



**UNIVERSIDAD DE OVIEDO
INSTITUTO UNIVERSITARIO DE ONCOLOGÍA DEL PRINCIPADO DE
ASTURIAS**

MÁSTER EN BIOMEDICINA Y ONCOLOGÍA MOLECULAR

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA RUTA EFGR
PTEN/AKT/MTOR EN CARCINOMAS
NASOSINUSALES**

MARÍA GABRIELA MUÑOZ CORDERO

JUNIO 2014

TRABAJO FIN DE MÁSTER



**UNIVERSIDAD DE OVIEDO
INSTITUTO UNIVERSITARIO DE ONCOLOGÍA DEL
PRINCIPADO DE ASTURIAS**

MÁSTER EN BIOMEDICINA Y ONCOLOGÍA MOLECULAR

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA RUTA EFGR
PTEN/AKT/MTOR EN CARCINOMAS
NASOSINUSALES**

MARÍA GABRIELA MUÑOZ CORDERO

JUNIO 2014

AUTORA

Gabriela Muñoz C.

DIRECTORES

Dr. José Luis Llorente
Dr. Mario Hermsen

TUTOR

Dr. José Luis Llorente

ÍNDICE

RESUMEN.....	7
1.INTRODUCCIÓN.....	9
1.1. Anatomía De Nariz y Senos Paranasales	10
1.2. Fisiología Nasal	11
1.3. Epidemiología	12
1.4. Etiología	12
1.5. Histología	13
1.5.1. Carcinoma Escamoso Nasosinusal	13
1.5.2. Adenocarcinoma Nasosinusal	14
1.5.3. Carcinoma Adenoide Quístico	15
1.5.4. Carcinoma Mucoepidermoide	15
1.5.5. Carcinoma Indirenciado Nasosinusal	16
1.5.6. Melanoma del tracto Nasosinusal	17
1.5.7. Neuroblastoma Olfatorio.....	17
1.5.8. Carcinoma Neuroendocrino Nasosinusal	18
1.6. Clínica	19
1.7. Diagnóstico de los tumores nasosinuales	20
1.8. Estadificación	20
1.9. Tratamiento	23
1.9.1. Cirugía	23
1.9.2. Radioterapia	25
1.9.3. Quimioterapia	26
1.9.4. Complicaciones	26
1.9.5. Pronóstico	27
1.10. Alteraciones Biomoleculares de los Tumores Nasosinuales ..	27
1.10.1. EGFR	28
1.10.2. PTEN	29

1.10.3. PI3/AKT	31
1.10.4. mTOR	32
2. HIPÓTESIS	35
3. OBJETIVOS	37
4. MATERIAL Y MÉTODO	39
4.1. Población a estudio	40
4.2. Variables	41
4.3. Recogida de la muestra	41
4.4. Análisis Mediante Inmunohistoquímica. Tissue Micro Arrays (Tma)42	
4.4.1 Técnica de los TMA	42
4.4.2 Selección de la zona a muestrear	42
4.4.3 Elaboración de la base de datos y la TMA	43
4.4.4 Elaboración del TMA	44
4.4.5 Selecciones del Bloque	44
4.4.6 Requerimientos mínimos estándar del TMA	45
4.4.7 Técnica Inmunohistoquímica.....	45
4.4.8 Interpretación de la Tinción Inmunohistoquímica	47
4.4.9 Análisis Estadístico	47
5. RESULTADOS	48
5.1. Perfil clínico y epidemiológico de la muestra	49
5.1.2.Carcinomas Escamosos	49
5.1.3. Adenocarcinomas	53
5.2. Relaciones entre rasgos clínicos – patológicos	55
5.3. Análisis Inmunohistoquímico	57
5.3.1. Carcinomas escamosos	57
5.3.2 Adenocarcinomas	61
6. DISCUSIÓN	65
6.1. Perfil clínico y epidemiológico de la muestra	66
6.1.2. Justificación para la orientación de la ruta PTEN/AKT/mTOR	67
6.1.3. La Via PTEN/AKT/mTOR es una importante diana terapéutica ...	68

7. CONCLUSIONES	70
8.Referencias Bibliográficas	73

RESUMEN

Los carcinomas nasosinusales son neoplasias que se originan en la mucosa de los senos paranasales y la cavidad nasal y, presentan una incidencia baja, aproximadamente un caso al año cada por 100.000 habitantes en Europa. La localización más frecuente es el seno maxilar, aunque en algunos países como España los carcinomas de etmoides son el grupo más numeroso. El tipo histológico más frecuente es el carcinoma escamoso, sin embargo, en nuestras series es el adenocarcinoma. Los síntomas de presentación son inespecíficos y pueden incluir obstrucción nasal, epistaxis, proptosis, alteraciones visuales, dolor, etc., con una duración de los síntomas generalmente de semanas a meses.

La proximidad a estructuras nobles y vitales, específicamente la órbita, el cerebro y los nervios craneales, así como su gran variabilidad histológica, hace que estos tumores tengan unas características específicas. Debido a su sintomatología inespecífica en algunas ocasiones se diagnostican en estadios avanzados. El estándar terapéutico en términos generales es multimodal con la combinación de cirugía radical, radioterapia complementaria y eventual quimioterapia.

En los últimos años se han estudiado nuevas dianas moleculares implicadas en el desarrollo y progresión del cáncer con el objetivo de lograr un tratamiento más específico e individualizado. Con este motivo hemos estudiado la ruta de EGFR que activa la vía de PTEN/Akt/mTOR, cuya aberración se ha visto vinculada con el desarrollo de varios tipos tumorales dentro de los cuales se incluyen los carcinomas nasosinusales.

La vía de PTEN, AKT y MTOR es una vía de señalización de supervivencia celular que se activa en muchos tipos de cáncer. Mecanismos para la activación de la

vía incluyen la pérdida de la función de supresor de tumor de PTEN, la amplificación o mutación de PI3K, la amplificación o mutación de Akt, la activación de receptores de factores de crecimiento, y la exposición a agentes carcinógenos. Una vez activado, la señalización a través de Akt se puede propagar a una diversa gama de sustratos, incluyendo mTOR, un regulador clave de la traducción de proteínas. Esta vía es una atractiva diana terapéutica en el cáncer, ya que sirve como un punto de convergencia de muchos estímulos de crecimiento, y a través de sus sustratos, controla los procesos celulares que contribuyen a la iniciación y mantenimiento de cáncer.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ANATOMÍA DE NARIZ Y SENOS PARANASALES

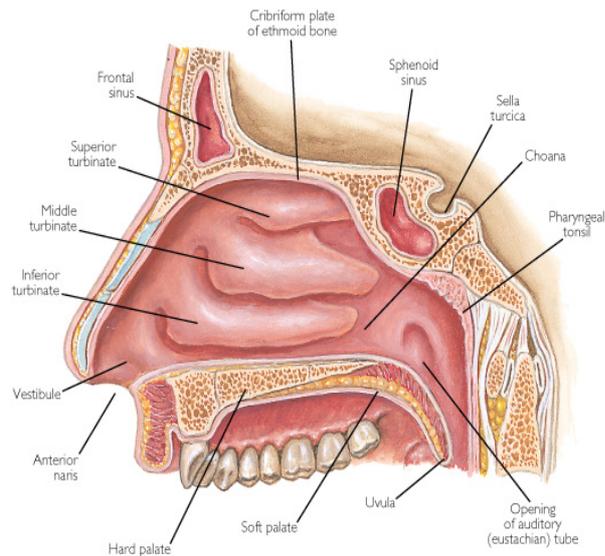


Fig 1. Anatomía de Nariz y Senos Paranasales

La nariz está situada en el centro de la cara y es una estructura compuesta por pirámide nasal y fosas nasales. La pirámide nasal, a su vez, está conformada por un esqueleto óseocartilaginoso, los huesos propios de la nariz que se articulan por sus lados con el hueso maxilar superior y por su base en el hueso frontal y las láminas del etmoides a nivel de las órbitas. Las estructuras cartilaginosas se encuentran hacia la base de la pirámide nasal y van a conformar la columela nasal y las alas de la nariz.

En el interior de las fosas nasales se encuentra dividido por el septum nasal que está constituido de arriba hacia abajo por la lámina perpendicular del etmoides, el cartílago cuadrangular y el vómer. La pared externa de la fosa nasal tiene varias formaciones óseas que constituyen los cornetes: inferior, medio y superior, donde sólo el cornete inferior es un hueso independiente, en tanto que el medio y el superior derivan del etmoides; por debajo de los tres cornetes se encuentran los meatos. Toda la superficie de las fosas nasales, excepto el vestíbulo nasal que está

cubierto de piel, está protegida por una mucosa respiratoria de epitelio columnar ciliado pseudoestratificado que descansa sobre una submucosa laxa. La irrigación viene dada por las arterias etmoidales anteriores y posteriores (ramas de la arteria oftálmica), por la esfenopalatina y la palatina descendente (ramas de la arteria maxilar interna) y la arteria del subtabique, rama de la arteria facial. En la parte anterior del tabique se encuentra un área de confluencia de vasos llamada plexo de Kiesselbach o de Little¹.

Los senos paranasales son cavidades neumáticas anexas a las fosas nasales que se desarrollan a partir de la pared lateral de la nariz, en forma de divertículo. Al meato superior drenan los senos etmoidales posteriores y esfenoidal. Al meato medio drenan el seno maxilar, etmoidal anterior y frontal. En el meato inferior se observa el orificio del conducto lacrimonasal. El órgano del olfato se encuentra en las fosas nasales en la denominada área olfatoria, en el techo de las fosas nasales. El nervio olfatorio cubre con sus filetes de origen la parte medial del cornete medio, el techo y la parte alta del septum. El nervio esfenopalatino, por sus ramas nasales superiores, nasopalatino, pterigopalatino y palatino anterior, proporcionan la sensibilidad a la mayor parte de las fosas nasales. La parte anterior de las fosas está inervada por el nervio nasal interno.²

1.2. FISIOLÓGÍA NASAL

Las fosas nasales presentan tres funciones: respiratoria, olfatoria y fonatoria. El aire ingresa a las fosas nasales y el volumen es controlado por la narina y la turgencia de los cornetes. La función respiratoria se basa en el acondicionamiento del aire, que consiste en la humectación, el calentamiento a 32-34 °C y purificación del aire, a través de mecanismos purificadores como el mucus, el movimiento ciliar, la lisozima, la fagocitosis superficial y un pH de 6.

En la función olfatoria, la columna superior de aire llega y estimula a la zona olfatoria de Schültze, donde se encuentran las terminaciones nerviosas del nervio olfatorio responsable de transmitir los estímulos. Para la función fonatoria las fosas

nasales actúan como cámaras de resonancia, agregando timbres armónicos a la voz dando el sonido durante la fonación¹.

1.3. EPIDEMIOLOGÍA

Los tumores malignos de fosas y senos paranasales son poco frecuentes, su incidencia varía a través de las áreas geográficas debido a diferencias en la predisposición genética y la exposición a factores cancerígenos. En Europa, la tasa es de 0,9 casos/100.000 hab/año, en Asia el 3 por 100,000¹ y en los Estados Unidos de 0.556 casos por cada 100.000 hab/año³ y representan 0,2 % de todos los cánceres y un 3-6% de los tumores de cabeza y cuello.⁴ El adenocarcinoma es el tipo histológico más frecuente de las series europeas, y el carcinoma escamoso en EEUU. Los más frecuentes son los que se originan en los senos maxilares y etmoidales siendo excepcionales los que lo hacen en los senos esfenoidales y frontales.

La edad de presentación suele estar en la sexta o la séptima década de la vida, y se aprecia un predominio en varones, con una relación aproximada 4:2, pero estudios recientes como el realizado por la base de datos poblacional de vigilancia, epidemiología y resultados finales [SEER] donde se incluyeron a más de 6.000 pacientes, informaron una disminución en la incidencia de cáncer nasosinusal en los hombres, mientras que se mantuvo estable entre mujeres. Estos resultados reflejan la demografía cambiante observada también en otros cánceres de cabeza y el cuello⁵.

1.4. ETIOLOGÍA

No está definida claramente, pero se han identificado diferentes carcinógenos ambientales, virus, agentes físicos sobre todo la exposición prolongada a diferentes sustancias laborales⁵. El consumo de tabaco y alcohol se ha

vinculado en menor frecuencia en relación con el resto de los tumores malignos de cabeza y cuello. Está bien documentada la estrecha relación entre la exposición prolongada al polvo de madera y curtidos y el desarrollo de un carcinoma nasosinusal, en especial el adenocarcinoma. También se los ha vinculado con la exposición de forma prolongada al formaldehído, el polvo textil o sílice y al asbesto⁶. Diversos agentes virales como el virus del papiloma humano (VPH), fundamentalmente los tipos 16 y 18 y, en menor medida, el 6 y el 11, se han aislado en diferentes carcinomas nasosinuales sobre todo aquellos carcinomas epidermoides derivados de un papiloma invertido. El virus de Epstein-Barr (VEB) presenta una asociación importante con el carcinoma indiferenciado nasofaríngeo⁷.

1.5. HISTOLOGÍA

El tracto nasosinusal y la base del cráneo es una de las regiones del organismo con la mayor diversidad histológica, y esto se refleja por su extensa variedad histológica tumoral. Las fosas y senos paranasales, en su mayor parte están recubiertos por epitelio cilíndrico ciliado pseudoestratificado con células caliciformes y células basales basófilas no ciliadas. En la mucosa respiratoria además existen glándulas mucosas y serosas, glándulas salivares menores y melanocitos así como células neuroepiteliales, células linfoides, mastocitos, células plasmáticas y plexos venosos⁵.

Se ha clasificado los distintos subtipos más comunes de carcinomas nasosinuales según La Organización Mundial de la Salud.

1.5.1. CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS

El carcinoma de células escamosas (CENS), el tipo histológico más frecuente del tracto nasosinusal en muchas series, y corresponde al 80% aproximadamente. Se localiza y origina más frecuentemente en la mucosa de los senos paranasales sobre todo en seno maxilar. Entre 1 % y el 7 % de todos los casos de los carcinomas

escamosos se asocia con papiloma invertido nasal. A menudo se diagnostica en un estadio avanzado. Las tasas de supervivencia a 5 años son del 40 al 70 %.⁸⁻⁹



Fig. 2. Imagen endoscópica de Carcinoma escamoso Nasosinusal

1.5.2. ADENOCARCINOMA

El Adenocarcinoma es el tipo histológico más frecuente en nuestro medio. Se originan con mayor frecuencia en los senos etmoidales. Se dividen en dos grandes grupos: Adenocarcinomas tipo intestinal o ITAC y Adenocarcinomas tipo no intestinal. El tipo intestinal incluyen papilar, colónico sólido, mucinoso, o mixto, y los tipos no intestinales se clasifican como de bajo o alto grado. Los Carcinomas de tipo intestinal son generalmente agresivos con una tasa local de recidiva de hasta el 50 %, diseminación linfática en el 10 %, y una tasa de metástasis a distancia del 20%. Los adenocarcinomas no intestinales de Bajo grado son más raros y la tasa de supervivencia a 5 años es de hasta 85 %. El adenocarcinomas no intestinal de alto grado se encuentran con mayor frecuencia en el seno maxilar y tienen un pronóstico muy pobre (supervivencia a los 3 años aproximadamente el 20%)^{5,10}.

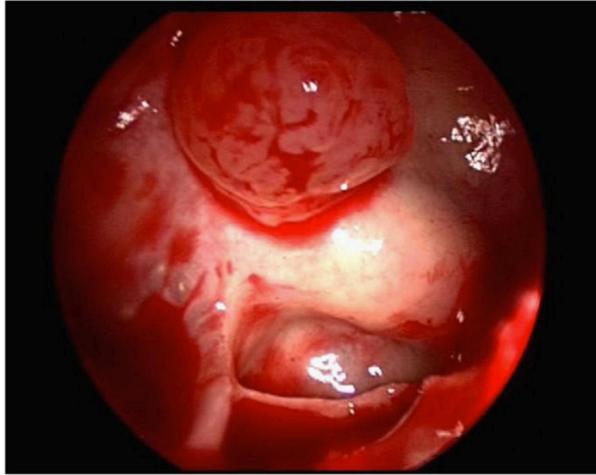


Fig. 3. Imagen endoscópica de Adenocarcinoma Nasosinusal

1.5.3. CARCINOMA ADENOIDE QUÍSTICO

Según algunas series, el carcinoma adenoide quístico, puede ser hasta el segundo tumor más frecuente de la cavidad nasal y de los senos paranasales , y representa aproximadamente el 10 % de los tumores nasosinuales, y el 15% de todos los cánceres de glándulas salivales. Se origina con mayor frecuencia en las glándulas salivales menores. En general, es una neoplasia de crecimiento lento, y las recurrencias se suelen desarrollar de 5 a 20 años después del tratamiento inicial. Tiene una propensión a extenderse intracranealmente afectando regiones perineurales. La propagación linfática es del 10 al 30% y mientras que la hematógena distante es más frecuente, con una incidencia promedio de 40 %, sobre todo a pulmón y huesos largos.⁵

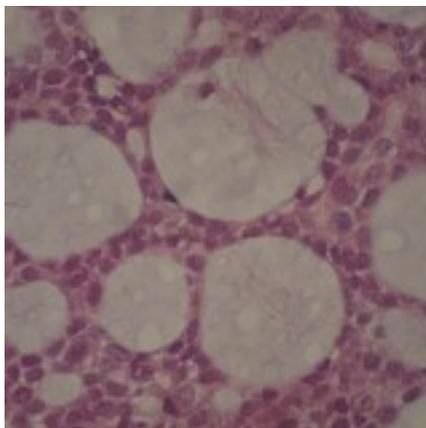


Fig. 4. Corte histológico de un Adenoide Quístico Nasosinusal.

1.5.4. CARCINOMA MUCOEPIDERMÓIDE

El carcinoma mucoepidermoide es el segundo tipo más común de neoplasia maligna de glándulas salivales nasosinusal después del adenocarcinoma. Representa menos del 0,1 % de todas las neoplasias malignas del tracto nasosinusal. Los síntomas clínicos son inespecíficos y suelen estar presentes durante un período de meses. Tiene un crecimiento invasivo y la recurrencia se observa en aproximadamente un tercio de los pacientes, generalmente dentro de los primeros 2 años.

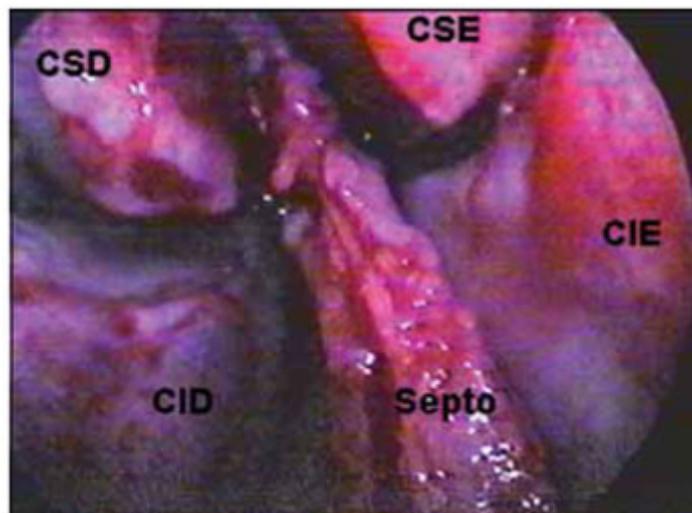


Fig. 5. Carcinoma Mucoepidermoide de Septum.

1.5.5. CARCINOMA INDIFERENCIADO NASOSINUSAL

El carcinoma indiferenciado nasosinusal es un tumor maligno muy raro y agresivo que se presume ser parte del espectro de carcinomas neuroendocrinos. Produce extensa destrucción e invasión local a tejidos como la órbita y fosa anterior¹¹. Su diagnóstico de confirmación requiere en algunas ocasiones inmunohistoquímica o microscopía electrónica. Se ha asociado con el virus de Epstein -Barr , pero su papel no ha sido aún confirmado ¹².

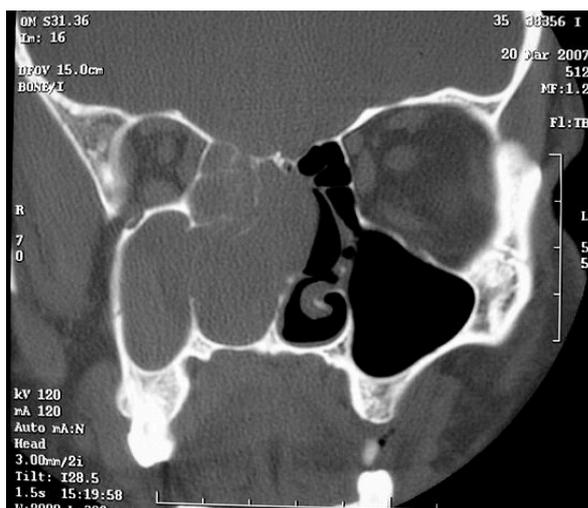


Fig. 6. Corte Coronal de TAC Craneal de Carcinoma nasal indiferenciado en fosa nasal derecha que invade, seno maxilar, frontal, órbita, con destrucción de lámina cribosa.

1.5.6. MELANOMA DEL TRACTO NASOSINUSAL

El melanoma nasosinusal es raro, representa sólo el 1 % de toda la melanomas¹³. Son más agresivos que los cutáneos. Se originan con más frecuencia en la parte anterior del septo. Ocurre entre la quinta y la octava década de la vida. El pronóstico es pobre, con una tasa menor del 15% a los 5 años. El tratamiento primario es la cirugía, radioterapia para control locorregional y la quimioterapia adyuvante⁵.

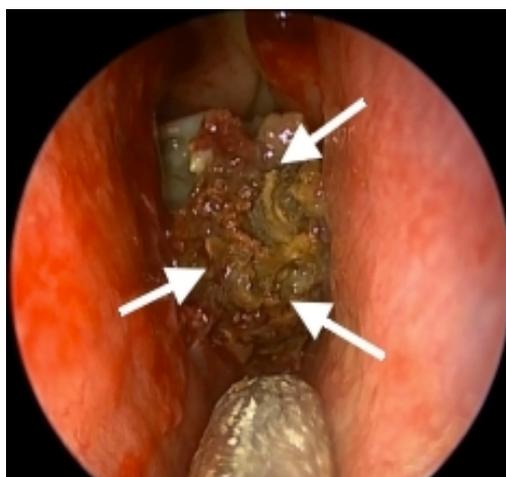


Fig. 7. Imagen videoendoscópica de melanoma nasal con infiltración de cornetes medio y superior y seno maxilar.

1.5.7. NEUROBLASTOMA OLFATORIO

El neuroblastoma olfatorio es una rara neoplasia maligna de origen en el epitelio olfatorio y constituye entre el 7 y 10% de todos los tumores nasosinusales. Es más frecuente en la segunda y sexta décadas de la vida. Se puede presentar con deterioro o pérdida del sentido del olfato. Los factores pronósticos más importantes son: grado de diferenciación, extensión intracraneal, arquitectura difusa, necrosis y metástasis. El tratamiento incluye radioterapia generalmente tras la cirugía, y quimioterapia adyuvante. La supervivencia es más favorable con un 52 % a 90 % a los 5 años⁵.



Fig. 8. Neuroblastoma Olfatorio de Nariz y Senos paranasales.

1.5.8. CARCINOMA NEUROENDOCRINO NASOSINUSAL

El carcinoma neuroendocrino nasosinusal es raro y representa menos del 5 % de los tumores malignos del tracto nasosinusal. Los sitios más comunes de origen son los senos nasales y la cavidad nasal. Pueden presentarse con sintomatología benigna como una rinosinusitis, siendo su diagnóstico tardío. La participación de los huesos y estructuras de la base del cráneo afectan negativamente a la supervivencia. En la Inmunohistoquímica presentan un alto índice mitótico y la positividad para

queratina y sinaptofisina¹⁴⁻¹⁵. Está asociado con una alta tasa de recidiva locorregional y metástasis a distancia¹⁶.



Fig. 9. Corte Coronal de TAC Craneal con reconstrucción 3D. Masa que ocupa las celdillas etmoidales y fosa nasal.

1.6. CLÍNICA

La forma de presentación de los tumores nasosinusales generalmente es inespecífica ya que puede presentarse con sintomatología benigna inflamatoria de rinosinusitis o incluso no presentar clínica hasta estadios avanzados más del 50% en estadio T3 y T4)¹⁷. La clínica nasal incluye: obstrucción nasal, rinorrea, epistaxis, y con menos frecuencia hiposmia, cacosmia, algias faciales. Estos síntomas deben hacer sospechar malignidad, sobre todo si es unilateral o si muestra progresión sin mejoría.

Cuando el tumor ya es avanzado, invade la base del cráneo, cerebro, órbita, cara y cavidad oral, apareciendo entonces algias faciales, exoftalmos, diplopía, cefaleas, confusión mental, crisis comiciales, etc. El crecimiento intracraneal con invasión de la órbita se caracteriza por un desplazamiento superolateral del ojo, proptosis, exoftalmos, edema palpebral orbitario diplopía, oftalmoplejía y en casos evolucionados pérdida de la visión. También puede invadir el etmoides posterior, esfenoides o la rinofaringe y de aquí a la base del cráneo, haciéndose intracraneal con síntomas como cefalea, crisis comicial, alteraciones de la conducta, etc¹⁸.

1.7. DIAGNÓSTICO

En general, los tumores malignos de senos paranasales no causan síntomas hasta que han alcanzado un cierto tamaño y expansión. Por lo tanto se requiere un alto grado de sospecha para evitar el retraso en el diagnóstico. Un examen endoscópico cuidadoso con biopsia e imágenes radiológicas son los primeros pasos a tomar ante una lesión sospechosa. Tanto la tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética (RNM) se recomiendan en la actualidad para la evaluación de estos tumores. La RNM ofrece mejor diferenciación de los tejidos blandos, mientras que la TAC evalúa el potencial erosivo del hueso. Para el seguimiento, la RNM se considera que es la técnica de imagen de elección¹⁹. Tian L Et al., analizaron el uso de la RNM mutiplanar en la invasión paranasal en cáncer nasofaríngeo en 180 pacientes y observaron una mejora en el diagnóstico diferencial con los cambios inflamatorios de los tejidos neoplásicos²⁰.

1.8. ESTADIFICACIÓN

La estadificación de los carcinomas nasosinusales se subdivide en dos grupos:

1. Carcinoma del Seno Maxilar.
2. Carcinoma del complejo nasoetmoidal, integrado por dos regiones independientes, los carcinomas de las fosas nasales, y los carcinomas de los senos etmoidales.

La clasificación más utilizada en la clínica es el TNM de la UICC. Está basada en tres parámetros: Extensión tumoral (T), afectación de ganglios linfáticos regionales (N), y presencia de metástasis a distancia (M).

Tabla Nº 1 Estadio de Carcinoma de Seno Maxilar

Estadio T	Carcinoma del Seno Maxilar
T1	Tumor limitado a la mucosa del seno maxilar sin erosión ni destrucción ósea.
T2	Tumor que produce erosión o destrucción ósea incluyendo extensión al paladar duro y/o meato nasal medio, excepto extensión a la pared posterior del seno maxilar y láminas pterigoideas.
T3	Tumor que invade cualquiera de las siguientes estructuras: pared ósea posterior del seno maxilar, tejido celular subcutáneo, suelo y pared medial de órbita, fosa pterigoidea, seno etmoidal.
T4a	Tumor que invade contenido orbitario anterior, piel o mejilla, láminas pterigoideas, fosa infratemporal, lámina cribiforme, seno esfenoidal y seno frontal.
T4b	Tumor que invade cualquiera de las siguientes estructuras: ápex orbitario, dura, cerebro, fosa craneal media, nervios craneales a parte de la subdivisión (V2) del nervio trigémino, nasofaringe o clivus.

Tabla Nº 2 Estadio De Carcinoma De Cavidad Nasal Y Seno Etmoidal

Estadio T	Carcinoma del complejo naso etmoidal
T1	Tumor limitado a una sublocalización, con o sin afectación ósea.
T2	Tumor que afecta a dos sublocalizaciones de una misma región o se extiende y afecta a una región adyacente dentro del complejo nasoetmoidal, con o sin afectación ósea.
T3	Tumor que se extiende a pared medial o suelo de órbita, seno maxilar, paladar o lámina cribiforme.

T4a Tumor que invade alguna de las siguientes estructuras: contenido orbitario anterior, piel de nariz o mejilla, extensión mínima a fosa craneal anterior, láminas pterigoideas, esfenoides o seno frontal.

T4b Tumor que invade alguna de las siguientes estructuras: ápex orbitario, dura, cerebro, fosa craneal media, pares craneales distintos de la rama V2, nasofaringe o clivus.

Tabla Nº 3 Estadio de Ganglios Linfáticos Regionales de Carcinomas Nasosinusales

Nx	Los ganglios linfáticos regionales no pueden ser valorados.
N0	No metástasis en ganglios linfáticos regionales
N1	Metástasis en un único ganglio linfático homolateral de 3 cm o menos de dimensión máxima.
N2	Metástasis en un único ganglio linfático homolateral mayor de 3 cm pero no mayor de 6 cm de dimensión máxima. O metástasis en múltiples ganglios linfáticos homolaterales, ninguna mayor de 6 cm de dimensión máxima. O metástasis en ganglios linfáticos bilaterales o contralaterales, ninguna mayor de 6 cm de dimensión máxima.
N2a	Metástasis en un único ganglio linfático homolateral mayor de 3 cm pero no mayor de 6 cm de dimensión máxima.
N2b	Metástasis en múltiples ganglios linfáticos homolaterales, ninguna mayor de 6 cm de dimensión máxima.
N2c	Metástasis en ganglios linfáticos bilaterales o contralaterales, ninguna mayor de 6 cm de dimensión máxima.
N3	Metástasis en un ganglio linfático mayor de 6 cm de dimensión máxima.

Tabla Nº 4 Metástasis a distancia de Carcinomas Nasosinusales

Mx	No pueden valorarse las metástasis a distancia.
-----------	--

M0	No hay metástasis a distancia.
M1	Hay metástasis a distancia. ²¹

1.9. TRATAMIENTO

El tratamiento óptimo para tumores malignos de senos paranasales aún está por definirse, y algunos de los motivos incluyen: el reducido número de pacientes, la gran variedad histológica, o la complejidad anatómica de la región. En términos generales en la actualidad la resección craneofacial abierta o endoscópica seguida de radioterapia postoperatoria se considera el tratamiento estándar en la gran mayoría de los pacientes con enfermedad localmente avanzada

1.9.1. CIRUGÍA

El abordaje quirúrgico dependerá de la localización y la extensión del tumor, las posibilidades de reconstrucción, los riesgos y la morbilidad de cada caso. En los últimos se ha difundido más ampliamente el abordaje endoscópico ya que proporciona al paciente una menor morbilidad quirúrgica y una mejor calidad de vida postoperatoria, además mejores resultados estéticos ya que evita las incisiones faciales y ello también previene complicaciones postrádicadas.

Uno de los mayores desafíos en la resección endoscópica es la capacidad de reconstruir la barrera de la duramadre tras la resección en aquellos pacientes con extensión intracraneal con el fin de independizar el cerebro de las fosas nasales y evitar el riesgo de fístula LCR y la subsiguiente meningitis.

En la reconstrucción de los abordajes craneofaciales endoscópicos se deben tener bordes de resección bien identificados, despegados y oncológicamente negativos. La primera reconstrucción conviene que sea entre el cerebro y la duramadre con un injerto de matriz de colágeno (Duragen®) o fascia lata de banco. Una vez que se logra una óptima cobertura se procede a una segunda capa “underlay” a ser posible entre

la duramadre y el hueso remanente. Luego se coloca un taponamiento que puede ser gasa, Merocel, sonda Foley o sonda de Bryton, entre otros.

Una mejora que se introdujo es la reparación con tejido vital, actualmente el más utilizado es el colgajo de Hadad, sobre todo en patología hipofisaria. Con la reparación el riesgo de fugas de LCR puede ser menor del 6%.

La decisión de la colocación de un drenaje lumbar de LCR es aún controvertida y se debe realizar en base a criterios individuales, pero en general no se recomienda su uso rutinario. Ciertamente, en algunas circunstancias, un abordaje abierto tendrá más sentido que la endoscopia. Fundamentalmente cuando existe infiltración del hueso frontal, duramadre, corteza cerebral, órbita lateral, tejidos blandos faciales e infiltración extensa de la vía lagrimal o el maxilar. Sin embargo, el tamaño del tumor no es decisivo para un enfoque de cirugía abierta o endoscópica, siendo en ocasiones necesario un abordaje mixto.

En investigaciones recientes que apoyan el uso de la endoscopia, un análisis retrospectivo de 10 años de Nicolai P y cols²² se evaluó 184 pacientes con tumores malignos nasosinuales. De estos, 134 fueron tratados con un enfoque exclusivamente endoscópico y 50 fueron tratados con una craneofacial convencional. Los autores encontraron que los cinco años de enfermedades la supervivencia fue del 91% para el grupo endoscópico y del 59% para el grupo abierto, lo que indica que la cirugía endoscópica, cuando está debidamente planificada y en manos expertas, puede ser una alternativa a los métodos quirúrgicos estándar. A todo eso sumado, las mejoras en el instrumental, tecnología basada en robótica y navegación, sistemas y técnicas receptoras favorecerán el uso de la cirugía endoscópica.

Por último, son muchos los factores involucrados en la decisión de un abordaje u otro por lo que se recomienda que el tratamiento sea individualizado, dependiendo de cada caso.²²⁻²³⁻²⁴

Tabla Nº5 Tratamiento primario de los tumores malignos nasosinuales de acuerdo al tipo histológico

CIRUGÍA	RADIOTERAPIA	QUIMIOTERAPIA
Carcinoma epidermoide	Carcinoma	Rabdomiosarcoma
Carcinoma mucoepidermoide	indiferenciado	Tumores neurogénicos
Carcinoma adenoide quístico		Procesos linfoproliferativos:
Carcinoma neuroendocrino		Linfoma
Adenocarcinoma		Plasmocitoma
Melanoma		Reticulosis polimórfica
Sarcomas		
Osteosarcoma		
Fibrohistiocitoma maligno		
Neurofibrosarcoma		
Condrosarcoma		
Hemangiopericitoma		
Fibrosarcoma		
Angiosarcoma		
Sarcoma de Ewing		
Neuroesthesioblastoma		
Schwanoma maligno		
Tumores metastásicos		

1.9.2. RADIOTERAPIA

La radioterapia aislada ofrece, perspectivas de curación más limitadas que la cirugía. Blanch y cols²⁵ publicaron que no existe ningún beneficio en cuanto a la supervivencia con la adición de radioterapia a la cirugía para los tumores en estadio

temprano. Sin embargo, las nuevas modalidades de radioterapia más precisas y eficaces (Tomoterapia, IMRT) harán que los próximos años se reevalúen estos resultados.

Se recurre a la radioterapia complementaria en tumores de alto grado, en estadios avanzados o cuando los márgenes de resección no pueden ser los adecuados. Algunos trabajos recientes aconsejan en los estadios avanzados un tratamiento de quimioterapia y radioterapia con protocolos similares a los de la preservación de órgano en la laringe²⁵⁻²⁶.

1.9.3. QUIMIOTERAPIA

El papel de la quimioterapia es limitado y controvertido. Hay algunos informes preliminares sobre la quimiorradioterapia concurrente, aunque está limitada a estadios avanzados de carcinomas de células escamosas y carcinoma indiferenciado nasosinusal²⁷. Otros trabajos describen el uso de tratamientos sistémicos dependiendo de la ubicación y el número de metástasis. Hay publicaciones descritas en la literatura para la quimioterapia local usando 5 - fluorouracilo en el tratamiento del adenocarcinoma, o como un adyuvante después de la cirugía mínimamente invasiva²⁸.

1.10. COMPLICACIONES

Las principales complicaciones del tratamiento incluyen epistaxis, fístula de líquido cefalorraquídeo, neumoencéfalo y meningitis. Complicaciones tardías incluyen la disfunción nasosinusal, déficit hipopituitario (terapia post- radiación), y osteoradionecrosis de la base del cráneo.

1.11. PRONOSTICO

La causa de fracaso del tratamiento más habitual es la recidiva local, seguida de metástasis a distancia y recidiva ganglionar. La mayoría de las recidivas aparecen antes de los 2 años después del tratamiento.

Existen múltiples factores asociados al pronóstico tales como la localización del tumor, estadio locorregional, tipo histológico, pero lo que más condiciona una evaluación desfavorable es la extensión a estructuras importantes como la orbitaria, seno esfenoidal o tejido intracraneal.

Tabla Nº 6. Pronóstico de los Principales Carcinomas Nasosinuales

Tipo Histológico	Pronóstico
Carcinomas Epidermoides Nasosinuales	Supervivencia global a los 5 años del 40 - <70%
Adenocarcinomas	Supervivencia entre el 30-50% a los 5 años.
Carcinomas Indiferenciados	Desfavorable. Supervivencia a los 5 años entre el 10-30%.
Carcinomas adenoide quísticos	Desfavorable. Supervivencia a los 10 años entre el 15-55%, metástasis a distancia 40%, (pulmonares y óseas).
Melanomas Nasosinuales	Desfavorable. Supervivencia a los 5 años entre el 0 y 45%.
Neuroblastoma Olfatorio	Supervivencia del 52 al 90% a los 5 años

1.11. ALTERACIONES BIOMOLECULARES EN LOS TUMORES NASOSINUALES

En los últimos años varios trabajos de investigación han enfocado su atención

en la biología molecular del tumor, permitiendo una descripción más detallada y clara de las distintas etapas de carcinogénesis, así como la activación de oncogenes y/o supresores tumorales que desencadenan señales proliferativas y antiapoptóticas celulares. Una diana importante en la activación de estas señales tumorales es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), un oncogen tirosin quinasa transmembrana de la familia de Erb que participa en diversas funciones proliferativas, por lo que es un objetivo en terapia oncológica. Una de las vías de expresión regulados por el EGFR es la vía de Akt / mTOR. El objetivo de mamífero de la rapamicina (mTOR) una quinasa serina/treonina situado por debajo de la vía del fosfatidilinositol 3 - quinasa (PI3K) - Akt, a menudo se activa en muchas enfermedades neoplásicas. Akt y mTOR actúan estimulando proteínas en células con potencial cancerígeno y modulando el ciclo celular. mTOR representa un punto estratégico en el que varias vías de señalización celular convergen, además está implicado en la regulación de la apoptosis, supervivencia celular, transformación, invasión, metástasis, angiogénesis y linfangiogénesis tumoral, lo que ha despertado el interés de su estudio²⁹. Por otro lado, la alteración funcional de proteínas con acciones normalmente inhibitorias, es un paso importante en el desarrollo de la mayoría de los cánceres humanos, siendo p53 y PTEN supresores tumorales frecuentemente alterados.

1.11.1. FAMILIA DE RECEPTORES TIROSÍN QUINASA

EGFR es un miembro de la familia tirosina quinasa formada por EGFR (ErbB1/HER1), HER2/neu (ErbB2), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4). Todos los miembros de la familia tienen ciertas características que explican la asociación en esta clase: un dominio de unión al ligando extracelular (I, II, III, IV), una sola región que abarca la membrana, una señal de localización nuclear yuxtamembrana, y un dominio de tirosina quinasa citoplasmática. HER2 no tiene ligando conocido. HER3 es el único miembro de la familia que carece de actividad quinasa intrínseca, sin embargo, la señalización por debajo se consigue fácilmente a través de la heterodimerización. La expresión o actividad aberrante de EGFR se ha identificado como un factor importante en muchos cánceres epiteliales humanos, incluyendo los carcinomas de

células escamosas de cabeza y cuello, la neoplasia nasosinusal, el cáncer no microcítico de pulmón (CPNM), cáncer colorrectal (CCR), cáncer de mama, cáncer de páncreas y cáncer de cerebro, entre otros. Los receptores HER se expresan de forma correcta en ciertos sitios de células epiteliales, mesenquimales y neuronales.

El EGFR y miembros de su familia desempeñan un papel importante en la carcinogénesis a través de la modulación de la proliferación celular, apoptosis, motilidad celular y neovascularización. Se han investigado mutaciones en el dominio quinasa para el desarrollo de dos clases de agentes anti-EGFR: anticuerpos monoclonales anti-EGFR (por ejemplo, cetuximab, panitumumab) y de molécula pequeña TKIs de EGFR (por ejemplo, gefitinib, erlotinib).

EGFR funciona en el núcleo como un factor de transcripción, y como una tirosina quinasa que aumenta la proliferación celular. La detección de EGFR en los núcleos se correlaciona con un peor pronóstico clínico y aumento de la expresión de ciclina D1; B-Myb, óxido nítrico sintasa inducible y la COX-2; todas ellas aumentan la fase G1 / S del ciclo celular y la proliferación de las células cancerosas.³⁰

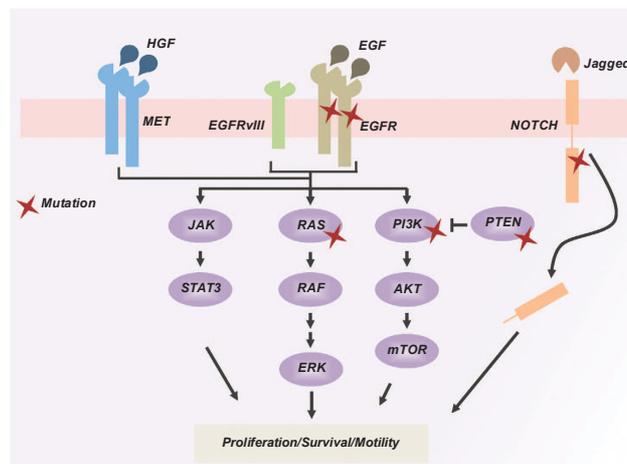


Fig. 10. Representación esquemática de las principales vías moleculares afectadas en CECC. Las estrellas indican posibles mutaciones en la molécula. EGFR, MET, Notch puede promover la señalización molecular a través de RAS / ERK, PI3K/AKT o vías de JAK / STAT.

1.11.2. PTEN

El Homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN), es un supresor tumoral implicado en la regulación del ciclo celular, frecuentemente mutado o con pérdida de función en cánceres humanos y en una serie de síndromes tumorales, denominado "PTEN

síndromes tumorales hamartomatosos" (PHTS), que incluyen la enfermedad de Cowden y el síndrome de Bannayan – Zonana.

Varios mecanismos causan esta pérdida de función, incluyendo cambio de sentido y mutaciones de truncamiento y deleciones en el gen PTEN , así como la reducción de expresión de PTEN activo mediado por metilación del promotor, efectos de miRNAs , y la supresión de la actividad enzimática de PTEN. La pérdida de ambas copias del gen PTEN conduce a la muerte durante el desarrollo embrionario, pero los seres humanos y otros vertebrados pueden sobrevivir llevando un gen activo y otro gen PTEN mutante. Los portadores de mutaciones de PTEN muestran susceptibilidad tumoral. PTEN parece actuar de una manera dosis dependiente, y en muchos tumores, la pérdida de la función aparece sólo parcialmente.

El estado de PTEN como un tumor supresor fue establecida en parte a través del estudio de varias líneas de ratones transgénicos diseñados para realizar una copia de tipo salvaje de PTEN y un alelo nulo que no expresa la proteína activa . Estos ratones - heterocigotos desarrollan una amplia gama de tumores, con superposición sustancial con el espectro de tumores observados en humanos portadores de mutaciones de PTEN y muchas veces se conserva algo de la expresión de PTEN normal. Un estudio reciente llevado a cabo por Papa et al³². En ratones transgénicos, observaron que la pérdida parcial de la función supresora de tumores PTEN normal puede verse agravada por la interrupción adicional causado por la expresión de la proteína PTEN mutante inactiva.

Funcionalmente, PTEN tiene actividad fosfatasa lipídica que suprime la señalización PI 3-kinase/Akt por desfosforilación del fosfatidilinositol 3,4,5 -trifosfato (PIP3), regulando la vía de señalización Akt / mTOR. Un análisis de la activación de la proteína cinasa Akt confirma que la pérdida de una copia del gen PTEN normal, causa un modesto aumento en la fosforilación de Akt en relación con las células normales. Esto implica que las proteínas mutante PTEN son capaces de interferir con la capacidad de la enzima normal para metabolizar su sustrato lipídico PIP3 y

también es consistente con un papel significativo para las quinasas Akt en la promoción de la tumorigénesis³¹⁻³².

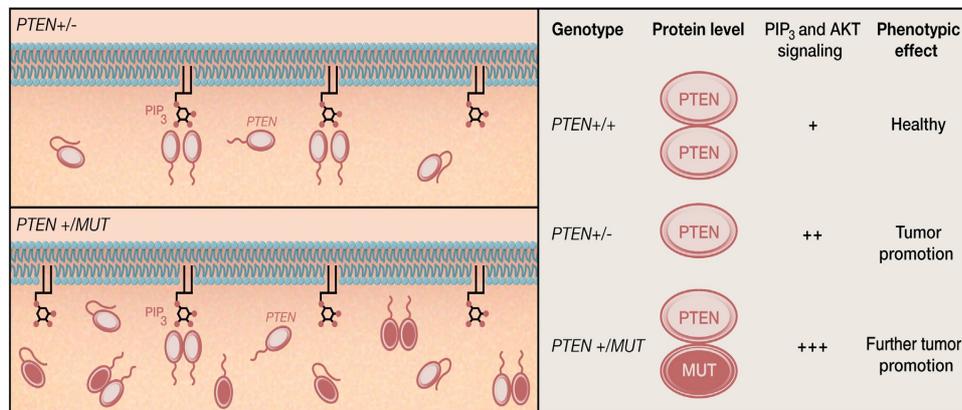


Fig. 11. Actividad dimérica de PTEN

La pérdida de función o mutación de PTEN metaboliza PIP₃ en la membrana plasmática en dímeros activos activando la vía PI3/AKT.

1.11.3. PI3K/AKT

La serina/treonina quinasa, desde su descubrimiento como un oncogén en el AKT8 virus de la leucemia del ratón en 1991 por Bellacosa y colaboradores y como un homólogo de la proteína quinasa C, ha despertado gran interés por la activación de señalización de su vía implicada en la tumorigénesis. Se han identificado tres genes en humanos que codifican PKB α /AKT1, PKB β /AKT2 y PKB γ /AKT3 respectivamente. La proteína quinasa B o AKT es un mediador de las vías de señalización y se activa en respuesta a factores de crecimiento y otros estímulos extracelulares. Contribuyen a varias funciones celulares tales como: el metabolismo de nutrientes, crecimiento celular, regulación de la transcripción y supervivencia celular. AKT actúa como un efector por debajo de fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3K). PI3K puede ser activada por receptores tirosín quinasa y receptores acoplados a proteínas G, y la activación de PI3K genera fosfatidil inositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃) a partir de fosfatidil inositol-3,4-difosfato (PIP₂). PIP₃ no activa directamente AKT/PKB pero recluta AKT/PKB a la membrana plasmática en donde es fosforilada y activada. AKT/PKB tiene un papel importante en el desarrollo de varios cánceres humanos, lo

que ha impulsado el desarrollo de inhibidores de la ruta de señalización PI3K/AKT³³.

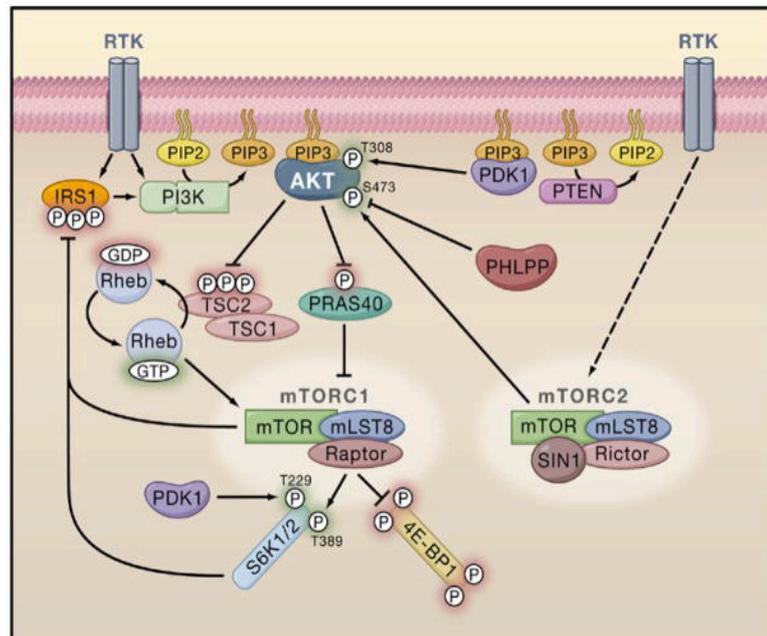


Fig 12. Activación de la vía de señalización PI3/AKT

1.11.4. mTOR

El crecimiento y proliferación celular depende de señales externas como factores de crecimiento, nutrientes y aporte sanguíneo. Muchas de estas señales son conducidas a través de la serina/treonina quinasa mTOR. mTOR es una proteína de 289 kDa que pertenece a la familia de PI3K y quinasas relacionadas (PIKK). El dominio catalítico de estos miembros se asemeja al de PI3K. Las PIKKs incluyen las subfamilias TOR (target of rapamycin), ATM (ataxia- telengectasia mutada) y ATR (relacionada con Rad3). La quinasa mTOR actúa como un interruptor central del metabolismo celular, señalizando rutas de crecimiento y proliferación, a través de efectos sobre VEGF en células endoteliales y tumorales. Esta ruta, se encuentra activada, especialmente en aquellos con una elevada actividad de PI3K, o en los que se encuentra mutada el supresor tumoral PTEN. Se estima, que la ruta de señalización de mTOR está activada en un 50% de los casos de cáncer de próstata, en un 30-60% de gliomas malignos, 30-50% de carcinoma de endometrio, 50% de melanomas etc. siendo una vía importante para el desarrollo de inhibidores terapéuticos. mTOR está

formado por dos complejos distintos: un complejo sensible a rapamicina en el que se encuentra asociada a la proteína raptor (proteína reguladora asociada a mTOR) TORC 1 y un complejo insensible a rapamicina que incluye a la proteína rector TORC2.

mTOR regula la síntesis de proteínas, nucleótidos y el metabolismo de los lípidos para promover el crecimiento y la proliferación. Nuevas evidencias sugieren que mTORC1 estimula la síntesis de nucleótidos, promoviendo la expresión de los genes de APP y de 5 'fosforibosil pirofostato 1' (PRPP) y estimula la producción de ATP a través de la activación de GDH. mTORC1 estimula la actividad mitocondrial a través de la regulación de traducción de nuclear secundaria a mRNAs relacionados con la mitocondria. En comparación con la regulación mTORC1, el papel de mTORC2 en la síntesis de proteínas está menos definida. Se ha asociado activamente a mTORC2 con la traducción, cotrasducción, fosforilación de ribosomas y estabilización de sustratos.

mTOR, no solo regula el crecimiento celular, sino que también interviene en la progresión y metástasis tumoral ya que regula positivamente la traducción de proteínas incluyendo el VEGF favoreciendo la angiogénesis. Sin embargo esta nueva vascularización también puede ser estimulada por citoquinas proinflamatorias como el TNF, y a su vez activación de mTOR como un estudio publicado por Dung-Fang Lee y colaboradores que observaron el TNF induce a las células tumorales que secreten VEGF a través de la disregulación de mTOR causado por la supresión de TSC1 por IKKb.³⁴⁻³⁵

En los últimos años se ha observado que la generación de nuevos vasos linfáticos y su remodelación en el tumor primario son pasos importantes en la metástasis del cáncer. La supervivencia, proliferación y migración de los células endoteliales linfáticas son centrales en la linfangiogénesis y dependen de señales del factor de crecimiento endotelial vascular del receptor 2 (VEGFR2) y VEGFR3 que es impulsado por VEGFC198 o VEGFD199, que puede estimular la activación dependiente de la proteína quinasa de la ERK1 o ERK2 que inicia la cascada de

señalización y fosforilación de AKT y con la consiguiente activación de mTOR.

Esta vía tiene especial interés para control y progresión de metastasis, observándose así en modelos de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello que la inhibición de mTOR disminuyó tanto la angiogénesis como la linfangiogénesis en el tumor primario y evita la diseminación de las células tumorales a nodulos linfáticos cervicales.

Además, agentes anti-linfangiogénicos podrían ser utilizados como parte de regímenes de tratamiento pre-operatorio que están diseñados para reducir el tamaño del tumor primario para facilitar la cirugía. Este enfoque también permitiría un análisis directo del efecto del agente antilinfangiogénico en los vasos linfáticos tumorales. En teoría, estos fármacos anti - linfangiogénicos también podrían utilizarse, en combinación con otros agentes sistémicos, para el tratamiento de pacientes con cánceres avanzados, no resecables. En este escenario, la inclusión de agentes antilinfangiogénicos tendría como objetivo reducir la incidencia de recurrencia local o distante³⁶⁻³⁷.

2. Hipótesis

La activación de la vía PTEN/AKT/mTOR, que se activa constitutivamente en muchos tipos de cáncer, es facilitada por la pérdida de expresión de pTEN y sobreexpresión de AKT y MTOR y se relaciona con el desarrollo y mal pronóstico en los carcinomas nasosinusales.

Estudiar esta vía nos permitirá un enfoque mas directo e individualizado, para el tratamiento y seguimiento de este tipo de tumores.

3. Objetivos

3.1. OBJETIVO GENERAL:

- Conocer el perfil inmunohistoquímico y el grado de participación de la vía PTEN/AKT/MTOR en los carcinomas nasosinuales su desarrollo y pronóstico.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Describir los aspectos clínico-patológicos más relevantes identificados en nuestra serie de casos de carcinomas nasosinuales.
- Determinar, mediante inmunohistoquímica, la pérdida de expresión de pTEN o la sobreexpresión AKT y MTOR en nuestras líneas tumorales y correlacionarlas con los aspectos clínicos patológicos.
- Relacionar los patrones de expresión proteica con el pronóstico y la supervivencia en nuestros pacientes estudiados.

4. Material y Método

4.1 POBLACIÓN A ESTUDIO

Se estudiaron retrospectivamente dos series de tumores nasosinusales, 16 Adenocarcinomas de tipo Intestinal (ITACS) y 29 carcinomas escamosos nasosinusales (SCNC), provenientes del Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Central de Asturias, España.

Los pacientes fueron intervenidos con fines curativos, en un período comprendido entre 1989 y 2006, en el caso de los carcinomas escamosos y entre 1981 y 2010 para los adenocarcinomas. Se decidió en función del tumor y del resultado de la cirugía, la necesidad o no de recibir tratamientos complementarios (radioterapia, quimioterapia o cirugía). Algunos de los pacientes habían recibido tratamiento quirúrgico sobre el tumor primario en su hospital de referencia.

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

En el caso de los adenocarcinomas, se distribuyeron cada subtipo según la clasificación de la OMS (Barnes et al) en tumores papilares, colónicos, sólidos, mucinosos y mixtos. Dentro de los tumores mixtos se incluyó en el subtipo tumoral de peor pronóstico.

4.2 VARIABLES

En la tabla Nº... se incluyen las principales características clínicas de los distintos pacientes incluidos en el estudio.

Tabla Nº 7 Variables

Edad	Años
Sexo	Hombre/Mujer
Exposición a factores de riesgo	*SI/NO
Tiempo de Exposición	Meses
Presencia de enfermedad metastásica	SI/NO
Presencia de recidivas	SI/NO
Exitus	SI/NO/exitus por otra causa
Tiempo de seguimiento	Meses
Tiempo libre de enfermedad	Meses
Estadio local Tumoral	T1/T2/T3/T4a/T4b

*Exposición a tabaco, alcohol y en el caso de adenocarcinoma a polvo de madera.

4.3 RECOGIDA DE MUESTRA

Las muestras de tumor primario fueron fijados en formol e incluidas en parafina, procesada la pieza se obtuvo bloques de tejido parafinado para su estudio en el Servicio de Anatomía Patológica y en el laboratorio de investigación del Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA). Para determinar el tejido tumoral en el bloque, se hizo un corte de 5 µm para tinción con hematoxilina-eosina que, observado al microscopio óptico permitió marcar la zona tumoral en el porta y seleccionarla en los cortes posteriores, evitando la necrosis y los tejidos sanos peritumorales. Se cogieron tres cortes de 50µ. Las muestras obtenidas fueron utilizadas para la posterior elaboración de tissue arrys y tinciones de

inmunohistoquímica.

4.4 ANÁLISIS MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA. TISSUE MICRO ARRAYS (TMA)

La inmunohistoquímica es un estudio histopatológico que permite localizar e identificar una determinada proteína sobre muestras biológicas, basándose en una reacción inmune antígeno-anticuerpo. En nuestro trabajo hemos estudiado la expresión de 3 proteínas PTEN, pAKT y mTOR en dos series de tumores nasosinusales, carcinomas escamosos y adenocarcinomas. El estudio inmunohistoquímico se realizó sobre “tissue micro- arrays” (TMA). Describiremos inicialmente la técnica de los TMA y posteriormente la técnica de inmunohistoquímica, que es similar en todos los casos.

4.4.1. TÉCNICA DE LOS TMA

4.4.1.2. SELECCIONAR LAS ZONAS A MUESTREAR

Se realizan cortes de rutina de los bloques incluidos en el estudio que se tiñen con H-E (hematoxilina- eosina). Las laminillas teñidas correspondientes a cada bloque son revisadas por el patólogo que elige las áreas representativas que se marcarán con círculos (mínimo 3) de 2 mm de diámetro para poder identificar las zonas correspondientes en cada bloque. (Figura 13).

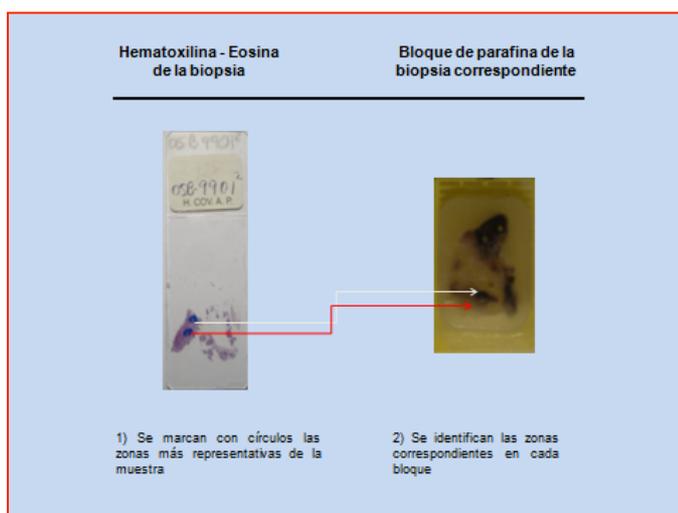


Fig.13. Ejemplo de seleccionado de zona a muestrear

4.4.1.3. ELABORACIÓN DE LA BASE DE DATOS Y ESQUEMA DEL TMA

El esquema topográfico del TMA se elabora en una tabla de Word que disponga de tantas casillas como cilindros de tejido. En cada casilla se pone el número de biopsia; así mismo se puede especificar en cada casilla la topografía y morfología del tumor. El número de casos por bloque y el tamaño del bloque varían en función de los requerimientos en número de casos del solicitante y al diámetro de las agujas perforadoras y la distancia entre perforaciones. En nuestro estudio se realizó un bloque de “tissue array” de 2 x 2,5 cm. con pocillos de tumor de 1 mm separadas por 1,5 mm. En total 87 pocillos en cada bloque y 29 casos. (Figura 14).

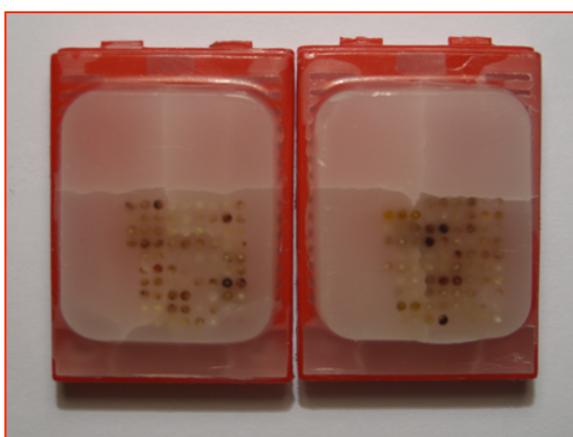


Fig. 14. Bloques TMA de 2 x 2,5 cm con 87 muestras por bloque

4.4.1.4. ELABORACIÓN DEL TMA

Para la elaboración de los bloques se seguirán las instrucciones técnicas del proveedor del aparato. Una vez se han extraído los cores de tejido de 1 mm de diámetro, se van colocando en el bloque receptor según el esquema previamente definido. Una vez completado este proceso, se procederá a la homogenización del bloque. Se hará en la estufa a 60°C durante 12-15 minutos colocándolo boca abajo sobre un porta y nunca directamente sobre el metal. Posteriormente se dejará enfriar a temperatura ambiente en el tiempo que necesite introduciéndolo en la nevera para endurecerlo antes de proceder a cortarlo.

4.4.1.5. SECCIONES DEL BLOQUE

Se recomienda hacer todas las secciones de una sola tanda, para evitar la pérdida de tejido que supone reorientar el bloque. Los cortes son de 3 µm. Se realizará una tinción de hematoxilina- eosina de control en el primer corte útil. En caso de que sean necesarias más de 20 secciones, hacer un corte de control por cada 20 secciones y teñirla con hematoxilina- eosina. Figura 15.

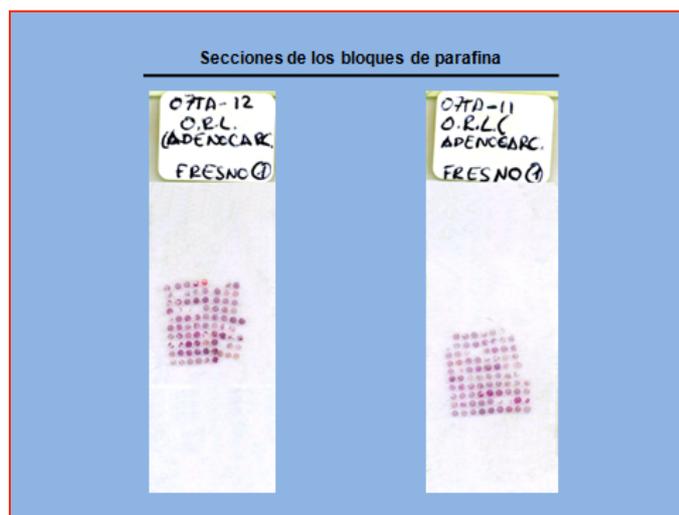


Figura 15. Tinción hematoxilina- eosina de control

Si las secciones no se van a utilizar de inmediato, los portas deben cubrirse con una fina capa de parafina y se guardarán refrigerados en una caja en la nevera de -3°C.

4.4.1.6. REQUERIMIENTOS MÍNIMOS ESTÁNDAR DEL TMA

- 1) Todos los tumores muestreados deben estar representados en las secciones, o al menos en un número superior al 90%.
- 2) Los cilindros una vez seccionados deben estar intactos o si se han perdido algunos, deben estar representados al menos el 50% del caso.
- 3) Si el número de casos perdidos fuese superior a 3 se procederá a la repetición del TMA.

4.4.1.7. TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA

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

Después se realiza el desparafinado de las muestras con xilol y la hidratación de las mismas con alcoholes de graduación decreciente y se efectúa el desenmascaramiento antigénico con solución recuperadora de antígenos en el PtLink de Dako® a 95°C durante 20 minutos y se mantienen 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 de Dako®. En primer lugar se introducen las muestras en un buffer de lavado y en una solución bloqueante de peroxidasa durante 5 minutos. Posteriormente se añade el anticuerpo monoclonal primario dirigido hacia la proteína que deseamos detectar durante un tiempo variable según el tipo de anticuerpo utilizado.

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

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

Como último paso se contrasta la preparación mediante hematoxilina durante un minuto. Tras la tinción, las preparaciones se deshidratan mediante alcoholes de graduación ascendente y se montan con un cubreobjetos. Como se ha dicho anteriormente nuestro estudio se dirigió a la detección de PTEN, pAKT y mTOR por lo que se utilizaron los siguientes reactivos en cada caso.

Tabla 7. Técnicas inmunohistoquímicas realizadas.

MARCADOR	SRA	AP	D	TI
PTEN	pH9, 20min.	Clon clone 6H2.1 (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca)	1/50	20min.
pAKT-pS473	pH9, 40min.	Clon 14-5 (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca)	1/20	30min.
p-mTOR- pS2448	pH9, 20min.	Clon 49F9 (Cell Signaling Technology Europe B.V., Leiden, The Netherlands)	1/100	45min.

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

4.5.1. INTERPRETACIÓN DE LA TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA

PTEN, pAKT y mTOR se puntuaron de acuerdo con el porcentaje de células positivas (PP) (0: <1%, 1: 1-10%, 2: 11-50%, 3: 51-80% y 4:> 80%) y la intensidad de la tinción (SI) (0: negativo, 1: débil, 2: moderada y 3: fuerte); La puntuación inmunorreactiva (IRS), que se calcula como $PP \times SI$. La pérdida de expresión de PTEN se definió como $IRS \leq 6$, y pAKT y mTOR sobreexpresión como $IRS \geq 7$.

Los 16 ITACs y los 29 SCNC fueron incluidos en bloques TMA 10TA10 y 08TA25 respectivamente. Cada bloque de TMA incluyó tres muestras de epitelio normal como control interno.

4.5.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico sobre las distintas variables estudiadas se ha llevado mediante el programa informático SPSS (“Statistical Package for Social Science”), versión 19.0 para Windows (SPSS® Inc. Illinois, EE.UU).

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

Para estimar la supervivencia se utilizaron las curvas Kaplan-Meier, comparando las distribuciones de supervivencia mediante la Prueba del Logaritmo del Rango « Log-Rank Test ». Los valores con una $p \leq 0.05$ fueron considerados significativos.

5. RESULTADOS

5.1 PERFIL CLÍNICO Y EPIDEMIOLÓGICO DE LA MUESTRA

Se estudiaron retrospectivamente dos series de tumores nasosinuales, 16 Adenocarcinomas de tipo Intestinal (ITACS) y 29 carcinomas escamosos nasosinuales (CENS), provenientes del Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Central de Asturias, España.

5.1.2. CARCINOMAS ESCAMOSOS NASOSINUALES

La muestra se compone de 29 casos de carcinomas epidermoides nasosinuales tratados en el Hospital Universitario Central de Asturias. Los pacientes fueron intervenidos entre Octubre de 1989 y Noviembre de 2006. Las variables descritas no tratan de definir los aspectos generales de los CENS, sino las características de los sujetos seleccionados para ver si se ajustan o desvían de lo esperado en este tipo de tumores. También tienen interés para intentar establecer asociaciones con el resto de variables obtenidas por medio de técnicas inmunohistoquímicas.

De los 29 pacientes incluidos en el estudio el 66% fueron varones y el 34% mujeres. La media de edad al diagnóstico fue de 65 años y la mediana de 66 años. La persona más joven diagnosticada tenía 47 años y la de más edad tenía 85 años. En ninguno de los casos se pudo identificar una clara exposición previa a los carcinógenos implicados en la génesis de estos tumores. En cuanto a la localización tumoral se encontró que en el 83% el origen era el seno maxilar y el 17% el tumor se originaba en el seno etmoidal.

Todos los pacientes tenían un diagnóstico histopatológico de carcinoma escamoso, siendo el grado histológico más frecuente el bien diferenciado con un

41%, seguido del pobremente diferenciado 38% y, finalmente, el moderadamente diferenciado 21%. En el estadio tumoral T, se observó un predominio de pacientes con tumores localmente avanzados, el estadio T4 el que abarcó el mayor número de pacientes con un 55%, frente a tan solo un 3.4% en estadios iniciales. El desarrollo de metástasis ganglionares cervicales se constató en el 28 % de los estadios avanzados T4, y ninguna se presentó en estadios tempranos.

Se consideraron asimismo la invasión intracraneal y a órbita en este estudio pues suponen dos de los factores pronósticos más destacados. En 15 pacientes (52%) no mostraron afectación orbitaria, 9 (31%) tenían afectada la periórbita y 5 (17%) invasión hacia la órbita en el momento de la cirugía. Sólo en 5 casos (17%) se constató la presencia de invasión intracraneal.

La radioterapia complementaria postoperatoria se indicó en 21 casos (72%). Los pacientes a los cuales no se les administró radioterapia adyuvante eran pacientes con tumores en estadios precoces y sin factores de riesgo o bien pacientes que fallecieron antes de recibir el tratamiento.

En la tabla 9 se resumen las características clínicas estudiadas en relación a la localización tumoral, donde no se pudo establecer una asociación estadísticamente significativa entre estas variables, esto pudo ser debido al tamaño reducido de la muestra.

Tabla 9. Cuadro – resumen de las características clínicas de la muestra según la localización Tumoral.

		Total n=29(%)	Maxilar n=24(%)	Etmoidal n=5(%)	P
Edad Media	65 años (47-85)				
Género	Hombre	19(66)	15(79)	4(21)	0.4
	Mujer	10(34)	9(90)	1(10)	
Diferenciación	Bien	12(41)	10(83)	2(17)	0.363
	Moderado	6(21)	6(100)	0	
	Mal	11(38)	8(73)	3(27)	

Estadio local	T1	0	0	0	0.116
Tumoral	T2	1(3)	0	1(100)	
	T3	7(24)	6(86)	1(14)	
	T4a	16(55)	13(81)	3(19)	
	T4b	5(17)	5(100)	0	
Invasión Intracraneal	Si	5(17)	4(80)	1(20)	0.858
	No	24(83)	20(83)	4(17)	
Invasión Orbita	Orbita	5(17)	5(100)	0	0.528
	Periorbita	9(31)	7(78)	2(22)	
	No	15(52)	12(80)	3(20)	
Estadio N	N0	21(72)	18(86)	3(14)	0.495
	N1	8(28)	6(75)	2(25)	
Metástasis	M0	24(83)	19(79)	5(21)	0.262
	M1	5(21)	5(100)	0	
Radioterapia	Si	21(72)	16(76)	5(21)	0.129
	No	8(28)	8(100)	0	
Media de seguimiento	de	58	(1-212		
		meses)			

Tras el tratamiento inicial y durante el periodo de seguimiento, 5 de los pacientes (17%) presentaron metástasis a distancia, que coincidieron con 5 recidivas locorregionales no tratables.

El tiempo medio de seguimiento fue de 32 meses, con una mediana de 18 y un rango entre 1 y 211 meses, durante el cual fallecieron el 21 pacientes (72%).

22 pacientes (76%) presentaron una recidiva local en el transcurso del seguimiento y 5 (17%) desarrollaron metástasis a distancia, por lo que la supervivencia libre de enfermedad fue del 17 % en el primero año y del 6% a los 5 años. (Figura.16).

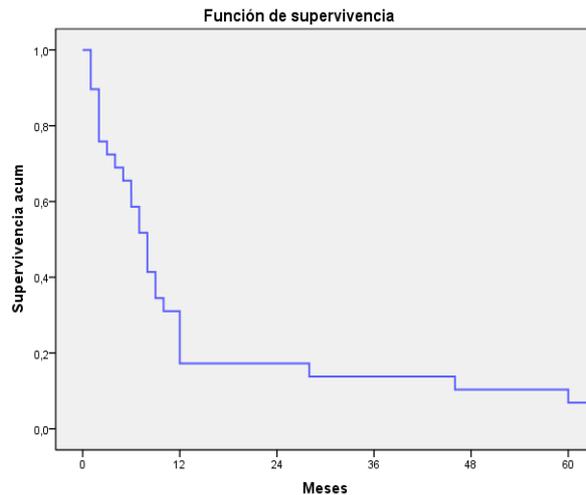


Figura 16. Curva Kaplan – Meier de supervivencia libre de enfermedad de carcinomas escamosas nasosinusales.

La supervivencia global de los pacientes fue del 24% a los 5 años de seguimiento. La principal causa de muerte en nuestra serie fue la presencia de recidiva local y el desarrollo de metástasis a distancia. No obstante 3 de los pacientes fallecieron debido a procesos intercurrentes o durante el postoperatorio. (Figura 17).

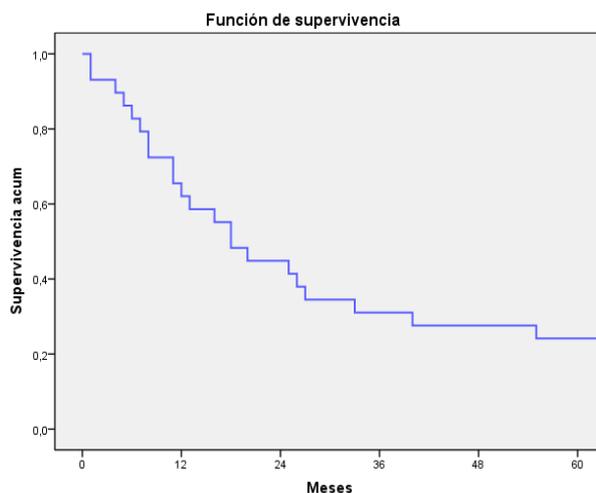


Figura 17. Curva Kaplan – Meier de supervivencia global de carcinoma escamoso nasosinusal.

Al analizar la relación con la supervivencia, y las variables clínicas estudiadas, (clasificación T, clasificación N, estadio global, grado de diferenciación histológica, afectación orbitaria, extensión intracraneal, desarrollo de metástasis a distancia), se

demonstró que estas relaciones no presentaron significación estadística, no obstante se observó que los pacientes en estadios avanzados T4 ($p = 0,4$) y con metástasis ganglionares ($p = 0,220$) tienen peor pronóstico ($p = 0,153$).

Los pacientes con tumores de mayor tamaño (T4) en el momento del diagnóstico, presentan recidivas más precozmente, con una ($p = 0,061$) aunque dicha relación no alcanzó la significación estadística. Figura 15

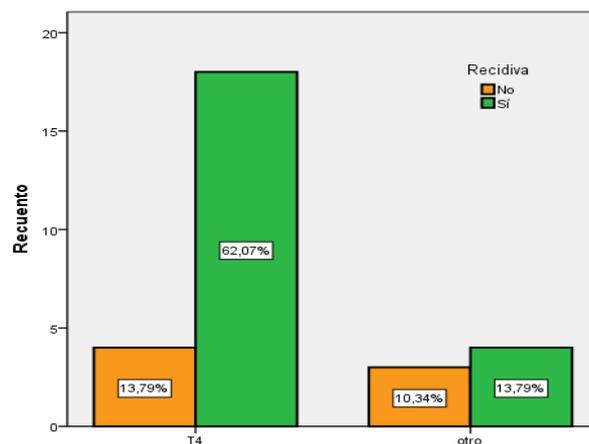


Fig. 18. Relación entre ente el estadio avanzado y recidivas tumorales.

5.1.3 ADENOCARCINOMAS

La muestra constó de 16 casos. El 93% al sexo masculino y el 6% a al sexo femenino, con edades comprendidas entre los 52 y 88 años, siendo la media 70 años. El 94%, presentaron antecedentes de exposición al polvo de la madera con un tiempo de exposición medio de 31 años (rango 1 a 60 años), mientras que solo el 50% presentaron antecedentes de exposición al tabaco y el 44% a alcohol. El periodo de seguimiento medio de los pacientes fue de 58 meses en un rango entre 1 hasta 212 meses.

De los 16 casos, el 61% se diagnosticaron en estadio T1 (10 casos).

Se revisaron todos los casos confirmándose el diagnóstico de ITAC. Se subclasificaron siguiendo el sistema modificado de Barnes et al. En donde se observó que el 6% (1 caso) de los tumores eran de tipo papilar, 69% colónicos (11 casos),

19% Mucinosos (3 casos) y finalmente el 6% correspondió al tipo Mixto (1 caso). No se encontró pacientes que presentaran el subtipo sólido. (Figura 19).

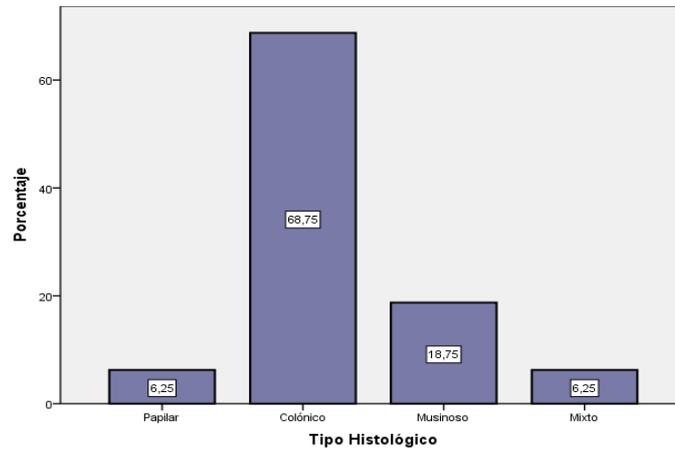


Figura 19. Subtipos histológicos identificados en nuestra serie de ITACs.

Se presentaron recidivas tumorales y metástasis a distancia en un 31% de pacientes estudiados.

Durante el período del seguimiento el 14 pacientes (87%) permanecieron vivos, 1 paciente (6%) falleció a causa del tumor, y otro paciente (6%) falleció por otra causa no asociada al tumor. (Figura 20).

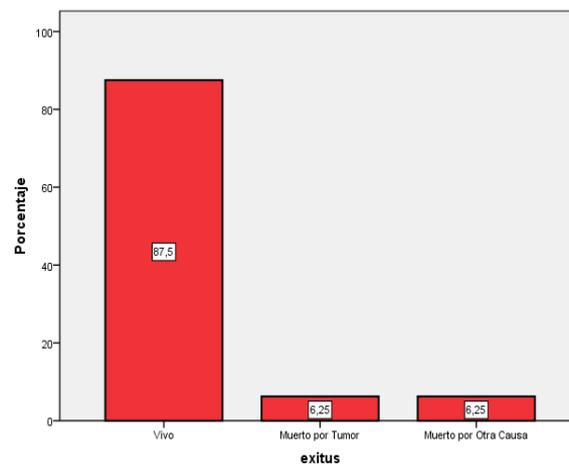


Figura 20. Fallecimiento de los pacientes con Adenocarcinomas Nasosinuales

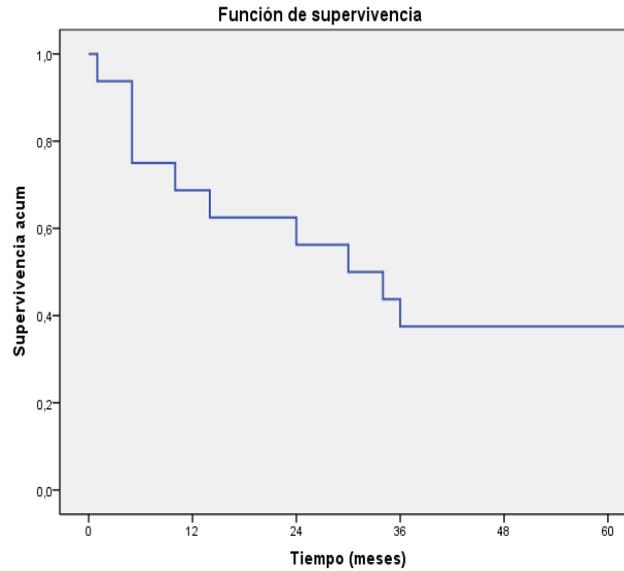


Fig. 21. Supervivencia Global de los Adenocarcinomas a los 5 años de seguimiento.

La supervivencia global de los pacientes fue del 38% a los 5 años de seguimiento.

Figura .

5.2. RELACIONES ENTRE LOS RASGOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS

Los diferentes subtipos histológicos mostraron rasgos clínicos variables, siendo más frecuentes los antecedentes de exposición al polvo de madera en los tipos histológicos papilar, colónico y mucinoso. Los tumores de tipo sólido fueron los que tuvieron un estadio local más avanzado. Los resultados se reflejan en la tabla 12.

Tabla 12. Esquema en el que se resumen de las características clínicas de la muestra según los distintos subtipos histológicos.

		Total n=16(%)	Papilar n=1(%)	Colónico n=11(%)	Mucinoso n= 3(%)	Mixto n=1(%)
Edad Media	70 años (52-88)					
Género	Hombre	15(93)	1(7)	10(67)	3(20)	1(7)
	Mujer	1(7)	0	1(100)	0	0
Trabajador de la	Si	15(94)	1(7)	10(67)	3(20)	1(7)
	No	1(7)	0	1(100)	0	0

Madera						
Fumador	Si	8(50)	1(13)	6(75)	1(13)	0
	No	8(50)	0	5(63)	2(25)	1(13)
Estadio local Tumoral	T1	10(63)	0	9(90)	1(10)	0
	T2	3(19)	1(33)	0	1(33)	1(33)
	T3	3(19)		2(67)	1(33)	0
Media de seguimiento		58 (1-212)				

El subtipo colónico fue el más frecuentemente diagnosticados en estadios T1 ($p=0.052$). La mayor parte de la muestra tenía antecedentes de exposición al polvo de madera (94%), y en todos los subtipos histológicos fue mayor el número de pacientes expuestos que no expuestos. Fig. 22.

El 31% de los pacientes presentaron la recidiva tumoral y 31% metástasis a distancia, ($p=0.001$).

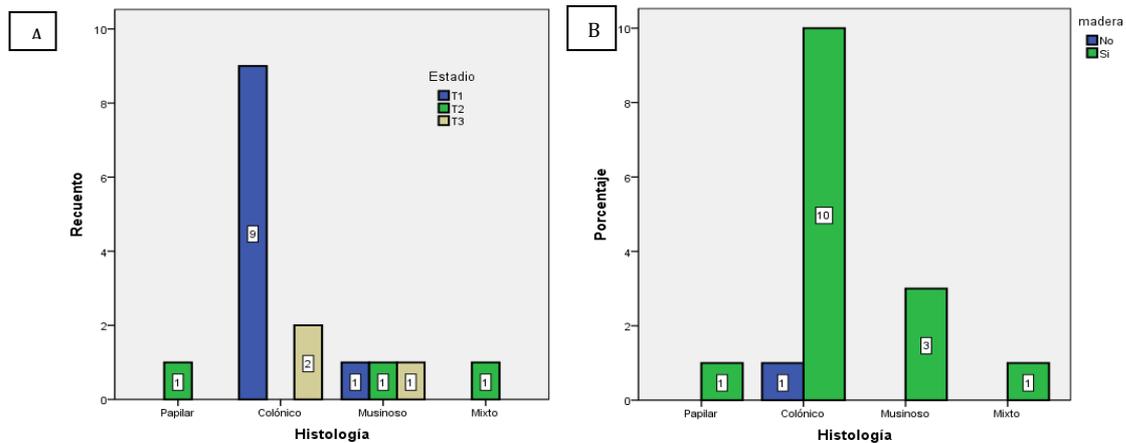


Figura 22. A) Asociaciones entre el subtipo histológico y el estadio y B) Y entre el subtipo histológico y los antecedentes de exposición al polvo de madera.

5.3. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO

5.3.1. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE CARCINOMAS ESCAMOSOS NASOSINUSALES.

Para analizar las inmunohistoquímicas de nuestras series de casos se utilizó el índice inmunoreactivo IRL, mencionado previamente en el apartado de material y método. Se observó que en la serie tumoral de carcinomas escamosos nasosinuales el 69% de pacientes (20 casos) presentaron pérdida de la expresión de pTEN. Figura 23.

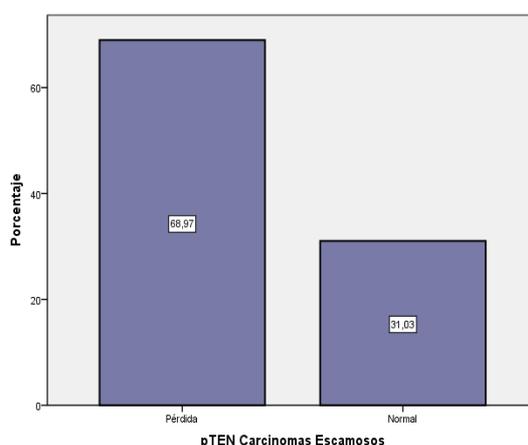


Figura 23. Pérdida de expresión de pTEN carcinomas escamosos

Al analizar la relación de las distintas variables clínicas estudiadas y la pérdida de expresión de pTEN en carcinomas escamosos nasosinuales, se obtuvieron resultados no estadísticamente significativos para el grado de diferenciación tumoral ($p=0.1$), Estadio Local T ($p=0.44$), Estadio ganglionar "N" ($p=0.6$), invasión orbitaria ($p=0.55$), Recidiva tumoral ($p=0.8$) y metástasis tumorales ($p=0.1$). Se observó que en el 31% que presentaron invasión intracraneal, ninguno tuvo pérdida de la expresión de pTEN, mientras que en 20 casos (69%) que presentaron pérdida de expresión de pTEN no se objetivo invasión intracraneal, ($p=0.001$).

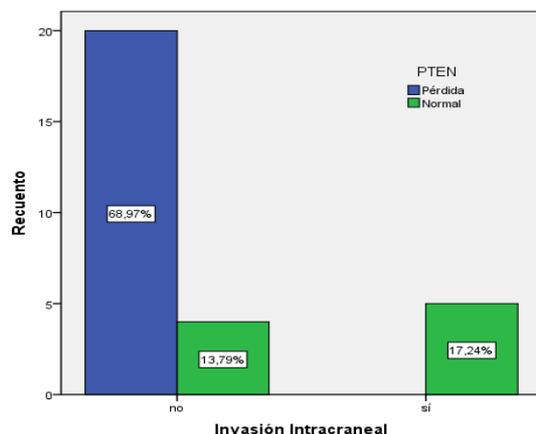


Fig. 24. Relación entre pérdida de expresión de pTEN e invasión intracraneal.

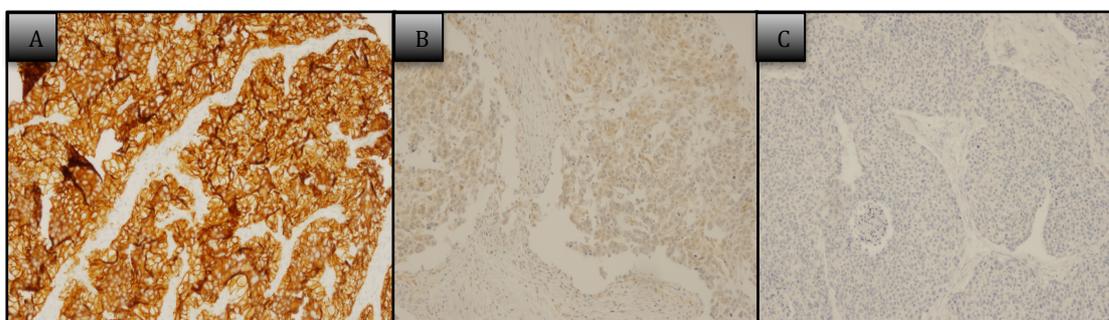


Fig. 25. Análisis inmunohistoquímico de pérdida de expresión de PTEN en CENS.
A) Positividad intensa. B) Positividad media. C) Positividad negativa.

En cuanto al análisis inmunohistoquímico de AKT y mTOR, se determinó su sobreexpresión de acuerdo a la positividad expresada en intensidad y porcentaje de células positivas y no al Índice inmuno reactivo, debido al pequeño tamaño de la muestra. Se observó que en 12 casos (41%) presentaron positividad para AKT, y en 8 casos (28%) para mTOR.

Al comparar las distintas variables clínicas encontradas en los carcinomas escamosos nasosinusales con la sobreexpresión de AKT se obtuvieron datos no estadísticamente significativos, no se encontró relación entre la sobreexpresión de AKT y la diferenciación histológica ($p=0.7$), estadio local T ($p=0.3$), estadio ganglionar ($p=0.7$), invasión intracraneal ($p=0.3$) y orbitario ($p=0.1$) y metástasis ($p=0.2$), solo se

encontró relación para la recidiva tumoral ($p=0.006$), en donde el 21% de los casos que presentaron recidiva tumoral, sobreexpresaron la proteína AKT. (Figura 26).

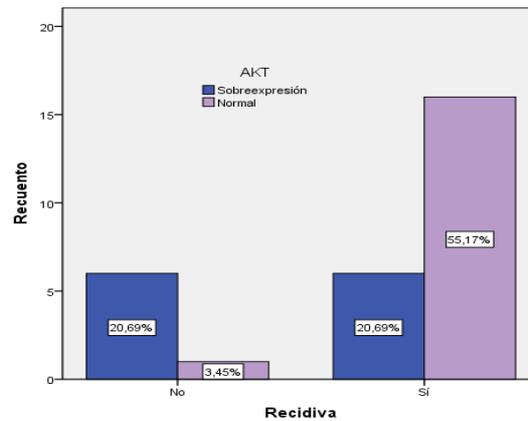


Fig. 26. Relación entre la Sobreexpresión de AKT y Recidiva Tumoral en carcinomas escamosos nasosinusales.

Al correlacionar mTOR con las distintas variables se observó que presentó datos relevantes en el grado de diferenciación histológica ($p=0.037$), la mayoría de casos que sobreexpresaron mTOR (21%) correspondieron al grado de mal diferenciado. (Figura 27).

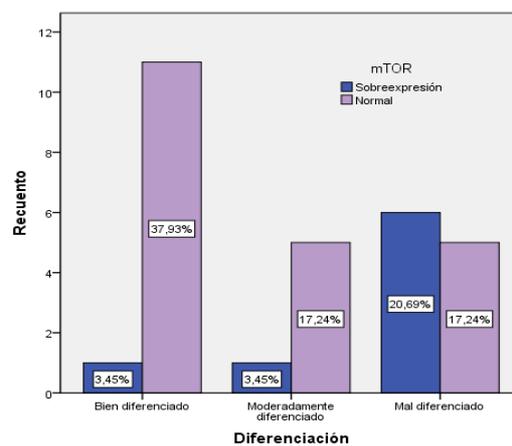


Fig 27. Relación entre la sobreexpresión de mTOR y el grado de diferenciación tumoral.

Al analizar la supervivencia global con la pérdida de expresión de pTEN y la sobreexpresión de AKT y mTOR no se obtuvieron datos estadísticamente significativos. Figura 28.

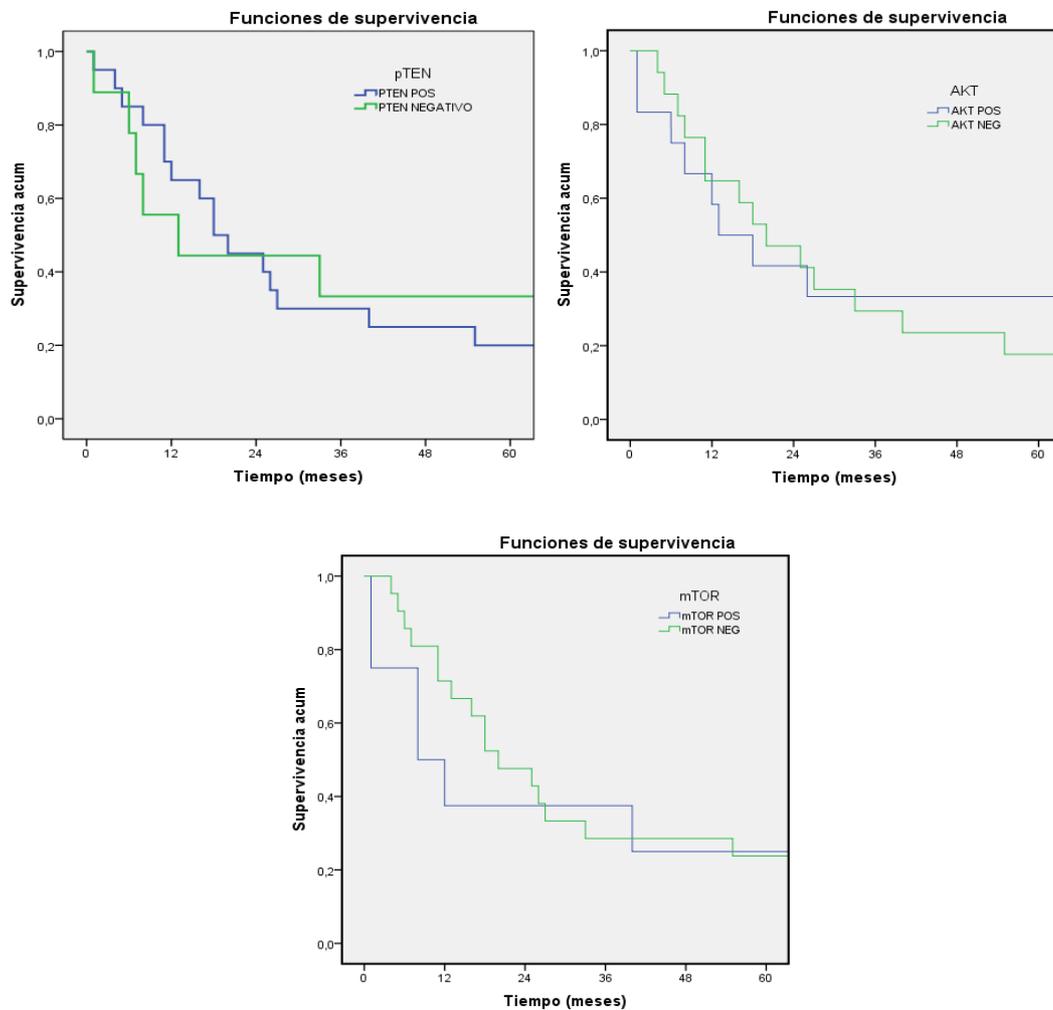


Figura 28. Relación entre la Supervivencia Global y la pérdida de expresión de pTEN y la sobreexpresión de AKT y mTOR.

5.3.3. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE ADENOCARCINOMAS NASOSINUSALES

En la serie de adenocarcinomas casi la totalidad, 15 casos (94%) presentaron pérdida de expresión de pTEN. El único que no presentó pérdida de expresión de pTEN pertenecía al sexo masculino, al subtipo mucinoso, e invasión intracraneal,

metástasis a distancia y falleció a causa del tumor a los 14 meses del seguimiento. (Figura 29).

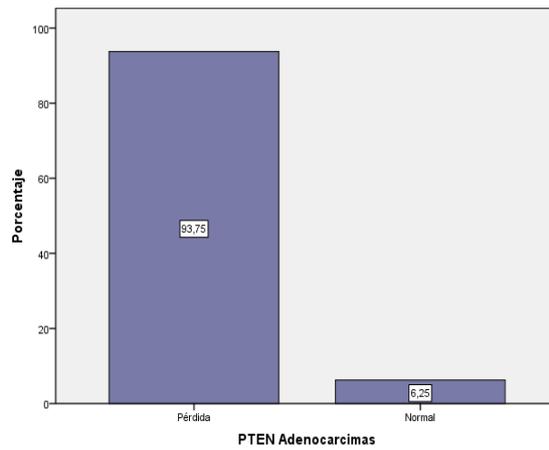


Fig. 29. Pérdida de expresión de pTEN en adenocarcinomas nasosinusales

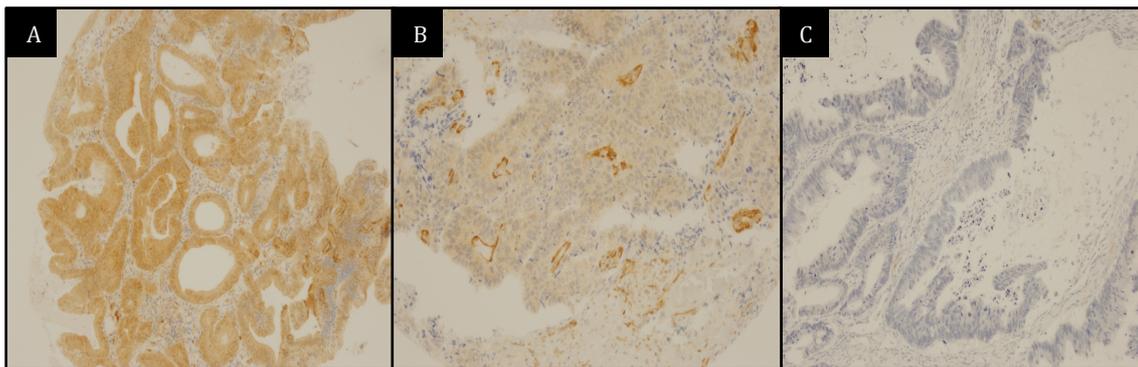


Fig. 30. Análisis inmunohistóquímico de la pérdida de expresión de PTEN expresado como: A) Positividad intensa B) Positividad media C) Positividad negativa en ITACS.

La frecuencia de sobreexpresión de AKT y mTOR en adenocarcinomas nasosinusales, se observó positividad para AKT en el 56% (9 casos) y para mTOR en el 37.5% (6 casos). Figura 31.

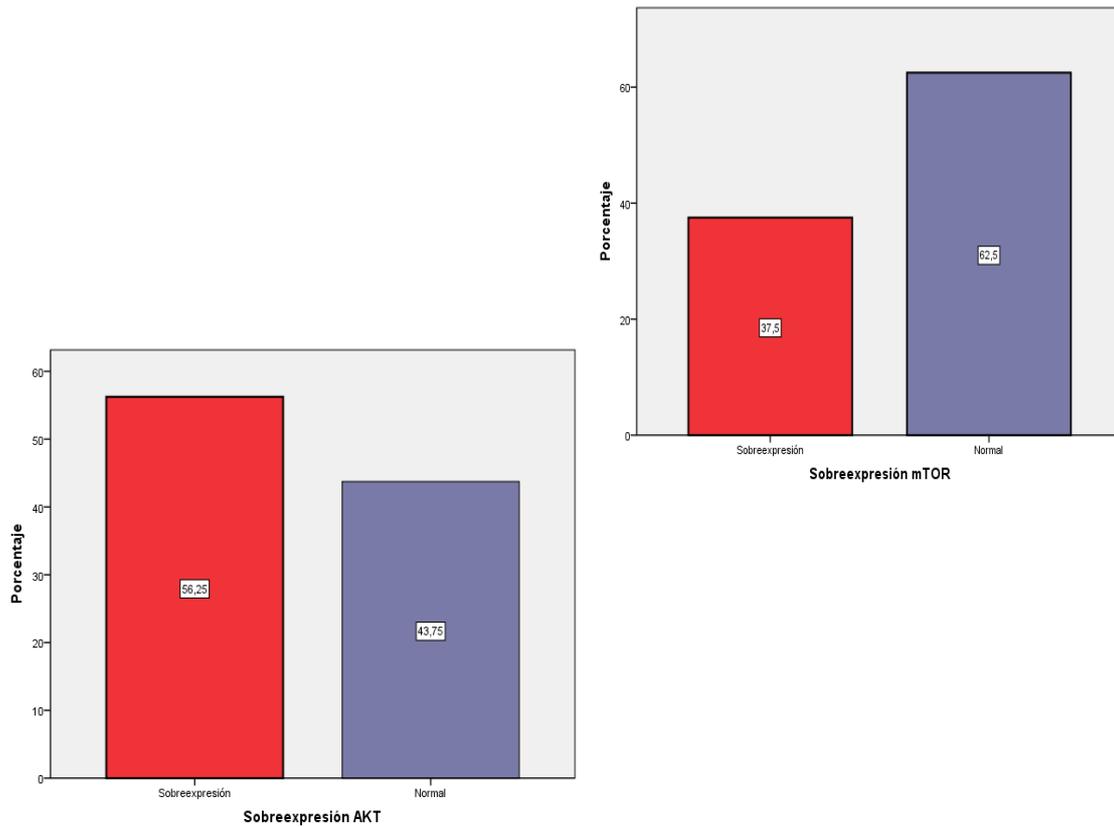


Fig. 31. Frecuencia de Sobreexpresión de AKT y mTOR en Adenocarcinomas nasosinuales

Al analizar la pérdida de expresión de pTEN y la sobreexpresión de AKT y mTOR con las distintas variables: Estadio Tumoral, Estadio T, Invasión Intracraneal, exposición a madera, tabaco y alcohol, tratamiento posterior, recidiva y metástasis no se obtuvieron datos estadísticamente significativos, estos datos se podrían explicar debido al tamaño reducido de la muestra.

Posteriormente se analizó la supervivencia global con la pérdida de expresión de pTEN y la sobreexpresión de AKT y mTOR en adenocarcinomas nasosinuales, no se obtuvieron datos estadísticamente significativos. (Figura 32).

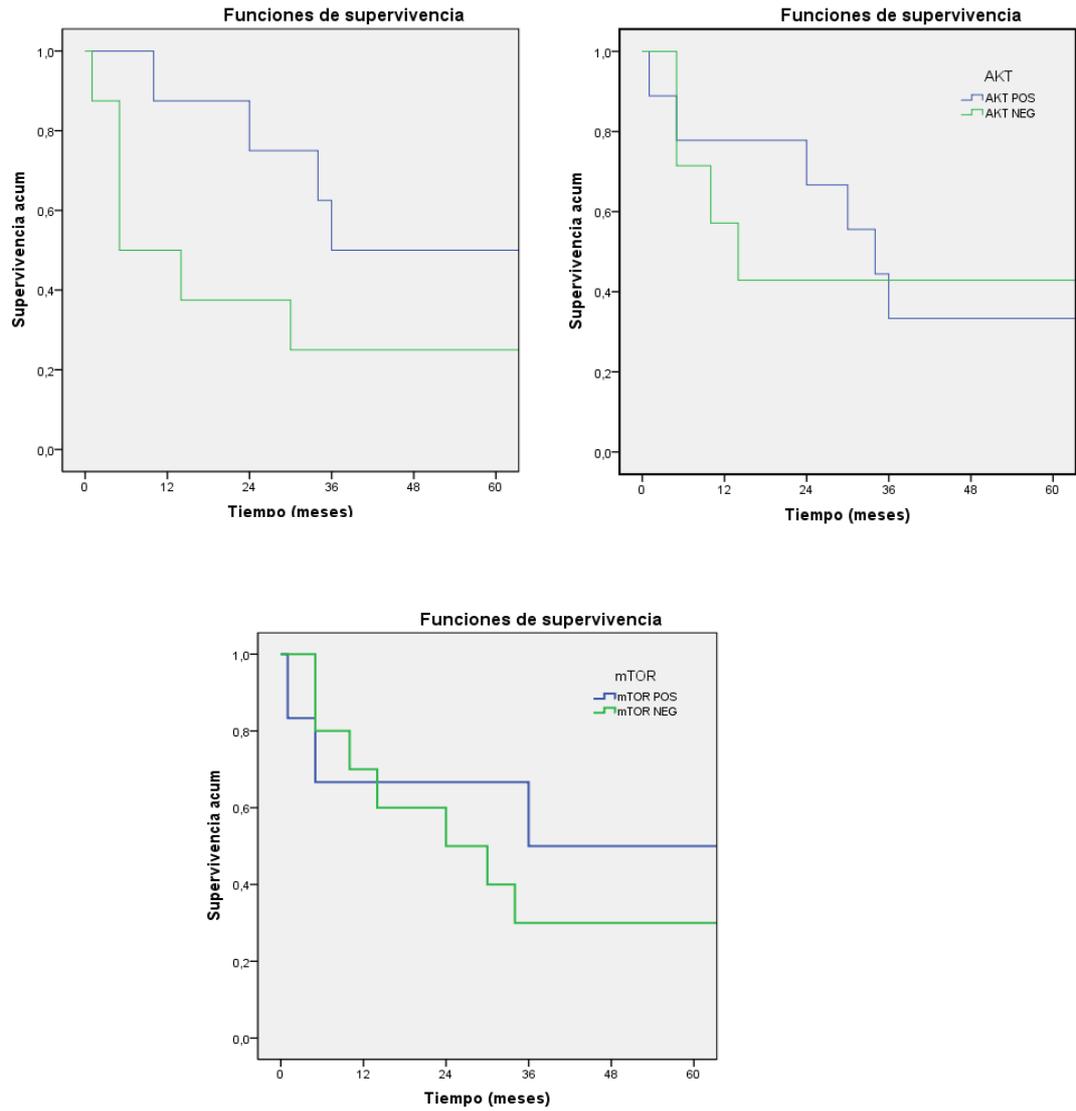


Fig. 32. Relación entre la pérdida de supervivencia global y la pérdida de expresión de PTEN, AKT y mTOR en adenocarcinomas nasosinuales.

6. DISCUSSION

El cáncer de cavidad nasal y senos paranasales es un grupo heterogéneo de tumores malignos de comportamiento agresivo, con una localización en la región centrofacial proximal a estructuras de importancia vital. La morbimortalidad generada por estos tumores es elevada a pesar de los continuos avances en el tratamiento.

Es por eso que se han investigado nuevas dianas terapéuticas con el fin de alcanzar un tratamiento más específico y personalizado que mejore el pronóstico y supervivencia de este tipo de tumores. En este estudio hemos analizado la ruta PTEN/AKT/mTOR y su relación en carcinomas nasosinuales.

6.1. PERFIL CLÍNICO Y EPIDEMIOLÓGICO DE LA MUESTRA

Hemos analizado 29 casos de carcinomas escamosos y 16 adenocarcinomas nasosinuales, donde se observó un claro predominio en el sexo masculino y una edad de presentación entorno a los 65 y 70 años de vida.

En cuanto a la exposición de factores de riesgo se sabe que los tumores nasosinuales se han vinculado en menor frecuencia con el consumo de tabaco y alcohol en relación con el resto de los tumores malignos de cabeza y cuello, mientras que está bien documentada la estrecha relación entre la exposición prolongada al polvo de madera y el desarrollo de adenocarcinomas nasosinuales⁵⁻⁶. En nuestra serie se observó que el 94% de adenocarcinomas presentaron antecedentes de exposición al polvo de la madera, mientras que la exposición a tabaco y a alcohol no mostraron una clara asociación.

El seno maxilar y el subtipo bien diferenciado se diagnosticaron con mayor frecuencia sobre todo en estadios avanzados T4 para carcinomas escamosos. En tanto que para adenocarcinomas el subtipo histológico más frecuente diagnosticado fue el tipo colónico en un 69% de los casos.

Para evaluar el pronóstico y supervivencia se evaluaron variables clínicas como la invasión, metástasis y recidivas. La principal causa de muerte en nuestra

serie de carcinomas escamosos fue la presencia de recidiva local y el desarrollo de metástasis a distancia.

En los adenocarcinomas el 31% presentaron recidivas tumorales y metástasis a distancia, ($p=0.001$). La supervivencia global de los pacientes fue del 38% a los 5 años de seguimiento.

6.1.2. JUSTIFICACIÓN PARA LA ORIENTACIÓN DE LA RUTA PTEN/AKT/MTOR

Varios estudios preclínicos y observacionales señalan la vía PTEN/Akt/mTOR, en el desarrollo de cánceres humanos. En el presente estudio se analizó la vía de PTEN/AKT/MTOR, determinándose las pérdidas o sobreexpresiones mediante análisis inmunohistoquímico y su relación con el desarrollo, pronóstico y supervivencia de nuestra serie de casos de carcinomas nasosinuales.

Un evento genético frecuente que se produce en el cáncer humano es la pérdida de la función de supresor de tumores PTEN. PTEN normalmente suprime la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR al funcionar como una fosfatasa de lípidos. La pérdida de la función de PTEN en el cáncer puede ocurrir a través de mutación, delección, o silenciamiento epigenético. En nuestro estudio se observó pérdida de expresión de PTEN en el 69% y 94% de los casos de carcinomas escamosos y adenocarcinomas respectivamente.

Varios estudios previos, como el descrito por Dreher et al 2004³⁹; Dahia et al 2005⁴⁰; han demostrado esta alta frecuencia de mutaciones de PTEN o supresiones en una variedad de cánceres humanos, incluyendo en cerebro, vejiga, mama, próstata, y cánceres endometriales, haciendo de PTEN el segundo gen supresor de tumor más frecuentemente mutado⁴¹. Forgacs et al. ⁴² sugirió que en tipos de tumores donde las mutaciones de PTEN son raras, tales como cáncer de pulmón, puede producirse por silenciamiento epigenético.

También se ha demostrado la importancia pronóstica de la pérdida de PTEN en varios cánceres humanos, estableciéndose que la pérdida de PTEN es un

mecanismo común para la activación de la ruta PI3K/Akt/mTOR y factor de mal pronóstico con supervivencia reducida en el cáncer humano⁴³⁻⁴⁴⁻⁴⁵.

Al analizar la relación entre la pérdida de expresión de pTEN y las principales variables clínicas que sugieran mal pronóstico en nuestra serie de casos como el estadio tumoral avanzado, metástasis y recidiva tumoral, no se encontró una relación estadísticamente significativa.

Se estudio AKT mediante inmunohistoquímica en trabajos previos como los descritos por Choe et al⁴⁶, y Dai et al⁴⁷, en donde han demostrado que la forma activa de Akt es detectable en cánceres tales como el mieloma múltiple, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer gástrico, leucemia mieloide aguda, cáncer de endometrio, melanoma, carcinoma de células renales, cáncer de colon, cáncer de ovario, y cáncer de próstata. En nuestro estudio se observó mediante análisis inmunohistoquímico positividad para AKT en el 56% de adenocarcinomas y 41% de carcinomas escamosos nasosinusales, lo cual sugiere que aKT se encuentra sobreexpresado en la mitad de carcinomas nasosinusales.

El análisis inmunohistoquímico también se ha utilizado para demostrar significado pronóstico de la activación de Akt. La fosforilación de Akt en S473 se ha asociado con un mal pronóstico en cánceres de piel⁴⁵, páncreas⁴⁸, próstata⁴⁹, de mama⁴⁴, cerebro⁵⁰ y sangre⁵¹. En nuestras series hemos encontrado una fuerte asociación entre la sobreexpresión de AKT y presencia de recidivas tumorales ($p=0.006$), y positividad para mTOR en el 56% de adenocarcinomas y 28% para el subtipo escamoso.

6.1.3. LA VÍA DE PTEN/AKT/MTOR ES UNA IMPORTANTE DIANA TERAPÉUTICA PARA EL CÁNCER HUMANO.

Recientemente se han investigado nuevos fármacos que bloqueen estas vías de señalización tumoral, como el inhibidor de Akt, el Perifosine, un inhibidor a base de lípidos. *in vitro*, Perifosine inhibe la translocación de Akt a la membrana celular, e

inhibe el crecimiento de melanoma, de pulmón, de próstata, de colon y células de cáncer de mama y mas recientemente se esta probando en células de carcinoma de nasofaringe recidivante o metastásico ⁵²⁻⁵³.

Un grupo relativamente nuevo de inhibidores de Akt a base de lípidos son los análogos de lípidos éter fosfatidilinositol (PIA), este inhibidor aumenta la apoptosis inducida por quimioterápicos y radioterapia por lo que están diseñados para evitar la resistencia al tratamiento ⁵⁴⁻⁵⁵.

*Otro inhibidor de AKT es Triciribina (API-2), que inhibe la fosforilación de Akt2. El tratamiento con dosis bajas de Triciribina estimula la apoptosis en xenoinjertos con mutaciones Akt o PTEN constitutivamente activadas, pero no en tumores con baja actividad de Akt*⁵⁶.

La inhibición de mTOR disminuye la fosforilación de 4E-BP1 y S6K, que resulta en la inhibición de la síntesis de proteínas. Los inhibidores de rapamicina, everolimus y temsirolimus se están evaluando para el CECC en la etapa de la fase II en neoadyuvancia. Se han desarrollado nuevas dianas como CCI-779 y RAD-001 que se unen a la proteína de unión a FK506-, FKBP-12, que posteriormente se une e inhibe a mTOR. Se ha determinado recientemente que la rapamicina y RAD-001 mejoran el daño inducido por la radiación en la vasculatura del tumor *in vivo* a través de la inducción de la apoptosis de las células endoteliales vasculares⁵⁷, estos datos indican que la combinación de la inhibición de mTOR con quimioterapia o radiación podría ser un enfoque potencialmente eficaz en el tratamiento del cáncer.

7. CONCLUSIONES

La revisión de la bibliografía y el estudio previo de una muestra de pacientes permite obtener algunas consideraciones:

- 7.1.1. Se observó pérdida de PTEN en los CENS en 20 casos (69%) y en el 94% de los ITAC sin relación estadística con las variables clínico patológicas.
- 7.1.2. AKT presentó positividad en la IHQ en el 41% de CENS y en el 56% de los ITAC encontrándose significación estadística para la aparición de recidivas tumorales.
- 7.1.3. Para mTOR el 28% presentó positividad en los CENS (se encontró significación estadística para el escaso grado de diferenciación de los tumores) y el 37,5% para los ITAC.
- 7.1.4. Dada la frecuencia de alteraciones inmunohistoquímicas en la vía PTEN /AKT /mTOR en los tumores nasosinuales (CENS e ITAC) parece interesante un estudio molecular e IHQ más profundo y con una serie mayor.

7.2 PROYECTO FUTURO

Mediante el presente estudio hemos hecho una aproximación del papel de la vía PTEN/AKT/MTOR en carcinomas nasosinuales, aunque dicha relación no se pudo establecer claramente con la supervivencia de los casos estudiados debido al número reducido de la muestra estudiada. Sin embargo, se ha podido comprobar como esta ruta se activa con alta frecuencia en adenocarcinomas y carcinomas escamosos, y como se relaciona con un peor pronóstico.

En la vía de PTEN AKT/mTOR, se encuentran un gran número de genes implicados que producen pérdidas o sobreexpresión de estas proteínas por lo que el futuro proyecto de investigación se centrara en identificar las alteraciones inmunohistoquímicas y genéticas (ganancias, mutaciones..) a partir de un mayor tamaño muestral.

Por último, sería interesante identificar y profundizar en marcadores génicos o cromosómicos que se correlacionen con variables clínico – evolutivas para poder incorporarlos en un futuro al estudio rutinario

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Shah JP, Patel SG, Cavidad nasal y Senos Paranasales. En: Shah J. Cirugía y Oncología de Cabeza y Cuello, Madrid: Elsevier; 2004: 57-93.
2. García A, Cobeta I, Anatomía y fisiología de la nariz, los senos paranasales y laringofaringe. En: Cobeta I. Otorrinolaringología y Patología Cévicofacial, Barcelona: Ars Médica; 2003: 177-190.
3. Harvey R, Dalgorf D, et al. Sinonasal malignancies Chapter 10, American Journal of Rhinology & Allergy May-June 2013: 27(3)
4. Cabrerizo A, García A, Montserrat J, Orús C, Revisión de los carcinomas de senos paranasales, Acta Otorrinolaringol Esp. 2007;58(6):266-75
5. Stephan K, MDa, Gullane P, CM, MB, Witterick I, MD, Zweifel C, et al. Sinonasal Carcinomas: Epidemiology, Pathology, and Management. Neurosurg Clin N Am 2013 (24):39-49
6. Luce D, Leclerc A, Begin D, Demers PA, Gerin M, Orłowski E, et al. Sino- nasal cancer and occupational exposures: a pooled analysis of 12 case-control studies. Cancer Causes Control. 2002;13:147-57.
7. Alos L, Moyano S, Nadal A, et al. Human papillomaviruses are identified in a subgroup of sinonasal squamous cell carcinomas with favorable outcome. Cancer 2009;115:2701-9.
8. Hayashi T, Nonaka S, Bandoh N, et al. Treatment outcome of maxillary sinus squamous cell carcinoma. Cancer 2001;92:1495-503.
9. Tiwari R, Hardillo JA, Mehta D, et al. Squamous cell carcinoma of maxillary sinus. Head Neck 2000;22:164-9.
10. Stoll D, Bebar JB, Truilhe Y, et al. Ethmoid adenocarcinomas: retrospective study of 76 patients. Rev Laryngol Otol Rhinol 2002;122:21-9.
11. Gorelick J, Ross D, Marentette L, et al. Sinonasal undifferentiated carcinoma: case series and review of the literature. Neurosurgery 2000;47:750-4.
12. Cerilli LA, Holst VA, Brandwein MS, et al. Sinonasal undifferentiated carcinoma: immunohistochemical profile and lack of EBV association. Am J Surg Pathol 2001;25:156-63.
13. Ganly I, Patel SG, Singh B, et al. Craniofacial resection for malignant melanoma of the skull base. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2006;132:73-8.
14. Cordes B, Williams M, Tirado Y, et al. Molecular and phenotypic analysis of poorly

- differentiated sinonasal neoplasms: an integrated approach for early diagnosis and classification. *Hum Pathol* 2009;40:283–92.
15. Iezzoni JC, Mills SE. “Undifferentiated” small round cell tumors of the sinonasal tract. Differential diagnosis update. *Am J Clin Pathol* 2005;124: 110–21.
 16. Rosenthal DI, Barker JL Jr, El-Naggar AK, et al. Sinonasal malignancies with neuroendocrine differentiation: patterns of failure according to histologic phenotype. *Cancer* 2004;101:2567–73.
 17. Bhattacharyya N. Factors Affecting Survival in Maxillary Sinus Cancer. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003 Sep;61(9):1016-21.
 18. Basterra, J et al, *Tratado de Otorrinolaringología y Patología Cervicofacial*, Bacerolna, Editorial El Sevier 2009, Pág. 393-400
 19. Lund VJ, Howard DJ, Lloyd GA, et al. Magnetic resonance imaging of paranasal sinus tumours for craniofacial resection. *Head Neck* 1989;11:279–83.
 20. Tian L, Mo YX, Li YZ, Liu LZ, Fan Ws, Zhi Z., et al. Analysis of paranasal sinus invasion in 182 patients with nasopharyngeal carcinoma. 2013;47:3779-3782
 21. 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.
 22. Nicolai P, Battaglia P, Bignami M, Bolzoni A, Delù G, Khrais T, Lombardi D, Castelnovo P. Endoscopic surgery for malignant tumors of the sinonasal tract and adjacent skull base: a 10-year experience. *Am J Rhinol.* 2008; 22(3):308-16.
 23. Jeyakumar, A., T.M. Brickman, and T. Doerr, Review of nasopharyngeal carcinoma. *Ear Nose Throat J*, 2006. 85(3): 168-70, 172-3, 184.
 24. Llorente JL, Suárez N, Et al. *Avances, Límites y Retos de la Cirugía Endoscópica Nasosinusal* Cáp. 37. *Abordaje Endoscópico De Los Tumores Nasosinusales*. Madrid, Elsevier. 2013.
 25. Nag S, Tippin D, Grecula J, et al. Intraoperative high-dose-rate brachytherapy for paranasal sinus tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;58: 155–60.
 26. Blanch JL, Ruiz AM, Alos L, et al. Treatment of 125 sinonasal tumors: prognostic factors, outcome, and follow-up. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 131:973–6.
 27. Nishimura G, Tsukuda M, Mikami Y, et al. The efficacy and safety of concurrent chemoradiotherapy for maxillary sinus squamous cell carcinoma. *Auris, Nasus,*

- Larynx 2009;36:547–54.
28. Enepekides DJ. Sinonasal undifferentiated carcinoma: an update. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;13:222–5.
 29. Lionello M., Lovato A., Staffieri A., Blandamura S., Turato C., Giacomelli L., et al. The EGFR pathway - mTOR and larynx cancer angiogenesis *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2013
 30. Ene P., Popescu R., Voiculescu S., Scaunasu R., Popescu R., Raluca Grigore R. The Role of EGFR and HER2- Activating Mutations in Maxillary Sinus Cancer Inhibidores contra serina/treonina quinasas *Journal list maedica* vol 7 jan 2012
 31. Papa A, Wan, L., Bonora M., Salmena L., Sup Song M., Hobbs R., Cancer-Associated PTEN Mutants Act in a Dominant-Negative Manner to Suppress PTEN Protein Function *Cell* 157, April 2014 Elsevier Inc.
 32. Mutant PTEN in Cancer: Worse Than Nothing Nick L, Den Hertog J., Mutant PTEN in Cancer: Worse Than Nothing *Cell* 157, April 2014 Elsevier Inc.
 33. Manning B and Cantley L. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell* Jun 2007.
 34. Shimobayashi M., Hall M., et al. Making new contacts: the mtor network in metabolism and signalling crosstalk *nature reviews molecular cell biology*. 2014;15.
 35. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*. 2005 Feb 18;307(5712):1098-101.
 36. Ekrem Er , Mendoza M., Mackey A., Lucía E., Blenis M., et al. AKT facilitates trafficking and degradation of EGFR phosphorylation and activation by PIKfyve 2013 *Science Signaling* 6 (279)
 37. Lee D., Kuo H., Chen C., Hsu J., Chou C., Wei Y., et al. IKKb Suppression of TSC1 Links Inflammation and Tumor Angiogenesis via the mTOR Pathway *Cell* 2007; 130:440–455, Elsevier Inc.
 38. Stacker S., Williams S., Karnezis T., Shayan R., Fox S., Achen M., et al. Lymphangiogenesis and lymphatic vessel remodelling in cancer. *Nature reviews march* 2014. *cancer* :14
 39. Dreher T, Zentgraf H, Abel G, et al. Reduction of PTEN and p27kip1 expression correlates with itself Tumor Grade in Prostate cancer. *Parts Review in radical*

- prostatectomy and needle biopsy scam. *Virchows Arch.* 2004;444:509-517
40. Dai DL, Martinka M, Li G. Prognostic significance of activated Akt expression in melanoma. A clinicopathologic 292 cases. Study *J Clin Oncol* 2005; 23: 1473-1482
 41. Stokoe D, et al. PTEN *Curr. Biol.* 2001; 11
 42. Forgacs E, Biesterveld EJ, Sekido Y, et al. Mutation analysis of the PTEN/MMAC1 gene in lung cancer. *Oncogene.* 1998; 17:1557-1565
 43. Bertram J, Peacock JW, Fazli L, et al. Loss of PTEN itself Associated With Progression Toward Androgen Independence no. *Prostate.* 2006; 66 :895-902
 44. Perez-Tenorio G, Alkhorri L, Olsson B, et al. PIK3CA mutations and PTEN loss correlate se Scam Predictions Similar factors itself and not mutually exclusive in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13:3577-3584
 45. Saal LH, Johansson S, Holm K, et al. Poor Prognosis in carcinoma yes Associated With Gene expression signature of aberrant tumor suppressor activity of PTEN pathway. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 2007; 104 :7564-7569
 46. West KA, Castillo SS, Dennis PA . La activation de la vía PI3K/Akt y Resistencia quimioterapéutico Drogas Resist ACTUALIZACIONES. 2002; 5 :234-248
 47. Dai DL, Martinka M, Li G. Prognostic significance of activated Akt expression in melanoma. A clinicopathologic 292 cases. Study *J Clin Oncol* 2005; 23. :1473-1482
 48. Schliemann MG, Fahy BN, Ramsamooj R, Beckett L, Bold RJ. Incidence, Mechanism and forecast value does activate AKT in pancreas cancer. *Br J Cancer.* 2003; 89. :2110-2115
 49. Kreisberg JI, Malik SN, Prihoda TJ, et al Phosphorylation of Akt (Ser473) is an excellent predictor of poor clinical evolution in Prostate Cancer. *Cancer Res ..* 2004; 64:5232-5236
 50. Ermoian RP, Furniss CS, Lamborn KR, et al. Dysregulation of PTEN and protein kinase B yes Associates With glioma histology and patient survival. *Clin Cancer Res* 2002; 8. :1100-1106
 51. Min YH Cheong JW, Kim JY, et al. Cytoplasmic mislocalization of p27Kip1 protein is associated with constitutive phosphorylation of Akt or protein kinase B and poor prognosis in acute myelogenous leukemia. *Cancer Res* 2004; 64:5225-5231
 52. Kondapaka SB, SS Singh, Dasmahapatra GP, Sausville EA, Roy KK. Perifosine a novel alkylphospholipid, inhibits activation of protein kinase B. *Mol Cancer Ther.*

2003; 2: 1093-1103

53. Suh Y., Amelio I., Guerrero T., and Tavassoli M., Clinical up date on cáncer: molecular oncology of head and neck cáncer. Review. Cell Death and Disease 2014; 5; 018 -1038
54. Branquias JJ, Castillo SS, Zhang C, et al. Phosphatidylinositol ether lipid analogues that inhibit AKT Also ACTIVAN independently of stress kinase, p38alpha, through MKK3/6-independent Y-dependent mechanisms. J Biol Chem 2007; 282 :27020-27029.
55. Ramos J, Sirisawad M, Miller R, L. Naumovski motexafin gadolinium modulates levels of phosphorylated Akt and synergy With Inhibitors of Akt phosphorylation. Mol Cancer Ther. 2006; May :1176-1182
56. Yang L, Dan HC, DOM M, et al. The signaling of Akt / protein kinase B-2 inhibitor, non-selective small molecule inhibitor of Akt signaling scam Antitumor activity in cancer cells overexpressing AKT. Cancer Res. 2004; 64 :4394-4399
57. Shinohara ET, Cao C, Niermann K, et al. Improved lot DAMAGE Radiation on the tumor vasculature mTOR inhibitors. Oncogene. 2005; 24:5414-5422.