frecuentes y representan aproximadamente el 0,2-0,8% del total de tumores malignos de la especie humana y el 3-6% de los tumores de cabeza y cuello^{1,4,5}. En las FN y SP se originan gran



variedad de tipos histológicos tumorales, aunque predominen los de estirpe epitelial como el carcinoma escamoso (CENS)^{5,6,7}. Los ACNS son menos frecuentes y representan entre el 8-25% de los tumores malignos nasosinusales⁸, aunque en nuestra serie representan la neoplasia más frecuente de los senos paranasales.

En nuestro medio, la incidencia de ACNS es de 0,19 casos/100.000 habitantes/año⁴. El adenocarcinoma es el tipo histológico más frecuente de los tumores etmoidales en Europa, siendo el carcinoma escamoso en EEUU.

La localización habitual, en el 85% de los casos, es la región etmoidal y la parte alta de las FN (cornetes superior, medio y meato medio), seguida de seno maxilar (10%), siendo excepcional en el resto de cavidades sinusales^{9,10,11}. Las localizaciones menos frecuentes son más propias de los pacientes no expuestos al polvo de la madera¹². No obstante, dada la proximidad de las regiones, en muchas ocasiones resulta difícil definir el origen exacto de la neoplasia, ya que se suele presentar en estadios avanzados. Además, un número significativo de tumores afecta a más de un sitio contiguo en el momento del diagnóstico.

La edad de aparición se sitúa entre los 50-60 años¹³, pero los casos relacionados con el polvo de madera aparecen a edades más tempranas¹⁴.

La relación entre sexos es de 4:1 a favor de los varones, probablemente debido a los factores etiopatogénicos implicados.

Los adenocarcinomas esporádicos afectan más a mujeres, localizándose en el seno maxilar y presentando peor pronóstico⁸.

Mientras que en los varones, con la edad, se observa un crecimiento lineal en la incidencia de las neoplasias nasosinusales, en las mujeres la curva desciende en torno a la menopausia, para aumentar a partir de los 55 años¹³. Esto podría deberse a que la mucosa nasal posee receptores para estrógenos y andrógenos, afectando los cambios hormonales a sus estructuras glandulares.



1.2.2. Factores etiológicos

No se conoce suficientemente el mecanismo etiopatogénico del cáncer nasosinusal, aunque sí se han descrito diferentes agentes carcinogénicos implicados en su desarrollo, en especial los agentes físicos y químicos. Hay estudios que relacionan al 40% de tumores nasosinuales con la exposición a diversos agentes químicos ambientales¹⁵. Los trabajadores de la industria de la madera, piel, textil y aluminio tienen un alto riesgo de desarrollar neoplasias nasosinuales¹⁶. Es bien conocido en la literatura, que algunos tipos histológicos, como el adenocarcinoma, se relacionan con la exposición prolongada al polvo de maderas duras (roble y haya), mientras que el carcinoma escamoso lo hace con el polvo de maderas blandas (abeto, pino)^{10,17,18,19,20,21,22}. Se estima que los trabajadores con exposición profesional al polvo de la madera tienen un riesgo 500 veces superior a la población masculina no expuesta y casi 900 veces más que la población general^{14,23,24}. Parece que el factor de riesgo reside en la exposición al polvo de la madera en sí, excluyéndose otros productos químicos usados en la industria maderera como abrillantadores, barnices, conservantes, etc²⁵. El riesgo aumentaría con la inhalación de formaldehído, pegamento y disolvente^{26,27}.

El tamaño de las partículas de polvo de madera es importante, ya que las de menos de 5 μm pasarían a la vía respiratoria baja provocando una respuesta inflamatoria pulmonar²⁸. Las partículas mayores de 5 μm , transportadas por el flujo aéreo, quedarían depositadas en la mucosa nasal, provocando una disminución del aclaramiento mucociliar. Este hecho favorecería la persistencia y contacto prolongado de partículas carcinógenas con la mucosa, ocasionando hiperplasia del epitelio adyacente y metaplasia escamosa o cuboidea⁹.

El tiempo de exposición al carcinógeno suele ser elevado, superior a 30 años^{4,10}. En las revisiones más amplias se observó que el 90,4% de los ACNS etmoidales estaban relacionados con la exposición al polvo de la madera, no

encontrando esta asociación con los carcinomas escamosos de la misma localización^{29,30,31}.

Esta relación causa-efecto ha hecho que sea una patología casi exclusiva de ebanistas y carpinteros, considerándola enfermedad profesional en países como Australia, Alemania, Italia, Inglaterra, Bélgica y Francia^{9,27}.

Aunque algunos autores los han relacionado también con el polvo de cuero en la génesis de los ACNS y el níquel y tabaco en los CENS⁸, a diferencia del resto de CECC, el alcohol y el tabaco no parecen tener un papel importante en el desarrollo de las neoplasias nasosinusales, sin negar cierta relación epidemiológica^{15,24,32}.

1.2.3. Histopatología

Los ACNS se dividen en dos grandes grupos: ACNS tipo intestinal (ITAC, “Intestinal Type-AdenoCarcinoma”) y ACNS tipo no intestinal.

Se han propuesto dos clasificaciones para el tipo ITAC:

La primera, propuesta por Barnes^{8,33} divide estos tumores en cinco categorías: papilar, colónico, sólido, mucinoso y mixto. La segunda, sugerida por Kleinsasser y Schroeder³⁴, los divide en cuatro categorías: papilar-tubular de células cilíndricas (PTCC) tipos I-III (I: bien diferenciado, II: moderadamente diferenciado y III: pobremente diferenciado), alveolar con células “caliciformes”, con células en anillo de sello y transicional (Tabla 1).

Tabla I. Clasificación histopatológica de los ACNS

Barnes ⁽⁸⁾	Kleinsasser and Schroeder ⁽³⁴⁾
Papilar	PTCC-I
Colónico	PTCC-II
Sólido	PTCC-III
Mucinoso	Alveolar, anillo de sello
Mixto	Transicional



Ambas clasificaciones son correctas pero, por su simplicidad, la OMS prefirió la propuesta por Barnes, describiendo en ella los tipos del siguiente modo:

-Tipo papilar: supone el 18% de los casos. En su histopatología predomina la arquitectura papilar con formación ocasional de glándulas tubulares. Muestra mínima atipia citológica y son raras las figuras mitóticas.

-Tipo colónico: representa el 40 % de los casos. En él predomina la arquitectura túbulo-glandular. Son raras las papilas. Aumenta el pleomorfismo nuclear y la actividad mitótica.

-Tipo sólido: es el 20%. Presenta pérdida de diferenciación con crecimiento sólido, trabecular y formaciones tubulares aisladas. Hay aumento del número de células cuboideas atípicas con núcleo vesicular y nucléolo prominente. Importante pleomorfismo y figuras mitóticas frecuentes.

-Tipo mucinoso (22% en conjunto con los tipo mixto): con dos patrones de crecimiento.

- Formando islotes sólidos de células con glándulas aisladas, células en anillo de sello y pequeñas papilas, con o sin eje fibrovascular. Presentan mucina de predominio intracelular y ocasionalmente se observa una matriz mucomixoide.
- Glándulas grandes, dilatadas revestidas por una capa de células cuboideas o caliciformes, con grandes lagos de mucina extracelular en su interior. Estos lagos están separados por tractos finos de tejido conectivo que le dan un aspecto de patrón alveolar.

-Tipo mixto: mezcla de dos o más patrones previamente definidos.

Independientemente del tipo histológico, los ACNS pueden simular mucosa intestinal normal e incluir vellosidades, células de Paneth, enterocromafines y musculares de la mucosa^{8,10}. Ejemplos de las histopatología se muestra en la Figura 1.

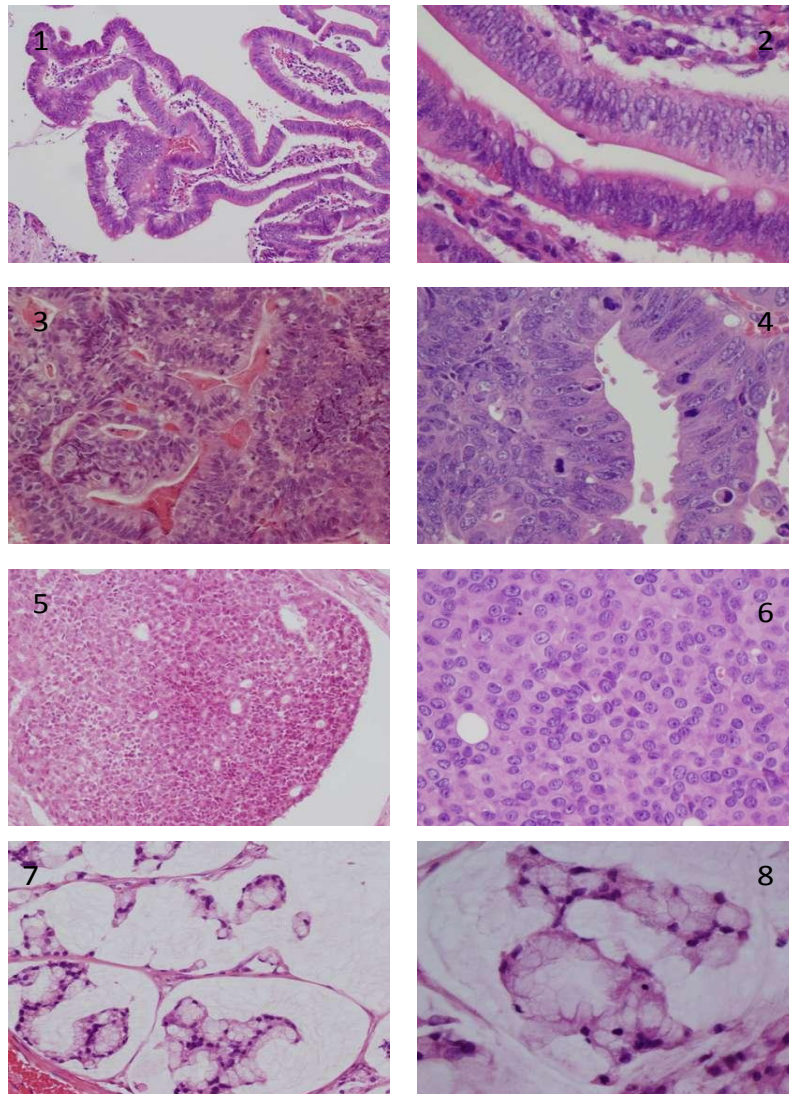


Figura 1. Histopatología de los tipos de ACNS. 1 y 2: papilar; 3 y 4: colónico; 5 y 6: sólido; 7 y 8: mucinoso

Otros procedimientos, que podemos considerar como propios dentro de un laboratorio de Anatomía Patológica, como son la inmunohistoquímica (IHQ) o la hibridación *in situ* fluorescente (FISH), no son utilizados de forma habitual en el diagnóstico y sólo, ocasionalmente, se emplean en el diagnóstico diferencial con otras neoformaciones nasales. Los ITACs presentan positividad difusa para



marcadores epiteliales como pancitoqueratina, antígeno epitelial de membrana, B72.3, Ver-EP4, BRST-1, Leu-M1, HMFG2, CK20 (73%) y CK7 (43-93%)³³.

1.2.4. *Clínica*

Se considera que los tumores nasosinusales de origen epitelial se encuentran, en sus estadios iniciales, confinados a los espacios óseos de los SP y de las FN, por lo que no suelen causar síntomas hasta alcanzar grandes dimensiones. La clínica aparece cuando se extienden fuera de los límites óseos o producen síntomas obstructivos secundarios a su tamaño^{1,4,32,35}.

Dada su clínica inicial silente, se suelen diagnosticar en estadios avanzados (más del 50% son T3 y T4)^{1,2}

Una rinosinusitis aguda puede ser la primera manifestación de un tumor sinusal y debe incitar a un mínimo estudio, sobre todo si no evoluciona favorablemente con el tratamiento^{6,36}.

Los síntomas que producen los ACNS se confunden con las enfermedades inflamatorias crónicas (rinitis, sinusitis) o con los tumores benignos, debido a su clínica inespecífica de obstrucción nasal, rinorrea, epistaxis y anosmia. Por este motivo es frecuente el diagnóstico tardío (6-8 meses desde el inicio de la clínica). Los tumores avanzados invaden la base del cráneo, cerebro, órbita, cara y cavidad oral, apareciendo entonces algias faciales, exoftalmos, diplopía, cefaleas, confusión mental y crisis comiciales. Se debe plantear la sospecha de un tumor nasosinusal maligno ante la presencia de epistaxis, obstrucción nasal o sinusitis unilateral.

Otra de sus características es su baja tendencia a desarrollar metástasis linfáticas o a distancia (menos del 5%)¹⁰, debido al escaso drenaje linfático de las FN y SP, aunque éstas sí aumentan cuando invade estructuras adyacentes. En ese caso, los ganglios retrofaríngeos son los más afectados, seguidos de los submandibulares y yugulares altos.



La progresión local de los ACNS hacia la órbita produce desplazamiento superolateral del ojo, proptosis, exoftalmos, edema palpebral, parálisis de los músculos extraoculares, diplopía y epífora. El periostio de la órbita constituye una barrera resistente a la invasión tumoral, sin embargo la lámina papirácea ofrece poca resistencia a dicha infiltración. El tumor también puede invadir el etmoides posterior, el esfenoides y la rinofaringe, progresando desde ahí hacia la base del cráneo, haciéndose intracraneal con síntomas de cefalea, crisis comicial, alteraciones de la conducta, etc.

1.2.5. Diagnóstico

El factor más importante para el diagnóstico precoz es la sospecha clínica ante todo síndrome obstructivo, álgico o secretor unilateral, que se prolongue en el tiempo y sea refractario a los tratamientos habituales.

La rinoscopia anterior clásica o actualmente la endoscopia (rígida o flexible) permiten la valoración clínica precisa de la neoformación, que suele ocupar la FN de forma unilateral. Ante la sospecha de un ACNS hay que tener en cuenta que estos tumores, como se citó, son más frecuentes en la región etmoidal, aunque se han descrito en seno maxilar y excepcionalmente en el esfenoidal y frontal^{5,6,20}

Los estudios de imagen son imprescindibles para valorar su extensión y seleccionar el abordaje terapéutico más adecuado. La TAC y la RNM son muy útiles para determinar los límites tumorales, la invasión de zonas adyacentes y la presencia de metástasis ganglionares, que aunque infrecuentes, cuando ocurren, son poco accesibles a la exploración.

La TAC (coronal y axial) tiene ventajas sobre la RNM para ver la invasión de la órbita, FN y base del cráneo. Por el contrario, la RNM (coronal, axial y sagital) es superior a la TAC en el estudio de partes blandas, para diferenciar el tumor de las secreciones retenidas y del edema peritumoral, así como para el estudio del tejido nervioso en la invasión perineural y cerebral. Por tanto, es

conveniente realizar ambos estudios de cara al tratamiento. Además, hoy se recomienda realizar los estudios de imagen antes de la toma de biopsia (Figura 2).

Antes de plantear el tratamiento definitivo es necesario tener una confirmación histopatológica de la naturaleza de la lesión y disponer de ese diagnóstico antes de tomar esa decisión.

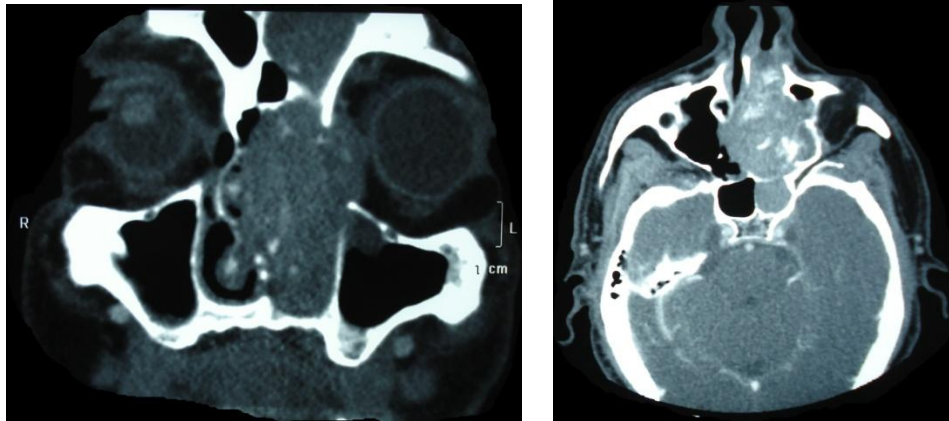


Figura 2. TAC coronal y axial de un ACNS con afectación de la fosa nasal e invasión orbitaria

1.2.6. Estadificación

La clasificación de los ACNS más utilizada en la clínica es el TNM de la UICC³⁷. Está basada en tres parámetros: extensión tumoral (T), afectación de ganglios linfáticos regionales (N) y presencia de metástasis a distancia (M), esta clasificación ha sido diseñada para todos los tumores de los senos paranasales sin ser específica de los ACNS. La información que aporta el TNM es descriptiva, pero no resulta muy útil a la hora de orientar el pronóstico individual. La baja incidencia de este tipo tumoral impide tener series amplias que aglutinen y validen esta información.

En las tablas II, III, IV, V y VI se muestra la clasificación de los tumores nasosinusales malignos³⁷.

Tabla II. Clasificación TNM relativa al tumor primario en seno maxilar

Categoría T	Tumor primario de seno maxilar
T1	Limitado a mucosa antral sin erosión ni destrucción ósea
T2	Erosión y destrucción ósea incluyendo extensión a paladar duro y /o meato medio, excepto extensión a pared antral posterior del seno maxilar y lámina pterigoidea
T3	Invade alguno de los siguientes: hueso de pared posterior del seno maxilar, tejido subcutáneo, suelo o pared medial de la órbita, fosa pterigoidea, seno etmoidal
T4a	Invade alguno de los siguientes: contenido orbita anterior, piel de la mejilla, lámina pterigoidea, fosa infratemporal, lámina cribiforme, seno frontal o esfenoidal
T4b	Invade alguno de los siguientes: ápex orbitario, dura, cerebro, fosa craneal media, nervios craneales exceptuando la rama maxilar del nervio trigémino (V2), nasofaringe, clivus

Tabla III. Clasificación TNM relativa al tumor primario de cavidad nasal y seno etmoidal

Categoría T	Tumor primario de fosas nasales y seno etmoidal
T1	Tumor limitado a una sublocalización en cavidad nasal o seno etmoidal sin invasión ósea
T2	Dos sublocalizaciones en una localización o se extiende invadiendo localizaciones adyacentes, dentro del complejo nasoetmoidal, con o sin invasión ósea
T3	Invade alguno de los siguientes: pared medial o suelo de la órbita, seno maxilar, paladar o lámina cribiforme
T4a	Invade alguno de los siguientes: contenido de órbita anterior, piel de nariz o mejilla, mínima extensión a fosa craneal anterior, lámina pterigoidea, seno esfenoidal o frontal
T4b	Invade alguno de los siguientes: ápex orbitario, dura, cerebro, fosa craneal media, nervios craneales excluyendo V2, nasofaringe, clivus

Tabla IV. Clasificación TNM relativa a las metástasis ganglionares

Categoría N	Ganglios linfáticos regionales
NX	No se puede asegurar su existencia
N0	Ausencia de nódulos metastásicos
N1	Metástasis en un único nódulo linfático ipsilateral ≤ 3 cm
N2a	Metástasis en un único nódulo linfático ipsilateral de > 3 cm pero < 6 cm
N2b	Múltiples nódulos linfáticos ipsilaterales, ninguno > 6 cm
N2c	Nódulos linfáticos bilaterales o contralaterales ninguno > 6 cm
N3	Nódulo linfático de > 6 cm

Tabla V. Clasificación de TNM relativa a las metástasis a distancia

Categoría M	Metástasis a distancia
MX	No se puede asegurar su existencia
M0	Ausencia de metástasis
M1	Presencia de metástasis

Tabla VI. Clasificación por estadios

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

Otra clasificación de los tumores etmoidales, aunque menos difundida, es la propuesta por el INT (“Clasificación para los tumores malignos de etmoides del Instituto Nacional Italiano para la cura de los tumores”). Permite clasificar cualquier tumor etmoidal, independientemente de su histopatología (Tabla VII) ³⁸.

Tabla VII. Clasificación INT para tumores malignos de etmoides

Categoría T	Tumor primario de fosas nasales y seno etmoidal
T1	Tumor que envuelve el etmoides y la cavidad nasal, ocupa la mayoría de las celdas etmoidales superiores
T2	Tumor con extensión o erosión de la lámina cribosa con o sin erosión de la lámina papirácea y sin extensión dentro de la órbita
T3	Tumor que se extiende hacia la fosa craneal anterior sin extensión intradural, o que se extiende a dos tercios de la órbita, con o sin erosión de la pared anteroinferior del seno esfenoidal, y/o involucra el seno maxilar, y/o el seno frontal
T4	Tumor con invasión intradural, y/o que se extiende al ápex orbitario, seno esfenoidal, apófisis pterigoides, fosa infratemporal o piel.



1.2.7. Tratamiento

Actualmente hay dificultad para alcanzar un consenso acerca del tratamiento óptimo de los tumores malignos de FN y SP, por diversos motivos⁵: reducido número de pacientes, gran variedad histológica, complejidad anatómica de la región y frecuente morbilidad asociada a los tratamientos.

Sólo en los últimos años, las técnicas de cirugía y radioterapia avanzada han conseguido mejorar los resultados en el manejo de estos tumores¹.

La terapéutica de elección es la cirugía seguida de radioterapia postoperatoria¹. Es muy importante conseguir el control local de la enfermedad, por lo que debe realizarse la exéresis tumoral con márgenes de seguridad suficientes^{1,3}.

Existen varias tendencias dentro del tratamiento quirúrgico. Por un lado está la de hacer grandes resecciones, incluyendo la base del cráneo o la exenteración orbitaria, si se precisan. La otra consiste en realizar una cirugía más conservadora y menos agresiva, con la ventaja de generar menos morbilidad y mejorar la calidad de vida a los pacientes, aunque debe asociarse siempre a otras terapias complementarias como la radio y quimioterapia.

La técnica quirúrgica depende de la localización y extensión del tumor, así como de las posibilidades de reconstrucción. Existen diversos abordajes quirúrgicos^{1,16}: cirugía endoscópica nasal³⁹, rinotomía lateral, maxilectomía, abordaje craneofacial y subcraneal^{40, 41, 42}.

En algunas ocasiones la cirugía puede ser técnicamente posible, pero el pronóstico de la enfermedad es tan malo que se desaconseja. Así, se pueden considerar irresecables los tumores que invaden el seno cavernoso, ampliamente el cerebro o ambos nervios ópticos².

La radioterapia se utiliza la mayoría de las veces tras la cirugía, debido a que en los tumores avanzados hay escasa posibilidad de controlar con seguridad



los márgenes de resección. Algunos autores consideran que debe utilizarse siempre, al demostrar la presencia de nidos tumorales en la mucosa sana alejada del tumor^{43,44}. Aunque es muy discutible la radioterapia neoadyuvante podría indicarse en algunos casos seleccionados, previa a la cirugía, para reducir su agresividad.

La radioterapia administrada de forma aislada no logra buenos resultados, aunque sólo se aplica así en tumores avanzados, donde el pronóstico inicial ya es desfavorable¹. En el caso de tumores no resecables se indicaría de forma paliativa, valorando posteriormente la posibilidad de un rescate quirúrgico, si lo permite la disminución del volumen tumoral.

La presencia de adenopatías en los tumores malignos nasosinusales, como se ha dicho, es infrecuente e indica un pronóstico infausto². El tratamiento del cuello de manera profiláctica es controvertido, tanto con cirugía como con radioterapia.

La quimioterapia se emplea, en la actualidad, sólo con fines paliativos debido a los resultados desalentadores obtenidos. Diversos autores proponen el empleo de nuevos quimioterápicos, inhibidores selectivos de determinadas dianas moleculares⁴⁵. Los marcadores biológicos permitirían seleccionar los pacientes sensibles a determinados quimioterápicos y así reducir la toxicidad del tratamiento con fármacos ineficaces. Se plantea la posibilidad de emplear fármacos p53 independientes (taxanos)⁴⁶ e incluso anticuerpos monoclonales frente a EGFR⁴⁶. Algunos estudios avalan la utilización del desbridamiento quirúrgico y la utilización de 5-FU de forma tópica como una buena opción terapéutica para el tratamiento de los ACNS⁴⁷.

1.2.8. Pronóstico

El pronóstico de estos tumores es malo, con una supervivencia entre el 20-50% a los 5 años^{10,11}. Se han visto diferencias de supervivencia entre los ACNS



esporádicos (20-40% a los 5 años) y los de trabajadores de la madera (50%)^{8,48}, aunque este dato no está consensuado⁴.

La supervivencia es mayor en los ACNS tipo papilar y colónico que en los sólidos y mucinosos¹². Desciende del 80% al 25% según se pasa de categoría T1 a T4, reduciéndose al mínimo cuando hay invasión intracraneal.

La causa principal de mortalidad se debe a la recidiva local, incluso después de la cirugía de resección amplia, aparentemente resolutive, estando descritas recidivas múltiples^{8,45}. La recidiva local tiene un pronóstico ominoso cuando afecta la base de cráneo o la fosa craneal anterior y media.

Las metástasis linfáticas y a distancia son excepcionales pero condicionan un pronóstico ominoso. Incluso se han descrito casos con progresión a través del LCR⁴⁹. No debemos olvidar la posibilidad de desarrollar un segundo tumor primario en otras zonas de la mucosa expuestas al mismo carcinógeno. Este hecho se puede confundir con una recidiva local al no haber un límite anatómico bien definido¹¹.

1.3. Alteraciones genéticas en los adenocarcinomas nasosinuales

No se conoce aún con suficiente profundidad la carcinogénesis de los ACNS. Los estudios con hibridación genómica comparativa (“Comparative Genomic Hybridation” o CGH)^{50,51}, muestran frecuentes ganancias en las regiones cromosómicas 1q, 3p, 5p, 7q, 8q, 11q, 12p, 20q y 22, así como pérdidas en 4q31-qter, 5q11-qter, 8p23, 9p, 17p y 18q12-22. Las ganancias de 5p15 y 8q24 son igual de frecuentes en los tumores con escaso número de alteraciones como en aquellos que presentan alto número, lo que indicaría que los genes de estas regiones alteradas podrían jugar un papel importante en la carcinogénesis tumoral.



Aunque los ACNS tienen, al igual que los ACCR, frecuentes pérdidas en 8p y 18q y ganancias en 8q y 20q, las alteraciones en los cromosomas 3 y 5, muy frecuentes en los ACNS, son casi inexistentes en los ACCR^{50,51}.

Los CENS presentan pérdidas en 3p y ganancias en 11q13, siendo éstas poco frecuentes en los ACNS⁷.

En los CENS las amplificaciones de *EGFR* (11%) y ganancias de *HER2* en relación con metástasis ganglionares, invasión local (orbitaria y craneal) y recidivas precoces, como fue descrito por nuestro grupo⁷.

Otras alteraciones cromosómicas descritas en los ACNS tipo ITAC, mediante microarray-CGH (m-CGH), son las ganancias en las regiones 5p15, 20q13 y 8q24 y las pérdidas en 4q31-qter, 5q 11-qter, 8p 12-pter y 18q 12-22⁵².

Todas estas alteraciones descritas indican que los ACNS poseen un patrón propio de ganancias y pérdidas cromosómicas que los diferencia de los CENS y de los ACCR, a pesar de la semejanza histológica con estos últimos.

Esta similitud histopatológica ha condicionado que la mayoría de los genes estudiados en los ACNS se hayan escogido por su implicación con el desarrollo de los ACCR. Sin embargo, las mutaciones de *K-ras* en ACNS oscilan entre el 0-15%, siendo más altas en los ACCR donde alcanzan el 50%^{53,54}. En el caso de *TP53*, las mutaciones observadas en ACNS oscilan entre el 18-44%, frente al 75% que presentan los ACCR^{55,56}. Estos datos génicos discrepantes apoyan lo mencionado anteriormente a nivel cromosómico.

La inestabilidad de microsatélites tiene importancia en la carcinogénesis solo en el 10% de los ACCR. Esta inestabilidad se origina por mutaciones y/o deleciones en los genes de reparación de apareamientos erróneos del ADN (MMR, "mismatch repair"). Los ACCR con inestabilidad de microsatélites presentan pocas alteraciones cromosómicas y suelen ser diploides⁵⁷. Estas características son similares a las que presentan los ACNS, donde no se ha visto



inestabilidad de microsatélites ni mutaciones en *APC*, *CTNNB1* y varios genes del sistema MMR⁵⁸.

Otros estudios génicos de interés son los realizados por nuestro grupo, mediante MLPA, en ACNS. Observamos ganancias en los genes *PTP4A3* y *PDCD8* (60%), *TNFRSF7* (50%), *RECQL4* y *LMO2* (45%) y pérdidas en *BCL2* (70%), *IL13* (55%), *ABCB1* y *RB1* (50%), *PIK3CA* y *CDH1* (45%)⁵⁹.

Como ya se ha comentado, las alteraciones cromosómicas y génicas descritas nos señalan que aunque los ACNS y ACCR tienen gran parecido histopatológico y presentan alteraciones genéticas similares, otras en cambio son marcadamente diferentes. Algunos autores sugieren que pudiera tratarse de diferencias relacionadas con la distinta localización tumoral y distintos factores epidemiológicos y etiológicos.

1.4. Ruta Wnt en adenocarcinomas

La ruta Wnt debe su nombre a que el primer organismo en el que se estudio fue la mosca *Drosophila melanogaster*, describiendo en ella la proteína “wingless” que ocasionaba el crecimiento de sus alas al inducir la proliferación celular.

La ruta Wnt fue descrita por primera vez como una de las vías patogénicas más importantes para el desarrollo del ACCR, siendo la otra vía descrita la inestabilidad de microsatélites^{60,61}. Es posible que dada la similar histopatología entre los ACNS y los ACCR, ambos tumores compartan las mismas vías de cancerización.

Los estudios moleculares previos parecen descartar la existencia de inestabilidad de microsatélites en los ACNS⁶².

La ruta Wnt tiene dos vías principales de señalización, la vía canónica implicada en la diferenciación celular, y la vía no canónica implicada en el control



de la polaridad y movilidad celular. La vía canónica Wnt se encuentra fisiológicamente activada durante la embriogénesis y la hipoxia, contribuyendo a la angiogénesis^{63,64,65}. Se considera que esta acción de regular la homeostasis en las células adultas es fruto de la activación de la vía a nivel de las células pluripotenciales⁶⁶ y se ha descrito también su importancia en el desarrollo neural⁶⁷. La vía canónica Wnt se encuentra también activada en los procesos inflamatorios crónicos, que podrían estar relacionados con la génesis de los ACNS y ACCR.

Las señales procedentes de la vía canónica Wnt son traducidas a receptores de la familia Frizzled y a receptores LRP5/LRP6, los cuales actúan como co-receptores de la cascada de señalización de la β -catenina. La **β -catenina** es una proteína codificada por el gen *CTNNB1*, localizado en el cromosoma 3p22, que se encuentra implicado en la adhesividad y polaridad celular, así como en la transcripción de varios genes. En ausencia de señal Wnt la β -catenina se une a APC y Axina, siendo fosforilados por la casein quinasa I α (CKI α) y por la glucógeno sintetinaquinasa 3 β (GSK3 β), para ser poliubiquitinizados por β TRCP1 y β TRCP2 y degradados en el proteosoma^{63,68}. (Figura 3).

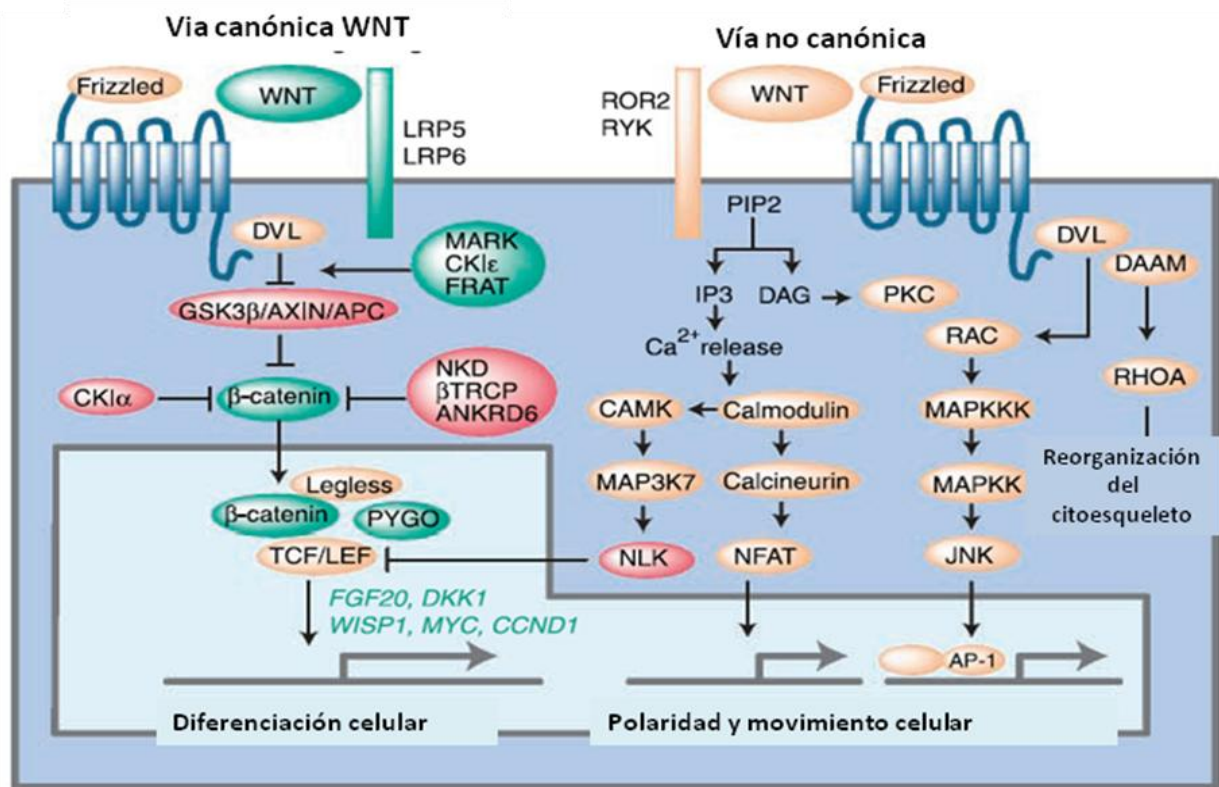


Figura 3. Ruta Wnt/ β -catenina

Cuando la vía canónica Wnt se encuentra activada, $CKI\alpha$ fosforila la proteína Dishevelled (DVL), la cual gana afinidad por la proteína Frizzled (FZD) y de forma secundaria se forma un complejo con LRP5/6-Axina, dando como resultado la no fosforilación de la β -catenina, que se acumula a nivel citoplasmático y nuclear. La β -catenina a nivel nuclear se une al factor de células T/factor de desarrollo linfóide (TCF/LEF) y Legless-Pygo para ser los efectores de esta vía canónica de Wnt y transcribir genes como *MYC*, *CCND1*, *FGF20*, *DKK1*, *WISP1*⁶³.

El porcentaje de activación de la ruta Wnt en los ACCR varía dependiendo de la génesis del tumor, ya que los ACCR esporádicos presentan una tinción nuclear de β -catenina del 81%, mientras que en los tumores derivados de la colitis ulcerosa los porcentajes de tinciones nucleares positivas para β -catenina descienden al 48%⁶⁹.



El gen *APC* se localiza en 5q21 y es uno de los genes clave en el funcionamiento de la ruta Wnt. Se cree que la hipótesis de “los dos hits”, que explica la pérdida de función proteica en genes supresores de tumores por una mutación bialélica, no es suficiente para explicar la pérdida de función de *APC* ya que las proteínas mutadas de *APC* retienen cierto grado de función. Además, muchos ACCR tienen poliploidías que harían necesario la mutación en más de dos copias⁷⁰.

La pérdida de función de *APC* es uno de los eventos más tempranos en la formación de adenomas colónicos (tumor benigno precursor de carcinoma). Este gen también contribuye a la migración y adherencia celular, codificando una proteína que se une a los fascículos de microtúbulos⁷¹. Una función importante de la proteína APC es inhibir la β -catenina. En ausencia de la señalización Wnt, APC produce la degradación de β -catenina impidiendo su acumulación en el citoplasma, evitando así que llegue al núcleo. La inactivación del gen *APC* fragmenta el complejo y aumenta los niveles celulares de β -catenina que, a su vez, se traslada al núcleo⁷².

Con la pérdida de *APC*, la célula se comporta como si tuviera una señalización continua de Wnt y existiera un exceso de β -catenina libre. La importancia de la vía de señalización APC/ β -catenina es evidente en los ACCR, donde el 80% de los tumores esporádicos tienen inactivada la proteína APC. El 50% de los cánceres sin mutación *APC* tienen mutaciones de *CTNNB1*. La β -catenina mutada no es inhibida por APC y migra al núcleo. La presencia de β -catenina nuclear se observa en los adenomas de colon con displasia moderada, sugiriendo que su acumulación en el núcleo se produce en un estadio inicial de la carcinogénesis (Figura 4) ⁷³. La pérdida de la expresión de APC también ha sido detectada en cáncer de mama en el 36-50% de los casos⁷⁴.

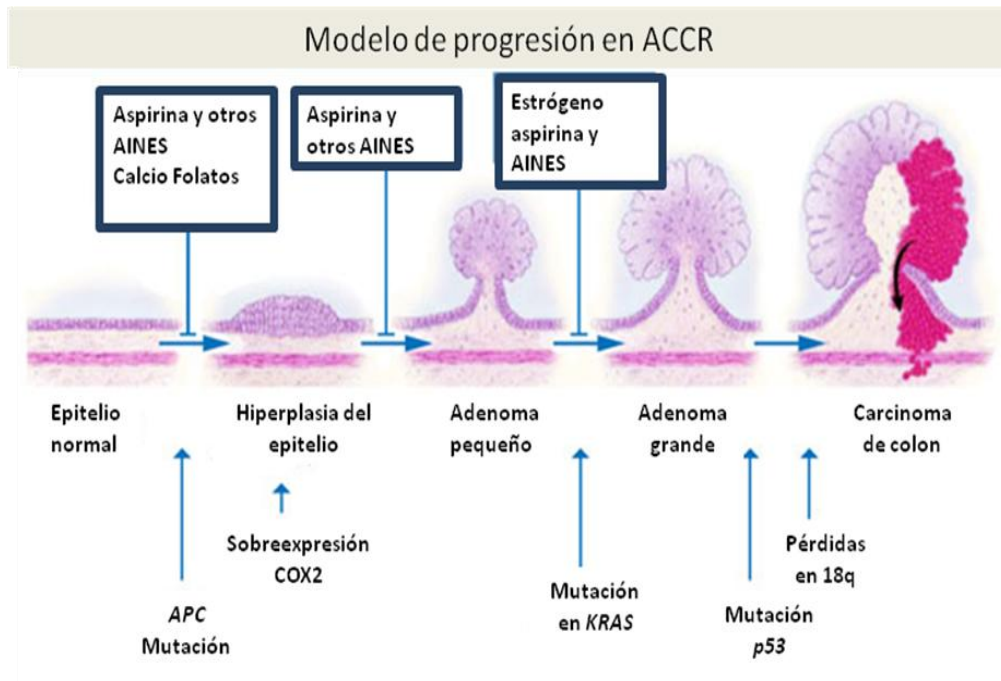


Figura 4. Modelo de progresión tumoral de los ACCR donde se observa que la mutación de *APC* acontece en estadios tempranos y como la administración de diversos medicamentos podría frenar la progresión.

E2F1 es uno de los puntos de control de la vía canónica Wnt sobre la transcripción de β -catenina/TCF-LEF en las células humanas⁷⁵. Esta última acción se lleva a cabo mediante la activación de los genes *AXIN1*, *AXIN2* y *SIAH1*. Se considera que la acción de *E2F1* debe estar inhibida en los ACCR para que se desarrolle de forma completa la actividad oncogénica de la β -catenina (Figura 5). *E2F1* controla la actividad de la β -catenina de manera independiente de APC y GSK3 y su activación contribuye a la apoptosis celular.

CDK8 es un gen que controla tanto de forma directa como indirecta la actividad de la transcripción de la β -catenina. Se considera que la forma directa es la más importante, siendo capaz de aumentar la transcripción del complejo β -catenina/TCF-LEF en células humanas⁷⁵. Su acción indirecta consiste en inhibir *E2F1*.

RB es un gen supresor de tumores que se encuentra inactivado o mutado en alrededor del 30% de los cánceres humanos, pero curiosamente en ACCR no se encuentra alterado y en muchos casos incluso está sobreexpresado^{76,77}. Se considera que en los ACCR el gen *RB* actúa como oncogén al inhibir mediante pRB a E2F1 y de esta forma promover la transcripción de la β -catenina (Figura 5)⁷⁸.

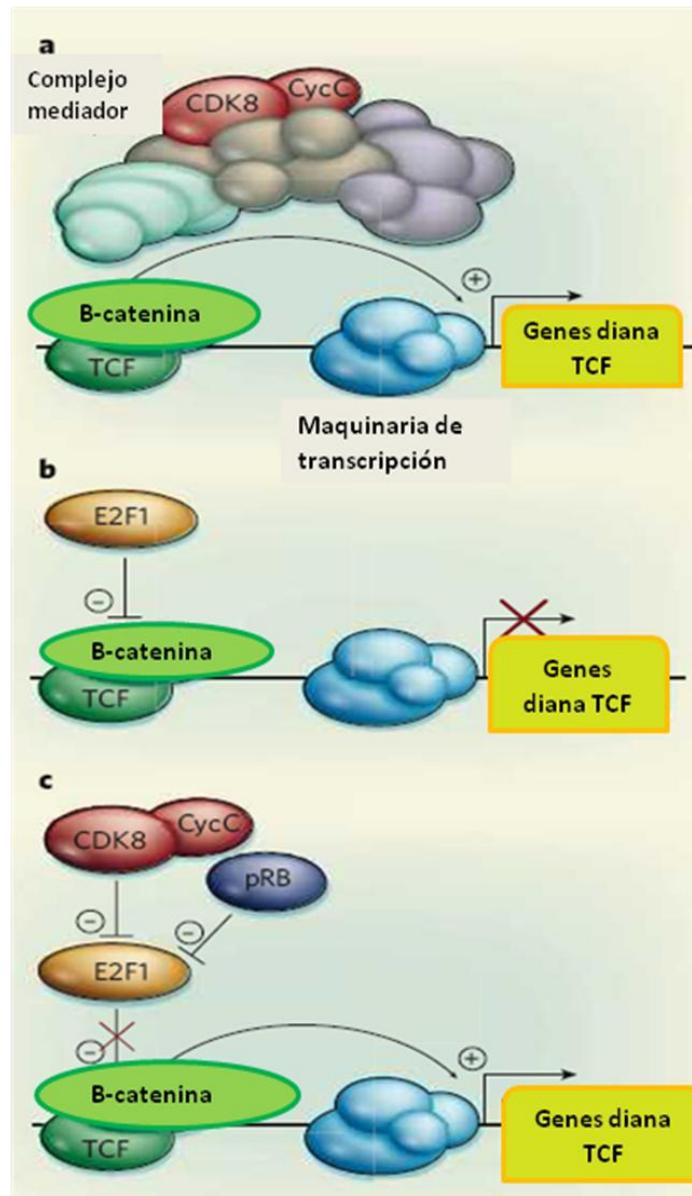


Figura 5. Mecanismos de regulación de la transcripción de β -catenina. a) Activación directa de la transcripción por CDK8. b) Inactivación de la transcripción de β -catenina por E2F1. c) Inactivación de E2F1 por CDK8 y pRB, promoviendo de forma indirecta la transcripción de los genes por parte de la β -catenina. (Tomado de ⁷⁸).



La **E-cadherina** no está involucrada en la vía canónica de Wnt, pero se encuentra íntimamente relacionada con la función de la β -catenina. La E-cadherina es codificada por el gen *CDH1* ubicado en el cromosoma 16q22.1. Esta proteína se une a la β -catenina actuando como una proteína de superficie celular que mantiene la adhesividad intercelular. La adhesividad reducida de las células cancerosas puede ser el resultado de defectos en el eje cadherina-catenina. Los defectos de adhesividad celular de la β -catenina son independientes de su papel como factor de transcripción.

La disminución en la expresión de E-cadherina en la superficie celular se ha descrito en muchos cánceres como esófago, mama, ovario, próstata y colon. La pérdida de expresión favorece la disgregación celular y las metástasis. La expresión reducida de E-cadherina puede ser un efecto secundario de la mutación del gen *CTNNB1*, y su proteína, la β -catenina, se uniría a la porción intracelular de las cadherinas favoreciendo su estabilidad.

Al contrario que en los ACCR, en los ACNS se han realizado pocos estudios de expresión IHQ de proteínas relacionadas con la ruta Wnt. En uno de ellos se estudia la β -catenina en 10 ACNS concluyendo que, a diferencia de los ACCR, la tinción de membrana es normal, sin acumulación citoplasmática o nuclear anómala⁷⁹. No obstante, otros autores observan sobreexpresión de β -catenina en la membrana plasmática, citoplasma y núcleo en el 40% de los casos⁵⁸.

Otra de las proteínas que se ha visto implicada en la vía canónica Wnt es **p16**. Esta proteína es un importante supresor de tumores y está codificada por el gen *CDKN2A*, localizado en el cromosoma 9p21. La transcripción producida por la activación de la vía Wnt/ β -catenina suprime la actividad de p16 y contribuye a la progresión tumoral en melanomas⁸⁰.

El reciente descubrimiento del papel de la vía de la Wnt/ β -catenina en un número creciente de neoplasias es un argumento a favor de la investigación de



alguna diana terapéutica encaminada a disminuir la transcripción nuclear de la β -catenina^{81, 82}. Existen dos grupos de fármacos con acción anti Wnt/ β -catenina: los inhibidores tipo moléculas pequeñas (AINES y el antagonista de CBP/ β -catenina ICG-001) y los inhibidores biológicos (anticuerpos, ARN de interferencia, proteínas recombinantes)⁸³. La mayoría de los estudios con estos fármacos se encuentran en la fase preclínica, con excepción de Celecoxib que ha demostrado una inhibición de la vía canónica mediante la degradación de TCFs^{84, 85,86}.

1.5. Modelo teórico

En este modelo simplificamos y resumimos de forma racional los pasos más importantes de la vía canónica Wnt, incluyendo los genes y proteínas con mayor interés en dicha vía, así como su efecto facilitador o inhibidor (Figura 6). Sobre este modelo teórico sentaremos las bases para formular nuestras hipótesis y ordenaremos buena parte de los resultados obtenidos.

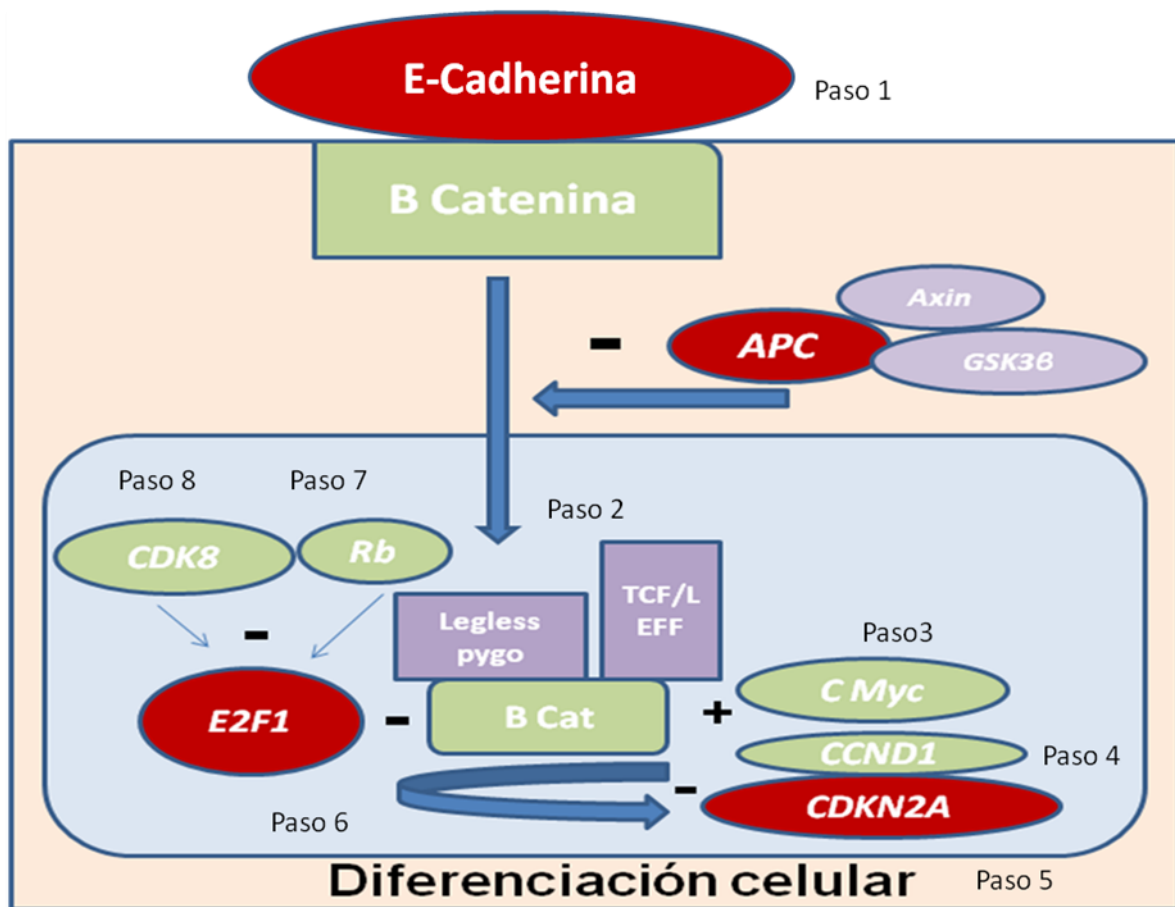


Figura 6. Modelo teórico de la activación de la ruta Wnt en ACNS. Los genes y proteínas que actúan como oncogenes se representan en verde, los genes y proteínas que actúan como supresores en rojo y las proteínas no estudiadas en violeta. Paso 1: interacción entre E-cadherina y β -catenina de membrana (si una es + la otra debe ser +). Paso 2: relación entre la expresión de membrana y nuclear de β -catenina (si una -, la otra +). Paso 3: transcripción nuclear de C-Myc por β -catenina (si β -catenina nuclear +, C-Myc +). Paso 4: transcripción nuclear de *CCND1* por β -catenina (si β -catenina nuclear +, ciclina D1 +). Paso 5: regulación de la transcripción de *CDKN2A* por la β -catenina (si β -catenina nuclear +, p16 -). Paso 6: control de la expresión nuclear de β -catenina por E2F1 (si E2F1+, β -catenina nuclear -). Paso 7: control de la expresión de E2F1 por Rb (si Rb +, E2F1 -). Paso 8: control de E2F1 por CDK8 (si CDK8 +, E2F1 -).





2. HIPÓTESIS



Los ACNS presentan un patrón histológico similar a los ACCR y podrían compartir una etiología común como puede ser la inflamación crónica. A nivel genético-molecular la ruta Wnt es una de las más estudiadas e implicadas en la carcinogénesis de los ACCR. Por lo tanto, parece interesante conocer el grado de participación de la ruta Wnt en los ACNS.

Si pudiésemos determinar los patrones genético-moleculares en los genes y proteínas de la vía canónica de la ruta Wnt en los ACNS, nos podrían servir para establecer con mayor solidez el grado de similitud o diferencia con los ACCR.

Una vez establecido un grado alto de similitud genético-molecular entre ambas localizaciones tumorales, podríamos utilizar los avances diagnósticos y terapéuticos obtenidos hasta la fecha en tumores muy frecuentes y ampliamente estudiados, como son los ACCR, y poder aplicarlos en tumores poco frecuentes, de distinta localización y menos investigados, pero con alta mortalidad, como son los ACNS.



3. OBJETIVOS



1. Describir los aspectos clínicos más importantes de nuestra serie de ACNS tipo ITAC.
2. Analizar las alteraciones genético-moleculares relacionadas con la ruta Wnt en los ACNS, tanto a nivel génico (*CDH1*, *CTNNB1*, *E2F1*, *CCND1*, *RB*, *APC*, *CDK8*, *CDKN2A* y *MYC*), como de expresión proteica (E-cadherina, β -catenina, E2F1, Ciclina D1, pRB, CDK8, p16 y C-Myc), por medio de m-CGH, MLPA, MLPA-MS e IHQ (tissue array).
3. Determinar si los cambios genético moleculares, en particular los de expresión proteica, son concordantes con lo esperado si la ruta Wnt estuviese activada en los ACNS.
4. Relacionar las alteraciones genético-moleculares encontradas en la ruta Wnt con los datos clínico-patológicos y la supervivencia de los pacientes.
5. Comparar las alteraciones genético-moleculares observadas en los ACNS con las descritas en los ACCR.



4. MATERIAL Y MÉTODO



4.1. Selección de pacientes. Diseño del estudio

Se estudiaron un total de 101 pacientes con ACNS, todos ellos tratados en el Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA). Los pacientes habían sido diagnosticados en dicho centro o en otros, de donde decidieron el traslado al HUCA para su tratamiento.

Todos los pacientes fueron intervenidos quirúrgicamente con fines curativos entre 1.981 y 2.008, decidiendo entonces, dependiendo del estadio tumoral y del resultado de la cirugía, la necesidad o no de recibir tratamiento complementario con radio o quimioterapia. Ningún caso fue tratado con radio o quimioterapia preoperatoria antes de obtener las muestras tisulares. El seguimiento medio de los pacientes fue de 46 meses con un rango de 5 a 252 meses.

Todos los pacientes tenían un historial clínico completo en el HUCA, así como un estudio histopatológico que confirmaba el diagnóstico de ACNS tipo ITAC. En todos los pacientes se disponía de material anatomopatológico suficiente para realizar alguno de los estudios genéticos o de expresión, según se expone posteriormente en el apartado 4.2.

El estudio realizado era de tipo experimental, retrospectivo, con incorporación sucesiva de nuevos casos según se iban diagnosticando. La extracción del ADN se hizo de forma paulatina hasta que se cerró el estudio en marzo del 2.010 con el total comentado de 101 pacientes.

El número de casos incluidos en cada uno de los procedimientos realizados dependió de diversas circunstancias como eran el momento de incorporación al estudio, la cantidad y calidad de la muestra y la prioridad establecida entre las diversas técnicas. Al final, se realizaron todos los

procedimientos descritos a 23 pacientes, mientras que los 78 restantes tenían realizados 1, 2 ó 3 experimentos, según se detalla en la tabla VIII.

Tabla VIII. Distribución de los pacientes en las distintas técnicas realizadas

Técnica de estudio				Total	
m-CGH	MLPA	MLPA-MS	TA	23	
m-CGH	MLPA	MLPA-MS		7	
m-CGH	MLPA		TA	5	
		MLPA-MS	TA	14	
	MLPA		TA	5	
	MLPA	MLPA-MS	TA	1	
	MLPA	MLPA-MS		1	
			TA	44	
		MLPA-MS		1	
Total	35	42	47	92	101

m-CGH: microarrays CGH; MLPA: Amplificación múltiple de sondas dependientes de ligación;

MLPA-MS: Metilación mediante amplificación múltiple de sondas dependientes de ligación;

TA: "Tissue arrays".

4.2. Recogida de muestras

Las muestras estudiadas procedían de 101 ACNS primarios tipo ITAC. Las muestras del tumor fueron obtenidas de dos maneras:

1- Muestra en fresco. Se obtuvo tejido tumoral en 57 pacientes durante las intervenciones quirúrgicas. Esta muestra tumoral tenía un tamaño mínimo de 3 mm³ y procedía de una zona sin necrosis, evitando el tejido sano de los bordes, con el fin de alcanzar un mínimo del 70% de pureza en células tumorales. Una vez

extraída se almacenó en RNA-later y posteriormente fue congelada a -80°C . Se consiguieron 124 muestras en fresco procedentes de los tumores de estos 57 casos.

2- Muestra en parafina. Se obtuvo en 92 casos de los bloques de tejido parafinado, una vez procesada la pieza para su estudio histopatológico en el Servicio de Anatomía Patológica del HUCA. Para determinar el tejido tumoral en el bloque, se hizo un corte de $5\ \mu$ para tinción con hematoxilina-eosina que, observado al microscopio óptico, permitió marcar en el porta la zona tumoral y seleccionarla en los cortes posteriores, evitando la necrosis y el tejido sano peritumoral.

En 48 pacientes se obtuvieron dos tipos de muestra, la del ADN tumoral (fresco) utilizada para el estudio del número de copias de los genes y la de los bloques de parafina, que empleamos en el estudio de expresión proteica.

Todas las muestras obtenidas, tanto en fresco como en parafina, fueron utilizadas para los estudios genéticos: microarray-CGH (m-CGH) (35), MLPA (42), MLPA-MS (47), y de expresión: "tissue array" (TA) y tinción IHQ (92)(Tabla IX). Las muestras control para la realización de la MLPA se obtuvieron de la sangre periférica de seis individuos sanos.

Tabla IX. Diferentes muestras utilizadas para la realización de los experimentos

Técnica	m-CGH	MLPA	MLPA-MS	TA	TOTAL
Tipo de tejido					
Fresco	35	42	47	0	124
Parafina	0	0	0	92	92



4.2.1. *Extracción de ADN*

El ADN tumoral se obtuvo a partir del tejido fresco de las 124 muestras. Los protocolos de extracción de ADN para todas las muestras se realizaron en base al uso de columnas de afinidad (QIAamp®, QIAgen, Valencia, CA, USA).

Las muestras tumorales para MLPA y m-CGH se descongelan a temperatura ambiente en una placa de Petri y, con ayuda de dos bisturís, se disgregan mecánicamente, cortándolas en pequeños fragmentos que son depositados en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL.

A continuación se realiza el lisado añadiendo 200 μ L del tampón de lisis ATL y 20 μ L de proteinasa K (concentración de almacenamiento: 10mg/mL). Se mezcla bien en un agitador y se deja incubando a 56°C en una placa térmica con agitación. Por la tarde se vuelven a añadir otros 20 μ L de proteinasa K, se mezcla bien y se deja incubando a 56°C toda la noche.

A la mañana siguiente se añaden 200 μ L de tampón AL, se agita enérgicamente y se incuba a 70°C durante 10 minutos. A continuación se añaden 200 μ L de etanol absoluto y se agita enérgicamente durante 15 segundos para precipitar el ADN. Posteriormente se aplica el contenido del tubo de microcentrífuga a una columna de afinidad (QIAamp®) que se coloca en un tubo de recolección de 2 mL. La columna y el tubo de recolección se centrifugan durante 1 minuto a 8.000 rpm y el filtrado es eliminado. Se procede a la purificación del ADN añadiendo sobre la columna 500 μ L del tampón AW1, centrifugando a 8.000 rpm durante 1 minuto. Tras eliminar el filtrado se continúa con un segundo lavado añadiendo a la columna 500 μ L del tampón AW2 y centrifugando a 14.000 rpm durante 3 minutos. Finalmente, se coloca la columna de afinidad en un nuevo tubo de microcentrífuga y se añaden 200 μ L de agua destilada para diluir el ADN de la columna. Se incuba durante 1 minuto y se centrifuga 1 minuto a 8.000 rpm.



La concentración y la pureza del ADN obtenido se determinan midiendo su absorbancia a 260 nm y a 280 nm en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (versión 3.1.0), (NanoDrop Technologies Inc.). La absorbancia a 260 nm nos indica la concentración de ADN que tenemos en nuestra muestra y la relación A260/A280 el grado de pureza de la muestra. Se consideran aceptables purezas con valores mayores de 1,5 (óptimo 1,7-1,9).

Mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% se puede comprobar que la extracción de ADN ha sido correcta y que no hay presencia de ARN.

4.3. Microarray de CGH

4.3.1. *Fundamento de la técnica*

Es una técnica desarrollada en los años noventa⁸⁷ que, en la actualidad, está muy difundida en los laboratorios de citogenética. Con ella se puede analizar en un sólo experimento todo el genoma del tumor y conocer las pérdidas, ganancias o amplificaciones del material cromosómico. La posibilidad de utilizar ADN procedente de tejido fresco o congelado, así como del incluido en parafina, ha favorecido que diferentes tipos de tumores sólidos puedan ser estudiados con este procedimiento⁸⁸.

En los “microarray-CGH”(m-CGH) el molde sobre el que compiten los ADNs, marcados con fluorescencia o radioactividad, no son metafases normales, sino una formación de clones conocidos de ADN de doble cadena: cDNA (ADN monocatenario, complementario al ARNm que contiene la secuencia codificante de un gen) o secuencias cortas de nucleótidos (oligonucleótidos) (“array”)⁸⁹. En todos los casos el material genético que se dispone en el “array” se refiere a un gen de situación y características conocidas, siendo la información generada la que corresponde a ese gen en la muestra analizada⁹⁰. Los m-CGH más extendidos y utilizados son los dos tipos mencionados (cDNA y oligos) y los experimentos en

los que se utilizan son, casi exclusivamente, estudios de análisis masivo o global de la expresión genética^{91,92,93,94}.

La resolución de esta técnica puede llegar e incluso superar los 0,5 Mpb y el análisis final no requiere del cariotipado, como ocurría con la CGH convencional.

El patrón de hibridación se revela con un escáner basado en microscopía confocal, siendo la imagen resultante convertida a valores numéricos. El nivel de expresión de un gen se reflejaría en el número de copias de ADN o de ARNm presentes en la muestra problema, según el tipo utilizado, siendo proporcional al nivel de señal detectado⁹⁵.

Por medio de los m-CGH se combina la tecnología de los “array” con la CGH, realizando la hibridación sobre segmentos de ADN de menor tamaño, clonados en forma de “Cromosomas Artificiales Bacterianos” o “Plasmídicos” (BAC o PAC, respectivamente). El nivel de resolución pasa, por tanto, de cromosómico a bacteriano o subcromosómico (150 Kb). Los segmentos de ADN estudiados son secuencias conocidas y localizadas según los datos previos del Proyecto Genoma Humano. Los primeros “array” usados tenían alrededor de 3.000 BAC por Mbp cubriendo el genoma con una resolución de un BAC por Mbp⁹⁶.

Actualmente, mediante m-CGH, como los que se han empleado en este trabajo, se estudian casi 30.000 genes, prácticamente la totalidad de los descritos en el genoma humano^{97, 98}.

4.3.2. Pasos del experimento

Los m-CGH se realizaron según la técnica descrita por Carvalho y cols⁸⁷ y reproducida posteriormente por Hermsen et al⁵². La muestra y el control de ADN se marcaron de forma diferente. Se hibridaron 300 ng de cada ADN con un 30K array (60-mer oligo's, diseñados por Compugen y sintetizados por Sigma-Genosys), impresos en portas activados de Codelink (Amersham).

Este “array” contiene 29.134 oligonucleótidos que representan unos 28.830 genes diferentes. La hibridación se realizó en dos noches en una cámara de hibridación especializada (Perkin Elmer HybArray 12™). Las imágenes fueron obtenidas usando un “Agilent DNA Microarray Scanner”.

La extracción de los datos y el análisis cuantitativo se realizaron por “BlueFuse” (BlueGnome, Cambridge, UK). “BlueFuse” es un programa que alinea sobre plantilla los “spots”, además de calcular la intensidad de las señales rojo/verde, y el cociente entre ambas. También evalúa desperfectos en los “spots” y da un valor p de confianza. Valores <0,10 no se usan en la interpretación (Figura 7).

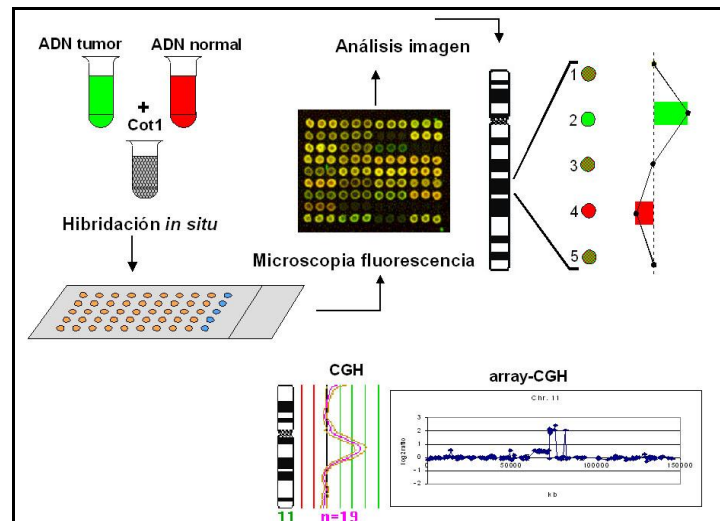


Figura 7. Esquema de la técnica de m-CGH

El ADN control de mujer sirvió de referencia y control de calidad. Debido a que todos los tumores provienen de hombres, los clones X normalmente mostraron pérdidas, mientras que los clones de Y siempre mostraron importantes ganancias.

4.3.3. Interpretación de datos

Se realizó una normalización estadística de los índices calculados a partir de la media de todos los índices. Los gráficos se hicieron con una media variable de

log₂ de índices de 5 clones vecinos. Las ganancias y las pérdidas se definieron como desviaciones de 0,2 ó más del log₂ de índices=0. Se consideró amplificación cuando al menos dos clones vecinos alcanzaban un log₂ índice de 1,0 ó mayor (Figura 8).

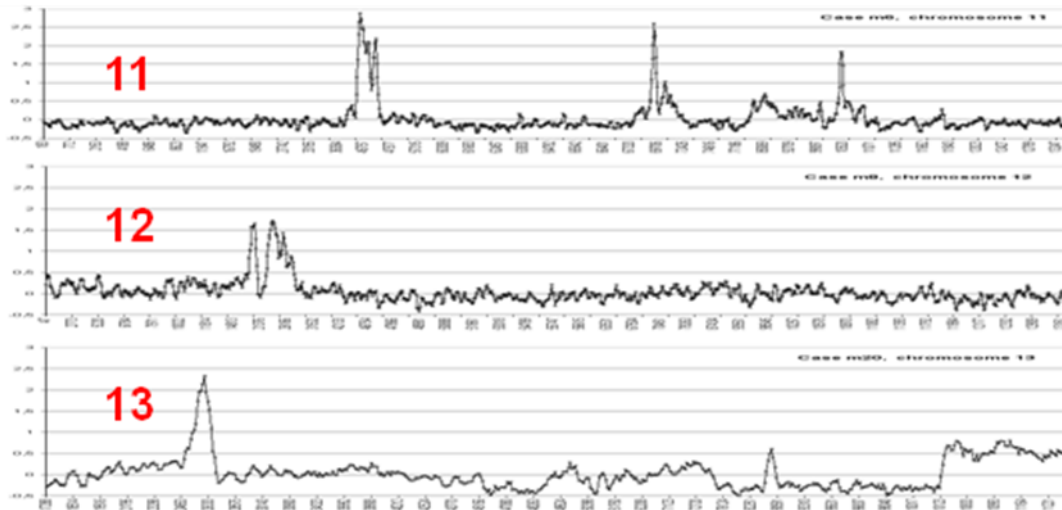


Figura 8. Representación gráfica de un m-CGH donde se muestran los picos de ganancias en los cromosomas 11,12 y 13

En este proyecto hemos seguido la metodología utilizada en esos experimentos para localizar la posición específica de cada gen y cuantificar el número de copias.

4.4. MLPA

4.4.1. Fundamento de la técnica

La MLPA (“Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification”) es una técnica de biología molecular, relativamente reciente, descrita por Schouten ⁹⁹ que permite amplificar, en un único experimento, hasta 42 secuencias distintas de ADN o ARNm (www.mlpa.com).

Ha sido utilizada de forma exitosa para detectar deleciones y amplificaciones de exones completos en genes tan relevantes como *BRCA1*, *MSH2*



y *MLH1* o en trisomías como la del cromosoma 21, caracterizar aberraciones cromosómicas mediante ganancias y pérdidas génicas y cuantificar el ARN mensajero.

Para su realización es necesario disponer de una cantidad mínima de ácido nucleico a estudio (≥ 20 ng), un “kit” de oligonucleótidos complementarios a las secuencias diana del ADN problema, un termociclador para amplificar mediante PCR (“Polymerase Chain Reaction”) las sondas hibridadas y un método de electroforesis en gel o capilar, para separar e identificar los productos amplificados según sus diferentes tamaños.

La selección de sondas depende del tipo tumoral y existen diversos “kits” comercializados. Por ello una de las limitaciones de esta técnica es que no dispone de sondas específicas para cada tipo tumoral, si bien es cierto que podrían diseñarse a demanda.

En la MLPA destacan dos peculiaridades:

1. Para reconocer las secuencias diana del ADN estudio se emplean dos oligonucleótidos que hibridan en regiones adyacentes, para posteriormente unirse por acción de un enzima específico (ligasa termoestable), formando una cadena única, pudiendo entonces ser amplificada mediante PCR.
2. Como todas las sondas cuentan con secuencias idénticas de bases en sus extremos 3' y 5', basta una pareja única de “primers” para su amplificación simultánea.

Es necesario precisar que no se amplifican las secuencias diana del ADN estudio, sino las sondas empleadas para su detección. Cada sonda se constituye por una secuencia de 50-70 nucleótidos, que es la que participa directamente en la hibridación; y por otra “no hibridante”, de longitud variable, diseñada para que los productos amplificados no coincidan en tamaño, dentro de un rango entre 130-

482 pares de bases (pb). De ese modo puedan separarse e identificarse mediante técnicas de electroforesis (Figura 9).

Finalmente, tras analizar los productos de la reacción mediante un software informático, se obtiene un perfil en el que cada producto amplificado genera un pico de fluorescencia, cuya área es proporcional al número de copias de esa secuencia presentes en el ADN estudio.

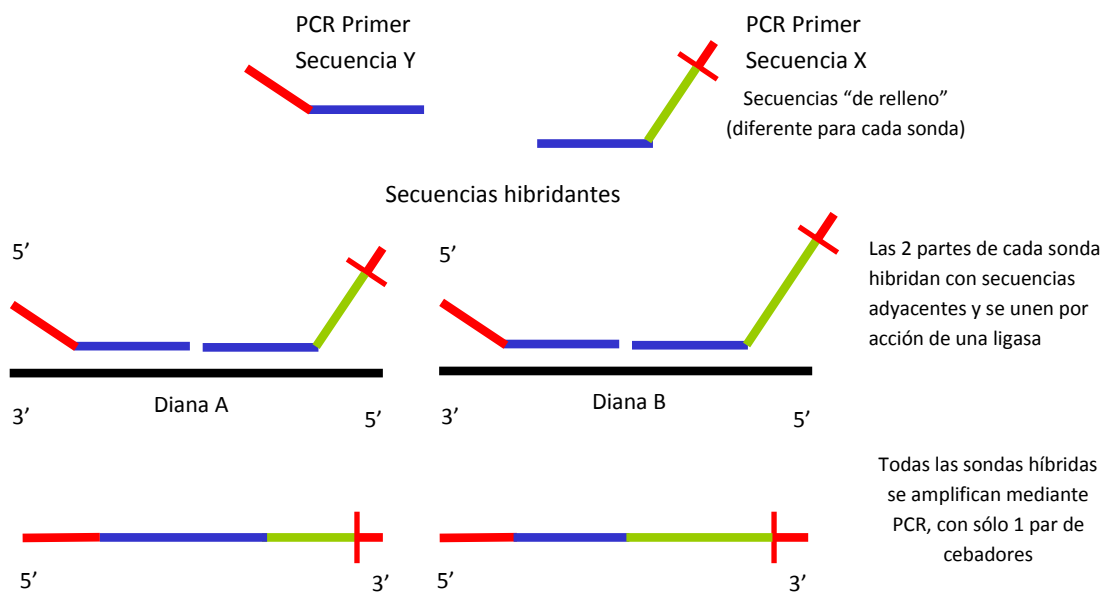


Figura 9. Bases moleculares de la MLPA

4.4.2. Tipos de sondas

Las mezclas de sondas empleadas se integran en los "kits": "SALSA P084 HNSCC-1" y "SALSA P005 MLPA", junto con sus correspondientes tampones y enzimas (MRC-Holland, Amsterdam, Holanda). Ente las dos pueden estudiar en total 59 genes, aunque este trabajo está centrado en los genes implicados en la ruta Wnt, por lo que sólo se describirán los resultados relacionados con los genes *CTNNB1*, *CDH1*, *RB*, *MYC* y *CCND1*.

“SALSA P084 HNSCC-1” fue utilizada para estudiar los genes *CTNNB1* (β -catenina), *CCND1* (Ciclina D1) y *RB* (pRB), mientras que “SALSA P005 MLPA” sirvió para estudiar *CDH1* (E-cadherina) y *MYC* (C-Myc).

“SALSA P084” incluye 38 sondas de genes (Tabla X). En la tabla XI se muestran las 41 sondas de “SALSA P005”. Ambos “kits” son específicos para el estudio de CECC.

Como ya se ha comentado existen comercializadas mezclas de sondas según el tumor que se quiera estudiar, o se pueden diseñar “a la carta”, pero no hay un “kit” específico para adenocarcinomas^{99,100}.

Tabla X. Descripción de las 38 sondas de “SALSA P084”. Longitud de los fragmentos, nombre de los genes, posición y localización cromosómica.

Longitud	Gen	Posición cromosómica (kb)	Cromosoma
472	<i>NRAS</i>	01-114.1	01p13.2
283	<i>LMNA</i>	01-151.9	01q21.2
256	<i>IL1A</i>	02-111.4	02q14
220	<i>TANK</i>	02-160.6	02q24
154	<i>MLH1</i>	03-036.3	03p22.1
337	<i>MLH1</i>	03-036.3	03p22.1
454	<i>CTNNB1</i>	03-040.5	03p22
166	<i>CASP6</i>	04-110.9	04q25
373	<i>IL2</i>	04-123.7	04q26
481	<i>MFHAS1</i>	08-008.7	08p23.1
130	<i>CTSB</i>	08-011.7	08p22
184	<i>N33</i>	08-015.5	08p22
445	<i>PTP4A3</i>	08-142.4	08q24.3
418	<i>RECQL4</i>	08-145.8	08q24.3
202	<i>CDKN2A</i>	09-022.2	09p21
364	<i>AI651963</i>	10-010.9	10p14
463	<i>RENT2</i>	10-012.0	10p14
292	<i>CCND1</i>	11-071.1	11q13
229	<i>EMS1</i>	11-071.8	11q13
310	<i>IL18</i>	11-113.5	11q23.1
238	<i>IGSF4</i>	11-116.7	11q23

Longitud	Gen	Posición cromosómica (kb)	Cromosoma
355	<i>BRCA2</i>	13-026.9	13q12.3
328	<i>RB</i>	13-043.0	13q14.2
148	<i>DLEU1</i>	13-044.9	13q14.3
400	<i>IGF1R</i>	15-093.2	15q26
301	<i>TP53</i> (exón 8)	17-008.3	17p13.1
346	<i>TP53</i> (exón 9)	17-008.3	17p13.1
391	<i>TP53</i> (exón 10)	17-008.3	17p13.1
409	<i>TP53</i> (exón 11)	17-008.3	17p13.1
142	<i>ERBB2</i>	17-039.9	17q21.1
319	<i>CDH2</i>	18-025.4	18q11.2
436	<i>MADH2</i>	18-045.3	18q21.1
274	<i>BCL2</i>	18-060.9	18q21.2
247	<i>STK11</i>	19-001.1	19p13.3
265	<i>CDKN2D</i>	19-010.9	19p13
160	<i>BCL2L1</i>	20-030.0	20q11.1
427	<i>PTPN1</i>	20-048.9	20q13.1

Tabla XI. Descripción de las 41 sondas de "SALSA P005". Longitud de los fragmentos, nombre de los genes, posición y localización cromosómica.

Longitud	Gen	Posición cromosómica (kb)	Cromosoma
418	<i>BCAR3</i>	01-093.4	01p22.1
328	<i>F3</i>	01-094.2	01p22
472	<i>NRAS</i>	01-114.1	01p13.2
193	<i>IL10</i>	01-202.7	01q31
256	<i>IL1A</i>	02-111.4	02q14
220	<i>TANK</i>	02-160.6	02q24
265	<i>PIK3CA</i>	03-179.8	03q26.3
274	<i>IL13</i>	05-132.4	05q31
154	<i>IL4</i>	05-132.5	05q31.1
427	<i>CDKN1A</i>	06-036.6	06p21.2
247	<i>MYB</i>	06-135.4	06q22
166	<i>ABCBI</i>	07-085.8	07q21
373	<i>FGFR1</i>	08-038.4	08p11.2

Longitud	Gen	Posición cromosómica (kb)	Cromosoma
238	<i>MYC</i>	08-128.8	08q24.12
346	<i>PTP4A3</i>	08-142.4	08q24.3
211	<i>RECQL4</i>	08-145.8	08q24.3
202	<i>CDKN2A</i>	09-022.18	09p21
463	<i>RENT2</i>	10-012.0	10p14
136	<i>CREM</i>	10-035.2	10p12.1
337	<i>HRAS</i>	11-001.12	11p15.5
436	<i>LMO2</i>	11-034.6	11p13
175	<i>RELA</i>	11-067.1	11q13
229	<i>EMS1</i>	11-071.8	11q13
445	<i>TNFRSF7</i>	12-006.5	12p13
310	<i>LRMP</i>	12-025.2	12p12.3
355	<i>BRCA2</i>	13-026.9	13q12.3
160	<i>RB</i>	13-043.0	13q14.3
148	<i>ABCC4</i>	13-090.2	13q32
382	<i>CDH1</i>	16-069.2	16q22.1
391	<i>CRK</i>	17-001.7	17p13.3
142	<i>ERBB2</i>	17-039.9	17q21.1
283	<i>BRCA1</i>	17-043.4	17q21
454	<i>TIMP2</i>	17-080.1	17q25
319	<i>CDH2</i>	18-025.4	18q11.2
130	<i>BCL2</i>	18-060.9	18q21.3
301	<i>BAX</i>	19-049.8	19q13.3
400	<i>STK15/STK6</i>	20-054.6	20q13.3
364	<i>STCH</i>	21-012.4	21q11
292	<i>MIF</i>	22-020.9	22q11.23
409	<i>PDCD8</i>	X-126.1	Xq25
184	<i>UTY</i>	Y-014.8	Yq11

Cada una de las sondas génicas está formada por dos oligonucleótidos, uno sintético y otro derivado del vector M13 (Figura 9). El oligonucleótido sintético consta de un “primer” en el extremo 5’ de 19 nucleótidos (“primer” Y), y una



secuencia de hibridación de 21-30 nucleótidos que se unirá a la muestra de ADN estudio. El oligonucleótido derivado del vector M13 tiene un tamaño diferente en cada sonda, gracias a la secuencia de relleno (“stuffer sequence”), de tamaño variable, que se intercala entre el “primer” de 36 nucleótidos situado en el extremo 3’ (“primer” X) y la secuencia de hibridación de 25-43 nucleótidos, que se unirá a la muestra de ADN.

Las mezclas de sondas “SALSA P084” y “SALSA P005” contienen también sondas de control interno (“DNA Quality”, DQ). En la amplificación por PCR estas sondas control generan productos más pequeños que los amplificados por las sondas génicas, que aparecen al inicio de cada perfil de MLPA. El control interno determina si la calidad y la concentración del ADN de la muestra son las necesarias para obtener un resultado óptimo. Este control interno está formado por dos tipos de sondas:

1- Cuatro fragmentos de ADN que generan productos amplificados de 64, 70, 76 y 82 pb (pares de bases), incluso si se omite el proceso de ligación.

2- Un producto de amplificación de 94 pb dependiente del proceso de ligación y del ADN de la muestra.

El tamaño de los cuatro picos DQ (64-82 pb), una vez amplificados por PCR, depende de la cantidad de ADN de la muestra. Serán difícilmente visibles si el ADN es >100 ng y tendrán un tamaño menor que el fragmento amplificado de 94 pb si la cantidad de ADN es de 20 ng aproximadamente. Con estos tamaños de los picos DQ podemos considerar que la cantidad de ADN es adecuada (≥ 20 ng) y/o que la reacción se ha desarrollado en perfectas condiciones (Figura 10).

Si estos 4 fragmentos tienen un tamaño similar o mayor que el fragmento de 94 pb y los productos de PCR de 130-482 pb, significa que la reacción de ligación ha fallado o que la cantidad de ADN es escasa y los resultados obtenidos no tienen validez. El tamaño del pico de 94 pb debe ser similar al obtenido por los productos

amplificados de las sondas génicas y nos sirve de control para saber que el experimento ha sido satisfactorio (Figura 10).

Al final todos los productos amplificados se separan mediante electroforesis.

La cantidad relativa de sondas amplificadas refleja el número relativo de copias de la secuencia diana del ADN estudio.

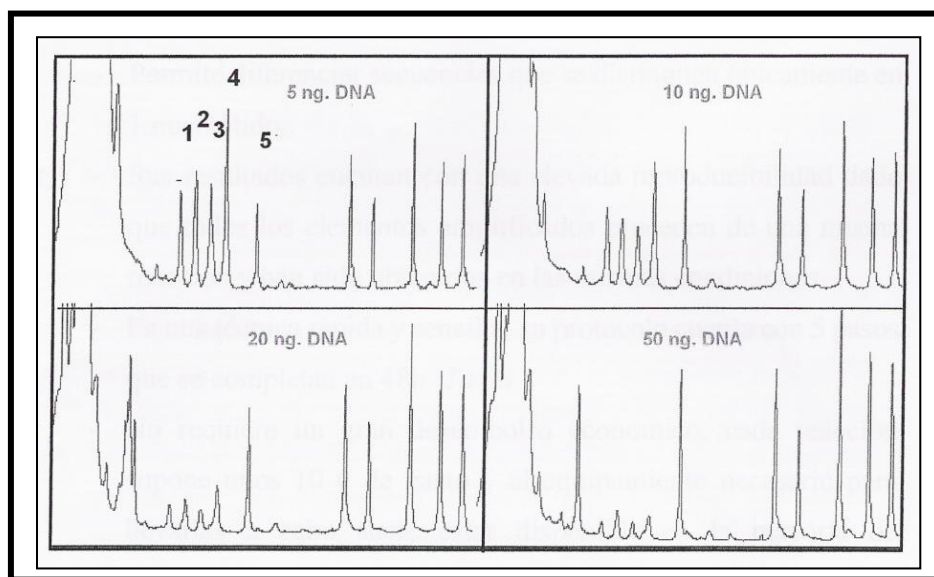


Figura 10. Calidad del ADN. Si los cuatro primeros picos -control- son más altos que los picos del producto de MLPA indica que el ADN de la muestra es insuficiente o bien un fracaso en la reacción de ligación

Para los experimentos de MLPA se utilizó ADN control procedente de sangre periférica de seis individuos sanos y ADN de los tumores primarios. Las muestras de ADN fueron extraídas según los protocolos anteriormente citados.

4.4.3. Pasos del experimento

El *primer día* del experimento, el ADN, previamente extraído de cada muestra (100-200 ng), se desnatura en un termociclador, aplicando un ciclo de 5 minutos a 98°C y enfriando posteriormente a 25°C. Se mezcla el ADN



desnaturalizado con las 38 sondas de “SALSA P084” y las 41 sondas de “SALSA P005” y su correspondiente tampón de hibridación y se coloca, de nuevo, en el termociclador en un ciclo único de un minuto a 95°C y 16 horas a 60°C, para que las sondas hibriden sobre el ADN de la muestra.

El *segundo día* se procede a la ligación de los dos oligonucleótidos de las sondas que han hibridado sobre el ADN. Para ello, se añade al tubo de PCR la mezcla de ligación con el enzima ligasa y su tampón. Se coloca de nuevo en el termociclador 15 minutos a 54°C, seguido de 5 minutos a 98°C, y posterior enfriamiento a 25°C. Una vez ligados los moldes de las regiones, se procede a preparar la mezcla de tampón y los “primers” para la PCR, el tampón del enzima de dilución y la polimerasa para la amplificación de las sondas. Todas las sondas ligadas poseen las mismas secuencias en sus extremos, permitiendo su amplificación simultánea por PCR, utilizando sólo un par de “primers”. Los oligonucleótidos no ligados al ADN de la muestra no serán amplificados por PCR y, por tanto, no precisan ser eliminados.

Una vez añadidos los “primers”, se colocan de nuevo las muestras en el termociclador y se corre el programa de PCR aplicando 1 minuto a 60°C, 33 ciclos, (35 ciclos si la concentración de ADN era muy baja, <30ng/μL), con tres pasos cada ciclo de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y 60 segundos a 72°C, enfriando finalmente a 4°C. Las muestras son almacenadas a 4°C hasta realizar el análisis de fragmentos.

Cada sonda da lugar a un producto de amplificación de tamaño único de entre 130 a 482 pb debido a la diferencia en tamaño de la secuencia relleno. Los productos amplificados de las sondas se analizan mediante electroforesis capilar. Para ello mezclamos 2 μL del producto de amplificación con 10 μL de formamida y 0,5 μL de marcador interno. La mezcla se desnaturaliza por calor y se somete a electroforesis capilar en un equipo “ABI Prism 3100” (Applied Biosystems, Warrington, UK). Los capilares están rellenos de un polímero que ofrece dificultad a la migración, permitiendo separar los fragmentos por su tamaño, corriendo los

fragmentos más pequeños más rápido que los grandes. Al final del recorrido hay un láser y un sistema de captura de la señal de fluorescencia, que detecta los distintos productos. Los productos finales serán analizados con el software “GeneScan v3.7” (Applied Biosystems, Warrington, UK), para determinar su tamaño por interpolación con fragmentos de tamaño conocido del marcador interno, cuantificando cada producto según su intensidad de fluorescencia. Cada sonda vendrá representada por un pico (Figuras 11 y 12).

Para relativizar los resultados y que estos sean fácilmente interpretables, se divide el área de cada pico entre la suma de todas las áreas-pico del perfil y se compara el área-pico relativa de cada producto de amplificación con su homóloga, dentro de un perfil de control obtenido a partir de ADN de tejido sano.

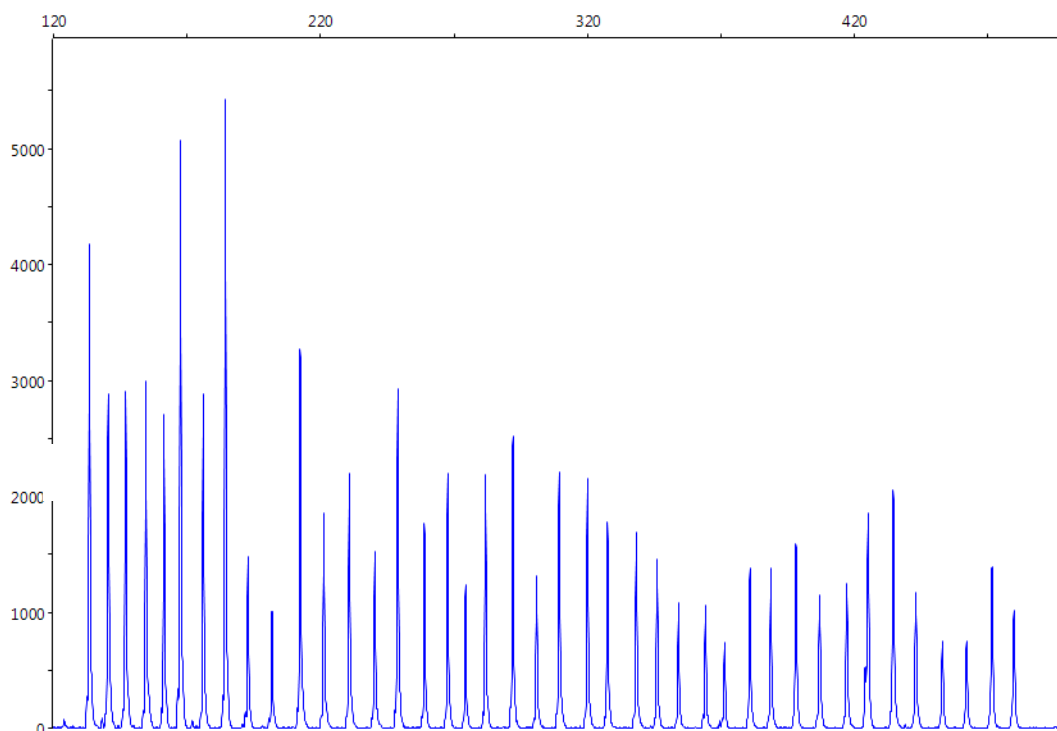


Figura 11. Representación gráfica de los 42 productos amplificados por PCR y analizados por electroforesis capilar

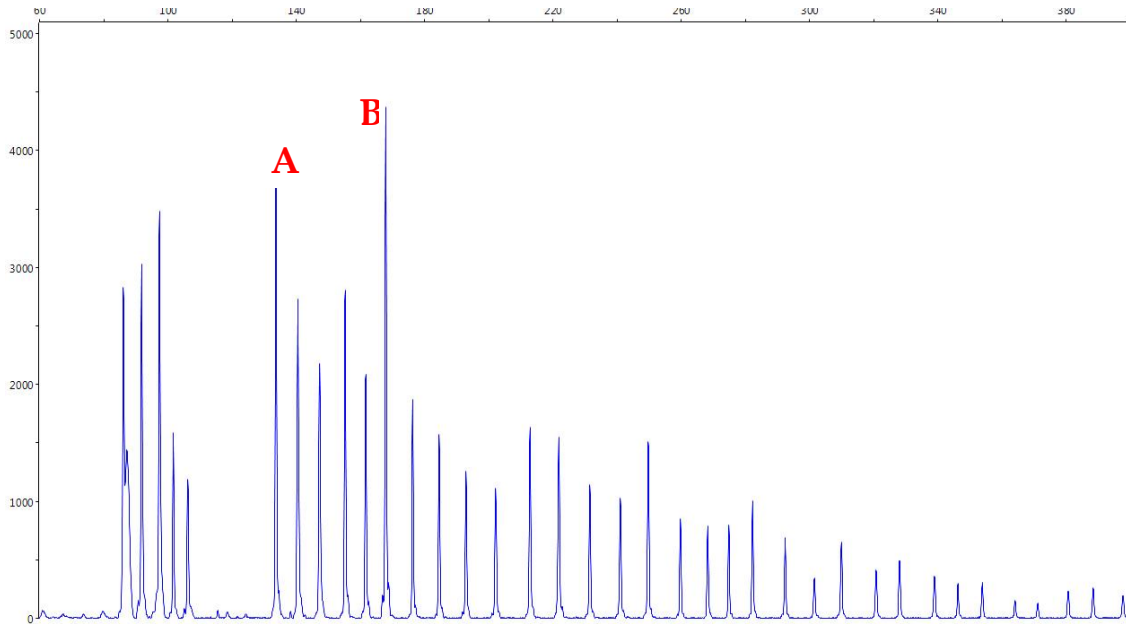


Figura 12. Representación gráfica en la que se puede apreciar una ganancia en *APC* (A) y en *CDKN2B* (B)

4.4.4. Interpretación de datos

A la hora de interpretar los experimentos de MLPA, dado que algunos genes se encuentran representados en ambos “kits” (*NRAS*, *CDKN2A*, *TANK*, *PTP4A3*, *RECQL4*, *RENT2*, *RB*, *CREM*, *EMS1*, *ERB2*, *CDH2* y *BCL2*) y los resultados obtenidos no fueron en ocasiones completamente concordantes, se decidió tomar en consideración el dato más acorde con lo publicado, así como los resultados obtenidos en el experimento de m-CGH.

Para definir la existencia de una ganancia o una pérdida de material génico en cada una de las sondas génicas de una muestra hay que normalizar los datos obtenidos. Para ello se calcula la mediana, la desviación estándar y el valor mínimo y máximo para las muestras control y para cada una de las muestras de tumor estudio. La relación entre el valor del tumor y el control se calcula aplicando las siguientes fórmulas:

- 1) Relación mínima = cociente entre el valor mínimo del tumor y el valor máximo del control.

2) Relación máxima = cociente entre el valor máximo del tumor y el valor mínimo del control.

3) Relación tumor/control = media de la relación mínima y la relación máxima.

4) Desviación estándar de la relación tumor/control = diferencia entre la relación tumor/control y la relación mínima.

Con este análisis normalizado se obtiene un diagrama de barras de todas las sondas génicas del "kit" estudiadas en el ADN tumoral (Figura 13). Cuando la relación tumor/control es mayor de 1,2 y la desviación estándar es >1 se interpreta como ganancia, si es menor de 0,8 y la desviación estándar es <1 se interpreta como pérdida. Por último, si la relación tumor/control es >2 se interpreta como amplificación.

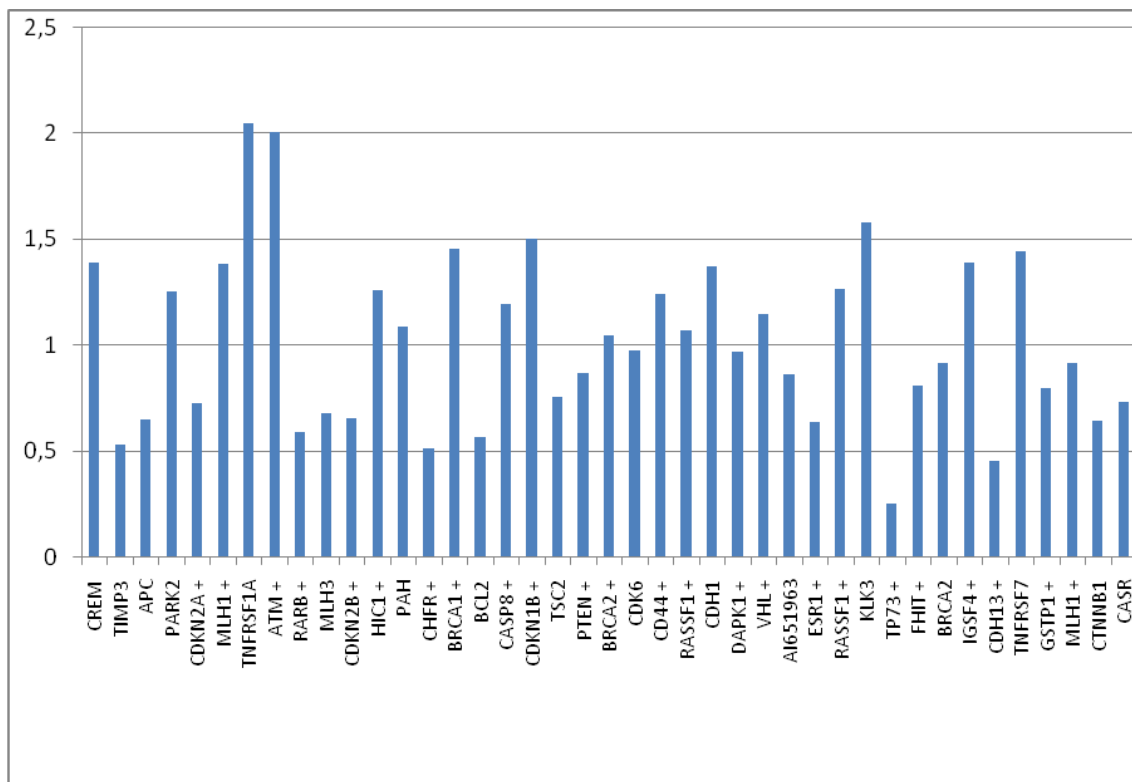


Figura 13. Diagrama de barras del resultado final obtenido por MLPA de un caso de ACNS. Las barras representan la relación tumor/control normalizada para cada sonda



4.5. MLPA de metilación

Los mecanismos epigenéticos causan modificaciones a nivel del ADN y de las histonas que se traducen en la falta de expresión de un gen, sin que se modifique la secuencia codificadora de su ADN. El principal mecanismo responsable de los cambios epigenéticos es la metilación, la cual se realiza mediante la adición de un grupo metilo (-CH₃) a una molécula, por acción de una metiltransferasa.

A nivel molecular la metilación consiste en transferir grupos metilos en algunas bases de citosinas (C) del ADN, situadas previa y contiguamente a una guanina (G), en las llamadas islas CpG, las cuales están presentes en las regiones promotoras o cerca de ellas. La metilación aberrante es responsable de la inactivación de genes supresores de tumores y está presente en gran número de tumores humanos. También pueden ser metilados los productos de los genes, es decir, las proteínas, regulándose así su función.

4.5.1. *Fundamento de la técnica*

Una de las principales ventajas de la MLPA de metilación o MLPA metilación específica (MS), es que permite analizar la metilación en regiones promotoras de varios genes supresores en una única reacción. Utiliza los mismos fundamentos de las MLPA anteriormente descritos, pero además expone el ADN estudio a una enzima de restricción sensible a metilación (HhaI). Esta enzima reconoce y corta las regiones no metiladas, por lo que no se forman picos en los genes del “kit” utilizado, a menos que dicho gen se encuentre metilado (Figura 14). El “kit” de MLPA-MS permite recoger información, en el mismo experimento, del número de copias de 41 genes, a la vez que determinar el estado de metilación de 26 de ellos.

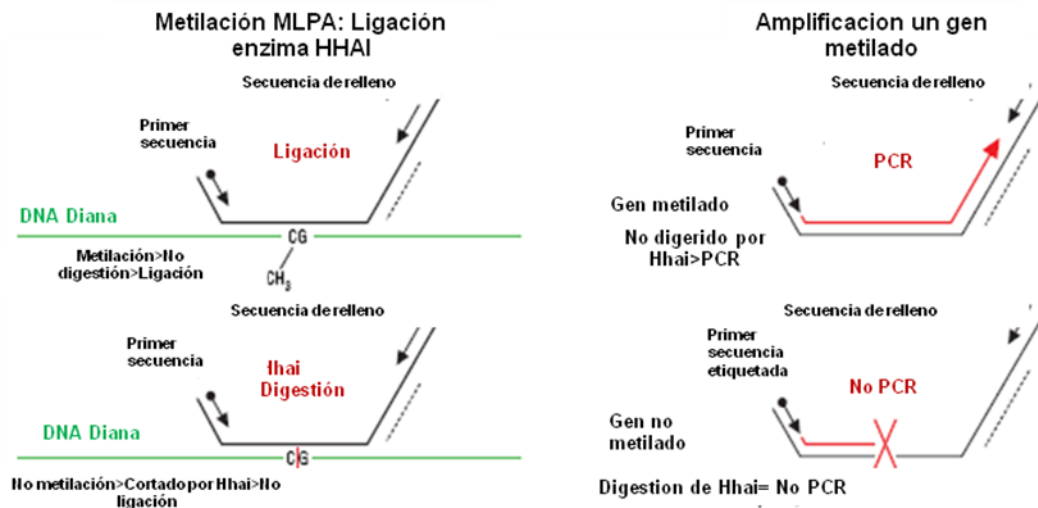


Figura 14. Bases moleculares de la MLPA-MS. En las figuras superiores se aprecia la exposición del ADN, que contiene un gen metilado, a la enzima HhaI que no reconoce el ADN. Por tanto se produce la PCR y se forma un pico (Figura 15). En las figuras inferiores la enzima reconoce un sitio no metilado, se une al ADN y lo corta, evitando que se lleve a cabo la PCR y no se forma el pico anteriormente descrito

La MLPA-MS se representa de una forma visual, alternando sondas de 15 genes control que siempre se forman, a razón de una sonda control cada dos sondas de metilación. Si un gen se encuentra metilado se forma un pico de reacción que se considera positivo si es mayor o igual al 60% de los picos controles cercanos. La magnitud de la reacción formada se encuentra directamente relacionada con el número de copias metiladas del gen, siendo mayor cuando se metilan los dos alelos del gen (Figura 15).

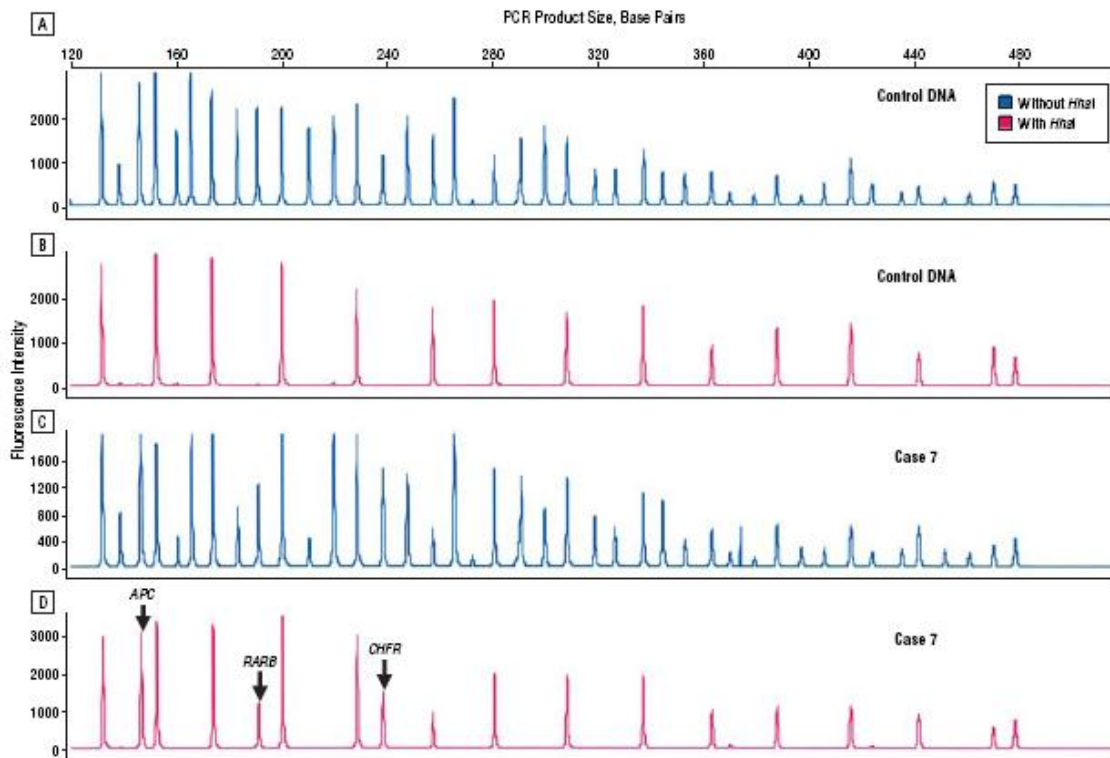


Figura 15. MLPA sin exposición al enzima *HhaI* (tira 1)(A) y MLPA-MS (tira 2)(B) en el ADN control. MLPA sin exposición al enzima *HhaI* (tira 1)(C). MLPA-MS (tira 2) (D) donde se ve los picos formados por la metilación de *APC*, *RARB* y *CHFR*

4.5.2. Tipos de sondas

Para realizar la MLPA-MS se utilizó "SALSA MS-MLPA KIT ME001-C1 Tumor supresor-1". Mediante este "kit" se realizan dos experimentos por tejido a estudiar, uno encaminado al estudio de 41 sondas génicas y el otro dirigido a las 26 sondas de metilación (Tabla XII). En este estudio tienen interés los genes *APC* y *CDKN2A* que participan en la ruta Wnt. Mediante dicho "kit" se detectó el número de copias de *APC* y *CDKN2A*, así como su metilación.

Tabla XII. Descripción de las 41 sondas de “Salsa MS-MLPA KIT ME001-C1 Tumor supresor-1”. Se indica la longitud de los fragmentos, nombre de los genes y localización cromosómica. Las sondas resaltadas en negrita y marcadas con el símbolo + en la columna HhaI son en las que se puede estudiar la metilación.

Longitud	Sonda Salsa MLPA	Sitio HhaI	Cromosoma
64-70-76-82	Fragmentos Q: calidad ADN; únicamente visible si la muestra de ADN es menor a 100ng		
88-92-96	Fragmentos D: bajas señales en los fragmentos 88 ó 96 indican desnaturalización incompleta		
100*	Fragmentos X: fragmento específico para el cromosoma X		
105*	Fragmentos Y: fragmento específico para el cromosoma Y		
136	Referencia (<i>CREM</i>) sonda 0981-L00566		10p12.1
142	TIMP3 sonda 2255-L01968	+	22q12.33
148	APC sonda 1905-L0352	+	5q22
154	Referencia (<i>PARK2</i>) sonda 3366-L02750		6q26
160	CDKN2A sonda 1524-L01744	+	9p21
166	MLH1 sonda 1686-L01266	+	3p22.3
175	Referencia (<i>TNFRSF1A</i>) sonda 0554-L13516		12p13.31
184	ATM sonda 4044-L03849	+	11q23
193	RARB sonda 4040-L01698	+	3p24.2
202	Referencia (<i>MLH3</i>) sonda 1245-L00793		14q24.3
211	CDKN2B sonda 0607-L00591	+	9p21
220	HICI sonda 3804-L00949	+	17p13.3
229	Referencia (<i>PAH</i>) sonda 2334-L01820		12q23
238	CHFR sonda 3813-L03753	+	12q24.33
247	BRCA1 sonda 5162-L04543	+	17q21.31
256	Referencia (<i>BCL2</i>) sonda 0587-L00382		18q21.33
265	CASP8 sonda 2761-L02210	+	2q33.2
274	CDK1B sonda 7949-L07730	+	12p13.2
283	Referencia (<i>TSC2</i>) sonda 1832-L01397		16p13.3
292	PTEN sonda 2203-L08261	+	10q23.3
301	BRCA2 sonda 4042-L03755	+	13q12.3
310	Referencia (<i>CDK6</i>) sonda 3184-L02523		7q21.3
319	CD44 sonda 3817-L01731	+	11p12

Longitud	Sonda Salsa MLPA	Sitio Hha1	Cromosoma
328	RASFI sonda 2248-L01734	+	3p21.3
337	Referencia (CDH1) sonda 2416-L01862		16q22.1
346	DAPKI sonda 1677-L01257	+	9q22
355	VHL sonda 3810-L01211	+	3p25.3
364	Referencia (AI651963) sonda 1234-L00781		10p14
373	ESRI sonda 2202-L01700	+	6q25.1
382	RASSFI sonda 3807-L02159	+	3p21.3
391	Referencia (KLK3) sonda 0713-L00108		19q13.33
400	TP73 sonda 4050-L01263	+	1p36.32
409	FHIT sonda 2201-L01699	+	3p14.2
418	Referencia (BRCA2) sonda 1617-L01199		13q12.3
427	IGSF4 sonda 3819-L03848	+	11q23
436	CDH13 sonda 7946-L07727	+	16q23.3
445	Referencia (TNFRSF7) sonda 0678-L00124		12p13.31
454	GSTP1 sonda 1638-L01176	+	11q13
463	MLH1 sonda 2260-L01747	+	3p22.1
472	Referencia (CTNNB1) sonda 3984- L03251		3p21.3
481	Referencia (CASR) sonda 2683-L02148		3q21

4.5.3. Pasos del experimento

Son los mismos que para la MLPA y han sido descritos anteriormente (Apartado 4.5.3.). No obstante, el proceso se diferencia en que al segundo día, a la hora de realizar la reacción de ligación de los oligonucleótidos, a la tira 2 se le agrega el reactivo “ligase 65 enzyme”, que contiene la enzima HhaI. Esta enzima realizará la reacción de digestión en las regiones promotoras de los genes no metilados, por lo que sólo se amplificarán los genes si están metilados.

4.5.4. Interpretación de datos

Para interpretar los datos obtenidos en los experimentos de las tiras 1 (sin HhaI) se utiliza el mismo proceso que en la MLPA clásica, anteriormente mencionado (Apartado 4.5.4.), siendo necesario, como es habitual, normalizar los resultados.

Para interpretar los datos de las tiras 2 (con HhaI) es necesario conocer la distribución de las sondas en el “kit” (Tabla XII). Los productos de las tiras B presentarán en el gráfico una distribución como consecuencia de la mezcla de sondas para metilación y las 15 sondas de control que siempre se forman (Tabla XI). Como ya se ha comentado, esta distribución es a razón de un control por dos sondas de metilación, considerándose que un gen está metilado cuando el producto de la sonda corresponde al 60% o más de los controles adyacentes (Figuras 16 y 17).

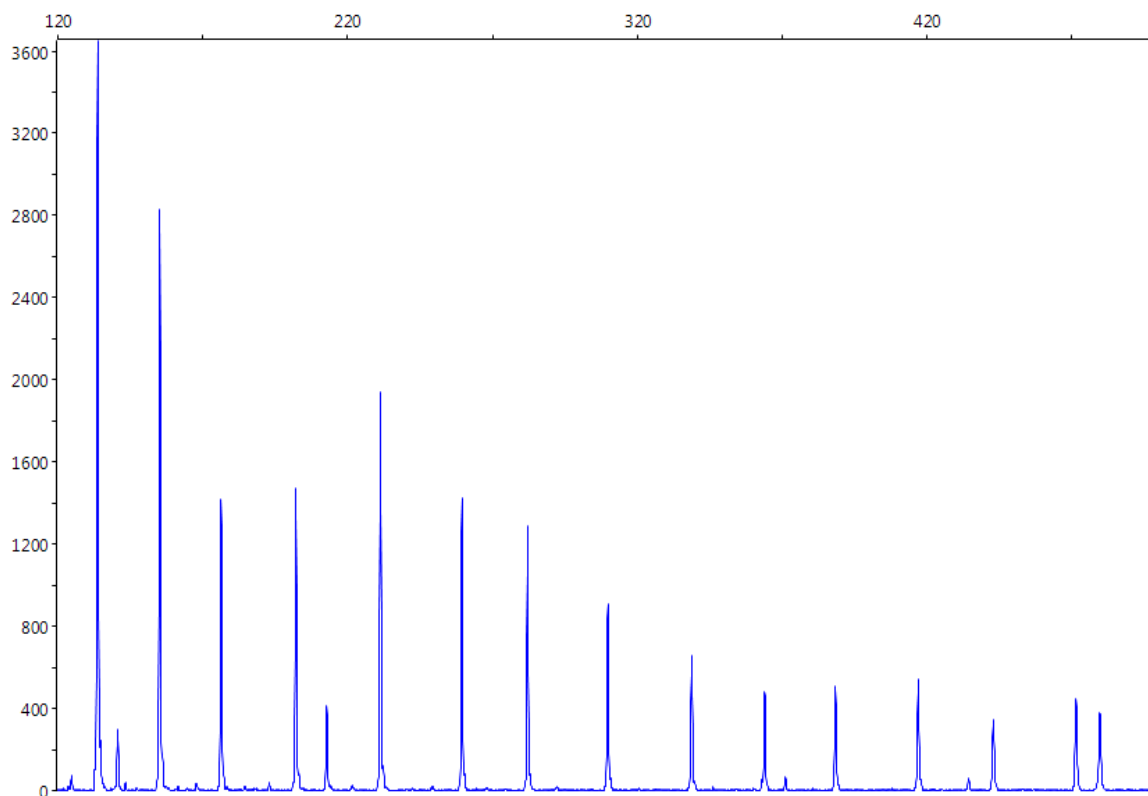


Figura 16. Representación gráfica de la MLPA-MS (tira 2) sin que se encuentre metilada ninguna de las sondas

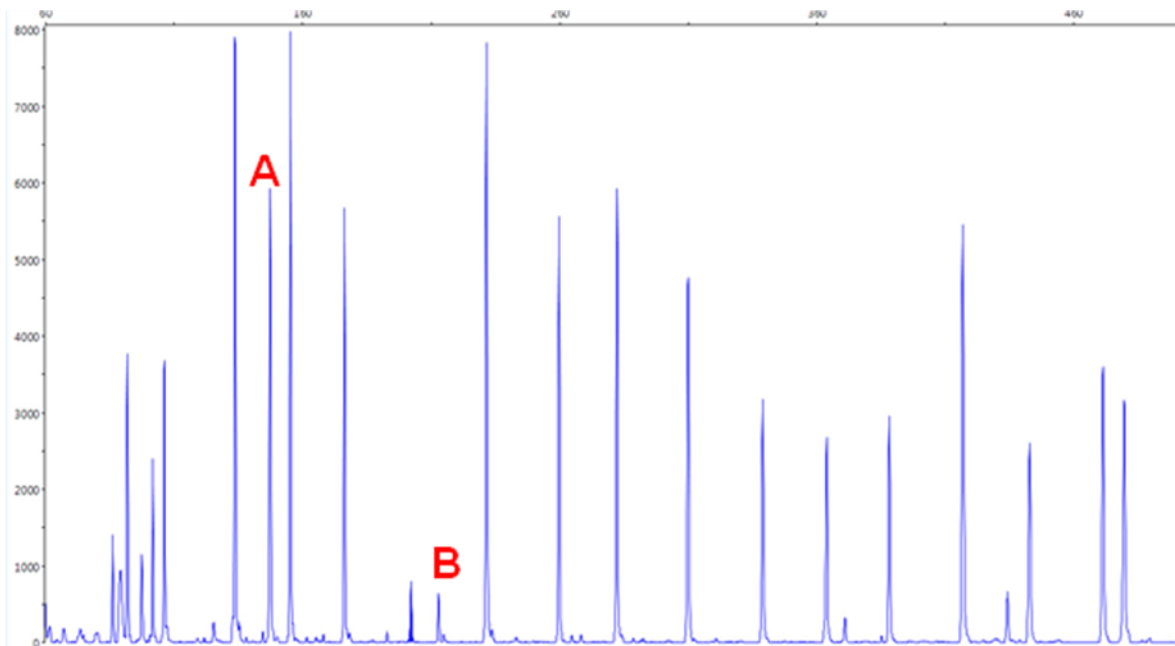


Figura 17. Representación gráfica de la MLPA-MS (tira 2) donde se observan metilados los genes *APC* (A) y *CDKN2A* (B)

4.6. "Tissue array"

4.6.1. Fundamento de la técnica

El "tissue array" (TA) es un procedimiento introducido en 1.998 por Kononen ¹⁰¹. Se trata de una técnica automatizada, que utiliza un instrumento denominado "tissue arrayer", para puncionar con agujas de pequeño diámetro (0,6; 1 ó 2 mm) un bloque de parafina y extraer un diminuto cilindro de tejido. Este tejido se coloca en el bloque de parafina denominado "receptor" en el que se disponen de forma matricial un gran número de cilindros¹⁰². La técnica permite realizar, además de IHQ, otros procedimientos técnicos como ISH (hibridación *in situ*) y FISH (hibridación *in situ* fluorescente).

La principal ventaja del TA es la reducción significativa de tiempo total empleado en la realización de los procedimientos, así como su menor consumo de tejido y coste del material¹⁰³.

Un posible inconveniente es el tamaño reducido de la muestra estudio, que viene a representar en nuestro caso sólo el 0,3% del tumor. También hay que tener en cuenta otros inconvenientes de índole técnica como son la rotura del bloque, su tinción heterogénea, la pérdida de cilindros durante el procesado, la ausencia de tinción en algún cilindro y la selección incorrecta del tejido.

Para solventar estos inconvenientes es importante que las zonas escogidas sean representativas del tumor, siendo imprescindible que dichas zonas sean seleccionadas por un patólogo o siguiendo criterios histopatológicos estrictos (Figura 18).

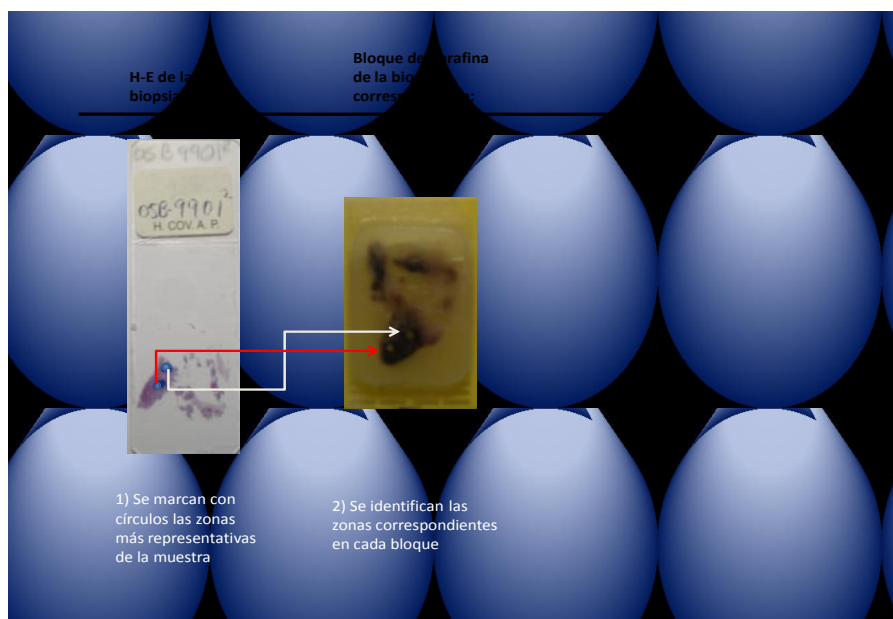


Figura 18. Selección de una zona para el “tissue array”



4.6.2. Pasos del experimento

Lo primero que se realiza para la elaboración de los TA es confirmar la histopatológica del diagnóstico de ACNS tipo ITAC de los casos seleccionados por un patólogo del Servicio de Anatomía Patológica del HUCA.

Una vez confirmado el diagnóstico se verifica la existencia de los bloques de tejidos parafinados y que su cantidad y calidad permita la elaboración de los TA.

Las zonas representativas de los tumores fueron seleccionadas por dos patólogos familiarizados con los ACNS, haciendo tres o más cores según la calidad del cilindro obtenido evitando zonas de necrosis.

Se realizaron esquemas topográficos en “Word” previos en los que se diseña la configuración del TA. Cada esquema contenía el mismo número de casillas que el TA elaborado y así se pudo identificar a que pacientes correspondía cada cilindro.

Para la elaboración de los cilindros se utilizó un aparato denominado “tissue arrayer” (Beecher Instruments, Silver Springs, MD, USA) (Figura 19). Con este aparato se llevó a cabo la punción de los bloques de parafina obteniendo cores de 1 mm. Una vez elaborado el bloque se procedió a homogeneizarlo, calentándolo y enfriándolo, a temperatura ambiente y en nevera, antes de cortarlo. Este proceso se realizó con la estufa a 60°C durante 12 a 15 minutos, colocándolos boca abajo sobre un porta objetos. Posteriormente se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se metieron en la nevera para endurecerlos antes de proceder a cortarlos.



Figura 19. “Tissue arrayer” utilizado en la elaboración de los TA

Los bloques fueron seccionados de forma homogénea, en una sola tanda, para evitar la pérdida de tejido que supone reorientar el bloque. La sección de los cortes fue de 3 μ . Para verificar la calidad de los TA se realizó una tinción de hematoxilina-eosina (HE) de control en el primer corte útil, la cuál se repitió, con nuevos cortes control de HE cada 20 secciones (Figura 20).

En el presente estudio se realizó un bloque de TA de 2 x 2,5 cm con pocillos de tumor de 1 mm separados por 1,5 mm. En total 87 pocillos por bloque y un total de 93 casos útiles repartidos en dos bloques de TA (Figura 21).

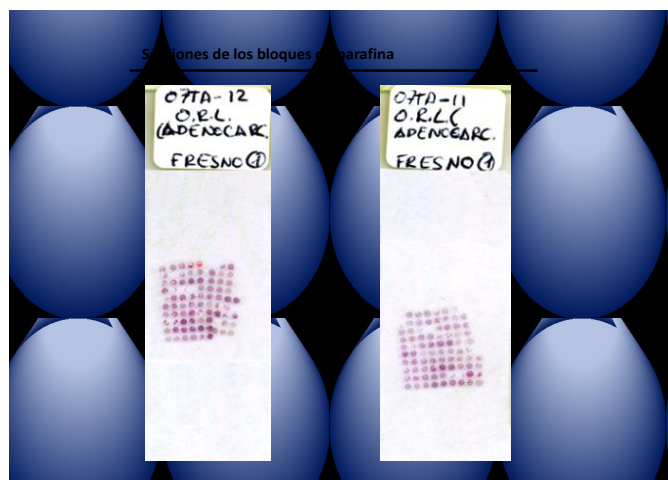


Figura 20. Tinción control de HE en las secciones de los “tissue array”

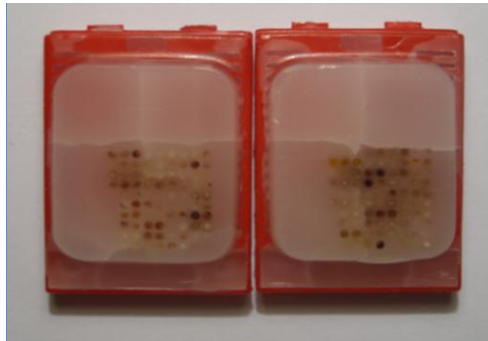


Figura 21. Bloques de “tissue array” de 2 x 2,5 cm con 87 cores por bloque

4.6.3. Interpretación de datos

Para dar como válido y poder interpretar cada TA se siguieron las normas descritas por los creadores de la técnica¹⁰²:

- Todos los tumores muestrados deben estar representados en las secciones, o al menos en un número superior al 90%.
- Los cilindros, una vez seleccionados, deben estar intactos o si se ha perdido alguno, debe estar representado al menos el 50% del caso.
- Si el número de casos perdidos fuera superior a 3 se repitió el TA.

4.7. Inmunohistoquímica (IHQ)

4.7.1. Fundamentos de la técnica

La IHQ es un procedimiento histopatológico basado en el uso de un anticuerpo específico, previamente marcado mediante un enlace químico con una enzima, que puede transformar un sustrato en visible sin afectar la capacidad del anticuerpo, para formar un complejo con el antígeno. Este complejo antígeno-anticuerpo es aplicado a una muestra de tejido orgánico, correctamente fijada e incluida en parafina, mediante la utilización de alguna de las técnicas específicas



(peroxidasa antiperoxidas, fluoresceína, etc). Así, el complejo puede ser localizado e identificado dentro de las muestras tisulares o citológicas a estudiar, logrando obtener marcadores antigénicos característicos de distintas líneas de diferenciación y funcionalismo celular, con lo que se determina el tipo de célula en la muestra¹⁰⁴.

4.7.2. *Pasos de la técnica*

Los tejidos fijados en formol e incluidos en parafina se cortan en secciones de 3 μm que son adheridas a portas siliconizados (Dako® S2024), dejando en estufa a 56-58° C al menos 2 horas y hasta 18 horas como máximo.

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

A partir de este paso, la técnica se realiza en el inmunoteñidor “Autostainer plus” (Dako®). En primer lugar se introducen las muestras en un buffer de lavado y en una solución bloqueante de peroxidasa durante 5 minutos. Se añade el anticuerpo monoclonal primario dirigido hacia la proteína que deseamos detectar durante un tiempo variable, según el tipo de anticuerpo utilizado.

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

Un paso clave para que los resultados sean reproducibles, comparables y de una calidad óptima, es la elección del método de detección. En nuestro estudio, se ha utilizado el sistema de polímeros de dextrano “EnVision™ Plus (PDE)” (Dako®). El sistema EnVision™ Plus es una técnica de tinción reciente desarrollada

en dos pasos en la que al anticuerpo primario le sigue un polímero conjugado. Este polímero de alto peso molecular es el dextrano, al que se conjugan de manera covalente un gran número de moléculas del enzima (por ejemplo la peroxidasa de rábano) y del anticuerpo secundario. Este sistema aumenta la sensibilidad, lo que permite incrementar las diluciones del anticuerpo primario y produce menos fondo que las técnicas tradicionales de avidina-biotina.

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

4.7.3. Tipos de reactivos

Como se ha comentado anteriormente nuestro estudio se dirigió a la detección de las proteínas E-cadherina, β -catenina, p16, CDK8, pRb, E2F1, Ciclina D1 y C-Myc, por lo que se utilizaron en cada caso los siguientes reactivos que se muestran en la tabla 13. En las figuras 22 a 29 se exponen ejemplos de cada inmunotinción.

Tabla XIII. Características de los inmunorreactivos

Ac primario	pH (SRA)	Dilución	Incubación	Clon	Referencia	Proveedor
E-cadherina	alto (x10)	1/50	20 minutos	NCH-38	M3612	Dako
β-catenina	9(x10)	1/200	25 minutos	β -catenina-1	M3539	Dako
p-16	9(x10)	1/40	30 minutos	E6H4	Mp16 ^{INK4a}	CINtec
E2F1	6	1/100	20 minutos	c-20	SC-193	Santa Cruz
CDK8	6	1/50	30 minutos	c-19	SC-1521	Santa Cruz
Rb	6	1/50	30 minutos	c-15	SC-50	Santa Cruz
CyclinD1	9	1/100	20 minutos	DCS-6	SC-20044	Santa Cruz
C-Myc	9	1/40	20 minutos	9E10	SC-40	Santa Cruz

SRA: solución recuperadora de antígenos basada en proteinasa K

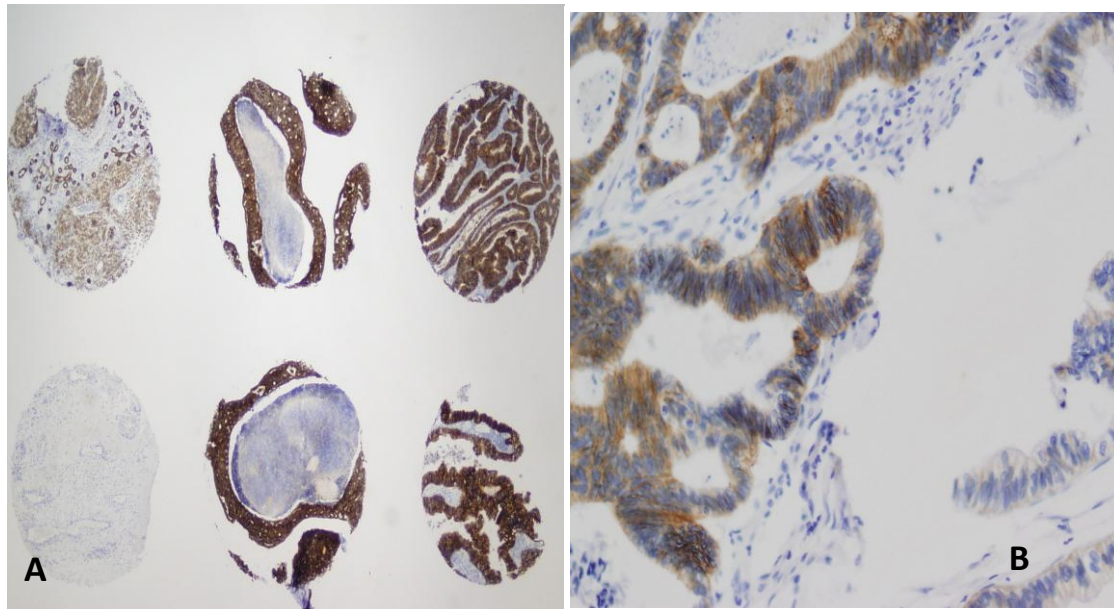


Figura 22. IHQ de E-cadherina a 4X (A) y 20X (B) en donde se detecta inmunotinción en cinco de los cores. En la figura B se observa la tinción positiva en la membrana para E-cadherina

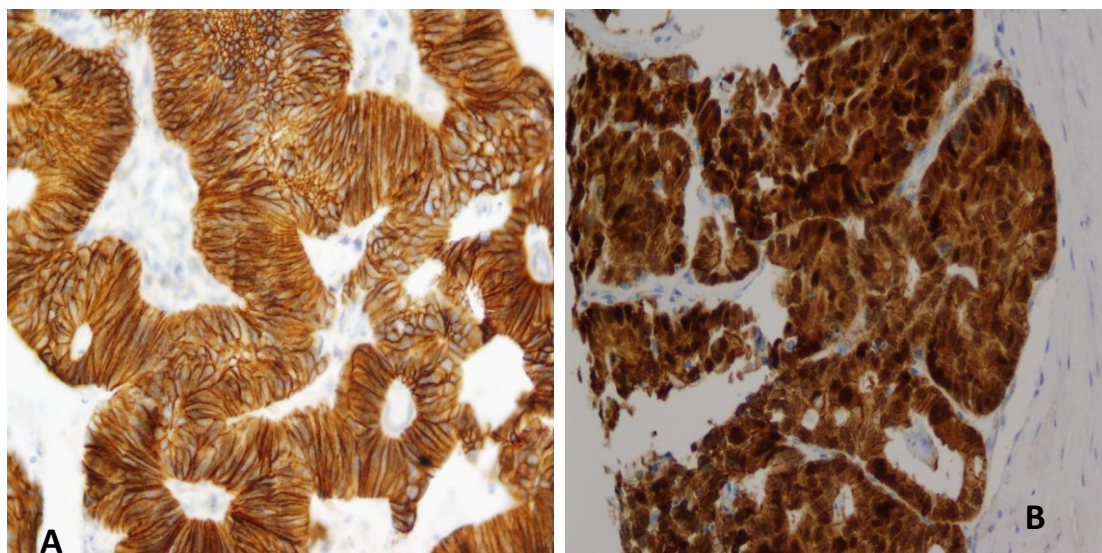


Figura 23. IHQ de β -catenina a 20X en donde se detecta inmunotinción positiva en la membrana (A) y a nivel nuclear (B).

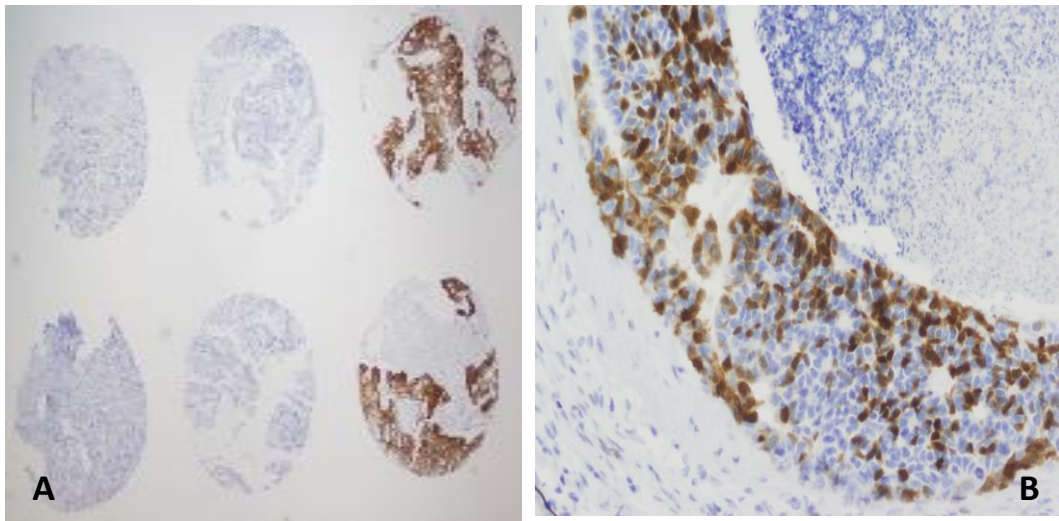


Figura 24. IHQ de p16 a 4X (A) y 20X (B) aumentos en donde se detecta inmunotinción positiva a nivel nuclear en dos de los cores (A). En la figura B se observa la tinción positiva a nivel nuclear en un caso seleccionado

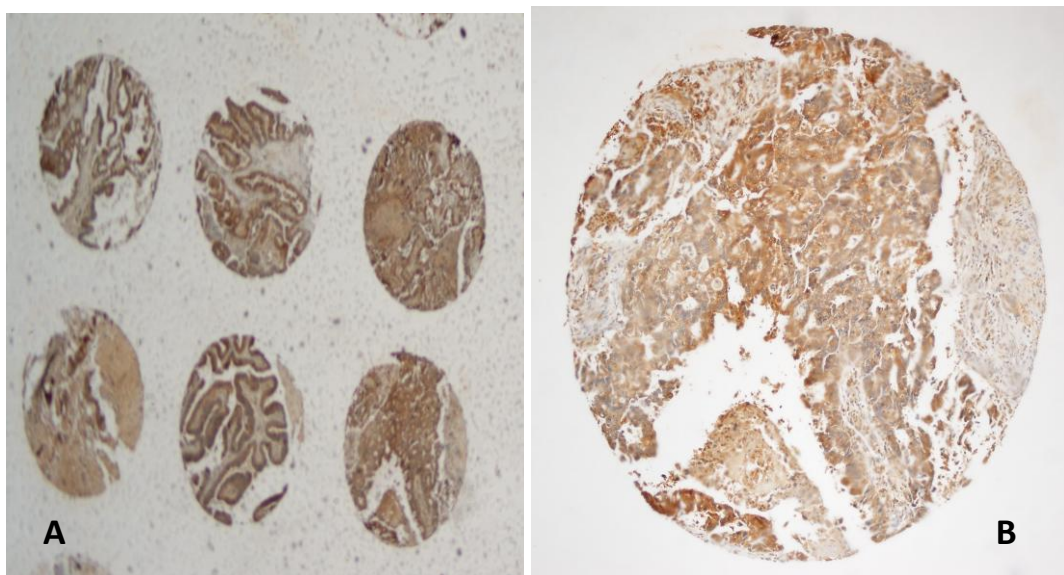


Figura 25. IHQ de E2F1 a 4X (A) y 10X (B) en la que se detecta inmunotinción positiva a nivel nuclear en todos los cores (A). En la figura B se observa la tinción positiva a nivel nuclear en un caso seleccionado

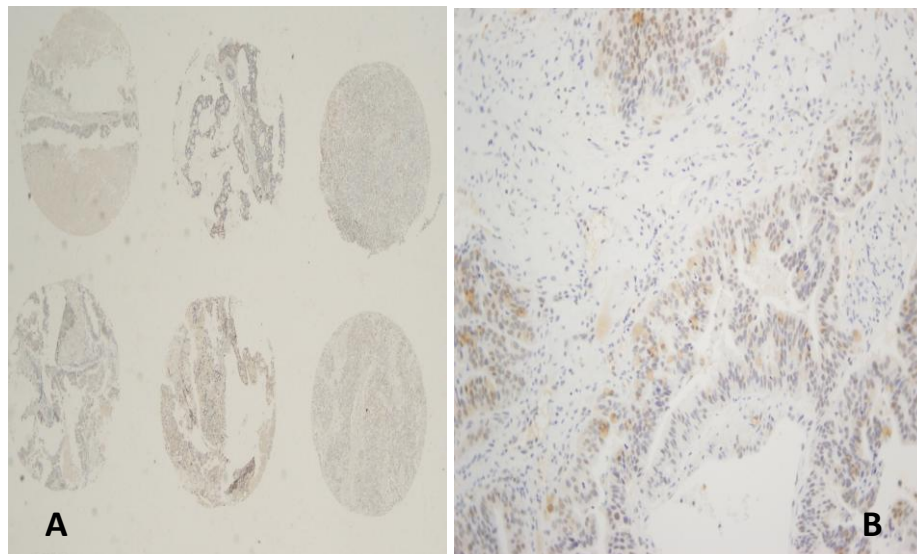


Figura 26. IHQ de CDK8 a 4X (A) y 20X (B) en la que no se detecta inmunotinción en ninguno de los cores (A). En la figura B se observa la tinción positiva en el 25% de las células a nivel nuclear en un caso seleccionado

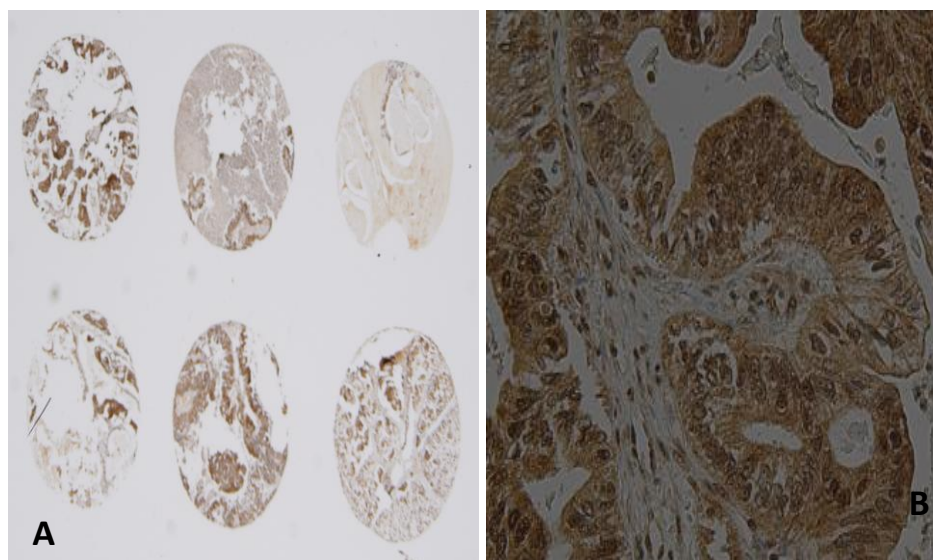


Figura 27. IHQ de pRb a 4X (A) y 20X (B) en la que se detecta inmunotinción en todos los cores (A). En la figura B se observa la tinción positiva en más del 75% de las células a nivel nuclear en un caso seleccionado

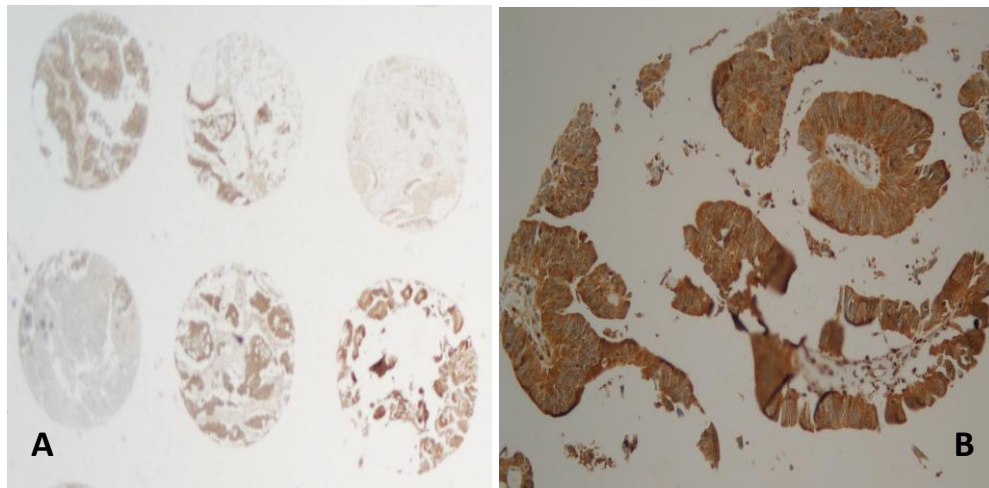


Figura 28. IHQ de ciclina D1 a 4X (A) y 20X (B) en la que se detecta inmunotinción a nivel nuclear en cinco de los seis cores (A). En la figura B se observa la tinción positiva entre el 25 y el 50% de las células a nivel nuclear en un caso seleccionado

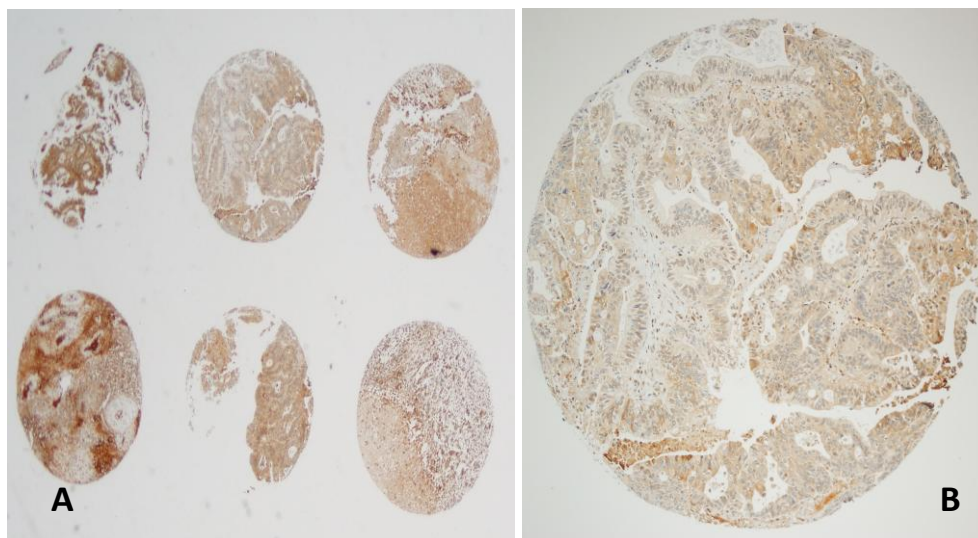


Figura 29. IHQ de C-Myc a 4X (A) y 10X (B) en la que se detecta inmunotinción a nivel nuclear en los seis cores (A). En la figura B se observa la tinción positiva entre el 25 y el 50% de las células a nivel nuclear en un caso seleccionado

4.7.4. Interpretación de datos

Los resultados de la IHQ fueron valorados por dos patólogos familiarizados con la morfología de los ITACs, sin el conocimiento de datos clínico-patológicos.

Las tinciones fueron clasificadas de forma separada, discutiendo aquellos casos en que la valoración fue discordante para llegar a un consenso.

Se utilizaron escalas de medida semicuantitativa que valoraron sobre todo el porcentaje de células teñidas y en menor medida la intensidad de tinción, tanto a nivel de la membrana citoplasmática como en el núcleo. Estas escalas para los distintos inmunorreactivos estudiados se representan en las tablas XIV y XV.

Tabla XIV. Escala de valoración de la inmunotinción para E-cadherina y β -catenina

Ac primario	Lugar de tinción	Intensidad de tinción		
		Negativa	Positiva débil	Positiva
E-cadherina	Membrana			
β -catenina	Membrana			
	Núcleo			

Tabla XV. Escala de valoración de la inmunotinción para p16, E2F1, CDK8, pRb, Ciclina D1 y C-Myc

Ac primario	Lugar de tinción	Intensidad de tinción				
		Negativa	<25%	25-50%	50-75%	>75%
p16	Núcleo					
E2F1	Núcleo					
CDK8	Núcleo					
pRb	Núcleo					
Ciclina D1	Núcleo					
C-Myc	Núcleo					

4.8. Descripción de variables

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



1. Edad (años)
2. Género (masculino o femenino)
3. Hábito tabáquico (sí y no)
4. Consumo habitual de alcohol (sí y no)
5. Exposición a polvo de madera (sí y no)
6. Tiempo de exposición al polvo de la madera (años)
7. Tipo histológico (papilar, colónico, sólido y mucinoso)
8. Estadio TNM (I, II, III, IV)
9. Invasión intracraneal (sí y no)
10. Radioterapia postoperatoria (sí y no)
11. Presencia de recidiva (sí y no)
12. Presencia de metástasis (sí y no, lugar)
13. Tiempo libre de enfermedad (en meses)
14. Supervivencia global (en %)
15. Supervivencia específica de enfermedad (en %)
16. Supervivencia libre de enfermedad (en %)
17. Estado del paciente (vivo sin tumor, muerto por tumor, muerto por otra causa)
18. Mortalidad por el tumor (sí y no, %)
19. Tiempo de seguimiento (media, mínimo y máximo)

Las **variables génicas** definidas por **m-CGH** fueron: pérdida, ganancia y amplificación de la región cromosómica codificadora de los genes *CDH1*, *CTNNB1*, *CDKN2A*, *APC*, *E2F1*, *RB*, *CDK8*, *MYC*, *CCND1*. Un valor de 1 para la relación de fluorescencia verde/rojo sería normal, un valor inferior a 0,8 indicaría pérdida, mayor de 1,2 ganancia y mayor de 2, amplificación.

Las **variables génicas** obtenidas con **MLPA** fueron: pérdida, ganancia y amplificación de los genes *CDH1*, *CTNNB1*, *CDKN2A*, *RB*, *CCND1*, *MYC*, con valores similares a los de m-CGH.



Las **variables génicas** obtenidas con **MLPA-MS** fueron la presencia o ausencia de metilación en los genes *CDKN2A* y *APC*.

Las **variables de expresión proteica** mediante el empleo de los TA valoraron la inmunotinción para E-cadherina (membrana) y β -catenina (membrana y nuclear), ambas clasificadas como positiva, positiva débil o negativa. Para p16, E2F1, CDK8, pRb, Ciclina D1 y C-Myc se valoró la tinción nuclear con una escala de rangos que iban desde la ausencia de expresión, expresión entre 1-25%, entre 25-50%, entre 50-75% y de más del 75%, considerándose como sobreexpresión cuando las células teñidas eran más del 50%.

4.9. Análisis estadístico

Las ganancias y pérdidas génicas (m-CGH y MLPA), la metilación (MLPA-MS) y la expresión proteica (IHQ), así como las variables clínico-patológicas, han sido analizadas estadísticamente mediante el programa informático SPSS ("Statistical Package for Social Science"), versión 12.0 para Windows (SPSS® Inc. Illinois, EE.UU).

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

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

Se realizó un estudio multivariante para determinar las variables que de forma independiente influían sobre la supervivencia, realizando la regresión de Cox mediante el método hacia adelante ("Razón de verosimilitud"RV).



Por último, llevamos a cabo un estudio de concordancias/discordancias entre los pasos establecidos en nuestro modelo teórico para la ruta Wnt. Este estudio se realizó en cada caso, comprobando si las proteínas que facilitaban o inhibían el paso siguiente eran concordantes con lo observado en las variables de expresión proteica, calculando estos resultados en porcentajes de concordancia/discordancia. Es un recurso cualitativo que permite intuir si la ruta Wnt sigue una determinada dirección y es compatible con lo esperado si estuviese activa, aunque no debemos obtener de su interpretación el carácter de significación estadística. Establecemos tres grados de concordancia, teniendo en cuenta que el azar estaría en torno al $50\pm 5\%$. Así, el primero (bajo) es cuando el nivel de concordancia con lo esperado se sitúa entre $\geq 55\%$ y $< 65\%$, el segundo (intermedio) entre $\geq 65\%$ y $< 75\%$ y el tercero (alto) cuando es $\geq 75\%$. De igual modo el carácter discordante se clasificó en tres grados: bajo ($\geq 55\%$ y $< 65\%$), intermedio ($\geq 65\%$ y $< 75\%$) y alto ($\geq 75\%$).





5. RESULTADOS

5.1. Aspectos clínico-patológicos

5.1.1. Datos descriptivos de los ACNS

5.1.1.1. Aspectos clínico-patológicos

En los **101 pacientes** que componían el grupo completo de ACNS tipo ITAC de nuestro estudio observamos las siguientes características:

La **edad media** al diagnóstico fue de 65 años (mediana: 66; moda: 64), con un rango de 40 a 92 años. El **género** de los pacientes fue mayoritariamente masculino, 99 de los 101 casos (98%). En relación a los hábitos tóxicos 54 pacientes (53,5%) eran **fumadores**, mientras que 52 (51,5%) consumían de forma habitual **alcohol** y 44 (44%) tenían los dos hábitos (Figura 30).

La exposición laboral al **polvo de madera** estaba presente en 81 pacientes (80,2%), con un tiempo medio de exposición de 31 años (mediana: 35 años, moda 50 años) y un rango entre 1 y 60 años (Figura 30). En 48 pacientes (47,5%) la exposición al polvo de madera era de más de 30 años.

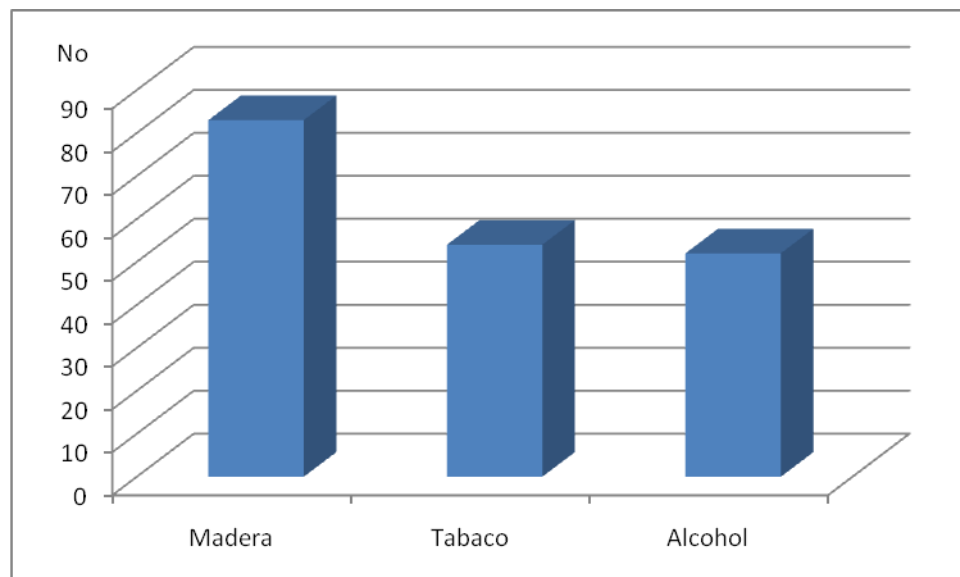


Figura 30. Factores externos de riesgo en los ACNS (n=101)

El **subtipo histológico** de los ACNS tipo ITAC fue de 46 colónicos (45,5%), 27 mucinosos (26,7%), 13 papilares (12,9%), 13 sólidos (12,9%) y 2 (2%) casos que no pudieron ser clasificados en ninguno de estos subtipos (Figura 31).

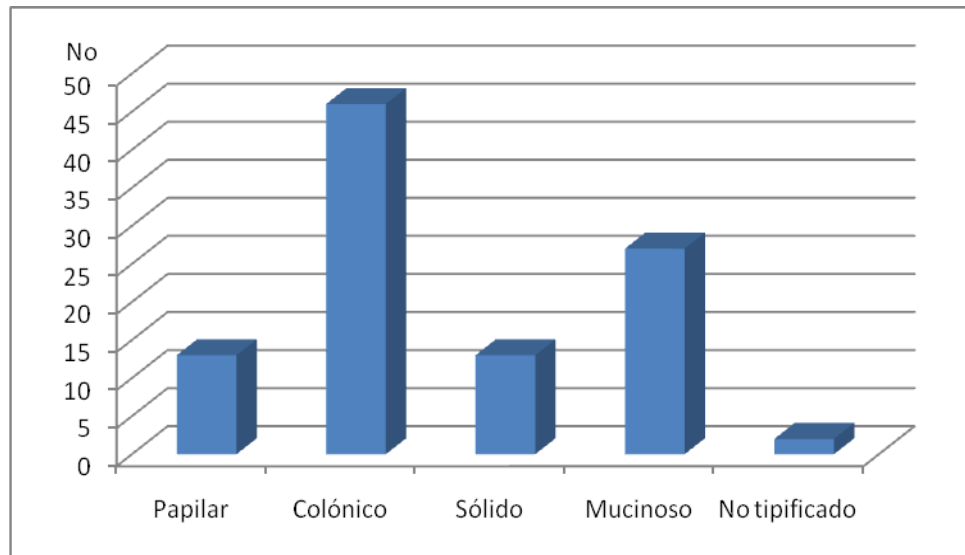


Figura 31. Clasificación de los ACNS según el subtipo histológico

La clasificación por **estadios** de los ACNS fue de 28 en estadio I (27,7%), 13 en estadio II (12,9%), 35 en estadio III (33,6%), 12 en estadio IVa (11,9%) y 13 en estadio IVb (12,9%) (Figura 32).

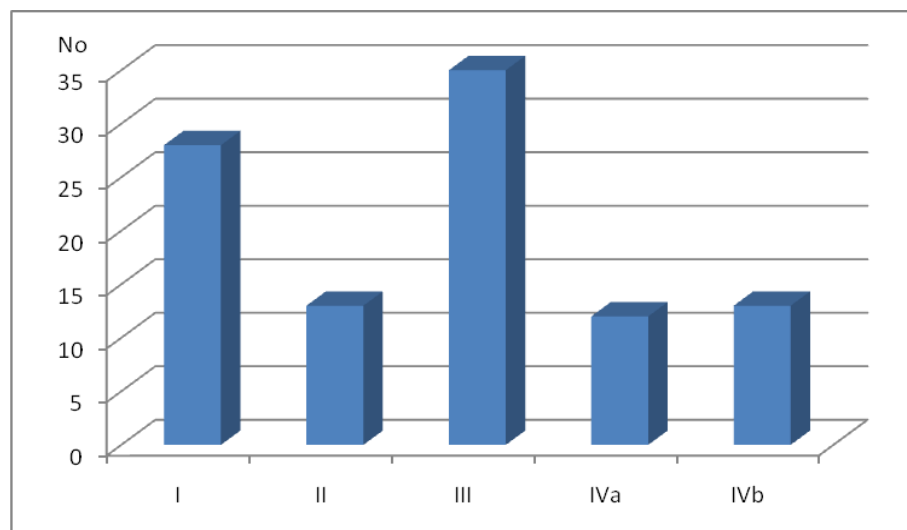


Figura 32. Clasificación de los ACNS según el estadio

Al estudiar la **invasión intracraneal** encontramos que 18 pacientes (17,8%) la presentaban al diagnóstico.

Tras la cirugía, 65 pacientes (65,3%) recibieron tratamiento complementario con **radioterapia** (16 pacientes estadio I (57% estadios I), 7 pacientes estadio II (54%), 23 pacientes estadio III (70%), 8 pacientes estadio IVa (67%) y 11 pacientes estadio IVb (85%)). El resto de pacientes a los que no se administró tenían tumores en estadios precoces o fallecieron antes de recibir dicho tratamiento.

Tras el tratamiento inicial y durante el seguimiento 47 pacientes presentaron **recidivas** (46,5%) y 17 (16,8%) **metástasis**, 7 de estos pacientes desarrollaron conjuntamente recidivas locales y metástasis (Figura 33). El lugar anatómico donde más se presentaron las metástasis fue el cerebro (58%), seguido por el hueso (25%), ganglios linfáticos (17%), hígado (8%) y pulmón (8%).

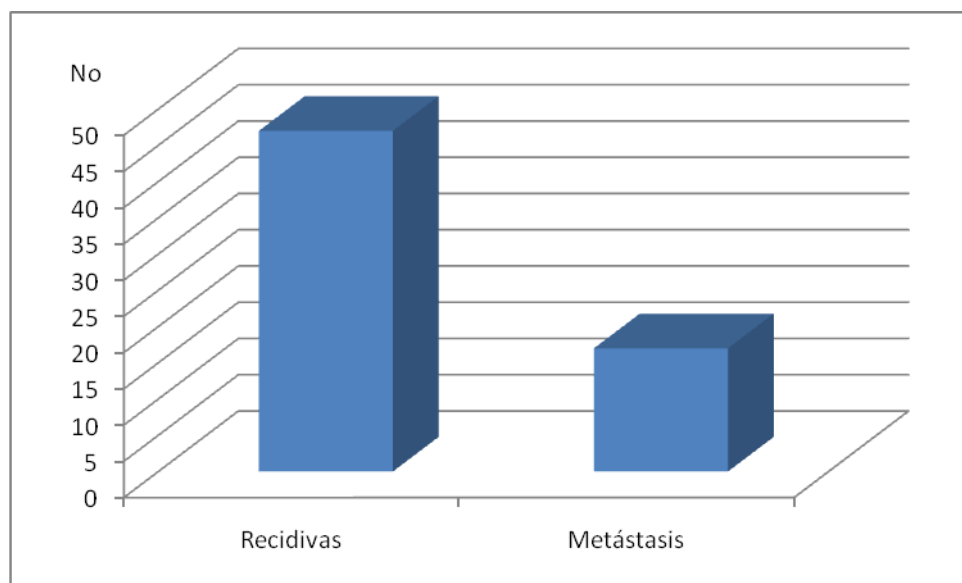


Figura 33. Casusas de fallo en el tratamiento en los pacientes con ACNS

El **tiempo libre de enfermedad** desde que se intervino quirúrgicamente al paciente hasta que presentó una recidiva fue de 19 meses con un rango de 1-173 meses. El tiempo medio desde la intervención hasta el desarrollo de la metástasis fue de 8 meses con un rango de 1-16 meses.

El **estado final** de los pacientes fue que 44 fallecieron por causa del tumor (43,6%), 15 fallecieron por otras causas (14,8%) y los 42 restantes (41,6%) seguían vivos, libres de tumor, al final del seguimiento (Figura 34).

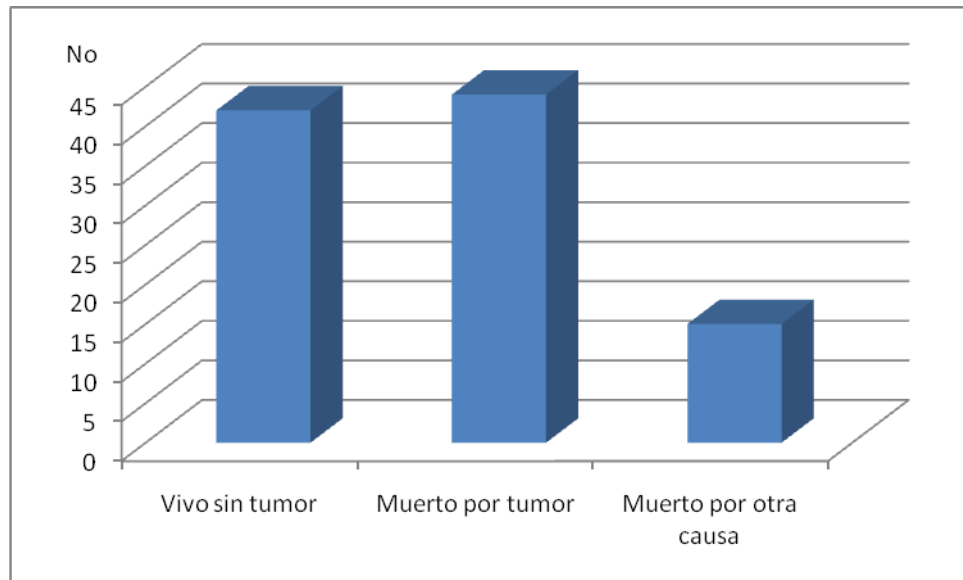


Figura 34. Evolución final de los pacientes con ACNS

La **supervivencia global** de los pacientes fue del 42,5% a los 5 años de seguimiento (Figura 35).

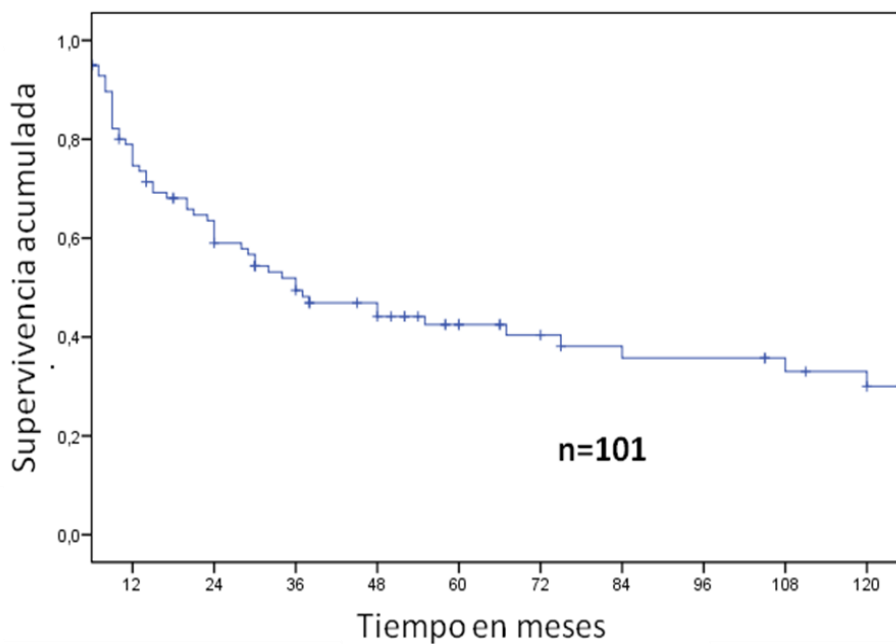


Figura 35. Supervivencia global de los pacientes con ACNS

La **supervivencia específica** de enfermedad fue del 50,2% a los 5 años de seguimiento (Figura 36).

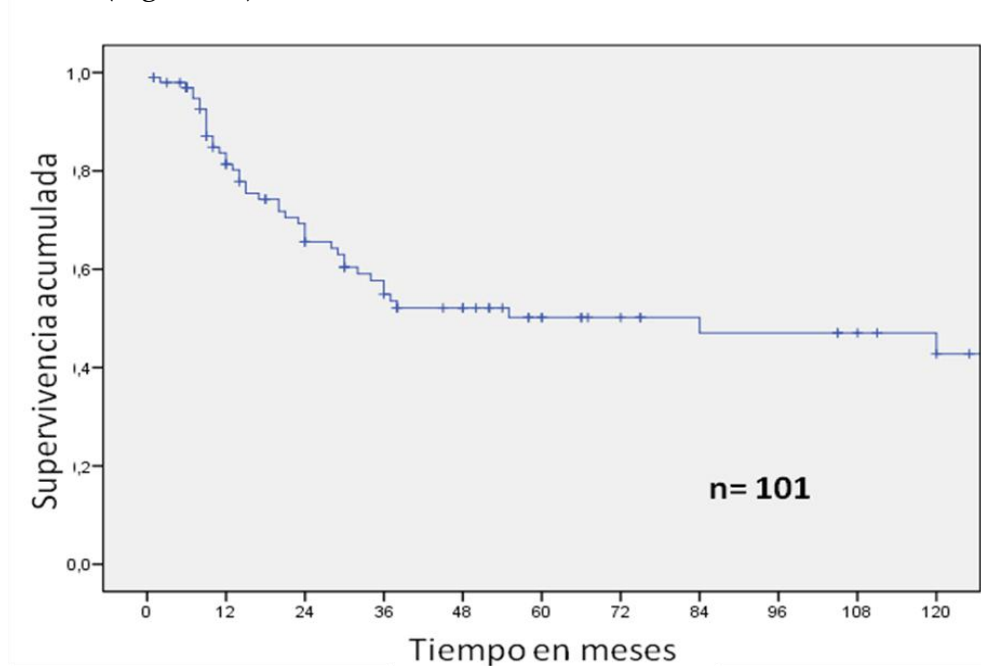


Figura 36. Supervivencia específica de la enfermedad de los pacientes con ACNS

La **supervivencia libre de enfermedad** a los 5 años de seguimiento fue de 36% (Figura 37).

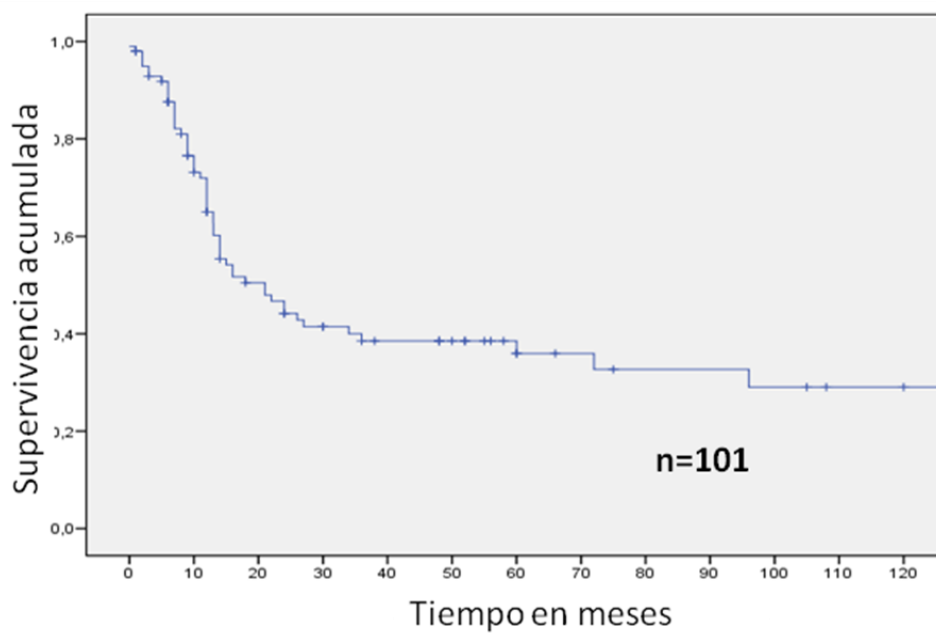


Figura 37. Supervivencia libre de enfermedad de los pacientes con ACNS

El **seguimiento medio** de los pacientes fue de 46 meses con un rango de 5 a 252 meses.

5.1.2. Relaciones de las variables clínico-patológicas con la supervivencia en los ACNS

5.1.2.1. Supervivencia específica y variables clínico-patológicas

Por su especial trascendencia clínica se relaciona la supervivencia específica de enfermedad con el resto de variables clínico-patológicas.

Al estudiar la supervivencia específica según el **subtipo histológico**, encontramos mayor supervivencia para los subtipos papilar y colónico al compararlos con el sólido y mucinoso, de forma estadísticamente significativa ($p=0,001$; figuras 38 y 39).

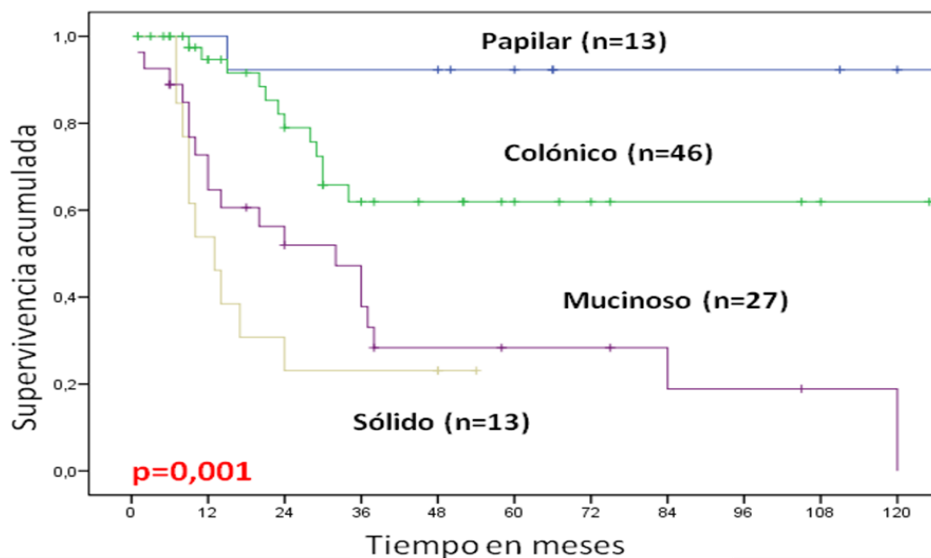


Figura 38. Supervivencia específica en relación con el subtipo histológico (n=99)

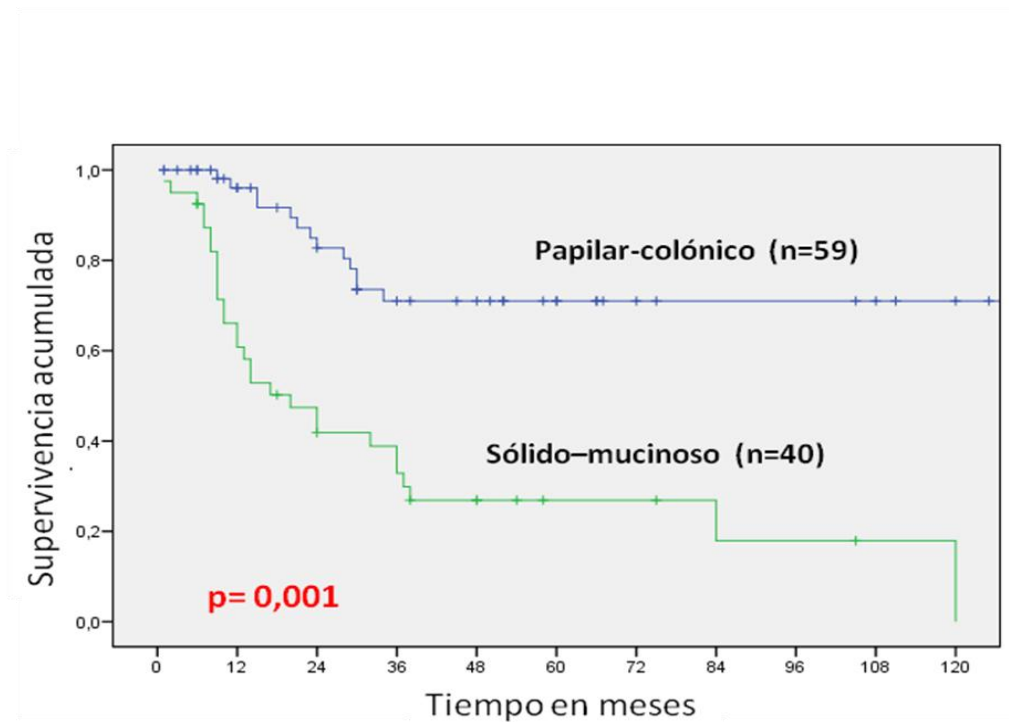


Figura 39. Supervivencia específica en relación con el subtipo histológico agrupado (n=99)

Al estudiar la supervivencia específica según el **estadio tumoral**, encontramos mayor supervivencia para los estadios precoces, que desciende considerablemente en los estadios IVa y IVb, alcanzando esa diferencia valores significativos ($p=0,001$; figuras 40 y 41).

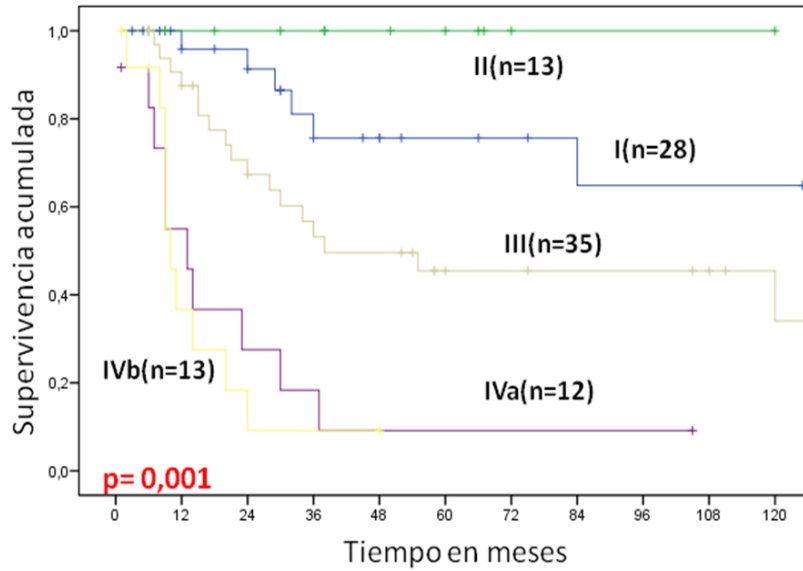


Figura 40. Supervivencia específica en relación al estadio (n=101)

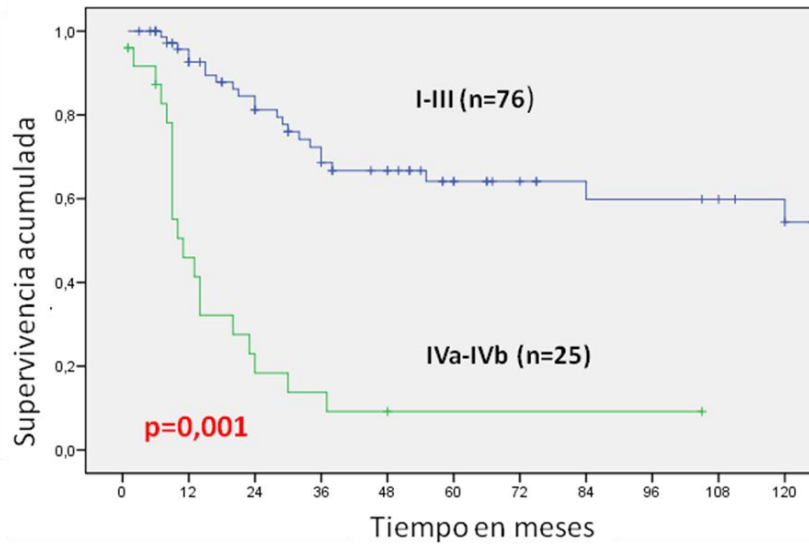


Figura 41. Supervivencia específica en relación al estadio agrupado (n=101)

Al estudiar la supervivencia específica ente los pacientes con **invasión intracraneal**, encontramos una peor supervivencia en los pacientes que la presentaban, siendo esa diferencia estadísticamente significativa ($p=0,001$; figura 42).

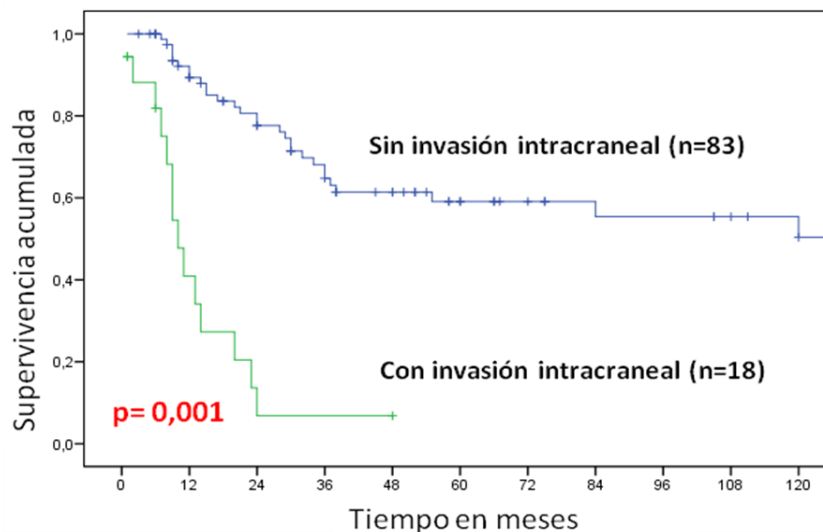


Figura 42. Supervivencia específica en relación a la invasión intracraneal (n=101)

Al estudiar la supervivencia específica en los pacientes con **recidiva y metástasis**, encontramos una peor supervivencia en los pacientes que las presentaban, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0,001$; figuras 43, 44 y 45).

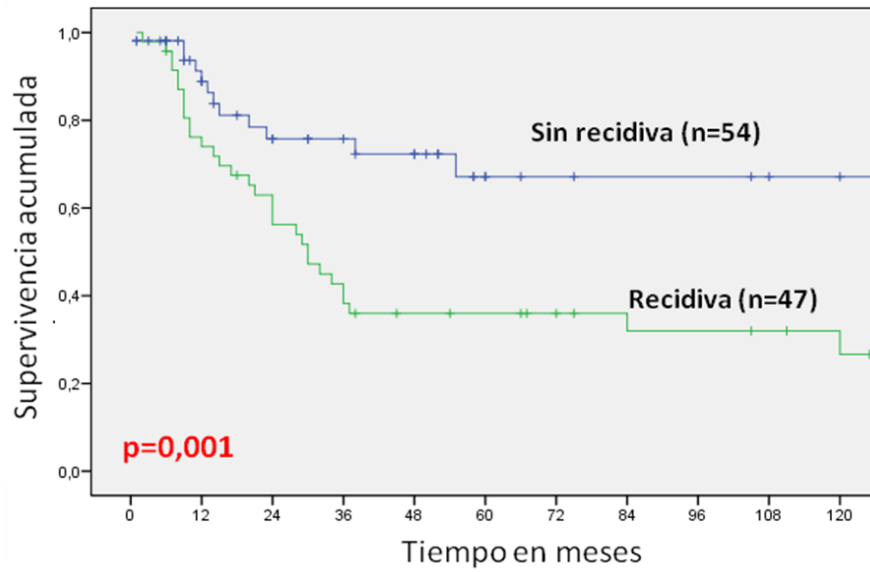


Figura 43. Supervivencia específica en relación al desarrollo de recidivas (n=101)

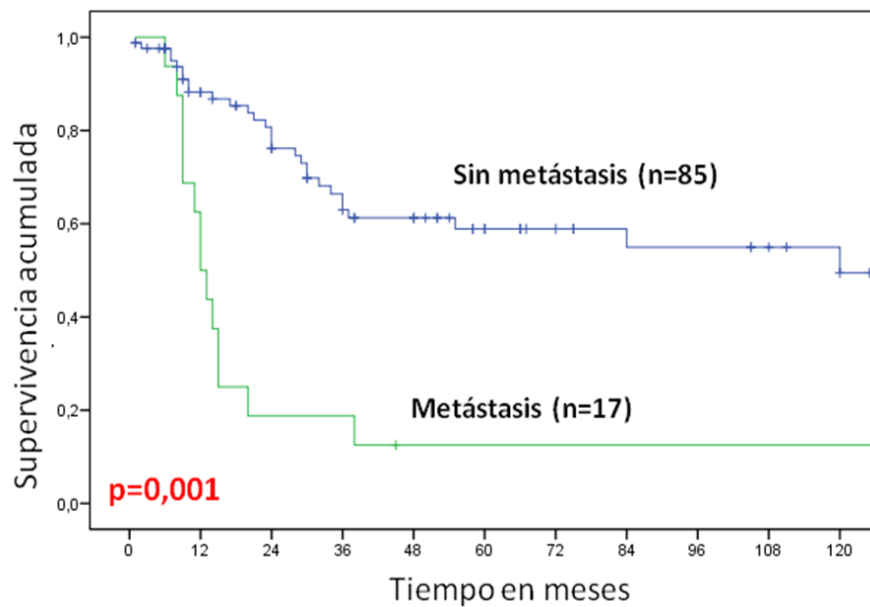


Figura 44. Supervivencia específica en relación al desarrollo de metástasis (n=101)

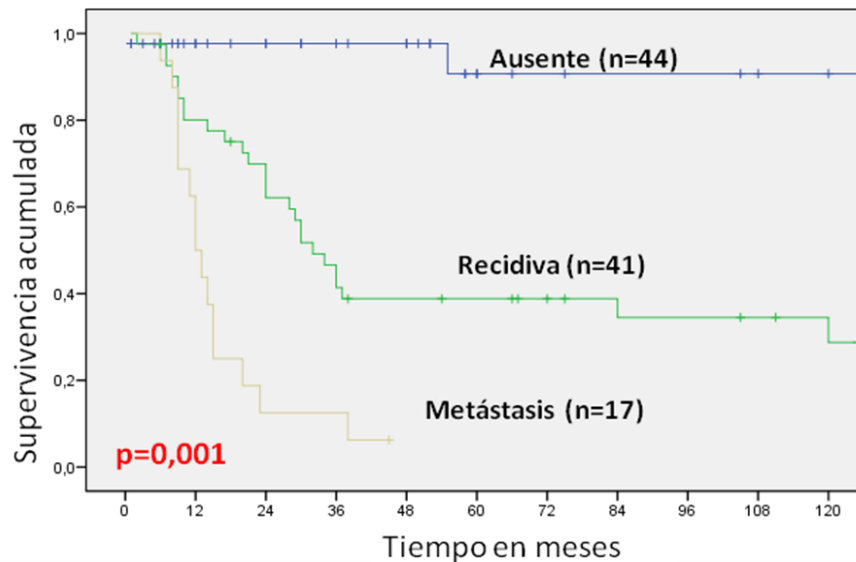


Figura 45. Supervivencia específica en relación al desarrollo de recidivas o metástasis (n=101)

No se encontró relación estadísticamente significativa entre la supervivencia específica de la enfermedad y el tiempo de exposición al polvo de madera, ser fumador, consumir alcohol o haber recibido tratamiento complementario con radioterapia.

5.1.2.2. *Supervivencia libre de enfermedad y variables clínico-patológicas*

Se relaciona a la supervivencia libre de enfermedad con el resto de las variables clínico-patológicas.

Al estudiar la supervivencia libre de enfermedad según el **subtipo histológico**, encontramos una mayor supervivencia para los subtipos papilar y colónico al compararlos con los sólidos y mucinosos, de forma estadísticamente significativa ($p=0,001$; figuras 46 y 47).

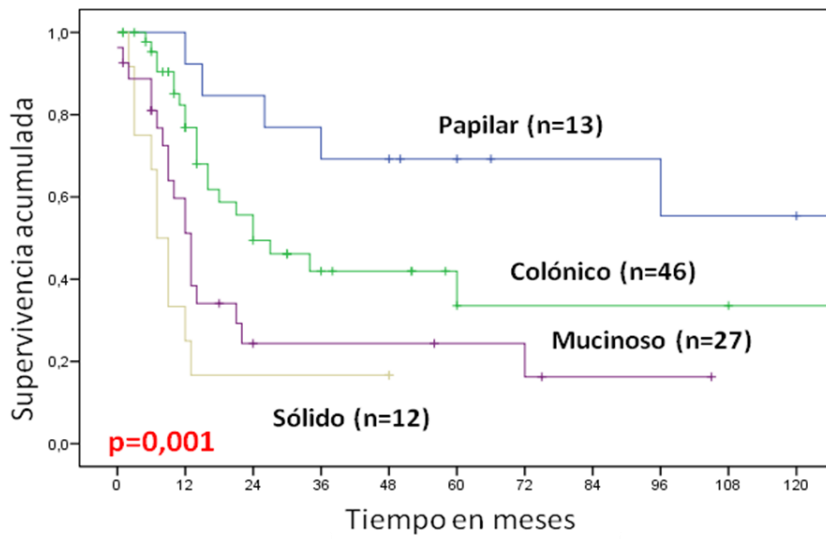


Figura 46. Supervivencia libre de enfermedad en relación con el subtipo histológico (n=98)

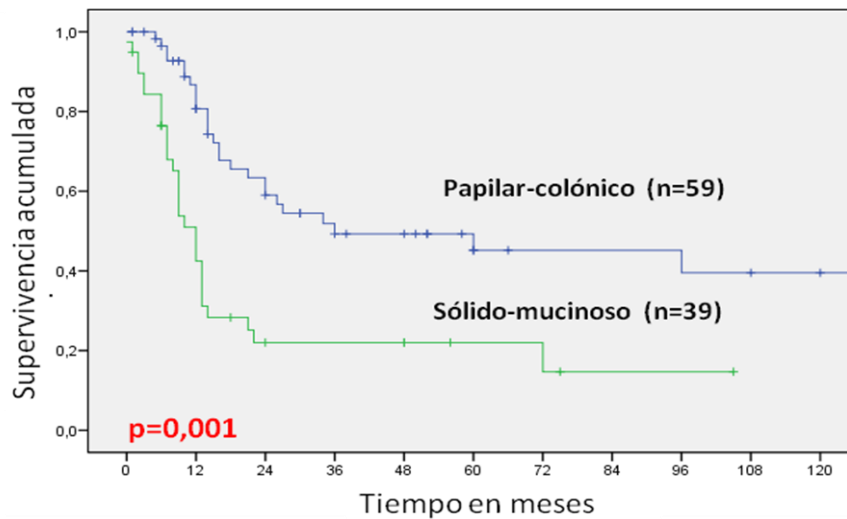


Figura 47. Supervivencia libre de enfermedad en relación con el subtipo histológico agrupado (n=98)

Al estudiar la supervivencia libre de enfermedad según el **estadio tumoral**, encontramos que conforme avanzaba el estadio disminuye la supervivencia libre de enfermedad, de forma estadísticamente significativa ($p=0,001$; figuras 48 y 49).

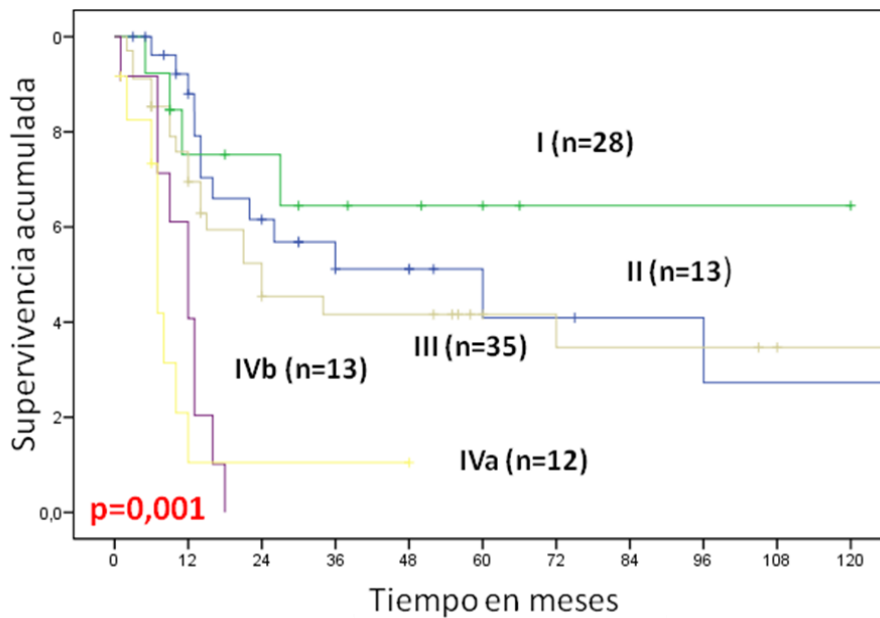


Figura 48. Supervivencia libre de enfermedad en relación con el estadio (n=101)

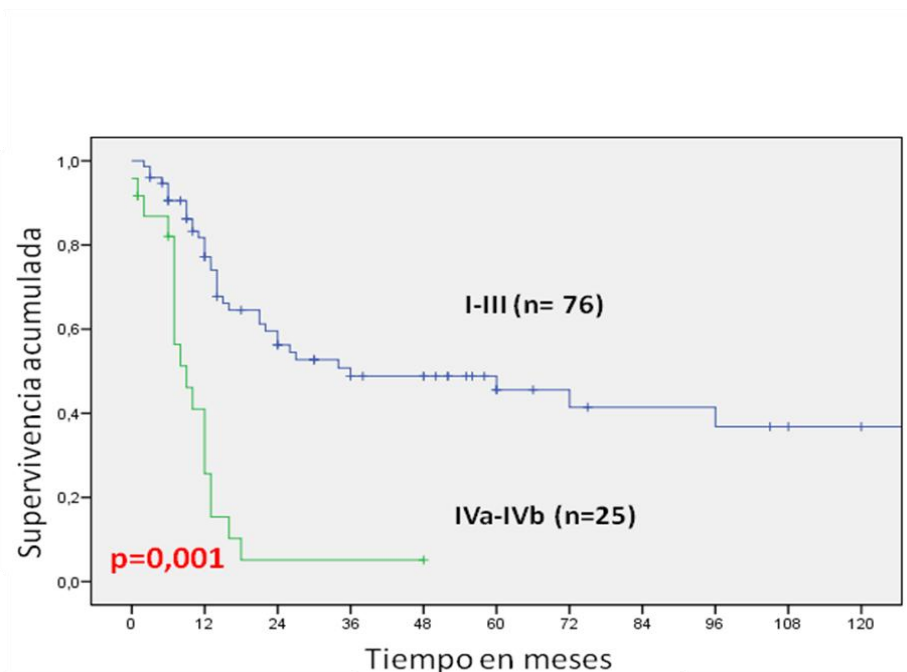


Figura 49. Supervivencia libre de enfermedad en relación con el estadio agrupado (n=101)

Al estudiar la supervivencia libre de enfermedad entre los pacientes con **invasión intracraneal**, encontramos peor supervivencia en los que la presentaban, siendo esa diferencia estadísticamente significativa ($p=0,001$; figura 50).

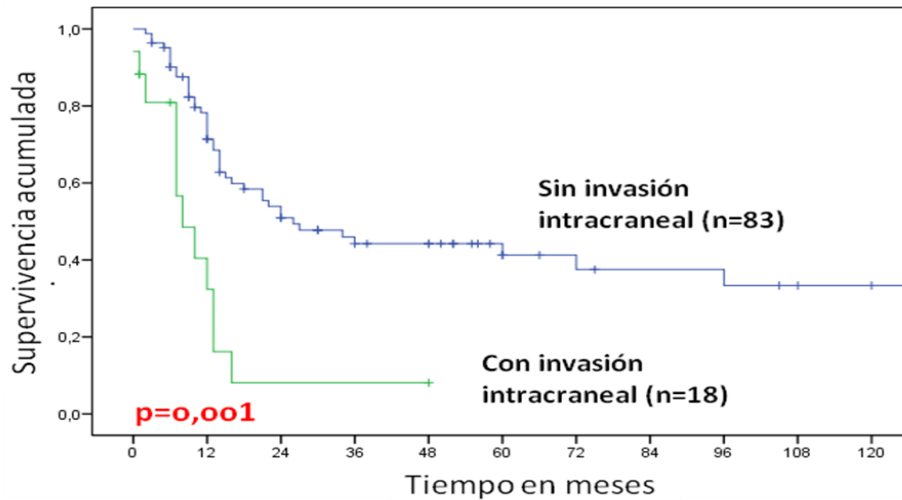


Figura 50. Supervivencia libre de enfermedad en relación con la invasión intracraneal (n=101)

No se encontró relación estadísticamente significativa entre la supervivencia libre de enfermedad y el resto de las variables clínico-patológicas estudiadas.

5.1.3. *Análisis multivariante de las variables clínicas que influyen en la supervivencia*

5.1.3.1. *Supervivencia específica de la enfermedad*

Se realizó un análisis multivariante para determinar las variables que influyen de forma independiente en la supervivencia específica de la enfermedad. Se estudiaron las variables estadio tumoral, dicotomizada como estadios I-III *versus* IV, subtipos histológicos dicotomizados como bien diferenciados (papilares y colónicos) *versus* poco diferenciados (sólidos-mucinosos), la invasión intracraneal y la administración de radioterapia postoperatoria, que resultaban significativas en el estudio univariante.

Mediante este análisis multivariante se identificaron dos variables que de forma independiente predicen menor supervivencia específica de la enfermedad, como son el estadio tumoral y el subtipo histológico (Tabla XVI).

Tabla XVI. Análisis multivariante para determinar el mal pronóstico (regresión de Cox mediante el método hacia delante RV)

Variable	RR	IC (95%)	P
Estadio IV	4,7	2,4-9,3	<i>p=0,001</i>
Poco diferenciados	3,1	1,6-6,4	<i>p=0,002</i>

RR: Riesgo relativo, IC: intervalo de confianza

5.1.3.2. Supervivencia libre de enfermedad

Se realizó un análisis multivariante para determinar las variables que influyen de forma independiente en la supervivencia libre de enfermedad. Se estudiaron las variables estadio tumoral, dicotomizada como estadios I-III *versus* IV, subtipos histológicos dicotomizados como bien diferenciados (papilares y colónicos) *versus* poco diferenciados (sólidos-mucinosos), la presencia de invasión intracraneal y la administración de radioterapia postoperatoria, que resultaban significativas en el estudio univariante.

Mediante este análisis multivariante se identificaron dos variables que de forma independiente predicen una menor supervivencia libre de enfermedad, como son el estadio tumoral y el subtipo histológico (Tabla XVII).

Tabla XVII. Análisis multivariante para determinar el mal pronóstico (regresión de Cox mediante el método hacia delante RV)

Variable	RR	IC (95%)	P
Estadio IV	3,5	1,9-6,7	<i>p=0,001</i>
Poco diferenciados	2,0	1,1-3,5	<i>p=0,024</i>

RR: riesgo relativo, IC: intervalo de confianza

5.2. Aspectos genéticos

5.2.1. Datos descriptivos de los ACNS

El estudio genético de los pacientes con ACNS tipo ITAC se llevó a cabo mediante el análisis del número de copias de los genes para detectar la presencia de ganancias, pérdidas o amplificaciones. Se utilizaron dos técnicas: los m-CGH y la MLPA.

5.2.1.1. Microarray-CGH

La técnica de m-CGH se realizó en muestras en fresco de 35 pacientes para valorar los genes *CDH1*, *CTNNB1*, *E2F1*, *CCND1*, *RB*, *APC*, *CDK8*, *CDKN2A* y *MYC*, todos ellos relacionados con la ruta WNT.

En 29 de los 35 pacientes (82,9%) se detectó al menos una anomalía en el número de copias de los genes anteriormente descritos.

Se detectaron **pérdidas** en los genes de la vía canónica Wnt en 20 ocasiones (Tabla XVIII y figura 51).

El gen *APC* fue el que presentó mayor número de pérdidas (17,1%) seguido por *CDKN2A* (11,4%). No se detectaron pérdidas en *E2F1* ni en *CCND1*.

Tabla XVIII. Pérdidas en los genes de la ruta Wnt detectadas mediante m-CGH

Gen	Nº Pérdidas	Porcentaje (%)
<i>APC</i>	6	17,1
<i>CDKN2A</i>	4	11,4
<i>CTNNB1</i>	3	8,6
<i>CDH1</i>	2	5,7
<i>RB</i>	2	5,7
<i>CDK8</i>	2	5,7
<i>MYC</i>	1	2,9
<i>E2F1</i>	0	0
<i>CCND1</i>	0	0

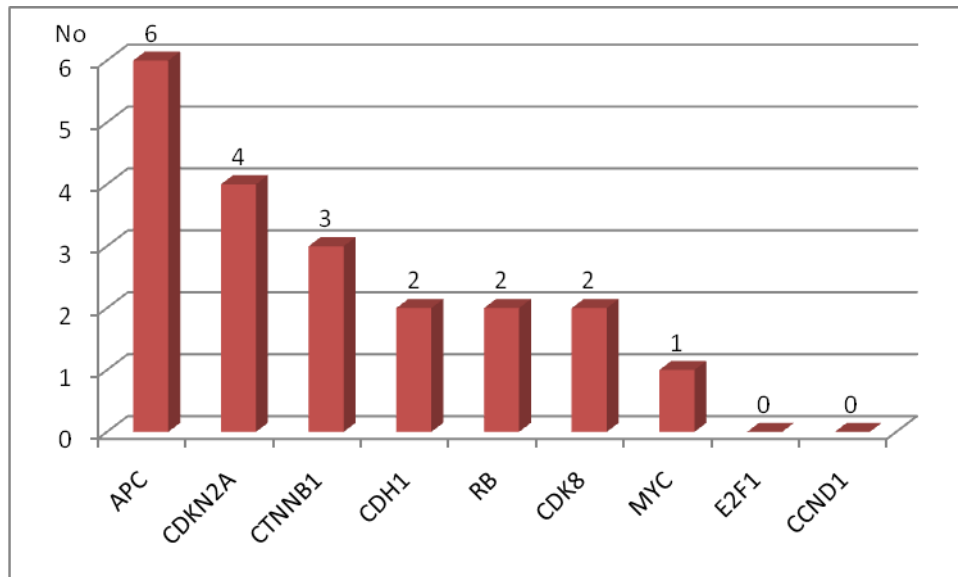


Figura 51. Pérdidas en los genes de la ruta Wnt (m-CGH)

Se detectaron **ganancias** en los genes de la vía canónica Wnt en 47 ocasiones (Tabla XIX y figura 52).

El gen *E2F1* fue el que presentó mayor número de ganancias (40%) seguido por *MYC* (37,1%). No se detectaron ganancias en *APC*.

Tabla XIX. Ganancias en los genes de la ruta Wnt detectadas mediante m-CGH

Gen	Nº Ganancias	Porcentaje (%)
<i>E2F1</i>	14	40
<i>MYC</i>	13	37,1
<i>CDKN2A</i>	6	15,1
<i>CTNNB1</i>	5	14,3
<i>CCND1</i>	5	14,3
<i>CDH1</i>	2	5,7
<i>RB</i>	1	2,9
<i>CDK8</i>	1	2,9
<i>APC</i>	0	0

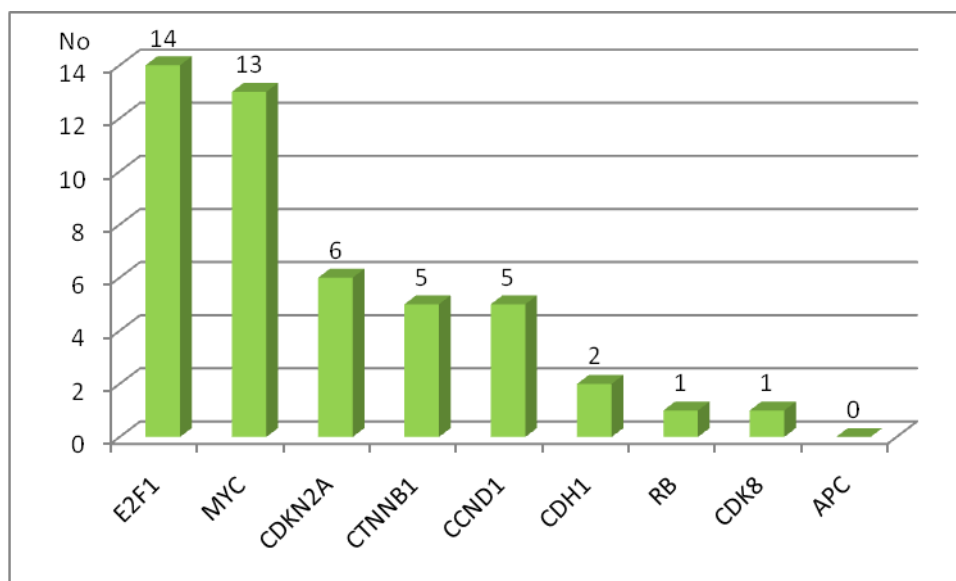


Figura 52. Ganancias en los genes de la ruta Wnt (m-CGH)

No se detectó ninguna **amplificación** en los genes de la vía anteriormente descritos.

5.2.1.2. MLPA

La técnica de MLPA (“SALSA P084” y “SALSA P005”) se realizó en muestras en fresco de 42 pacientes para los genes *CDH1*, *CTNNB1*, *CCND1*, *RB*, *APC*, *CDKN2A* y *MYC*.

En 36 de los 42 pacientes (86%) se detectó al menos una anomalía en el número de copias de los genes anteriormente descritos.

Se detectaron **pérdidas** en los genes de la vía canónica Wnt en 60 ocasiones (Tabla XX y figura 53).

El gen *APC* fue el que presentó mayor número de pérdidas (48,8%) seguido por *CDKN2A* (37%) y *CDH1* (26,2%). No se detectaron pérdidas en *RB* ni en *MYC*.

Tabla XX. Pérdidas en los genes de la ruta Wnt detectadas mediante MLPA

Gen	Nº Pérdidas	Porcentaje (%)
<i>APC</i>	23	48,9
<i>CDKN2A</i>	17	37
<i>CDH1</i>	11	26,8
<i>CCND1</i>	6	14,3
<i>CTNNB1</i>	3	7,3
<i>RB</i>	0	0
<i>MYC</i>	0	0

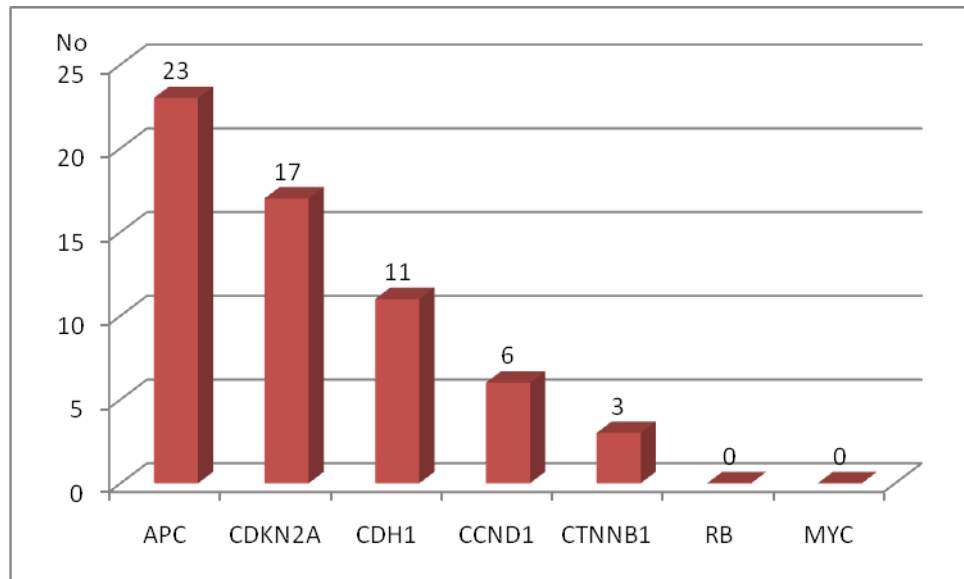


Figura 53. Pérdidas en los genes de la ruta Wnt (MLPA)

Se detectaron **ganancias** en los genes de la vía canónica Wnt en 42 ocasiones (Tabla XXI y figura 54).

El gen *MYC* fue el que presentó mayor número de ganancias (31%) seguido por *RB* (28,6%) y *CCND1* (21,4%). No se detectaron ganancias en *CDH1*.

Tabla XXI. Ganancias en los genes de la ruta Wnt detectadas mediante MLPA

Gen	Nº Ganancias	Porcentaje (%)
<i>MYC</i>	13	31
<i>RB</i>	12	28,6
<i>CCND1</i>	9	21,4
<i>CTNNB1</i>	5	11,9
<i>CDKN2A</i>	3	6,5
<i>APC</i>	2	4,3
<i>CDH1</i>	0	0

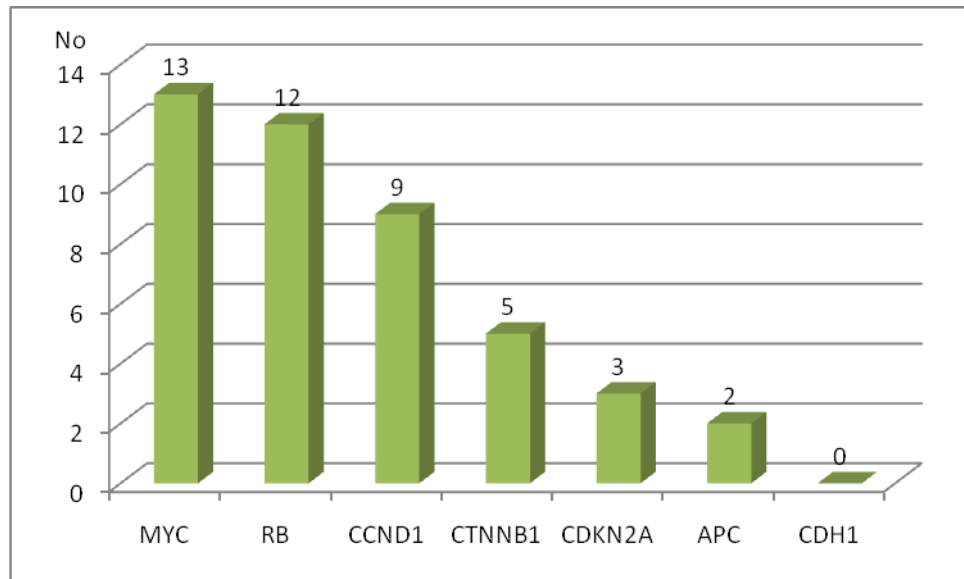


Figura 54. Ganancias en los genes de la ruta Wnt (MLPA)

Se detectaron dos **amplificaciones** en *APC* (4,8%) y en *CDKN2A* (4,8%), respectivamente. No se detectaron más amplificaciones en el resto de los genes de la vía anteriormente descritos.

5.2.1.3. MLPA-MS

La técnica de MLPA-MS (“SALSA MS-MLPA KIT ME001-C1 Tumor supresor-1”) se realizó en 47 pacientes para los genes *APC* y *CDKN2A*.

Se detectó **metilación** en *APC* en 2 ocasiones (4,3%), pero no se observó ninguna en *CDKN2A*.

5.2.2. Relaciones génicas

Se establecieron relaciones entre las variables génicas y el resto de variables estudiadas. Iremos describiendo las relaciones significativas observadas entre dichas variables.

5.2.2.1. Relación de las variables génicas con las clínico-histopatológicas

Encontramos que la **ganancia** de *CTNNB1* y la **pérdida** de *APC* tienen una relación estadísticamente significativa con las variables clínico-histológicas: subtipo histológico, estadio e invasión intracraneal, que a su vez guardan relación con la supervivencia específica y la supervivencia libre de enfermedad, tanto en el análisis univariante como en el multivariante (Tabla XXII y figura 55).

Tabla XXII. Relaciones significativas entre las variables génicas y las clínico-histológicas

Variables Clínico- histológicas	Subtipo histológico (mucinoso/sólido)		Estadio IV		Invasión intracraneal		Mortalidad por el tumor	
	Sí	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No
Génicas								
Ganancia <i>CTNNB1</i> (MLPA)	5/21	0/19	4/11	2/30	4/10	2/31	6/6	15/35
	<i>p</i> =0,049		<i>p</i> =0,035		<i>p</i> =0,024		<i>p</i> =0,024	
Pérdida <i>APC</i> (MLPA)	14/22	7/23	10/13	12/33	9/11	13/35	15/22	10/24
	<i>p</i> =0,038		<i>p</i> =0,021		<i>p</i> =0,015		<i>p</i> =0,071	

Test estadísticos: Chi cuadrado o prueba exacta de Fischer (cuando el valor de alguna de las casillas era ≤ 5)

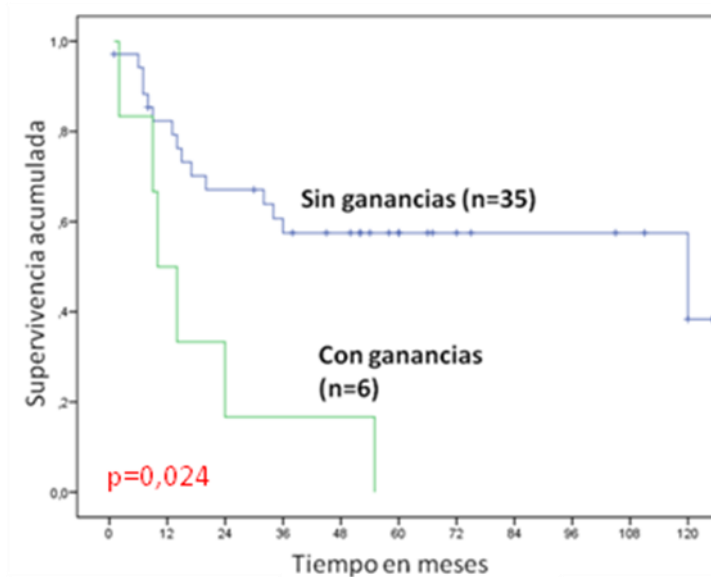


Figura 55. Supervivencia específica de la enfermedad y ganancias en *CTNNB1* por MLPA (n=41)

5.2.2.2. Relación entre las variables génicas

Encontramos relaciones estadísticamente significativas en los genes *CDKN2A*, *APC*, *CCND1*, *CTNNB1*, *CDK8*, *RB* y *CDH1*. Todas ellas se detallan en la tabla XXIII.

Tabla XXIII. Relaciones entre las variables génicas entre sí. Sólo se exponen las estadísticamente significativas

Variables Génicas	Ganancia <i>CDKN2A</i> (m-CGH)		Pérdida <i>APC</i> (MLPA)		Metilación <i>APC</i> (MLPA-MS)		Pérdida <i>CDKN2A</i> (m-CGH)		Ganancia <i>RB</i> (MLPA)		Ganancia <i>CCND1</i> (m-CGH)	
	Sí	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No
Ganancia <i>CTNNB1</i> (MLPA)			5/16	0/14								
			<i>p</i> =0,045									
Ganancia <i>CDK8</i> (m-CGH)							2/7	0/28				
							<i>p</i> =0,035					
Ganancia <i>RB</i> (MLPA)							4/7	4/28				
							<i>p</i> =0,033					
Pérdida <i>APC</i> (m-CGH)	4/6	3/29	5/15	0/13			4/7	2/28				
	<i>p</i> =0,009		<i>p</i> =0,044				<i>p</i> =0,009					
Pérdida <i>CDH1</i> (m-CGH)	1/3	0/32										
	<i>p</i> =0,005											
Ganancias <i>CCND1</i> (MLPA)											3/7	2/27
											<i>p</i> =0,048	
Pérdida <i>CDKN2A</i> (MLPA)					2/2	7/45	8/17	1/29	4/9	2/21		
					<i>p</i> =0,033		<i>p</i> =0,001		<i>p</i> =0,049			
Ganancias <i>CDKN2A</i> (MLPA)	3/3	8/43										
	<i>p</i> =0,011											

Test estadísticos: Chi cuadrado o prueba exacta de Fischer (Cuando el valor de alguna de las casillas era \leq a 5)

5.3. Expresión proteica

5.3.1. Datos descriptivos de los ACNS

Se realizaron un total de 92 estudios de IHQ, aunque el porcentaje de tinciones útiles varía en cada tipo de inmunotinción, debido a que algunos cores se perdieron, otros no tenían tumor o los TA estaban plegados y su valoración no era fiable.

Se realizaron 92 inmunotinciones para **E-cadherina** (el total de las muestras parafinadas), de las que fueron positivas 86 (93,5%), mientras que 6 (6,5%) presentaron tinción positiva débil, no observando tinciones negativas.

Al estudiar la **β -catenina** se obtuvieron 90 casos útiles, de los cuales 68 (75,6%) presentaron una expresión positiva a nivel de membrana, mientras que 16 (17,8%) fueron positivos débiles y sólo 6 (6,7%) fueron negativos. Al estudiar la expresión de la β -catenina a nivel nuclear, 63 (70%) fueron negativos y 27 (30%) fueron positivos.

En la tabla XXIV y en la figura 56 se muestran los valores de la inmunotinción para E-cadherina y β -catenina.

Tabla XXIV. Valoración de las inmunotinciones de E-cadherina y β -catenina

Proteína	E-cadherina	β -catenina membrana	β -catenina nuclear
Grado tinción	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)
Positivo	87 (93,5)	68 (75,6)	27 (30)
Positivo débil	6 (6,5)	16 (17,8)	0 (0)
Negativo	0 (0)	6 (6,7)	63 (70)
Total	93 (100)	90 (100)	90 (100)

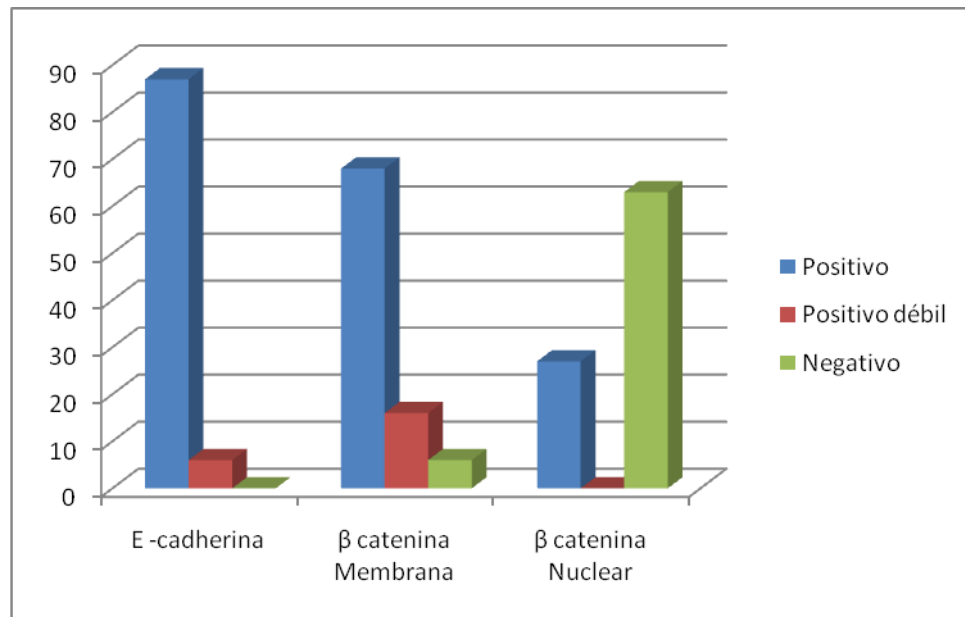


Figura 56. Valoración de las inmunotinciones de E-cadherina y β-catenina

Al estudiar **p16** encontramos que fue una tinción útil en 60 casos, de los cuales 40 (66,7%) fueron positivos y 20 (33,3%) negativos. Las tinciones positivas se catalogaron como 20 inmunotinciones (33,3%) entre 1-25% de las células teñidas, 13 (21,7%) entre el 25-50% y 7 (11,6%) entre el 50-75%. No hubo tinciones en más del 75% de las células.

Al estudiar **E2F1** se obtuvieron 87 casos útiles, de los cuales 66 (75,9%) fueron positivos y 21 (24,1%) negativos. Las tinciones positivas se catalogaron como 37 tinciones (42,5%) entre el 1-25% de las células teñidas, 16 (18,4%) entre el 25-50%, 10 (11,5%) entre el 50-75% y 3 (3,4%) con tinción en más del 75% de las células.

Al estudiar **CDK8** se obtuvieron 89 casos útiles, de los cuales 47 (52,8%) fueron positivos y 42 (47,2%) negativos. Las tinciones positivas se catalogaron como 42 tinciones (47,2%) entre el 1-25% de las células teñidas, 3 (3,4%) entre el 25-50% y 2 (2,2%) con tinción en más del 75% de las células.

Al estudiar **pRb** se obtuvieron 89 casos útiles, de los cuales 88 (98,9%) fueron positivos y 1 (1,1%) negativo. Las tinciones positivas se catalogaron como 4

tinciones (4,5%) entre el 1-25%, 10 (11,2%) entre el 25-50%, 15 (16,9%) entre el 50-75% y 59 (66,3%) con tinción en más del 75% de las células.

Al estudiar **Ciclina D1** se obtuvieron 86 casos útiles, de los cuales 48 (55,8%) fueron positivos y 38 (44,2%) negativos. Las tinciones positivas se catalogaron como 35 tinciones (40,7%) entre el 1-25%, 10 (11,6%) entre el 25-50%, 1 (1,2%) entre el 50-75% y 2 (2,3%) con tinción en más del 75% de las células.

Por último, al estudiar **C-Myc** se obtuvieron 89 casos útiles, de los cuales 87 (97,8%) fueron positivos y 2 (2,2%) negativos. Las tinciones positivas se catalogaron como 35 tinciones (39,3%) entre el 1-25%, 25 (28,1%) entre el 25-50%, 17 (19,1%) entre el 50-75% y 10 (11,2%) con tinción en más del 75% de las células.

Todos estos datos obtenidos por IHQ de las proteínas estudiadas se representan en la tabla XXV y en la figura 57.

Tabla XXV. Valoración de las inmunotinciones de p16, E2F1, CDK8, pRb, Ciclina D1 y C-Myc

Proteína	p16	E2F1	CDK8	pRb	Ciclina D1	C-Myc
Tinción	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)
Negativo	20 (33,33)	21 (24,1)	42 (47,2)	1 (1,1)	38 (44,2)	2 (2,2)
Positivo	40 (66,66)	66 (75,9)	47 (52,8)	88 (98,9)	48 (55,8)	87 (97,8)
1-25 %	20 (33,33)	37 (42,5)	42 (47,2)	4 (4,5)	35(40,7)	35 (39,3)
25-50%	13 (21,7)	16 (18,4)	3 (3,4)	10 (11,2)	10 (11,6)	25 (28,1)
50-75% *	7 (11,6)	10 (11,5)	0 (0)	15 (16,9)	1 (1,2)	17 (19,1)
>75%*	0	3 (3,4)	2 (2,2)	59 (66,3)	2 (2,3)	10 (11,2)
Total	60 (100)	87 (100)	89 (100)	89 (100)	86 (100)	89 (100)

* $\geq 50\%$ se considera sobreexpresión

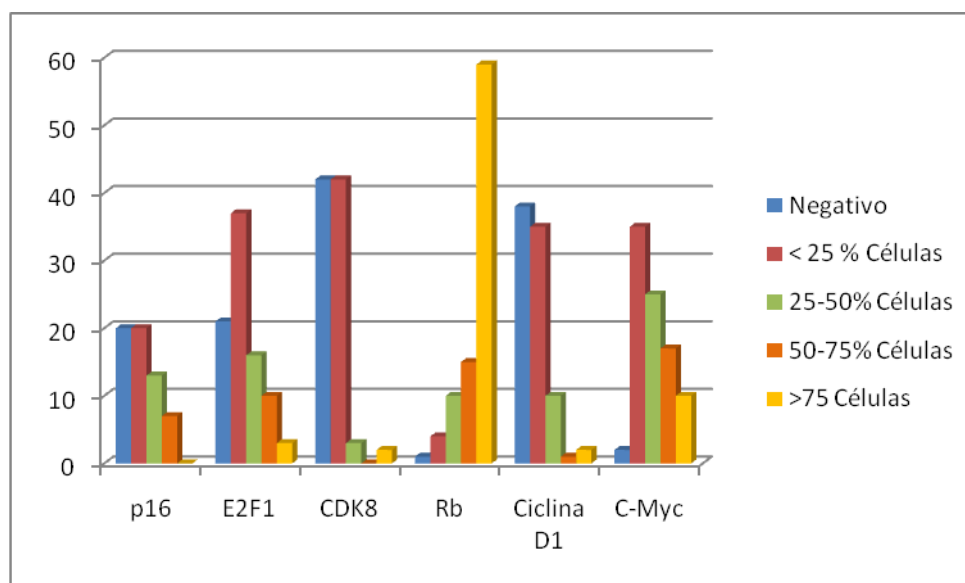


Figura 57. Valoración de las inmunotinciones de p16, E2F1, CDK8, pRb, Cyclina D1 y C-Myc

5.3.2. Relaciones en la expresión proteica

Se establecieron relaciones entre las variables de expresión proteica y el resto de variables estudiadas. Iremos describiendo las relaciones significativas observadas entre los diversos grupos estudiados.

5.3.2.1. Relación de las variables de expresión proteica con las clínico-histopatológicas

La sobreexpresión de CDK8 y Cyclina D1 tiene una relación significativa, en el análisis univariante, con la supervivencia específica (Figuras 58 y 59). La expresión nuclear de β -catenina en los subtipos histológicos papilares y colónicos tiene una relación significativa, en el análisis univariante, con la supervivencia específica (Figura 60), mientras que la ausencia de expresión de E-cadherina lo hace con los subtipos sólidos y mucinosos. En la tabla XXVI se muestran estas relaciones.

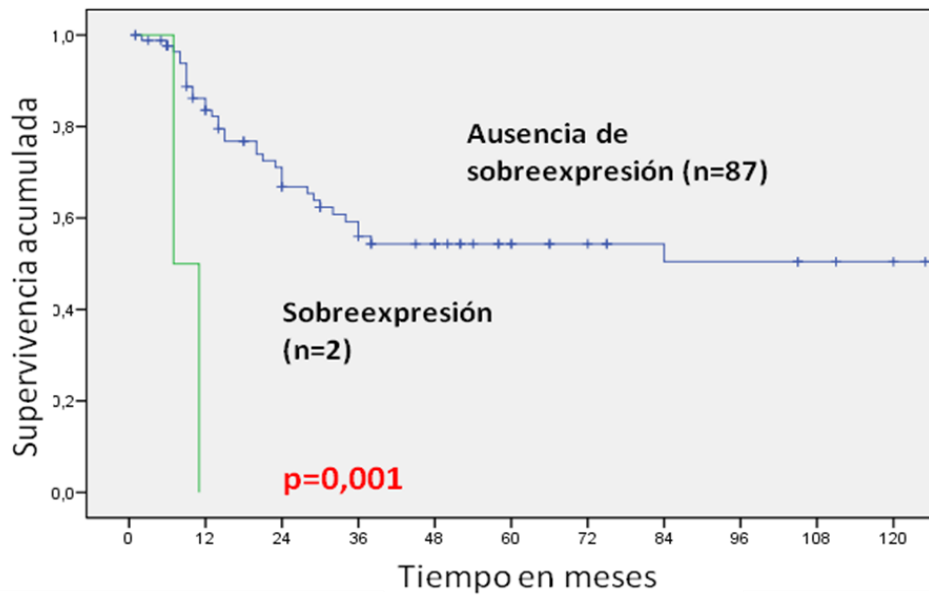


Figura 58. Supervivencia específica de la enfermedad y la sobreexpresión de CDK8 (n=89)

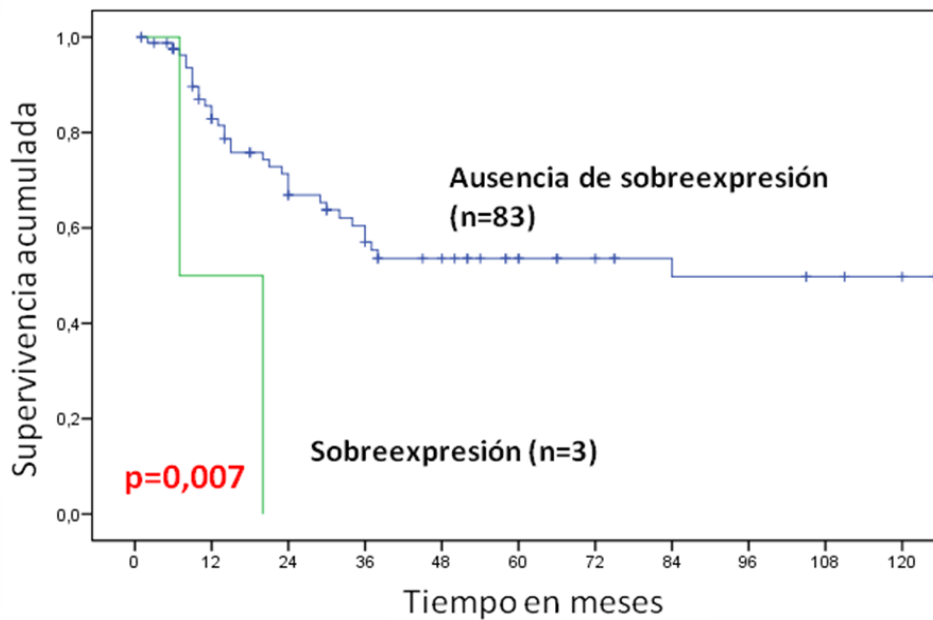


Figura 59. Supervivencia específica de la enfermedad y la sobreexpresión de Ciclina D1 (n=86)

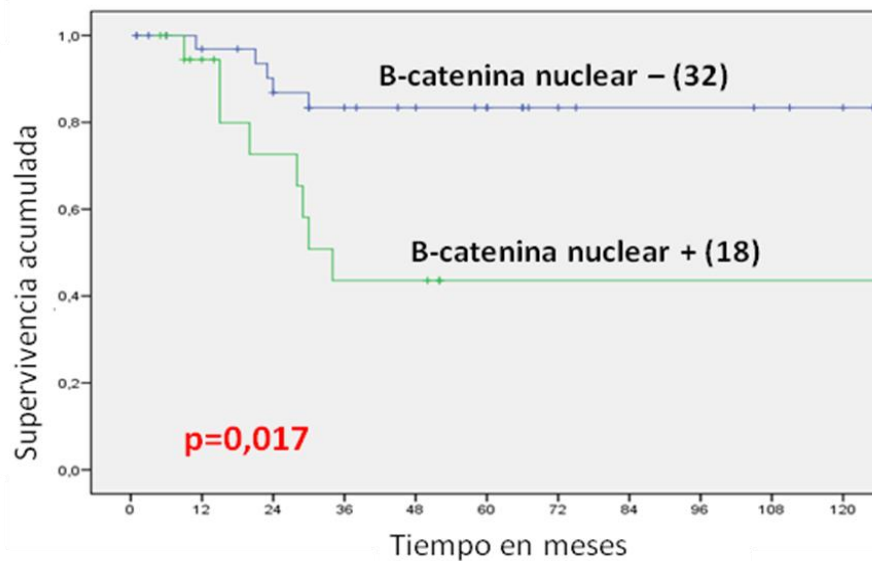


Figura 60. Supervivencia específica de la enfermedad y expresión nuclear de β -catenina en subtipos papilares y colónicos (n=50)

Tabla XXVI. Relaciones estadísticamente significativas entre la expresión proteica y las variables clínico-histológicas

Variables Clínico-patológicas	Subtipo histológico (mucinoso/sólido)		Mortalidad por el tumor	
	Sí	No	Sí	No
E-cadherina (ausencia de expresión en membrana)	5/36	1/57		
	<i>p=0,031</i>			
β -catenina (ausencia de expresión en membrana)	6/34	0/56		
	<i>p=0,005</i>			
CDK8 (sobreexpresión)			2/2	35/87
			<i>p=0,001</i>	
Ciclina D1 (sobreexpresión)			3/3	33/83
			<i>p=0,007</i>	
Expresión de β -catenina nuclear (papilares-colónicos)			6/32	8/18
			<i>p=0,017</i>	

Test estadísticos: Chi cuadrado o prueba exacta de Fischer (Cuando el valor de alguna de las casillas era \leq a 5)

Los pacientes que expresaban β -catenina a nivel nuclear se distribuían de manera homogénea en los diferentes estadios (33%, 17%, 38% y 23% en los estadios I-IV respectivamente). La expresión nuclear de β -catenina era mayor en las variedades más diferenciadas, 36% en los papilares y colónicos y 20% en los sólidos y mucinosos ($p=0,159$).

Los pacientes que expresaban p16 tenían una supervivencia específica de la enfermedad menor, aunque sin alcanzar valores significativos ($p=0,133$).

5.3.2.2. Relación de las variables de expresión entre sí

Encontramos relaciones estadísticamente significativas en las proteínas E-cadherina, β -catenina, pRb, CDK8, Ciclina D1, E2F1 y C-Myc. Todas ellas se detallan en la tabla XXVII.

Tabla XXVII. Relaciones entre las variables de expresión proteica entre sí. Sólo se exponen las relaciones estadísticamente significativas

Variables expresión	E-cadherina negativa		β -catenina (m) positiva		CDK8 sobreexpresión		pRb sobreexpresión		E2F1 sobreexpresión		CDK8 Expresión <25%	
	Sí	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No
β -catenina no expresión	5/22	1/68										
pRb débil	4/15	2/72										
β -catenina (n) expresión			25/27	2/22							4/5	23/83
Ciclina D1 sobreexpresión					1/2	1/83	43/48	26/36	2/11	0/72		
E2F1 sobreexpresión					2/2	10/83						
C-Myc sobreexpresión							26/72	1/15				
pRb sobreexpresión			59/65	13/21								
E2F1 positiva							60/66	12/20				

m: membrana citoplasmática, n: núcleo. Test estadísticos: Chi cuadrado o prueba exacta de Fischer (cuando el valor de alguna de las casillas era \leq a 5)

La expresión de β -catenina a nivel nuclear se relacionaba con la sobreexpresión de C-Myc ($p=0,087$) y con los que sobreexpresaban Ciclina D1 ($p=0,093$), aunque sin alcanzar significación estadística.

5.3.2.3. Relación de las variables de expresión proteica con las variables génicas

Encontramos que la expresión de las proteínas Ciclina D1, p16 y E-cadherina tienen una relación estadísticamente significativa, en el análisis univariante, con las alteraciones génicas en *CTNNB1*, *APC*, *CDKN2A* y *CDK8*. En la tabla XXVIII se muestran estas relaciones.

Tabla XXVIII. Relaciones entre las variables de expresión proteica y las génicas. Sólo se exponen las relaciones estadísticamente significativas

Variables Génicas	<i>CTNNB1</i> ganancia (MLPA)		<i>APC</i> pérdida (m-CGH)		<i>CDKN2A</i> pérdida (m-CGH)		<i>CDK8</i> pérdida (m-CGH)	
	Sí	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No
Ciclina D1 (no expresión)	5/5	12/29						
p16 (no expresión)			3/4	3/20	4/6	2/18		
E-cadherina (no expresión)							1/1	0/32

Test estadísticos: Chi cuadrado o prueba exacta de Fischer (cuando el valor de alguna de las casillas era ≤ 5)

5.3.3. Análisis multivariante de las variables genéticas y de expresión que influyen en la supervivencia específica de la enfermedad

Se realizó un análisis multivariante para determinar las variables génico-moleculares (génicas y de expresión) que influyen de manera independiente en la supervivencia específica de la enfermedad, utilizando aquellas variables que en el análisis univariante se hayan relacionado de forma estadísticamente significativa sobre la supervivencia. Se estudiaron las ganancias en *CTNNB1* dicotomizadas como presentes o ausentes, la sobreexpresión de *CDK8* y de Ciclina D1.

Mediante este análisis multivariante se identificaron dos variables que de forma independiente predicen menor supervivencia específica de la enfermedad, como son la sobreexpresión de *CDK8* y la ganancia en *CTNNB1* (Tabla XXIX).

Tabla XXIX. Análisis multivariante para determinar el mal pronóstico (regresión de Cox mediante el método hacia delante RV), siendo significativo para la sobreexpresión de CDK8 y la ganancia en CTNNB1

Variable	RR	IC (95%)	P
Sobreexpresión de CDK8	18,7	1,8-196,0	<i>p=0,014</i>
Ganancia en CTNNB1	7,0	2,2-22,8	<i>p=0,001</i>

RR: riesgo relativo, IC: intervalo de confianza

5.4. Concordancias y discordancias de las variables de expresión en los ACNS

El análisis de concordancia y discordancia en las variables de expresión en la ruta Wnt de los ACNS ha sido realizado según los pasos del modelo teórico expuesto en la introducción (Apartado 1.5). Utilizamos para ello la expresión de las proteínas de cada paso de la vía canónica, que actúan bien facilitando o inhibiendo el paso siguiente. Por tanto, utilizaremos las técnicas de IHQ que son las que han estudiado más casos de la muestra de ACNS y que determinan los efectores finales de los distintos pasos de la vía. Se ha analizado cada paso expuesto en el modelo teórico teniendo en cuenta la expresión de su proteína, como se muestra en la figura 6.

Se establecieron tres grados de concordancia y, de forma similar, otros tres de discordancia:

- Grado alto: concordancia o discordancia en $\geq 75\%$ de los casos.
- Grado intermedio: concordancia o discordancia entre $\geq 65\%$ y $< 75\%$ de los casos.

- Grado bajo: concordancia o discordancia entre $\geq 55\%$ y $< 65\%$ de los casos.

5.4.1. Análisis de concordancias entre E-cadherina y β -catenina

Representa el **paso 1** del modelo teórico (Figura 6). En él se observa la relación entre la expresión de las proteínas de membrana citoplasmática E-cadherina y β -catenina, las cuales interactúan promoviendo la adhesividad celular.

Lo esperado es una regulación positiva, es decir si la primera tiene una forma de expresión la otra debería ser similar. La relación se considera concordante cuando entre las dos proteínas se guarda esta proporción. Así, si E-cadherina es positiva, β -catenina debe ser positiva o si E-cadherina es negativa, β -catenina debería serlo también. La relación se considera discordante cuando ocurre lo contrario de lo esperado entre ambas proteínas.

Así el 94% de los casos fue concordante y el 6% discordante, estableciéndose un grado de concordancia alto (Tabla XXX).

5.4.2. Análisis de concordancias entre β -catenina de membrana y nuclear

Representa el **paso 2** del modelo teórico (Figura 6). En él se observa la relación entre la expresión de la proteína β -catenina en la membrana citoplasmática y a nivel nuclear. Este paso indica que cuando la ruta Wnt se encuentra activa la β -catenina atraviesa la membrana y migra al núcleo para promover la transcripción celular.

Lo esperado es una regulación negativa, es decir cuando aumenta una disminuye otra. La relación se considera concordante cuando la mayor expresión nuclear se asocia con disminución en la expresión de membrana y viceversa. La relación se considera discordante cuando la expresión es similar entre ambas proteínas, bien ambas negativas o positivas.

El 69% de los casos fue concordante y el 31% discordante, estableciéndose un grado de concordancia intermedio (Tabla XXX).

5.4.3. *Análisis de concordancias entre β -catenina y C-Myc*

Representa el **paso 3** del modelo teórico (Figura 6). En él se observa la relación entre la expresión de las proteínas β -catenina a nivel nuclear y C-Myc. En este paso se relaciona el control de la transcripción de C-Myc por la β -catenina nuclear. El gen *MYC* es un protooncogén que actúa facilitando la proliferación celular, la expresión de β -catenina nuclear promueve la transcripción del gen y la expresión de C-Myc a nivel nuclear.

Por tanto, lo esperado es una regulación positiva, es decir si la primera tiene una forma de expresión la otra debería ser similar. La relación se considera concordante cuando entre estas dos proteínas se guarda esta proporción. Así, si β -catenina nuclear es positiva, C-Myc debe ser positiva o si β -catenina nuclear es negativa, C-Myc debería serlo también. La relación se considera discordante cuando ocurre lo contrario de lo esperado entre ambas proteínas.

El 42% de los casos fue concordante y el 58% discordante, estableciéndose un grado de discordancia bajo (Tabla XXX).

5.4.4. *Análisis de concordancias entre Ciclina D1 y β -catenina*

Representa el **paso 4** del modelo teórico (Figura 6). En él se observa la relación entre la expresión de las proteínas β -catenina a nivel nuclear y Ciclina D1. En este paso se muestra el control de la transcripción de *CCND1* por la β -catenina nuclear. El gen *CCND1* es un protooncogén que codifica la Ciclina D1, proteína que promueve la proliferación celular. La β -catenina nuclear facilita la transcripción de *CCND1* y la expresión de Ciclina D1 a nivel nuclear. Por tanto, lo esperado es una regulación positiva, es decir si la primera tiene una forma de expresión la otra debería ser similar. La relación se considera concordante cuando entre estas dos proteínas se guarda esta proporción. Así, si β -catenina nuclear es positiva, Ciclina D1 debe ser positiva o si β -catenina nuclear es negativa, Ciclina D1 debería serlo

también. La relación se considera discordante cuando ocurre lo contrario de lo esperado entre ambas proteínas.

El 61% de los casos fue concordante y el 39% discordante, estableciéndose un grado de concordancia bajo (Tabla XXX).

Tabla XXX. Análisis de concordancia/discordancia según los pasos del modelo teórico establecido para el estudio de la ruta Wnt en los ACNS tipo ITAC

	E-cadherina β -catenina (paso 1)	β -catenina (paso 2)	β -catenina C-Myc (paso 3)	β -catenina Ciclina D1 (paso 4)	β -catenina p16 (paso 5)	β -catenina E2F1 (paso 6)	E2F1 pRb (paso 7)	E2F1 CDK8 (paso 8)
Nivel	M	M/N	N	N	N	N	N	N
Regulación	+	-	+	+	-	-	-	-
Concordancia	94%	69%	42%	61%	59%	51%	64%	71%
Discordancia	6%	31%	58%	39%	41%	49%	36%	29%
Grado de concordancia	Concor. Alto	Concor. Intermedio	Discor. bajo	Concor. bajo	Concor. bajo	Indiferente	Concor. Bajo	Concor. Intermedio

M: membrana citoplasmática; N: núcleo; Concor: concordante; Discor: discordante

5.4.5. Análisis de concordancias entre β -catenina y p16

Representa el **paso 5** del modelo teórico (Figura 6). En él se observa la relación entre la expresión de las proteínas β -catenina a nivel nuclear y p16.

En este paso se muestra el control negativo de la transcripción de *CDKN2A* por la β -catenina nuclear. El gen *CDKN2A*, considerado un gen supresor de tumores, transcribe la proteína p16 que actúa regulando el ciclo celular. La β -catenina nuclear inhibe la transcripción de *CDKN2A* y de esta forma la expresión de p16 a nivel nuclear. Por tanto, lo esperado es una regulación negativa, es decir si la primera tiene una forma de expresión la otra debería tener la contraria. La relación se considera concordante cuando entre estas dos proteínas se guarda esta

proporción. Así, si β -catenina nuclear es positiva, p16 debe ser negativa o si β -catenina nuclear es negativa, p16 debería ser positiva. La relación se considera discordante cuando ocurre lo contrario de lo esperado entre ambas proteínas.

El 59% de los casos fue concordante y el 41% discordante, estableciéndose un grado de concordancia bajo (Tabla XXX).

5.4.6. *Análisis de concordancias entre E2F1 y β -catenina*

Representa el **paso 6** del modelo teórico (Figura 6). En él se observa la relación entre la expresión de las proteínas E2F1 y β -catenina a nivel nuclear.

En este paso se muestra el control negativo de la transcripción nuclear de β -catenina por E2F1. *E2F1* es considerado un gen supresor de tumores y codifica la proteína del mismo nombre. E2F1 inhibe la transcripción de la β -catenina nuclear. Por tanto, lo esperado es una regulación negativa, es decir si la primera tiene una forma de expresión la otra debería tener la contraria. La relación se considera concordante cuando entre estas dos proteínas se guarda esta proporción. Así, si E2F1 es positiva, β -catenina nuclear debe ser negativa o si E2F1 es negativa, β -catenina nuclear debería ser positiva. La relación se considera discordante cuando ocurre lo contrario de lo esperado entre ambas proteínas.

El 51% de los casos fue concordante y el 49% discordante, por lo que no se establece grado de concordancia/discordancia (Tabla XXX).

5.4.7. *Análisis de concordancias entre E2F1 y pRb*

Representa el **paso 7** del modelo teórico (Figura 6). En él se observa la relación entre la expresión de las proteínas E2F1 y pRb a nivel nuclear.

En este paso se muestra el control negativo de E2F1 por pRb. La proteína pRb es considerada como “oncogén”, ya que inhibe a E2F1 y, por tanto, promueve la transcripción de la β -catenina nuclear. Así, lo esperado es una regulación negativa, es decir si la primera tiene una forma de expresión la otra debería tener la contraria. La relación se considera concordante cuando entre estas dos proteínas



se guarda esta proporción. Así, si pRb es positiva, E2F1 debe ser negativa o si pRb es negativa, E2F1 debería ser positiva. La relación se considera discordante cuando ocurre lo contrario de lo esperado entre ambas proteínas.

El 64% de los casos fue concordante y el 36% discordante, estableciéndose un grado de concordancia bajo (Tabla XXX).

5.4.8. *Análisis de concordancias entre E2F1 y CDK8*

Representa el **paso 8** del modelo teórico (Figura 6). En él se observa la relación entre la expresión de las proteínas E2F1 y CDK8 a nivel nuclear.

En este paso se muestra el control negativo de E2F1 por CDK8. CDK8 es considerada como “oncogén”, ya que actúa inhibiendo a E2F1 y, por tanto, promoviendo la transcripción de la β -catenina nuclear. Así, lo esperado es una regulación negativa, es decir si la primera tiene una forma de expresión la otra debería tener la contraria. La relación se considera concordante cuando entre estas dos proteínas se guarda esta proporción. Así, si CDK8 es positiva, E2F1 debe ser negativa o si CDK8 es negativa, E2F1 debería ser positiva. La relación se considera discordante cuando ocurre lo contrario de lo esperado entre ambas proteínas.

El 71% de los casos fue concordante y el 29% discordante, estableciéndose un grado de concordancia intermedio.

En la tabla XXX se resumen las concordancias y discordancias observadas entre las proteínas de la ruta Wnt cuando se agrupan en los pasos establecidos del modelo teórico. Los valores completos obtenidos en el análisis de concordancias/discordancias se muestran en Anexos (Tabla XXXIII).



6. DISCUSIÓN



6.1. Justificación

Este trabajo de investigación ha sido impulsado por diversos motivos, pero podemos resumirlos en dos. Por un lado el número relativamente alto de pacientes con ACNS recopilados en la serie, debido a que el Servicio de Otorrinolaringología del HUCA es centro de referencia nacional para el tratamiento de tumores de base de cráneo. Por otra parte, la puesta en funcionamiento dentro del IUOPA de un laboratorio de biología molecular específico para nuestra especialidad, donde trabajan en estrecha colaboración clínicos e investigadores básicos.

Durante años se han ido recogiendo muestras y puesto a punto técnicas, consolidando la línea de investigación en ACNS. Los escasos artículos publicados en la biología molecular de estos tumores, algunos de ellos surgidos en nuestro propio grupo, han sido un nuevo impulso añadido que ha hecho posible el proyecto actual.

Como se ha comentado en la introducción, la similitud histopatológica entre los ACCR y los ACNS tipo ITAC, nos ha hecho pensar que puedan compartir una misma ruta de cancerización. Además, en ambos tumores se ha adjudicado como agente etiológico un papel importante a la inflamación crónica.

En los ACCR se han encontrado dos formas principales de cancerización como son la inestabilidad de microsatélites y la ruta Wnt/ β -catenina. Nosotros hemos estudiado y publicado recientemente que la inestabilidad de microsatélites no se está presente en los ACNS⁶², por lo que el estudio de la ruta Wnt/ β -catenina parecía un camino interesante para intentar aclarar la génesis de los ACNS.



6.2. Aspectos clínico-patológicos

En sus **aspectos descriptivos** las variables clínico-patológicas estudiadas en los 101 pacientes concuerdan, en general, con los rasgos descritos en otras series publicadas de ACNS^{1,3,4,5,6}. La mayoría de los pacientes fueron diagnosticados alrededor de la sexta década de la vida, de forma similar a las series referidas en la literatura¹⁹.

Como era de esperar la mayoría de los pacientes con ACNS tipo ITAC habían tenido exposición laboral al polvo de la madera (80%)^{10,17,18,19,20,21,22}. La exposición laboral fue de forma prolongada, con una media de 31 años, hecho que ya había sido descrito como principal agente causal en estos tumores^{4,10}.

Los antecedentes de tabaco y alcohol, que en los ACNS no se relacionan de manera causal, aunque sí están epidemiológicamente asociados, se encontraban presentes en el 54 y 52% de nuestros casos^{15,32}.

En cuanto a la histopatología más frecuente de los ACNS hemos observado que la mayoría (46%) eran del subtipo colónico, seguidos en frecuencia por los mucinosos, sólidos y papilares, hecho también recogido en la mayoría de las series publicadas^{1,2,3,4,9,11}.

Los pacientes se diagnosticaron en estadios tumorales avanzados (III y IV) en el 58% los casos, al igual que lo referido por otros autores^{1,2,44} hecho explicable por la clínica silente en estadios precoces.

La mayor parte de los pacientes (65,3%) recibió tratamiento con radioterapia postoperatoria, como se realiza en otros centros y se recoge en otras publicaciones^{10,16}.

Los fracasos en el tratamiento fueron debidos, casi siempre, a las recidivas locales, presentes en el 47%, y a las metástasis en el 17% de los casos.



La supervivencia global de los pacientes de nuestra serie fue del 43% a los 5 años con una supervivencia específica a 5 años de 50,2%, cifras muy similares a las recogidas en la mayoría de las series occidentales publicadas^{1,3,30,44,45}.

En las **relaciones** entre las variables clínico-patológicas entre sí encontramos valores estadísticamente significativos entre supervivencia e histopatología, siendo mayor en los subtipos papilar y colónico que en el mucinoso y sólido. Esto concuerda con los datos publicados por otros autores^{11,12}, excepto por que los de tipo sólido tuvieron peor pronóstico que los mucinosos.

La supervivencia es mayor, como cabría esperar, en los estadios precoces, observando, una caída en la supervivencia desde el 80% en estadios I y II, a menos del 20% en estadios IV^{12,44,45}.

Otro dato que influyó en la supervivencia de forma significativa fue la invasión intracraneal, como también habían publicado otros autores^{3,4,42,44}. Nosotros observamos que su presencia tiene un pronóstico ominoso, ya que sólo el 15% de los pacientes que la presentaban al diagnóstico seguían vivos a los 5 años, comparado con el 60% de los que no la tenían.

Como ya se mencionó, las principales causas de fallo en el tratamiento de los ACNS fueron las recidivas locales y las metástasis^{8,45}. Ambas situaciones se relacionan en nuestro estudio, de forma significativa, con una menor supervivencia ($p=0,001$).

Por último, nuestro estudio no muestra que la radioterapia postoperatoria aumente la supervivencia de forma significativa ($p=0,878$). Se debe tener en cuenta que nuestros resultados podrían estar sesgados, ya que los casos con estadios más avanzados son aquellos donde con más frecuencia se indica dicho tratamiento.

La supervivencia libre de enfermedad, entendida como la proporción de pacientes vivos que no desarrollan recidivas o metástasis disminuía de forma significativa en los pacientes con subtipos histológicos sólidos y mucinosos



($p=0,001$), con estadio IV ($p=0,001$) e invasión intracraneal ($p=0,001$), como también ha sido publicado por otros autores^{3,10,16}.

6.3. Aspectos genético-moleculares

La oncogénesis es un proceso complejo, no bien conocido, y en el que se acumulan múltiples alteraciones genéticas, que pueden ser detectadas mediante técnicas de biología molecular.

A lo largo de los años, dada la alta incidencia de patología oncológica, se han hecho múltiples esfuerzos para tratar de dilucidar las alteraciones genéticas implicadas en su desarrollo.

En los CECC los factores clínico-patológicos (localización tumoral, diferenciación histológica, TNM), utilizados habitualmente como factores pronósticos, parecen mejorables, hecho que condicionaría también las estrategias terapéuticas actualmente utilizadas.

Los ACNS se relacionan de forma evidente con factores de riesgo como es la exposición al polvo de la madera, pero no con el tabaco y el alcohol, más típicos de los CECC³².

La similitud histopatológica con los ACCR nos hace suponer que puede haber alteraciones genéticas parecidas, aunque también diferencias, que merece la pena estudiar. En los ACNS no se han descrito modelos genéticos de progresión, como en los CECC^{105,106} y ACCR¹⁰⁷, por la dificultad para demostrar lesiones preinvasivas en FN y SP, o bien por su ausencia real.

Para el estudio de la ruta Wnt/ β -catenina hemos combinado varias técnicas, basadas en estudios genéticos (m-CGH, MLPA, MLPA-MS) y de expresión (IHQ con TA).

Vamos a llevar esta discusión en los distintos pasos que componen la ruta Wnt, de acuerdo a los procedimientos empleados, agrupando el gen y la proteína por él codificada.

- El gen *CDH1* (16q22.1) codifica la proteína **E-cadherina** que uniéndose a la β -catenina participa en la adhesión celular. *CDH1* es considerado un gen supresor de tumores y se encuentra mutado en gran número de neoplasias de origen gastrointestinal.

En nuestro estudio se observaron por m-CGH pérdidas o ganancias del gen en sólo el 5,7% (Figuras 51 y 52). Sin embargo, por MLPA se encontraron pérdidas génicas en el 27% (Tabla XX). Estas alteraciones génicas no se corresponden con la expresión de E-cadherina, ya que ésta era positiva en la membrana citoplasmática en el 93,5% (Tabla XXIV). Aunque no advertimos que la disminución de la expresión de E-cadherina influyera sobre la supervivencia, la disminución de expresión a nivel de membrana se relacionaba de forma significativa ($p=0,031$) con el subtipo histológico sólido y mucinoso, que sí influyen (Tabla XXVI). Estos tipos histológicos son formas menos diferenciadas de los ACNS y, por tanto, deberían tener peor pronóstico, como nosotros hemos observado también.

Una característica del subtipo mucinoso es el hecho de que en la histopatología de este tumor se forman nidos celulares rodeados de lagos de mucina, siendo probable que se pierdan las uniones intercelulares. Este hecho puede justificar su mal pronóstico al hacerlos más proclives a desarrollar metástasis.

En el modelo teórico propuesto hemos encontrado una regulación positiva (94% de los casos) entre los niveles de E-cadherina y β -catenina de membrana citoplasmática, demostrando así que la expresión proteica de estas proteínas va de la mano, presentando un grado alto de concordancia (Tabla XXX).



En los ACCR las alteraciones en el complejo E-cadherina- β -catenina son indicadores de menor supervivencia, posiblemente por favorecer el desarrollo de metástasis¹⁰⁸. En los CECC, nuestro grupo ha publicado que la disminución de expresión de E-cadherina predice la presencia de metástasis linfáticas en carcinomas epidermoides supraglóticos¹⁰⁹, siendo un marcador independiente para su desarrollo¹¹⁰.

-El gen *CTNNB1* (3p22) codifica la proteína **β -catenina** que tiene un papel esencial dentro de la ruta canónica Wnt, siendo su expresión nuclear el principal indicador de activación de esta ruta. La proteína está activa durante la organogénesis e interviene como factor de transcripción génica en los ACCR⁷¹.

En nuestro estudio se observaron, por m-CGH, pérdidas (8,6%) y ganancias (14,3%) de *CTNNB1* (Figuras 51 y 52; Tabla XVIII, XIX). Al estudiarlo por MLPA encontramos también un número similar de pérdidas (7,1%) y ganancias (11,9%) (Tablas XX y XXI). La expresión proteica de β -catenina a nivel de la membrana citoplasmática era positiva en el 75,6%, débil en el 17,8% y estaba ausente en el 6,7% (Tabla XXIV). La pérdida de expresión de β -catenina a nivel de la membrana era más frecuente en los ACNS sólidos y mucinosos que en los papilares-colónicos ($p=0,05$), (Tabla XXVI). Además, la β -catenina se expresaba a nivel nuclear en el 30% de los casos.

Las ganancias en *CTNNB1* se relacionaban de forma significativa con las variables clínicas de mal pronóstico, como los subtipos histológicos sólidos y mucinosos, el estadio avanzado (IV) y la presencia de invasión intracraneal (Tabla XXII). Los pacientes con ganancias en *CTNNB1* tenían menor supervivencia específica ($p=0,024$), (Figura 55). Los pacientes con ACNS bien diferenciados (papilares y colónicos) con expresión de β -catenina nuclear tenían peor supervivencia específica de enfermedad que los pacientes con variedades bien diferenciados que no la expresaban ($p=0,017$), (Figura 60).



Un hecho llamativo es que al estudiar la expresión proteica a nivel nuclear de la β -catenina, descrito como el principal indicador de la activación de la ruta Wnt/ β -catenina, esté presente en el 30%, con una relación significativa con la expresión de β -catenina de membrana citoplasmática ($p=0,016$), (Tablas XXIV y XXVII).

Además, la ausencia de expresión de β -catenina nuclear se relacionaba también de forma significativa con la ausencia de expresión de E-cadherina a nivel de la membrana citoplasmática ($p=0,003$).

En el modelo teórico propuesto hemos encontrado una regulación negativa (69% de los casos), (Tabla XXX), y por tanto con un grado de concordancia intermedio, entre la β -catenina nuclear y de membrana citoplasmática, hecho que contrasta con lo descrito en ACCR, donde la menor expresión de membrana se relaciona con una expresión nuclear de la proteína^{111,112}.

En ACCR la expresión nuclear de β -catenina está presente desde los estadios tempranos⁷⁶, aunque su expresión aumenta con la agresividad del tumor. Así, se observa en el 15 % de los adenomas, 33% de los tumores con invasión mucosa, 35% con invasión de lámina propia y 63% con invasión de la serosa¹¹³. Estos datos contrastan con los resultados obtenidos en los ACNS, donde la distribución era homogénea en los diferentes estadios. La expresión nuclear de β -catenina era mayor en las formas diferenciadas, siendo positiva en el 36% de los papilares-colónicos y en el 20% de los sólidos-mucinosos.

La expresión nuclear de β -catenina ha sido poco estudiada en los ACNS. Hemos encontrado sólo dos referencias que la citen, en una no se describen alteraciones en su expresión (serie de 10 casos)⁷⁹ y en otra presentan expresión intranuclear en el 40% (8 de 20 casos)⁵⁸. Curiosamente, la conclusión de este último estudio fue que la ruta Wnt no parece ser importante en los ACNS. Nosotros consideramos que la expresión nuclear de β -catenina en el 30% de los ACNS es un indicador de activación de la ruta y puede explicar en parte la similitud

morfológica con los ACCR. El porcentaje de expresión que hemos obtenido a nivel nuclear es inferior al descrito en los ACCR esporádicos (80%), pero próximo al de los ACCR originados desde la enfermedad inflamatoria intestinal (48%)⁶⁹. Este hecho podría indicar que ACNS y ACCR comparten la inflamación crónica como agente etiológico, haciendo que ambos tumores tuviesen semejanza a nivel genético-molecular.

Aunque el subtipo histológico papilar y colónico tienen mejor pronóstico que el sólido y mucinoso, los que expresaban β -catenina nuclear tenían menor supervivencia específica de enfermedad (Figura 60). Este hallazgo también fue descrito en los ACCR originados desde la enfermedad inflamatoria intestinal, donde la expresión nuclear de β -catenina es considerada un evento tardío y confiere peor pronóstico¹¹⁴.

-El gen *APC* (5q22.2) que codifica la proteína **APC** es uno de los principales genes reguladores de la ruta Wnt/ β -catenina y se le considera un gen supresor. Una de sus funciones es unirse a la β -catenina y favorecer su degradación en el proteosoma, evitando que llegue al núcleo y transcriba los genes que conducen a la diferenciación celular. Al perder la función de APC, la célula se comporta como si tuviera activada la vía canónica Wnt y por tanto la transcripción génica.

En nuestro estudio encontramos por m-CGH pérdidas (17,1%) del gen (Tabla XVIII y Figura 51), aún más manifiestas con MLPA (48,9%), (Figura 51 y tabla XX). Observamos metilación en sólo dos casos (4,1%). Los pacientes con pérdidas de *APC* en la MLPA se relacionaban de forma significativa con el subtipo histológico sólido y mucinoso, el estadio avanzado (IV) y la presencia de invasión intracraneal (Tabla XXII). La supervivencia específica de la enfermedad era menor, aunque sin alcanzar valores significativos ($p=0,071$)(Tabla XXII). La pérdida en *APC* estudiada por MLPA tenía una relación significativa con la obtenida con m-CGH ($p=0,044$). También observamos que la pérdida de *APC* tenía una relación significativa con la ganancia de *CTNNB1* ($p=0,045$), (Tabla XXIII).



No hemos estudiado las mutaciones de *APC* ni su expresión proteica debido a que la IHQ de esta proteína presenta algunas dificultades técnicas y es difícil de interpretar. Además, está descrito en la bibliografía que las mutaciones de *APC* mantienen cierto grado de función en la proteína⁷⁰, siendo probable que sean más frecuentes en los ACCR esporádicos, donde la proteína *APC* está inactivada en el 80% de los casos⁷³. Las metilaciones en el promotor de *APC* son comunes en los ACCR, estando presentes hasta en un 70%¹¹⁵, aunque las pérdidas génicas son menos frecuentes en el 26%¹¹⁶. Nosotros sólo observamos metilación de *APC* en dos casos (4%) de ACNS, siendo probablemente un mecanismo poco importante en la pérdida de función del gen.

Un hallazgo encontrado que sugiere la activación de la ruta Wnt en ACNS es la relación entre las pérdidas de *APC* con las ganancias en *CTNNB1*. Este último gen codifica la β -catenina, que como hemos indicado es la proteína que interviene en casi todos los pasos de la ruta Wnt. Así, parece consistente que la pérdida del principal gen supresor de la ruta se relacione con la ganancia del principal oncogén, como se muestra en la Figura 6. No obstante, al no realizar el estudio de expresión de la proteína, *APC* no se propuso para establecer las concordancias/discordancias en los pasos de la vía canónica Wnt.

-El protooncogén *MYC* (8q24) codifica la proteína **C-Myc** que actúa estimulando la proliferación celular y el paso de la fase G₀/G₁ a S. Este gen se encuentra alterado en gran variedad de neoplasias, estimando que uno de cada siete pacientes fallecidos por cáncer en EEUU tiene cambios en la expresión de C-Myc.

En los ACCR la expresión nuclear de β -catenina promueve la transcripción de C-Myc y estimula la proliferación y diferenciación celular.

Nosotros encontramos que con m-CGH las pérdidas en *MYC* sólo se observan en el 2,9%, no habiendo ningún caso en el estudio con MLPA (Tabla XVIII). Por el contrario, las ganancias eran del 37,1% con m-CGH y del 30,4% con

MLPA (Tablas XIX y XXI). La expresión proteica de C-Myc fue positiva en el 97,8% de los casos con sobreexpresión en el 30,3% (Tabla XXV).

En el modelo teórico propuesto hemos encontrado una regulación positiva (42% de los casos), y por tanto un grado de discordancia bajo, entre los niveles de β -catenina nuclear y la expresión de C-Myc (Tabla XXX).

Existen múltiples mecanismos que pueden inducir la sobreexpresión de una proteína entre ellos la amplificación. Sin embargo, la amplificación de *MYC* en ACNS es un hecho infrecuente según ha publicado nuestro grupo⁵², aunque ha sido descrita en el 36% por otros autores⁵¹. Como cabría esperar si la expresión de C-Myc se viese influenciada por la β -catenina, tendría que haber relación entre la expresión de estas proteínas. Nosotros encontramos cierta relación, aunque sin alcanzar valores significativos ($p=0,087$), hecho que podría explicar en parte su sobreexpresión.

En los ACCR la sobreexpresión de C-Myc es alta (58%; definida como inmunotinción positiva en >30% de las células) y aumenta con la agresividad del tumor, desde el 24% en adenomas hasta el 64% en carcinomas con invasión de la serosa¹¹³. En los ACNS, utilizando el concepto de sobreexpresión anteriormente descrito, el porcentaje sería también del 58% y demuestra la similitud entre la expresión proteica de C-Myc entre los ACNS y los ACCR.

-El gen *CCND1* (11q13.2) codifica la proteína **Ciclina D1** que forma parte del complejo Cdk4 y Cdk6, cuya actividad es necesaria para la transcripción de G1/S en el ciclo celular. La transcripción nuclear de la β -catenina provoca la transcripción de la Ciclina D1 y por tanto la diferenciación celular⁶¹.

Nosotros, con m-CGH, no observamos pérdidas para *CCND1*, pero sí las obtenemos en el 14,3% con MLPA (Tabla XX). Las ganancias con m-CGH fueron del 14,3% y del 21,4% con MLPA (Tablas XIX y XXI). La expresión proteica de Ciclina D1 fue positiva en el 55,8% con sobreexpresión en el 3,5% (Tabla XXV).



Los pacientes con ganancias en *CCND1* estudiadas por m-CGH tenían una relación significativa con las ganancias obtenidas con MLPA ($p=0,048$), (Tabla XXIII). La pérdida de expresión de Ciclina D1 se relaciona con la ganancia en *CTNNB1* detectada con MLPA ($p=0,044$), (Tabla XXVIII). Los pacientes con sobreexpresión de Ciclina D1 presentaban peor supervivencia específica de enfermedad ($p=0.007$) (Figura 59).

En el modelo teórico propuesto hemos encontrado una regulación positiva (61% de los casos), y por tanto con un grado de concordancia bajo, entre los niveles de β -catenina nuclear y la expresión de Ciclina D1 (Tabla XXX).

La amplificación de *CCND1* en ACNS es infrecuente^{52,51}, por lo que deben existir otros mecanismos para explicar la expresión proteica observada en nuestra serie. Uno de estos mecanismos podría ser la transcripción de Ciclina D1 mediada por β -catenina nuclear. Aunque no observamos relación significativa entre ambas proteínas ($p=0,093$), los dos pacientes con sobreexpresión de Ciclina D1 tenían inmunotinciones positivas para β -catenina nuclear.

En ACCR se ha descrito sobreexpresión de Ciclina D1 en tumores con inestabilidad de microsatélites^{117,118}, y así su expresión no depende únicamente de la β -catenina nuclear, pudiendo existir en los ACNS otras vías que expliquen la expresión positiva de ciclina D1 sin expresión nuclear de β -catenina.

En los ACCR la sobreexpresión de Ciclina D1 va desde el 28% al 55%^{117,118}, cifras superiores a las descritas por nosotros en ACNS.

Hemos encontrado que la alta expresión de Ciclina D1 era una variable de mal pronóstico ($p=0,007$) (Figura 59), al igual que en los ACCR, donde también se relaciona la sobreexpresión de Ciclina D1 con menor supervivencia específica de la enfermedad^{119,120}.

-El gen *CDKN2A* (9p21) codifica las proteínas **p16** y **p14** que favorecen la función de pRb y p53, respectivamente. Es un gen supresor de tumores con

participación en el control del ciclo celular, regulando las funciones de *RB* y *TP53*. Es importante destacar que la mutación de *CDKN2A* es la alteración más frecuente en el CECC y la segunda, tras *TP53*, en todo el organismo.

Las alteraciones en *CDKN2A* (mutación, delección, metilación del promotor...) favorecen la carcinogénesis por anomalías en p16 y/o p14. El gen juega un papel importante en las etapas precoces de la carcinogénesis de cabeza y cuello ^{121,122}, observando además que las proteínas codificadas por él disminuyen su expresión en el cáncer de faringe y laringe¹²³.

Nosotros, con m-CGH, encontramos pérdidas de *CDKN2A* en el 11,4% y ganancias en el 15,1% (Tabla XVIII y XIX; Figuras 51 y 52); mientras que con MLPA las pérdidas son del 37% y las ganancias del 6,5% (Tablas XX y XXI). No observamos metilación en ningún caso. Se encontró una expresión positiva de p16 en el 66,7% con sobreexpresión en el 11,6% (Tabla XXV).

La pérdida de *CDKN2A* estudiada por m-CGH se relaciona de forma significativa con las pérdidas del mismo gen estudiadas por MLPA ($p=0,001$), (Tabla XXIII). Además, con m-CGH, también se relacionó la pérdida de *CDKN2A* con la de *APC* ($p=0,009$) y otros genes (Tabla XXIII).

En el modelo teórico propuesto hemos encontrado una regulación negativa (59% de los casos), y por tanto un grado bajo de concordancia, entre la expresión de β -catenina nuclear y la de p16 (Tabla XXX).

Aunque no se encontró metilación en ninguno de los 47 casos estudiados por nosotros, sí se observa en el 20% de los ACCR⁶⁹, incluso en la mucosa "sana" próxima al tumor¹²⁴.

Como cabría esperar si la ruta Wnt estuviese activa en los ACNS, deberían existir relaciones intervariables que apoyen esta hipótesis. En nuestro estudio llama la atención que la pérdida de *CDKN2A* se relaciona con la pérdida de otros genes supresores de tumores, como el *APC*. Así, encontramos relación significativa



entre la pérdida de *APC* con la falta de expresión de p16 ($p=0,035$), (Tabla XXVIII). Por otro lado también observamos que la pérdida de *CDKN2A* se relaciona con la falta de expresión de p16 ($p=0,018$), hecho que ya se había confirmado en tumores de estirpe diferente, como los CECC¹²⁵ y los mesoteliomas¹²⁶.

En ACCR se ha demostrado positividad muy alta para p16, llegando hasta el 98% de los casos¹²⁷. Esta sobreexpresión de p16 aumenta según avanza el estadio de la enfermedad, desde el 10% en adenomas hasta el 35% en adenocarcinomas con invasión de la serosa¹¹³. En nuestro estudio la positividad de p16 fue algo menor (66%), en probable relación con la activación de la ruta Wnt⁶⁹.

En los ACCR, la baja expresión de p16 se relaciona con invasión linfática, agresividad local, menor grado de diferenciación y peor pronóstico^{69,127,128}. No obstante, en nuestro estudio las alteraciones de *CDKN2A* y p16 no mostraron relaciones significativas con la supervivencia (global y específica), aunque los pacientes con expresión de p16 tenían menor supervivencia específica ($p=0,133$).

La sobreexpresión de p16 se suele asociar en la bibliografía a variables clínico-evolutivas de mal pronóstico, explicando esta asociación por la capacidad del tumor de proliferar, superando el control negativo que hace p16 en la fase G1-S. Además, se ha asociado esta sobreexpresión a las alteraciones en la vía *RB*^{129,130}. En nuestro estudio la asociación entre la sobreexpresión de p16 y la menor supervivencia específica de enfermedad nos hace suponer que, en este subgrupo de pacientes, el tumor ha conseguido superar el bloqueo de la proliferación ejercido por p16.

- El gen *E2F1* (20q11.22) es un factor de transcripción que codifica la proteína **E2F1**, encargada de regular la transición entre la fase G1-S del ciclo celular. Posee la capacidad de promover la proliferación celular mediante la activación de genes dianas implicados en la síntesis de ADN, el control del ciclo celular y la regulación de protooncogenes¹³¹. Además, puede inducir apoptosis mediante acciones antiproliferativas p53 dependientes o independientes¹³². Por

tanto, según el tipo tumoral, ha sido implicado como oncogén (mama, tiroides, pulmón y páncreas)^{133,134,135} o gen supresor (ACCR y carcinomas esofágicos derivados de esófago de Barret)^{136,137}.

En ACCR se considera un gen supresor de tumores que impide la transcripción nuclear inducida por la β -catenina. Se piensa que en los ACCR, para que se lleve a cabo la transcripción, debe perderse por completo la función de *E2F1*. El gen se encuentra controlado por otros genes supresores de tumores como son *RB* y *CDK8* que inhiben su función⁷⁵.

Nosotros, con m-CGH, no encontramos pérdidas de *E2F1*, aunque sí ganancias en el 40% (Figura 52 y Tabla XIX). Se observó expresión positiva de *E2F1* en el 76% de los casos con sobreexpresión en el 14,9% (Tabla XXV). Los pacientes con sobreexpresión de *E2F1* se relacionaban con los que tenían sobreexpresión de Ciclina D1 ($p=0,016$).

En el modelo teórico propuesto hemos encontrado una regulación negativa (51% de los casos), y por tanto no hemos podido establecer un grado de concordancia/discordancia, entre los niveles de β -catenina nuclear y la expresión de *E2F1* (Tabla XXX).

Las ganancias de *E2F1* en ACNS son similares a las descritas en ACCR en donde alcanzan el 25% de los casos¹³⁸. En los ACCR se observó sobreexpresión de *E2F1* en el 25%, en relación con apoptosis y baja tasa de replicación¹³¹, indicando su función como supresor de tumores. En los ACNS no hay estudios publicados sobre el papel de dicho gen/proteína en su carcinogénesis. La alta tasa de expresión proteica que hemos detectado (76%) puede ser debida al intento de frenar la transcripción y replicación celular induciendo la apoptosis, aunque no hemos confirmado estos datos con el estudio de la proliferación (Ki67).

El que no haya relación entre la expresión de *E2F1* con las variables clínico-histológicas y de supervivencia apoya la hipótesis de que, posiblemente, la pérdida de función de *E2F1* sea un evento temprano en la carcinogénesis, propio



del desarrollo tumoral, pero sin valor pronóstico al no implicarse en los mecanismos de invasión y metástasis.

- El gen *RB* (13q14.2) codifica la proteína **pRb**. Se considera un gen supresor de tumores en la mayoría de los cánceres humanos, pero en los ACCR la proteína se encuentra sobreexpresada y actúa como oncogén^{76,77}. El mecanismo de acción por el que pRb activa la carcinogénesis es inhibiendo a E2F1, promoviendo así la transcripción dependiente de β -catenina⁷⁵.

Nosotros, con m-CGH, encontramos pérdidas de *RB* en el 5,7% y ganancias en el 2,9% (Figuras 51 y 52); mientras que con MLPA no se observan pérdidas y las ganancias son del 28,6% (Tabla XXI). Se encontró una expresión positiva de pRb en el 98,9% con sobreexpresión en el 83,2% (Tabla XXV).

Las ganancias en *RB* detectadas con MLPA se relacionan de forma significativa con las pérdidas en *CDKN2A* detectadas por MLPA y m-CGH ($p=0,049$; $p=0,033$), (Tabla XXIII). La sobreexpresión de pRb se relaciona también, de forma significativa, con la sobreexpresión de Ciclina D1, C-Myc y la expresión positiva de E2F1 (Tabla XXVII).

En el modelo teórico propuesto hemos encontrado una regulación negativa (64% de los casos), y por tanto con un grado bajo de concordancia, entre los niveles de pRb nuclear y la expresión de E2F1 (Tabla XXX).

Las ganancias de *RB* son comunes en los ACCR, estando presentes en un 1/3 de los casos^{134,139}. Nosotros observamos que los ACNS, al estudiarlos con MLPA, presentaban ganancias en el 28,6%, valor muy similar.

RB se considera el prototipo de gen supresor en gran número de tumores, siendo preciso que pierda su función y se exprese para que proliferen las células tumorales¹⁴⁰. En el colon, de forma paradójica, se ha visto sobreexpresión de pRb en el 87% de los pólipos que desarrollan ACCR¹⁴¹. Esta sobreexpresión proteica se ha tratado de explicar por la formación de una proteína mutada, resistente a la

degradación y carencia de función, similar al mecanismo de sobreexpresión de p53¹⁴².

Pese a estas consideraciones hay autores que proponen a *RB* como oncogén en los ACCR¹³⁹. La proteína pRb tiene la función de bloquear el ciclo celular inhibiendo el paso de la fase G1/S. Cuando pRb se encuentra hipofosforilada bloquea la acción del factor de transcripción E2F1, considerado un supresor de tumores al favorecer la apoptosis. La Ciclina D1 puede fosforilar a pRb haciendo que libere E2F1¹⁴³. La Ciclina D1 se encuentra a su vez controlada por p16 que inhibe su actividad¹⁴⁴.

Estos datos se han contrastado en algunos estudios realizados en ACCR donde se suprime la actividad de pRb mediante un AS-RB. Se observa que la pérdida de expresión de hasta el 70% en pRb se acompaña de menor expresión de Ciclina D1, disminución de la actividad CDK, de la proliferación celular y de un aumento de apoptosis mediada por E2F1. Así, se concluye que pRb actúa indirectamente como oncogén al frenar la apoptosis¹⁴¹.

Uno de los hechos que apoya el posible papel de pRb como oncogén en los ACNS es que existen relaciones significativas entre la sobreexpresión de pRb y los productos de la transcripción de la β -catenina, como son C-Myc y Ciclina D1. Desafortunadamente la IHQ es positiva tanto en las formas fosforiladas como no fosforiladas de pRb¹⁴¹, no siendo útil para determinar la función que esta sobreexpresión proteica tiene en la ruta Wnt. Los pacientes con sobreexpresión de pRb se relacionaban de forma significativa con los que expresan E2F1, sugiriendo que pRb se encuentra unida a E2F1 y por tanto bloquea su acción.

- El gen *CDK8* (13q12.3) codifica la proteína **CDK8** que en la ruta Wnt promueve la transcripción de la β -catenina mediante un doble mecanismo. La forma directa, la más importante, activa la transcripción génica de la β -catenina nuclear; la forma indirecta es por inhibición de E2F1⁷⁵.



Nosotros, con m-CGH, encontramos pérdidas de *CDK8* en el 5,7% y ganancias en el 2,9% (Figuras 51 y 52). Se observó una expresión positiva de *CDK8* en el 52,8% con sobreexpresión en el 2,2% (Tabla XXV).

Las ganancias en *CDK8*, detectadas mediante m-CGH, se relacionan con las pérdidas de *CDKN2A* detectadas mediante m-CGH ($p=0,035$). La sobreexpresión de *CDK8* se relaciona con la sobreexpresión de Ciclina D1 y E2F1 ($p=0,047$; $p=0,018$), (Tabla XXVII). La expresión de *CDK8* en más del 25% de las células se relaciona con la expresión nuclear de β -catenina ($p=0,029$), (Tabla XXVII). La pérdida en *CDK8* estudiada por m-CGH se relaciona con la ausencia de expresión de E-cadherina ($p=0,030$), (Tabla XXVIII). Los pacientes con alta expresión de *CDK8* tenían menor supervivencia específica de la enfermedad ($p=0,001$), (Tabla XXVI).

En el modelo teórico propuesto hemos encontrado una regulación negativa (71% de los casos), y por tanto un grado de concordancia intermedio, entre los niveles de *CDK8* nuclear y la expresión de E2F1 (Tabla XXX).

Las ganancias que observamos en los ACNS (2,9%) son muy bajas respecto a las descritas en ACCR (60%)⁷⁶, donde las ganancias y amplificaciones de *CDK8* se relacionan con la sobreexpresión proteica. Pese a estos valores bajos de ganancias, la expresión de *CDK8* estaba presente en el 52,8% de los ACNS, cifra algo inferior al 70% descrito en ACCR¹⁴⁵. En ACNS, al igual que lo publicado en ACCR¹⁴⁵, la sobreexpresión de *CDK8* se relaciona con menor supervivencia específica de enfermedad (Figura 58), quizá debido a que su expresión celular implica mayor capacidad para proliferar.

En ACCR la expresión nuclear de *CDK8* se relaciona de forma significativa con la expresión nuclear de β -catenina^{146,147}, al controlar la transcripción de los genes activados por la β -catenina.

Nosotros observamos relación entre los pacientes que expresan *CDK8* en más del 25% de las células y la expresión nuclear de β -catenina ($p=0,029$).



Como cabría esperar al promover la transcripción de la β -catenina a nivel nuclear, CDK8 mantiene relación con los otros genes que transcribe β -catenina. Así, encontramos relación entre la sobreexpresión de CDK8 y la sobreexpresión de Ciclina D1, hecho que apoya la activación de la ruta Wnt en ACNS. Hemos observado que la ganancia en *CDK8* se relaciona con la pérdida en *CDKN2A*. Esta relación entre ganancia de oncogén y pérdida de gen supresor, también apoya la hipótesis de que la ruta Wnt está activada en los ACNS.

La sobreexpresión de CDK8 se relaciona también con la sobreexpresión de E2F1. Se sugiere así que en los ACNS, CDK8 activa la ruta Wnt mediante la transcripción de genes dependientes de la β -catenina nuclear, siendo menos probable que inhiba E2F1.

Una vez debatidos e interpretados los resultados obtenidos de forma pormenorizada, en cada gen y proteína, esta discusión no sería completa, y no podría concluirse, si antes no hacemos unos comentarios sobre la **ruta Wnt** desde una **perspectiva global** en la carcinogénesis y progresión de los ACNS. En este sentido juega un papel importante el esquema propuesto en nuestro modelo teórico, donde una determinada proteína condiciona la activación o inhibición de otra en el siguiente paso de la vía canónica Wnt.

En primer lugar hay que considerar la expresión de la β -catenina en los ACNS, ya que en otras localizaciones tumorales, como los ACCR, esta proteína tiene un papel imprescindible en la activación de la ruta Wnt. La expresión de β -catenina a nivel nuclear estaba presente en el 30%, con mayor porcentaje en papilares-colónicos (36%) que en sólidos-mucinosos (20%), pero muy inferior a la descrita en los ACCR (80%). Esto indica que probablemente un 30-40% de los ACNS bien diferenciados utiliza la ruta Wnt en su carcinogénesis/progresión tumoral.

Los pasos de la ruta Wnt, esquematizados en nuestro modelo teórico, que presentan algún grado de concordancia: alta (paso 1), intermedia (pasos 2 y 8) y



baja (pasos 4, 5 y 7), son más que aquellos indiferentes (paso 6) o con discordancia baja (paso 3), (Tabla XXX). Si distintos pasos de la ruta Wnt se ven reflejados en nuestro estudio, probablemente esta tendencia indique que la ruta sea utilizada en un grupo considerable de ACNS, más aún si en 4 de ellos interviene la β -catenina.

No obstante, hay que suponer que no todos los ACNS siguen esta vía de cancerización, pues un marcador esencial en la ruta Wnt como es la β -catenina nuclear sólo se expresa en 1/3 de los casos. Por tanto, parece lógico y necesario centrar y dirigir los estudios hacia determinados subtipos histológicos de ACNS con expresión de β -catenina nuclear, con el fin de que las tendencias marcadas se acentúen.

6.4. Similitudes y diferencias clínico-patológicas y genético-moleculares entre los ACNS y los ACCR

Por último, para finalizar la discusión, resumimos en las tablas XXXI y XXXII las principales similitudes y diferencias clínico-patológicas y genético-moleculares encontradas entre los ACNS de nuestra serie y lo publicado para los ACCR.

Los ACNS, a diferencia de los ACCR, son tumores poco frecuentes en cuya génesis se ha involucrado al polvo de madera, aunque comparten a la inflamación crónica como posible agente etiológico común. Los ACNS, al igual que los ACCR, presentan tipos histológicos poco diferenciados y de peor pronóstico como son los mucinosos. Los estadios al diagnóstico tienen una distribución de frecuencias similar, aunque con distinta escala de graduación, no obstante en los ACCR hay establecido un “screening” para el diagnóstico precoz de las lesiones preinvasivas precursoras. A pesar de que en muchos países se realizan cribados para la detección precoz de los ACCR, más del 50% de estas neoplasias se diagnostican en



estadios C y D de Dukes, dato similar a lo que ocurre en los ACNS donde el 59% de los casos son estadios III y IV.

La cirugía es el arma terapéutica fundamental en ambos tipos de tumores, aunque en los ACCR está muy introducida la quimioterapia, mientras que en los ACNS es habitual la utilización de radioterapia complementaria. El motivo de este proceder es mejorar el control local en los ACNS con radioterapia, mientras que en los ACCR la quimioterapia adyuvante pretende reducir las micrometástasis.

El pronóstico de ambas neoplasias es similar, aunque algo más favorable en los ACCR. Los fallos en el tratamiento se deben a las recidivas locales en los ACNS y a las metástasis en los ACCR. No se pudo asegurar el motivo del mejor pronóstico de los ACCR respecto a los ACNS, pero habría que tener en cuenta aspectos positivos como la posibilidad de hacer diagnósticos precoces por medio del “screening” y al uso de la quimioterapia de forma protocolizada. No obstante, como aspectos negativos que se oponen a esta hipótesis estaría el mayor número de metástasis desarrolladas por los ACCR (Tabla XXXI).

Tabla XXXI. Similitudes/diferencias clínico-patológicas entre los ACNS y ACCR

Característica clínico-patológica	ACNS	ACCR	Referencia	Comentario
Incidencia	0,19/10 ⁵ h/año	53/10 ⁵ h/año	148	Los ACCR son muy frecuentes mientras que los ACNS son raros
Polvo de madera	Sí	No	20	El polvo de madera ↓ aclaramiento mucociliar y favorece inflamación crónica
Inflamación	Sí	Sí	25	Hay ACCR originados en la enfermedad inflamatoria intestinal
Histopatología	Mucinoso (27%). Sólido (13%). Colónico (47%). Papilar (13%)	Adenocarcinoma. Mucosecretor (anillo sello). Mucinoso. Adenoescamoso	149	Las variedades histológicas son similares en ACCR y ACNS. Buen pronóstico los papilares y peor en los mucinosos
Diferenciación	BD:60%;PD:40 %	BD 75%; PD 25%	150	Predominio de las formas diferenciadas en ambos tumores
Estadios	I: 28%, II: 13% III: 33%, IV: 26%	B1:12%, B2:18% C1:22%,C2:29% D:19% (Dukes)	149	En ACCR se hace "screening" que detecta estadios precoces y lesiones preinvasivas. Ambos tumores suelen dar clínica cuando están en estadios avanzados
Tratamiento	Cirugía sólo o + radioterapia	Cirugía sólo (I) o + quimioterapia (II, III). Radioterapia si enfermedad residual, bordes + o ganglios +	151	El tratamiento de elección en ACNS y ACCR es la cirugía. La alta tasa de metástasis ocultas en ACCR justifica quimioterapia adyuvante si estadio II o superior
Evolución: recidivas/metástasis	Recidivas 47% Metástasis 17%	Recidivas 10% Metástasis 50%	152	En ACCR la causa del fracaso terapéutico son las metástasis; en ACNS las recidivas locales
Supervivencia específica	Global: 50,2% 65% en I-III 10% en IV	Global: 60% 90%: local 70%: locorregional 11%: metástasis	153, 154	Mejor pronóstico en ACCR. Los estadios precoces tienen alta supervivencia en ambas neoplasias

En cuanto a su perfil genético molecular los ACNS se parecen a los ACCR en que la pérdida de expresión de E-cadherina se relaciona en ambos tumores con variables de mal pronóstico.

El porcentaje de activación de la ruta Wnt, determinado por la expresión nuclear de β -catenina, es menor en los ACNS que en los ACCR. Además, en los ACNS, la expresión es similar en los diferentes estadios, mientras que en los ACCR es un evento temprano, propio de los estadios precoces, que aumenta



según progresa el estadio tumoral. Pese a ello el perfil de expresión es similar al descrito en los ACCR con origen en la enfermedad inflamatoria intestinal.

En el gen *APC* la principal diferencia de los ACNS con respecto a los ACCR es que su metilación en los ACNS es un fenómeno poco frecuente en relación a la alta frecuencia observada en los ACCR. No obstante, en ambas localizaciones tumorales predominan las pérdidas génicas.

C-Myc tiene valores de sobreexpresión similares entre los ACNS y los ACCR, relacionándose en ambos tumores su sobreexpresión con la expresión nuclear de la β -catenina.

Ciclina D1 presenta unos valores de sobreexpresión menores en los ACNS respecto a los ACCR, pero en ambos tumores se comporta como una variable molecular de mal pronóstico.

La proteína p16 tiene unos valores de expresión y sobreexpresión menores en los ACNS que en los ACCR, pero en ambas neoplasias la expresión de p16 se relaciona con un peor pronóstico.

Por el contrario, los valores de expresión y sobreexpresión de E2F1 en los ACNS son mayores a los descritos en ACCR.

En pRb los valores de sobreexpresión son similares, con indicios de que actúa como oncogén en ambas neoplasias.

En CDK8 los valores de expresión y sobreexpresión son inferiores en los ACNS respecto a lo publicado en ACCR, aunque en ambas neoplasias su sobreexpresión es una variable molecular que indica mal pronóstico (Tabla XXXII).

Tabla XXXII. Similitudes/diferencias genético-moleculares de la ruta Wnt entre los ACNS y ACCR

Característica genético-molecular	ACNS	ACCR	Referencia	Comentario
<i>CDH1</i> /E-cadherina	↓ expresión en relación con subtipo mucinoso	↓ expresión en relación con peor pronóstico	104	Marcador de mal pronóstico en ambos tumores
<i>CTNNB1</i> / β -catenina	↓ expresión (m): 24,5%. Expresión + (n): 30%. > expresión en diferenciados. Peor pronóstico en diferenciados con expresión (n)	↓ expresión (m): 80%. Expresión + (n): 80%, en EII: 48%. Expresión (n) evento precoz. Peor pronóstico en EII con expresión (n)	69	Los ACNS son similares a los ACCR derivados de EII. Marcador mal pronóstico (n) en ACCR derivados de EII y en ACNS diferenciados
<i>APC</i>	Pérdidas: 48,9%. Metilación: 4,1%. Relación con ganancias de <i>CTNNB1</i>	Pérdidas: 26,1%. ↓ expresión: 80%. Metilación: 70%	73,115, 116	Marcador mal pronóstico (pérdidas) en ACNS. Escasa metilación en ACNS, muy frecuente en ACCR. Apoya ruta Wnt: relación pérdida principal gen supresor con ganancia principal oncogén
<i>MYC</i> /C-Myc	Expresión: 98%. Sobreexpresión: 30% (58% si $\geq 30\%$ células). Relación con expresión nuclear de β -catenina	Sobreexpresión 58%	113	Alta expresión y similar en ambos tumores. Apoya ruta Wnt: relación de sobreexpresión con expresión β -catenina (n)
<i>CCND1</i> /Ciclina D1	Expresión: 55,8%. Sobreexpresión: 3,5%. Relación con mal pronóstico	Sobreexpresión: 28-55%. Relación con mal pronóstico	117,117	Marcador de mal pronóstico en ambos tumores
<i>CDKN2A</i> /p16	Expresión: 66,7%. Sobreexpresión: 11,6%. No hay metilación	Expresión: 98%. Sobreexpresión: 35%. Metilación: 20%	69, 113	Marcador de menor supervivencia en ambos tumores
<i>E2F1</i> /E2F1	Ganancias: 40%. Expresión: 76%. Sobreexpresión: 14,9%	Ganancias: 25%. Expresión: 25%	131,138	En ACCR la expresión de E2F1 indica buen pronóstico (↓ replicación e induce apoptosis)
<i>RB</i> /pRb	Ganancias: 28,6%. Expresión: 98,9%. Sobreexpresión: 83,2%. Relación con sobreexpresión de C-Myc y Ciclina D1	Ganancias: 33%. Sobreexpresión: 87%. Oncogén implicado	132,139, 141	Sobreexpresión similar. Acción de oncogén en ACNS en relación con productos transcripción de β -catenina (n): C-Myc y Ciclina D1
<i>CDK8</i> /CDK8	Ganancias: 2,9%. Expresión: 52,8%. Sobreexpresión: 2,2%. Relación con mal pronóstico	Ganancias: 60%. Expresión: 70%. Relación con mal pronóstico	76,145, 145	La sobreexpresión es marcador de mal pronóstico en ambos tumores

m: membrana, n: núcleo, EII: enfermedad inflamatoria intestinal

Una vez establecida la comparación entre los ACNS y los ACCR, podemos concretar que en sus aspectos clínico-patológicos ambas localizaciones tumorales



tienen unas características comunes muy marcadas, propias quizá de una etiología e histopatología similar, aunque con diferencias puntuales, en probable relación con su diferente localización. Así, marcarían un distinto perfil clínico entre los ACNS (invasión local, peor pronóstico) y los ACCR (metástasis, mejor pronóstico). Estas diferencias, en cierto modo contradictorias, podrían estar condicionadas por algunos hechos clínicos, como son los programas de diagnóstico precoz y el uso de la quimioterapia de forma protocolizada en los ACCR. El mayor avance realizado en los ACCR, respecto a los ACNS en estos dos aspectos, podría deberse ha sido debido a que al tener mayor incidencia ha contado con mayores recursos destinados a la prevención e investigación de terapéuticas más eficaces. No obstante, en los ACNS podrían realizarse acciones similares, sobre todo teniendo en cuenta que se originan en una población de riesgo muy concreta.

El perfil genético molecular similar apoya la posible etiología relacionada con la inflamación crónica, aunque con algunas peculiares en cada tipo tumoral, matizadas por los agentes etiológicos concretos y la localización anatómica, que condicionan sus características clínico-patológicas específicas. Desde el punto de vista general los cambios genético-moleculares observados en los ACNS tienen similitud, salvo en algunos aspectos puntuales, ya comentados, con lo observado en los ACCR, aunque estos últimos suelen tener valores más altos.





Universidad
de Oviedo





7. CONCLUSIONES

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

- 1) Los pacientes con ACNS tipo ITAC han tenido exposición crónica al polvo de madera en el 80% de los casos. El subtipo histológico más frecuente fue el colónico (48%). El tratamiento quirúrgico con radioterapia posterior obtuvo una supervivencia específica del 50%. Los fracasos terapéuticos se deben a la alta tasa de recidivas locales (47%) y en menor medida a las metástasis (17%). La invasión intracraneal está presente en el 18% de los casos. Una peor supervivencia se relacionaba de forma significativa con el subtipo histológico sólido/mucinoso, el estadio IV, la invasión intracraneal, las recidivas y las metástasis. El estudio multivariante, en relación al peor pronóstico, resultó significativo para el estadio IV y los subtipos histológicos poco diferenciados.
- 2) Los cambios génicos más frecuentes observados por m-CGH fueron las pérdidas en *APC* (17%), *CDKN2A* (11,4%), *CTNNB1* (8,6%) y las ganancias en *E2F1* (40%), *MYC* (37%), *CDKN2A* (15%), *CTNNB1* (14%) y *CCND1* (14%).
- 3) Los cambios génicos más frecuentes observados por MLPA fueron las pérdidas en *APC* (49%), *CDKN2A* (37%), *CDH1* (26,8%) y las ganancias en *MYC* (31%), *RB* (29%) y *CCND1* (21%). Sólo hubo amplificaciones en *APC* y *CDKN2A* (5%), siendo las metilaciones en *APC* muy escasas (4%).
- 4) La expresión proteica fue positiva para E-cadherina (100%), pRb (99%), C-Myc (98%), β -catenina de membrana citoplasmática (93%), E2F1 (76%), p16 (67%), Ciclina D1 (56%), CDK8 (53%) y β -catenina nuclear (30%). La sobreexpresión se observó en pRb (83%), C-Myc (30%), E2F1 (15%) y p16 (12%).
- 5) Diversas variables génicas y de expresión implicadas en la ruta Wnt están relacionadas entre sí, de forma significativa, como son los genes *CTNNB1*, *CDH1*, *APC*, *CDK8*, *CDKN2A* y *RB*, junto a las proteínas E-cadherina, β -catenina, Ciclina D1, pRb, CDK8, E2F1 y C-Myc.
- 6) Los grados de concordancia/discordancia observados en los pasos establecidos en la ruta Wnt tenían un grado alto de concordancia entre E-cadherina/ β -



catenina de membrana, grado intermedio entre β -catenina de membrana/ β -catenina nuclear y E2F1/CDK8, y grado bajo entre β -catenina/Ciclina D1, β -catenina/p16 y E2F1/pRb. Sólo β -catenina/C-Myc mostraba discordancia en grado bajo.

- 7) La supervivencia se relacionó de forma significativa con la ganancia *CTNNB1* y la pérdida de *APC*. Ambos genes se relacionan también con el subtipo mucinoso/sólido, el estadio IV y la invasión intracraneal. El estudio multivariante resultó significativo para la ganancia de *CTNNB1* en relación al mal pronóstico.
- 8) La supervivencia se relacionó de forma significativa con la sobreexpresión de CDK8, Ciclina D1 y β -catenina nuclear en los subtipos diferenciados. La falta de expresión en la membrana citoplasmática de E-cadherina y β -catenina se relacionó con el subtipo mucinoso/sólido. La sobreexpresión de CDK8 fue considerada de mal pronóstico en el estudio multivariante.
- 9) Los ACNS comparten con los ACCR similitudes génicas y de expresión en puntos clave de la ruta Wnt, como son las pérdidas de *APC*, las ganancias en *E2F1* y *RB*; además de cambios en la expresión de las proteínas β -catenina nuclear, Ciclina D1, p16 y en la sobreexpresión de C-Myc y pRb, sugiriendo una carcinogénesis relacionada.
- 10) Al contrario de lo observado en ACCR en los ACNS son infrecuentes la metilación de genes supresores (*APC*, *CDKN2A*), la ganancia de *CDK8* y la expresión nuclear de β -catenina en estadios precoces.



Universidad
de Oviedo





8. PROYECTO FUTURO



El estudio realizado presenta una serie amplia de pacientes con ACNS, analizados por diversas técnicas genético-moleculares (m-CGH, MLPA, MLPA-MS, TA-IHQ). Se obtiene así gran número de variables clínico-histológicas, génicas y de expresión, éstas últimas ajustadas a los pasos de una ruta compleja como es la Wnt. Hemos tratado de ser rigurosos y exhaustivos en todos los procedimientos realizados, sin embargo, en un paso crucial como es la expresión de APC no se han podido obtener resultados satisfactorios en la IHQ. Por ese motivo se prescindió de APC en el estudio de expresión y en el análisis de concordancia, aunque sí se estudió con m-CGH, MLPA y MLPA-MS. Por tanto, parece obvio que uno de los próximos proyectos sea estudiar la expresión proteica de APC con un anticuerpo seguro y eficaz, además de hacer un análisis específico de sus mutaciones.

Un resultado llamativo fue la sobreexpresión de genes supresores en la ruta Wnt, que en neoplasias distintas a las de colon habían sido implicados como oncogenes. Sería interesante estudiar la proliferación (Ki67), con el fin de aclarar si la sobreexpresión proteica se debe a que el tumor ha superado el freno del gen supresor, o si en los ACNS funcionan verdaderamente como oncogenes.

A tenor de lo observado parece adecuado concretar el estudio de la ruta Wnt- β -catenina a los ACNS de tipo colónico, que son los más frecuentes y donde parece estar más implicada dicha ruta. Se podrían confirmar así las tendencias observadas en sus distintos pasos.

Recientemente se han desarrollado fármacos anti Wnt que podrían testarse *in vitro* (líneas celulares) e *in vivo* (modelos animales) en ACNS que expresen β -catenina nuclear, con el fin de verificar su posible utilidad terapéutica.

Por último, se ha de señalar que en los últimos años se han publicado numerosos artículos relacionados con la ruta Wnt, describiendo nuevos genes y proteínas que interaccionan y regulan sus pasos. Así, la acción sinérgica del gen *PTEN* sobre el *APC* actúa como un gen supresor de tumor, inhibiendo la activación de la vía WNT¹⁵⁵. Es obligado incorporar su estudio a nuestra serie de



ACNS, con el fin de describir su implicación y su posible utilidad en el control de estas neoplasias.



Universidad
de Oviedo





9. BIBLIOGRAFÍA



- ¹ Dulguerov P, Jacobsen MS, Allal AS, Lehmann W, Calcaterra T. Nasal and paranasal sinus carcinoma: are we making a progress? A serie of 220 patients and systematic review. *Cancer* 2001; 92:3012-3029.
- ² Cantú G, Bimbi G, Miceli R, Mariani L, Colombo S, Riccio S, Squadrelli M, Battisti A, Pompilio M, Rossi M. Lymph node metastases in malignant tumors of paranasal sinuses. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2008; 134: 170-177.
- ³ Álvarez I, Suárez C, Rodrigo JP, Núñez F, Caminero MJ. Prognosis factors in paranasal sinus cancer. *Am J Otolaryngol* 1995; 16: 109-114.
- ⁴ Nuñez F, Suárez C, Álvarez I, Losa JL, Barthe P, Fresno M. Sino-nasal adenocarcinoma: epidemiological and clinicopathological study of 34 cases. *J Otolaryngol* 1993; 22: 86-90.
- ⁵ Gras JR, Sarandeses A, Montserrat JR, Orús C. Revisión de los carcinomas de senos paranasales. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2007; 58: 266-275.
- ⁶ Suárez Nieto C, Llorente Pendás JL. Tumores malignos de fosas nasales y Senos paranasales. En: Suárez Nieto C: *Oncología de Cabeza y Cuello*, Barcelona: Ars Medica; 2002: 75-90.
- ⁷ López Álvarez F. Análisis de los genes *EGFR* y *HER2* en los carcinomas epidermoides nasosinusales. Tesis Doctoral de la Universidad de Oviedo. Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias, 2010.
- ⁸ Barnes L. Intestinal- type adenocarcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Am J Surg Pathol* 1986; 10:192-202.
- ⁹ Wilhelmsson B, Lundh B. Nasal epithelium in woodworkers in the furniture industry. An histological and cytological study. *Acta Otolaryngol* 1984; 98: 321-324.
- ¹⁰ Klintonberg C, Olofsson J, Hellquist H, Söckjer H. Adenocarcinoma of the ethmoid sinuses. A review of 28 cases with special reference to wood dust exposure. *Cancer* 1984;54:482-488.
- ¹¹ Batsakis JG. Pathology of tumors of the nasal cavity and paranasal sinuses. En: Thawley, Pange, Batsakis and Lindberg eds. *Comprehensive management of head and neck tumors*. Philadelphia: WS Saunders Co, 1987: 327- 343.
- ¹² Manzarbeitia F, Cortés L. Anatomía patológica de los tumores de las fosas nasales y senos paranasales. En: Suárez C, eds. *Tratado de Otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*. Tomo IV. Madrid: Proyectos Médicos 1999; 2585- 2594.
- ¹³ Muir CS, Nectoux J. Descriptive epidemiology of malignant neoplasma of nose, nasal cavities, middle ear and accessory sinuses. *Clin Otolaryngol* 1980; 5: 195-211.
- ¹⁴ Acheson ED, Codwell RH, Hadfield E, Macbeth RG. Nasal cancer in the woodworkers in the furniture industry. *Br Med J* 1968; 2: 587-596.
- ¹⁵ Mannelje A, Kogevinas M, Luce D, Demers PA, Bégin D, Bolm-Audorff U, Comba P, Gérin M, Hardell L, Hayes RB, Leclerc A, Magnani C, Merler E, Tobías A, Boeffetta P. Sinonasal cancer, occupation, and tobacco smoking in European women and men. *Am J Ind Med* 1999;36:101-107.
- ¹⁶ Götte K, Hörmann K. Sinonasal malignancy: what's new?. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2004; 66: 85-97.
- ¹⁷ Wolf J, Schmezer P, Fengel D, Schroeder HG, Scheithauer H, Woeste P. The role of combination effects on the etiology of malignant nasal tumors in the wood-working industry. *Acta Otolaryngol Suppl* 1998; 535: 1-16.
- ¹⁸ Demers PA, Kogevinas M, Boffetta P, Leclerc A, Luce D, Gérin M, Battista G, Belli S, Bolm-Audorf U, Brinton LA. Wood dust and sino-nasal cancer: pooled reanalysis of twelve case-control studies. *Am J Ind Med* 1995; 28: 151-166.
- ¹⁹ Vaughan TL, Davis S. Wood dust exposure and squamous cell cancers of the upper respiratory tract. *Am J Epidemiol* 1991;133:560-564.
- ²⁰ Voss R, Stenersen T, Roald B, Boysen M. Sinonasal cancer and exposure to softwood. *Acta Otolaryngol* 1985;99:172-178.
- ²¹ Viladot J, Alejo M, Droguet M, García P, Esteller E, León J. Adenocarcinoma of the nose and paranasal sinuses. Presentation of 3 cases. *Acta Otorrinolaringol Esp* 1990;41:405-408.



- ²² Morales C, Megía R, Del Valle A, Acinas O, Rama J. Nasal sinus adenocarcinoma in patients exposed to wood dust in the Community of Cantabria, Spain. *Acta Otorrinolaringol Esp* 1997;48:620-624.
- ²³ Acheson ED, Codwell RH, Jolles B. Nasal cancer in the Northhamptonshire boot and shoe industry. *Br Med J* 1970;1: 385- 393.
- ²⁴ Zheng W, McLaughlin JK, Chow WH, Chien HT, Blot WJ. Risk factors for cancers of the nasal cavity and paranasal sinuses among white men in the United States. *Am J Epidemiol* 1993;138:965-972.
- ²⁵ Llorente JL, Pérez -Escuredo J, Alvarez-Marcos C, Suárez C, Hermsen M. Genetic and clinical aspects of Wood dust related intestinal-type sinonasal adenocarcinoma: a review. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2009; 266: 1-7.
- ²⁶ Leclerk A, Martínez M, Gérin M, Luce D, Brugère J. Sinonasal cancer and wood dust exposure: results from a case- control study. *Am J Epidemiol* 1994; 140: 340-349.
- ²⁷ Holt GR. Sinonasal neoplasm and inhaled air toxics. *Otolaryngol* 1995; 16: 109-114.
- ²⁸ Määttä J, Lehto M, Leino M, Tillander S, Haapakoski R, Majuri ML, Wolff H, Rautio S, Welling I, Husgafvel-Pursiainen K, Savolainen K, Alenius H. Mechanisms of particle-induced pulmonary inflammation in a mouse model: exposure to wood dust. *Toxicol Sci* 2006; 93: 96-104 .
- ²⁹ Bimbi G, Saraceno MS, Riccio S, Gatta G, Licitra L, Cantù G. Adenocarcinoma of ethmoid sinus: an occupational disease. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2004; 24: 199-203.
- ³⁰ Cantu G, Solero C.L, Mariani L, Lo Vullo S, Riccio S, Colombo S, Pompillo M, Perrone F, Formillo P, Cuatrone P. Intestinal type adenocarcinoma of the ethmoid sinus in wood and leather workers: A retrospective study of 153 cases. *Head Neck* 2011; 33: 535-542.
- ³¹ Nylander LA, Dement JM. Carcinogenic effects of wood dust: review and discussion. *Am J Ind Med* 1993; 24: 619-647.
- ³² García JR, González F, López C. Tumores nasosinusales. *Manual de Otorrinolaringología*. Eds Ramírez Camacho R, Mc Graw-Hill. Madrid: Interamericana. 1998: 225-235.
- ³³ Franchi A, Santucci M, Wenig B. Adenocarcinoma. *World Health Organization classification of tumours, pathology and genetics of head and neck tumours*. (Ed. Barnes L, Evenson JW, Reichart P, Sidransky D); IARC Press, Lyon. 2005: 20-23.
- ³⁴ Kleinsasser O, Schroeder HG. Adenocarcinomas of the inner nose after exposure to wood dust. Morphological findings and relationships between histopathology and clinical behavior in 79 cases. *Arch Otorhinolaryngol* 1988; 245: 1-15.
- ³⁵ Ernest A, Weymuller JR. Neoplasm of the paranasal sinuses. En: Cummings CW, et al, Editors. *Otolaryngol Head Neck Surgery*, St. Louis: Mosby; 1992: 941-954.
- ³⁶ Myers E, Carrau RL. Neoplasm of the nose and paranasal sinuses. En: Bailey BJ, editors. *Head and Neck Surgery-Otolaryngology*, Philadelphia JB: Lippincott Company; 1993: 1445-1469.
- ³⁷ Sobin LH, Wittekind C. UICC. TNM classification of malignant tumours (sixth edition). New York: Wiley-Liss, 2002.
- ³⁸ Cantú G, Solero C, Mariani L, Mattavelli F, Pizzi N, Licitra L. A new classification for malignant tumors involving the anterior skull base. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1999; 125: 1252- 1257.
- ³⁹ Bogaerts S, Vander Poorten V, Nuyts S, Van den Bogaert W, Jorissen M. Results of endoscopic resection followed by radiotherapy for primarily diagnosed adenocarcinomas of the paranasal sinuses. *Head Neck* 2008; 30: 728-736.
- ⁴⁰ Howard DJ, Lund VJ, Wei WI. Craniofacial resection for tumors of the nasal cavity and paranasal sinuses: a 25- years experience. *Head Neck* 2006; 28: 867-873.
- ⁴¹ Nicolai P, Battaglia P, Bignami M, Bolzoni A, Delù G, Khrais T, Lombardi D, Castelnuovo P. Endoscopic surgery for malignant tumors of the sinonasal tract and adjacent skull base: a 10-year experience. *Am J Rhinol* 2008; 22: 308-316.
- ⁴² Suárez C, Llorente JL, Fernández de León R, Cabanillas R, Suárez V, López A. Resección craneofacial anterior: Resultados oncológicos y complicaciones en una serie de 111 casos. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2004; 55: 27-33.

- ⁴³ Bussi M, Gervasio CF, Riontino E, Valente G, Ferrari L, Pira E, Cortesina G. Study of ethmoidal mucosa in a population at occupational high risk of sinonasal adenocarcinoma. *Acta Otolaryngol* 2002; 122:197-201.
- ⁴⁴ Llorente JL, Núñez F, Rodrigo JP, Fernández R, Alvarez C, Hermsen M, Suárez C. Adenocarcinomas nasosinusales: nuestra experiencia. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2008; 59: 235-238.
- ⁴⁵ Choussy O, Ferron C, Védrine PO, Toussaint B, Liétin B, Marandas P, Babin E, De Raucourt D, Reyt E, Cosmidis A, Makeiff M, Dehesdin D, GETTEC Study Group. Adenocarcinoma of ethmoid: A GETTEC Retrospective Multicenter study of 418 case. *Laryngoscope* 2008; 118: 437-443.
- ⁴⁶ Licitra L, Suardi S, Bossi P, Locati LD, Mariani L, Quattrone P, lo Vullo S, Oggionni M, Olmi P, Cantù G, pierotti MA, Pilotti S. Prediction of TP53 status for primary cisplatin, fluorouracil and leucovorin chemotherapy in ethmoid sinus intestinal-type adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2004; 22: 4901- 4906.
- ⁴⁷ Almeyda R, Capper J. Is surgical debridement and topical 5 fluoracil the optimum treatment for woodworker' adenocarcinoma of the ethmoid sinuses? A case-controlled study of a 20 - year experience. *Clin Otolaryngol* 2008; 33: 435-441.
- ⁴⁸ Robin PE, Powel DJ, Stansbie JM. Carcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses: incidence and presentation of different histological types. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1979; 4: 431-456.
- ⁴⁹ Núñez F, Alvarez I, Suárez C, Mateos V, Campos DM, Astudillo A. Ethmoidal carcinoma presenting as sensorineural hearing loss. *Am J Rhinol* 1993; 7: 241-244.
- ⁵⁰ Ariza M, Llorente JL, Alvarez-Marcos C, Baragaño L, Salas A, Rodriguez Prado N, Hermsen M, Suárez C, Sampedro A. Comparative genomic hybridization in primary sinonasal adenocarcinomas. *Cancer* 2004; 100: 335-341.
- ⁵¹ Korinath D, Pacyna-Gengelbach M, Deutschmann N, Hattenberg S, Bockmühl U, Dietel M, Schroeder HG, Donhuijsen K, Petersen I. Chromosomal imbalances in wood dust-related adenocarcinomas of the inner nose and their associations with pathological parameters. *J Pathol* 2005; 207: 207- 215.
- ⁵² Hermsen MA, Llorente JL, Pérez-Escuredo J, López F, Ylstra B, Alvarez-Marcos C, Suárez C. Genome-wide analysis of genetic changes in intestinal-type sinonasal adenocarcinomas. *Head Neck* 2009;31:290-297.
- ⁵³ Pérez P, Domínguez O, González S, González S, Triviño A, Suárez C. Ras-gene mutations in ethmoid sinus adenocarcinoma : prognosis implications. *Cancer* 1999; 86: 255-264.
- ⁵⁴ Yomm SS, Rashid A, Rosenthal DI, Elliott DD, Weber RS, El-Naggar AK. Genetic analysis of sinonasal adenocarcinoma phenotypes: distinct alterations of histogenetic significance. *Mod Pathol* 2005; 18: 315-319.
- ⁵⁵ Wu TT, Barnes L, Bakker A, Swalsky PA, Finkelstein SD. K-ras-2 and p53 genotyping of intestinal-type adenocarcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Mod Pathol* 1996; 9: 199-204.
- ⁵⁶ Perrone F, Oggionni M, Birindelli S, Suardi S, Tabano S, Romano R, Moiraghi ML, Bimbi G, Quattrone P, Cantu G, Pierotti MA, Licitra L, Pilotti S. TP53, p14ARF, p16INK4a and H-ras gene molecular analysis in intestinal- type adenocarcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Int J Cancer* 2003; 105: 196-203.
- ⁵⁷ Rajagopalan H, Nowak MA, Vogelstein B, Lengauer C. The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 695-701.
- ⁵⁸ Frattini M, Perrone F, Suardi S, Balestra D, Caramuta S, Colombo F, Licitra L, Cantù G, Pierotti MA, Pilotti S. Phenotype-genotype correlation: challenge of intestinal- type adenocarcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Head Neck* 2006; 28: 909-915.
- ⁵⁹ Llorente J, Aldama P, Álvarez-Marcos C, Escudero J, Alonso-Cuervós M, Fresno F, Suárez C, Hermsen M. Análisis genético molecular con MLPA en los adenocarcinomas nasosinusales. *Acta Otolaryngol Esp* 2008;59:151-158.
- ⁶⁰ Jass JR. Pathogenesis of colorectal cancer. *Surg Clin North Am* 2002; 82: 891-904.
- ⁶¹ Kinzler KW, Vogelstein B. Colorectal tumors. En: Kinzler KW, Vogelstein B (eds): *The Genetic Basis of Human Cancer* 2004; 53: 573.



- ⁶² Martínez JG, Pérez-Escuredo J, López F, Suárez C, Alvarez-Marcos C, Llorente JL, Hermsen MA. Microsatellite instability analysis of sinonasal carcinomas. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2009 ;140:55-60.
- ⁶³ Katoh M, Katho M. WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clin Cancer Res* 2007;13:4042-4045.
- ⁶⁴ Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, β -catenin, and cadherin pathways. *Science* 2004; 303: 1483-1487.
- ⁶⁵ Moon RT, Bowerman B, Boutros M, Perrimon N. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science* 2002; 296: 1644-1646.
- ⁶⁶ Takahashi-Yanaga F, Kahn M. Targeting Wnt signaling: can we safely eradicate cancer stem cells?. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 3153-3162.
- ⁶⁷ Otero JJ, Fu W, Kan L, Cuadra AE, Kessler JA. Beta-catenin signaling is required for neural differentiation of embryonic stem cells. *Development* 2004; 131: 3545-3557.
- ⁶⁸ Akiyama T. Wnt/beta-catenin signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000; 11: 273-282.
- ⁶⁹ Aust DE, Terdiman JP, Willenbacher RF, Chew K, Ferrell L, Florendo C, Molinaro-Clark A, Baretton GB, Löhrs U, Waldman FM. Altered distribution of beta-catenin, and its bindings protein E-cadherin and APC, in ulcerative colitis-related colorectal cancer. *Mod Pathol* 2001; 14: 29-39.
- ⁷⁰ Segditsas S, Rowan AJ, Howarth K, Jones A, Leedham S, Wright NA, Gorman P, Chambers W, Domingo E, Roylance RR, Sawyer EJ, Sieber OM, Tomlinson IP. APC and the three-hit hypothesis. *Oncogene* 2009;28:146-155.
- ⁷¹ Van Es JH, Barker N, Clevers H. You WNT some, you lose some: oncogenes in the Wnt signaling pathway. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13:28-33.
- ⁷² Polakis P. The oncogenic activation of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev* 1999; 9:15-21.
- ⁷³ Lifschitz-Mercer B, Amitai R, Maynon BB, Shechtman L, Czernobilsky B, Leider-Trejo L, Ben-Ze'ev A, Geiger B. Nuclear localization of beta-catenin and plakoglobin in primary and metastatic human colonic carcinomas, colonic adenomas, and normal colon. *Int J Surg Pathol* 2001;9:273-279.
- ⁷⁴ Virmani AK, Rathi A, Sathyanarayana UG, Padar A, Huang CX, Cunningham HT, Farinas AJ, Milchgrub S, Euhus DM, Gilcrease M, Herman J, Minna JD, Gazdar AF. Aberrant methylation of the adenomatous polyposis coli (APC) gene promoter 1A in breast and lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1998-2004.
- ⁷⁵ Morris EJ, Ji JY, Yang F, Di Stefano L, Herr A, Moon NS, Kwon EJ, Haigis KM, Näär AM, Dyson NJ. E2F1 represses beta-catenin transcription and is antagonized by both pRB and CDK8. *Nature* 2008; 455: 552-556.
- ⁷⁶ Firestein R, Bass AJ, Kim SY, Dunn IF, Silver SJ, Guney I, Freed E, Ligon AH, Vena N, Ogino S, Chheda MG, Tamayo P, Finn S, Shrestha Y, Boehm JS, Jain S, Bojarski E, Mermel C, Barretina J, Chan JA, Baselga J, Tabernero J, Root DE, Fuchs CS, Loda M, Shivdasani RA, Meyerson M, Hahn WC. CDK8 is a colorectal cancer oncogene that regulates beta-catenin activity. *Nature* 2008; 455: 547-551.
- ⁷⁷ Gope R, Christensen MA, Thorson A, Lynch HT, Smyrk T, Hodgson C, Wildrick DM, Gope ML, Boman BM. Increased expression of the retinoblastoma gene in human colorectal carcinomas relative to normal colonic mucosa. *J Natl Cancer Inst* 1990 ; 82:310-314.
- ⁷⁸ Bernards R. Cancer: Entangled pathways. *Nature* 2008; 455: 479-480.
- ⁷⁹ Perez-Ordoñez P, Huynh NH, Berean KW, Jordan RC. Expression of mismatch repair proteins, beta catenin, and E cadherin in intestinal-type sinonasal adenocarcinoma. *J Clin Pathol* 2004; 57: 1080-1083
- ⁸⁰ Delmas V, Beermann F, Martinozzi S, Carreira S, Ackermann J, Kumasaka M, Denat L, Goodall J, Luciani F, Viros A, Demirkan N, Bastian BC, Goding CR, Larue L. Beta-catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16^{INK4a} expression and cooperates with N-Ras in melanoma development. *Genes Dev* 2007; 21: 2923-2925.
- ⁸¹ Barker N, Clevers H. Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5 : 997-1014.

- ⁸² Kim JS, Crooks H, Foxworth A, Waldman T. Proof-of-principle: oncogenic beta-catenin is a valid molecular target for the development of pharmacological inhibitors. *Mol Cancer Ther* 2002; 1: 1355-1359.
- ⁸³ Hu J, Dong A, Fernandez-Ruiz V, Shan J, Kawa M, Martínez-Ansó E, Prieto J, Qian C. Blockade of Wnt signaling inhibits angiogenesis and tumor growth in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2009; 69: 6951-6959.
- ⁸⁴ Grösch S, Tegeder I, Niederberger E, Bräutigam L, Geisslinger G. COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. *FASEB J* 2001; 15: 2742-2744.
- ⁸⁵ Maier TJ, Jansen A, Schmidt R, Geisslinger G, Grösch S. Targeting the beta-catenin/APC pathway: a novel mechanism to explain the cyclooxygenase-2-independent anticarcinogenic effects of celecoxib in human colon carcinoma cells. *FASEB J* 2005; 19: 1353-1355.
- ⁸⁶ Sakoguchi-Okada N, Takahashi-Yanaga F, Fukada K, Shiraishi F, Taba Y, Miwa Y, Morimoto S, Lida M, Sasaguri T. Celecoxib inhibits the expression of surviving via the suppression of promoter activity in human colon cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2007; 73: 1318-1329.
- ⁸⁷ Carvalho B, Ouwerkerk E, Meijer GA, Ylstra B. High resolution microarray comparative genomic hybridisation analysis using spotted oligonucleotides. *J Clin Pathol* 2004; 57: 644-646.
- ⁸⁸ Alberston DG, Ylstra B, Segraves R, Collins C, Dairkee SH, Kowbel D, Kuo WL, Gray JW, Pinkel D. Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies CYP24 as a candidate oncogene. *Nat Genet* 2000; 25: 144-146.
- ⁸⁹ Hodgson G, Hager JH, Volik S, Hariono S, Wernick M, Moore D, Nowak N, Albertson DG, Pinkel D, Collins C, Hanahan D, Gray JW. Genome scanning with array CGH delineates regional alteration in mouse islet carcinoma. *Nat Genet* 2001; 29: 459-464.
- ⁹⁰ Emanuel BS, Saitta SC. From microscope to microarrays: dissecting recurrent chromosomal rearrangements. *Nat Rev Genet* 2007; 8: 869-883.
- ⁹¹ Pollack JR, Sorlie T, Perou CM, Rees CA, Jeffrey SS, Lonning PE, Tibshirani R, Botstein D, Borresen-Dale AL, Brown PO. Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 12963-12968.
- ⁹² Wilhelm M, Veltran JA, Olshen AB, Jain AN, Moore DH, Presti JC Jr, Kovacs G, Waldman FM. Array-based comparative genomic hybridization for the differential diagnosis of renal cell cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 957-960.
- ⁹³ Snijders AM, Nowee ME, Fridlyand J, Piek JM, Dorsman JC, Jain AN, Pinkel D, van Diest PJ, Verheijen RH, Albertson DG. Genome-wide-array-based comparative genomic hybridization reveals genetic homogeneity and frequent copy number increases encompassing CCNE1 in fallopian tube carcinoma. *Oncogene* 2003; 22: 4281-4286.
- ⁹⁴ Weiss MM, Kuipers EJ, Postma C, Snijders AM, Siccama I, Pinkel D, Westerga J, Meuwissen SG, Albertson DG, Neijer GA. Genomic profiling of gastric cancer predicts lymph node status and survival. *Oncogene* 2003; 22: 1872-1879.
- ⁹⁵ Snijders AM, Nowak N, Segraves R, Blackwood S, Brown N, Conroy J, Hamilton G, Hindle AK, Huey B, Kimura K, Law S, Myambo K, Palmer J, Ylstra B, Yue JP, Gray JW, Jain AN, Pinkel D, Albertson DG. Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nat Genet* 2001; 29:263-264.
- ⁹⁶ Snijders AM, Pinkel D, Albertson DG. Current status and future prospects of array-based comparative genomic hybridisation. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2003; 2: 37-45.
- ⁹⁷ Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, Eisen MB, Pergamenschikov A, Williams CF, Jeffrey SS, Botstein D, Brown PO. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet* 1999; 23: 41-46.
- ⁹⁸ Hyman E, Kauraniemi P, Hautaniemi S, Wolf M, Mousses S, Rozenblum E, Ringnér M, Monni O, Elkahlon A, Kallioniemi OP, Kallioniemi A. Impact of DNA amplification on gene expression patterns in breast cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 6240-6245.



- ⁹⁹ Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acid Res* 2002; 30: 1-13.
- ¹⁰⁰ Worsham MJ, Pals G, Schouten JP, Van Spaendonk RM, Concus A, Carey TE, Benninger MS. Delineating genetic pathways of disease progression in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003; 129 :702-708.
- ¹⁰¹ Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*; 1998; 4: 844-847.
- ¹⁰² Nocito A, Kononen J, Kallioniemi OP, Sauter G. Tissue microarrays (TMAs) for high-throughput molecular pathology research. *Int J Cancer* 2001; 94:1-5.
- ¹⁰³ Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Sauter G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J Pathol* 2001; 195:72-79.
- ¹⁰⁴ Imam A, Taylor CR. Application of immunohistochemical methods in the diagnosis of malignant disease. *Cancer Invest* 1985;3:339-359.
- ¹⁰⁵ Califano J, Van der Riet, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantosi S, Corio R , Lee D, Greenberg B, Koch W, Sidransky D. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 1996;56:2488-2492.
- ¹⁰⁶ Álvarez C, Alonso-Guervos M, Prado NR, Gimeno TS, Iglesias FD, Hermsen M, Llorente JL. Genetic model of transformation and neoplastic progression in laryngeal epithelium. *Head Neck* 2011; 33:216-224.
- ¹⁰⁷ Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-767.
- ¹⁰⁸ Bondi J, Bukholm G, Nesland JM, Bakka A, Bukholm IR. An increase in the number of adhesion proteins with altered expression is associated with an increased risk of cancer death for colon carcinoma patients. *Int J Colorectal Dis* 2006 ;21:231-237.
- ¹⁰⁹ Rodrigo JP, Dominguez F, Alvarez C, Manrique C, Herrero A, Suárez C. Expression of E-cadherin in squamous cell carcinoma of the supraglottic larynx with correlation with clinicopathological features. *Eur J Cancer* 2002; 38: 1059-1064.
- ¹¹⁰ Rodrigo JP, Dominguez F, Suárez V, Canel M, Secades P, Chiara MD. Focal adhesion kinase and E-cadherin as markers for nodal metastasis in laryngeal cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2007; 133: 145-150.
- ¹¹¹ El-Bahrawy MA, Poulosom R, Jeffery R, Talbot I, Alison MR. The expression of E-cadherin and catenins in sporadic colorectal carcinomas. *Hum Pathol* 2001; 32: 1216-1224.
- ¹¹² Wheeler JM, Warren BF, Mortensen NJ, Kim HC, Biddolph SC, Elia G, Beck NE, Williams GT, Shepherd NA, Bateman AC, Bodmer WF. An insight into the genetic pathway of adenocarcinoma of the small intestine. *Gut* 2002; 50: 218-223.
- ¹¹³ Xie D, Sham JS, Zeng WF, Lin HL, Che LH, Wu HX, Wen JM, Fang Y, Hu L, Guan XY. Heterogeneous expression and association of β -catenin, p16 and c-myc in multistage colorectal tumorigenesis and progression detected by tissue microarray. *Int J Cancer* 2003; 107: 896-902.
- ¹¹⁴ Tarmin L, Yin J, Harpaz N, Kozam M, Noordzij J, Antonio LB, Jiang HY, Chan O, Cymes K, Meltzer SJ. Adenomatous polyposis coli gene mutations in ulcerative colitis-associated dysplasias and cancers versus sporadic colon neoplasms. *Cancer Res* 1995; 55: 2035-2038.
- ¹¹⁵ Suehiro Y, Wong CW, Chirieac LR, Kondo Y, Shen L, Webb CR, Chan YW, Chan AS, Chan TL, Wu TT, Rashid A, Hamanaka Y, Hinoda Y, Shannon RL, Wang X, Morris J, Issa JP, Yuen ST, Leung SY, Hamilton SR. Epigenetic-genetic interactions in the APC/WNT, RAS/RAF, and P53 pathways in colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008;14:2560-2569
- ¹¹⁶ Fang Z, Xiong Y, Li J, Liu L, Li, M, Zhang W, Shi L, Wan J. Detection of APC gene deletion in colorectal malignancies using quantitative PCR in a Chinese population. *Pathol Oncol Re* 2011; Epub ahead of print.
- ¹¹⁷ Nosho K, Kawasaki T, Chan AT, Ohnishi M, Suemoto Y, Kirkner GJ, Fuchs CS, Ogino S. Cyclin D1 is frequently overexpressed in microsatellite unstable colorectal cancer, independent of CpG island methylator phenotype. *Histopathology* 2008; 53: 588-598.

- ¹¹⁸ Ogino S, Nosho K, Irahara N, Kure S, Schima K, Baba Y, Toyoda S, Chen L, Giovanucci EL, Meyerhardt JA, Fuchs CS. A cohort study of cyclin D1 expression and prognosis in 602 colon cancer cases. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 4431-4438.
- ¹¹⁹ Maeda K, Chung YS, Kang SM, Ogawa M, Onoda N, Nakata B, Nishiguchi Y, Ikehara T, Okuno M, Sowa M. Overexpression of cyclin D1 and p53 associated with disease recurrence in colorectal adenocarcinomas. *Int J Cancer* 1997; 74: 310-315.
- ¹²⁰ Bahnassy AA, Zekri AR, El-Houssini S, El-Shehaby AM, Mahmoud MR, Abdallah S, El-Serafi M. Cyclin A and Cyclin D1 as significant prognostic markers in colorectal cancer patients. *BMC Gastroenterol* 2004; 4:22-34.
- ¹²¹ El-Naggar AK, Lai S, Clayman GL, Zhou JH, Tucker SA, Myers J, Luna MA, Benedict WF. Expression of p16, Rb, and cyclin D1 gene products in oral and laryngeal squamous carcinoma: biological and clinical implications. *Hum Pathol* 1999; 30: 1013-1018.
- ¹²² Tripathi Bhar A, Banerjee S, Chunder N, Roy A, Sengupta A, Roy B, Roychowdhury S, Panda CK. Differential alterations of the genes in the CDKN2A-CCND1-CDK4-RB1 pathway are associated with the development of head and neck squamous cell carcinoma in Indian patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003; 129: 642-650.
- ¹²³ Smigiel R, Sasiadek M, Krecicki T, Ramsey D, Jaqqielski J, Blin N. Inactivation of the cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A) gene in squamous cell carcinoma of the larynx. *Mol Carcinog* 2004; 39:147-154.
- ¹²⁴ Ramírez N, Bandrés E, Navarro A, Pons A, Jansa S, Moreno I, Martínez-Rodenas F, Zárata R, Bitarte N, Monzó M, García-Forcillas J. Epigenetic events in normal colonic mucosa surrounding colorectal cancer lesions. *Eur J Cancer* 2008; 44: 2689-2695.
- ¹²⁵ O'Regan EM, Toner ME, Finn SP, Fan CY, Ring M, Hagmar B, Timon C, Smyth P, Cahill S, Flavin R, Scheils OM, O'Leary JJ. p16 (INK4A) genetic and epigenetic profiles differ in relation to age and site in head and neck squamous cell carcinoma. *Hum Pathol* 2008; 39: 452-458.
- ¹²⁶ Krasinkas AM, Bartlett DL, Ciepy K, Dacic S. CDKN2A and MTAP deletions in peritoneal mesotheliomas are correlated with loss of p16 protein expression and poor survival. *Mod Pathol* 2010; 23: 531-538.
- ¹²⁷ Tada T, Watanabe T, Kazama S, Kanasawa T, Hata K, Komuro Y, Nagawa H. Reduced p16 expression correlates with lymphatic invasion in colorectal cancers. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 1756-1760.
- ¹²⁸ Schima K, Nosho K, Baba Y, Cantor M, Meyerhardt JA, Giovanucci EL, Fuchs CS, Ogino S. Prognostic significance of CDKN2A (p16) promoter methylation and loss of expression in 902 colorectal cancer. Cohort study and literature review. *Int J Cancer* 2011; 128: 1080-1094.
- ¹²⁹ Lee CT, Capodieci P, Osman I, Fazzari M, Ferrara J, Scher HI, Cordon-Cardo C. Overexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 is associated with tumor recurrence in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 977-983.
- ¹³⁰ Omurra-Minamisawa M, Diccianni MB, Chang RC, Batova A, Bridgeman LJ, Schiff J, Cohn SL, London WB, Yu AL. P16/p14(ARF) cell cycle regulatory pathways in primary neuroblastoma: p16 expression is associated with advanced stage disease. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 3481-3490.
- ¹³¹ Bramis J, Zacharatos P, Papaconstantinou I, Kotsinas A, Sigala F, Korkolis DP, Nikiteas N, Pazaiti A, Kittas C, Bastounis E, Gorgoulis VG. E2-F1 transcription factor immunoexpression is inversely associated with tumor growth in colon adenocarcinomas. *Anticancer Research* 2004; 24: 3041-3047.
- ¹³² Ginsberg D. E2F-1 pathway to apoptosis. *FEBS Lett* 2002; 529: 122-125.
- ¹³³ Zhang SY, Liu SC, Al-Saleem LF, Holloran D, Babb JJ, Guo X, Klein-Szanto AJ. E2F-1: a proliferative marker of breast neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 395-401.
- ¹³⁴ Saiz AD, Olvera M, Rezk S, Florentine BA, McCourty A, Brynes RK. Immunohistochemical expression of cyclin D1, E2F-1, and Ki-67 in benign and malignant thyroid lesions. *J Pathol* 2002; 198: 157-162.



- ¹³⁵ Yamazaki K, Yajima T, Nagao T, Shinkawa H, Kondo F, Hanami K, Asoh A, Sugano I, Ishida Y. Expression of transcription factor E2F-1 in pancreatic ductal carcinoma: an immunohistochemical study. *Pathol Res Pract* 2003; 199: 23-28.
- ¹³⁶ Elliot MJ, Dong YB, Yang H, McMasters KM. E2F-1 up-regulates c-Myc and p14 (ARF) and induces apoptosis in colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 3590-3597.
- ¹³⁷ Evangelou K, Kotsinas A, Mariolis-Sapsakos, Giannopoulos A, Tsantoulis PK, Constantinides C, Troupis TG, Salmas M, Kyroudis A, Kittas C, Gorgoulis VG. E2F-1 overexpression correlates with decreased proliferation and better prognosis in adenocarcinomas of Barret oesophagus. *J Clin Pathol* 2008; 61: 601-605.
- ¹³⁸ Suzuki T, Yasui W, Yokazaki H, Naka K, Ishikawa T, Tahara E. Expression of E2F family in human gastrointestinal carcinomas. *Int J Cancer* 1999; 81: 535-538.
- ¹³⁹ Lai PS, Cheah PY, Kadam P, Chua CL, Lie DK, Li HH, Eu KW, Seow-Choen F, Lee AS. Overexpression of Rb1 transcript is significantly correlated with 13q14 allelic imbalance in colorectal carcinomas. *Int J Cancer* 2006; 119: 1061-1066.
- ¹⁴⁰ Yamasaki L. Role of the RB tumor suppressor in cancer. *Cancer Treat Res* 2003; 115: 209-239.
- ¹⁴¹ Yamamoto H, Soh JW, Monden T, Klein MG, Zhang LM, Shirin H, Arber N, Tomita N, Schieren I, Stein CA, Weinstein IB. Paradoxical increase in retinoblastoma protein in colorectal carcinoma may protect cells from apoptosis. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1805-1815.
- ¹⁴² Kouraklis G, Theocharis S, Vamvakas P, Vagianos C, Glinavou A, Giaginis C, Sioka C. Cyclin D1 and Rb protein expression and their correlation with prognosis in patients with colon cancer. *World J Surg Oncol* 2006; 4: 5-13.
- ¹⁴³ Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer II: cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 1994; 79: 573-582.
- ¹⁴⁴ Ayhan S, Isisaq A, Saruc M, Nese N, Demir MA, Kucukmetin NT. The role of pRb, p16 and cyclin D1 in colon carcinogenesis. *Hepatogastroenterology* 2010; 57: 251-256.
- ¹⁴⁵ Firestein R, Shima K, Noshu K, Irahara N, Baba Y, Bojarski E, Giovannucci EL, Hahn WC, Fuchs CS, Ogino S. CDK8 expression in 470 colorectal cancers in relation to beta-catenin activation, other molecular alteration and patient survival. *Int J Cancer* 2010; 126: 2863-2873.
- ¹⁴⁶ Seo JO, Han SI, Lim SC. Role of CDK8 and beta-catenin in colorectal adenocarcinoma. *Oncol Rep* 2010; 24: 285-291.
- ¹⁴⁷ Firestein R, Hahn WC. Revving the throttle on an oncogene: CDK8 takes the driver seat. *Cancer Res* 2009; 69: 7899-7901.
- ¹⁴⁸ Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 2007; 18: 581-592.
- ¹⁴⁹ Cusack JC, Giacco GG, Cleary K, Davidson BS, Izzo F, Skibber J, Yen J, Curley SA. Survival factors in 186 patients younger than 40 years old with colorectal adenocarcinoma. *J Am Coll Surg* 1996; 183: 105-112.
- ¹⁵⁰ Tapia O, Roa JC, Manterola C, Bellolio E. Colon and rectum cancer: morphological and clinical descriptio of 322 cases. *In J Morphol* 20110; 28: 393-398.
- ¹⁵¹ Willett C, Tepper JE, Cohen A, Orlow E, Welch C, Donaldson G. Local failure following curative resection of colonic adenocarcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1984; 10: 645-651.
- ¹⁵² Van Cutsem E, Oliveira J. ESMO Guidelines working group. Advanced colorectal cancer: ESMO clinical recommendation for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2009; 20: 61-63.
- ¹⁵³ Talbäck M, Stenbeck M, Rosén M, Barlow L, Glimelius B. Cancer survival in Sweden, 1960-1998--developments across four decades. *Acta Oncol* 2003; 42: 637-659.
- ¹⁵⁴ Horner MJ, Ries LAG, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Howlader N. SEER cancer statistics review 1975-2006. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2009. Available en <http://seer.cancer.gov/csr/1995-2006>.
- ¹⁵⁵ Song MS, Carracedo A, Salmena L, Song SJ, Egia A, Malumbres M, Pandolfi PP. Nuclear PTEN regulates the APC-CDH1 tumor-suppressive complex in a phosphatase-independent maner. *Cell* 2011; 144: 187-199.





ANEXOS

Tabla XXXIII. Concordancia y discordancia entre las proteínas de ruta Wnt en los ACNS tipo ITAC

Caso	Pasos del modelo teórico							
	Paso 1 E-adherina/ β-catenina	Paso 2 β-catenina	Paso 3 β-catenina/ C-Myc	Paso 4 β-catenina/ Ciclina D1	Paso 5 β-catenina/ p16	Paso 6 E2F1/ β-catenina	Paso 7 pRb/ E2F1	Paso 8 CDK8/ E2F1
1	C	C	C	C	D	D	C	C
2	C	D	D	D	C	C	C	C
3	C	C	D	C	C	C	C	C
4	C	C	C	C	D	C	C	D
5	C	C	D	C	-	D	-	D
6	C	C	C	C	C	C	D	C
7	D	D	D	C	C	C	D	C
8	C	D	C	D	C	D	D	C
9	C	C	D	-	D	C	C	C
10	C	C	D	C	C	C	D	C
11	C	C	C	D	D	C	C	D
12	C	C	D	C	D	D	C	D
13	C	C	C	D	C	C	D	C
14	C	C	-	C	C	-	-	-
15	C	D	C	D	D	C	C	C
16	C	C	C	C	C	D	C	D
17	C	C	D	C	C	D	C	C
18	C	C	C	C	C	D	C	D
19	C	C	D	C	-	D	C	D
20	C	D	D	C	C	D	D	D
21	C	C	D	C	C	D	C	D
22	D	C	D	C	C	C	D	C
23	C	D	C	D	D	C	C	D
24	D	C	D	C	C	C	D	C
25	C	D	D	C	D	C	C	C
26	C	C	D	C	C	C	D	C
27	C	C	D	C	-	C	D	C
28	C	C	D	C	-	D	C	D
29	C	C	D	C	-	C	D	C
30	C	D	C	D	-	D	D	C
31	C	C	-	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-	-	-
36	C	C	-	-	D	-	-	-
37	D	C	-	-	-	C	D	C
38	-	-	-	-	C	-	C	C
39	C	C	D	C	C	C	D	C
40	C	C	D	C	C	D	C	D
41	C	D	C	C	D	-	-	-
42	C	C	D	-	C	C	D	C
43	C	D	D	C	D	D	D	D
44	C	C	D	C	D	C	C	C
45	-	-	-	-	-	-	-	-
46	C	D	D	D	C	C	C	C
47	C	C	C	D	C	-	-	-
48	C	C	D	C	C	C	D	C
49	C	D	C	D	D	C	C	C
50	C	C	C	C	C	D	C	C
51	C	C	D	C	D	C	C	C
52	C	C	C	-	C	-	-	-
53	-	-	-	-	-	-	-	-
54	C	C	C	D	C	C	D	C
55	C	D	D	D	C	D	D	C
56	C	C	D	C	C	C	D	C



57	C	D	C	D	D	C	C	C
58	C	C	D	-	C	D	C	C
59	C	C	D	C	D	D	C	D
60	C	C	D	D	D	D	C	C
61	C	C	D	D	D	C	C	C
62	C	C	D	C	D	C	D	C
63	C	C	D	C	C	D	C	D
64	C	C	D	C	C	D	C	D
65	C	D	C	D	C	C	C	C
66	C	D	C	D	C	C	C	C
67	C	D	D	D	D	C	C	C
68	C	C	D	D	D	D	C	C
69	C	D	C	D	-	C	C	C
70	C	C	C	C	-	D	C	C
71	C	D	C	D	-	C	D	C
72	C	C	C	C	-	C	D	C
73	C	C	D	C	-	D	C	D
74	C	C	C	C	-	D	C	C
75	C	C	C	D	-	D	C	D
76	C	D	C	D	-	C	C	C
77	C	D	C	D	-	D	C	C
78	C	C	D	C	-	D	C	C
79	C	D	D	C	-	D	D	D
80	C	C	D	C	-	D	C	C
81	C	C	C	C	-	D	C	C
82	C	C	D	C	-	D	C	D
83	C	C	D	C	C	D	C	C
84	C	D	D	D	D	D	C	C
85	-	-	-	-	-	-	-	-
86	C	C	C	C	-	C	D	C
87	C	D	C	C	-	D	D	D
88	C	D	D	D	-	C	C	C
89	C	C	C	C	-	D	D	D
90	C	C	D	C	-	D	C	D
91	D	D	C	C	-	D	C	C
92	C	D	C	C	-	D	C	C
93	C	C	D	C	-	C	D	C
94	-	-	-	-	-	-	-	-
95	-	-	-	-	-	-	-	-
96	-	-	-	-	C	-	C	-
97	C	D	C	C	-	C	C	C
98	C	D	D	D	-	C	D	D
99	C	C	D	C	-	D	C	C
100	C	C	C	C	-	D	C	C
101	C	C	C	C	-	D	C	C
Total	90 C=94% D=6% G=CA	90 C=69% D=31% G=CI	86 C=42% D=58% G=DB	84 C=61% D=39% G=CB	56 C=59% D=41% G=CB	84 C=51% D=49% G= no hay	87 C=64% D=36% G=CB	85 C=71% D=29% G=CI

C: concordancia, D: discordancia, -: datos no disponibles.

Grado (G): alto (A): $\geq 75\%$; intermedio (I): $\geq 65\%$ y $< 75\%$, bajo (B): $\geq 55\%$ y $< 65\%$