



Universidad de Oviedo



Universidad de Oviedo

Instituto Universitario de Oncología (IUOPA)

**EXPRESIÓN DE ANOCTAMINA-1 (TMEM16A/ANO1)
Y SU SIGNIFICADO CLÍNICO-PATOLÓGICO EN
CÁNCER EPIDERMÓIDE DE LARINGE**

Memoria de Proyecto de Fin de Máster en Biomedicina y
Oncología Molecular

Autor:
Pablo H. Albornoz Afanasiev

Director:
Juan P. Rodrigo Tapia

Tutor:
Juan P. Rodrigo Tapia

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Sección	Pág.
1. Resumen	6
2. Introducción	8
2.1 El cáncer como problema clínico	8
2.2 Generalidades de Anoctamina 1 (TMEM16A/ANO1)	9
2.3 Expresión y funciones de ANO1 en cáncer de cabeza y cuello	10
2.4 Hipótesis	11
2.5 Objetivos de la investigación	11
3. Materiales y Métodos	12
3.1 Selección de pacientes y muestras de tejidos	12
3.2 Construcción de las matrices de tejidos (Tissue Microarrays -TMA-)	14
3.3 Estudios de inmunohistoquímica	14
3.4 Análisis estadístico	14
4. Resultados	16
5. Discusión	20
7. Conclusiones	22
6. Referencias Bibliográficas	23

1. RESUMEN

El cáncer continúa siendo en la actualidad una entidad nosológica de gran impacto a nivel mundial, pese a los importantes avances hechos en materia de tratamiento, diagnóstico y conocimiento de las bases fisiopatológicas de la enfermedad. El campo de la biología molecular ha contribuido notablemente en el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas y ha permitido el entendimiento de complejos mecanismos biológicos que intervienen en el desarrollo y progresión del cáncer.

Recientemente, se logró la identificación de un nuevo canal de cloro regulado por flujos de calcio, que recibió el nombre de Anoctamina 1 (TMEM16A/ANO1) y que en condiciones fisiológicas se expresa discretamente en epitelios secretores. Se ha demostrado la sobreexpresión de este canal en múltiples neoplasias, entre las que se encuentran los tumores del Estroma Gastrointestinal (GIST) y el cáncer de cabeza y cuello. Los estudios realizados hasta la fecha sobre el papel de ANO1 en el cáncer, han podido evidenciar que su sobreexpresión pareciera estar relacionada con un aumento en la migración y capacidad invasiva de las células tumorales, al participar en el control del volumen intracelular e intervenir en las propiedades de adhesión y dispersión celular. Por otra parte, las investigaciones sobre la expresión de ANO1 y su significación clínica en cáncer de cabeza y cuello, han permitido obtener resultados que sugieren un aumento en la frecuencia de metástasis a distancia y estadios clínicos más avanzados en aquellos tumores que demuestran sobreexpresión del canal.

En nuestro estudio, hemos analizado la expresión de ANO1 y su significado clínico-patológico en carcinoma epidermoide de laringe. Para ello, se seleccionó una muestra tumoral de pacientes que habían sido intervenidos quirúrgicamente en el Hospital Universitario Central de Asturias y se efectuaron ensayos de inmunohistoquímica para determinar cualitativamente la expresión de ANO1. Posteriormente, se analizó la asociación entre la expresión del canal y las características clínico-patológicas de los pacientes estudiados.

Se evidenció la expresión de ANO1 en 11% de los tumores analizados, observándose que los pacientes positivos presentaban estadios clínicos más avanzados, a expensas de una mayor frecuencia de metástasis, y una menor supervivencia, a pesar de que no se pudieron encontrar diferencias estadísticamente significativas en las comparaciones realizadas entre el grupo de pacientes positivos y negativos.

Sin embargo, estos resultados pudieron estar influenciados por la escasa muestra de pacientes que fueron positivos para ANO1 y por factores relacionados a la amplificación y sobreexpresión de otras proteínas pertenecientes al locus 11q13, del cual forma parte ANO1 y que también pueden participar en el desarrollo de tumores más invasivos y estadios clínicos más avanzados.

En base a los resultados obtenidos y pese a la falta de significación estadística de estos, podemos concluir que la expresión de ANO1 en nuestra investigación fue baja y que su expresión se asoció con un pronóstico clínico más desfavorable, en concordancia con los resultados publicados hasta la fecha por otros autores.

2.- INTRODUCCIÓN

2.1.- El cáncer como problema clínico

Los importantes avances hechos durante la última década, en relación a la caracterización molecular del cáncer, han sido fundamentales para entender las bases fisiopatológicas y aspectos esenciales en el funcionamiento biológico de los tumores. En este sentido, se han descrito hasta la fecha, múltiples componentes moleculares que son necesarios para la sustentabilidad del cáncer y están asociados en algunos casos, a su capacidad de proliferación, invasión y gran poder de adaptación a situaciones de estrés celular.

Muchos de estos hallazgos, han sido y son la piedra angular de innovadores tratamientos, así como de herramientas diagnósticas y factores pronóstico, que son utilizados en la actualidad y que han cambiado radicalmente la forma como se conceptualiza y se aborda clínicamente el cáncer. No obstante, el cáncer continúa siendo una enfermedad de gran importancia a nivel mundial, con una incidencia para el año 2012 de aproximadamente 14 millones de casos y un total de 8.2 millones de muertes¹. Se espera que la incidencia global aumente significativamente en las próximas dos décadas, con una proyección de hasta 22 millones de casos anuales¹.

El cáncer de cabeza y cuello, corresponde a un importante grupo de tumores, de distintas localizaciones y que en conjunto representan aproximadamente un 5-6% del total de casos anuales de cáncer^{2,3,4}. Su incidencia, así como el tipo de tumor, pueden variar considerablemente según la región estudiada². Sin embargo, su interés clínico no solo radica en la proporción anual de casos, sino también en el impacto que produce en la salud y la calidad de vida del individuo, teniendo en cuenta las posibles alteraciones en la función respiratoria, deglutoria y/o fonatoria, así como su desfavorable pronóstico global.

El cáncer de laringe, es responsable de aproximadamente un 25% del total de tumores en cabeza y cuello². En el 2008 se estimó un total de 81900 muertes a nivel mundial, de las cuales cerca de 12700 ocurrieron dentro de la Unión Europea¹. La mayoría de los tumores de laringe presentan

características anatomopatológicas compatibles con carcinoma epidermoide (90-95%) y por lo general están asociados a factores de riesgo bien definidos como el tabaco, el alcohol y la infección por virus del papiloma humano (VPH), teniendo además una prevalencia predominante en el sexo masculino.

2.2.- Generalidades de Anoctamina 1 (TMEM16A/Ano1)

Los canales de cloro, han demostrado ser una parte fundamental en la fisiología de epitelios secretores y en la génesis de entidades patológicas de gran importancia clínica. Tal es el caso del canal de Regulación de Conductancia Transmembrana de la Fibrosis Quística, conocido por sus siglas en inglés como CFTR, el cual participa en el transporte activo de cloro en células secretoras y cuyo defecto es el responsable de la enfermedad por la que recibe su nombre⁵.

En el año 2004, investigaciones realizadas en el campo de la bioinformática permitieron la identificación de un nuevo grupo de genes, denominado inicialmente TMEM16⁶. Posteriormente en el 2008, tres grupos de investigación reportaron la existencia de dos proteínas transmembrana que se incluyeron en el grupo de TMEM16, denominadas TMEM16A y TMEM16B, las cuales estaban presentes en células con un aparente incremento de los flujos de cloro^{6,7,8}. Este hecho fue confirmado posteriormente a través de múltiples estudios y hoy en día, se considera que TMEM16A y TMEM16B, son canales de cloro, localizados en la membrana plasmática y que se activan principalmente por gradientes de calcio. No obstante, la mayoría de sus funciones celulares siguen siendo desconocidas en la actualidad.

TMEM16A/Ano1 pertenece a una familia de 10 proteínas, con una estructura común de ocho dominios hidrofóbicos transmembrana y dominios citosólicos amino y carboxi-terminales⁷. La secuencia codificante de esta proteína se encuentra en el locus cromosómico 11q13⁹, el cual tiene especial interés en el estudio del cáncer, porque se ha demostrado estar amplificado en gran variedad de tumores, incluyendo tumores de cabeza y cuello. En este sentido, el canal ha recibido varios nombres en relación al tipo de tumor en el cual ha sido identificado, como por ejemplo ORAOV2 por su sobre-expresión

en cáncer oral y DOG1 (Discovered on GIST) por su marcada presencia en células de Tumor Estromal Gastrointestinal (GIST)^{6,7,8}.

La expresión de Ano1, se ha estudiado fundamentalmente en ratones, en los cuales se ha podido evidenciar su expresión en células de epitelio secretor, fundamentalmente en vías respiratorias, tracto intestinal, páncreas y glándula mamaria, aunque también se ha demostrado su expresión en otros tejidos no epiteliales, como en algunas células de músculo liso y neuronas sensoriales^{6,7,8}. Ensayos con ratones knock-out para Ano1, han demostrado importantes defectos en el desarrollo de la vía aérea, funcionamiento intestinal y el mecanismo de transporte iónico en diferentes sistemas epiteliales, llegando a causar la muerte de los animales estudiados en corto tiempo después del nacimiento^{6,7,8}. En los humanos, la expresión del canal ha sido confirmada en múltiples de tejidos, siendo predominante en el epitelio respiratorio y gastrointestinal y funcionando a su vez como marcador de las células marcapasos de Cajal del intestino^{6,7,8}.

2.3.- Expresión y funciones de Ano1 en cáncer de cabeza y cuello

Estudios realizados en cáncer de cabeza y cuello, han evidenciado que la amplificación del gen codificante para Ano1 puede estar presente en hasta un 16,5% de los tumores de estirpe epidermoide y que su distribución puede variar considerablemente en relación a la localización del tumor¹⁰, estando presente en aproximadamente un 6% de los tumores de cavidad oral y en hasta 57% de los tumores de hipofaringe¹⁰. De forma similar, la expresión de la proteína varía desde un 4-5% en tumores de cavidad oral hasta un 13% en tumores de laringe y un 19% de hipofaringe¹⁰.

Adicionalmente, se ha demostrado que Ano1 podría participar en el control de la proliferación celular a través de la activación de la vía ERK 1/2 y la inducción de Ciclina D1^{10,11}, favoreciendo a su vez la migración celular y la metástasis, como resultado de alteraciones en la regulación del volumen y simetría celular. En contraste, el silenciamiento del gen codificante para Ano1 o el uso de bloqueadores selectivos de canales de cloro, producen una disminución en la movilidad celular y de su capacidad para migrar. Por

consiguiente, se ha planteado la expresión de este canal, como un marcador de metástasis y un factor asociado a peor pronóstico vital^{10,11}.

2.4 Hipótesis

En base a la información disponible en la actualidad sobre las implicaciones clínicas y patológicas de la expresión de ANO1 en cáncer de cabeza y cuello, se puede establecer la hipótesis de que su expresión en tumores de laringe, se asocia a estadios clínicos más avanzados y peor pronóstico global, como resultado de una mayor probabilidad de generar metástasis a distancia.

2.5 Objetivos de la investigación

Teniendo en cuenta los antecedentes y el interés en establecer el significado clínico y patológico de la expresión de ANO1 en el cáncer de laringe, se han planteado los siguientes objetivos en nuestra investigación:

- 1.- Analizar la expresión de ANO1 en una serie de carcinomas epidermoides de laringe.
- 2.- Determinar la correlación entre la expresión de ANO1 y las variables clínico-patológicas de los pacientes estudiados.
- 3.- Establecer el valor pronóstico de la expresión de ANO1.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Selección de pacientes y muestras de tejidos.

Se recolectaron muestras tumorales conservadas en bloques de parafina de 68 pacientes con el diagnóstico de carcinoma epidermoide de laringe, los cuales fueron intervenidos quirúrgicamente para la extirpación del tumor en el Hospital Universitario Central de Asturias, durante el periodo comprendido entre 1990 y 2009. La recolección de muestras se realizó, siguiendo las normas y recomendaciones del comité ético de la institución, entre las que se incluyó la firma del consentimiento informado por parte de todos los pacientes. El análisis y el diagnóstico anatomopatológico fueron realizados por un patólogo experto, perteneciente al Servicio de Anatomía Patológica del hospital.

Ninguno de los pacientes seleccionados recibió tratamiento previo a la cirugía y todos tenían un único tumor primario, con márgenes quirúrgicos libres de enfermedad a nivel microscópico. El grupo de pacientes estudiados estuvo compuesto por 66 hombres (97,1%) y 2 mujeres (2,9%) (Tabla 1), con edades comprendidas entre 36 y 86 años y una media de 61 años. En cuanto a los hábitos tóxicos referidos, un 75,5% reportaba algún grado de consumo de alcohol, siendo este mayor a 50 gr./día, en un 45,6% del total de pacientes estudiados (Tabla 1). Por otra parte y en relación al consumo de tabaco, se reportó una media de 49,85 paquetes-año consumidos, con una máxima de hasta 120 paquetes-año.

El estadio de los tumores se determinó utilizando la clasificación TNM, desarrollada por la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC). En este sentido, un 50% de los pacientes estudiados presentaban estadio IV al momento de la cirugía y sólo un 19,1%, se encontraban en estadios iniciales de la enfermedad (I-II) (Tabla 1).

Adicionalmente, se determinó el grado de diferenciación tumoral, utilizando la clasificación de Broders, reportándose que un 36,8% de los tumores seleccionados eran bien diferenciados, un 45,6% eran moderadamente diferenciados y un 17,6% eran pobremente diferenciados (Tabla 1).

Tabla 1. Características globales de los pacientes incluidos en el estudio.

Característica	n	%
Sexo		
Hombres	66	97,1
Mujeres	2	2,9
Alcohol		
No	16	23,5
<50 gr./día	21	30,9
50-100gr./día	16	23,5
>100 gr./día	15	22,1
Clasificación T		
T1	14	20,6
T2	7	10,3
T3	27	39,7
T4	20	29,4
Clasificación N		
N0	33	48,5
N1-3	35	51,5
Estadio tumoral		
I-II	13	19,1
III	21	30,9
IV	34	50,0
Diferenciación		
Buena	25	36,8
Moderada	31	45,6
Pobre	12	17,6
Recurrencia		
No	36	52,9
Si	32	47,1

3.2 Construcción de las matrices de tejidos (Tissue Microarrays –TMA-)

Para la construcción de los TMA, se seleccionaron tres áreas morfológicamente representativas de cada bloque tumoral de parafina. Se realizaron 3 perforaciones, utilizando un perforador estéril (Kai Europe GMBH, Solingen, Alemania) único para cada bloque, obteniendo cilindros de 1mm. Adicionalmente, cada TMA incluyó tres cilindros de epitelio normal, como control negativo interno.

3.3 Estudios de inmunohistoquímica.

Para determinar cualitativamente la expresión de ANO1, se efectuaron estudios de inmunohistoquímica. Los tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina, fueron cortados en secciones de 3 μm y secados en láminas portaobjetos tipo Flex IHC (Dako). Las secciones se desparafinaron utilizando xileno y se hidrataron en agua mediante gradientes de alcohol. La recuperación antigénica se realizó utilizando la solución EnVision Flex Target Retrieval a pH elevado. La tinción se efectuó a temperatura ambiente, en una estación de tinción automática (Dako Autostainer Plus) con anticuerpo policlonal de ratón anti-TMEM16A (Abcam No. ab53212), empleando una dilución de 1:500 y utilizando el sistema de visualización Dako EnVision Flex Plus. Se utilizó un sistema de evaluación semicuantitativa, que se basó en la intensidad de la tinción para TMEM16A/ANO1, categorizada en negativa (0), débil-moderada (1+) y fuerte (2+) y medida por dos observadores independientes que no tenían conocimiento previo de las características clínicas de los pacientes. Todas las puntuaciones mayores o iguales a 1 fueron consideradas como positivas para la expresión de ANO1.

3.4 Análisis estadístico

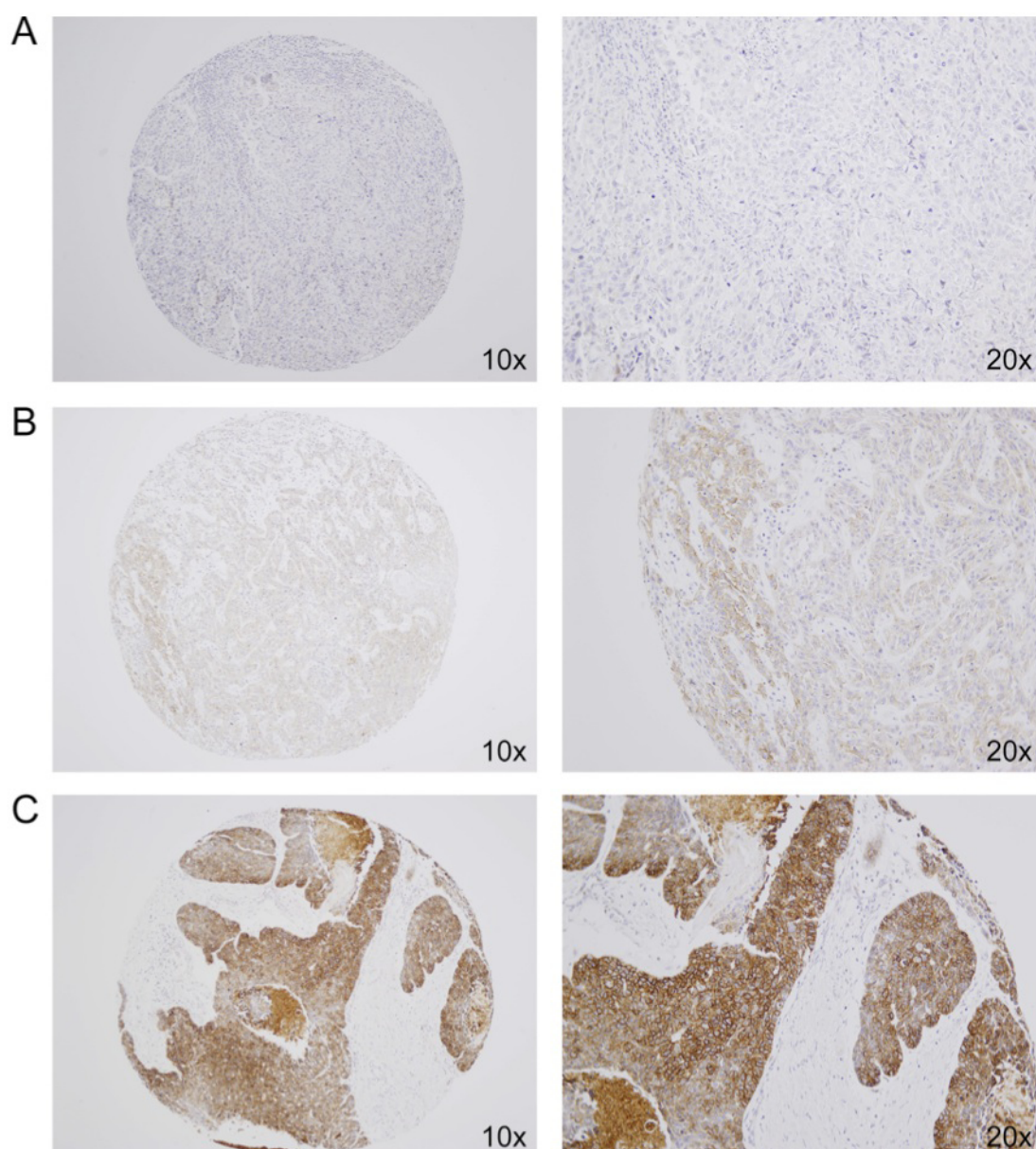
Para la comparación de variables categóricas se utilizó el test de Chi Cuadrado y la prueba de T de Student para variables continuas. Las curvas de supervivencia fueron calculadas utilizando el método del límite de producto de Kaplan-Meier. Las diferencias en términos de supervivencia fueron analizadas utilizando el método log-rank. Se consideraron como

estadísticamente significativos aquellos valores de p , menores o iguales a 0,05.

4.- RESULTADOS

Los estudios de inmunohistoquímica efectuados para determinar la expresión de ANO1, fueron considerados como válidos en 57 pacientes (83,8%) y de estos, sólo 6 mostraron positividad para el canal, lo que representa un 10,52% de expresión, considerando sólo los pacientes válidos y un 8,82% de expresión si se considera la muestra global. La figura 1 muestra ejemplos de tinción positiva y negativa para ANO1.

Figura 1. Expresión de ANO1 en cortes histológicos con tinción inmunohistoquímica utilizando el sistema EnVision®. A) Tinción negativa; B) Tinción débil; C) Tinción Fuerte.



Se estudió el significado clínico de la expresión de ANO1, mediante su comparación con el grado de T, N y el estadio resultante de la escala TNM, también se comparó la expresión del canal con la recurrencia tumoral y la muerte relacionada con el tumor, y se elaboró una curva de supervivencia de Kaplan-Meier en base a los datos obtenidos.

De esta forma, un 67% de los pacientes positivos tenían una clasificación T4, presentaban metástasis ganglionares representadas por una clasificación de N mayor o igual a 1 y fueron categorizados en el estadio 4 de la enfermedad, frente a un 31%, 53%, y 53% de los casos negativos, respectivamente, no siendo las diferencias estadísticamente significativas. Adicionalmente, se presentó recurrencia tumoral en un 67% de los pacientes positivos y en un 53% de los pacientes negativos, no siendo tampoco estas diferencias estadísticamente significativas (Tabla 2).

Por otra parte, la muerte relacionada con el tumor fue mayor en los pacientes positivos para ANO1: ocurrió en un 67% de los pacientes cuyos tumores mostraron positividad para ANO1 y en un 43% de los negativos para la expresión del canal, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla 3).

Al comparar la supervivencia de los pacientes positivos y negativos para la expresión de ANO1 se pudo evidenciar que los pacientes cuyos tumores expresaban el canal, tenían una peor supervivencia, presentando una media de 36,3 meses, en contraste con la media de 60 meses de supervivencia en pacientes negativos para ANO1, aunque las diferencias tampoco alcanzaron significación estadística ($P=0,361$; Figura 2).

Tabla 2. Relación de la expresión de ANO1 con las características clínicas y patológicas de los pacientes con estudios inmunohistoquímicos válidos.

Característica	Nº de casos (%)	Expresión de ANO1 (%)	P
Clasificación T			
T1-T2	13 (23%)	2 (33%)	0,080
T3	24 (42%)	0 (0%)	
T4	20 (35%)	4 (67%)	
Clasificación N			
N0	26 (46%)	2 (33%)	0,678
N1-3	31 (54%)	4 (67%)	
Estadio tumoral			
I-II	7 (12%)	2 (33%)	0,890
III	19 (33%)	0 (0%)	
IV	31 (54%)	4 (67%)	
Recurrencia			
No	26 (53%)	2 (33%)	0,678
Si	31(47%)	4 (67%)	

Tabla 3. Relación de pacientes con muerte asociada al tumor y expresión tumoral de ANO1.

	Positivos ANO1 (%)	Negativos ANO1 (%)	P
No. de muertes por tumor	4 (67)	22 (43)	0,396
No. de vivos sin tumor	2 (33)	29 (57)	
Total	6 (100)	51 (100)	



Universidad de Oviedo



Universidad de Oviedo

Instituto Universitario de Oncología (IUOPA)

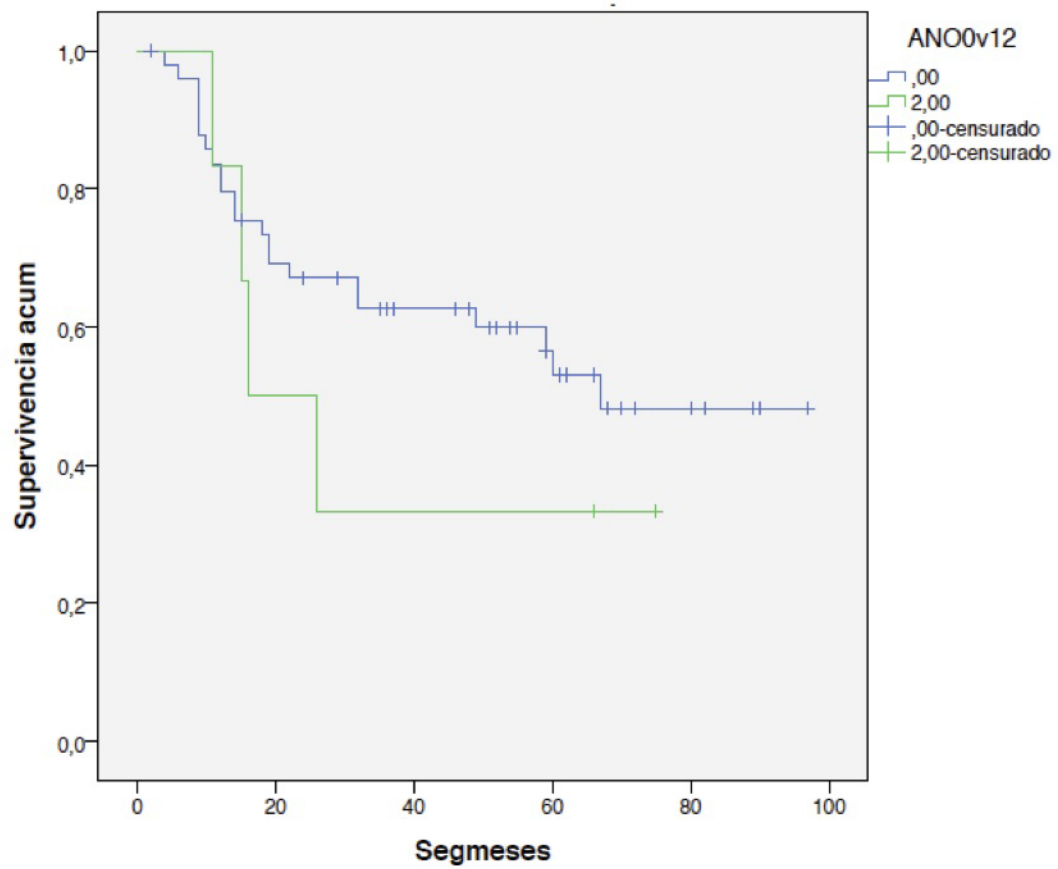
**EXPRESIÓN DE ANOCTAMINA-1 (TMEM16A/ANO1)
Y SU SIGNIFICADO CLÍNICO-PATOLÓGICO EN
CÁNCER EPIDERMÓIDE DE LARINGE**

Memoria de Proyecto de Fin de Máster en Biomedicina y
Oncología Molecular

Pablo H. Albornoz Afanasiev

Junio, 2014

Figura 2. Curva de supervivencia de Kaplan-Meier según la expresión tumoral de ANO1; en verde los casos positivos para ANO1.



5. DISCUSIÓN

Los estudios realizados hasta la fecha sobre la expresión de ANO1 y su implicación en el cáncer de cabeza y cuello son escasos (únicamente hay dos estudios publicados), pero han permitido obtener algunos datos que sugieren un peor pronóstico y una mayor probabilidad de metástasis, en aquellos tumores con sobreexpresión del canal^{10,11}. Esta mayor probabilidad de generar metástasis a distancia, pareciera estar relacionada con el papel que tiene ANO1 en el control del volumen intracelular, a través de la regulación de los flujos de cloro y el desarrollo de cambios morfológicos que favorecen la migración celular^{10,11}, así como su participación en la capacidad de adherencia, desprendimiento y dispersión de las células¹¹.

Ruiz y col., estudiaron la expresión de ANO1 en cáncer de cabeza y cuello y su correlación con el pronóstico vital de la enfermedad, evidenciando la expresión del canal en el 13% de los 31 tumores de laringe analizados mediante inmunohistoquímica¹⁰. Adicionalmente, se demostró que la expresión de ANO1 se asociaba a una menor supervivencia, con una media de 23 meses, contrastando claramente con la media de 56 meses en pacientes negativos¹⁰.

En nuestro estudio obtuvimos resultados similares, evidenciando la expresión del canal en un 10,56% de los pacientes evaluables mediante inmunohistoquímica. También observamos que los pacientes positivos, presentaron un estadio clínico más avanzado, mayor número de recurrencias y un tiempo de supervivencia inferior en comparación con los pacientes negativos. Sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas, lo cual podría deberse al escaso número de pacientes positivos.

Ante estos datos y teniendo en cuenta los estudios previos que reportan resultados similares, existe la posibilidad de que la expresión de ANO1 pueda estar asociada a estadios clínicos más avanzados y por ende una mayor probabilidad de muerte relacionada con el tumor, pero la falta de significación estadística de nuestros resultados, impiden realizar conclusiones sólidas al respecto.

Los ensayos funcionales realizados por Ayoub y col, en líneas celulares de carcinoma epidermoide (Hep-2, SCC-25), permitieron demostrar que la expresión de ANO1 no se relacionaba con un incremento en la proliferación celular, pero sí estaba asociada a un aumento de la migración y capacidad invasiva de estas¹¹. Por otra parte, evidenciaron que la amplificación y la expresión de genes localizados en el locus 11q13, entre los que se incluye ANO1, se relacionaba positivamente con el desarrollo de metástasis a distancia¹¹.

En la actualidad, existe evidencia consistente sobre la relación entre la amplificación de 11q13 y un peor pronóstico clínico en tumores de cabeza y cuello^{12,13,14}. Por tanto, es necesario tener en consideración, que la sobreexpresión de ANO1 puede acompañarse de la expresión aumentada de otras proteínas, como por ejemplo CTTN (Cortactina), TAOS1, FGF19, FADD, PPFIA1 y CCND1 (Ciclina D1), cuyos genes están localizados en el mismo amplicón^{12,13} y las cuales podrían colaborar en el desarrollo de tumores más invasivos o ser propiamente las responsables de los hallazgos clínicos y patológicos obtenidos, como ha sido demostrado en otros estudios^{12,13,14,15}.

Algunos autores han planteado la hipótesis de que el amplicón entero podría funcionar como la unidad que determina los efectos negativos observados¹² y en consecuencia, la expresión individual de los genes contenidos en el amplicón, podría carecer de significado clínico y ser la razón por la cual no se evidenció un peor pronóstico y un estadio clínico más avanzado en la totalidad de los casos positivos de nuestro estudio. En este sentido, no es posible afirmar que la sobreexpresión de ANO1 condiciona por sí sola a un aumento en la probabilidad de metástasis y se relaciona con estadios tumorales más avanzados, al menos con los resultados obtenidos en nuestra investigación.

Consideramos que son necesarios estudios adicionales que determinen de forma conjunta, el grado de expresión de ANO1 y otras genes relacionados con 11q13, así como la frecuencia de la amplificación de este segmento y su correlación clínico-patológica. También sería de utilidad, realizar más

ensayos que permitan determinar de forma concluyente y apoyen las hallazgos de estudios previos sobre el significado funcional de la sobreexpresión del ANO1.

Finalmente, los datos obtenidos en esta investigación, no permiten realizar afirmaciones sobre el papel de la expresión de ANO1 en las características clínicas y anatomopatológicas de los pacientes con cáncer de laringe, ni su significado en el pronóstico vital. Sin embargo, nuestros resultados pueden ayudar en la génesis de nuevas hipótesis y en el desarrollo de nuevos estudios que permitan aclarar el rol de ANO1 en el cáncer de laringe, teniendo en cuenta que en la actualidad se dispone de información limitada al respecto y es un campo de investigación que aún queda por explorar a fondo.

6. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en nuestro estudio y pese a la falta de significación estadística de éstos, podemos concluir que:

- 1.- La expresión de ANO1 en carcinoma epidermoide de laringe fue poco frecuente.
- 2.- La expresión de ANO1 en carcinoma epidermoide de laringe se asoció a estadios tumorales más avanzados y una mayor incidencia de metástasis y recurrencias tumorales, aunque sin diferencias significativas.
- 3.- Los pacientes con expresión positiva de ANO1 presentaban menor supervivencia, no alcanzando las diferencias significación estadística.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. International Agency for Research on Cancer. World Cancer Report 2014. Lyon, Francia: IARC; 2014.
2. Dobrossy L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer Metastasis Rev.* 2005; 24:9-17.
3. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet.* 2008; 371:1695-709.
4. Walden M, Aygun N. Head and Neck Cancer. *Semin Roentgenol.* 2013; 48:75-86.
5. Lubamba B, Dhooghe B, Noel S, Leal T. Cystic fibrosis: Insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy. *Clin Biochem.* 2012; 45: 1132-1144.
6. Duran C, Hartzell HC. Physiological roles and diseases of tmem16/anoctamin proteins: are they all chloride channels?. *Acta Pharmacologica Sinica.* 2011; 32:685-692.
7. Scuderi P, Sondo E, Ferrera L, Galiotta LV. The anoctamin family: TMEM16A and TMEM16B as calcium-activated chloride channels. *Exp Physiol.* 2012; 97:177-183.
8. Kunzelmann K, Schreiber R, Kmit A, Jantarajit W, Martins JR, Faria D, Kongsuphol P, Ousingsawat J, Tian Y. Expression and function of epithelial anoctamins. *Exp Physiol.* 2012; 97:184-192.
9. Katoh M, Katoh M. Characterization of human TMEM16G gene in silico. *Int J Mol Med.* 2004;14:759-764.
10. Ruiz C, Martins JR, Rudin F, Schneider S, Dietsche T, Fischer C, Tornillo L, Terracciano LM, Schreiber R, Bubendorf L, Kunzelmann K. Enhanced Expression of ANO1 in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Causes Cell Migration and Correlates with Poor Prognosis. *PLoS ONE.* 2012; 7: e43265.
11. Ayoub C, Wasylyk C, Li Y, Thomas E, Marisa L, Robé A, Roux M, Abecassis J, de Reyniès A, Wasylyk B, ANO1 amplification and expression in HNSCC with a high propensity for future distant metastasis and its functions in HNSCC cell lines. *Br J Cancer.* 2010; 103:715-726.

12. Gibcus JH, Kok K, Menkema L, Hermsen MA, Mastik M, Kluin PM, van der Wal JE, Schuuring E. High-resolution mapping identifies a commonly amplified 11q13.3 region containing multiple genes flanked by segmental duplications. *Hum Genet.* 2007; 121:187-201.
13. Pattje WJ, Melchers LJ, Slagter-Menkema L, Mastik MF, Schrijvers ML, Gibcus H, Kluin PM, Hoegen-Chouvalova O, van der Laan B, Roodenburg JL, van der Wal JE, Schuuring E, Langendijk JA. FADD expression is associated with regional and distant metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Histopathol.* 2013; 63:263-270.
14. Rodrigo JP, Gonzalez MV, Lazo PS, Ramos S, Coto E, Alvarez I, Garcia LA, Suarez C. Genetic alterations in squamous cell carcinomas of the hypopharynx with correlations to clinicopathological features. *Oral Oncol.* 2002; 38:357-363.
15. Rodrigo JP, Garcia-Carracedo D, Garcia LA, Menendez S, Allonca E, Gonzalez MV, Fresno MF, Suarez C, Garcia-Pedrero JM. Distinctive clinicopathological associations of amplification of the cortactin gene at 11q13 in head and neck squamous cell carcinomas. *J Pathol.* 2009; 217:516-523.