



Universidad de
Oviedo

Alteraciones genético-moleculares en el carcinoma
epidermoide de oído externo.

Investigación en Cirugía.

Rafael Sánchez Fernández.



Universidad de
Oviedo

Tesis Doctoral.

Alteraciones genético-moleculares en el carcinoma
epidermoide de oído externo.

Programa de doctorado: Investigación en Cirugía.

Autor: Rafael Sánchez Fernández.

Directores: Dr. José Luis Llorente.

Dr. Mario Hermsen.



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Alteraciones genético-moleculares en el carcinoma epidermoide de oído externo.	Inglés: Genetic and molecular alterations in squamous cell carcinoma of the external ear.
2.- Autor	
Nombre: Rafael Sánchez Fernández	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: Investigación en Cirugía	
Órgano responsable: Departamento de Cirugía y especialidades M-Q	

RESUMEN (en español)

El oído externo incluye el pabellón auricular y el conducto auditivo externo (CAE). El carcinoma epidermoide del CAE (CEACE) es un tumor muy infrecuente que por su forma de presentación suele ser diagnosticado en estadios avanzados y conlleva un mal pronóstico. El carcinoma epidermoide de pabellón auricular (CEPA) es un tipo concreto de carcinoma epidermoide de piel que por su localización está considerado de alto riesgo dado que presenta una mayor frecuencia de recidiva y metástasis. Planteamos la hipótesis de que debería haber diferencias genético-moleculares entre ambas localizaciones, aunque son histológicamente indistinguibles, debido a que tienen una patogenia diferente, como la exposición al sol en el pabellón auricular o la radioterapia previa en el CAE. Estudiamos 39 casos de CECAE y 36 casos de CEPA. Determinamos las alteraciones en el número de copias génicas en el tejido tumoral mediante *multiplex ligation-dependent probe amplification*. La expresión de las proteínas p16, EGFR, PTEN y p53 se estudió mediante inmunohistoquímica. Observamos una mayor pérdida de expresión de p16 en los CECAE (90% de los casos contra 41% en los CEPA). La sobreexpresión de EGFR fue más frecuente en los CEPA (91% de los casos contra 67% en los CECAE). Los CECAE que habían recibido radioterapia previa en el área de cabeza y cuello presentaron una menor sobreexpresión de EGFR que el resto de los CECAE (29% contra 76%). La sobreexpresión de p53 fue alta en ambos tumores pero fue más frecuente en los CEPA que en los CECAE (82% contra 66%), probablemente como consecuencia de la exposición a la radiación solar. La pérdida de PTEN, tanto en el número de copias génicas como en la expresión proteica, parece relacionarse con tumores menos agresivos en ambas localizaciones.

RESUMEN (en Inglés)

The external ear includes both the pinna and the external auditory canal (EAC). Squamous cell carcinoma of the external auditory canal (SCCEAC) is a very rare tumor. Because of its clinical presentation it is usually diagnosed in an advanced stage and carries a bad prognosis. Squamous cell carcinoma of the pinna (SCCP) is considered a high-risk skin squamous cell carcinoma that, because of its specific localization, frequently presents recurrence and metastases. We hypothesize that these two tumors, although histologically the same, carry different genetic alterations, due to differences in etiology, such as sun exposure in the pinna and previous radiotherapy in the EAC.



We studied 39 cases of SCCEAC and 36 cases of SCCP. Alterations in the number of gene copies in tumor tissue were studied by multiple ligation-dependent probe amplification. Protein expression of p16, EGFR, PTEN and p53 was studied by immunohistochemistry.

We observed a statistically significant higher loss of expression of p16 in SCCEAC (90% of cases versus 41% in SCCP). Overexpression of EGFR was more frequent in SCCP (91% of cases versus 67% in SCCEAC). SCCEAC patients who had previously received radiotherapy in the head and neck area presented less frequent over-expression of EGFR than the rest of SCCEAC (29% versus 76%). P53 overexpression was frequent in both tumors but was observed more in SCCEAC than in EAC (82% contra 66%), probably triggered by sun exposure. Loss of PTEN, either gene copy number or protein expression, appears related to less aggressive tumors in both locations.

SR. DIRECTOR DE DEPARTAMENTO DE _____ /
SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN _____

Agradecimientos

Es evidente que cualquier logro en la vida deja detrás de sí un reguero de pequeñas y grandes ayudas sin las que las cosas habrían sido totalmente diferentes. Esta tesis no sólo no es una excepción, sino que es un ejemplo de lo necesario que es contar con la colaboración de la gente que te rodea.

Las primeras personas a las que quiero agradecer de la forma más sincera son mis directores en este trabajo, el Dr. José Luis Llorente y el Dr. Mario Hermsen. Su orientación, ayuda y dedicación han sido ejemplares y sin ellos simplemente no habría podido realizar este trabajo. Gracias por vuestra paciencia, que sólo se comprende desde la amistad, y por aceptar deportivamente mis defectos como doctorando.

Recuerdo cuando conocí al Dr. Carlos Suárez. Entre montañas de papeles, libros y pruebas de imagen apiladas en su mesa ya nos avanzó en ese primer encuentro sus planes académicos para nosotros, los residentes entrantes. A él le debo un agradecimiento muy especial porque fue el que me empujó a iniciar este proceso y porque sin duda fue para mi y para muchos otros una especie de “padre” profesional.

Al Dr. Juan Pablo Rodrigo por ser mi principal “asesor externo”, profesor de SPSS y un gran compañero.

A Albert Pujol y sus compañeros de servicio por su colaboración realizada desde el Hospital de Sant Pau de Barcelona (y por los grandes momentos extra hospitalarios).

En el complejo ecosistema de un servicio relativamente pequeño como el nuestro son necesarias otro tipo de ayudas, más indirectas pero importantes. Es decir; si vas al laboratorio alguien tendrá que coger el busca y si vas a revisar historias al archivo alguien tendrá que ir a pasar *las primeras* por ti. Por ello quiero dar las gracias a todos los integrantes del servicio de ORL del HUCA, especialmente a los residentes con los que coincidí en su momento, ya que fueron siempre un apoyo fundamental. De entre estos residentes quiero acordarme especialmente de Sergio Obeso y Gonzalo Mancebo, grandes amigos que hicieron llevaderos los malos momentos y mejores los buenos.

Quiero agradecer de forma especial a la gente que trabaja o ha trabajado en el IUOPA. Siempre estuvieron dispuestos a colaborar conmigo, me facilitaron la posibilidad de “rascar” la superficie de la biología molecular y realizaron una labor que ha sido fundamental para la finalización de esta tesis. De ellos quisiera destacar a la Dra. Marta Alonso, Dra. M^a Soledad Fernández, Eva Allonca y Sira Potes.

Y como hay vida fuera del hospital, hay mucha gente con la que uno está en deuda más allá de sus límites. Cuando llegué a Oviedo tuve la gran suerte de hacer muy buenos amigos (a los que no voy a nombrar porque son muchos y me da miedo que se me despiste alguno). A ellos les debo grandes momentos, viajes, cenas, póker, algunas tonterías y alguna que otra cosa más seria. Les doy las gracias porque, parafraseando a un famoso cantautor (aunque adaptando la frase a la seriedad que exige este contexto), “no todo va a ser *trabajar*”.

A mis padres se lo debo todo por lo que no hay palabras para agradecer lo que hicieron por mi. Lo más obvio es que gracias a su estímulo y soporte he podido llevar mi trayectoria académica hasta aquí, aunque, con mucho, lo más importante para mi ha sido el amor y apoyo que siempre me han dado. Gracias a ellos me he convertido, con lo bueno y con lo malo, en la persona que soy hoy.

Quiero agradecer también a mi amigo y hermano, el Dr. Pablo Sánchez, por aportarme una visión diferente, por sus consejos y por haber sido para mi un ejemplo desde pequeño.

Recién llegado a Oviedo para empezar mi residencia conocí a Irene. Además de la felicidad que me ha dado todos estos años y, sobretodo, de haber formado junto a mi nuestra propia familia, a ella tengo mucho que agradecerle desde varios puntos de vista. Si bien su apoyo, ánimo y cariño han sido enormes (siendo ella, esto se da por descontado), sin su ayuda y sacrificio yo no habría conseguido sacar el tiempo necesario para hacer esta tesis. Ella ha trabajado tantas horas como yo para que se haya podido hacer realidad.

Por último quiero dar las gracias a una persona muy especial. No me ha ayudado en este trabajo ni me ha puesto las cosas más fáciles en los momentos complicados. Su contribución ha sido indirecta pero definitiva. Quiero darle las gracias a Marc, mi hijo, por ser el estímulo que me ha empujado a terminar este trabajo. Puede que él no llegue nunca a darle importancia a esto pero por si acaso, ¡ahí queda!

Abreviaturas

CAE: Conducto auditivo externo

CECAE: Carcinoma epidermoide de conducto auditivo externo

CECC: Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello

CEP: Carcinoma epidermoide de piel

CEPA: Carcinoma epidermoide de pabellón auricular

CGH: *Comparative genomic hybridization* (Hibridación genómica comparativa)

ERO: Especies reactivas de oxígeno

FISH: *Fluorescence in situ hybridization* (Hibridación fluorescente *in situ*)

HPV: *Human papillomavirus* (Virus del papiloma humano)

IHQ: Inmunohistoquímica

LOH: *Loss of heterozygosity* (Pérdida de heterocigosidad)

MLPA: *Multiplex ligation-dependent probe amplification* (Amplificación múltiple de sondas dependiente de ligación)

PCR: *Polymerase chain reaction* (Reacción en cadena de la polimerasa)

PHTS: *PTEN hamartoma syndromes* (Síndromes hamartomatosos relacionados con PTEN)

RT: Radioterapia

UV: Ultravioleta

Índice

Agradecimientos	XI
Abreviaturas	XV
Índice	XVII
1. Introducción	1
1.1. Aspectos clínicos del carcinoma epidermoide de conducto auditivo externo (CECAE)	2
1.1.1. Anatomía del oído.....	2
1.1.2. Histología del conducto auditivo externo (CAE)	5
1.1.3. Epidemiología del CECAE	5
1.1.4. Factores etiológicos del CECAE.....	5
1.1.5. Clínica.....	6
1.1.6. Diagnóstico	6
1.1.7. Estadificación.....	7
1.1.8. Tratamiento.....	8
1.1.9. Pronóstico	11
1.1.10. Factores pronósticos.....	12
1.2. Aspectos clínicos del carcinoma epidermoide de piel (CEP)	13
1.3. Biología molecular del cáncer	16
1.4. Alteraciones moleculares frecuentes en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello (CECC)	18
1.5. Patología molecular del CEP esporádico	20
1.6. Patología molecular del carcinoma epidermoide de CAE	22
1.6.1. CDKN2A/p16	22

1.6.2. EGFR	24
1.6.3. PTEN	26
1.6.4. TP53/p53	27
2. Hipótesis.....	31
3. Objetivos.....	33
4. Material y métodos	35
4.1. Sujetos a estudio.....	36
4.2. Extracción de ADN	37
4.3. Técnica de la MLPA.....	39
4.3.1. Tipos de kits	39
4.3.2. Pasos del experimento.....	42
4.3.3. Interpretación de los datos.....	44
4.4. Técnica de la inmunohistoquímica (IHQ).....	46
4.4.1. Pasos de la técnica	46
4.4.2. Interpretación de los datos.....	47
4.5. Análisis estadístico	48
5. Resultados	49
5.1. Aspectos Clínico-patológicos.....	50
5.1.1. Aspectos clínico patológicos de los CECAE	50
5.1.2. Aspectos clínico-patológicos de los CEPA	60
5.2. Alteraciones genético-moleculares	66
5.2.1. MLPA	66

5.2.2. IHQ.....	81
5.3. Relación entre el número de copias génicas y la expresión proteica.....	92
5.4. Interrelación de los resultados de las IHQ	95
6. Discusión	99
6.1. Aspectos clínico-patológicos	101
6.1.1. CECAE.....	101
6.1.2. CEPA	104
6.2. Alteraciones genético-moleculares	106
6.2.1. Alteraciones en el número de copias génicas	106
6.2.2. Alteraciones en la expresión proteica.....	108
6.3. Relación entre las variables clínico-patológicas y las alteraciones genético-moleculares.....	111
6.3.1. CDKN2A/p16.....	111
6.3.2. EGFR	112
6.3.3. PTEN	113
6.3.4. TP53/p53	114
6.4. Interrelaciones en la expresión proteica.....	115
7. Conclusiones	117
8. Bibliografía.....	119

1. Introducción

1.1. Aspectos clínicos del carcinoma epidermoide de conducto auditivo externo (CECAE)

El carcinoma epidermoide de conducto auditivo externo (CECAE) es un tumor muy poco frecuente y agresivo que por su localización, forma de presentación y difícil diagnóstico temprano supone un riesgo vital muy importante para los pacientes que lo padecen.

Definiciones:

- Carcinoma: Neoplasia maligna de origen epitelial, derivada de cualquiera de las tres capas germinales del embrión.
- Carcinoma epidermoide (o escamoso): Carcinoma procedente de células escamosas identificables de cualquiera de los epitelios pavimentosos estratificados del organismo.¹

1.1.1. Anatomía del oído

El oído es un órgano complejo encargado de la función auditiva y del equilibrio. Clásicamente, y a grandes rasgos, se divide anatómicamente en tres partes: oído externo, formado por el pabellón auricular y conducto auditivo externo; oído medio, formado por la caja timpánica y la mastoides y el oído interno formado por el laberinto óseo o cápsula ótica, que a su vez está integrado por la cóclea o laberinto anterior y el laberinto posterior (Figura 1).

El conducto auditivo externo (CAE) es la continuación del pabellón auricular y comunica el exterior con el oído medio a través de la membrana timpánica. Es de forma tubular con una longitud de unos 24 milímetros y un diámetro aproximado de 10 milímetros. Está compuesto por una porción cartilaginosa y una ósea. La primera es continuación de la estructura cartilaginosa del pabellón auricular y está fija al perímetro del conducto óseo por tejido fibroso. En su parte anterior se localizan las fisuras de Santorini, lugar por donde se puede producir la diseminación de los tumores originados en el conducto (Figura 2).

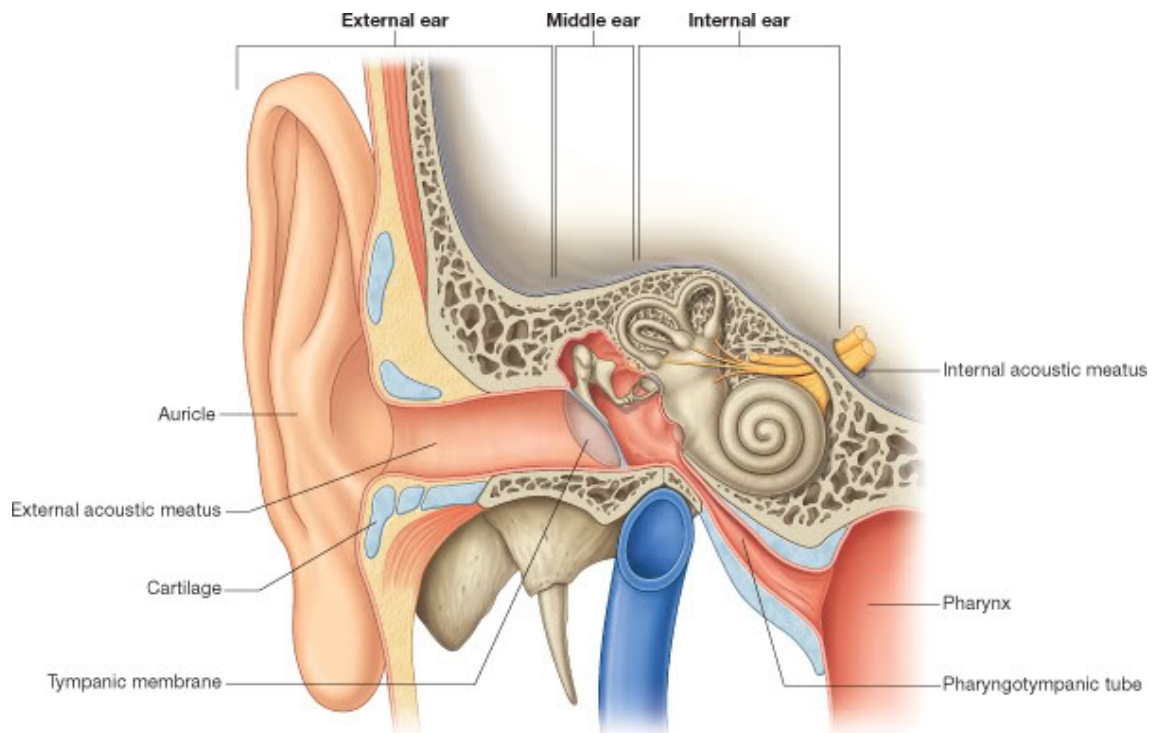


Figura 1: Anatomía del oído (Imagen tomada de Elsevier. Drake et al: *Gray's Anatomy for Students* – www.studentconsult.com).

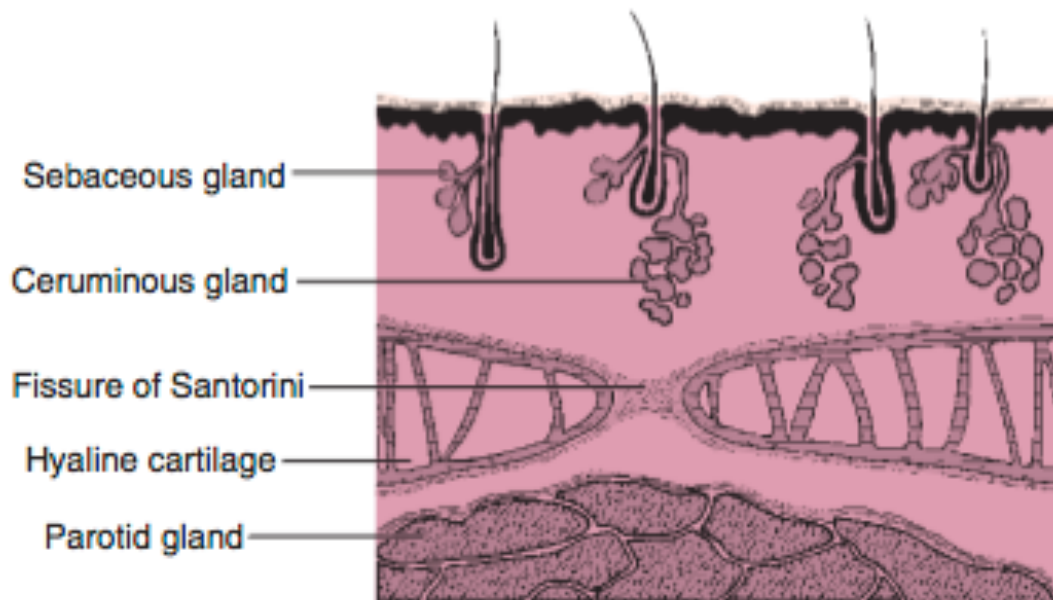


Figura 2: Fisuras de Santorini (Imagen tomada de *Operative otolaryngology: head and neck surgery*. Eugene N. Myers²).

La porción ósea está constituida por el hueso timpánico en sus paredes anterior, inferior y mayor parte de la posterior, mientras que la porción escamosa del hueso temporal conforma la región pósterosuperior del conducto óseo (Figura 3). Es de unos 16 mm de largo y es más estrecha que la parte cartilaginosa.

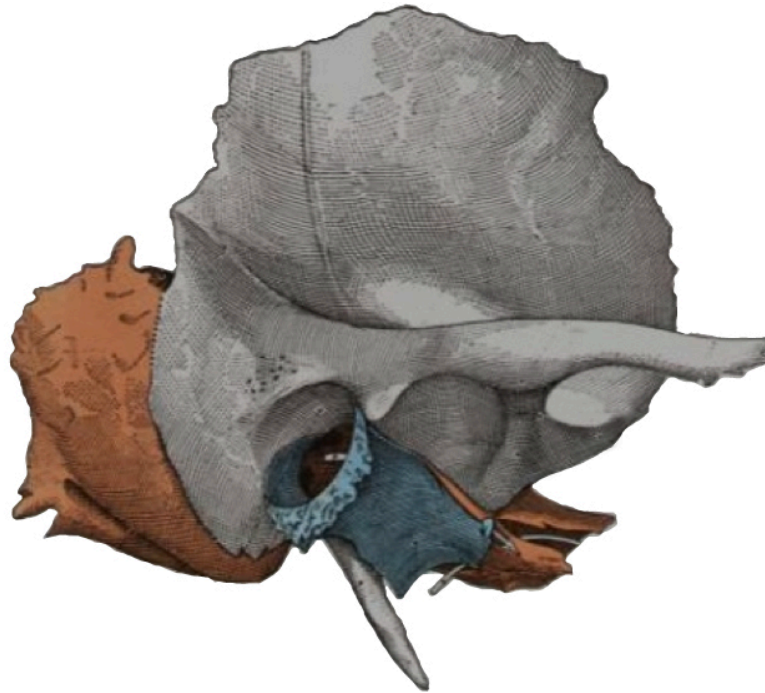


Figura 3: Hueso temporal. En gris se representa la porción escamosa, en azul el hueso timpánico y en marrón la porción petromastoidea.

El CAE tiene un abundante drenaje linfático que se dirige a los ganglios parotídeos, retroauriculares, infraauriculares y cadenas cervicales profundas superiores.

Su inervación sensitiva es compleja y está compuesta por ramas dependientes del trigémino, vago, glossofaríngeo y fibras sensitivas del nervio facial.

El CAE se relaciona anatómicamente hacia delante con la glándula parótida y articulación temporo-mandibular; superiormente con la fosa craneal media y posteriormente con las celdas mastoideas.

1.1.2. Histología del conducto auditivo externo (CAE)

El CAE y pabellón auricular, están recubiertos por un epitelio escamoso queratinizante que, exceptuando la porción ósea del CAE, se acompaña de anexos cutáneos, como folículos pilosos y glándulas sebáceas. La porción externa del conducto cuenta con las glándulas ceruminosas, que son una variante especializada de glándulas apocrinas. Están formadas por una estructura tubular enrollada que se asemeja a las glándulas sudoríparas.

El CAE y el pabellón auricular están soportados por un tejido fibroadiposo, cartílago elástico y hueso³.

La piel que recubre la porción ósea del CAE está íntimamente adherida al periostio, es muy delgada y no posee anexos. En la parte más medial del CAE, esta piel conforma la capa más lateral de la membrana timpánica.

1.1.3. Epidemiología del CECAE

El CECAE es un tumor raro, que representa un 0,2% de todos los tumores de cabeza y cuello, con una incidencia anual de entre 1 y 6 casos por cada millón de habitantes⁴⁻⁷, existiendo diferencias en función de la distribución geográfica⁸. Se han descrito casos raros de afectación bilateral⁹.

Varios autores han encontrado una incidencia mayor de CECAE en varones que en mujeres, con proporciones que van desde 1,7 hasta 2,4 a 1^{5,10}.

La edad media de presentación está por encima de los 60 años en la mayoría de los estudios^{4,5,10,11}. La mediana es de 63 a 64 años y el pico de incidencia se sitúa entre 50 y 69 años^{5,10}.

En la gran mayoría de las series no se objetivan diferencias en el pronóstico en función del sexo.¹⁰

1.1.4. Factores etiológicos del CECAE

El CECAE se ha relacionado con ciertos factores etiológicos como:

- Predisposición genética
- Otorrea crónica de larga evolución
- Radioterapia previa en otros tumores de cabeza y cuello¹², como por ejemplo en el carcinoma nasofaríngeo¹³
- Sustancias químicas como los desinfectantes clorinados

1.1.5. Clínica

Uno de los principales problemas que plantea el CECAE es su forma de presentación, inespecífica y que a menudo simula la clínica de patologías crónicas benignas del oído (otitis crónica, colesteatoma...) provocando un retraso en el diagnóstico, lo que tiene una influencia muy negativa en el pronóstico de estos tumores. Así, la media de duración de los síntomas hasta el diagnóstico puede ser desde 1 mes a 3,9 años^{4,14}.

Las formas de presentación más frecuentes de la enfermedad son: Otagia (64-81%), otorrea (69-75%), pérdida de audición (62%), sensación de ocupación (40%), sangrado u otorrea sanguinolenta (31%), parálisis facial (25-7%), masa en la parótida (19%)^{4,14-16}.

1.1.6. Diagnóstico

El diagnóstico temprano es fundamental dado que el pronóstico depende principalmente de lo avanzada que esté la enfermedad en el momento de su diagnóstico. La clínica antes citada, dolor en una otitis externa que no mejora con el tratamiento, otorrea sanguinolenta, presencia de tejido necrótico en la otorrea y ulceraciones del CAE que dejan expuesto el hueso o el cartílago subyacente deben hacernos pensar en este diagnóstico¹⁰. El siguiente paso debe ser el examen físico completo, que incluya la palpación cervical y una exploración neurológica. Se realizará toma de biopsia bajo otomicroscopia para su análisis histopatológico y confirmación de la sospecha.

Las pruebas de imagen son imprescindibles para el diagnóstico, estadificación y planificación del tratamiento.

La TC da una buena imagen del hueso pero está muy limitada para la evaluación de los planos blandos porque no distingue bien entre inflamación y tumor, especialmente

cuando no hay erosión ósea⁴. La RMN es muy valiosa para el estudio de la afectación de partes blandas como, por ejemplo, la duramadre o la invasión intracraneal¹⁷. La combinación de ambas pruebas nos da la información más completa posible. En los últimos años se ha extendido el uso del PET-TC, habiéndose convertido en otra prueba de gran utilidad para la estadificación y planificación del tratamiento.

1.1.7. Estadificación

El CECAE es un tumor muy poco frecuente y es difícil encontrar series en la literatura con un gran número de pacientes. Es por ello que sería necesario que hubiese un sistema de estadificación aceptado de forma universal para este tumor, de forma que los diferentes resultados de las diferentes series fuesen más fácilmente comparables. A día de hoy dicho sistema no existe aunque el más aceptado actualmente es la clasificación de Pittsburgh, descrita inicialmente por Arriaga en 1990¹⁸ y modificada por Moody en 2000⁴. Esta clasificación se basa en hallazgos clínicos y radiológicos, habiéndose descrito 12 áreas anatómicas identificables en la TC que condicionan el estadio tumoral (Tabla 1 y Tabla 2).

Tabla 1: Definición de T en el CECAE según la clasificación de Pittsburgh.

T1	Tumor limitado a CAE, sin evidencia de erosión ósea ni afectación de tejidos blandos.
T2	Tumor con erosión ósea limitada al CAE (no en el total del grosor del mismo) o afectación de tejidos blandos <0,5cm.
T3	Tumor que erosiona el grosor total del CAE óseo con afectación limitada de tejidos blandos (<0,5cm), o que afecta al oído medio y/o mastoides.
T4	Tumor que erosiona la cóclea, ápex petroso, pared medial del oído medio, canal carotideo, foramen yugular o duramadre; o con afectación extensa de tejidos blandos (>0,5cm) como la afectación de la articulación témporo-mandibular o apófisis estiloides; o evidencia de parálisis facial.

N+ se considera estado avanzado de la enfermedad, al igual que M+.

Tabla 2: Clasificación por estadios en el CECAE.

	N0	N+	M1
T1	Estadio I	Estadio III	Estadio IV
T2	Estadio II	Estadio IV	Estadio IV
T3	Estadio III	Estadio IV	Estadio IV
T4	Estadio IV	Estadio IV	Estadio IV

Se considera enfermedad en fase temprana cuando se encuentra en estadios I y II, mientras que se habla de fase avanzada cuando lo hace en estadios III y IV.

Existen otras clasificaciones para los tumores de CAE y hueso temporal que actualmente parecen estar siendo usadas de forma más minoritaria en la literatura. Sus limitaciones son el uso de la misma clasificación para diferentes histologías tumorales como carcinoma epidermoide, carcinoma adenoide quístico, adenocarcinoma, melanoma, carcinoma basocelular¹⁹⁻²³ o la inclusión de tumores de pabellón, los cuales tienen diferentes factores de riesgo como la exposición al sol²³, teniendo así más que ver con tumores epidermoides de piel que con los de CAE.

1.1.8. Tratamiento

El manejo del CECAE sigue siendo controvertido porque hay pocos estudios con suficientes pacientes, son difícilmente comparables por la falta de consenso en cuanto a la estadificación o incluso en cuanto a la nomenclatura y técnica de las diferentes intervenciones quirúrgicas.

No se han hecho ensayos clínicos para comparar diferentes estrategias de tratamiento aunque se acepta mayoritariamente que el tratamiento de elección siempre que sea posible es la cirugía radical, obteniendo una resección con márgenes libres de tumor, seguida de radioterapia en función del estadio (T2, T3 y T4)⁴, de la afectación de márgenes quirúrgicos o de la existencia de metástasis ganglionares^{5,10,11,15}.

Como ya se ha mencionado, la gran variedad de técnicas quirúrgicas, con sus modificaciones y sus diferentes nomenclaturas hace difícil la comparación de resultados en los diferentes artículos. Se ha propuesto una protocolización de las técnicas en función del tumor^{2,4} (Figura 4):

- Resección lateral del temporal: Lateral al oído interno. Incluye membrana timpánica (1)
- Resección lateral del temporal modificada: Preserva membrana timpánica
- Resección subtotal del temporal: Además de las estructuras de la resección lateral del temporal se incluye la cápsula ótica y pared medial de la caja timpánica (2)
- Resección total del temporal: Además de las estructuras de la resección subtotal del temporal se incluye la resección del conducto auditivo interno y ápex petroso (3)

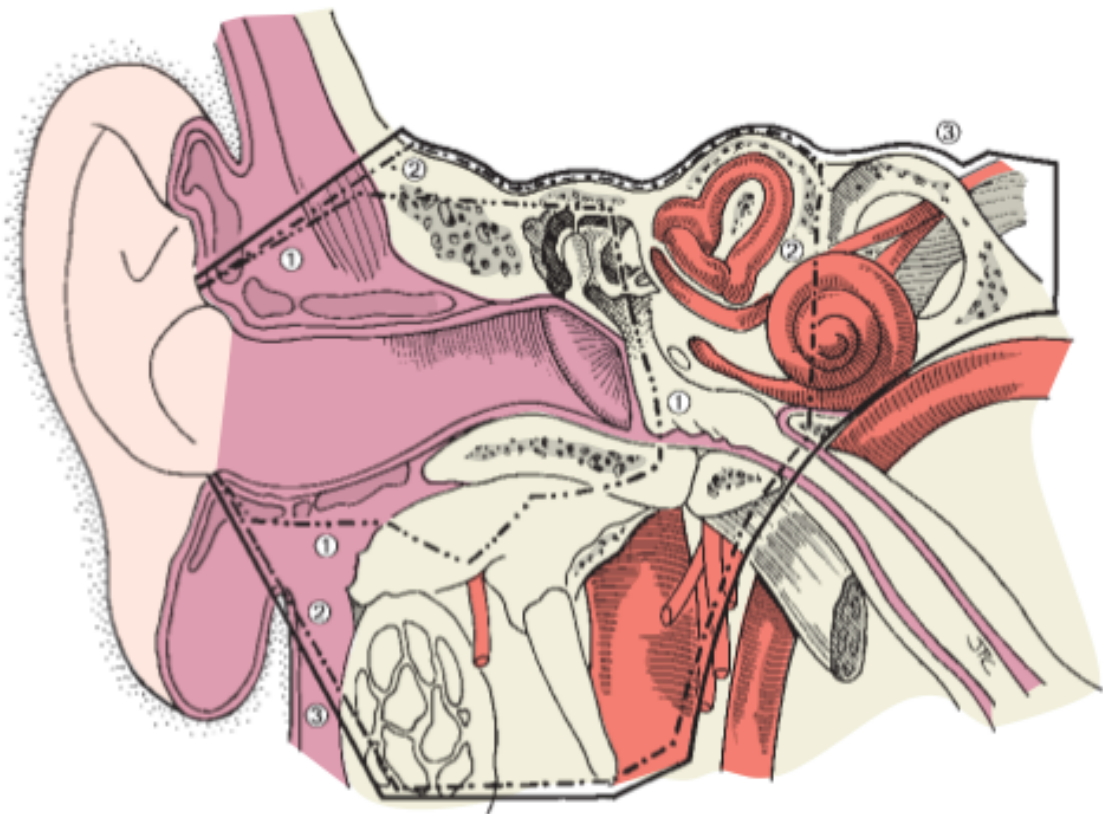


Figura 4: Tipos de resección del temporal (Imagen tomada de *Operative otolaryngology: head and neck surgery*. Eugene N. Myers²)

Típicamente se ha recomendado la resección en bloque pese a que recientemente algunos autores abogan por una resección “*step by setep*”, “*piecemeal*” o en

sacabocados⁸. En su opinión permite una resección igual de agresiva, llevando la disección de forma progresiva hasta la obtención de márgenes negativos pero con una mejor conservación de pares craneales y estructuras que puedan no estar afectadas por el tumor^{7,24}.

El manejo del cuello en los N0 clínicos es controvertido. La incidencia de metástasis ganglionares cervicales es de entre el 10 y el 23%²⁵ por lo que en general no se recomienda el vaciamiento de forma sistemática, reservándolo para los casos con metástasis clínicas o radiológicas y los estadios avanzados. Pese a todo, hay autores que sí lo realizan de forma rutinaria alegando que ayuda a una correcta estadificación que va a determinar la necesidad de tratar con radioterapia postoperatoria^{15,26}.

El tratamiento de la parótida es otro aspecto debatido. El CAE cartilaginoso ofrece poca resistencia a la progresión del tumor hacia adelante por la existencia de las fisuras de Santorini. Además, la parótida contiene ganglios linfáticos que podrían estar afectados de forma temprana. Por todo ello, hay autores que proponen la parotidectomía superficial en todos los tumores avanzados incluso aunque no haya afectación clínica ni radiológica^{27,28}.

Pese a que la cirugía con o sin radioterapia postoperatoria es el tratamiento más aceptado, también se ha propuesto el tratamiento mediante radioterapia exclusiva, con resultados comparables en cuanto a control local y supervivencia específica de enfermedad, utilizando un régimen con una dosis de 55 Gy en una mediana de 16 sesiones a lo largo de 21 días²⁹.

El objetivo de la radioterapia puede ser, en los diferentes casos, el lecho tumoral, la porción petrosa del hueso temporal, la fosa parotídea, las cadenas ganglionares retroauriculares, y yugulares altas.

En la radioterapia postoperatoria con intención curativa se aplican de 60 a 66 Gy si los márgenes son negativos y de 68 a 72 Gy con bordes afectados o próximos³⁰. En caso de existencia de ganglios positivos se aplica una dosis adyuvante de 54-60 Gy sobre los territorios ganglionares¹¹.

Aunque se ha utilizado la quimio-radioterapia concomitante (docetaxel, cisplatino y 5-fluorouracilo) como abordaje inicial con muy buenos resultados³¹, la realidad es que por el momento la quimioterapia tiene un papel secundario en el tratamiento con intención curativa. Aún así merece la pena destacar un metaanálisis reciente en el que tras incluir 752 pacientes se observó la mejor supervivencia en el grupo que había recibido quimio-

radioterapia preoperatoria. Además se concluyó que la quimio-radioterapia como tratamiento exclusivo no era peor que la cirugía con o sin radioterapia postoperatoria³².

Al igual que en otros tumores epidermoides de cabeza y cuello, de momento, la combinación de cisplatino y 5-fluorouracilo se considera la asociación más efectiva para el tratamiento paliativo.

Otras posibilidades terapéuticas son el tratamiento con braquiterapia¹¹, (como rescate cuando ha fallado la cirugía más radioterapia) y con pomada tópica (5-FU) tras *debulking* quirúrgico y necrotectomías sucesivas³³.

1.1.9. Pronóstico

La mayoría de las series publicadas valoran de forma conjunta todos los carcinomas epidermoides del hueso temporal.

En ellas se observa que la tasa global de supervivencia es baja, por debajo del 50% en la mayoría de los trabajos³⁴, y que el pronóstico depende sobretudo del estadio en el momento del diagnóstico, siendo bueno en los estadios iniciales pero empeorando drásticamente en los más avanzados, tal y como se puede ver en la Tabla 3.

Tabla 3: Supervivencia en diferentes series.

Serie	Nº de casos	supervivencia	Estadio			
			I	II	III	IV
Testa ¹⁰	79	Global a 5 años	100%	69%	43%	22%
Moody ⁴	32	Global a 2 años	100%	80%	50%	7%
Moffat ¹⁵	37	Libre de enfermedad	100%		40%	
Yin ⁵	95	Global a 5 años	100%		42%	
Ogawa ³⁵	87	Libre de enfermedad a 5 años	72%		38%	
Lobo ¹⁴	19	Libre de enfermedad	100%		18%	
Gidley ²⁶	71	Global a 5 años	48%		28%	
Chi ³⁶	72	Global a 5 años	94%		16%	
Bacciu ³⁷	45	Específica de enfermedad	100%		45%	
Zanoletti ³⁸	41	Específica de enfermedad	78%		50%	
Shiga ³¹	14	Específica de enfermedad a 5 años	78%			67%
Pemberton ²⁹	123	Específica de enfermedad a 5 años	85%		44%	

1.1.10. Factores pronósticos

El primer factor pronóstico a considerar es el estadio en el momento del diagnóstico. La extensión del tumor primario (categoría T) es para algunos autores el factor más determinante⁸.

La extensión anterior del tumor hacia la parótida y la articulación témporo-mandibular se considera de mejor pronóstico que la extensión medial o posterior hacia la cápsula ótica, mastoides, área infralaberíntica, espacio parafaríngeo y duramadre^{8,38}.

Se ha relacionado con mejor pronóstico la ausencia de erosión ósea¹⁰, ya que implica que el tumor tiene un estadio menos avanzado y quizás un comportamiento biológico menos agresivo.

Se considera un factor clínico de mal pronóstico la existencia de parálisis facial en el momento del diagnóstico, ya que el nervio suele ser muy resistente a la infiltración tumoral y por lo tanto ésta aparece en fases avanzadas de la enfermedad. En la modificación del año 2000 de la clasificación de Pittsburgh se considera que cuando existe parálisis facial, el tumor se clasifica como T4.

La afectación de la parótida es signo de enfermedad localmente avanzada y por lo tanto de peor pronóstico. Se ha observado que el CECAE tiene tendencia a metastatizar en los ganglios parotídeos en las fases avanzadas de la enfermedad, por lo que en esos casos se recomienda parotidectomía profiláctica por la posible existencia de adenopatías subclínicas. Aunque parece ser que la tendencia de este tumor a invadir directamente la parótida es menor que en otros tumores del CAE (carcinoma adenoide quístico) se puede dar en estadios avanzados²⁸.

Las metástasis ganglionares cervicales son consideradas a menudo como el factor pronóstico individual más adverso^{25,38,39}. La supervivencia en los pacientes con N+ en las diferentes series baja de forma drástica, llegando a ser del 0% a tres años⁴⁰. En general se acepta que el vaciamiento ganglionar profiláctico se deberá realizar cuando exista una probabilidad de metástasis ganglionar oculta superior al 20%.

Por último, la diferenciación histológica parece tener que ver también con el pronóstico; así se ha encontrado que la tasa de supervivencia es mayor cuando el tumor es bien diferenciado (80%), que cuando es moderadamente diferenciado (55%). Cuando el tumor es poco diferenciado las tasas de supervivencia bajan muy notablemente (11%)¹⁵

1.2. Aspectos clínicos del carcinoma epidermoide de piel (CEP)

El carcinoma epidermoide de piel (CEP) es la segunda neoplasia más frecuente de la piel después del carcinoma basocelular^{41,42}, representando aproximadamente el 20% de los tumores malignos no-melanoma. Suele darse en grupos de edad avanzada, personas con piel clara y más frecuentemente en zonas con alto índice UV y latitudes bajas, siendo ligeramente más frecuente en hombres que en mujeres.

El área de cabeza y cuello es la zona más habitualmente afectada, siendo el lugar de presentación de aproximadamente un 65% de estos tumores en los pacientes de piel clara⁴³.

El CEP se desarrolla con frecuencia en el labio inferior y en el pabellón auricular y es precisamente en estas zonas donde tiene tendencia a comportarse de manera más agresiva, con frecuentes recidivas y alto riesgo de metástasis⁴⁴.

Así como el carcinoma basocelular se ha relacionado con exposiciones intensas pero puntuales al sol -como por ejemplo actividades de recreo al aire libre- el CEP se asocia con la exposición crónica y acumulativa a lo largo de la vida a la radiación UV⁴⁵, habiéndose observado que una exposición significativa durante la infancia y la adolescencia aumenta el riesgo de padecer un CEP⁴⁴.

La exposición a radiación UV, especialmente UVB (280-320 nm), produce radicales libres que provocan la formación de dímeros de timidina en el ADN e interfieren con su reparación, además de comprometer la inmunidad celular mediante daño local a las células de Langerhans⁴⁶ (Figura 5).

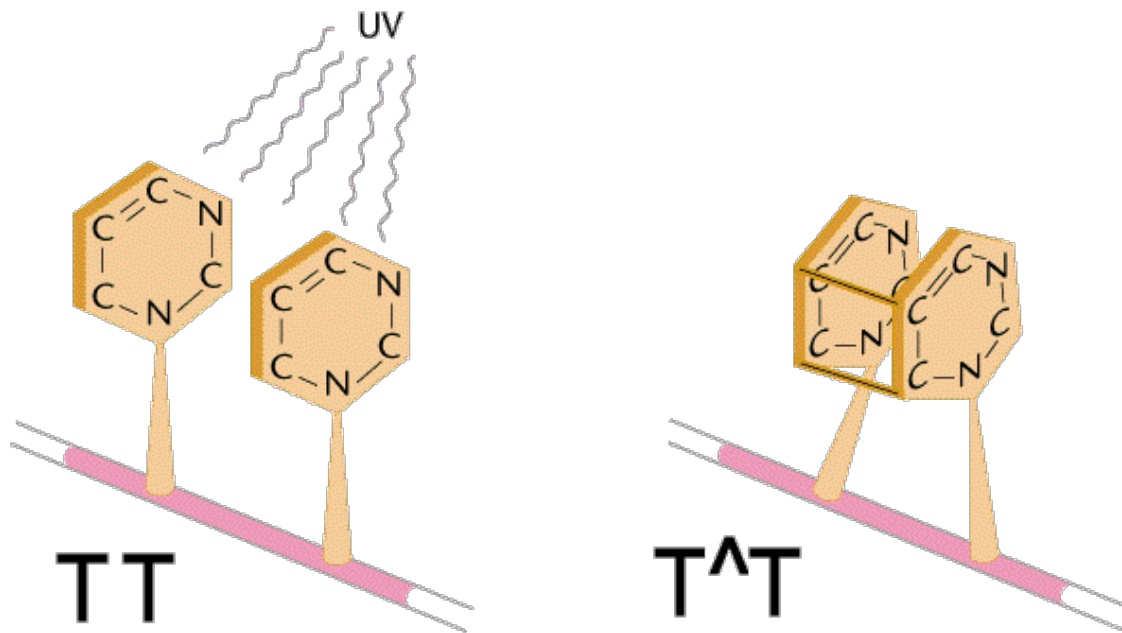


Figura 5: formación de dímeros de timidina.

La inmunosupresión también se considera un factor etiológico importante, habiéndose hallado una mayor frecuencia de CEP en trasplantados y pacientes infectados por VIH⁴⁷⁻⁴⁹. Otros factores de riesgo son las radiaciones ionizantes, los procesos inflamatorios crónicos, la infección por el virus del papiloma humano (HPV) y la exposición a químicos como el arsénico.

Clínicamente se suele presentar como una masa hiperqueratósica o lisa, de color rosado que crece lentamente en forma de nódulo o placa, pudiendo presentar ulceraciones⁴⁵. A menudo se desarrolla a partir o en las inmediaciones de una queratosis actínica, que es su lesión displásica precursora. Se estima que el riesgo de que la queratosis actínica se transforme en un CEP invasivo es del 8% a lo largo de la vida⁵⁰.

La queratosis actínica es una lesión displásica que puede mostrar varios niveles de atipia en los queratinocitos epidérmicos. Se acompaña de hiperqueratosis o paraqueratosis (núcleos retenidos en la capa córnea de la epidermis).

Los CEP bien diferenciados muestran nidos de células escamosas eosinófilas, a menudo queratinizadas, con puentes intercelulares, siendo la atipia nuclear escasa. En los tumores menos diferenciados disminuye progresivamente la queratinización y aumenta la atipia nuclear así como el número de mitosis hasta llegar a los poco diferenciados, en los que puede llegar a ser difícil su identificación histológica siendo

necesario el uso de la inmunohistoquímica (anti-queratina y p63) para intentar demostrar su origen escamoso. El carcinoma *in situ* se presenta como una lesión en placa, de aspecto eccematoso.

El tratamiento de elección es la cirugía con resección completa del tumor y márgenes quirúrgicos libres de neoplasia. Dependiendo del caso se realizará disección ganglionar regional y se valorará la necesidad de tratamiento complementario como la radioterapia o la quimioterapia. En lesiones de bajo riesgo se ha recomendado la cirugía de Mohs, proporcionando una menor morbilidad quirúrgica y unas tasas inferiores de recidiva local. En el caso de los carcinomas epidermoides de pabellón auricular (CEPA) se publicó una tasa de recidiva del 5,3% tras la cirugía de Mohs contra el 18,7% en las resecciones no-Mohs⁵¹.

El lugar más frecuente de aparición de metástasis regionales en los CEP de la cabeza y cuello es la parótida, seguido del nivel II de las cadenas ganglionares cervicales. De entre los CEP de la cabeza y cuello con metástasis regionales, el pabellón auricular, junto con la mejilla, es el origen más frecuente⁵².

El CEP invasivo presenta un riesgo de recurrencia entre el 3,7% y el 10,9% y una tasa de metástasis del 3,3%. El tamaño es un factor importante ya que en un tumor de 2cm se multiplica por 2 el riesgo de recurrencia y por 3 el de metástasis⁵¹. El factor predictivo independiente más importante para la aparición de metástasis es la profundidad del tumor⁵³.

Otros factores de riesgo propuestos para la recurrencia y metástasis son la inmunosupresión, la localización del tumor, la afectación ganglionar, la pobre diferenciación, la invasión perineural, las lesiones primarias surgidas a partir de cicatrices, quemaduras, úlceras crónicas y zonas radiadas.

El CEPA es un tipo especial de CEP cuya localización se considera un factor de alto riesgo. Tiene más tendencia que otros CEP a dar metástasis ganglionares y cuando esto sucede la supervivencia específica de enfermedad disminuye mucho⁵⁴.

La estadificación del CEPA se suele hacer mediante la clasificación de la AJCC/UICC⁵⁵ para carcinomas epidermoides y basocelulares de la piel, representada en la Tabla 4 y Tabla 5.

Tabla 4: Clasificación T en el CEPA (basada en AJCC/UICC TNM, 7ª edición). Factores de alto riesgo: Localización en el pabellón auricular, nivel de Clark mayor o igual a 4, Breslow mayor a 2mm, invasión perineural y pobre diferenciación histológica.

T	Descripción
1	Tumor menor de 2cm en su dimensión mayor y menos de 2 factores de alto riesgo
2	Tumor mayor de 2cm en su dimensión mayor o cualquier tamaño con 2 factores de alto riesgo
3	Tumor con invasión del maxilar, mandíbula, órbita o hueso temporal
4	Tumor con invasión del esqueleto (axial o apendicular) o invasión perineural de la base del cráneo

Tabla 5: Clasificación por estadios en el CEPA

	N0	N1	N2-3	M1
T1	Estadio I	Estadio III	Estadio IV	Estadio IV
T2	Estadio II	Estadio III	Estadio IV	Estadio IV
T3	Estadio III	Estadio III	Estadio IV	Estadio IV
T4	Estadio IV	Estadio IV	Estadio IV	Estadio IV

1.3. Biología molecular del cáncer

Se considera que el cáncer surge del resultado de una acumulación concatenada de alteraciones genéticas que producen una población clonal de células transformadas^{56,57} con ventajas proliferativas sobre las células circundantes. Sobre esta población clonal pueden aparecer nuevas alteraciones genéticas que vayan transformando el fenotipo celular hasta adquirir las características de malignidad. Esta hipótesis se basa en tres principios fundamentales que fueron inicialmente descritos como modelo de génesis tumoral para el cáncer colorrectal, aunque actualmente se cree que son comunes al resto de cánceres:

- Las neoplasias son el resultado de la inactivación de un gen supresor de tumores y/o la activación de un protooncogén.
- Existe un orden definido de sucesos genéticos que llevan al desarrollo del fenotipo tumoral.

- Las variaciones en el orden de los sucesos genéticos son posibles, pero es la acumulación neta de alteraciones la que determina el fenotipo de malignidad.

Más recientemente se han definido diez procesos biológicos que definen las señas de identidad del cáncer^{58,59} (Figura 6):

- Mantenimiento de las señales proliferativas
- Evasión de los supresores del crecimiento
- Evitación de la destrucción por el sistema inmune
- Resistencia a la apoptosis
- Potencial de replicación ilimitado
- Generación de inflamación promotora de tumores
- Inducción de la angiogénesis
- Activación de la invasión y metástasis
- Desestabilización genómica y mutación
- Desregulación energética de la célula.

Todos estos procesos se asocian a ciertas alteraciones moleculares y definen la propia naturaleza del cáncer, siendo dianas potenciales para su tratamiento.

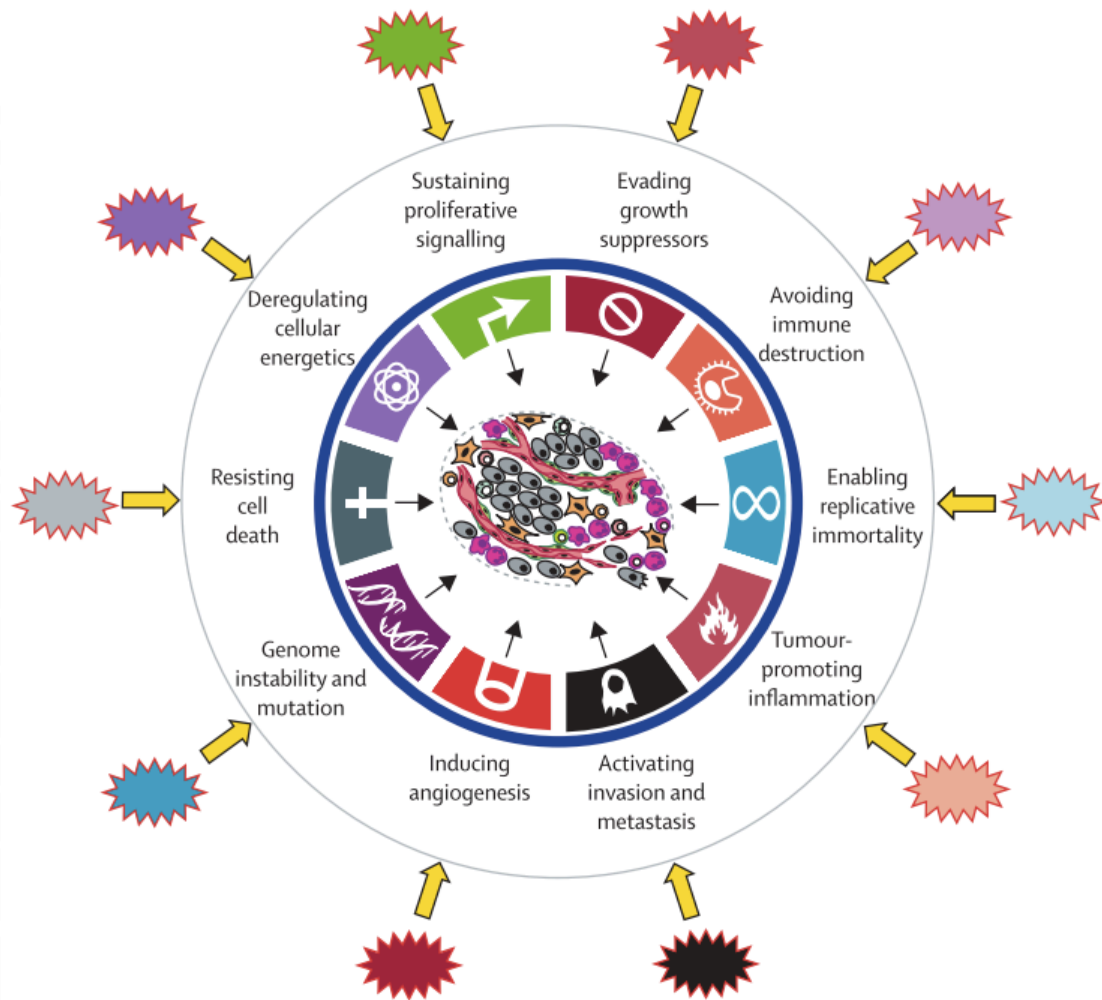


Figura 6: Señas de identidad del cáncer (Imagen tomada de *Rethinking the war on cancer*. D.Hanahan⁵⁹).

1.4. Alteraciones moleculares frecuentes en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello (CECC)

En las células normales los genes supresores de tumores son reguladores y antiproliferativos mientras que los proto-oncogenes tienen funciones proliferativas. Así pues, la inactivación de los genes supresores de tumores puede llevar a un proceso de proliferación descontrolada, mientras que mutaciones o amplificaciones en proto-oncogenes pueden dar lugar al fenotipo canceroso a través de una activación aumentada o a una sobreexpresión aberrante de los mismos. En los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello se conoce la afectación de diversos genes:

- La pérdida de la región cromosómica 9p21-22: es una de las alteraciones más frecuentemente observadas en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello, con una frecuencia del 70%. Además es una alteración temprana en la progresión del tumor en la faringe⁶⁰. En dicha zona se hallan los genes supresores de tumores p16(CDKN2A)/p14^{ARF}.

En condiciones normales p16 impide la entrada de la célula en el ciclo celular y p14^{ARF} inhibe la asociación entre p53 y su inhibidor MDM2.

- Pérdida de la región cromosómica 3p: Los genes supresores de tumores implicados en esa región pueden ser FHIT y RASSF1A⁵⁶; ALS2CL, EPHA7 y CMYA1⁶¹. La pérdida de p53 asociada a la pérdida de 3p tiene peor pronóstico que la pérdida de p53 sola⁶².

- Sobreexpresión de EGFR: La sobreexpresión de EGFR aumenta en relación con el grado de displasia en las lesiones premalignas de cabeza y cuello, lo que sugiere que se trata de una alteración temprana⁶³. Sus niveles se han relacionado con la supervivencia libre de metástasis y con la supervivencia global.

- Her2/neu: Oncogén con homología con EGF. Se encontró alterado en el 30% de los cánceres de mama y se relacionó con un peor pronóstico. Este gen se ha encontrado en el 40% de los carcinomas epidermoides orales⁶⁴. El especial interés de este gen radica en el desarrollo del anticuerpo monoclonal trastuzumab (Herceptin), que bloquea el receptor del factor de crecimiento de HER2.

- Pérdida de la región cromosómica 17p13 y p53: la inactivación de p53 es una de las alteraciones genéticas conocidas más frecuentes en todos los cánceres humanos⁶⁵ y se asocia con la transformación de un fenotipo preinvasivo a uno invasivo. Se considera una alteración temprana en el proceso de carcinogénesis. En carcinomas epidermoides de cabeza y cuello se ha llegado a encontrar una tasa de mutaciones de entre el 60 y el 80%^{66,67}.

- Amplificación de 11q13 y ciclina D1: La amplificación de 11q13 se ha encontrado en aproximadamente un tercio de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello, considerándose que la amplificación de la ciclina D1 confiere la transformación fenotípica hacia el cáncer⁶⁸.

- PTEN: se estima que un 30% de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello tienen una expresión reducida de PTEN. Esta proteína es el regulador negativo de la vía

PI3K/Akt/mTOR, cuya actividad se encuentra aumentada en la mayoría de estos tumores⁶⁹.

En 2011 Leemans et al. Propusieron un modelo⁶⁷ para explicar la carcinogénesis desde el punto de vista molecular en el CECC basado principalmente en el carcinoma epidermoide oral, donde se relacionan las alteraciones moleculares con los cambios histológicos (Figura 7).

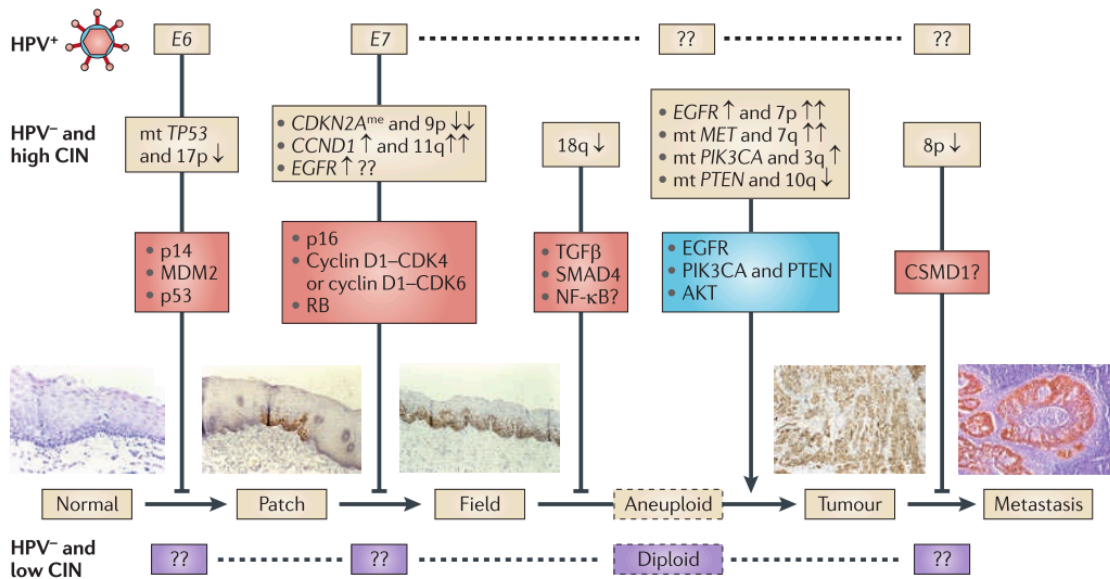


Figura 7: Modelo teórico de progresión tumoral en el CECC. Los recuadros amarillos contienen alteraciones genéticas y cromosómicas; las vías oncogénicas se representan en el azul y las vías antioncogénicas en los rojos. CIN: inestabilidad cromosómica.

1.5. Patología molecular del CEP esporádico

La radiación ultravioleta B y en menor medida la A (UVB 280-320nm y UVA 320-400nm) es considerada el agente carcinógeno fundamental en los CEP. Estas ondas penetran a diferentes profundidades en la epidermis y en la dermis, afectando cada una de ellas a un tipo diferente de células. Así pues, la radiación UVB penetra a menor profundidad y su acción fundamental es el daño en el ADN, mientras que la radiación UVA que penetra hasta las capas más profundas de la epidermis y la dermis genera sobretodo daño oxidativo.

El gen TP53 es un gen supresor de tumores que, entre otras cosas, se encarga de regular el ciclo celular, la reparación de ADN y la apoptosis⁷⁰. En los CEP, el gen TP53

juega un papel crucial y está mutado en un 90% de los casos⁷¹. El gen TP53 muestra una firma característica de la exposición a radiación UV con mutaciones de C a T o CC a TT en los sitios de dipirimidina^{72,73}.

La sobreexpresión de p53 (como indicador de p53 mutante) ya está presente en la queratosis actínica y en la piel dañada por el sol, lo que sugiere que éste es un evento temprano en la tumorigénesis de los CEP⁷⁴ y que proporciona un “campo” sobre el que pueden asentar nuevas mutaciones⁷⁵⁻⁷⁷. Se acepta que estas células con mutación en p53 tienen ciertas ventajas proliferativas y resistencia a la apoptosis, lo que les confiere la capacidad de ir sustituyendo a los queratinocitos normales. Se ha encontrado una menor expresión de p53 en CEP desarrollados en zonas no expuestas al sol⁷⁸.

En lesiones tempranas premalignas ya se aprecian anomalías cromosómicas clonales y pérdida de heterocigosidad (LOH) en 3p, 8p, 9p, 9q, 13q, 17p y 17q; así como ganancias cromosómicas en 11q y 8q^{71,79}.

Las mutaciones de RAS se dan en el 21% de los CEP, siendo la mutación de HRAS la más común⁸⁰.

En las lesiones premalignas como la queratosis actínica también se ha visto un nivel elevado o activación de EGFR, familia Src de tirosina quinasas, v-myc y factor activador de la transcripción 1⁸¹, lo que sugiere que son alteraciones tempranas.

La expresión de la proteína quinasa C δ , un mediador de la apoptosis inducida por UV, está reducida en los CEP⁸¹.

Mediante estudios LOH de CDKN2A, que codifica p16^{INK4a} (inhibidor de kinasas dependiente de ciclinas) y p14^{ARF} (activador de p53), se ha observado que la alteración del locus es muy frecuente en el CEP pero es más rara en la queratosis actínica, lo que sugiere que tiene un papel importante en el proceso de transformación maligna^{82,83}.

La pigmentación cutánea es un factor muy importante en el riesgo individual de padecer un CEP. En este sentido, los polimorfismos de MC1R (receptor 1 de melanocortina, encargado de controlar el tipo de melanina que será producida) son un factor determinante en la sensibilidad a la radiación UV, habiéndose encontrado tasas de CEP hasta 100 veces superiores entre diferentes fenotipos de pigmentación cutánea⁸⁴.

La vía de señalización Notch regula varios aspectos de la renovación tisular⁸⁵. Recientemente se ha observado que mutaciones que inactivan NOTCH1 y NOTCH2

están frecuentemente presentes en los CEP, carcinomas de cabeza y cuello y algunos de pulmón⁸⁶.

1.6. Patología molecular del carcinoma epidermoide de CAE

Actualmente no existe un modelo que explique la patología molecular del carcinoma epidermoide de CAE por lo que nos vemos obligados a recurrir a modelos descritos para otros carcinomas epidermoides, como los de piel y los de cabeza y cuello.

Los objetivos de la investigación en oncología molecular incluyen el desarrollo de nuevos métodos de detección temprana del cáncer o que permitan valorar de una forma más precisa el pronóstico, de forma que se pueda indicar un tratamiento individualizado conforme al riesgo de recidiva, metástasis, etc. Por ello es de utilidad conocer las alteraciones moleculares características de un tipo concreto de tumor para ser capaces de establecer estrategias específicas.

A continuación se describen 4 genes y sus proteínas que se encuentran frecuentemente alterados en los carcinomas epidermoides, tanto de cabeza y cuello como de piel.

1.6.1. *CDKN2A/p16*

La vía p16-Rb tiene una función crítica en el control del ciclo celular y la senescencia. En la transición de G1 a S del ciclo celular p16 se une a las ciclinas dependientes de quinasas 4 y 6 (CDK4 y CDK6) evitando así la fosforilación de pRb. Como consecuencia los factores de transcripción E2F quedan secuestrados mediante la generación de complejos incompetentes pRb/E2F, lo que bloquea la progresión del ciclo celular⁸⁷(Figura 8).

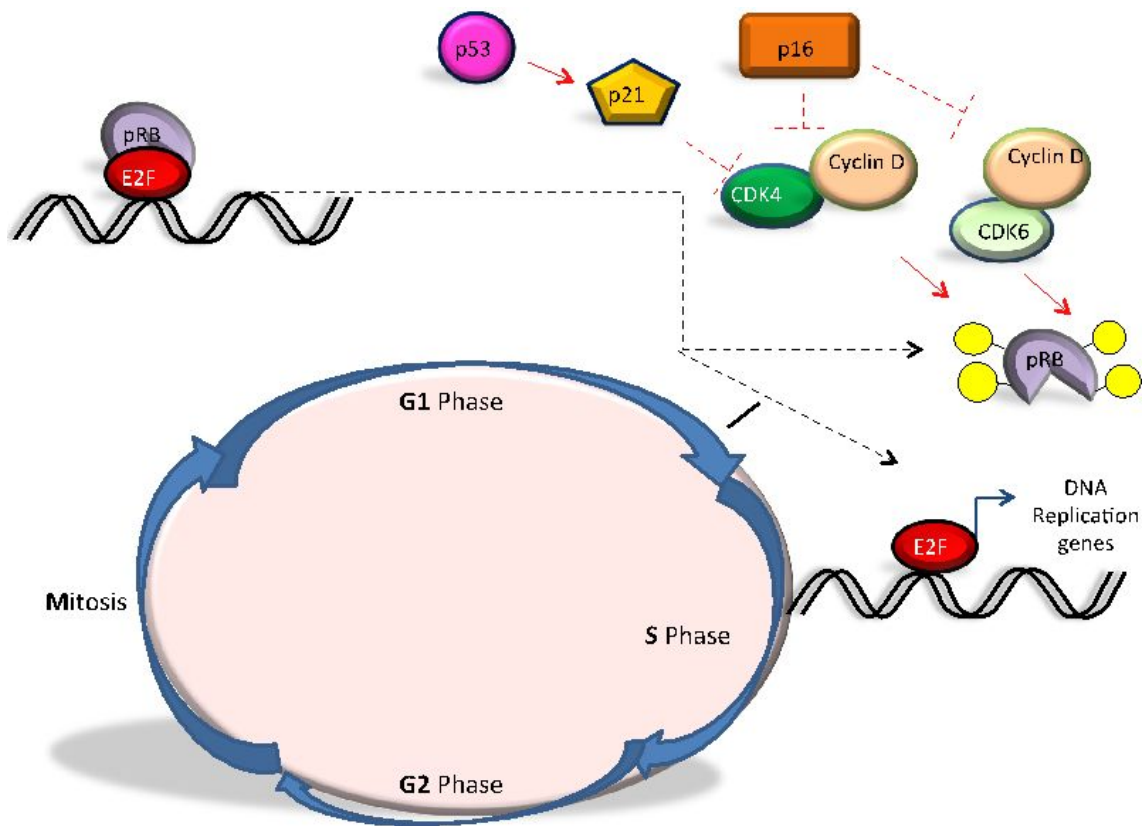


Figura 8: Bloqueo del ciclo celular mediado por p16 (Imagen tomada de *Senescence and senescence-related disorders*⁸⁸).

Un aumento de la expresión de p16 provocado por oncogenes, en respuesta al daño en el ADN o al envejecimiento puede provocar o acelerar la senescencia celular. La inactivación del gen que codifica p16, CDKN2A, se ha encontrado en cerca del 50% de los cánceres humanos⁸⁹. Esta inactivación se puede producir por acción de HPV, delección, metilación o mutaciones puntuales. Por otro lado se ha visto que la sobreexpresión de p16 se relaciona con un peor pronóstico en varios tipos de tumor, como en el neuroblastoma, cérvix, mama, ovario o próstata⁹⁰.

Se ha observado que p16 protege a la célula de la apoptosis como respuesta a la exposición a radiación ultravioleta⁹¹ mediante la desregulación de la proteína proapoptótica Bax, encargada de estimular a la mitocondria para la liberación de citocromo C. La ausencia de p16 funcional en la célula promueve la señalización pro-apoptosis mediada por luz UV.

Se sabe que las mutaciones germinales de p16 se relacionan con una tendencia mayor a la aparición de CEP y melanomas⁹².

La sobreexpresión de p16 es poco frecuente en los CECC no relacionados con HPV y se da siempre en los HPV positivos. En los CEP la sobreexpresión de p16 es frecuente pero se considera independiente de la acción del HPV.

1.6.2. EGFR

EGFR pertenece a la familia Erb/HER de receptores transmembrana tirosina quinasas.

Entre los cuatro miembros de esta familia se incluyen EGFR y HER2/neu (o ErbB-2)⁹³.

La unión con ligandos tales como TGF- α o EGF provoca la autofosforilación del receptor y a su activación, desencadenando la activación de varias cascadas de señalización tales como Ras/RAF/MEK/ERK, PTEN/PI3K-Akt, Stat y la vía de la fosfolipasa C γ ⁹⁴ (Figura 9).

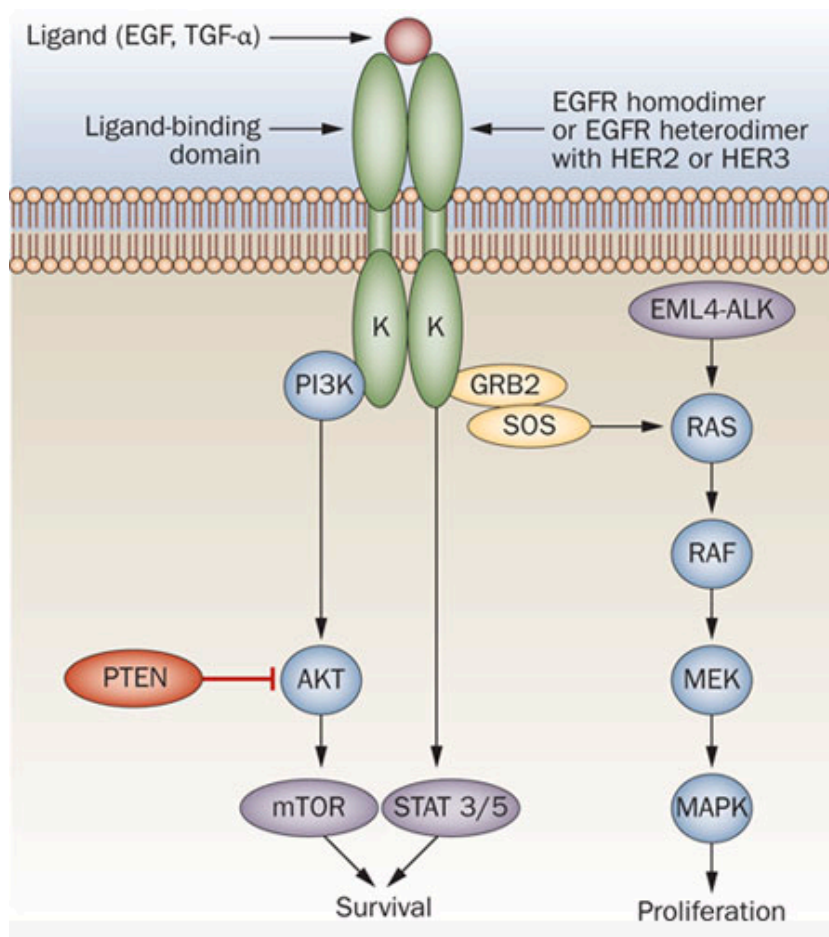


Figura 9: EGFR y activación de cascadas de señalización. (Imagen tomada de *Nature Reviews. Clinical Oncology*⁹⁵).

La activación de estas vías promueve la proliferación de células tumorales, su supervivencia, la capacidad invasiva y la angiogénesis.

EGFR se puede expresar en el núcleo, donde actúa como un activador de la transcripción. Se ha visto que en pacientes con tumores epidermoides de orofaringe, una mayor expresión de EGFR nuclear se relacionaba con una mayor tasa de recidivas y una menor supervivencia libre de enfermedad⁹⁶.

La sobreexpresión de EGFR se ha detectado en muchos tumores malignos epiteliales como la vesícula, mama, pulmón, cerebro, estómago, próstata, ovario y páncreas.

En los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello EGFR está sobreexpresado hasta en un 90% de los casos y se suele acompañar de sobreexpresión de sus ligandos⁹⁴.

La sobreexpresión de EGFR puede manifestarse por varias causas. Una de ellas es la amplificación del gen de EGFR, que no es muy frecuente en los carcinomas de cabeza y cuello⁹⁴ pero lo es más en los de piel^{97,98}. Otro mecanismo para la activación de la vía de EGFR es la expresión de una proteína truncada carente del dominio extracelular (EGFRvIII) como resultado de la delección de los exones 2 al 7 del gen EGFR. Cuando esto sucede, el dominio quinasa intracelular está activado de forma constitutiva. Otras causas posibles pueden ser la sobreexpresión de sus ligandos o la pérdida de sus inhibidores.

En los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello^{94,99} se ha relacionado la sobreexpresión de EGFR con una mayor agresividad y una peor supervivencia.

La sobreexpresión de EGFR en muchos carcinomas epidermoides es muy frecuente y eso lo convierte en una importante diana terapéutica. Se ha ensayado con muchas moléculas capaces de inhibir EGFR, de las cuales probablemente sea el anticuerpo monoclonal cetuximab la más representativa. El cetuximab se une al dominio extracelular de EGFR impidiendo su activación. Se ha utilizado sólo o asociado a radioterapia y a quimioterapia.

Tanto en cabeza y cuello como en piel¹⁰⁰, el cetuximab está aceptado como un tratamiento adecuado para carcinomas epidermoides en estadios avanzados, con la intención de disminuir la proliferación celular y con ello estabilizar la enfermedad y controlar los síntomas.

1.6.3. PTEN

PTEN es un gen supresor de tumores localizado en 10q23 que forma parte de la vía de señalización PTEN/PI3K/Akt.

La inactivación de PTEN es un fenómeno frecuente en muchos tipos de cánceres humanos. La pérdida de la función del gen se puede producir por múltiples motivos, como las mutaciones, deleciones o metilaciones. En experimentos con ratones transgénicos se ha observado que la pérdida homocigota de PTEN es incompatible con la vida en el periodo embrionario, mientras que los sujetos portadores de una pérdida heterocigota del gen son más susceptibles a las neoplasias^{101,102}.

Las mutaciones germinales de PTEN son la causa de los síndromes hereditarios PHTS (*PTEN hamartoma syndromes*) entre los que se incluye los síndromes de Cowden, Bannayan–Zonana, Lhermitte–Duclos, Proteus, y Proteus-like¹⁰³. Dichas mutaciones son responsables de estos síndromes y llevan a la disfunción de PTEN y a la formación de tumores benignos y malignos de varias localizaciones incluyendo la piel.

La proteína quinasa específica de serina/treonina Akt (proteína quinasa B) es activada por receptores de membrana. Su función es aumentar la síntesis de proteínas, el crecimiento celular, la progresión del ciclo celular y la supervivencia celular. La activación de Akt es dependiente de fosfoinosítoles producidos por la PI3-quinasa que a su vez es regulada negativamente por PTEN. PTEN tiene una actividad fosfatasa lipídica y se encarga de la desfosforilación del fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP3) interrumpiendo así la vía de Akt (Figura 10).

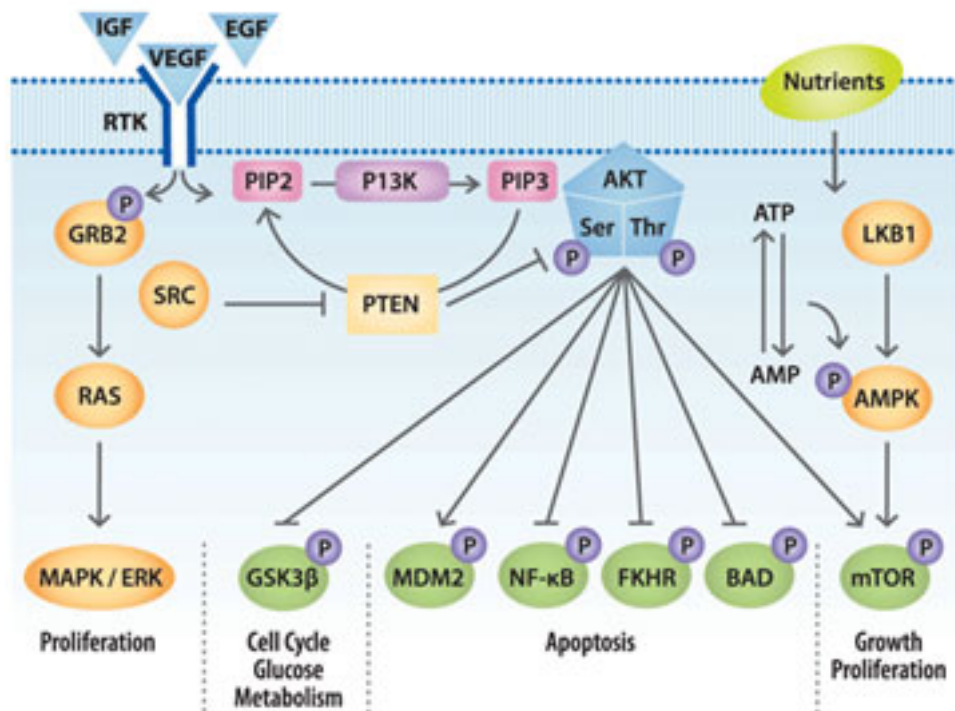


Figura 10: Esquema de la vía PI3K PTEN AKT (Imagen tomada de *genengnews.com*. Michel Becker).

Para la actividad fosfatasa lipídica PTEN se homodimeriza. Si bien la carencia de uno de los alelos ya genera una tendencia a la aparición de neoplasias por el mecanismo de haploinsuficiencia, se ha observado que la existencia de un alelo mutado genera una heterodimerización que es todavía más perjudicial¹⁰⁴.

Mediante actividad fosfatasa proteica se ponen de manifiesto otras funciones de PTEN como son la inhibición de la migración celular y el arresto del ciclo celular¹⁰³. Recientemente se están descubriendo nuevas funciones fosfatasa-independientes de PTEN que se llevan a cabo en el núcleo, como la contribución a la estabilidad cromosómica y la reparación de roturas de doble cadena del ADN¹⁰⁵.

1.6.4. TP53/p53

El gen TP 53 se encuentra en el cromosoma 17p13 y codifica la proteína p53. La inactivación de este gen supresor de tumores es una de las alteraciones más frecuentes observadas en los cánceres humanos, ya sea mediante mutaciones somáticas o a causa de la inactivación mediada por HPV⁶⁷.

Es un factor de transcripción homotetramérico encargado de organizar una respuesta transcripcional global que inhibe la proliferación celular (senescencia) o induce la apoptosis cuando es activado por estrés celular como irradiación, hipoxia, daño genómico o activación oncogénica¹⁰⁶. Forma parte de una red de señalización integrada, además, por las proteínas Rb, p16 y p14 junto a las que cumple las citadas funciones de senescencia y apoptosis. Esta red de señalización está alterada en la mayoría de los tumores (Figura 11).

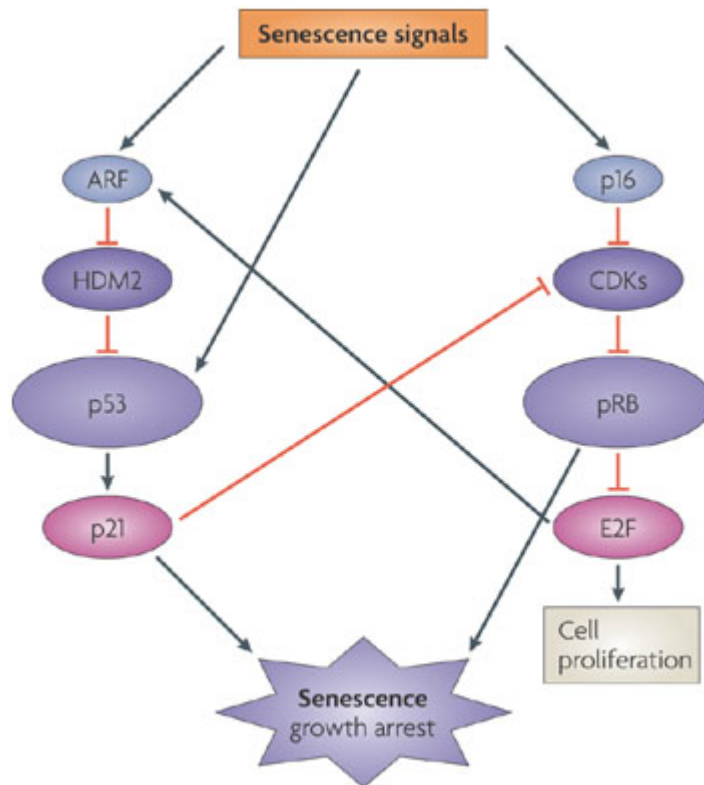


Figura 11: Red de señalización en la que se encuentra incluido p53 (Imagen tomada de *Nature reviews. Molecular cell biology*).

La forma más frecuente de alteración de la ruta de p53 es la mutación puntual que impide la unión específica de la proteína a su secuencia de reconocimiento en el ADN. Otras formas de disfunción son mediante la inactivación de la proteína, como sucede en el caso de la infección por el virus del papiloma humano, en la que la proteína E6 se une a p53 y lo inactiva funcionalmente¹⁰⁷.

Puede dar lugar a la apoptosis mediante la inducción de la expresión de la proteína pro-apoptótica Bax en respuesta al daño del ADN. La estrategia más común de las células cancerosas para evitar la apoptosis es a través de la pérdida funcional de p53.

MDM2 es el principal antagonista de p53. La interacción entre ambas moléculas lleva a la inactivación y degradación de p53. Varios mecanismos de estrés, como la hiperproliferación celular o el daño en el ADN inducen la actividad de p53 mediante la desunión del complejo p53-MDM2¹⁰⁸.

Actualmente se está estudiando p53 como una diana terapéutica a través de pequeñas moléculas como nutlin, RITA, PRIMA-1 y PRIMA-1MET, que pueden devolver su función a p53 mutante. También se dispone de moléculas capaces de antagonizar MDM2 cuando está sobreexpresada para evitar la degradación excesiva de p53¹⁰⁹.

2. Hipótesis

El oído externo está formado por el CAE y por el pabellón auricular. En la piel de ambas localizaciones puede aparecer un carcinoma epidermoide. Aunque histológicamente son indistinguibles, los factores clínicos y etiológicos diferentes entre los dos tipos de tumor (exposición a radiación solar en el CEPA y no en el CECAE) podrían provocar la existencia de alteraciones genético-moleculares distintas con implicaciones evolutivas y pronósticas.

3. Objetivos

Se analizarán las alteraciones genético-moleculares de una serie de CECAE y de CEPA, con el objetivo principal de encontrar biomarcadores que permitan diferenciar estos dos tumores y que se relacionen con el comportamiento clínico.

- 1.** Describir los aspectos clínico-patológicos de las series de pacientes con CECAE y CEPA.
- 2.** Analizar el patrón genómico de las alteraciones génicas en los CECAE y CEPA y determinar si existen diferencias entre ambos tipos de tumor.
- 3.** Evaluar y comparar el número de copias génicas de 4 de los genes más frecuentemente alterados en los carcinomas epidermoides (EGFR, PTEN, CDKN2A y TP53) en los CECAE y CEPA.
- 4.** Evaluar y comparar la expresión proteica correspondiente a esos 4 genes (EGFR, PTEN, p16 y p53) en los CECAE y CEPA.
- 5.** Relacionar las alteraciones genéticas con variables clínico-patológicas, etiológicas y de seguimiento.

4. Material y métodos

4.1. Sujetos a estudio

Se estudió de forma retrospectiva a 39 pacientes diagnosticados de CECAE y a 36 con diagnóstico de CEPA.

De los 39 pacientes diagnosticados de CECAE, 29 fueron tratados por el servicio de otorrinolaringología del Hospital Universitario Central de Asturias mediante cirugía con intención curativa (salvo un caso, que se consideró subsidiario de tratamiento paliativo desde el momento del diagnóstico) entre 1989 y 2006. 10 pacientes fueron tratados mediante cirugía con intención curativa por el servicio de otorrinolaringología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona entre 1995 y 2007.

Los 36 pacientes diagnosticados de CEPA fueron tratados mediante cirugía con intención curativa (salvo un caso que se consideró candidato a tratamiento paliativo desde el momento del diagnóstico y otro que se trató mediante radioterapia) en el Hospital Universitario Central de Asturias por el servicio de otorrinolaringología o el servicio de cirugía plástica entre 1993 y 2008.

El diagnóstico anatomopatológico de carcinoma epidermoide fue realizado sobre la pieza de resección quirúrgica por un patólogo experimentado en cabeza y cuello en el Servicio de Anatomía Patológica.

Las muestras tumorales fueron obtenidas en fresco en los casos que fue posible y de piezas incluidas en parafina procedentes del servicio de anatomía patológica en el resto de los casos.

Los datos clínicos se obtuvieron de la revisión de las historias clínicas, pruebas de imagen e informes anatomopatológicos.

Para la estadificación de los CECAE se utilizó la clasificación de Pittsburgh⁴.

Para la estadificación de los CEPA se utilizó la clasificación de la AJCC/UICC (6ª edición)¹¹⁰.

Para los CECAE, el periodo de seguimiento osciló entre 1 y 153 meses, con una media de 36 y una mediana de 19 meses.

Para los CEPA, el periodo de seguimiento fue de 1 a 154 meses, con una media de 43 y una mediana de 28 meses.

Las muestras biológicas fueron procesadas en los laboratorios del Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias.

Las variables clínico-patológicas estudiadas fueron:

1. Tipo de tumor (CECAE o CEPA)
2. Edad
3. Sexo
4. T
5. N
6. M
7. Grado de diferenciación histológica
8. Bordes de resección quirúrgica
9. Estadio
10. Factores de riesgo: radioterapia previa, otitis crónica, exposición laboral a la radiación solar
11. Tipo de tratamiento primario
12. Tratamientos complementarios
13. Tiempo de seguimiento
14. Aparición de recidiva
15. Situación del paciente: vivo, muerto por el tumor o muerto por otra causa

4.2. Extracción de ADN

Los protocolos de extracción de ADN para todas las muestras se realizan en base al uso de columnas de afinidad (QIAamp QiAgen, Valencia, CA, USA). De las muestras tumorales se obtienen tres cortes de 50 μ m. Se realiza una microdissección de los cortes

en tres portas, recogiendo el material en un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml y a continuación se lleva a cabo la desparafinación.

Se añade al tubo de microcentrifuga 1 ml de Xileno, manteniendo la mezcla a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se centrifuga a 14.000 rpm durante 10 minutos y se retira el sobrenadante. Se añade al tubo 1 ml de metanol y se agita para favorecer la mezcla. Se centrifuga otra vez durante 10 minutos, retirando el sobrenadante. Se añade 1 ml de PBS y se agita el contenido del tubo, volviendo a centrifugar durante 10 minutos y retirando el sobrenadante. Finalmente se añade 1 ml de tiocianato sodico (NaSCN) y se incuba toda la noche a 37°C en una placa térmica de agitación

A la mañana siguiente se centrifugan los tubos a 14.000 rpm durante 10 minutos y se decanta el sobrenadante con la ayuda de una pipeta. A continuación se añade en cada tubo 1 ml de PBS para lavar y eliminar los restos de tiocianato sodico de los tubos, favoreciendo la mezcla mediante agitación. Se vuelve a centrifugar durante 10 minutos, retirando el sobrenadante.

Tras el desparafinado se lleva a cabo la lisis del tejido, añadiendo 200 µl de tampón de lisis ATL y 20 µl de proteinasa K (concentración de almacenamiento 20 mg/ml) a cada tubo. Se mezcla la solución con un agitador y se deja incubando a 56°C en un termoagitador durante 3 noches, añadiendo 20 µl de proteinasa K cada 12 horas hasta un total de 5 dosis.

Tras las 72 horas de lisis con el tampón ATL y la proteinasa K, se añaden 200 µl de tampón de lisis AL, se agitan enérgicamente y se incuban 10 minutos a 70°C. A continuación se les añaden 200 µl de alcohol absoluto y se agitan durante 15 segundos para precipitar el ADN. La muestra obtenida en el tubo de microcentrifuga se aplica a una columna de afinidad (*QiAamp spin column*) que se coloca en tubos de recolección de 2 ml. Las columnas y los tubos de recolección se centrifugan durante 1 minuto a 8.000 rpm, eliminando después el filtrado.

Posteriormente, para purificar el ADN, se añaden a las columnas 500 µl de la solución AW1 y se centrifugan a 8.000 rpm durante un minuto. Tras eliminar el filtrado se realiza un segundo lavado, añadiendo a las columnas 500 µl del tampón AW2, y centrifugando a 14.000 rpm durante 3 minutos. Finalmente se coloca cada columna de afinidad en un nuevo tubo de microcentrifuga y se le añaden 70 µl del tampón AE y se dejándolo

reposar 5 minutos a temperatura ambiente. Se procede a la última centrifugación (8.000 rpm durante 1 minuto). El ADN que se obtenido debe guardarse a 4°C.

La concentración y la pureza del ADN obtenido fueron evaluados mediante la medida de las absorbancias a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (versión 3.1.0, NanoDrop Technologies Inc.)

4.3. Técnica de la MLPA

La MLPA es una técnica de biología molecular que permite amplificar en un único experimento múltiples secuencias distintas de ADN o ARNm¹¹¹. En cada experimento se utilizaron un mínimo de 8 muestras, incluyendo siempre una con ADN control. Todas las muestras se procesaron al menos dos veces en distintos experimentos. Este ADN control provenía de sangre periférica de donantes sanos.

4.3.1. Tipos de kits

Se utilizaron 2 “kit” comercializados (MRC-Holland, Amsterdam, Holanda), el SALSA P084 HNSCC1 con 42 sondas para genes implicados en el desarrollo del carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (CECC) y el SALSA P105-C1 con 45 sondas para detectar alteraciones en los genes *EGFR*, *TP53*, *PTEN*, *ERBB2* y *CDKN2A*. Ambos experimentos se realizaron por separado, pero al ser idénticos en su ejecución describiremos sólo el procedimiento común.

Cada sonda se compone de oligonucleótidos, uno sintético y otro derivado del vector M13. El oligonucleótido sintético está formado por un “primer” en el extremo 5’ de 19 nucleótidos (“primer” Y) y por una secuencia de hibridación de 21-30 nucleótidos que se unirá a la muestra de ADN. El oligonucleótido derivado del vector M13 tiene un tamaño diferente en cada sonda, que varía gracias a una secuencia de relleno (*stuffer sequence*) de diferentes tamaños que se intercala entre el *primer* de 36 nucleótidos, situado en el extremo 3’ (*primer* X) y la secuencia de hibridación de 25-43 nucleótidos que se unirá a la muestra de ADN.

La mezcla de sondas de cada “kit” contiene además sondas de control interno llamadas DQ (*DNA Quality*). En la amplificación por PCR estas sondas control generan productos más pequeños que los amplificados por las 45 ó 42 sondas de genes. El control interno

determina si la calidad y la concentración del ADN de la muestra son adecuadas para obtener un resultado óptimo. El control interno está formado por dos tipos de sondas: 1) Cuatro fragmentos de ADN que generan productos amplificados de 64, 70, 76 y 82 pares de bases (pb), incluso si se omite el proceso de ligación; 2) Un producto de amplificación de 94 pb dependiente del proceso de ligación del ADN de la muestra.

El tamaño de los cuatro picos del control interno (64-82 pb), una vez amplificados por PCR, depende de la cantidad de ADN de la muestra. Serán difícilmente visibles si el ADN es >100 ng y tendrán un tamaño menor que el fragmento amplificado de 94 pb si la cantidad de ADN es de 50 ng aproximadamente. Si estos 4 fragmentos tienen un tamaño similar o mayor que el fragmento de 94 pb y los productos de PCR de 130-482 pb, significa que la reacción de ligación ha fallado o que la cantidad de ADN es escasa y los resultados obtenidos no tienen validez. El tamaño del pico de 94 pb debe ser similar al obtenido por los productos amplificados de las sondas de genes y nos sirve de control para saber que el experimento ha sido satisfactorio.

Tabla 6: Descripción de las sondas del kit P084 en orden en cromosómico. Longitud de los fragmentos, nombre de los genes y localización cromosómica. Seis genes (tachados) no fueron analizados porque sus resultados no fueron reproducibles en ADN extraído a partir de bloques de parafina.

Tamaño	Gen	cromosoma
472	NRAS	01p13.2
283	LMNA	01q21.2
256	IL1A	02q14
220	TANK	02q24
154	MLH1	03p22.1
337	MLH1	03p22.1
454	CTNNB1	03p22
166	CASP6	04q25
373	IL2	04q26
481	MFHAS1	08p23.1
130	CTSB	08p22
184	N33	08p22
445	PTP4A3	08q24.3
418	RECQL4	08q24.3
202	CDKN2A	09p21
211	CDKN2B	09p21
364	AI651963	10p14
463	RENT2	10p14
136	CREM	10p12.1

292	CCND1	11q13
229	EMS1	11q13
310	IL18	11q23.1
238	IGSF4	11q23
355	BRCA2	13q12.3
328	RB1	13q14.2
148	DLEU1	13q14.3
382	BLM	15q26.1
400	IGF1R	15q26
193	TP53	17p13.1
301	TP53	17p13.1
346	TP53	17p13.1
391	TP53	17p13.1
409	TP53	17p13.1
142	ERBB2	17q21.1
319	CDH2	18q11.2
436	MADH2	18q21.1
274	BCL2	18q21.2
247	STK11	19p13.3
265	CDKN2D	19p13
160	BCL2L1	20q11.1
175	MYBL2	20q12
427	PTPN1	20q13.1

Tabla 7: Descripción de las sondas del kit P105-C1. Longitud de los fragmentos, nombre de los genes y sus exones y localización cromosómica.

Tamaño	Gen	Exón	cromosoma
202	CDKN2A	p16 exón 2	9p21
160	CDKN2A	p14ARF promotor	9p21
265	CDKN2A	p14ARF promotor	9p21
274	CDKN2A	p16 exón 3	9p21
355	CDKN2A	intrón p16 y p14 exón 1	9p21
373	EGFR	1	7p12
418	EGFR	2	7p12
391	EGFR	3	7p12
310	EGFR	4	7p12
154	EGFR	5	7p12
136	EGFR	6	7p12
184	EGFR	7	7p12
427	EGFR	8	7p12

214	EGFR	13	7p12
238	EGFR	22	7p12
454	EGFR	16	7p12
142	ERBB2		17q12
409	ERBB2		17q12
292	PTEN	1	10q24
328	PTEN	1	10q24
190	PTEN	2	10q24
337	PTEN	2	10q24
178	PTEN	3	10q24
232	PTEN	4	10q24
364	PTEN	5	10q24
319	PTEN	6	10q24
148	PTEN	7	10q24
400	PTEN	8	10q24
436	PTEN	9	10q24
226	Ref HNF1A		12q24
445	Ref ING1		13q24
208	Ref DYSF		2p13
382	Ref MSH6		2p16
463	Ref SIX3		2p21
472	Ref CTNNB1		3p21
172	Ref TGFBR2		3p22
128	Ref IL4		5q31
166	TP53	1	17p13
301	TP53	1	17p13
196	TP53	2	17p13
220	TP53	4	17p13
247	TP53	5	17p13
256	TP53	6	17p13
283	TP53	8	17p13
346	TP53	12	17p13

4.3.2. Pasos del experimento

El *primer día* del experimento el ADN, previamente extraído de cada muestra (100-200 ng), se desnaturaliza en un termociclador, aplicando un ciclo de 5 minutos a 98°C y enfriando posteriormente a 25°C. Se mezcla el ADN desnaturalizado con las sondas del “kit” y su correspondiente tampón de hibridación y se coloca, de nuevo, en el termociclador en un ciclo único de un minuto a 95°C y 16 horas a 60°C para que las sondas hibriden sobre el ADN de la muestra.

El *segundo día* se procede a la ligación de los dos oligonucleótidos de las sondas que han hibridado sobre el ADN. Para ello, se añade al tubo de PCR la mezcla de ligación con el enzima ligasa y su tampón y se coloca de nuevo en el termociclador 15 minutos a 54°C, seguido de 5 minutos a 98°C, y posterior enfriamiento a 25°C. Una vez ligados los moldes de las 42 ó 45 regiones, se procede a preparar la mezcla de tampón y los *primers* para la PCR, el tampón enzima de dilución y la polimerasa para la amplificación de las sondas. Todas las sondas ligadas poseen las mismas secuencias en sus extremos, permitiendo su amplificación simultánea por PCR utilizando sólo un par de *primers*. Los oligonucleótidos no ligados al ADN de la muestra no serán amplificados por PCR y, por tanto, no precisan ser eliminados (Figura 12).

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

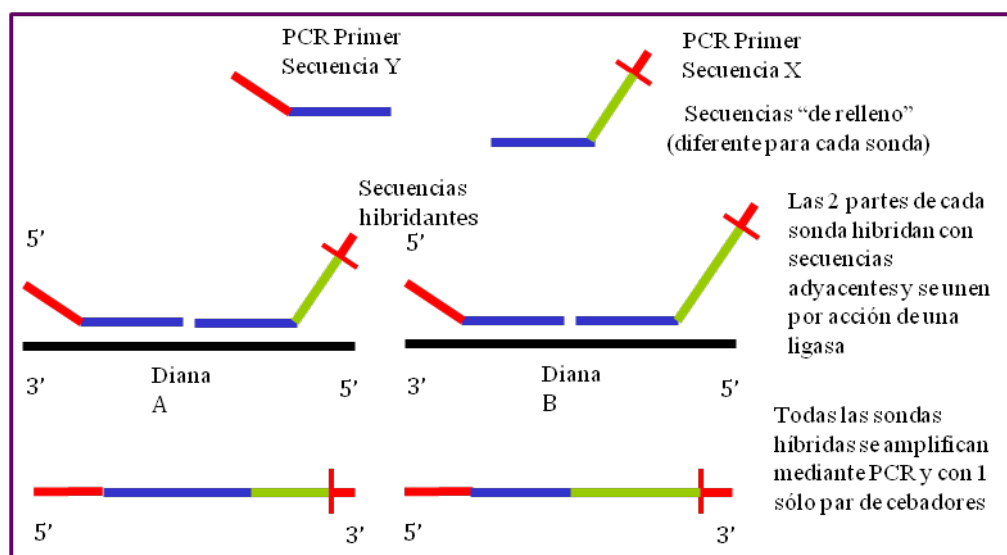


Figura 12: Bases moleculares de la MLPA.

Cada sonda da lugar a un producto de amplificación de tamaño único de entre 130 a 482 pb debido a la diferencia en tamaño de la secuencia relleno. Los productos amplificados de las sondas se analizan mediante electroforesis capilar. Para ello mezclamos 2 µL del producto de amplificación con 10 µL de formamida y 0,5 µL de

marcador interno. La mezcla se desnaturaliza por calor y se somete a electroforesis capilar en un equipo "ABI Prism 3100" (Applied Biosystems, Warrington, UK). Los capilares están rellenos de un polímero que ofrece dificultad a la migración permitiendo separar los fragmentos por su tamaño, corriendo los fragmentos más pequeños más rápido que los grandes. Al final del recorrido hay un láser y un sistema de captura de la señal de fluorescencia que permite detectar los distintos productos. Estos productos finales serán analizados con el software "GeneScan v3.7" (Applied Biosystems, Warrington, UK), que permite determinar su tamaño por interpolación con distintos fragmentos de tamaño conocido del marcador interno y cuantificar cada producto en función de la intensidad de fluorescencia. Cada sonda vendrá representada por un pico. La señal relativa de cada sonda se define dividiendo la medida del área de cada pico entre la suma de todas las áreas de todos los picos de sondas de una muestra.

4.3.3. Interpretación de los datos

Para definir la existencia de una ganancia o una pérdida de material génico en cada una de las sondas de una muestra tumoral hay que normalizar los datos obtenidos con experimentos con DNA control. Para cada gen, el número de copias fue obtenido primero por calcular la área debajo de cada pico relativo a la suma de las áreas de todos los picos y segundo por dividir la área relativo debajo de cada pico de la muestra tumoral por la área relativo debajo del pico de la muestra control. Cuando la relación tumor/control es mayor de 1,2 se interpreta como ganancia, si es menor de 0,8 se interpreta como pérdida (Figura 13).

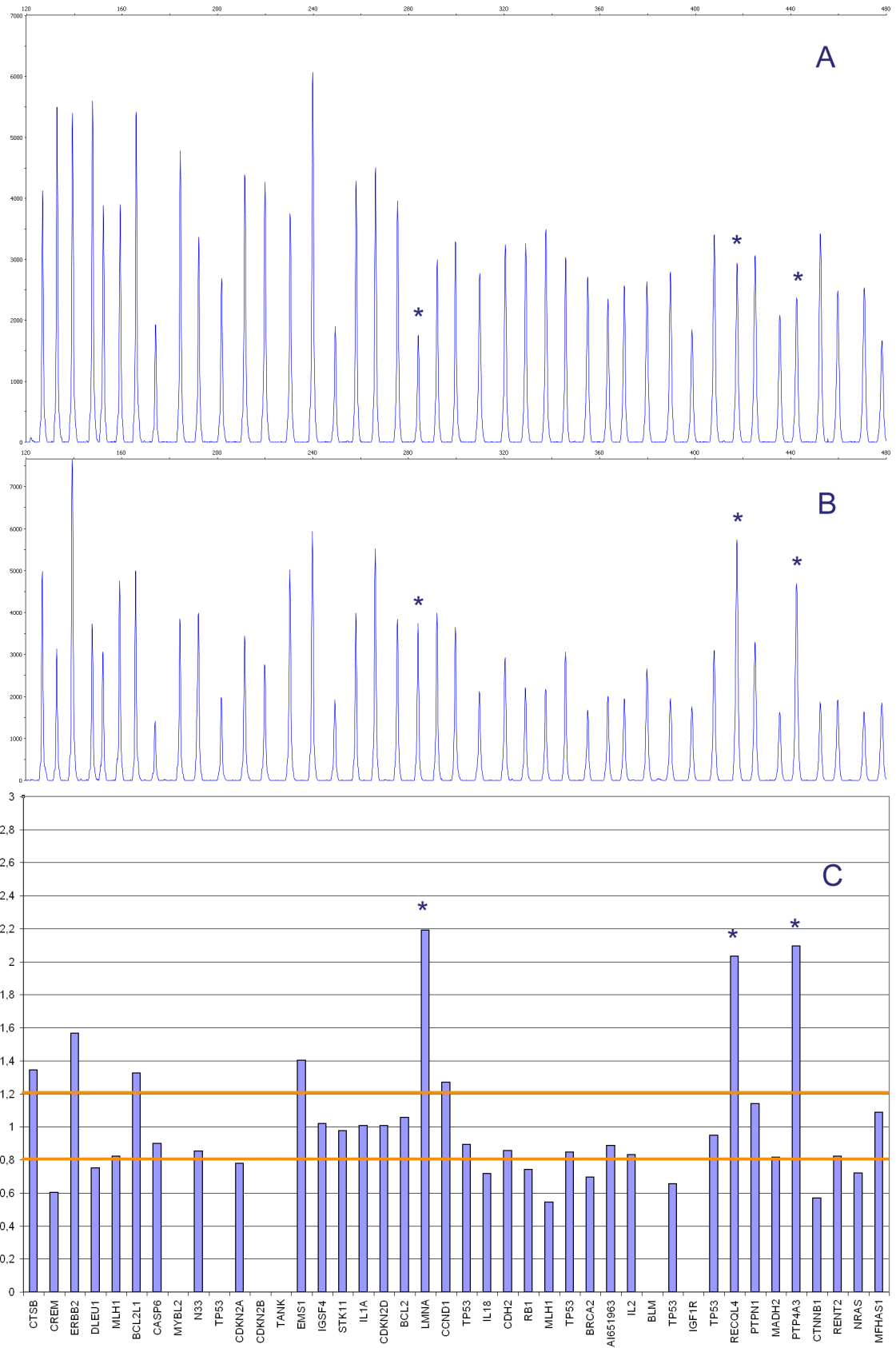


Figura 13: Resultado del análisis de los fragmentos producidos por la MLPA usando ADN control (A) y ADN del tumor (B). Gráfico expresando la relación entre los picos tumor y los picos control (C). Los asteriscos marcan los picos y barras correspondientes a LMNA, RECQL4 y PTP4A3.

4.4. Técnica de la inmunohistoquímica (IHQ)

Se analizó la expresión proteica de las proteínas p16, EGFR, p53 y PTEN. La IHQ es un procedimiento histopatológico basado en el uso de un anticuerpo específico, previamente marcado mediante un enlace químico con una enzima, que puede transformar un sustrato en visible sin afectar la capacidad del anticuerpo para formar un complejo con el antígeno. Este complejo antígeno-anticuerpo es aplicado a una muestra de tejido orgánico, correctamente fijada e incluida en parafina, mediante la utilización de alguna de las técnicas específicas (peroxidasa antiperoxidasa, fluoresceína, etc.) Así, el complejo puede ser localizado e identificado dentro de las muestras tisulares o citológicas a estudiar, logrando obtener marcadores antigénicos característicos de distintas líneas de diferenciación y funcionalismo celular, con lo que se determina el tipo de células en las muestra.

4.4.1. Pasos de la técnica

Los tejidos son fijados en formol, incluidos en parafina y cortados en secciones de 3 μm . A continuación el tejido se adhiere a los portas siliconizados (DakoCytomation) que se dejan en la estufa a 56-58°C, un mínimo de 2 horas y un máximo de 18. Posteriormente se realiza el desparafinado de las muestras con xilol y la hidratación con alcoholes de graduación decreciente. Más adelante se efectúa el desenmascaramiento antigénico con una solución recuperadora de antígenos en el Pmlink de Dako a 95°C durante 20 minutos, manteniendo las preparaciones dentro de la solución recuperadora de antígenos hasta que la temperatura baja a 60°C. Finalizado el proceso se colocan las preparaciones en un recipiente con 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. Se añade el anticuerpo monoclonal primario dirigido hacia la proteína que deseamos detectar durante un tiempo variable, según el tipo de anticuerpo utilizado. La inmunodetección fue realizada con el sistema EnVision Plus “anti-mouse” empleando como sustrato el cromógeno diaminobenzidina (DakoCytomation).

Para que el resultado sea reproducible, comparable y de calidad apropiada, depende de la elección del método de detección. En nuestro estudio, se ha utilizado el sistema de

polímeros de dextrano EnVision Plus (PDE) Dako, técnica de IHQ desarrollada recientemente. El sistema EnVision Plus es una técnica de tinción en dos pasos en la que al anticuerpo primario le sigue un polímero conjugado de alto peso molecular como es el dextrano, al que se conjugan de manera covalente un gran número de moléculas de enzima (peroxidasa de rábano) y del anticuerpo secundario. El sistema aumenta la sensibilidad y permite incrementar las diluciones de anticuerpo primario, con menos fondo que las técnicas tradicionales de avidina-biotina.

Como último paso se contrasta la preparación mediante hematoxilina durante un minuto y luego se deshidrata mediante alcoholes de graduación ascendente, colocando al final un cubreobjetos.

Tabla 8: Anticuerpos y condiciones utilizados en la IHQ.

Anticuerpo (AC)	pH	Dilución	Minutos incubación	Casa comercial	Tipo AC
PTEN	9	1:50	20	Dako	Monoclonal Ratón
p16	9	Prediluido	30	Cintec	Monoclonal Ratón
p53	9	1:10	15	Dako	Monoclonal Ratón
EGFR		Prediluido		Dako	Monoclonal Ratón

4.4.2. Interpretación de los datos

Los resultados de la IHQ fueron valorados por dos investigadores de manera independiente. Las muestras se evaluaron según la cantidad de células teñidas (extensión), con un valor de 1 a 3, siendo 1: 0-25% de células teñidas, 2: 25-50% y 3: >75%; Asimismo, se valoró la intensidad de tinción con valores del 1 a 3, siendo 1= tinción débil/leve, 2 = moderada y 3 = intensa. En caso de no presentar ninguna tinción se consideró negativa.

Tabla 9: Cuantificación de la expresión proteica

Proteína	Tinción	Cuantificación	Evaluación
EGFR	Membrana	% de células teñidas	> 10% = positivo
p16	Nuclear - Citoplasmática	% de células teñidas	> 0% = positivo
p53	Nuclear	% de células teñidas	> 10% = positivo
PTEN	Nuclear - Citoplasmática	(% de células teñidas 0-4) x (intensidad de tinción 1-3)	< 8 = negativo

4.5. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa estadístico SPSS (“Statistical Package for Social Science”) versión 22.0 para Macintosh (SPSS Inc., Chicago, IL). El test Chi cuadrado (χ^2) ha sido utilizado para la comparación de variables cuantitativas. La correlación entre la respuesta a la quimioterapia y la expresión de las proteínas a estudio se ha determinado mediante el Test exacto de Fisher. Para determinar la existencia de un patrón proteico relacionado con la respuesta a quimioterapia, se ha llevado a cabo una regresión logística multivariante. La supervivencia de los pacientes fue calculada empleando el método de Kaplan Meier y las diferencias fueron analizadas mediante el método de rangos logarítmicos (Log-rank). Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. En las tablas y gráficos incluidos en la sección de resultados también se ha especificado el valor p cuando, pese a no haber una significación estadística, parecía observarse una tendencia.

5. Resultados

5.1. Aspectos Clínico-patológicos

Se incluyó en el estudio a 75 pacientes, de los cuales 39 habían sido diagnosticados de un CECAE y 36 de un CEPA.

5.1.1. Aspectos clínico patológicos de los CECAE

De los 39 pacientes diagnosticados de CECAE, 23 (59%) eran varones y 16 (41%) mujeres (Figura 14).



Figura 14: Distribución por sexos en el CECAE.

La media de edad al diagnóstico fue de 72 años y la mediana de 75.

En la Figura 15, Figura 16 y Figura 17 se indican las frecuencias de T, N y estadio en nuestra muestra. En la Tabla 10 se expresa la frecuencia de las diferentes combinaciones de T y N. No hubo ningún paciente con metástasis a distancia en el momento del diagnóstico.

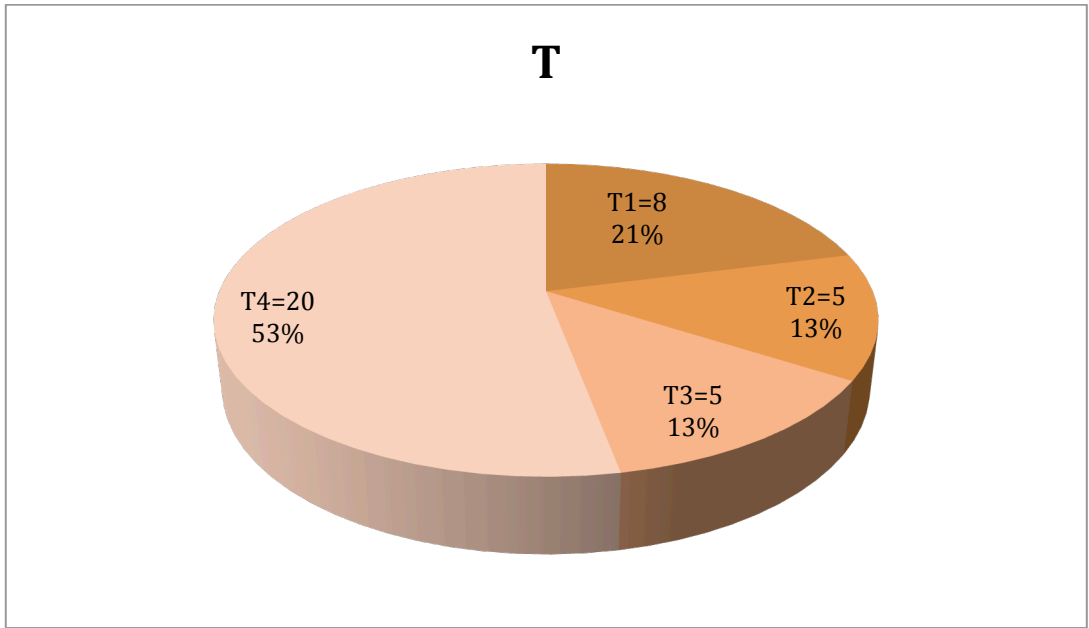


Figura 15: Distribución de la categoría T en el CECAE.

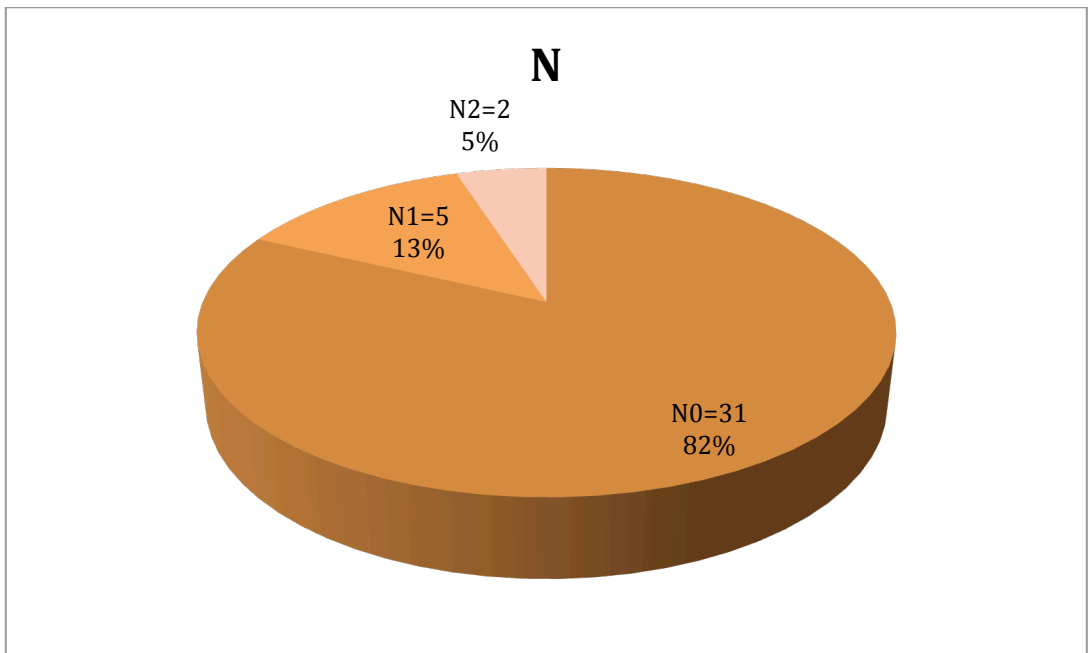


Figura 16: Distribución de la categoría N en el CECAE.

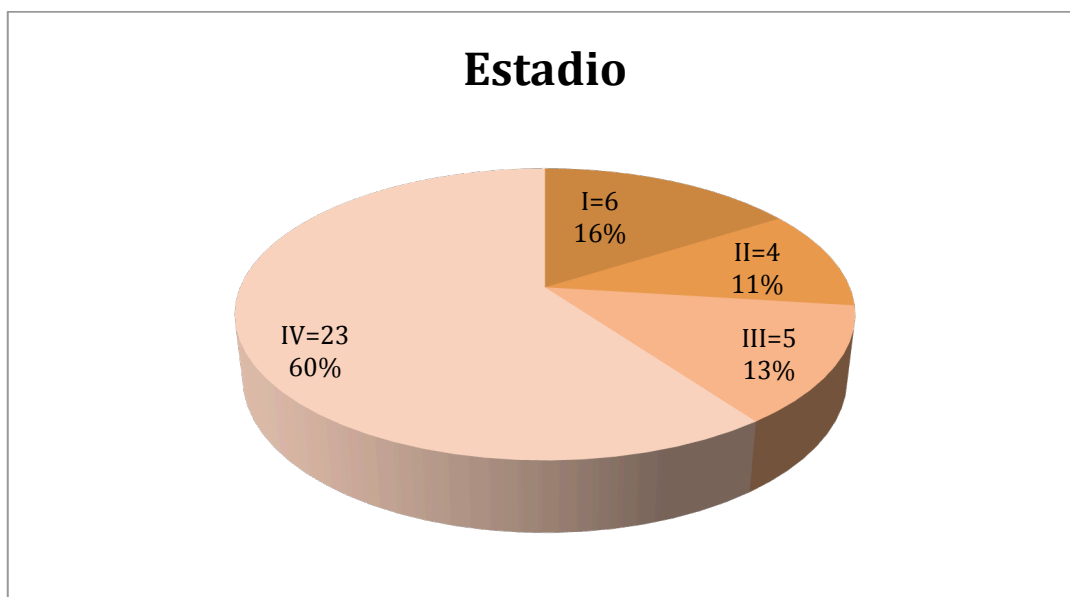


Figura 17: Distribución del estadio en el CECAE.

Tabla 10: Clasificación de los casos en función de la categoría T y N.

N \ T	1	2	3	4
0	6 (15%)	4 (10%)	4 (10%)	17 (45%)
1	1 (3%)	1 (3%)	1 (3%)	2 (5%)
2	1 (3%)	0	0	1 (3%)

Dieciocho tumores eran bien diferenciados (46%), 15 moderadamente diferenciados (38%) y 2 poco diferenciados (5%).

En los informes de anatomía patológica se informó de bordes de resección afectados microscópicamente en 8 casos (20%) y macroscópicamente en 4 casos (11%).

8 de los pacientes (21%) habían recibido tratamiento con radioterapia por patología de cabeza y cuello o base de cráneo (carcinoma indiferenciado de cávum, dos casos de tumor de pabellón auricular, adenoma hipofisario, carcinoma epidermoide de seno maxilar, meningioma selar, hemangiopericitoma maligno parotídeo y tumor frontal) antes

del diagnóstico de CECAE. Sólo 2 pacientes (5%) tenían historia previa de otitis crónica en el oído enfermo.

Todos los pacientes salvo uno (que sólo fue candidato a tratamiento paliativo desde el mismo momento de su diagnóstico) fueron tratados inicialmente con cirugía.

En 25 casos (66%) se realizó tratamiento adyuvante mediante radioterapia tras la cirugía primaria.

2 pacientes también recibieron quimioterapia como parte de su tratamiento inicial.

12 pacientes tuvieron una recidiva local (32%) y 4 regional (11%). En uno de los casos ambas fueron diagnosticadas de forma simultánea (3%) (Figura 18).

La media de tiempo transcurrido hasta la recidiva local fue de 13 meses (entre 3 y 37) y la mediana fue de 10. Hasta la recidiva regional la media fue de 20 meses (entre 13 y 24) y la mediana fue de 21. El caso de recidiva locorregional se dio a los 24 meses.

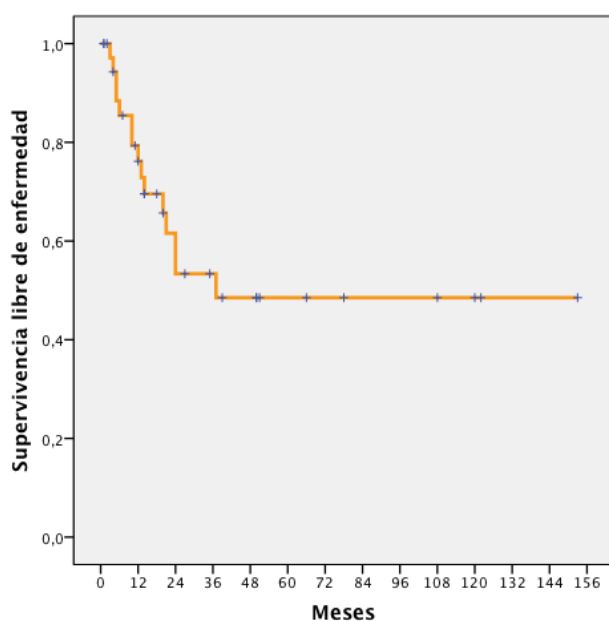


Figura 18: Supervivencia libre de enfermedad en el CECAE.

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre la categoría T ($p=0,471$) o el estadio ($p=0,800$) y la aparición de recidivas.

Se observó una tendencia a la aparición de recidivas en los pacientes que tenían metástasis regionales en el momento del diagnóstico ($p=0,085$) (Figura 19).

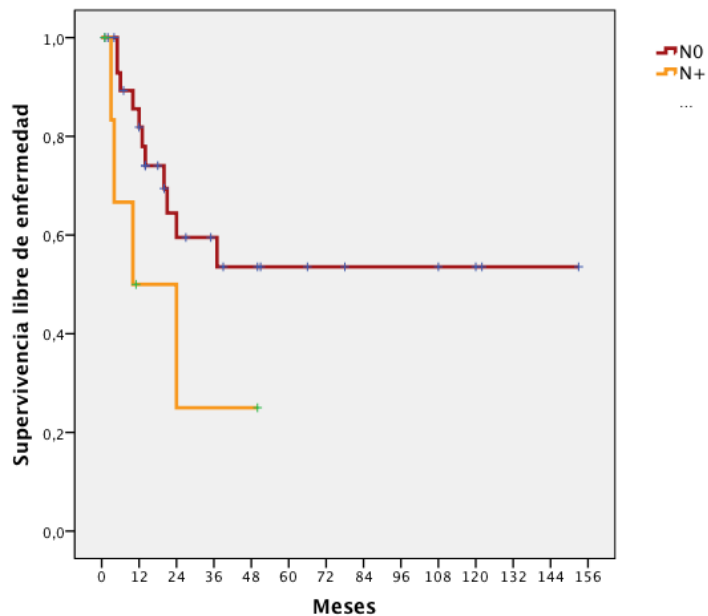


Figura 19: Supervivencia libre de enfermedad en función de N en el CECAE.

No hubo diferencia entre la aparición de recidivas y el grado de diferenciación histológica ($p=0,808$).

Hubo más recidivas en el grupo en el que los márgenes quirúrgicos estaban afectados por el tumor aunque no se llegó a obtener significación estadística ($p=0,508$).

Se observó una mayor tendencia a la recidiva en los pacientes que habían recibido radioterapia previa aunque sin llegar a la significación estadística ($p=0,164$) (Figura 20).

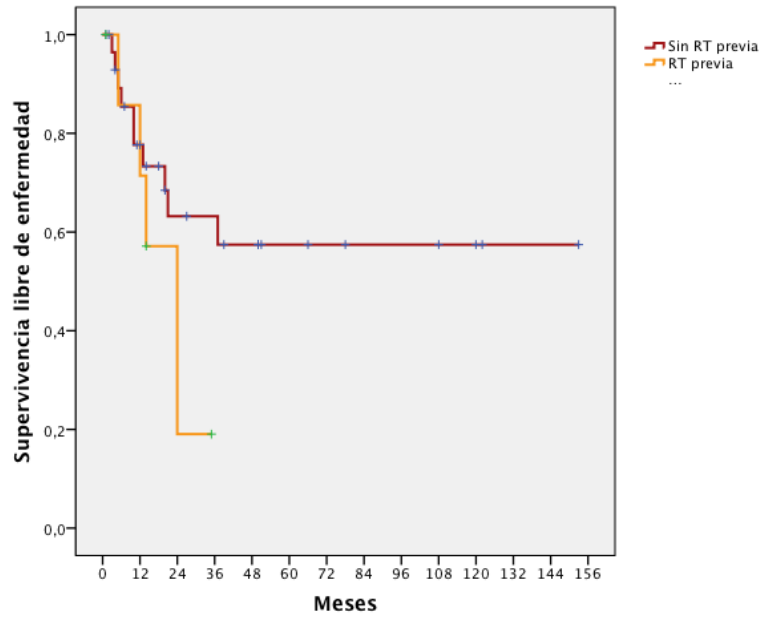


Figura 20: Tiempo libre de enfermedad en función de RT previa en el CECAE.

El supervivencia global a los tres años fue del 43% y del 28% a los cinco años (Figura 21).

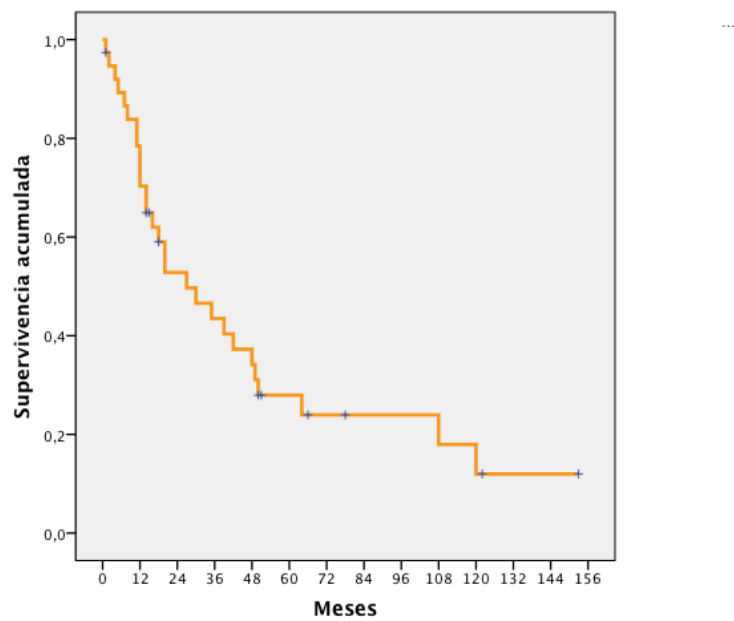


Figura 21: Supervivencia global en el CECAE.

La supervivencia específica de enfermedad (muertes directamente atribuibles al CECAE) fue del 57% a los tres años y del 48% a los cinco años (Figura 22).

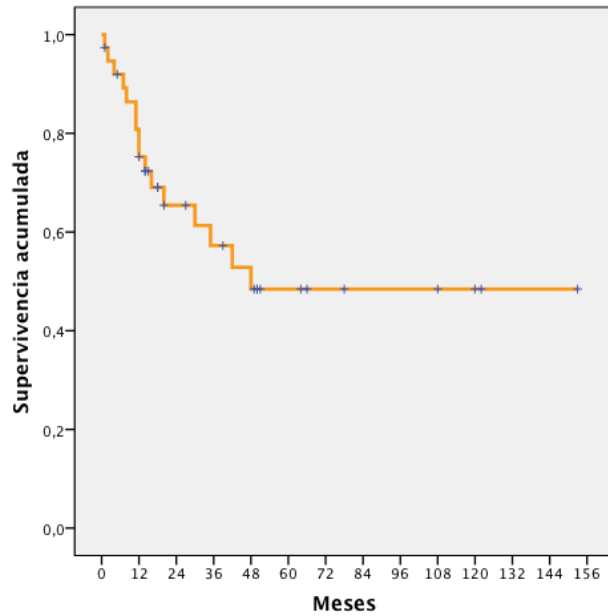


Figura 22: Supervivencia específica de enfermedad en el CECAE.

Para la comparación de supervivencia según los diferentes parámetros clínico-patológicos se han unido ciertos resultados de las variables con el fin de conseguir grupos más fácilmente comparables.

En la Figura 23 se refleja la supervivencia en función de la T: T1, 2 y 3 (n=18) comparado con T4 (n=20), siendo ésta mejor en el grupo de la T menor sin alcanzar la significación estadística (p=0,148).

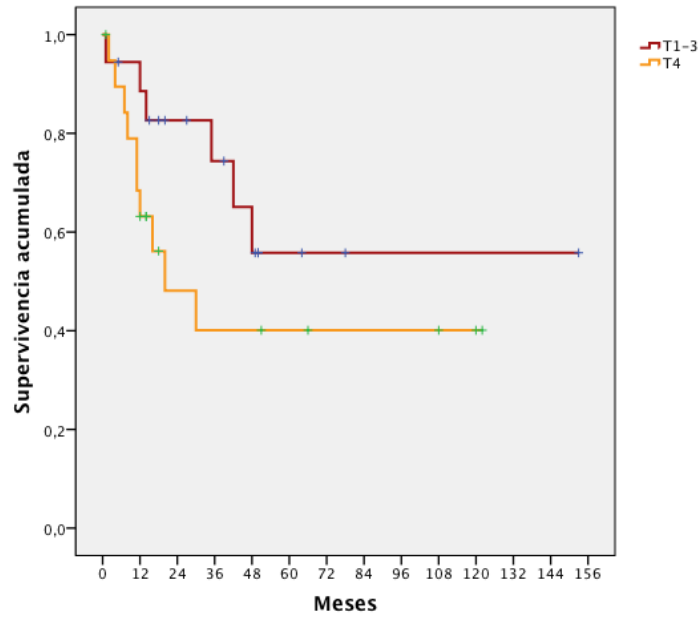


Figura 23: Supervivencia específica de enfermedad en función de la categoría T en el CECAE.

La Figura 24 representa la supervivencia en función de la existencia de metástasis ganglionares cervicales: N positivo (n=7) comparado con N negativo (n=31), siendo superior en el grupo N0 ($p=0,153$).

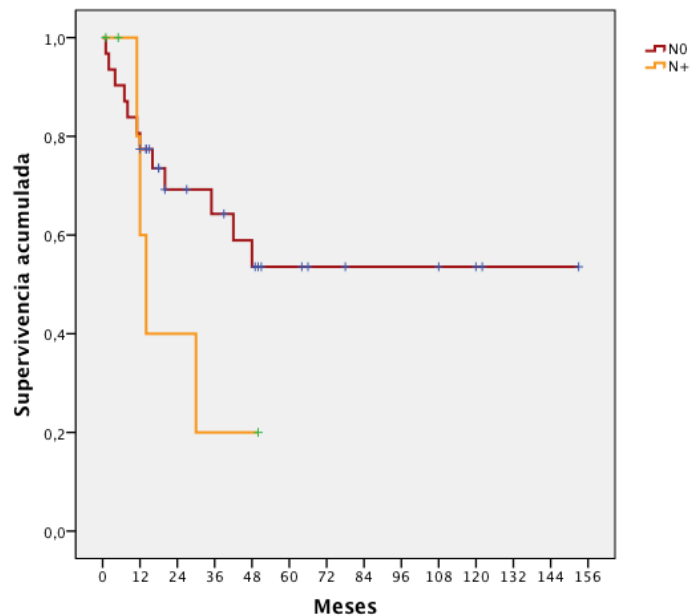


Figura 24: Supervivencia específica de enfermedad en función de N en el CECAE.

La supervivencia en función del estadio está reflejada en la Figura 25, donde se compara los estadios I, II y III (n=15) con el IV (n=23), encontrando una mayor supervivencia en el grupo que incluye los estadios menos avanzados (p=0,159).

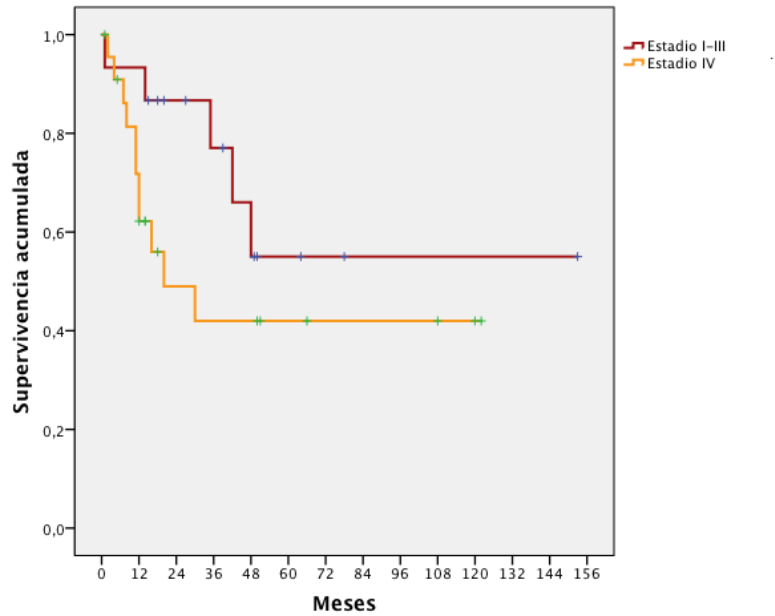


Figura 25: Supervivencia específica de enfermedad en función del estadio en el CECAE.

La supervivencia específica de enfermedad fue claramente peor en los pacientes que sufrieron una recidiva durante el periodo de observación (p=0,035) (Figura 26).

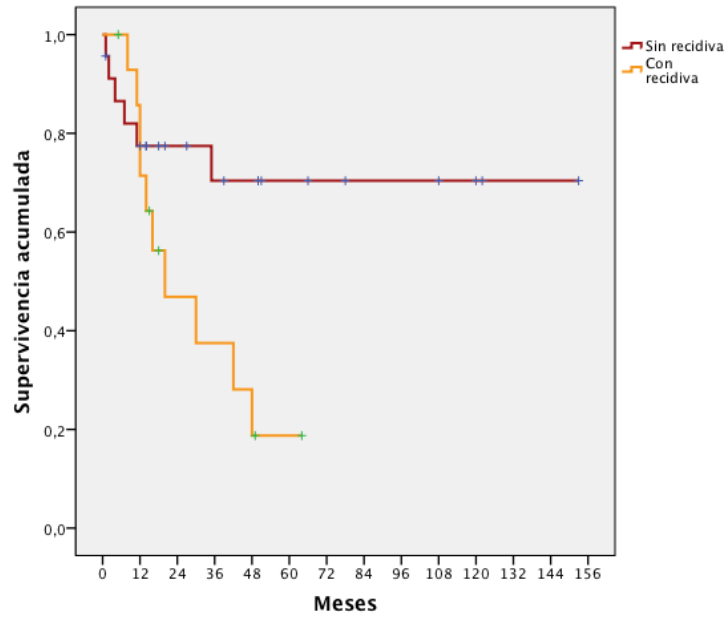


Figura 26: Supervivencia específica de enfermedad en función de la aparición de recidiva en el CECAE.

No hubo diferencias tras comparar la supervivencia con el grado de diferenciación histológica ($p=0,804$).

Como es de esperar, la supervivencia fue superior en los casos en los que los bordes de resección no estaban afectados aunque no se alcanzó la significación estadística ($p=0,152$).

Los casos en los que hubo exposición previa a radioterapia tuvieron una supervivencia específica de enfermedad sensiblemente peor ($p=0,077$) (Figura 27).

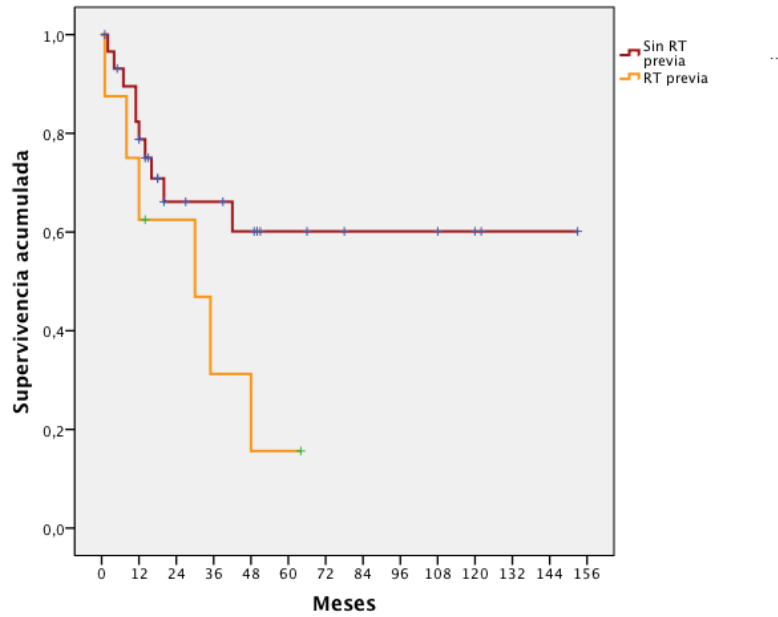


Figura 27: Supervivencia específica de enfermedad en función de la RT previa en el CECAE.

5.1.2. Aspectos clínico-patológicos de los CEPA

De los 36 pacientes diagnosticados de CEPA, 35 (97%) eran varones y sólo había una mujer (3%) (Figura 28). La diferencia en la proporción por sexo con los CECAE es estadísticamente significativa ($p=0,000$).



Figura 28: Distribución por sexo en el CEPA.

La media y la mediana de edad al diagnóstico fue de 78 años.

En la Figura 29 se muestra la distribución de la T en nuestra muestra, donde hubo 23 T1, 9 T2, 3 T3 y un T4. Dado que en el momento del diagnóstico no hubo ningún caso con metástasis regionales ni a distancia, la T coincide con el estadio en todos estos casos.

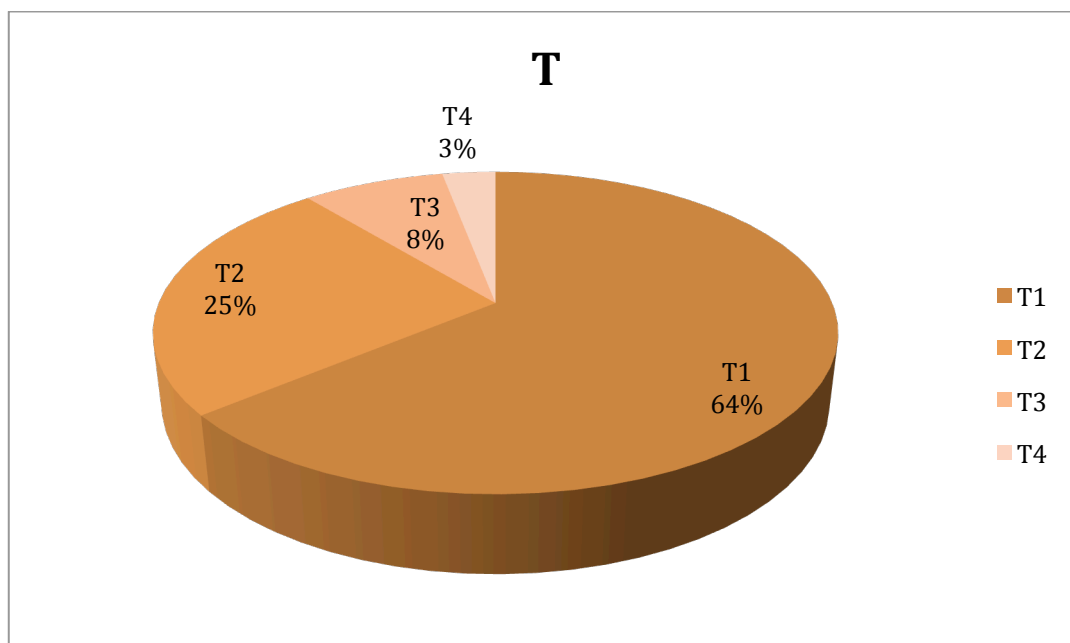


Figura 29: Distribución en función de la categoría T en el CEPA.

25 tumores eran bien diferenciados (69%) y 11 moderadamente diferenciados (31%). No hubo ninguno poco diferenciado.

Hubo un caso con afectación microscópica del borde de resección.

En 8 casos (22%) se supo a través de la historia clínica que existía un antecedente laboral de exposición frecuente a radiación solar.

Todos los pacientes fueron tratados mediante cirugía. Además, en 5 casos (14%) se administró radioterapia como tratamiento adyuvante.

Hubo 6 casos (17%) de recidiva local y 3 (8%) de recidiva regional. En dos casos la recidiva se presentó de forma local y regional simultáneamente (Figura 30). La media de tiempo hasta la recidiva local fue de 29 meses (entre 10 y 95) y la mediana de 17. La

media de tiempo hasta la recidiva regional fue de 13 meses (entre 6 y 23) y la mediana de 11.

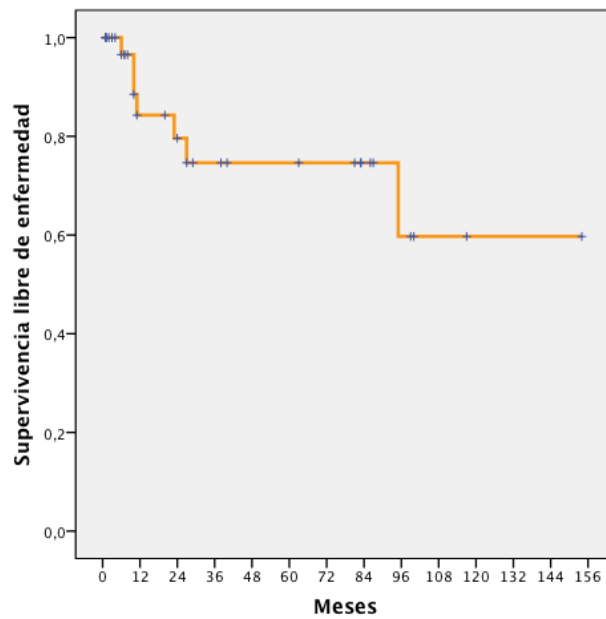


Figura 30: Supervivencia libre de enfermedad en el CEPA.

No se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre la aparición de recidivas y el grado de diferenciación histológica ($p=0,342$).

Los tumores en estadio I presentaron recidivas de forma mucho menos frecuente que el resto ($p=0,001$) (Figura 31).

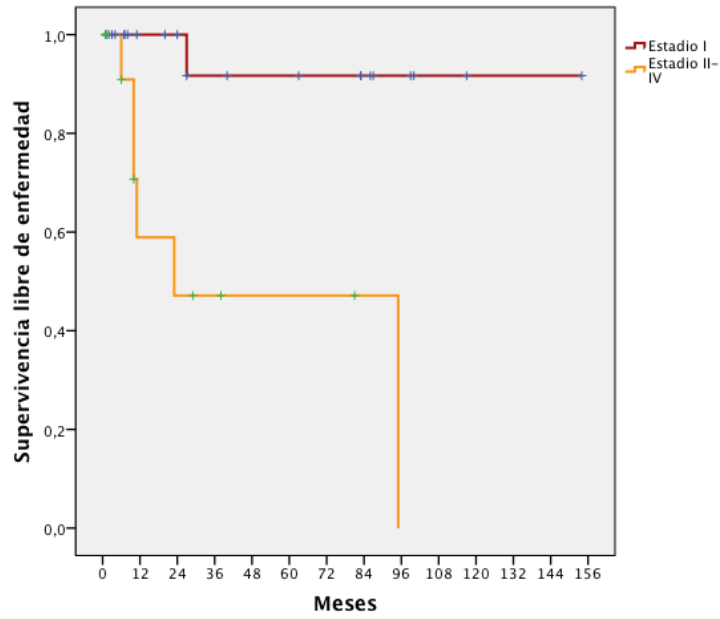


Figura 31: Supervivencia libre de enfermedad en función del estadio en el CEPA.

La supervivencia global fue del 54% a los tres años y del 37% a los cinco años (Figura 32).

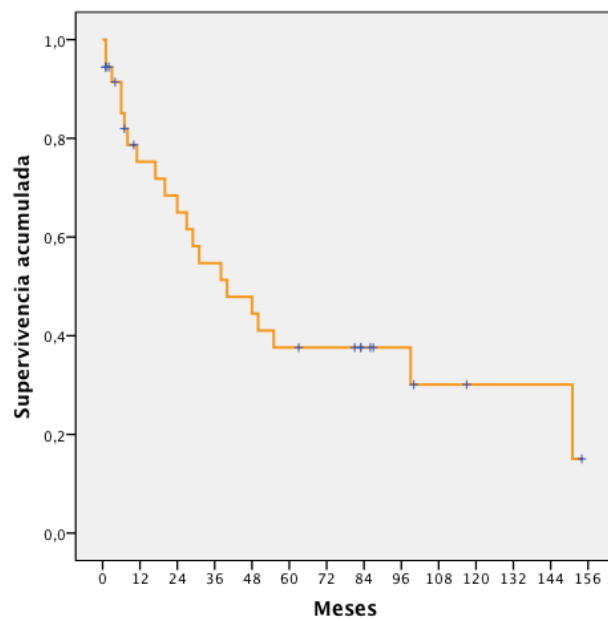


Figura 32: Supervivencia global en el CEPA.

La supervivencia específica de enfermedad (muertes directamente atribuibles al CEPA) se refleja en la Figura 33 y fue del 78% a los tres años y del 63% a los cinco años.

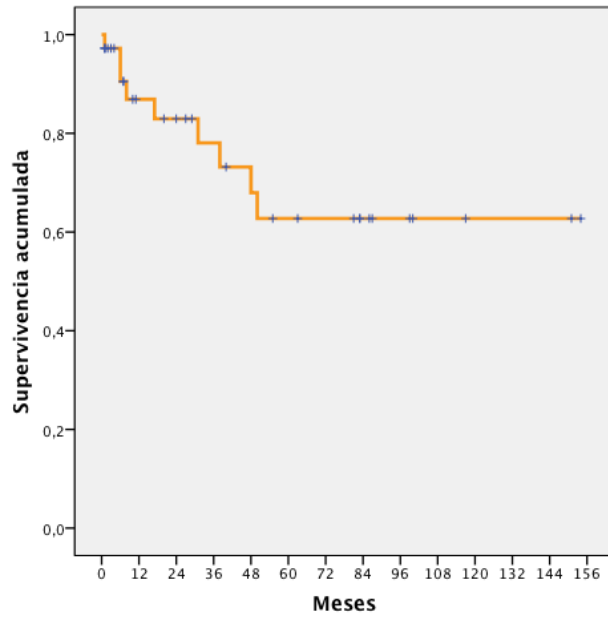


Figura 33: Supervivencia específica de enfermedad en el CEPA.

Para valorar la supervivencia en función del estadio (coincide con la categoría T en nuestra serie) se agrupó los estadios II, III y IV (n=13) para compararlos con el I (n=23) (Figura 34). Como es de esperar la supervivencia es mucho mejor en el estadio I que en los más avanzados ($p=0,0001$).

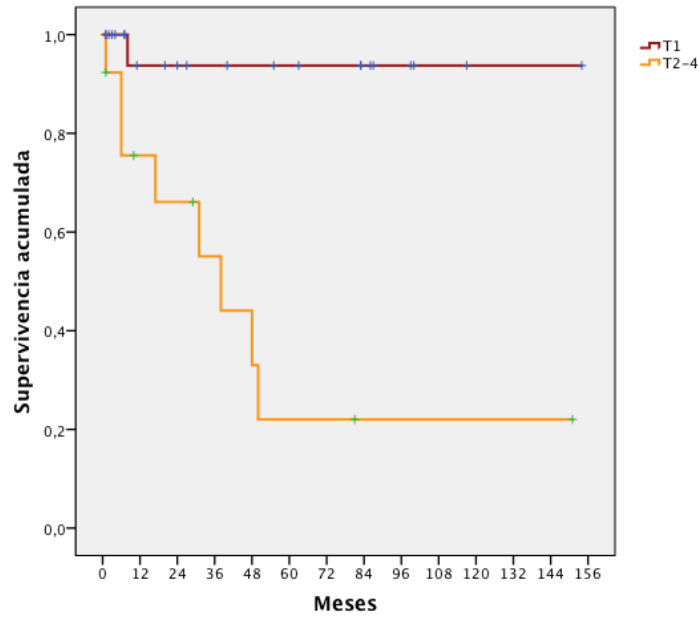


Figura 34: Supervivencia específica de enfermedad en función del estadio en el CEPA.

La supervivencia específica de enfermedad fue mucho peor en los pacientes que habían tenido una recidiva ($p=0,033$).

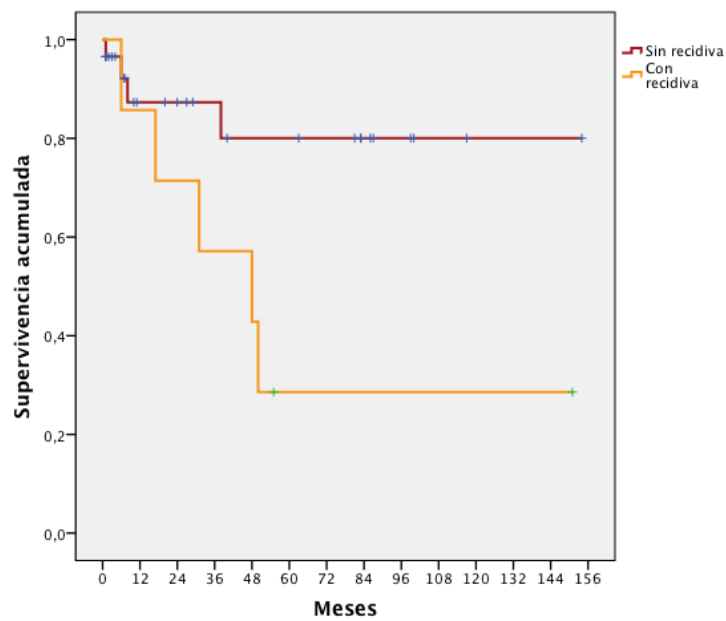


Figura 35: Supervivencia específica de enfermedad en función de la existencia de recidiva en el CEPA.

No hubo diferencias tras comparar la supervivencia con el grado de diferenciación histológica ($p=0,583$).

No se pudo demostrar ninguna diferencia en la supervivencia de los pacientes que tuvieron una exposición laboral a la radiación solar ($p=0,865$).

5.2. Alteraciones genético-moleculares

5.2.1. MLPA

5.2.1.1. P084

En la MLPA con el kit P084 contamos con 15 casos válidos de CECAE y 8 casos de CEPA.

En la siguiente tabla están representados los resultados de ganancias y pérdidas en los diferentes genes estudiados en el kit P084.

Tabla 11: Resultados de la MLPA con el kit P084 en 15 casos de CECAE y 8 casos de CEPA.

Cromosoma	Gen	15 CECAE		8 CEPA		15 CECAE		8 CEPA	
		Pérdidas				Ganancias			
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
1p13	NRAS	9	60,0	4	50,0	0	0,0	0	0,0
1q21	LMNA	1	6,7	0	0,0	10	66,7	5	62,5
2q14	IL1A	1	6,7	1	12,5	3	20,0	0	0,0
3p22	MLH1B	5	33,3	5	62,5	0	0,0	0	0,0
3p22	CTNNB1	8	53,3	5	62,5	0	0,0	0	0,0
4q25	CASP6	4	26,7	3	37,5	0	0,0	0	0,0
4q26	IL2	2	13,3	3	37,5	0	0,0	0	0,0
8p23	MFHAS1	1	6,7	0	0,0	1	6,7	3	37,5
8p22	CTSB	3	20,0	1	12,5	1	6,7	0	0,0
8p22	N33	6	40,0	3	37,5	0	0,0	0	0,0
8q24	PTP4A3	0	0,0	0	0,0	12	80,0	8	100,0

8q24	RECQL4	0	0,0	0	0,0	13	86,7	7	87,5
9p21	CDKN2A	2	13,3	2	25,0	1	6,7	0	0,0
10p14	AI65	1	6,7	0	0,0	0	0,0	0	0,0
10p14	RENT2	1	6,7	0	0,0	0	0,0	0	0,0
10p12	CREM	1	6,7	3	37,5	0	0,0	0	0,0
11q13	CCDN1	0	0,0	0	0,0	6	40,0	6	75,0
11q13	EMS1	0	0,0	0	0,0	5	33,3	4	50,0
11q23	IL18	3	20,0	3	37,5	0	0,0	0	0,0
11q23	IGSF4	1	6,7	3	37,5	0	0,0	0	0,0
13q12	BRCA2	3	20,0	1	12,5	0	0,0	0	0,0
13q14	RB1	2	13,3	2	25,0	2	13,3	0	0,0
13q14	DLEU1	3	20,0	5	62,5	1	6,7	0	0,0
17p13	TP53	2	13,3	0	0,0	4	26,7	2	25,0
17q21	ERBB2	0	0,0	0	0,0	5	33,3	4	50,0
18q11	CDH2	6	40,0	2	25,0	0	0,0	0	0,0
18q21	MADH2	1	6,7	2	25,0	0	0,0	0	0,0
18q21	BCL2	3	20,0	2	25,0	0	0,0	0	0,0
19p13	STK11	1	6,7	0	0,0	3	20,0	3	37,5
19p13	CDKN2D	1	6,7	0	0,0	5	33,3	1	12,5
20q11	BCL2L1	0	0,0	2	25,0	3	20,0	0	0,0
20q13	PTPN1	1	6,7	0	0,0	0	0,0	1	12,5

Las ganancias más frecuentemente encontradas fueron las de los genes PTP4A3, RECQL4, LMNA y CCDN1; mientras que las pérdidas génicas observadas con más frecuencia fueron las de NRAS, CTNNB1, MLH1B y DLEU1.

Dado el escaso número de casos estudiados con este kit no se realizó estudio estadístico sobre los resultados obtenidos. No obstante, a continuación se reseñan los genes que presentaron alteraciones en proporción notablemente diferente en los dos tipos de tumores (en los porcentajes entre paréntesis el primer dato corresponde al CECAE y el segundo al CEPA).

- Genes con pérdidas: MLH1B (33% y 63%), IL2 (13% y 38%), CDKN2A (13% y 25%), CREM (7% y 38%), IL18 (20% y 38%), IGSF4 (7% y 38%), DLEU (20% y 63%), CDH2 (40% y 25%) y BCL2L1 (0% y 25%).

- Genes con ganancias: MFHAS1 (7% y 38%), CCDN1 (40% y 75%), EMS1 (33% y 50%), ERBB2 (33% y 50%), STK11 (20% y 38%) y CDKN2D (33% y 13%).

La Figura 36 es la representación gráfica de los resultados de la MLPA con el kit P084. En el lado izquierdo del gráfico se representa el porcentaje de pérdidas y el lado derecho el de ganancias.

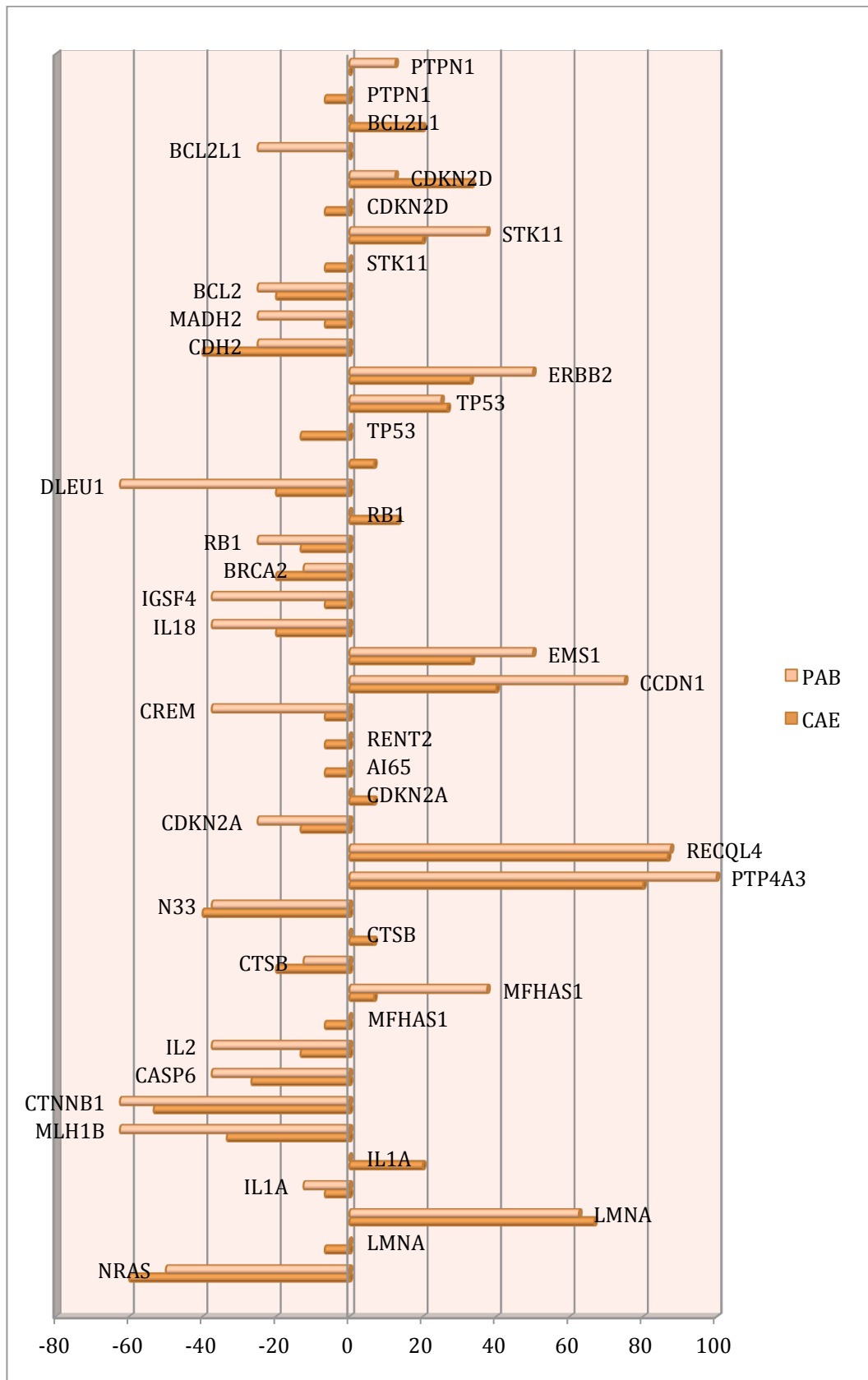


Figura 36: Resultados de la MLPA con el kit P084. Los genes en los que hubo ganancias y pérdidas se representan por duplicado.

Los tumores de pabellón tuvieron más alteraciones genéticas que los de CAE, con una media de 12 genes alterados por cada caso de CEPA y 9,8 por cada caso de CECAE.

5.2.1.2. P105

Tras la realización de la MLPA con el kit P105 conseguimos resultados válidos en 22 casos de CECAE y 28 de CEPA.

En la siguiente tabla están representados los resultados del kit p105 en cuanto a pérdidas y ganancias de los genes incluidos.

Tabla 12: Resultados de la MLPA con el kit P105 en 22 casos de CECAE y 28 casos de CEPA.

	Cromosoma	gen	22 CECAE		28 CEPA		Chi2
			Nº	%	Nº	%	
pérdida	9p21	CDKN2A	8	36,4	6	21,4	p=0,343
ganancia	7p12	EGFR	2	9,1	7	25,0	p=0,266
ganancia	17q12	ERBB2	7	31,8	5	17,9	p=0,324
pérdida	10q24	PTEN	11	50,0	16	57,1	p=0,776
pérdida	17p13	TP53	0	0,0	1	3,6	
ganancia	17p13	TP53	7	31,8	4	14,3	p=0,178

La columna Chi2 expresa la significación estadística de la diferencia entre la proporción de casos en el grupo del CECAE y del CEPA.

La Figura 37 es la representación gráfica de los resultados de la MLPA con el kit P105. Columnas hacia arriba ganancias y hacia abajo pérdidas.

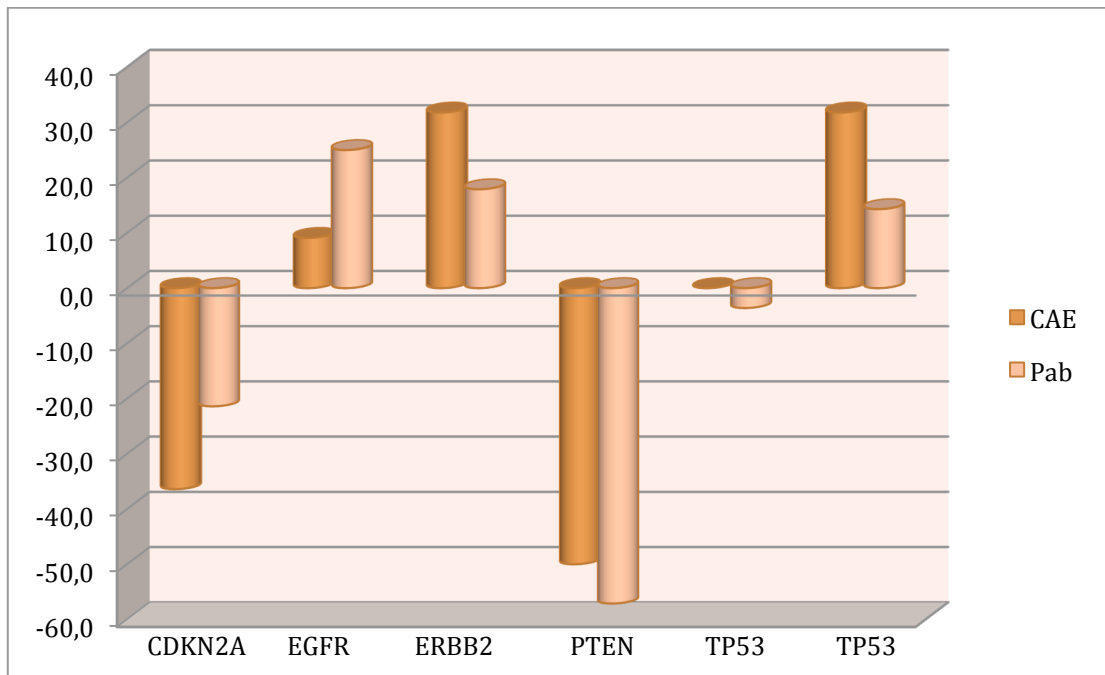


Figura 37: Resultados de la MLPA con el kit P105.

Pese a haber diferencias entre la proporción de ganancias y pérdidas en los dos tipos de tumores, en ningún caso se alcanzó la significación estadística. Pese a todo los genes que mostraron unas diferencias más llamativas entre los dos tipos de tumores fueron TP53 y EGFR, siendo su ganancia más frecuente en los CECAE y en los CEPA respectivamente.

5.2.1.3. Relación entre los resultados de la MLPA (kit P105) y las variables clínico-patológicas de los CECAE

Tras comparar el estadio T con los resultados de la MLPA no se observó ninguna relación estadísticamente significativa. Aún así se encontró una cierta tendencia a la relación entre el estadio T y la pérdida de CDKN2A ($p=0,125$), la pérdida de PTEN ($p=0,164$) y la ganancia de ERBB2 ($p=0,224$).

Tras agrupar los estadios T1, T2 y T3 (de forma que la comparación es T4 contra el resto), se observó una posible relación entre el estadio T y la pérdida de PTEN ($p=0,135$) y la ganancia de ERBB2 ($p=0,149$).

Tabla 13: Relación entre la categoría T y los resultados de la MLPA (kit P105) en el CECAE.

CDKN2A	T1	T2	T3	T4		T1-3	T4
Normal	1	3	1	8		5	8
Pérdida	3	0	2	3		5	3
					p=0,125		
EGFR	T1	T2	T3	T4		T1-3	T4
Normal	4	3	3	9		10	9
Ganancia	0	0	0	2		0	2
PTEN	T1	T2	T3	T4		T1-3	T4
Normal	3	1	3	4		7	4
Pérdida	1	2	0	7		3	7
					p=0,164		p=0,135
TP53	T1	T2	T3	T4		T1-3	T4
Normal	2	2	2	8		6	8
Ganancia	2	1	1	3		4	3
ERBB2	T1	T2	T3	T4		T1-3	T4
Normal	4	3	2	6		9	6
Ganancia	0	0	1	5		1	5
					p=0,224		p=0,149

Tabla 14: Relación entre la categoría N y los resultados de la MLPA (kit P105) en el CECAE.

CDKN2A	N0	N+
Normal	10	3
Pérdida	7	1
EGFR	N0	N+
Normal	15	4
Ganancia	2	0
PTEN	N0	N+
Normal	8	3
Pérdida	9	1
TP53	N0	N+
Normal	12	2
Ganancia	5	2
ERBB2	N0	N+
Normal	11	4
Ganancia	6	0
		p=0,281

La única alteración genética estudiada que pudiera relacionarse con la presencia de adenopatías metastásicas en el momento del diagnóstico es la ganancia de ERBB2 (p=0,281).

Tabla 15: Relación entre el grado de diferenciación histológica y los resultados de la MLPA (kit P105) en el CECAE.

CDKN2A	Bien diferenciado	Moderadamente diferenciado	Pobrementemente diferenciado
Normal	9	2	1
Pérdida	3	4	0
			p=0,165
EGFR	Bien diferenciado	Moderadamente diferenciado	Pobrementemente diferenciado
Normal	10	6	1
Ganancia	2	0	0
PTEN	Bien diferenciado	Moderadamente diferenciado	Pobrementemente diferenciado
Normal	6	3	1
Pérdida	6	3	0
TP53	Bien diferenciado	Moderadamente diferenciado	Pobrementemente diferenciado
Normal	9	3	1
Ganancia	3	3	0
ERBB2	Bien diferenciado	Moderadamente diferenciado	Pobrementemente diferenciado
Normal	9	4	1
Ganancia	3	2	0

La pérdida de CDKN2A podría estar relacionada con el grado de diferenciación histológica en los CECAE, aunque no de forma estadísticamente significativa ($p=0,165$).

No se pudo establecer ninguna relación estadística entre las alteraciones genéticas estudiadas por MLPA y el hecho de haber recibido radioterapia previa al diagnóstico de CECAE.

La ganancia de TP53 se relacionó, aunque de forma no estadísticamente significativa, con una peor supervivencia libre de enfermedad ($p=0,135$) (Figura 38).

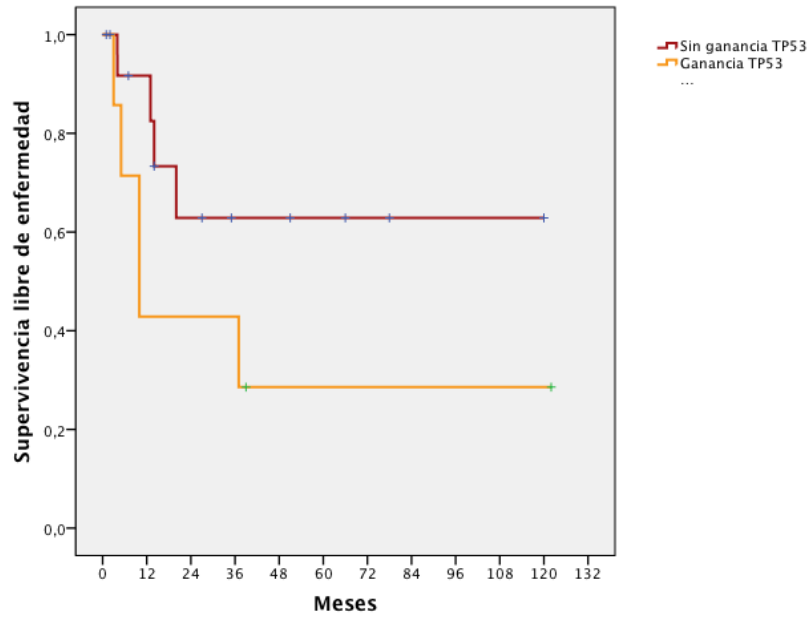


Figura 38: Supervivencia libre de enfermedad en función de la ganancia de TP53 en el CECAE.

Se observó una relación estadísticamente significativa entre la pérdida de PTEN y una mejor supervivencia global ($p=0,031$) (Figura 39). La relación entre la pérdida de PTEN y la mejor supervivencia específica de enfermedad fue algo más débil ($p=0,079$) (Figura 40).

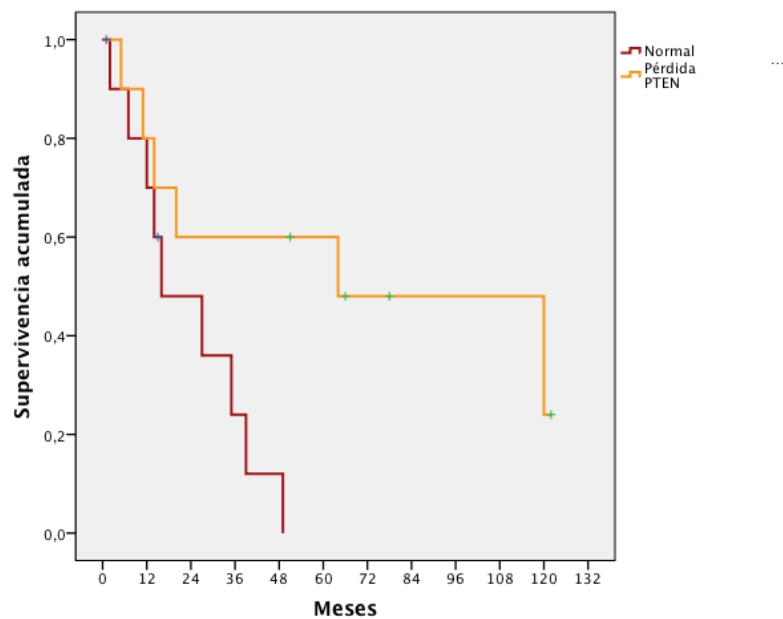


Figura 39: Supervivencia global en relación con la pérdida de PTEN en el CECAE.

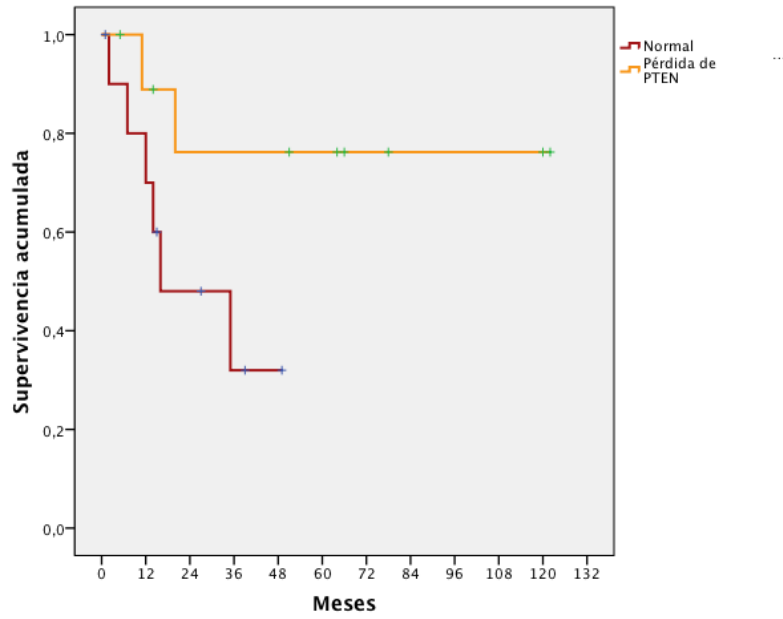


Figura 40: Supervivencia específica de enfermedad en relación con la pérdida de PTEN en el CECAE.

La ganancia de ERBB2 podría suponer una menor supervivencia específica de enfermedad ($p=0,349$) (Figura 41).

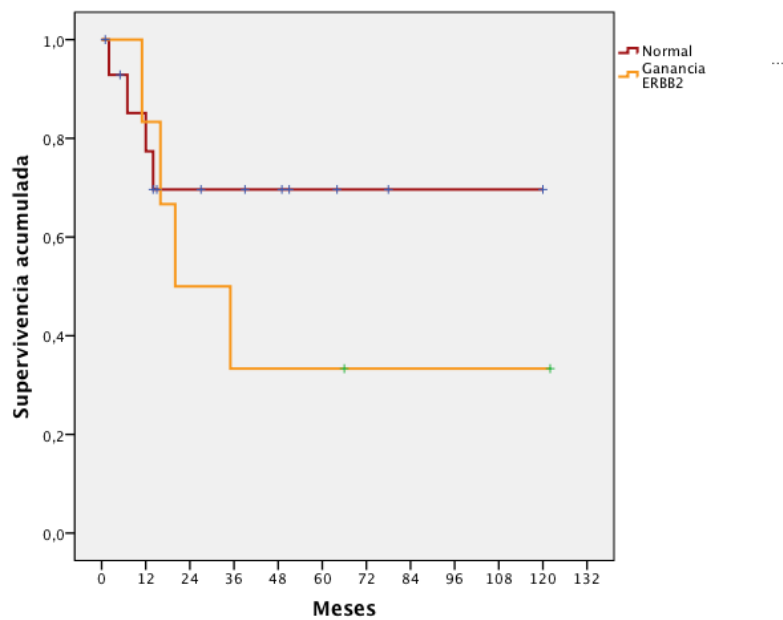


Figura 41: Supervivencia específica de enfermedad en relación con la ganancia de ERBB2 en el CECAE.

5.2.1.4. Relación entre los resultados de la MLPA (kit P105) y las variables clínico-patológicas de los CEPA

Tras comparar el estadio T con los resultados de la MLPA no se observó ninguna relación estadísticamente significativa. Aún así se encontró una cierta tendencia a la relación entre el estadio T y la ganancia de ERBB2 ($p=0,207$).

Tras agrupar los estadios T2, T3 y T4, se observó una posible relación entre el estadio T y la ganancia de ERBB2 ($p=0,133$).

Tabla 16: Relación entre la categoría T y los resultados de la MLPA (kit P105) en el CEPA.

CDKN2A	T1	T2	T3	T4	T1	T2-4
Normal	12	7	2	1	12	10
Pérdida	4	2	0	0	4	2
EGFR	T1	T2	T3	T4	T1	T2-4
Normal	13	6	1	1	13	8
Ganancia	3	3	1	0	3	4
PTEN	T1	T2	T3	T4	T1	T2-4
Normal	7	4	0	1	7	5
Pérdida	9	5	2	0	9	7
TP53	T1	T2	T3	T4	T1	T2-4
Normal	14	7	2	1	14	10
Ganancia	2	2	0	0	2	2
ERBB2	T1	T2	T3	T4	T1	T2-4
Normal	15	6	1	1	15	8
Ganancia	1	3	1	0	1	4
				$p=0,207$		$p=0,133$

Se observó una relación estadísticamente significativa entre la ganancia de EGFR y el grado de diferenciación histológica ($p=0,009$)

Tabla 17: Relación entre el grado de diferenciación histológica y los resultados de la MLPA (kit P105) en el CEPA.

CDKN2A	Bien diferenciado	Moderadamente diferenciado
Normal	16	6
Pérdida	4	2
EGFR	Bien diferenciado	Moderadamente diferenciado
Normal	18	3
Ganancia	2	5
		p=0,009
PTEN	Bien diferenciado	Moderadamente diferenciado
Normal	10	2
Pérdida	10	6
TP53	Bien diferenciado	Moderadamente diferenciado
Normal	18	6
Ganancia	2	2
ERBB2	Bien diferenciado	Moderadamente diferenciado
Normal	16	7
Ganancia	4	1

Se encontró una relación, aunque estadísticamente no significativa, entre la ganancia de TP53 y una mejor supervivencia libre de enfermedad ($p=0,269$) (Figura 42).

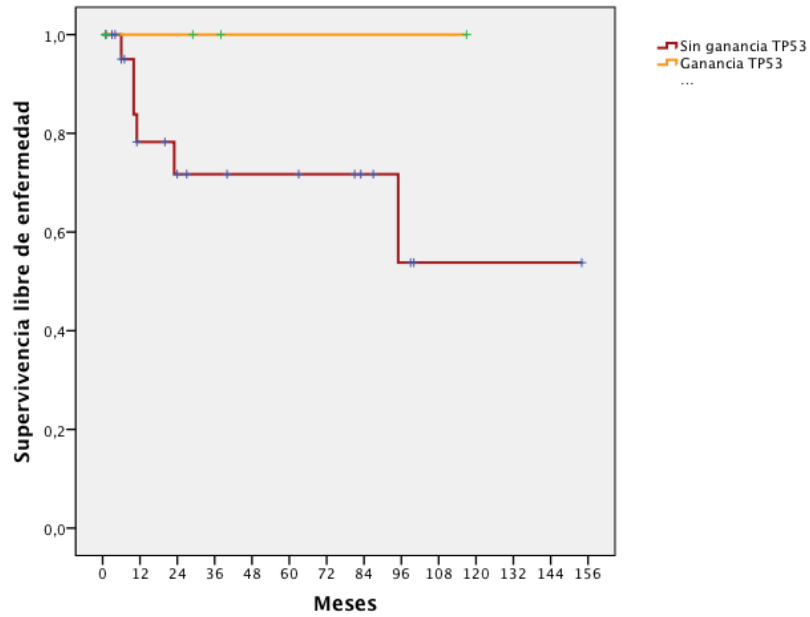


Figura 42: Supervivencia libre de enfermedad en relación con la ganancia de TP53 en el CEPA.

Se encontró relación, aunque estadísticamente no significativa, entre la pérdida de CDKN2A y una peor supervivencia global ($p=0,327$) (Figura 43); la ganancia de EGFR y una peor supervivencia global ($p=0,105$) (Figura 44); la ganancia de ERBB2 y una peor supervivencia global ($p=0,256$) (Figura 45) y la pérdida de PTEN y una peor supervivencia global ($p=0,318$) (Figura 46).

No se observó ninguna relación entre las alteraciones genéticas estudiadas y una peor supervivencia específica de enfermedad.

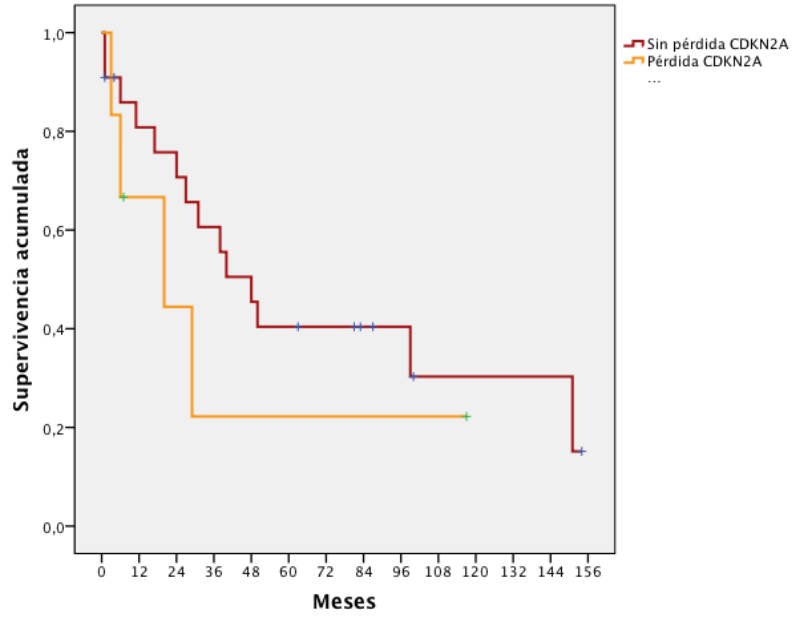


Figura 43: Supervivencia global en relación con la pérdida de CDKN2A en el CEPA.

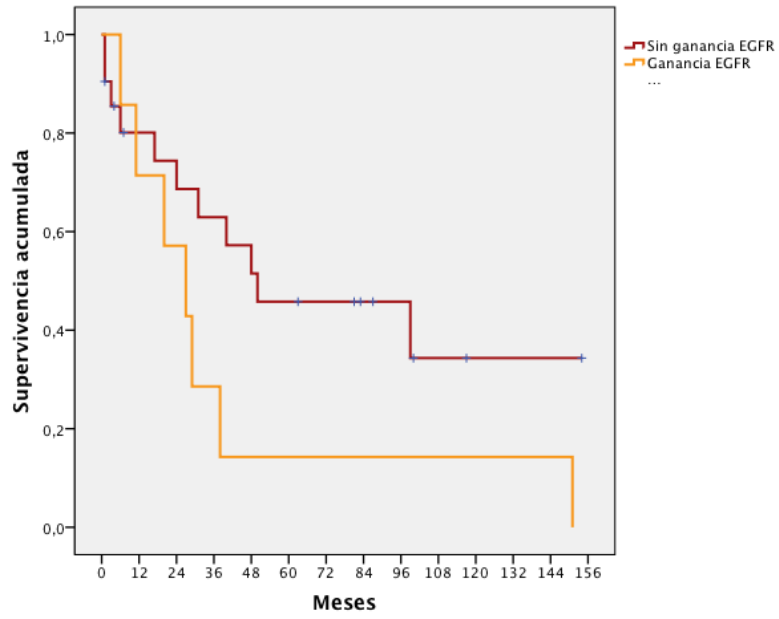


Figura 44: Supervivencia global en relación con la ganancia de EGFR en el CEPA.

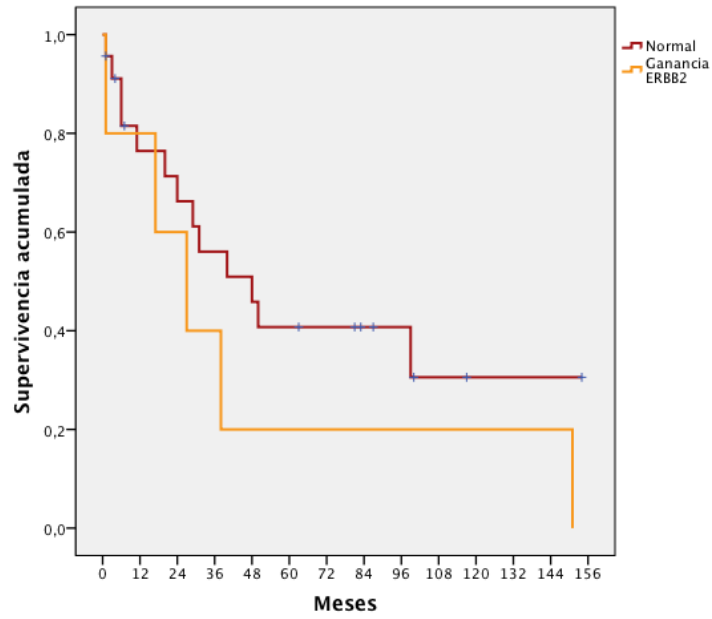


Figura 45: Supervivencia global en relación con la ganancia de ERBB2 en el CEPA.

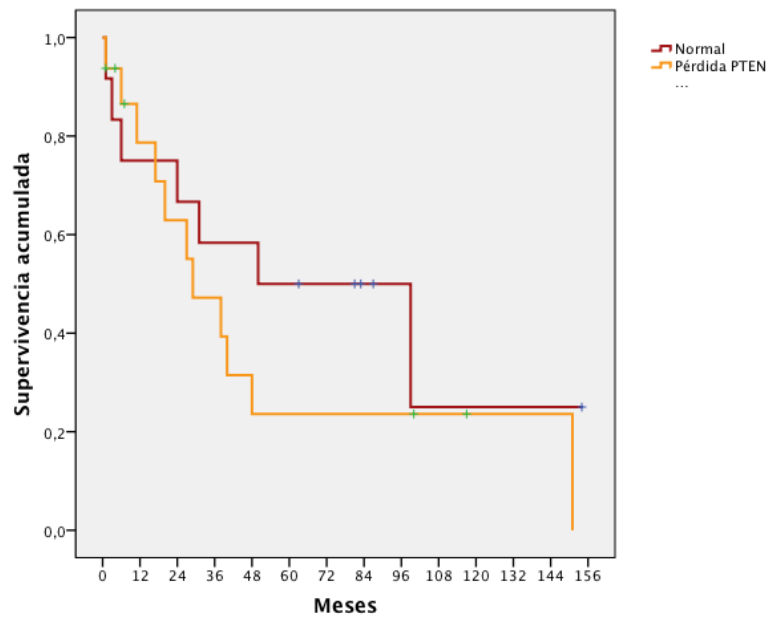


Figura 46: Supervivencia global en relación con la pérdida de PTEN en el CEPA.

5.2.2. IHQ

Se realizó la tinción inmunohistoquímica en 33 casos de CECAE y 33 casos de CEPA.

Tabla 18: Resultados de la IHQ en 33 casos de CECAE y 33 de CEPA.

		33 CECAE		33 CEPA		Chi2
		Nº	%	Nº	%	
p16	+ débil	1/31	3,2	5/32	15,6	p=0,000
	+ fuerte	2/31	6,5	14/32	43,8	
EGFR	+	22/33	66,7	30/33	90,9	p=0,033
PTEN	-	26/32	81,3	27/33	81,8	
TP53	+	21/32	65,6	27/33	81,8	

En la columna Chi2 se expresa la significación estadística resultante de la comparación de la proporción de casos positivos entre el CECAE y el CEPA.

La positividad para p16 es mucho más frecuente en los CEPA que en los CECAE (p=0,000). La positividad para EGFR también es más frecuente en los CEPA que en los CECAE (p=0,033).

En la Figura 47 se representa de forma gráfica los resultados de las IHQ en los CECAE y los CEPA expresados porcentualmente.

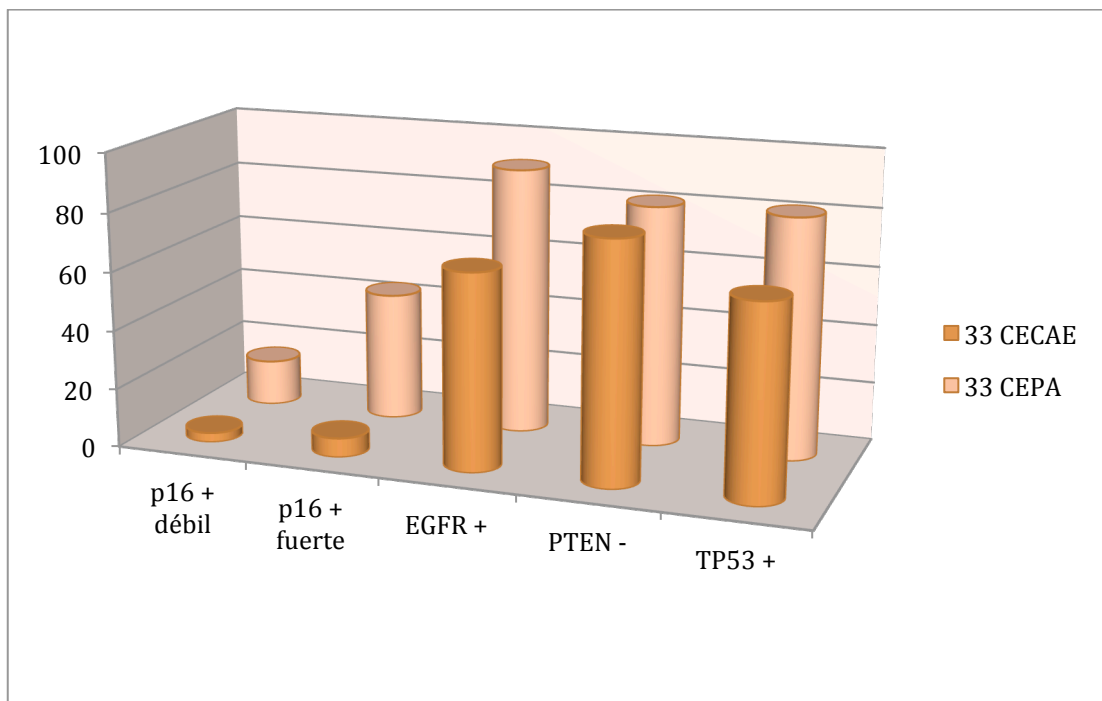


Figura 47: Resultados porcentuales de las IHQ.

5.2.2.1. Relación entre los resultados de las IHQ y las variables clínico-patológicas de los CECAE

Tabla 19: Relación entre la categoría T y los resultados de las IHQ en el CECAE.

p16	T1	T2	T3	T4	T1-3	T4
-	5	3	3	16	11	16
+	1	0	0	2	1	2
EGFR	T1	T2	T3	T4	T1-3	T4
-	1	2	2	6	5	6
+	4	3	2	12	9	12
PTEN	T1	T2	T3	T4	T1-3	T4
-	5	4	2	14	11	14
+	0	0	2	4	2	4
				p=0,198		
p53	T1	T2	T3	T4	T1-3	T4
-	1	1	0	8	2	8
+	4	4	3	10	11	10
						p=0,129

No se alcanzó significación estadística al relacionar ninguna de las proteínas estudiadas con la T.

Pese a todo, sí parece que los PTEN positivos se podrían relacionar con un estadio T más avanzado ($p=0,198$). Haciendo la comparación de los T4 con los T1, T2 y T3 de forma conjunta encontramos una mayor proporción de p53 negativo en el grupo de los T4 ($p=0,129$).

Tabla 20: Relación entre la categoría N y los resultados de las IHQ en el CECAE.

p16	N0	N+
-	21	6
+	3	0
EGFR	N0	N+
-	9	2
+	17	4
PTEN	N0	N+
-	22	3
+	3	3
		p=0,069
p53	N0	N+
-	9	1
+	17	4

Tampoco se encontró ninguna relación estadísticamente significativa tras comparar los resultados de la IHQ con la existencia de metástasis cervicales en el momento del diagnóstico. Aún así parece que la pérdida de expresión de PTEN es más frecuente en pacientes sin metástasis cervicales (p=0,069).

No se encontró ninguna relación entre la expresión de las proteínas a estudio y el grado de diferenciación histológica.

Tabla 21: Relación entre haber recibido radioterapia previa y los resultados de la IHQ en el CECAE.

p16	RT previa -	RT previa +
-	21	6
+	3	0
EGFR	RT previa -	RT previa +
-	6	5
+	19	2
		p=0,032
PTEN	RT previa -	RT previa +
-	18	7
+	6	0
		p=0,293
p53	RT previa -	RT previa +
-	8	2
+	16	5

Se estudió la posible relación entre la expresión de las proteínas estudiadas mediante IHQ con el hecho de haber recibido radioterapia previa al desarrollo del CECAE.

La positividad de EGFR fue mucho más frecuente en los casos en los que no se había recibido radioterapia previa ($p=0,032$).

No hubo ninguna relación estadísticamente significativa entre los resultados de los estudios por IHQ y el tiempo libre de enfermedad. Aún así la positividad de p16 parece que pudiera relacionarse con una supervivencia libre de enfermedad mayor ($p=0,156$) (Figura 48).

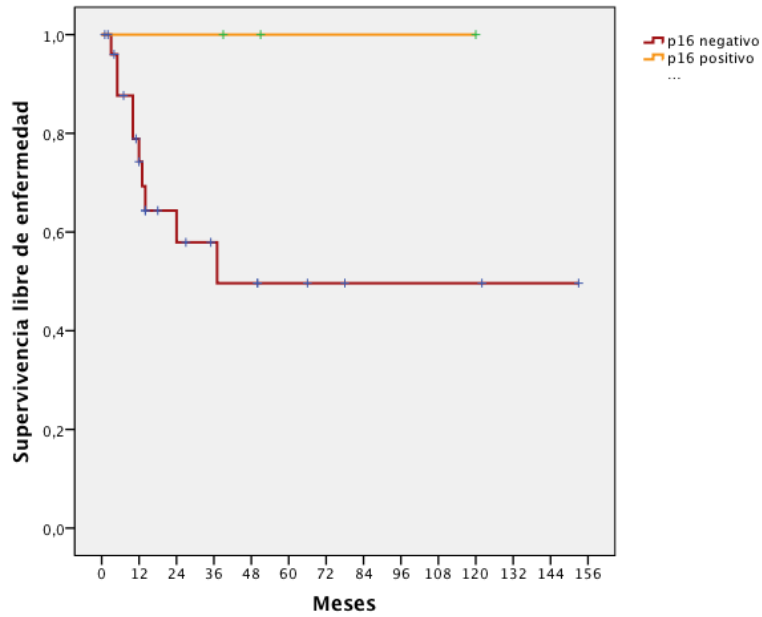


Figura 48: Supervivencia libre de enfermedad en relación con la positividad de p16 en el CECAE.

No se encontró ninguna relación estadísticamente significativa entre los resultados de las IHQ y la supervivencia.

De todas formas, podría haber una relación entre la positividad de p16 y una mejor supervivencia específica de enfermedad ($p=0,158$) (Figura 49).

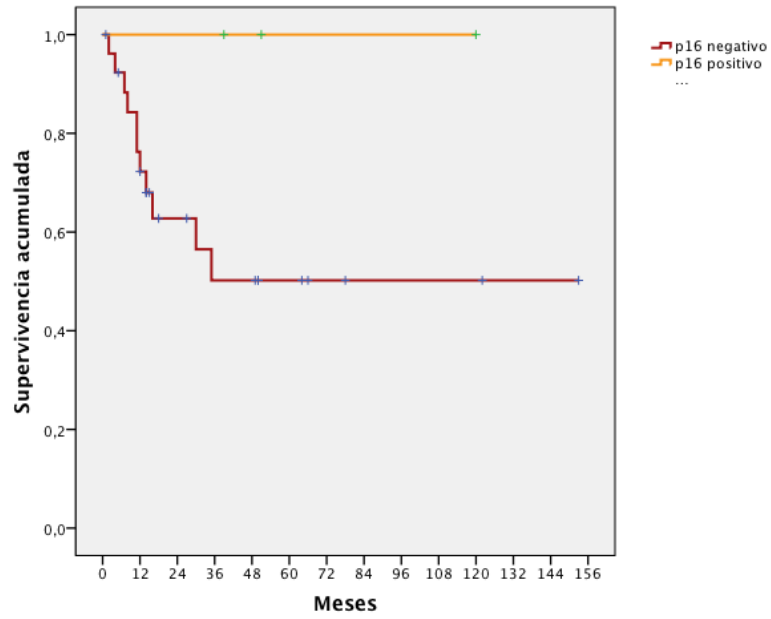


Figura 49: Supervivencia específica de enfermedad en relación con la positividad de p16 en los CECAE.

Se observó una relación sin significación estadística entre la positividad de EGFR y una mejor supervivencia específica de enfermedad ($p=0,193$) (Figura 50).

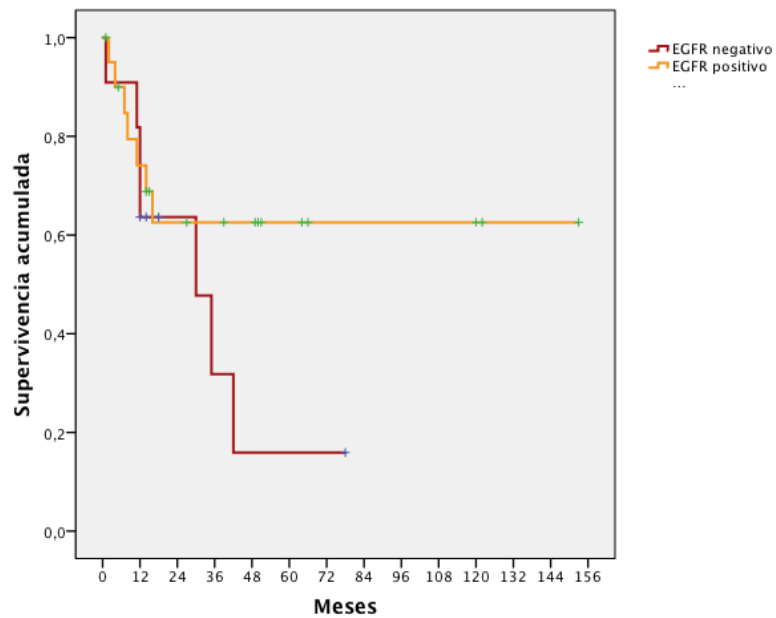


Figura 50: Supervivencia específica de enfermedad en relación con la positividad de EGFR los CECAE.

Valorando la supervivencia global también se sugiere que los pacientes con p53 negativo podrían tener una supervivencia mejor ($p=0,104$) (Figura 51).

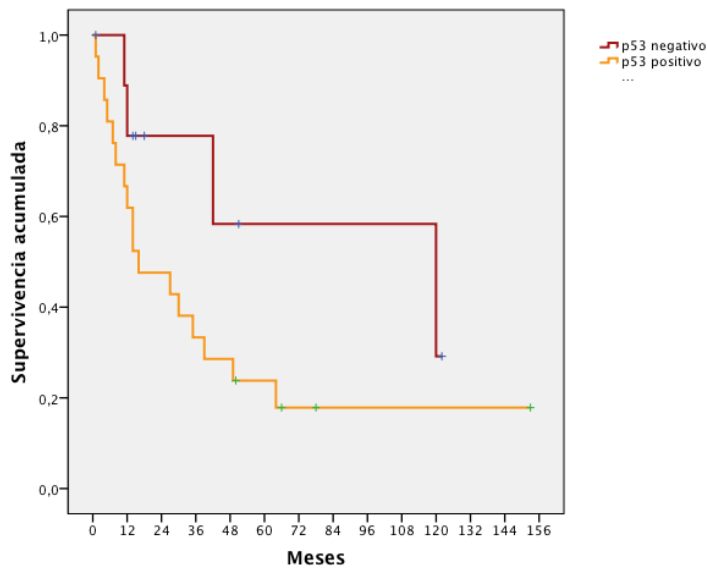


Figura 51: Supervivencia global en relación con la positividad de p53 en los CECAE.

5.2.2.2. Relación entre los resultados de las IHQ y las variables clínico-patológicas de los CEPA

Tabla 22: Relación entre la categoría T y los resultados de las IHQ en el CEPA.

p16	T1	T2	T3	T4	T1	T2-4
-	5	5	2	1	5	8
+	15	3	1	0	15	4
						p=0,03
EGFR	T1	T2	T3	T4	T1	T2-4
-	3	0	0	0	3	0
+	17	9	3	1	17	13
						p=0,261
PTEN	T1	T2	T3	T4	T1	T2-4
-	19	7	1	0	19	8
+	1	2	2	1	1	5
						p=0,025
p53	T1	T2	T3	T4	T1	T2-4
-	3	2	1	0	3	3
+	17	7	2	1	17	10

Agrupando T2, T3 y T4 para comparar con el grupo de los T1 encontramos que la positividad de p16 es más frecuente en los T1 y menos en los T más avanzados ($p=0,03$).

La pérdida de expresión de PTEN se produce más frecuentemente en los T1 ($p=0,025$).

No se encontró ninguna relación entre la expresión de las diferentes proteínas a estudio con el grado de diferenciación histológica.

Al igual que en el caso de los CECAE, el único resultado que pudiera sugerir una relación con un mayor tiempo libre de enfermedad es la positividad de p16 ($p=0,222$) (Figura 52).

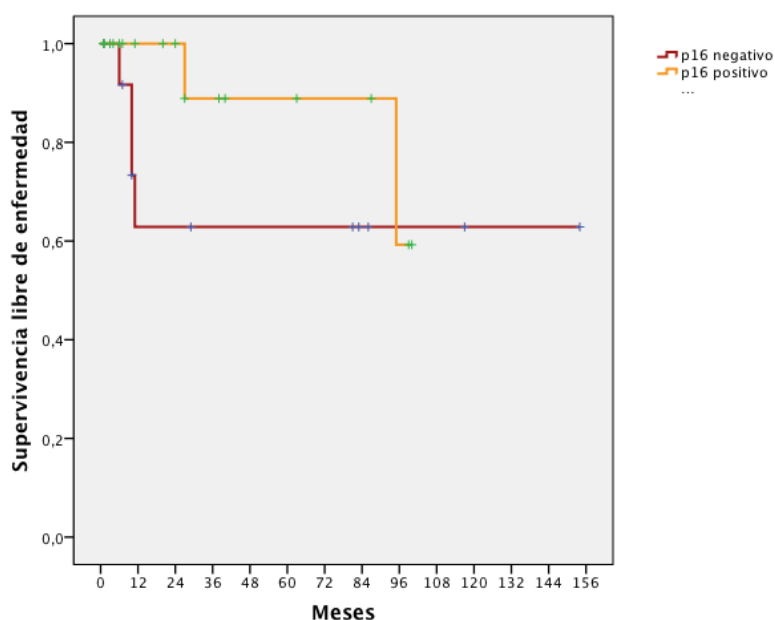


Figura 52: Supervivencia libre de enfermedad en relación con la positividad de p16 en el CEPA.

La supervivencia específica de enfermedad de los CEPA parece ser mejor en los pacientes con p16 positivo ($p=0,163$) (Figura 53); y peor en los casos positivos para EGFR ($p=0,285$) (Figura 54).

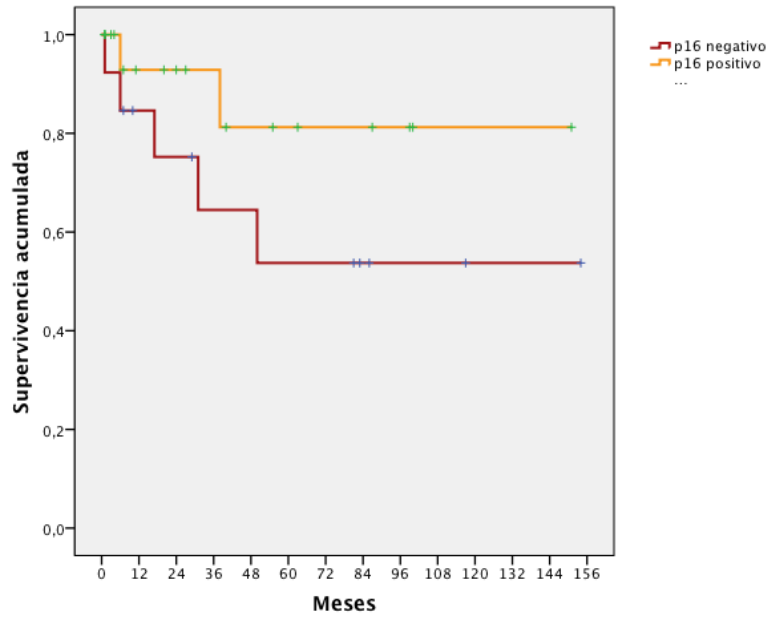


Figura 53: Supervivencia específica de enfermedad en relación con la positividad de p16 en el CEPA.

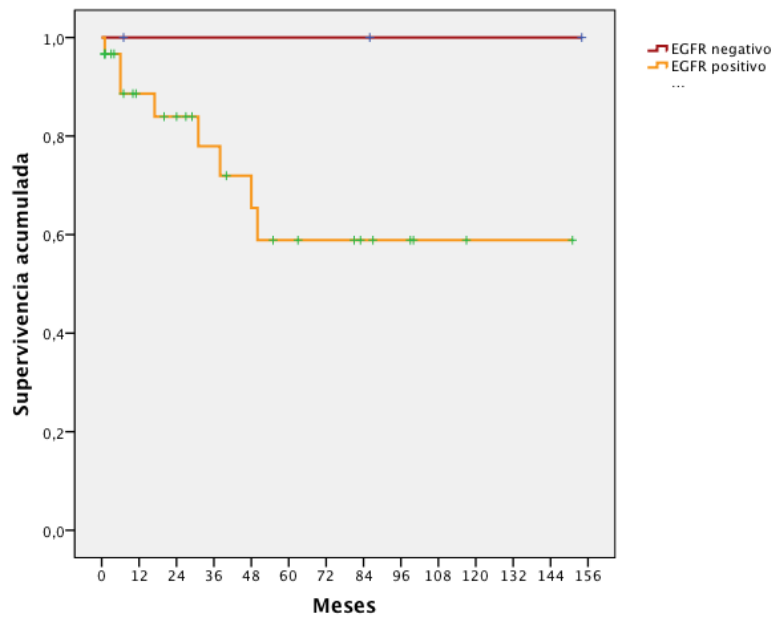


Figura 54: Supervivencia específica de enfermedad en relación con la positividad de EGFR en el CEPA.

La supervivencia global de los pacientes diagnosticados de CEPA podría ser peor en los casos positivos para EGFR ($p=0,059$) (Figura 55); en los casos en los que no hay pérdida de PTEN ($p=0,116$) (Figura 56); y en los casos positivos para p53 ($p=0,117$)

(Figura 57).

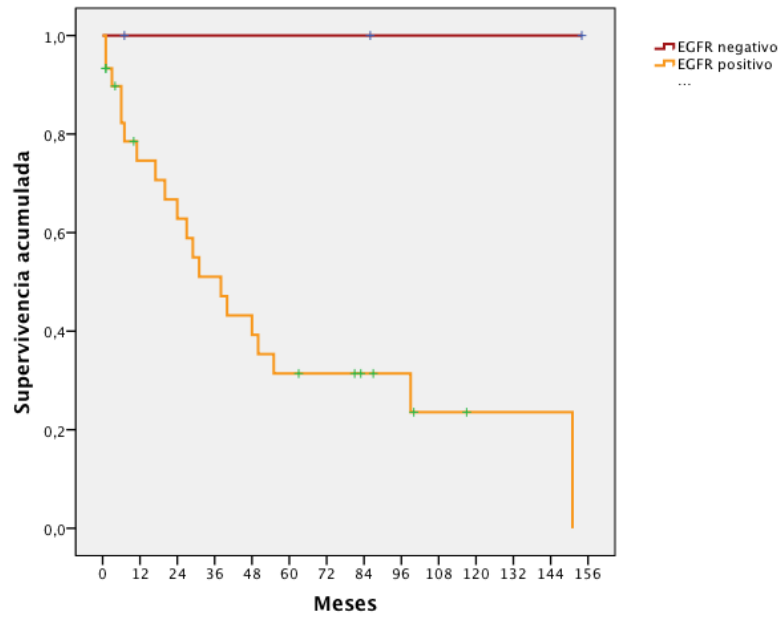


Figura 55: Supervivencia global en relación con la positividad de EGFR en el CEPA.

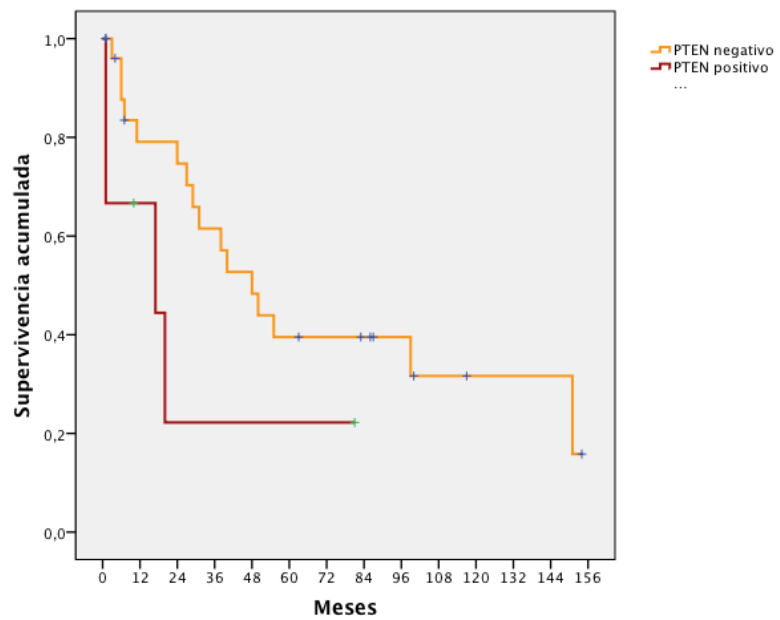


Figura 56: Supervivencia global en relación con la positividad de PTEN en el CEPA.

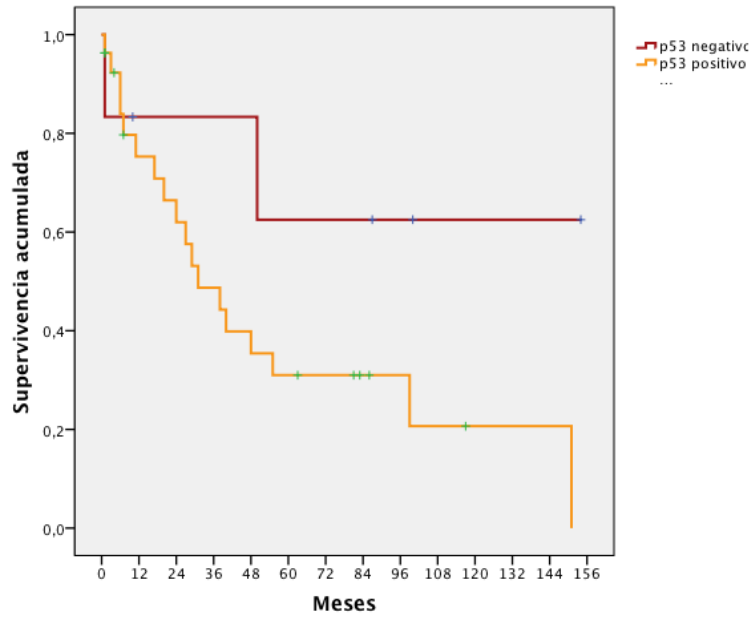


Figura 57: Supervivencia global en relación con la positividad de p53 el CEPA.

5.3. Relación entre el número de copias génicas y la expresión proteica

Se analizó la posible relación entre las ganancias o pérdidas en el número de copias de cada uno de los genes a estudio con la expresión en el tejido tumoral de las proteínas codificadas por los mismos.

Se analizaron ambos tipos de tumor por separado y agrupados, consiguiendo un tamaño de la muestra mayor.

Tabla 23: Relación entre los resultados de la MLPA (kit P105) y los resultados de la IHQ. Ambos tipos de tumor de forma conjunta.

		CDKN2A	
		normal	pérdida
p16	-	19	8
	+	15	5
		EGFR (gen)	
		normal	ganancia
EGFR	-	6	0
	+	34	9
		PTEN (gen)	
		normal	pérdida
PTEN	-	17	22
	+	5	4
		TP53	
		normal	ganancia
p53	-	10	2
	+	27	9

No hubo ninguna relación estadísticamente significativa entre los genes estudiados por MLPA y la expresión proteica estudiada mediante IHQ tras analizar ambos tipos de tumor de forma conjunta.

Tabla 24: Relación entre los resultados de la MLPA (kit P105) y los resultados de la IHQ en los CECAE.

		CDKN2A	
		normal	pérdida
p16	-	12	5
	+	1	2
		EGFR (gen)	
		normal	ganancia
EGFR	-	4	0
	+	15	2
		PTEN (gen)	
		normal	pérdida
PTEN	-	7	9
	+	3	1
		TP53	
		normal	ganancia
p53	-	5	2
	+	8	5

No se observó ninguna relación estadísticamente significativa al estudiar la relación entre los resultados de la IHQ y la MLPA en los CECAE.

Tabla 25: Relación entre los resultados de la MLPA (kit P105) y los resultados de la IHQ en los CEPA.

		CDKN2A	
		normal	pérdida
p16	-	7	3
	+	14	3
		EGFR (gen)	
		normal	ganancia
EGFR	-	2	0
	+	19	7
		PTEN (gen)	
		normal	pérdida
PTEN	-	10	13
	+	2	3
		TP53	
		normal	ganancia
p53	-	5	0
	+	19	4

No se observó ninguna relación estadísticamente significativa al estudiar la relación entre los resultados de la IHQ y la MLPA en los CEPA.

5.4. Interrelación de los resultados de las IHQ

A continuación se representa en tablas de contingencia la relación de los resultados de la IHQ para cada una de las proteínas estudiadas con las otras.

Se estudia ambos tipos de tumor de forma conjunta y por separado.

Tabla 26: Interrelación de los resultados de las IHQ. Ambos tipos de tumor de forma conjunta.

		EGFR			PTEN			p53	
		-	+		-	+		-	+
p16	-	10	30		30	9		11	29
	+	1	21		20	2		5	17
		p=0,079							
EGFR	-				13	1		6	7
	+				40	11		11	41
								p=0,085	
p53	-				14	3			
	+				39	8			

La positividad de p16 parece relacionarse con la negatividad de EGFR aunque no alcanza significación estadística (p=0,079).

La positividad de EGFR parece relacionarse con una mayor proporción de p53 positivos pero sin alcanzar significación estadística (p=0,085).

Tabla 27: Interrelación de los resultados de las IHQ en los CECAE.

		EGFR			PTEN			p53	
		-	+		-	+		-	+
p16	-	8	19		21	5		8	19
	+	0	3		3	0		2	1
								p=0,251	
EGFR	-				10	1		5	5
	+				16	5		6	16
								p=0,252	
p53	-				10	1			
	+				16	4			

No se encontró ninguna relación estadísticamente significativa en los CECAE. La relación entre EGFR y p53 no es estadísticamente significativa pero se aproxima a lo observado al estudiar ambos tipos de tumor de forma conjunta.

Tabla 28: Interrelación de los resultados de las IHQ en los CEPA.

		EGFR			PTEN			p53	
		-	+		-	+		-	+
p16	-	2	11		9	4		3	10
	+	1	18		17	2		3	16
EGFR	-				3	0		1	2
	+				24	6		5	25
p53	-				4	2			
	+				23	4			
						p=0,295			

No se encontró ninguna relación estadísticamente significativa en los CEPA.

6. Discusión

El CECAE es un tumor raro, en ocasiones difícil de diagnosticar y muy agresivo en sus estadios más avanzados.

En la gran mayoría de las series publicadas encontramos los CECAE englobados dentro de los carcinomas epidermoides de hueso temporal, lo que también incluye los tumores del oído medio e incluso en ocasiones los tumores de pabellón auricular que afectan al hueso subyacente. Sólo algunas series son específicas de los tumores del CAE^{4,14,18,30}.

Por otro lado, los CEPA son tumores más frecuentes y suelen ser diagnosticados en fases tempranas de la enfermedad. Además las características anatómicas de su lugar de origen permiten la realización de tratamientos quirúrgicos mucho más sencillos que los del CAE, por lo que su pronóstico es mejor.

El objetivo principal de este trabajo es intentar hacer una aproximación a la biología molecular de los CECAE. La idea de estudiar paralelamente los CEPA para compararlos con los CECAE surge del hecho de que ambos son tumores epidermoides que asientan sobre la piel, en zonas adyacentes, pero con etiologías probablemente distintas. No consideramos adecuado valorar de forma conjunta los CECAE y otros carcinomas epidermoides que puedan afectar al hueso temporal (como primarios de oído medio o piel) ya que los mecanismos tumorigénicos pueden ser muy diferentes.

Hasta la fecha hay pocos estudios que hayan intentado aportar información sobre la biología molecular de los tumores epidermoides de hueso temporal. En ellos se ha estudiado la transición epitelio mesénquima a través de inmunohistoquímica con vimentina como posible marcador de mal pronóstico¹¹²; la relación entre el estado de STAT3 y los parámetros clínicos¹¹³; la asociación de la endoglina (CD105), proteína relacionada con la neoangiogénesis, con las recurrencias¹¹⁴ y la relación entre la concentración citoplasmática de la proteína supresora de tumores MASPIN y una menor tasa de recurrencia¹¹⁵.

En este estudio analizamos los aspectos clínico-patológicos, etiológicos y la supervivencia de unas series de 39 CACAE y 36 CEPA. Después de un primer análisis de ganancias y pérdidas génicas en todo el genoma, nos centramos en 4 genes en particular: EGFR, PTEN, CDKN2A (p16) y TP53 (p53). Estos genes son representantes claves de rutas de señalización descritas en la literatura como importantes en el carcinoma epidermoide, sea de piel o de mucosa.

6.1. Aspectos clínico-patológicos

6.1.1. CECAE

Los aspectos clínico patológicos de nuestra serie se asemejan a los descritos en otros trabajos publicados.

En nuestra muestra hay una mayor proporción de hombres que de mujeres (59% contra 41%), dato que concuerda con lo observado en otras series^{5,10}. La media y mediana de edad al diagnóstico fue similar pero ligeramente mayor de lo esperable según los datos publicados hasta la fecha, siendo de 72 y 75 años respectivamente.

Es una queja habitual en la literatura el hecho de que no haya un sistema de estadificación universalmente aceptado para los tumores de hueso temporal^{8,34}. Hay que recordar que la clasificación de Pittsburgh^{4,18}, utilizada en este trabajo, es únicamente válida para los carcinomas epidermoides de conducto auditivo externo. La categoría T más frecuente en nuestro estudio fue la 4, con un 53% de los casos, mientras que hubo un 60% de pacientes en estadio IV. El hecho de que tenga una presentación clínica que simula otras patologías benignas mucho más frecuentes retrasa el diagnóstico, lo que puede explicar la mayor frecuencia de tumores en estadios avanzados. En la mayoría de las series también predominan los estadios avanzados^{4,116} aunque muchas de ellas no son directamente comparables porque usan sistemas de clasificación diferentes como el de Stell and McCormick^{30,117} o, como ya se ha dicho, no son series exclusivas de tumores del CAE^{5,26,36}.

En nuestro grupo de pacientes hubo un 18% con metástasis regionales, lo que es muy similar a lo publicado en otras series^{10,26,116}.

Se ha publicado una peor supervivencia en estos tumores a medida que disminuye su grado de diferenciación¹⁵, pero nosotros no observamos ninguna correlación significativa.

El 21% de nuestros pacientes habían recibido radioterapia previamente en el área de cabeza y cuello. Esta proporción puede considerarse comparable con lo descrito en otras series, aunque los porcentajes varían algo, pudiendo ir del 10%¹⁶ al 39%¹³. La radioterapia se considera uno de los factores de riesgo más importantes para la aparición de este tumor^{118,119}. Se ha descrito una incidencia de tumores de oído 1000

veces superior a la población general en los pacientes irradiados previamente por un carcinoma de cávum¹¹⁸. Otro factor de riesgo reconocido es la patología inflamatoria crónica del oído medio pero en nuestra muestra sólo había dos pacientes con historia de otitis crónica.

Todos los pacientes recibieron tratamiento quirúrgico salvo uno, que se trató sólo de forma paliativa. En 25 casos (66%) se realizó tratamiento con radioterapia postoperatoria y en dos casos además se administró quimioterapia como parte del tratamiento inicial. Hay mucha variabilidad en la literatura en lo que a la administración postoperatoria de radioterapia se refiere, encontrando desde un 4% (1/25)¹²⁰ hasta el 82% (37/45)³⁷.

Se realizó resección local, sin resecar hueso, con o sin injertos de piel o colgajos locales en 10 casos (26%). Se realizó resección lateral de temporal en 9 casos (24%). Se llevó a cabo una resección subtotal del temporal en 14 pacientes (37%). La resección total del temporal se hizo en 4 casos (11%).

Se llevó a cabo vaciamiento ganglionar cervical como parte del tratamiento inicial en 9 casos (24%). La parotidectomía como parte del tratamiento inicial se realizó en 16 casos (42%). El manejo del cuello y de la parótida varía mucho en las diferentes series, pudiéndose encontrar desde un 0% (0/15)¹²¹ a un 100% (17/17)¹²² de vaciamientos cervicales y entre un 28% (23/81)²³ y un 100% (17/17)¹²².

Durante el periodo de seguimiento aparecieron recidivas en 16 casos (42%). Doce pacientes tuvieron una recidiva local (32%) y 4 regional (11%). En uno de los casos ambas fueron diagnosticadas de forma simultánea (3%). Siete pacientes requirieron cirugía de rescate (18%). Se realizó vaciamiento cervical por recidiva regional en 5 casos (13%); una parotidectomía y una resección de cóndilo mandibular y carótida externa por sendas recidivas locales. Nuestra tasa de recidivas fue similar a la observada en otras series^{26,35}.

No apreciamos una relación estadísticamente significativa entre la categoría T y la aparición de recidivas, lo que se podría explicar por el pequeño tamaño de la muestra ya que parece lógico pensar que tumores mayores tendrán una mayor tendencia a la recidiva. Sí encontramos más recidivas en el grupo que tenía metástasis regionales en el momento del diagnóstico aunque sin significación estadística ($p=0,085$). Las adenopatías cervicales son consideradas uno de los factores pronósticos más importantes por lo que este es un resultado esperable^{25,38,39}.

También pudimos observar una mayor tendencia a la recidiva en los pacientes que habían recibido radioterapia previa aunque, también, sin significación estadística ($p=0,164$). Se ha publicado una supervivencia libre de enfermedad del 30% a 3 años en tumores radioinducidos del oído¹⁸, lo que supone una tasa de recidivas superior a la mayoría de series y concuerda con lo observado por nosotros. Una explicación podría ser que el hecho de haber recibido radioterapia previamente condiciona la posibilidad de volver a utilizarla como tratamiento complementario postquirúrgico. Aún así 3 de los 8 pacientes de este grupo fueron re-irradiados. Uno de ellos había recibido radioterapia 20 años antes por un tumor en el pabellón contralateral, otro se había tratado 25 años antes de un adenoma hipofisario y el último de un tumor de seno maxilar.

La supervivencia global fue del 43% a los tres años y del 28% a los cinco años, mientras que la supervivencia específica de enfermedad fue del 57% a los tres años y del 48% a los 5 años. La diferencia entre ambos tipos de supervivencia se podría explicar por el hecho de que la media de edad de nuestros pacientes era muy avanzada. En un meta-análisis reciente que incluye a 752 pacientes se ha observado una supervivencia global del 57% a 5 años. Este dato difiere bastante del observado en nuestra serie, lo que podría estar en relación con diferencias en las características demográficas y clínicas de nuestros pacientes. En cuanto a la supervivencia específica de enfermedad, se han publicado resultados a 5 años del 54%³⁰, del 59%³⁸ y del 73%³⁷.

El CECAE es un tumor muy poco frecuente y aunque nuestra serie es bastante extensa en comparación a las que hay publicadas (teniendo en cuenta que no incluye todos los tumores del hueso temporal) la realidad es que el número de casos es pequeño para trabajar con la estadística. Por este motivo, con el fin de poder comparar la categoría T o el estadio con las diferentes variables estudiadas, tuvimos que clasificar los casos en dos grupos. Decidimos que por las características de nuestra serie, en la que son mayoritarios los T4 y el estadio IV, ese era un punto de corte adecuado, quedando agrupados T1, T2 y T3 y los estadios I, II y III. De esta forma observamos que la supervivencia en los tumores en estadio IV y los T4 es inferior a la del resto, aunque de forma no estadísticamente significativa ($p=0,148$). Este dato concuerda con la práctica totalidad de las series publicadas (Tabla 3).

Coincidiendo con lo descrito en la literatura^{32,40}, en nuestra serie la supervivencia es peor en los casos con adenopatías metastásicas aunque sin alcanzar la significación estadística ($p=0,153$), probablemente condicionado por el escaso número de pacientes en este grupo.

La supervivencia específica de enfermedad fue claramente peor en el grupo que sufrió una recidiva durante el periodo de observación ($p=0,035$). Esto coincide con lo publicado²⁶ y podría relacionarse con el hecho de que los tumores más agresivos son los que tienen más tendencia a recidivar.

Los casos en los que se había recibido radioterapia previa tuvieron una peor supervivencia ($p=0,077$), lo que podría estar relacionado con la limitación a la hora de recibir radioterapia postoperatoria o con una mayor agresividad de los tumores radioinducidos. Las series de tumores radioinducidos del oído son muy cortas por lo que los resultados son dispares, habiéndose publicado supervivencias que van del 0% (0/11) a 4 años¹¹⁸ al 89% (8/9) a 3 años¹²³.

6.1.2. CEPA

El área de cabeza y cuello es la zona sobre la que asientan más del 80% de todos los cánceres de piel no-melanoma. Los CEP que se producen en el pabellón auricular son considerados de alto riesgo⁵⁴ ya que la piel fina del pabellón favorece la diseminación tumoral. También se considera que los planos de fusión embrionarios subyacentes forman un tejido que es más propenso a la invasión y diseminación tumoral¹²⁴. Así pues, el CEPA tiene una tendencia a dar metástasis regionales mayor que otros CEP y cuando éstas se producen la supervivencia específica de enfermedad baja del 70-80% hasta el 33% a tres años⁵⁴.

La proporción de hombres en nuestra muestra es claramente superior a la de mujeres ya que sólo hay una (3%). Este es un dato llamativo pero que ya había sido publicado con anterioridad en varios estudios^{124,125}, encontrando proporciones del 95% al 100% para el sexo masculino. Entre las diferentes causas tal vez se pueda incluir algún factor cultural que condicione la forma de vestir o peinarse y por lo tanto de protegerse del sol. Esta proporción es muy superior a la hallada en los CECAE y es una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,000$).

La media y la mediana de edad fue de 78 años, similar a lo descrito en otras series^{54,125}. La diferencia con los CECAE es escasa ya que ambos tipos de tumores tienden a aparecer en edades avanzadas.

La gran mayoría de los casos se presentaron en estadios tempranos (64% en estadio I) en contraposición a lo observado en el CECAE, donde el 60% de los casos eran estadio

IV. No hubo metástasis regionales ni a distancia en el momento del diagnóstico. Parece lógico pensar que la causa fundamental por la que el diagnóstico llega en fases tempranas es por el hecho de que los CEPA son fáciles de identificar en estadios iniciales, no siendo así el caso de los CECAE.

El 69% de los tumores fueron bien diferenciados y el 31% restante fue moderadamente diferenciado. No hubo tumores poco diferenciados. Globalmente los CEPA se presentaron con un mejor grado de diferenciación histológica que los CECAE, aunque las diferencias fueron escasas.

Se pudo demostrar a través de la historia clínica una exposición laboral al sol en el 22% de los casos. Este número parece a priori muy bajo pero hay que tener en cuenta que la exposición a la radiación UV no tiene que ser necesariamente en el ámbito laboral. Además hay que reconocer que en muchos casos la historia clínica no recogía este dato. En cualquier caso, está aceptado de forma unánime en la literatura que la exposición a la radiación solar, especialmente a la radiación UVB, es el agente causal más importante en los carcinomas de piel no-melanoma^{126,127}. También se considera que la infección por HPV puede estar relacionada con la patogenia del CEP actuando éste como co-carcinógeno junto con la radiación UVB¹²⁸.

Todos los pacientes fueron tratados quirúrgicamente y en 5 casos (13,9%) se realizó tratamiento con radioterapia postoperatoria en función de los criterios clínicos. Se considera que las indicaciones generales de radioterapia postoperatoria en los CEP de cabeza y cuello son la invasión perineural, la afectación ganglionar o parotídea, las lesiones recurrentes, la invasión ósea, la extensión extracapsular, las histologías desfavorables y el tamaño superior a 4cm⁵⁵.

Seis pacientes (16,7%) tuvieron una recidiva local y tres (8,3%) una recidiva regional. Este es un dato bastante más bajo que el observado en el CECAE (42%), lo que resulta lógico teniendo en cuenta que una gran proporción de los CEPA se encontraba en fases más tempranas de la enfermedad, donde los pacientes con tumores T1 tuvieron muchas menos recidivas que el resto (1/23 en T1 contra 6/13 en el resto) (p=0,001). Se ha descrito una incidencia de entre el 6 y el 13% de metástasis ganglionares secundarias en los CEPA¹²⁵, lo que concuerda con lo observado por nosotros.

La supervivencia global fue del 54% a los tres años y del 37% a los cinco, mientras que la supervivencia específica de enfermedad fue del 78% a los tres años y del 63% a los cinco. Ésta es una supervivencia específica de enfermedad mejor que la observada en

los CECAE (57% y 48% a tres y cinco años respectivamente) y similar a la descrita para los carcinomas epidermoides de piel de alto riesgo (70% a tres años)¹²⁹.

El tamaño de la muestra en el caso de los CEPA es pequeño por lo que, con el fin de poder comparar la categoría T con las diferentes variables estudiadas, decidimos clasificar los casos en dos grupos. Consideramos que dadas las características de nuestra serie, en la que son mayoritarios los T1, ese era un punto de corte adecuado, quedando agrupados T2, T3 y T4.

La supervivencia fue mucho mejor en los T1 que en el resto ($p=0,0001$) y en los pacientes que no tuvieron una recidiva ($p=0,033$), lo que resulta lógico y concordante con lo descrito en la literatura^{127,129}.

6.2. Alteraciones genético-moleculares

6.2.1. Alteraciones en el número de copias génicas

6.2.1.1. P084

Todos los tumores estudiados presentan alteraciones en el número de copias génicas.

Llama la atención tras estudiar los resultados obtenidos con el kit P084 el hecho de que pese a que hay una proporción muy superior de tumores en fases iniciales en el grupo de los CEPA, éstos presentan un mayor número global de alteraciones genéticas que los CECAE. La radiación solar es un conocido agente mutágeno y la exposición a la misma podría explicar estas diferencias.

El perfil genético global en ambos tumores presenta las alteraciones características de los carcinomas epidermoides en general, ya sean de mucosa o de piel: pérdidas en 3p, 8p, 13q, 17p y 18q y ganancias en 7p, 7q, 8q, 11q13 y 20q. Estas alteraciones se han demostrado previamente en estudios que utilizaron el mismo kit comercial de MLPA en carcinomas epidermoides de laringe, faringe y nasosinusales¹³⁰⁻¹³² y en otros a través de otras técnicas¹³³ como la hibridación genómica comparativa (CGH) o microarray CGH¹³⁴.

Una discordancia que encontramos está en la región 17p y en particular el gen supresor de tumores TP53 localizado en 17p13, que en los carcinomas epidermoides generalmente muestra pérdidas –habiéndose visto en estudios de LOH la alteración de al menos un locus en 17p13.1 en el 84% de los CEP⁸²- pero no en nuestra serie de CACAE ni de CEPA donde, de hecho, lo que encontramos fue un 27% y un 25% de ganancias respectivamente. No hemos encontrado en la literatura artículos que concuerden con este hallazgo.

6.2.1.2. P105

Tras estudiar los genes CDKN2A, EGFR, ERBB2, PTEN y TP53 comprobamos que tanto los CECAE como los CEPA tienen un perfil de ganancias y pérdidas similar aunque con alguna diferencia reseñable. Los CECAE tienen más pérdidas en CDKN2A (36% contra 21%) y más ganancias en ERBB2 (32% contra 18%) y TP53 (32% contra 14%); mientras que los CEPA tienen más ganancias en EGFR (25% contra 9%) y más pérdidas en PTEN (57% contra 50%), siendo ésta la alteración más frecuente en ambos tipos de tumor. No se obtuvo significación estadística en ninguna de estas diferencias, probablemente motivado por el escaso tamaño de la muestra, pero algunas sí parece que pudieran ser relevantes, como es el caso de EGFR ($p=0,266$) o TP53 ($p=0,178$).

En estudios de LOH y metilación de CDKN2A se ha observado que la inactivación de este gen es uno de los eventos más frecuentes en los CECC, presentándose en más del 50% de los casos¹³⁵. En tumores de piel la pérdida de CDKN2A también es muy frecuente, habiéndose observado en estudios de LOH la alteración de al menos un locus en 9p21 en hasta el 46% de los casos⁸².

En los CECC se ha observado un aumento del número de copias de EGFR en cerca del 45% de los casos^{136,137}, mientras que en los CEP se ha detectado por FISH un aumento del número de copias de EGFR en un 20% de los casos¹³⁸. Este último dato es concordante con lo que nosotros hallamos en los CEPA.

Se ha descrito LOH en PTEN entre el 41% y el 71% de los CECC¹³⁹, lo que supone una proporción similar a la de pérdidas del gen observada por nosotros en los dos tipos de tumor.

Al igual que se observó con el kit p084, es llamativo el hecho de que una proporción significativa de ambos tipos de tumor hayan presentado una ganancia en el gen supresor de tumores TP53. Tal y como se explicó anteriormente, este es un hallazgo

poco frecuente ya que en los carcinomas epidermoides suele haber pérdidas de la región cromosómica en la que se halla TP53.

6.2.2. Alteraciones en la expresión proteica

Los CEPA muestran un perfil global de expresión proteica algo más alterado que los CECAE, con una mayor expresión de EGFR y p53 y una pérdida de expresión mayor de PTEN. Los CECAE presentaron una pérdida de expresión de p16 mayor que los CEPA.

En los casos de p16 y EGFR las diferencias son estadísticamente significativas, habiendo un 10% (3/31) de expresión positiva de p16 en los CECAE frente a un 59% (19/32) en los CEPA ($p=0,000$); y un 67% (22/33) de expresión positiva de EGFR en los CECAE frente a un 91% (30/33) en los CEPA ($p=0,033$).

Los CECC relacionados con HPV muestran sobreexpresión de p16 en la IHQ¹⁴⁰ y suelen mantener intacto p53. En nuestro entorno, donde se ha encontrado una muy baja incidencia de CECC relacionados con HPV, se ha visto una expresión de p16 de entre el 12% y el 14% en tumores de laringe, hipofaringe y orofaringe^{141,142}.

Se ha descrito una expresión de p16 entre el 33% y el 60% de los CEP de áreas expuestas al sol^{143,144}. En la piel, p16 parece sobreexpresarse de forma progresiva en respuesta a la radiación UVB según avanza el proceso tumorigénico y de forma totalmente independiente del HPV. Se cree que el p16 mutante y disfuncional, sobreexpresado en la IHQ por tener una vida media más larga, no es capaz de provocar el arresto del ciclo celular que debería suceder como respuesta a las mutaciones de otros genes provocadas por la radiación UV¹⁴³. Esta sobreexpresión de p16 mediada por radiación UVB puede explicar las diferencias halladas en los dos tipos de tumor de nuestra serie y podría indicar mecanismos tumorigénicos distintos.

La metilación de promotores es un cambio epigenético que se asocia de forma frecuente con la inactivación de CDKN2A en los CECC relacionados con el tabaco¹⁴⁵. Por otro lado, se ha visto que en la piel las especies reactivas de oxígeno (ERO) provocan la activación de p16 y la desmetilación de promotores en queratinocitos normales pero no en los tumorales. De esta forma los queratinocitos normales entran en senescencia como respuesta a la agresión de las ERO pero no los tumorales¹⁴⁶. En este trabajo no hemos estudiado la metilación de CDKN2A pero sería interesante investigar en futuros

estudios si este es un mecanismo relacionado con la inactivación de p16 en los CECAE o en el grupo con pérdida de expresión de los CEPA.

EGFR es una proteína transmembrana perteneciente a la familia de las tirosina-quinazas encargada de la proliferación, supervivencia, migración y diferenciación celular¹⁴⁷. La unión de EGFR con su ligando provoca la homodimerización con otra proteína EGFR o la heterodimerización con otra proteína de la familia HER2 facilitando su autofosforilación y activación. Esto provoca a su vez la activación de varias vías de señalización, entre las que se incluye PI3K/AKT, RAS-RAF-MEK-MAPK, PLC-gamma/PKC, STAT y NFkappaB⁷¹.

La sobreexpresión de EGFR es frecuente en muchas neoplasias malignas como la vejiga, pulmón, estómago, próstata, cerebro, páncreas, mama, ovario, etc. En los CECC, EGFR está sobreexpresado en hasta un 90% de los casos^{94,148}.

En los CEP se ha observado la sobreexpresión de EGFR la mayoría de los casos, habiéndose publicado cifras entre el 80% y el 100%^{98,149,150}. Tanto en los CECC como en los CEP la mutación de EGFR parece ser un evento poco frecuente⁷¹, siendo habitual el aumento en el número de copias del gen¹⁴⁸.

En nuestro estudio hallamos una menor sobreexpresión de EGFR en los CECAE. Una de las causas podría ser que hay un subgrupo de pacientes diagnosticados de CECAE cuyo tumor parece relacionado con el hecho de haber recibido radioterapia previamente. En ese subgrupo la expresión de EGFR es bastante menor (se discutirá más adelante). En CECAE esporádicos la sobreexpresión de EGFR es del 76%, lo que se acerca más a lo descrito tanto en CECC como en CEP.

Veintiuno de 32 CECAE (66%) y 27 de 33 CEPA (82%) presentaron sobreexpresión de p53. Las diferencias entre ambos grupos no alcanzaron la significación estadística. La positividad de p53 suele indicar mutación de TP53 y este es un evento muy frecuente tanto en los CECC como los CEP. La proteína mutante escapa a la degradación y se acumula en la célula. En los CECC TP53 se encuentra mutado entre el 60% y el 80% de los casos⁶⁷. La mutación de TP53 es un evento temprano y muy frecuente en los CEP de áreas expuestas al sol, encontrándose ya en el 64% de las queratosis actínicas y en el 84% de los CEP⁸². En los CEP la inestabilidad genómica se relaciona con la exposición a radiación UVB, habiéndose observado la mutación característica CC-TT o C-T en TP53 en cerca de un 60% de los casos⁸¹. En los CEP se ha descrito una menor expresión de p53 en los tumores originados en zonas no expuestas al sol, lo que podría

resultar concordante con nuestros resultados⁷⁸. Dado que la mutación de p53 se encuentra en una gran proporción de las lesiones premalignas, se asume que son necesarias alteraciones adicionales para el desarrollo tumoral¹⁵¹.

La vía PI3K/PTEN/AKT es una de las más frecuentemente alteradas en los CECC¹⁵², habiéndose encontrado defectos en alguno de sus componentes en cerca del 50% de los tumores¹⁰², favoreciendo la supervivencia celular y la resistencia a la apoptosis. En los CECC se ha observado pérdida de expresión de PTEN entre un 30% y un 60% de los casos^{153,154}.

Se ha visto que la exposición a radiación UVA produce una supresión de la transcripción de PTEN *in vitro* e *in vivo* por alteración del ARN mensajero¹⁵⁵, reduciéndose la cantidad de proteína en la célula.

La radiación UV estimula en queratinocitos normales tanto p53 como la vía AKT/mTOR, generándose así un equilibrio inestable que puede llevar a la célula tanto a la senescencia o apoptosis como a la supervivencia y expansión clonal de células irradiadas¹⁵⁶. Se han hallado niveles bajos de PTEN en lesiones cutáneas de zonas expuestas al sol, tanto en queratosis actínica (expresión reducida en el 92% de los casos) como en el CEP (expresión reducida en el 94% de los casos), lo que sugiere que las alteraciones de esta proteína juegan un papel importante en la carcinogénesis de este tipo de tumor¹⁵⁷.

En nuestra serie encontramos una expresión de PTEN reducida o perdida en 26 de 32 CECAE (81%) y 27 de 33 CEPA (82%). Ambos tumores parecen perder la expresión de PTEN con más frecuencia que los CECC y en un porcentaje similar a lo descrito para los CEP. Se plantea la duda de por qué los dos tipos de tumor presentan niveles prácticamente iguales de pérdida de expresión cuando uno de ellos ha tenido exposición a la radiación UV, factor externo que se sabe que afecta a la expresión de PTEN, y el otro no.

6.3. Relación entre las variables clínico-patológicas y las alteraciones genético-moleculares

6.3.1. CDKN2A/p16

CDKN2A se relacionó de forma estadísticamente no significativa ($p=0,125$) con la categoría T en los CECAE, observándose que cuando no hubo pérdida del gen el T4 fue más frecuente. Una posibilidad podría ser que algunos de los tumores más agresivos utilizaran vías de progresión no relacionadas con CDKN2A. La pérdida de CDKN2A se considera un acontecimiento temprano en la tumorigénesis de una gran proporción de los carcinomas epidermoides por lo que dado que no hubo significación estadística este hecho podría ser fruto del azar. También se relacionó la ausencia de pérdida del gen CDKN2A con una mejor diferenciación histológica en los CECAE aunque sin significación estadística ($p=0,165$). Aunque la pérdida de CDKN2A es un evento temprano y ya se encuentra en muchas lesiones premalignas de cabeza y cuello⁶⁷ y de piel expuesta al sol, el acúmulo de alteraciones genéticas puede ir paralelo a la pérdida de diferenciación histológica en los CECAE.

En los CEPA la expresión de p16 fue más frecuente en el grupo de los T1 que en el grupo T2-T4 (15/20 contra 4/12) ($p=0,03$). Está descrito el hecho de que p16 se va sobreexpresando más según progresa el tumor como respuesta a mutaciones dependientes de la radiación UVB que generan el acúmulo de la proteína en la célula¹⁴³. Esto no parece concordante con lo que sucede en los tumores más avanzados de nuestra serie, lo que podría indicar que en nuestro caso la pérdida de expresión de p16 de este subgrupo se produce por algún mecanismo diferente, como por ejemplo la delección, que según algunos autores puede aparecer en los CEP durante la progresión tumoral⁸³.

La expresión de p16 mostró una tendencia ($p=0,156$) a conllevar una mejor supervivencia libre de enfermedad y una mejor supervivencia específica de enfermedad ($p=0,158$) en los CECAE. De forma similar, en el caso de los CEPA, se observó una mejor supervivencia libre de enfermedad ($p=0,222$) y una mejor supervivencia específica de enfermedad ($p=0,163$) en los casos positivos para p16, también de forma estadísticamente no significativa. La sobreexpresión de p16, tanto de la forma *wild-type* como de la mutante, se ha relacionado con peor pronóstico en tumores como el neuroblastoma, mama, ovario, cérvix y próstata⁹⁰, mientras que su expresión se ha

considerado por otros autores como el factor de buen pronóstico más importante en los carcinomas epidermoides de orofaringe¹⁵⁸, aunque este hecho está probablemente relacionado con los tumores HPV-positivos y podría no ser aplicable en poblaciones como la nuestra donde la prevalencia tumores relacionados con HPV es menor. Por otro lado, también se ha descrito una mejor supervivencia en los casos en los que había expresión de p16 en los leiomiomas cutáneos⁵⁴.

6.3.2. EGFR

La ganancia del gen EGFR se relacionó de forma estadísticamente significativa ($p=0,009$) con una menor diferenciación histológica en los CEPA. La expresión de EGFR se ha relacionado con una menor diferenciación histológica en algunos tumores¹⁵⁹, lo que resulta concordante con nuestros datos.

En el caso de los CEPA sólo la ganancia del gen EGFR se acercó a la significación estadística tras relacionarla con una menor supervivencia global ($p=0,105$). Asimismo, los pacientes con CEPA que presentaron expresión de EGFR en la IHQ tuvieron una peor supervivencia global ($p=0,059$) y específica de enfermedad ($p=0,285$) aunque sin alcanzar la significación estadística. Tanto la ganancia en el número de copias del gen como la sobreexpresión de la proteína se han relacionado en muchos estudios con un peor pronóstico en muchos tipos de tumores distintos como páncreas, pulmón, riñón, mama, colorrectal, CECC y CEP entre otros^{137,147,150}.

En los pacientes diagnosticados de CECAE que habían recibido radioterapia previa fue menos frecuente la sobreexpresión de EGFR que en los que no la habían recibido (2/7 contra 19/25). Esa diferencia fue estadísticamente significativa ($p=0,032$). Se ha descrito en tumores de tiroides radioinducidos un patrón de alteraciones genéticas que los diferencia de los tumores esporádicos¹⁶⁰. Parece razonable pensar que la radioterapia previa puede conllevar mecanismos tumorigénicos distintos a los de los tumores esporádicos con sus características propias. En nuestra serie, los CECAE radioinducidos parecen tener un mecanismo de progresión tumoral menos relacionado con EGFR que los esporádicos. No hemos encontrado en nuestro estudio ninguna otra alteración molecular en los pacientes previamente irradiados que nos permita sospechar la vía de progresión tumoral alternativa a EGFR en este grupo de tumores.

Uno de los motivos por los que EGFR es especialmente importante es por el uso creciente de terapias biológicas específicamente dirigidas a su inhibición, como los

anticuerpos monoclonales cetuximab o gefitinib que se utilizan en tumores avanzados de cabeza y cuello y pulmón respectivamente. En los últimos años se ha utilizado el cetuximab también en los CEP inoperables o metastásicos -acompañado o no de RT- dada la importancia de EGFR en su patología^{71,149,161}.

6.3.3. PTEN

La pérdida de PTEN se relacionó de forma estadísticamente significativa ($p=0,031$) con una mejor supervivencia global y de una forma un poco más débil ($p=0,079$) con una mejor supervivencia específica de enfermedad en los CECAE. Este dato contrasta con lo descrito para los CECC, donde la LOH de 10q, región donde se halla el gen PTEN, se relaciona con un peor pronóstico¹⁶².

Los casos de CECAE en los que hubo expresión de PTEN en la IHQ fueron todos T3 y T4 (6/6 contra 16/25) ($p=0,198$). La mayoría de los PTEN positivos también se manifestaron en tumores más avanzados que T1 en los CEPA (5/6 contra 8/27) ($p=0,025$). La expresión de PTEN es más frecuente en pacientes con metástasis ganglionares (3/6 contra 3/25) ($p=0,069$) en los CECAE. En el caso de los CEPA podría haber una supervivencia global peor cuando hay expresión de PTEN en la IHQ ($p=0,116$). Estos datos son similares en los dos tipos de tumor estudiados pero no concuerdan con lo que se conoce en el caso de los CECC, donde la expresión de PTEN se relaciona con un mejor pronóstico y mejor control locorregional¹⁵⁴. Aún así, sí se ha publicado una peor supervivencia en carcinomas avanzados de ovario cuando la expresión de PTEN está intacta¹⁶³ o la aparición de tumores de mayor tamaño y peor pronóstico en mama cuando PTEN fue positivo en la IHQ¹⁶⁴.

La normalidad de PTEN (sin pérdidas génicas y expresión positiva en la IHQ) podría indicar que cuando el proceso tumorigénico, tanto de los CECAE como de los CEPA, se produce por vías no relacionadas con PTEN se generan tumores más agresivos. En los dos tumores estudiados por nosotros parece cumplirse este hecho, tanto en lo referente a las pérdidas génicas como en la IHQ. De todas formas, no se consiguió relacionar de forma estadísticamente significativa la normalidad del gen en la MLPA con la normalidad en la expresión de la IHQ.

6.3.4. TP53/p53

La disfunción del gen TP53 está presente en la mayoría de los cánceres humanos y también específicamente en los CEP y CECC. Aún así, aproximadamente un 20% de los CECC no manifiestan una inactivación de p53. Puede ser que el proceso de carcinogénesis en estos tumores sea independiente de p53 o que las alteraciones se produzcan en otras proteínas de la vía de p53¹⁶⁵. Aunque p53 suele estar inactivado en el CEP, este hecho por sí solo no inicia el cáncer ya que dicha inactivación provoca en los queratinocitos la diferenciación escamosa y la expulsión de las células mutantes, considerándose éste un mecanismo de defensa de la epidermis¹⁶⁶. Además p53 suele estar ya inactivado en la mayoría de queratosis actínicas. De todas formas, la inactivación de p53 sí influye negativamente una vez se ha producido el cáncer aumentando la inestabilidad genómica y la progresión tumoral¹⁶⁶.

La inactivación de p53 en los CEP llega al 80% y sobretodo es a expensas de la mutación del gen con la firma característica de la exposición a la radiación UVB¹⁶⁶. La mayoría de las mutaciones de TP53, aproximadamente el 75%¹⁶⁷, son *missense*. Esto genera una proteína mutante que escapa a los mecanismos de degradación y se acumula en el núcleo de la célula, siendo identificable en la IHQ.

En nuestra serie la ganancia de TP53 se relacionó, aunque de forma no estadísticamente significativa ($p=0,135$), con una peor supervivencia libre de enfermedad en el CECAE. Curiosamente se observó la tendencia contraria en los CEPA ($p=0,269$). No hemos encontrado literatura que informe de ganancias en TP53 por lo que para la interpretación de estos datos serían necesarios nuevos estudios que pudiesen dar explicación a este hecho.

En el grupo de los T1-T3 de CECAE la expresión de p53 en la IHQ se observó en un 85% de los casos (11/13) mientras que en los T4 la expresión fue positiva en un 56% de los casos (10/18). No se llegó a la significación estadística ($p=0,129$) pero podría sugerir una tendencia a perder la expresión de p53 en estadios más avanzados o la alteración de otras proteínas de la vía de p53 en este subgrupo de tumores.

Los pacientes con expresión de p53 en la IHQ tuvieron una peor supervivencia global en los CECAE ($p=0,104$) y en los CEPA ($p=0,117$). Típicamente la mutación de TP53, y por lo tanto su expresión en la IHQ, se ha considerado de mal pronóstico^{65,70} aunque más recientemente se ha observado que el tipo y localización de la mutación son factores muy importantes a la hora de valorar el pronóstico en varios tipos de tumor y que la IHQ

por sí sola puede llevar a datos contradictorios¹⁶⁷. Es por ello que aunque nuestros datos parecen concordar con lo publicado en la literatura, sería interesante analizar qué tipo de mutaciones de p53 son las que encontramos tanto en los CEPA como en los CECAE.

6.4. Interrelaciones en la expresión proteica

Estudiamos la interrelación de los resultados de las IHQ para ver si la expresión de alguna de las proteínas estudiadas se relacionaba de forma positiva o negativa con la expresión del resto. Se estudió ambos tipos de tumor de forma conjunta y por separado.

No hubo ningún resultado estadísticamente significativo aunque prácticamente siempre que p16 fue positivo también lo fue EGFR ($p=0,079$); y la positividad de EGFR y p53 se presentó de forma conjunta con mucha frecuencia ($p=0,085$). Al estudiar cada tipo de tumor por separado no se encontró ninguna relación con significación estadística. Aún así, en la relación entre EGFR y p53 en los CECAE se observó una tendencia similar a la obtenida al estudiar los dos tipos de tumor de forma conjunta ($p=0,252$).

Los tumores son poblaciones celulares que van evolucionando a lo largo del tiempo y van adquiriendo mutaciones que les confieren ventajas evolutivas que les permiten progresar. Por ese motivo es habitual que una población celular clonal que adquiere unas capacidades gracias a la activación de una vía no presente alteraciones adicionales que confieran las mismas capacidades. Aplicado a nuestro caso, el ciclo celular se puede estimular a través de la aplicación de EGFR o de la inhibición de p16 por lo que parece razonable pensar que si EGFR está activado haya menos proporción de pérdida de expresión de p16 y viceversa.

En procesos relacionados con la inflamación crónica se puede dar la sobreexpresión de EGFR que actúa a través de numerosas "conversaciones cruzadas" como organizador de la respuesta inflamatoria a través de factores de crecimiento, citoquinas y mediadores de la inflamación¹⁶⁸. Paralelamente, la inflamación también puede generar ERO que a su vez se han relacionado con el daño en el ADN a través de mutaciones G-A en TP53¹⁶⁹.

7. Conclusiones

- 1.** Los aspectos clínico-patológicos de nuestra serie son comparables a los descritos en la literatura. Los CECAE suelen diagnosticarse en estadios más avanzados que los CEPA y tienen un peor pronóstico. Haber recibido radioterapia en cabeza y cuello es un importante factor de riesgo para la aparición del CECAE.
- 2.** Ambos tumores (CECAE y CEPA) presentan el perfil de alteraciones genéticas características de los carcinomas epidermoides con pérdidas en 3p, 8p, 13q, 17p y 18q y ganancias en 7p, 7q, 8q, 11q13 y 20q.
- 3.** Identificamos pérdidas en CDKN2A y PTEN y ganancias en EGFR y TP53 sin diferencias significativas entre los dos tipos de tumor. Aún así los datos sugieren que podría haber más ganancias de TP53 y menos de EGFR en los CECAE.
- 4.** La pérdida de expresión de p16 fue más frecuente en los CECAE que en los CEPA (90% contra 41%), pero no se relacionó con las variables clínico-patológicas ni con el seguimiento. La frecuente positividad fuerte de p16 en los CEPA posiblemente refleja una respuesta al daño en el ADN causado por la radiación UVB.
- 5.** La sobreexpresión de p53 fue alta en ambos tumores pero fue más frecuente en los CEPA que en los CECAE (82% contra 66%), probablemente como consecuencia de la exposición a radiación solar.
- 6.** La sobreexpresión de EGFR fue significativamente mayor en los CEPA que en los CECAE (91% contra 67%). Los pacientes con CECAE que habían recibido radioterapia previa en el área de cabeza y cuello presentaron un 29% de sobreexpresión de EGFR contra el 76% en el resto de los CECAE.
- 7.** Observamos una reducción de la expresión de PTEN en un 80% en ambos tumores. Los casos de CECAE y CEPA que no mostraron pérdida de PTEN, tanto en el gen como en la expresión proteica, tenían un peor pronóstico, un estadio más avanzado y una mayor frecuencia de metástasis ganglionares; lo que puede sugerir que la progresión tumoral por vías no relacionadas con PTEN es más agresiva en estos tumores.

8. Bibliografía

1. Robbins, Cotran, Kumar & Collins. *Patología estructural y funcional*. (McGraw Hill interamericana, 2006).
2. Myers, E. N., Hirsch, B. E. & Chang, C. in *Operative otolaryngology: head and neck surgery* 1434–1458 (1997).
3. Devaney, K. O., Boschman, C. R., Willard, S. C., Ferlito, A. & Rinaldo, A. Tumours of the external ear and temporal bone. *Lancet Oncol.* **6**, 411–420 (2005).
4. Moody, S. A., Hirsch, B. E. & Myers, E. N. Squamous cell carcinoma of the external auditory canal: an evaluation of a staging system. *Am. J. Otol.* **21**, 582–8 (2000).
5. Yin, M. *et al.* Analysis of 95 cases of squamous cell carcinoma of the external and middle ear. *Auris Nasus Larynx* **33**, 251–257 (2006).
6. Kuhel, W. I., Hume, C. R. & Selesnick, S. H. Cancer of the external auditory canal and temporal bone. *Otolaryngol. Clin. North Am.* **29**, 827–52 (1996).
7. Prasad, S. C., D’Orazio, F., Medina, M., Bacciu, A. & Sanna, M. State of the art in temporal bone malignancies. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **22**, 154–65 (2014).
8. Lionello, M. *et al.* Temporal bone carcinoma. Current diagnostic, therapeutic, and prognostic concepts. *J. Surg. Oncol.* **110**, 383–392 (2014).
9. Thevarajah, S., Carew, J. & Selesnick, S. H. Bilateral squamous cell carcinoma of the external auditory canal. *Otolaryngol. Head. Neck Surg.* **132**, 960–2 (2005).
10. Testa, J. R., Fukuda, Y. & Kowalski, L. P. Prognostic factors in carcinoma of the external auditory canal. *Arch. Otolaryngol. Head. Neck Surg.* **123**, 720–4 (1997).
11. Pfreundner, L. *et al.* Carcinoma of the external auditory canal and middle ear. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **44**, 777–88 (1999).

12. Barrs, D. M. Temporal bone carcinoma. *Otolaryngol. Clin. North Am.* **34**, 1197–218, x (2001).
13. Lim, L. H., Goh, Y. H., Chan, Y. M., Chong, V. F. & Low, W. K. Malignancy of the temporal bone and external auditory canal. *Otolaryngol. neck Surg.* **122**, 882–6 (2000).
14. Lobo, D., Llorente, J. L. & Suárez, C. Squamous cell carcinoma of the external auditory canal. *Skull Base* **18**, 167–72 (2008).
15. Moffat, D. a, Wagstaff, S. a & Hardy, D. G. The outcome of radical surgery and postoperative radiotherapy for squamous carcinoma of the temporal bone. *Laryngoscope* **115**, 341–347 (2005).
16. Nyrop, M. & Grøntved, A. Cancer of the external auditory canal. *Arch. Otolaryngol. Head. Neck Surg.* **128**, 834–837 (2002).
17. Gidley, P. W. & DeMonte, F. Temporal bone malignancies. *Neurosurg. Clin. N. Am.* **24**, 97–110 (2013).
18. Arriaga, M., Curtin, H., Takahashi, H., Hirsch, B. E. & Kamerer, D. B. Staging proposal for external auditory meatus carcinoma based on preoperative clinical examination and computed tomography findings. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **99**, 714–21 (1990).
19. Crabtree, J. A., Britton, B. H. & Pierce, M. K. Carcinoma of the external auditory canal. *Laryngoscope* **86**, 405–15 (1976).
20. Stell, P. M. & McCormick, M. S. Carcinoma of the external auditory meatus and middle ear. Prognostic factors and a suggested staging system. *J. Laryngol. Otol.* **99**, 847–50 (1985).
21. Shih, L. & Crabtree, J. A. Carcinoma of the external auditory canal: an update. *Laryngoscope* **100**, 1215–8 (1990).

22. Pensak, M. L., Gleich, L. L., Gluckman, J. L. & Shumrick, K. A. Temporal bone carcinoma: contemporary perspectives in the skull base surgical era. *Laryngoscope* **106**, 1234–7 (1996).
23. Manolidis, S., Pappas, D., Von Doersten, P., Jackson, C. G. & Glasscock, M. E. Temporal bone and lateral skull base malignancy: experience and results with 81 patients. *Am. J. Otol.* **19**, S1–15 (1998).
24. Dean, N. R. *et al.* Outcomes following temporal bone resection. *Laryngoscope* **120**, 1516–22 (2010).
25. Moffat, D. A. & Wagstaff, S. A. Squamous cell carcinoma of the temporal bone. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **11**, 107–11 (2003).
26. Gidley, P. W., Roberts, D. B. & Sturgis, E. M. Squamous cell carcinoma of the temporal bone. *Laryngoscope* **120**, 1144–1151 (2010).
27. Morris, L. G. T. *et al.* Predictors of survival and recurrence after temporal bone resection for cancer. *Head Neck* **34**, 1231–9 (2012).
28. Choi, J. Y. *et al.* Mode of parotid involvement in external auditory canal carcinoma. *J. Laryngol. Otol.* **117**, 951–4 (2003).
29. Pemberton, L. S., Swindell, R. & Sykes, a. J. Primary Radical Radiotherapy for Squamous Cell Carcinoma of the Middle Ear and External Auditory Canal - an Historical Series. *Clin. Oncol.* **18**, 390–394 (2006).
30. Prabhu, R. *et al.* Squamous Cell Carcinoma of the External Auditory Canal. *Am. J. Clin. Oncol.* **32**, 401–404 (2009).
31. Shiga, K., Ogawa, T., Maki, A., Amano, M. & Kobayashi, T. Concomitant chemoradiotherapy as a standard treatment for squamous cell carcinoma of the temporal bone. *Skull Base* **21**, 153–8 (2011).
32. Takenaka, Y. *et al.* Chemoradiation therapy for squamous cell carcinoma of the external auditory canal: A meta-analysis. *Head Neck* **37**, 1073–80 (2015).

33. Knecht, P. P. *et al.* Squamous carcinoma of the external auditory canal: A different approach. *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.* **27**, 183–187 (2002).
34. Paramás, R., Carrasco, R. G., Britez, O. A. & Yurrita, B. S. Tumores malignos del conducto auditivo externo y oído medio. *Acta Otorrinolagol Esp* 470–474 (2004).
35. Ogawa, K. *et al.* Treatment and prognosis of squamous cell carcinoma of the external auditory canal and middle ear: a multi-institutional retrospective review of 87 patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **68**, 1326–34 (2007).
36. Chi, F.-L., Gu, F.-M., Dai, C.-F., Chen, B. & Li, H.-W. Survival outcomes in surgical treatment of 72 cases of squamous cell carcinoma of the temporal bone. *Otol. Neurotol.* **32**, 665–9 (2011).
37. Bacciu, A., Clemente, I. A., Piccirillo, E., Ferrari, S. & Sanna, M. Guidelines for treating temporal bone carcinoma based on long-term outcomes. *Otol. Neurotol.* **34**, 898–907 (2013).
38. Zanoletti, E. *et al.* Temporal bone squamous cell carcinoma: analyzing prognosis with univariate and multivariate models. *Laryngoscope* **124**, 1192–8 (2014).
39. Rinaldo, A., Ferlito, A., Suárez, C. & Kowalski, L. P. Nodal disease in temporal bone squamous carcinoma. *Acta Otolaryngol.* **125**, 5–8 (2005).
40. Moncrieff, M. D. *et al.* Reconstructive options after temporal bone resection for squamous cell carcinoma. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* **60**, 607–14 (2007).
41. Jemal, A., Siegel, R., Xu, J. & Ward, E. Cancer statistics, 2010. *CA. Cancer J. Clin.* **60**, 277–300
42. Madan, V., Lear, J. T. & Szeimies, R.-M. Non-melanoma skin cancer. *Lancet* **375**, 673–85 (2010).
43. Kraft, S. & Granter, S. R. Molecular pathology of skin neoplasms of the head and neck. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **138**, 759–787 (2014).

44. McGuire, J. F., Ge, N. N. & Dyson, S. Nonmelanoma skin cancer of the head and neck I: histopathology and clinical behavior. *Am. J. Otolaryngol.* **30**, 121–33
45. Alam, M. & Ratner, D. Cutaneous squamous-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **344**, 975–83 (2001).
46. Melnikova, V. O. & Ananthaswamy, H. N. Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer. *Mutat. Res.* **571**, 91–106 (2005).
47. Blohmé, I. & Larkö, O. Skin lesions in renal transplant patients after 10-23 years of immunosuppressive therapy. *Acta Derm. Venereol.* **70**, 491–4 (1990).
48. Dyll-Smith, D., Trowell, H., Mark, A. & Dyll-Smith, M. Cutaneous squamous cell carcinomas and papillomaviruses in renal transplant recipients: a clinical and molecular biological study. *J. Dermatol. Sci.* **2**, 139–46 (1991).
49. Martinez, J.-C. *et al.* Defining the clinical course of metastatic skin cancer in organ transplant recipients: a multicenter collaborative study. *Arch. Dermatol.* **139**, 301–6 (2003).
50. Glogau, R. G. The risk of progression to invasive disease. *J. Am. Acad. Dermatol.* **42**, 23–4 (2000).
51. Rowe, D. E., Carroll, R. J. & Day, C. L. Prognostic factors for local recurrence, metastasis, and survival rates in squamous cell carcinoma of the skin, ear, and lip. Implications for treatment modality selection. *J. Am. Acad. Dermatol.* **26**, 976–90 (1992).
52. Vauterin, T. J., Veness, M. J., Morgan, G. J., Poulsen, M. G. & O'Brien, C. J. Patterns of lymph node spread of cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* **28**, 785–91 (2006).
53. Brantsch, K. D. *et al.* Analysis of risk factors determining prognosis of cutaneous squamous-cell carcinoma: a prospective study. *Lancet. Oncol.* **9**, 713–20 (2008).

54. Kolk, A. *et al.* Melanotic and non-melanotic malignancies of the face and external ear - A review of current treatment concepts and future options. *Cancer Treat. Rev.* **40**, 819–37 (2014).
55. Mydlarz, W. K., Weber, R. S. & Kupferman, M. E. Cutaneous Malignancy of the Head and Neck. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* **24**, 593–613 (2015).
56. Kim, M. M. & Califano, J. A. Molecular pathology of head-and-neck cancer. *Int. J. cancer* **112**, 545–53 (2004).
57. Fearon, E. R. & Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759–67 (1990).
58. Hanahan, D. & Weinberg, R. a. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
59. Hanahan, D. Rethinking the war on cancer. *Lancet* **383**, 558–563 (2014).
60. Van der Riet, P. *et al.* Frequent loss of chromosome 9p21-22 early in head and neck cancer progression. *Cancer Res.* **54**, 1156–8 (1994).
61. Lee, D. J. *et al.* Multiple tumor-suppressor genes on chromosome 3p contribute to head and neck squamous cell carcinoma tumorigenesis. *Cancer Biol. Ther.* **10**, 689–93 (2010).
62. Gross, A. M. *et al.* Multi-tiered genomic analysis of head and neck cancer ties TP53 mutation to 3p loss. *Nat. Genet.* **46**, 939–43 (2014).
63. Rubin Grandis, J., Tweardy, D. J. & Melhem, M. F. Asynchronous modulation of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor protein expression in progression of premalignant lesions to head and neck squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **4**, 13–20 (1998).
64. Xia, W. *et al.* Strong correlation between c-erbB-2 overexpression and overall survival of patients with oral squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **3**, 3–9 (1997).

65. Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. & Harris, C. C. p53 mutations in human cancers. *Science* **253**, 49–53 (1991).
66. Balz, V. *et al.* Is the p53 inactivation frequency in squamous cell carcinomas of the head and neck underestimated? Analysis of p53 exons 2-11 and human papillomavirus 16/18 E6 transcripts in 123 unselected tumor specimens. *Cancer Res.* **63**, 1188–91 (2003).
67. Leemans, C. R., Braakhuis, B. J. M. & Brakenhoff, R. H. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 9–22 (2011).
68. Callender, T. *et al.* PRAD-1 (CCND1)/cyclin D1 oncogene amplification in primary head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* **74**, 152–8 (1994).
69. Squarize, C. H. *et al.* PTEN deficiency contributes to the development and progression of head and neck cancer. *Neoplasia* **15**, 461–71 (2013).
70. Levine, A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**, 323–31 (1997).
71. Uribe, P. & Gonzalez, S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and squamous cell carcinoma of the skin: Molecular bases for EGFR-targeted therapy. *Pathol. Res. Pract.* **207**, 337–342 (2011).
72. Brash, D. E. *et al.* A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 10124–8 (1991).
73. Singh, A. A. *et al.* Keratinocyte stem cells and the targets for nonmelanoma skin cancer. *Photochem. Photobiol.* **88**, 1099–110 (2012).
74. Campbell, C., Quinn, A. G., Ro, Y. S., Angus, B. & Rees, J. L. p53 mutations are common and early events that precede tumor invasion in squamous cell neoplasia of the skin. *J. Invest. Dermatol.* **100**, 746–8 (1993).
75. Ziegler, A. *et al.* Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* **372**, 773–6 (1994).

76. Bäckvall, H. *et al.* Genetic tumor archeology: microdissection and genetic heterogeneity in squamous and basal cell carcinoma. *Mutat. Res.* **571**, 65–79 (2005).
77. Slaughter, D. P., Southwick, H. W. & Smejkal, W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer* **6**, 963–8 (1953).
78. Barzilai, A., Lyakhovitsky, A., Trau, H., Fogel, M. & Huszar, M. Expression of p53 in the evolution of squamous cell carcinoma: correlation with the histology of the lesion. *J. Am. Acad. Dermatol.* **57**, 669–76 (2007).
79. Jin, C. *et al.* Karyotypic heterogeneity and clonal evolution in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Genet. Cytogenet.* **132**, 85–96 (2002).
80. Bamford, S. *et al.* The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. *Br. J. Cancer* **91**, 355–8 (2004).
81. Ratushny, V., Gober, M. D., Hick, R., Ridky, T. W. & Seykora, J. T. From keratinocyte to cancer: the pathogenesis and modeling of cutaneous squamous cell carcinoma. *J. Clin. Invest.* **122**, 464–72 (2012).
82. Mortier, L. *et al.* Progression of actinic keratosis to squamous cell carcinoma of the skin correlates with deletion of the 9p21 region encoding the p16INK4a tumor suppressor. *Cancer Lett.* **176**, 205–214 (2002).
83. Pacifico, A. *et al.* Loss of CDKN2A and p14ARF expression occurs frequently in human nonmelanoma skin cancers. *Br. J. Dermatol.* **158**, 291–7 (2008).
84. Rees, J. L. The genetics of sun sensitivity in humans. *Am. J. Hum. Genet.* **75**, 739–51 (2004).
85. Wang, N. J. *et al.* Loss-of-function mutations in Notch receptors in cutaneous and lung squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 17761–6 (2011).

86. Stransky, N. *et al.* The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science* **333**, 1157–1160 (2011).
87. Rayess, H., Wang, M. B. & Srivatsan, E. S. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *Int. J. Cancer* **130**, 1715–1725 (2012).
88. Becker, T. & Haferkamp, S. *Senescence and senescence-related disorders.* (InTech, 2013). doi:10.1016/S1359-6349(08)71309-0
89. Gonzalez, S. & Serrano, M. A New Mechanism of Inactivation of the INK4 / ARF Locus Extra View ND ES SC. *cell Cycle* **5**, 1382–1384 (2006).
90. Li, J., Poi, M. J. & Tsai, M.-D. The Regulatory Mechanisms of Tumor Suppressor p16INK4 and Relevance to cancer. *Biochemistry* **50**, 5566–5582 (2011).
91. Al-Mohanna, M. A., Manogaran, P. S., Al-Mukhalafi, Z., A Al-Hussein, K. & Aboussekhra, A. The tumor suppressor p16(INK4a) gene is a regulator of apoptosis induced by ultraviolet light and cisplatin. *Oncogene* **23**, 201–12 (2004).
92. Puig-Butille, J. A. *et al.* Capturing the biological impact of CDKN2A and MC1R genes as an early predisposing event in melanoma and non melanoma skin cancer. *Oncotarget* **5**, 1439–51 (2014).
93. Kalyankrishna, S. & Grandis, J. R. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J. Clin. Oncol.* **24**, 2666–72 (2006).
94. Kim, S., Grandis, J. R., Rinaldo, A., Takes, R. P. & Ferlito, A. Emerging perspectives in epidermal growth factor receptor targeting in head and neck cancer. *Head Neck* **30**, 667–74 (2008).
95. Janku, F., Stewart, D. J. & Kurzrock, R. Targeted therapy in non-small-cell lung cancer--is it becoming a reality? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **7**, 401–14 (2010).
96. Psyrri, A. *et al.* Quantitative determination of nuclear and cytoplasmic epidermal growth factor receptor expression in oropharyngeal squamous cell cancer by using automated quantitative analysis. *Clin. Cancer Res.* **11**, 5856–62 (2005).

97. Jacobs, M. S., Persons, D. L. & Fraga, G. R. EGFR and MYC gene copy number aberrations are more common in squamous cell carcinoma than keratoacanthoma: a FISH study. *J. Cutan. Pathol.* **40**, 447–54 (2013).
98. Toll, A. *et al.* Epidermal growth factor receptor gene numerical aberrations are frequent events in actinic keratoses and invasive cutaneous squamous cell carcinomas. *Exp. Dermatol.* **19**, 151–153 (2010).
99. Rubin Grandis, J. *et al.* Levels of TGF-alpha and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J. Natl. Cancer Inst.* **90**, 824–32 (1998).
100. Gaffney, D. C., Soyer, H. P. & Simpson, F. The epidermal growth factor receptor in squamous cell carcinoma: An emerging drug target. *Australas. J. Dermatol.* **55**, 24–34 (2014).
101. Di Cristofano, A., Pesce, B., Cordon-Cardo, C. & Pandolfi, P. P. Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat. Genet.* **19**, 348–55 (1998).
102. Pedrero, J. M. G. *et al.* Frequent genetic and biochemical alterations of the PI 3-K/AKT/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer* **114**, 242–248 (2005).
103. Milella, M. *et al.* PTEN: Multiple Functions in Human Malignant Tumors. *Front. Oncol.* **5**, 24 (2015).
104. Papa, A. *et al.* Cancer-associated PTEN mutants act in a dominant-negative manner to suppress PTEN protein function. *Cell* **157**, 595–610 (2014).
105. Planchon, S. M., Waite, K. a & Eng, C. The nuclear affairs of PTEN. *J. Cell Sci.* **121**, 249–253 (2008).
106. Rodrigo, J. P., Chiara Romero, M. D., Esteban Ortega, F., Álvarez Marcos, C. & Cabanillas Farpón, R. Biología molecular del cáncer de cabeza y cuello. *Acta otorrinolaringológica española* **57**, (2006).

107. Lane, D. P. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**, 15–16 (1992).
108. Meek, D. W. Regulation of the p53 response and its relationship to cancer. *Biochem. J.* **469**, 325–46 (2015).
109. Duffy, M. J. *et al.* p53 as a target for the treatment of cancer. *Cancer Treat. Rev.* **40**, 1153–60 (2014).
110. Wick, M. R. & Compton, C. Carcinoma of the skin. (2004).
111. Schouten, J. P. *et al.* Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* **30**, e57 (2002).
112. Sugimoto, H. *et al.* Roles of epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma of the temporal bone. *Otol. Neurotol.* **32**, 483–7 (2011).
113. Marioni, G. *et al.* Evaluation of the prognostic role of pSTAT3 expression in temporal bone squamous cell carcinoma. *Otol. Neurotol.* **34**, 1476–82 (2013).
114. Marioni, G. *et al.* Neoangiogenesis in temporal bone carcinoma: the prognostic role of CD105. *Otol. Neurotol.* **33**, 843–8 (2012).
115. Marioni, G. *et al.* Expression of the tumour-suppressor maspin in temporal bone carcinoma. *Histopathology* **63**, 242–9 (2013).
116. Mazzoni, A., Danesi, G. & Zanoletti, E. Primary squamous cell carcinoma of the external auditory canal: surgical treatment and long-term outcomes. *acta Otorhinolaryngol. Ital.* 129–137 (2014).
117. Gandhi, A. K. *et al.* Treatment of squamous cell carcinoma of external auditory canal: A tertiary cancer centre experience. *Auris. Nasus. Larynx* (2015). doi:10.1016/j.anl.2015.06.005
118. Lo, W.-C. *et al.* Malignancies of the ear in irradiated patients of nasopharyngeal carcinoma. *Laryngoscope* **118**, 2151–2155 (2008).

119. Lambert, E. M., Garden, A. S., DeMonte, F., Roberts, D. B. & Gidley, P. W. Radiation-associated malignancies of the ear canal and temporal bone. *Laryngoscope* **125**, 1198–1204 (2015).
120. Nakagawa, T. *et al.* Squamous cell carcinoma of the external auditory canal and middle ear: an operation combined with preoperative chemoradiotherapy and a free surgical margin. *Otol. Neurotol.* **27**, 242–248; discussion 249 (2006).
121. Hosokawa, S. *et al.* Surgical approach for treatment of carcinoma of the anterior wall of the external auditory canal. *Otol. Neurotol.* **33**, 450–4 (2012).
122. Cristalli, G. *et al.* Treatment and outcome of advanced external auditory canal and middle ear squamous cell carcinoma. *J. Craniofac. Surg.* **20**, 816–21 (2009).
123. Wang, J., Xie, B. & Dai, C. Clinical Characteristics and Management of External Auditory Canal Squamous Cell Carcinoma in Post-Irradiated Nasopharyngeal Carcinoma Patients. *Otol. Neurotol.* **36**, 1081–8 (2015).
124. Gustaitytė-Larsen, D. & Illum, P. Non-melanoma skin cancer of the auricle is treated according to national guidelines. *Dan. Med. J.* **60**, A4587 (2013).
125. Wermker, K. *et al.* Prediction score for lymph node metastasis from cutaneous squamous cell carcinoma of the external ear. *Eur. J. Surg. Oncol.* **41**, 128–35 (2015).
126. Porceddu, S. V, Veness, M. J. & Guminski, A. Nonmelanoma Cutaneous Head and Neck Cancer and Merkel Cell Carcinoma: Current Concepts, Advances, and Controversies. *J. Clin. Oncol.* (2015). doi:10.1200/JCO.2014.60.7333
127. Stratigos, A. *et al.* Diagnosis and treatment of invasive squamous cell carcinoma of the skin: European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur. J. Cancer* 1989–2007 (2015). doi:10.1016/j.ejca.2015.06.110
128. Yan, W., Wistuba, I. I., Emmert-Buck, M. R. & Erickson, H. S. Squamous Cell Carcinoma - Similarities and Differences among Anatomical Sites. *Am. J. Cancer Res.* **1**, 275–300 (2011).

129. Clayman, G. L. *et al.* Mortality risk from squamous cell skin cancer. *J. Clin. Oncol.* **23**, 759–65 (2005).
130. Alonso, M., Álvarez, C., Hermsen, M. & Sampedro, A. Deletions of N33, STK11 and TP53 are Involved in the Development of Lymph Node Metastasis in Larynx and Pharynx Carcinomas. *DNA Repair (Amst)*. **29**, 327–334 (2007).
131. Gutiérrez, V. F. *et al.* Genetic profile of second primary tumors and recurrences in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck* **34**, 830–9 (2012).
132. López, F. *et al.* Genomic profiling of sinonasal squamous cell carcinoma. *Head Neck* **33**, 145–53 (2011).
133. Riaz, N., Morris, L. G., Lee, W. & Chan, T. A. Unraveling the molecular genetics of head and neck cancer through genome-wide approaches. *Genes Dis.* **1**, 75–86 (2014).
134. Hermsen, M. *et al.* New chromosomal regions with high-level amplifications in squamous cell carcinomas of the larynx and pharynx, identified by comparative genomic hybridization. *J. Pathol.* **194**, 177–82 (2001).
135. Sasiadek, M. M. *et al.* Impairment of MLH1 and CDKN2A in oncogenesis of laryngeal cancer. *Br. J. Cancer* **90**, 1594–9 (2004).
136. López, F. *et al.* Gene amplification and protein overexpression of EGFR and ERBB2 in sinonasal squamous cell carcinoma. *Cancer* **118**, 1818–1826 (2012).
137. Szabó, B. *et al.* Clinical significance of genetic alterations and expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* **47**, 487–96 (2011).
138. Ch'ng, S. *et al.* Epidermal growth factor receptor: a novel biomarker for aggressive head and neck cutaneous squamous cell carcinoma. *Hum. Pathol.* **39**, 344–9 (2008).
139. Giudice, F. S. & Squarize, C. H. The determinants of head and neck cancer: Unmasking the PI3K pathway mutations. *J. Carcinog. Mutagen. Suppl* **5**, (2013).

140. Smeets, S. J. *et al.* A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int. J. Cancer* **121**, 2465–72 (2007).
141. Rodrigo, J. P. *et al.* Prevalence of human papillomavirus in laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinomas in northern Spain. *Cancer Epidemiol.* **39**, 37–41 (2015).
142. Rodrigo, J. P. *et al.* Time trends in the prevalence of HPV in oropharyngeal squamous cell carcinomas in northern Spain (1990-2009). *Int. J. Cancer* **134**, 487–92 (2014).
143. Conscience, I. *et al.* P16 is overexpressed in cutaneous carcinomas located on sun-exposed areas. *Eur. J. dermatology* **16**, 518–22 (2006).
144. Beadle, B. M., William, W. N., McLemore, M. S., Sturgis, E. M. & Williams, M. D. p16 expression in cutaneous squamous carcinomas with neck metastases: a potential pitfall in identifying unknown primaries of the head and neck. *Head Neck* **35**, 1527–33 (2013).
145. Pierini, S. *et al.* Promoter hypermethylation of CDKN2A, MGMT, MLH1, and DAPK genes in laryngeal squamous cell carcinoma and their associations with clinical profiles of the patients. *Head Neck* **36**, 1103–8 (2014).
146. Sasaki, M., Kajiya, H., Ozeki, S., Okabe, K. & Ikebe, T. Reactive oxygen species promotes cellular senescence in normal human epidermal keratinocytes through epigenetic regulation of p16(INK4a.). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **452**, 622–8 (2014).
147. Mahipal, A., Kothari, N. & Gupta, S. Epidermal growth factor receptor inhibitors: coming of age. *Cancer Control* **21**, 74–9 (2014).
148. Hunt, J. L. *et al.* Molecular diagnostic alterations in squamous cell carcinoma of the head and neck and potential diagnostic applications. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngology* 1–13 (2013). doi:10.1007/s00405-013-2400-9

149. Alter, M., Satzger, I., Mattern, A., Kapp, A. & Gutzmer, R. Treatment of Advanced Cutaneous Squamous Cell Carcinomas with Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors. *Dermatology* **227**, 289–294 (2013).
150. Khan, M. H., Alam, M. & Yoo, S. Epidermal growth factor receptor inhibitors in the treatment of nonmelanoma skin cancers. *Dermatol. Surg.* **37**, 1199–209 (2011).
151. Troiano, A. *et al.* Y-box Binding Protein-1 Is Part of a Complex Molecular Network Linking Δ Np63 α to the PI3K/akt Pathway in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *J. Cell. Physiol.* **230**, 2067–2074 (2015).
152. Martin, D. *et al.* The head and neck cancer cell oncogenome: a platform for the development of precision molecular therapies. *Oncotarget* **5**, 8906–23 (2014).
153. Da Costa, A. a B. a *et al.* Low PTEN expression is associated with worse overall survival in head and neck squamous cell carcinoma patients treated with chemotherapy and cetuximab. *Int. J. Clin. Oncol.* 282–289 (2014). doi:10.1007/s10147-014-0707-1
154. Snietura, M. *et al.* PTEN as a prognostic and predictive marker in postoperative radiotherapy for squamous cell cancer of the head and neck. *PLoS One* **7**, e33396 (2012).
155. Baozhong, Z., Mei, M. & Yu-Ying, H. Suppression of PTEN transcription by UVA. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **27**, 184–191 (2013).
156. Strozyk, E. & Kulms, D. The role of AKT/mTOR pathway in stress response to UV-irradiation: Implication in skin carcinogenesis by regulation of apoptosis, autophagy and senescence. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 15260–15285 (2013).
157. Ming, M. *et al.* PTEN positively regulates UVB-induced DNA damage repair. *Cancer Res.* **71**, 5287–5295 (2011).
158. Fischer, C. A. *et al.* p16 expression in oropharyngeal cancer: its impact on staging and prognosis compared with the conventional clinical staging parameters. *Ann. Oncol.* **21**, 1961–1966 (2010).

159. Lozano-Leon, A. *et al.* Ductal adenocarcinoma of the pancreas: Expression of growth factor receptors, oncogenes and suppressor genes, and their relationship to pathological features, staging and survival. *Oncol. Lett.* **2**, 161–166 (2011).
160. Ory, C. *et al.* Gene expression signature discriminates sporadic from post-radiotherapy-induced thyroid tumors. *Endocr. Relat. Cancer* **18**, 193–206 (2011).
161. Wollina, U. Update of cetuximab for non-melanoma skin cancer. *Expert Opin. Biol. Ther.* **14**, 271–6 (2014).
162. Freudlsperger, C. *et al.* EGFR-PI3K-AKT-mTOR signaling in head and neck squamous cell carcinomas: attractive targets for molecular-oriented therapy. *Expert Opin. Ther. Targets* **15**, 63–74 (2011).
163. Bakkar, R. M. *et al.* Intact PTEN Expression by Immunohistochemistry is Associated With Decreased Survival in Advanced Stage Ovarian/Primary Peritoneal High-grade Serous Carcinoma. *Int. J. Gynecol. Pathol.* (2015). doi:10.1097/PGP.0000000000000205
164. Dębska-Szmich, S. *et al.* Prognostic value of HER3, PTEN and p-HER2 expression in patients with HER2positive breast cancer. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)* **69**, 586–97 (2015).
165. Berns, K. *et al.* A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature* **428**, 431–7 (2004).
166. Freije, A. *et al.* Inactivation of p53 in Human Keratinocytes Leads to Squamous Differentiation and Shedding via Replication Stress and Mitotic Slippage. *Cell Rep.* **9**, 1349–1360 (2014).
167. Petitjean, A., Achatz, M. I. W., Borresen-Dale, a L., Hainaut, P. & Olivier, M. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene* **26**, 2157–2165 (2007).
168. Berasain, C. *et al.* The Epidermal Growth Factor Receptor: A Link Between Inflammation and Liver Cancer. *Exp. Biol. Med.* **234**, 713–725 (2009).

169. Saeidnia, S. & Abdollahi, M. Antioxidants: friends or foe in prevention or treatment of cancer: the debate of the century. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **271**, 49–63 (2013).