

Universidad de Oviedo

PROGRAMA DE DOCTORADO: INVESTIGACIÓN EN CIRUGÍA

Título de la tesis

EXPRESIÓN DE LOS CANALES DE POTASIO HERG1 Y KV 3.4 EN LESIONES POTENCIALMENTE CANCERIZABLES Y EN CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CAVIDAD ORAL. UTILIDAD COMO MARCADOR DE TRANSFORMACION MALIGNA Y PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD

Nombre del Autor

ALVARO FERNÁNDEZ DEL VALLE

2016



Universidad de Oviedo

PROGRAMA DE DOCTORADO: INVESTIGACIÓN EN CIRUGÍA

Título de la tesis

EXPRESIÓN DE LOS CANALES DE POTASIO HERG1 Y KV 3.4 EN LESIONES POTENCIALMENTE CANCERIZABLES Y EN CARCINOMA EPIDERMOIDE DE CAVIDAD ORAL. UTILIDAD COMO MARCADOR DE TRANSFORMACION MALIGNA Y PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD

Nombre del Autor

ALVARO FERNÁNDEZ DEL VALLE



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: EXPRESIÓN DE LOS CANALES DE POTASIO HERG1 Y KV 3.4 EN LESIONES POTENCIALMENTE CANCERIZABLES Y EN CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE LA CAVIDAD ORAL. UTILIDAD COMO MARCADOR DE TRANSFORMACIÓN MALIGNA Y PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD.	Inglés: EXPRESSION OF HERG1 AND KV 3.4 POTASSIUM CHANNELS IN POTENTIALLY MALIGNANT DISORDERS AND IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMAS. UTILITY AS MARKER OF MALIGNANT TRANSFORMATION AND DISEASE PROGRESSION.
2.- Autor	
Nombre: ALVARO FERNÁNDEZ DEL VALLE FERNÁNDEZ	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: INVESTIGACIÓN EN CIRUGÍA	
Órgano responsable: CIRUGÍA Y ESPECIALIDADES MÉDICO-QUIRÚRGICAS	

RESUMEN (en español)

INTRODUCCIÓN:

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es el tumor maligno más frecuente en la cavidad oral, representando entre el 2 y el 4% de todos los cánceres diagnosticados.

Los canales de potasio son proteínas transmembrana que han sido implicadas en el crecimiento, la progresión, la migración celular y las metástasis en numerosas neoplasias malignas.

Hasta la fecha, no existen marcadores suficientemente avalados para la predicción de progresión a malignidad en el caso de trastornos orales potencialmente cancerizables (TOPC) ni para establecer el pronóstico en el COCE.

MATERIAL Y MÉTODO:

Se ha seleccionado una cohorte de 62 pacientes diagnosticados y tratados por leucoplasias orales con diagnóstico histológico de hiperplasia o displasia y una cohorte de 100 pacientes diagnosticados y tratados por COCE en el Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), obteniendo de manera retrospectiva datos demográficos, clínicos y patológicos en los casos de COCE y de manera prospectiva en los casos de TOPC. En el caso de TOPC se clasificó a los pacientes en función de si presentaron o no, transformación maligna de la lesión inicial.

Se obtuvieron muestras representativas de tejido parafinado del archivo de Anatomía Patológica del HUCA y se procesaron para su estudio mediante inmunohistoquímica de la expresión de HERG 1 y de Kv3.4 tanto de las lesiones potencialmente cancerizables como de los carcinomas de células escamosas de la cavidad oral.

La expresión de ARNm (ácido ribonucleico mensajero) de HERG1 fue analizada mediante RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa) en tiempo real en una serie de 22 especímenes tisulares frescos de carcinomas escamosos de la cabeza y el cuello (CECC).

RESULTADOS:

En HERG1, se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre la expresión de HERG1 y el consumo de tabaco, estadio de la enfermedad, diferenciación tumoral, recurrencia tumoral y reducción de la supervivencia. No fue hallada una asociación entre la expresión de HERG1 y el riesgo de progresión a COCE desde los TOPC. Además, una alta proporción de tumores (80%) mostraron niveles aumentados de ARNm de HERG1 comparados con la mucosa normal de pacientes no oncológicos.

En Kv3.4, treinta y nueve de los 100 tumores mostraron expresión positiva para Kv3.4, y la inmunopositividad se asoció significativamente con el grado de diferenciación ($p=0,05$) pero no mostró impacto en el pronóstico. La expresión anormal de kv3.4 se detectó en el 16% (7 de 43) de las lesiones hiperplásicas y en una proporción significativamente mayor en las displasias (50%; 8 de 16 casos; $p=0,008$) mientras que su expresión fue despreciable en el tejido epitelial adyacente normal. Además, los pacientes con lesiones Kv3.4 positivas mostraron un riesgo de progresión mayor que aquellas kv3.4 negativas. Sin embargo, fue la histología y no la expresión de Kv3.4 el factor que resultó significativo como predictor de progresión a malignidad en esta cohorte prospectiva.

CONCLUSIONES:

En HERG1, la expresión anómala de HERG1 se incrementa a medida que progresa la tumorigénesis desde la hiperplasia al COCE. Los niveles aumentados de ARNm de HERG1 fueron detectados con una frecuencia alta en los casos de COCE y de otros CECC. La expresión de HERG1 aparece como una característica clínicamente relevante durante la progresión tumoral y como un potencial marcador de mal pronóstico en COCE.

En Kv 3.4, el estudio proporciona evidencia original que demuestra la aparición precoz y la alta prevalencia de la expresión anormal de Kv3.4. Nuestros resultados apoyan un papel importante del canal de potasio Kv3.4 en la tumorigénesis del COCE más que en la progresión tumoral o el pronóstico de la enfermedad.



RESUMEN (en Inglés)

INTRODUCTION:

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common type of cancer in the oral cavity, representing between 2 and 4% of all the malignant tumors.

Potassium channels are transmembrane proteins which have been implied in the growth, progression, cellular migration and metastases in a vast number of malignant tumors.

To date, there are no accurate biomarkers capable of predicting the risk of malignant transformation of oral potentially malignant disorders (OPMD) and for establishing the prognosis in OSCC.

MATERIALS AND METHODS:

HERG1 and Kv3.4 immunoexpression was analyzed in a cohort of 62 patients diagnosed for oral leukoplakia that showed epithelial hyperplasia or dysplasia, and in a cohort of 100 patients diagnosed and treated for COCE in the Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA). Demographic, clinical and pathological data were retrospectively collected for the COCE and prospectively for the OPMD.

Representative formalin-fixed paraffin-embedded sections from archival tissue blocks at HUCA were

immunohistochemically evaluated to investigate the role of HERG 1 and Kv3.4 in both OPMD and OSCC.

HERG1 mRNA (messenger ribonucleic acid) levels were assessed by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) in 22 patients with primary head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC).

RESULTS:

In HERG1, statistically significant associations were found between HERG1 expression and tobacco consumption,

disease stage, tumor differentiation, tumor recurrence, and reduced survival. There was no association between

HERG1 expression and the risk of progression from oral leukoplakia to OSCC. In addition, a high proportion of tumors (80%) showed increased HERG1 mRNA levels compared to normal mucosa from nononcologic patients.

In Kv3.4, thirty-nine of 100 tumours exhibited Kv3.4-positive expression, and staining was associated with the degree of differentiation ($P = 0.05$) but showed no impact on patient prognosis. Abnormal Kv3.4 expression was detected in 16% (7 of 43) hyperplastic lesions and at a significantly higher proportion in oral dysplasias (50%, 8 of 16 cases; $P = 0.008$), whereas expression was negligible in normal adjacent epithelia. Furthermore, patients carrying Kv3.4-positive lesions exhibited a higher progression risk than those with Kv3.4-negative lesions; however, histology but not Kv3.4 expression predicted oral cancer development significantly in this prospective cohort.

CONCLUSIONS:

In HERG1, aberrant HERG1 expression increases as oral tumorigenesis progresses from oral hyperplasia to OSCC.

Increased HERG1 mRNA levels were also frequently detected in OSCC and other HNSCC subsites. HERG1 expression

emerges as a clinically relevant feature during tumor progression and a potential poor prognostic biomarker for OSCC.

In Kv3.4, this study provides original evidence to demonstrate the early occurrence and high prevalence of abnormal Kv3.4 expression in oral leukoplakias. Our results support a role for Kv3.4 potassium channel in OSCC tumorigenesis rather than tumour progression and disease outcome.

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN EN CIRUGÍA.

AGRADECIMIENTOS :

En primer lugar, me gustaría expresar mi sincero agradecimiento a mis directores de tesis:

Al Prof. Juan Carlos de Vicente Rodríguez, por su incansable dedicación y ayuda, por ser mi maestro en éste y en otros muchos campos de la medicina y de la cirugía maxilofacial y en especial por enseñarme que el esfuerzo con pasión por lo que uno hace es lo que marca realmente la diferencia.

Al Prof. Juan Pablo Rodrigo Tapia por su inestimable ayuda sin la que no sería posible este trabajo, y por demostrarme que es posible colaborar y sobre todo aprender de grandes profesionales aún perteneciendo a especialidades medicas distintas.

También quisiera agradecer su colaboración:

A la Dra. Juana María García del Pedrero, por su fundamental labor en la realización de este proyecto, por su ayuda y su capacidad de aportar soluciones.

A Eva Allonca y al resto de personal de IUOPA por su contribución en el procesamiento de las muestras.

A mis compañeros del servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial del Hospital Universitario Central de Asturias, en especial a la Dra. Tania Rodríguez Santamarta, cuya aportación ha sido crucial como siempre lo es, al Dr. Lucas Villalaín por su apoyo incondicional y al Dr. Manuel Gonzalez por su interés y animo constantes.

Por último, quiero agradecerse especialmente a mis padres, a mi hermana, a mi familia y amigos por su cariño, por hacer realidad mis sueños y por estar siempre ahí.

LISTADO DE ABREVIATURAS

CCE	Carcinoma de células escamosas
COCE	Carcinoma oral de células escamosas
CECC	Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello
Kv	Canales de potasio activados por voltaje
KCa	Canales de potasio activados por calcio
Kir	Canales de potasio rectificadores hacia el interior o anómalos.
K2P	Canales de potasio de doble dominio de poro
G1	Primera fase del ciclo celular
HERG1	Canal de potasio humano codificado por el gen 1 relacionado con el <i>ether-à-go-go</i>
mV	Milivoltio
OMS	Organización mundial de la salud
GLOBOCAN	Proyecto de la OMS para la estimación de incidencia, mortalidad y prevalencia del cáncer a nivel mundial
HPV	Virus del papiloma humano
ADN	Ácido desoxirribonucleico
N0	No existe evidencia de metástasis en el cuello
N+	Existe evidencia de metástasis en el cuello
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
TOPC	Trastornos orales potencialmente cancerizables

HR	<i>Hazard ratio</i>
IHQ	Inmunohistoquímica
ATP	Adenosín trifosfato
TM	Dominio transmembrana
P	Dominio de poro
Slo	Canales de potasio de alta conductancia activados por calcio
BKCa	Canal de potasio de alta conductancia
H ⁺	Ion hidrógeno (catión del protio)
Ca ²⁺	Ion calcio
Cl ⁻	Ion cloro
Na ⁺	Ion sodio
SKCa	Canales de potasio activados por calcio de baja conductancia
IKCa	Canales de potasio activados por calcio de conductancia intermedia
Asp	Ácido aspártico
Asn	Asparagina
ARN	Ácido ribonucleico
M	Fase del ciclo en la que se produce la mitosis y citocinesis
S	Segunda fase del ciclo celular (síntesis de ADN)

RE	Retículo endoplásmico
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular
Gy	Gray
HUCA	Hospital Universitario Central de Asturias
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
DS	Desviación estándar

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1: *Publicaciones acerca de las localizaciones más frecuentes del COCE/CECC*

Tabla 2: *Trastornos orales potencialmente cancerizables*

Tabla 3: *TOPC según su potencial de melnización aproximado.*

Tabla 4: *Criterios usados para el diagnóstico de displasia. Warnakulasuriya 2008.*

Tabla 5: *Expresión de los canales de potasio implicados en el cáncer. Los cuadros rojos representan los tumores donde se ha observado sobreexpresión de los canales de potasio favoreciendo la proliferación, la migración celular o las metástasis, como HERG1 en carcinomas de cabeza y cuello (C y C). Los cuadros verdes representan los canales cuya expresión esta relacionada de manera inversa con la malignidad y la agresividad clínica como el KCNA5 en el glioma o en el linfoma o el KCNQ1 en el cáncer colorrectal. El cuadro azul representa la presencia de mutaciones somáticas recurrentes en el gen KCNJ5 en los adenomas suprarrenales.*

Tabla 6: *Variables demográficas y de hábitos tóxicos recogidas en los pacientes del estudio.*

Tabla 7: *Variables recogidas en los pacientes con TOPC.*

Tabla 8: *Variables recogidas en los pacientes con COCE.*

Tabla 9: *Clasificación TNM del American Joint Comitee on Cancer*

Tabla 10: *Estadaje TNM del American Joint Comitee on Cancer*

Tabla 11: *Evolución de los TOPC en relación con el diagnostico histopatológico y la expresión de HERG1.*

Tabla 12: *Evolución de los TOPC en relación con el diagnostico histopatológico y la expresión de Kv3.4.*

Tabla 13: *Asociaciones entre la expresión de HERG1 y los hallazgos clínico-patológicos.*

Tabla 14: *Análisis multivariante de Cox.*

Tabla 15: Asociaciones entre la expresión de Kv3.4 y los hallazgos clínico-patológicos.

LISTADO DE FIGURAS

- Figura 1:** Modelo genético de carcinogénesis en carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello.
- Figura 2:** Representación esquemática de los canales con dos segmentos transmembrana y un dominio formador de poro (2TM - 1P)
- Figura 3:** Representación esquemática de los canales con cuatro segmentos transmembrana y dos dominios formadores de poro (4TM - 2P)
- Figura 4:** Representación esquemática de los canales con seis segmentos transmembrana un dominio formador de poro (6TM - 1P)
- Figura 5:** Familia de canales de potasio Slo
- Figura 6:** Familia de canales de potasio de baja conductancia sensibles al calcio (SK)
- Figura 7:** Familia de canales de potasio de rectificación hacia dentro (Kir)
- Figura 8:** Familia de canales de potasio con dos dominios formadores de poro (K2P)
- Figura 9:** Representación de la subunidad alfa de un canal de potasio Kv
- Figura 10:** Formación de tetrámeros por las subunidades alfa.
- Figura 11:** Familia de canales de potasio sensibles al voltaje (Kv)
- Figura 12:** Dendrograma filogenético representando los canales de potasio relacionados con el cáncer. Existen canales de cada una de las familias de canales de potasio implicados en la carcinogénesis. (Adaptado de Huang y cols.¹³)
- Figura 13:** La oscilación en el potencial de membrana ha sido observado en numerosos tipos celulares proliferantes. Una hiperpolarización transitoria en la transición G1-S está acompañada de una actividad aumentada de los canales de potasio. La despolarización puede inducir la actividad mitótica en varios tipos celulares diferenciados. También se ha observado una despolarización transitoria en la transición G2-M, sin embargo, en el momento actual no está claro el papel de los canales de potasio en esta despolarización ni su relevancia fisiológica. (Adaptado de Huang y cols.¹³)
- Figura 14:** Los canales de potasio pueden regular la proliferación celular mediante el control del volumen de la célula durante el ciclo celular. Por ejemplo, el canal sensible al voltaje EAG2 tiene una localización

específica en la membrana dependiente de la fase del ciclo celular. EAG2 se localiza a nivel intracelular durante la interfase pero aumenta su expresión a nivel de la membrana durante la fase G2 tardía y la mitosis. Este aumento de la expresión de EAG2 a nivel de la membrana promueve un flujo eferente de potasio para la condensación premitótica que es esencial para la entrada en mitosis, así como regula la morfología celular durante la mitosis para una progresión exitosa del ciclo celular. (Adaptado de Huang y cols.¹³)

Figura 15: El flujo hacia el compartimento extracelular de potasio a través de los canales específicos puede llevar a una hiperpolarización de membrana, que incrementa el flujo de calcio al interior celular a través de canales permeables al calcio localizados en la membrana. Esta entrada de calcio puede disparar la liberación de calcio desde depósitos intracelulares. El aumento de la concentración de calcio intracelular puede provocar la señalización dependiente de calcio y promover la proliferación celular. (Adaptado de Huang y cols.¹³)

Figura 16: Los canales de potasio pueden regular la proliferación celular por vías no canónicas independientes de su permeabilidad a los iones de potasio (representado por el canal con un asterisco). El canal de potasio puede interactuar con proteínas de membrana (X) o intracelulares (Y) para iniciar la cascada de señalización. Por otra parte, canales de potasio que han perdido parte de sus dominios podrían entrar en el núcleo para modular la función celular⁹⁶. La manera en la que los canales de potasio llevan a cabo sus funciones no canónicas para regular la proliferación celular es desconocida. (Adaptado de Huang y cols.¹³)

Figura 17: Los cambios locales en el volumen celular y, con ellos, la migración de la célula son llevados a cabo mediante flujos polarizados de iones y agua. La migración celular está caracterizada por procesos moleculares y celulares polarizados que ocasionan una protusión en el borde delantero (por aumento del volumen local) y una retracción en el borde trasero (por disminución del volumen local). La entrada de iones y agua en el borde delantero y la salida de los mismos en el borde posterior son los responsables de estos cambios hidrodinámicos, debido a la localización polarizada de diversos transportadores y canales iónicos durante la migración celular. En el borde posterior, la entrada de calcio por canales específicos puede activar los canales de potasio sensibles al calcio y promover la salida de potasio al medio extracelular. La apertura de los canales de cloruro mantiene la electroneutralidad y fomenta la salida de iones, que es seguido de la salida de agua por las acuaporinas. En el borde delantero, un surtido de canales con flujo hacia el medio intracelular, como canales de sodio activados por voltaje (Nav), canales de sodio epiteliales (ENaC), transportadores como intercambiadores de sodio y protones (NHE1), o cotransportadores de sodio, potasio y cloruro (NKCC1) junto con las acuaporinas, regulan el influjo de agua e iones. Este aumento de iones y agua en el medio intracelular conlleva un aumento de volumen

y, con él, la protusión del lamelipodio en el borde delantero. La salida de protones y la acidificación subsiguiente del medio extracelular mediante el NHE1 puede facilitar la degradación de proteínas de la matriz extracelular y la promover la invasión celular. (Adaptado de Huang y cols.¹³)

Figura 18: *Clasificación de los TOPC en el análisis de HERG1 y Kv3.4*

Figura 19: *Progresión a COCE de pacientes diagnosticados de TOPC según el diagnóstico histológico inicial.*

Figura 20: *Localización de los TOPC*

Figura 21: *Consumo de tabaco en los pacientes con TOPC.*

Figura 22: *Consumo de alcohol en los pacientes con TOPC.*

Figura 23: *Trastorno oral potencialmente cancerizable con inmunotinción negativa (magnificación original x200)*

Figura 24: *TOPC con tinción positiva para HERG1 (magnificación original x200)*

Figura 25: *Trastorno oral potencialmente cancerizable con inmunotinción negativa para Kv3.4*

Figura 26: *TOPC con expresión positiva de Kv3.4.*

Figura 27: *Carcinoma oral de células escamosas con inmunotinción negativa para HERG1 (magnificación original x200)*

Figura 28: *CECO con tinción fuertemente positiva para HERG1 (magnificación original x400)*

Figura 29: *Curva de supervivencia de Kaplan-Meier en pacientes con COCE categorizados por la expresión de HERG1 (log-rank $p=0,03$)*

Figura 30: *Análisis de los niveles de ARNm mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en carcinomas primarios de cabeza y cuello en diferentes localizaciones. Los datos están expresados en cambio en número de veces de los niveles de HERG1A en la muestra tumoral normalizado por los niveles de ARNm de L19 y en relación a la mucosa normal.*

Figura 31: *Inmunotinción negativa para Kv3.4 en COCE.*

Figura 32: *Inmunotinción positiva para Kv3.4 en COCE.*

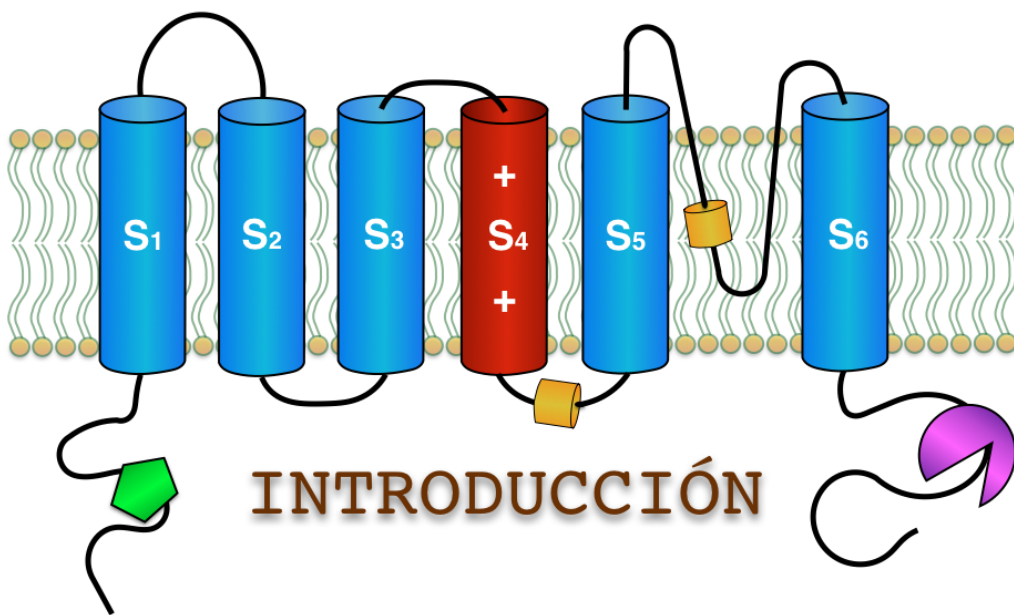
Figura 33: *La inmunotinción intensa en las células musculares lisas vasculares sirvió como control interno positivo.*

INDICE

AGRADECIMIENTOS	14
LISTADO DE ABREVIATURAS	15
LISTADO DE TABLAS	18
LISTADO DE FIGURAS	21
ÍNDICE	25
INTRODUCCIÓN	30
MARCO TEÓRICO	35
1. Cáncer Oral	35
• Incidencia	35
• Etiología	37
• Localización	39
• Histología	41
• Alteraciones genéticas	44
• Tratamiento	48
• Pronóstico	50
2. Trastornos orales potencialmente cancerizables	52
• Definición	52
• Clasificación	55
3. Canales de potasio	57

• Familia de los canales de potasio Slo	61
• Familia de los canales de potasio de baja conductancia sensibles al calcio (SKCa)	63
• Familia de los canales de potasio KIR	64
• Familia de los canales de potasio K2P	65
• Familia de los canales de potasio dependientes del voltaje Kv	67
4. Canales de potasio y cáncer	72
• Los canales de potasio en el crecimiento y la proliferación tumoral	76
• Los canales de potasio en la migración celular y las metástasis	81
• Los canales de potasio como dianas terapéuticas	83
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	87
PACIENTES Y MÉTODO	93
1. Selección de pacientes	93
• Trastornos orales potencialmente cancerizables	93
• Carcinoma oral de células escamosas	95
2. Variables analizadas	97
• Trastornos orales potencialmente cancerizables	98
• Carcinoma oral de células escamosas	99
3. Muestras histológicas, análisis inmunohistoquímico y de ARNm	102
• Técnica de inmunohistoquímica	103
• RT-PCR en tiempo real	104

4. Cuantificación de marcadores	105
5. Análisis estadístico	106
RESULTADOS	
1. Trastornos orales potencialmente cancerizables	110
A. Descripción de la muestra	110
B. HERG1	114
C. Kv.3.4	117
2. Carcinomas orales de células escamosas	121
A. HERG1	121
B. Kv3.4	128
DISCUSIÓN	136
A. HERG1	137
B. Kv3.4	141
CONCLUSIONES	149
ANEXO	153
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	171



INTRODUCCION

El carcinoma de células escamosas (CCE) es el tumor maligno más frecuente en la región de la cabeza y el cuello, representando más del 90% de las neoplasias malignas cavidad oral¹. La incidencia de este tipo de cáncer a nivel mundial se estima en unos 300.000 nuevos casos al año, representando aproximadamente un entre un 2 y un 4% del total de cánceres diagnosticados².

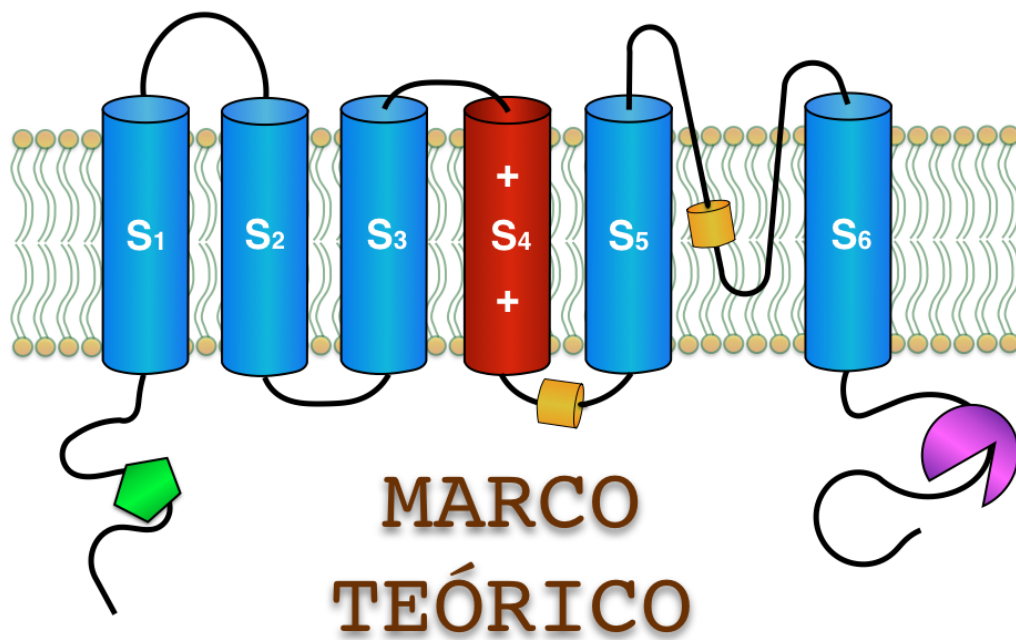
Los factores de riesgo relacionados con el COCE son fundamentalmente el consumo de tabaco y alcohol. El consumo de tabaco puede aumentar el riesgo de padecerlo hasta seis veces³ y en el caso del alcohol lo incrementa hasta dos veces⁴. La sinergia entre tabaco y alcohol se asocia con un riesgo hasta 13 veces mayor con respecto a los no consumidores de estas sustancias⁵. Otros factores de riesgo identificados con el desarrollo de COCE son la pobre higiene oral, la dieta deficitaria en antioxidantes⁶, y agentes infecciosos como la *Candida albicans*⁷, el virus del herpes simple⁸ y el virus del papiloma humano⁹.

En los últimos 30 años, la supervivencia de los pacientes con CCE ha mejorado tan sólo de manera marginal, a pesar de los avances en su diagnóstico y tratamiento^{10,11}. Esta tendencia pone de manifiesto la necesidad de nuevos marcadores además de los clásicos, clínicos e histopatológicos, que permitan distinguir diferencias en el comportamiento tumoral¹². Por otra parte, estos nuevos marcadores podrían proporcionar dianas moleculares para el desarrollo de nuevas terapias alternativas en el tratamiento del cáncer.

Los canales iónicos son proteínas transmembrana que regulan el flujo de iones a través de membranas biológicas, mostrando un papel crítico en multitud de funciones fisiológicas, incluyendo transmisión eléctrica, excitabilidad neuronal, control de la contracción muscular y secreción hormonal. A pesar del vasto conocimiento de las funciones de los canales iónicos en las células excitables, sus múltiples papeles en la modificación del comportamiento de las células tumorales han sido descritos recientemente. Existen más de 400 genes que codifican para canales iónicos, lo que representa aproximadamente el 1,5% del genoma humano¹³. Con 78 miembros, los canales de potasio pueden ser divididos en cuatro clases principales basándose en la estructura de su dominio y mecanismo de activación, incluyendo canales de potasio activados por voltaje (Kv), canales de potasio activados por calcio (KCa), canales de potasio rectificadores internos (Kir) y canales de potasio de doble dominio de poro (K2P)¹⁴. La familia Kv, codificada por 40 genes en humanos, es el subgrupo más grande de canales de potasio. Son activados por cambios en el potencial de membrana¹⁴ y todos sus miembros comparten dominios transmembrana que forman el poro conductor de potasio. La evidencia emergente en la actualidad indica que la desregulación de los canales de potasio ocurre con frecuencia en el cáncer, y ha sido demostrada a nivel genómico, transcripcional, post-traducciona l y epigenético. A pesar de que inicialmente las funciones de los canales iónicos fueron estudiadas únicamente en células excitables, está bien establecida en la actualidad su implicación e impacto en varios fenómenos relevantes para la biología de la célula tumoral, como la proliferación celular y la migración. En una publicación fundamental al respecto, DeCoursey y cols.¹⁴ demostraron que los canales Kv son los canales predominantes en los linfocitos T humanos proliferantes. La mayor parte de las células se someten a una hiperpolarización transitoria a la salida de la fase G1 y

las células tumorales están, en promedio, despolarizadas en comparación con las células no tumorales¹⁵. En los últimos años, en diversos estudios se ha descrito que comparadas con el potencial de reposo de membrana más hiperpolarizado en las células excitables, las células con un ritmo de proliferación más rápido como células embrionarias, células madre o células tumorales están en general más despolarizadas, con un potencial de reposo de membrana de -20 a 85mV^{14,16}. Por lo tanto, una hipótesis clásica es que la despolarización de membrana por si misma juega un papel funcional en la iniciación o en la progresión tumoral, pero considerando que los cambios dinámicos de potencial de membrana durante la progresión del ciclo celular son probablemente dependientes del tipo celular. Además, las células de mamíferos sufren marcados cambios de forma y de volumen durante la progresión del ciclo celular¹⁷. Mediante el control del flujo de potasio y la osmolaridad intracelular que conduce agua a través de la membrana, los canales de potasio son reguladores centrales de la dinámica volumétrica importante para la progresión del ciclo celular. La fuente más importante de evidencia que apoya el papel trascendental de los canales Kv en la proliferación celular proviene de datos experimentales que muestran que un amplio espectro de bloqueantes de Kv inhiben la proliferación en numerosos tipos celulares¹⁶, incluyendo los queratinocitos^{18,19}.

El presente estudio fue llevado a cabo con el objetivo de investigar el efecto de los canales iónicos de potasio, en concreto de HERG1 y KV3.4, en el carcinoma de células escamosas y en lesiones potencialmente cancerizables de la cavidad oral y establecer su relevancia clínica en el desarrollo y la progresión del COCE.



MARCO TEÓRICO

1. Cáncer oral

El cáncer de la cavidad oral representa aproximadamente el 30% de los tumores malignos de cabeza y cuello. Aproximadamente el 90% de éstos corresponden a carcinomas de células escamosas²⁰, mientras en el 10% restante se encuentran neoplasias más raras como otros carcinomas, tumores de glándulas salivales menores, melanomas, linfomas, sarcomas y tumores de origen odontogénico.

Incidencia

El COCE representa, a nivel mundial, entre un 2 y un 4% de todas las neoplasias malignas, ocasionando aproximadamente un 2% de todas las muertes atribuibles al cáncer²¹. Existe una importante variabilidad geográfica con respecto a la incidencia del COCE, fundamentalmente en relación con factores ambientales y hábitos de vida. Así en el sudeste asiático e India, el COCE representa uno de los tumores malignos más frecuentes, mientras que en países desarrollados, en general, su incidencia se mantiene por debajo del 5%²².

Considerando conjuntamente los cánceres de la cavidad oral y la faringe, en España se estima que en 2014 fueron diagnosticados un total de 6.632 nuevos casos, 4.961 en hombres y 1.671 en mujeres²³.

Las tasas ajustadas por edad presentaron una importante variabilidad, de 10,3 a 20,6 por 100.000 en hombres y de 1,6 a 4,2 por 100.000 en

mujeres en el período 2003-2007²⁴. Según GLOBOCAN, en 2012 murieron en España 2.070 personas por este tipo de cáncer, de los que un 76% eran hombres. La tasa de mortalidad en hombres fue de 4,1 por 100.000 habitantes y de 0,9 por 100.000 habitantes en mujeres².

La edad media de presentación del cáncer oral está en torno a los 60 años, siendo más del 90% de los pacientes afectados mayores de 45 años²⁵.

A pesar de que tradicionalmente el COCE ha sido mucho más frecuente en hombres, al aumento del consumo de tabaco por parte de las mujeres desde los años setenta ha provocado que la proporción hombre/mujer haya pasado de 10:1 a 2:1 llegando incluso a equipararse en ciertas localizaciones. En España, la incidencia en hombres es de 5,7 a 12,9 casos por 100.000 habitantes/año mientras que en las mujeres es de 0,6 al 2,1 casos por 100.000 habitantes/año²⁶. En los últimos años se ha observado un aumento de la incidencia (rango 0,4%-4%) en pacientes menores de 40 años y en mujeres sin factores de riesgo²⁷. Así entre los años 1973 y 2001 se ha visto incrementada la incidencia del carcinoma de células escamosas en lengua, base de la lengua y amígdala en Estados Unidos en pacientes blancos de 20 a 40 años^{28,29}. Estos datos están en concordancia con los obtenidos en países como Suiza, Inglaterra, Eslovaquia, Escandinavia y Escocia³⁰

Etiología

Los factores de riesgo más comúnmente implicados en el desarrollo del COCE son el tabaco y el alcohol de manera independiente y en mayor medida, actuando de manera sinérgica⁵. Alrededor del 80% de los pacientes con COCE han sido fumadores, teniendo estos pacientes un riesgo de 5 a 7 veces mayor de desarrollar tumores de la cabeza y el cuello que los no fumadores. Además, los pacientes que continúan fumando tras el diagnóstico del tumor inicial multiplican el riesgo de padecer un segundo tumor primario en la vía aerodigestiva superior por seis con respecto a los pacientes que abandonan el hábito tabáquico³¹.

Numerosos agentes carcinógenos han sido identificados en relación al tabaco o a alguno de sus componentes. Los más estudiados son el benzopireno y las nitrosaminas específicas del tabaco, que interfieren en la replicación del ADN, produciendo un daño en la replicación celular³².

Existen otras modalidades de consumo de tabaco sin combustión que son muy frecuentes en determinadas regiones geográficas, ya sea consumiéndolo mascado como el “paan”, el “gutka”, el “snuff” o rapé o el “toombak” o bien mediante su colocación en contacto con las mucosas como el “naswar”³³. El tabaco mascado (betel) constituye la causa más importante de COCE y carcinoma orofaríngeo en la India, sudeste asiático, China, Taiwan y comunidades emigrantes, en especial cuando es consumido en conjunción con la nuez de areca e hidróxido de calcio. En regiones como la India estos hábitos representan un importante factor adicional, ocasionando que en esta región geográfica, el cáncer oral constituye la neoplasia maligna más prevalente en hombres³⁴.

El alcohol constituye el otro factor etiológico principal en el desarrollo de COCE. Se ha observado que el alcohol podría favorecer la penetración de los carcinógenos del tabaco mediante la eliminación del componente lipídico que recubre el estrato espinoso epitelial³⁵. El acetaldehído, es un metabolito carcinogénico del etanol, es producido en grandes cantidades por los estreptococos presentes en la cavidad oral y podría explicar la incidencia aumentada de COCE en pacientes con una deficiente higiene oral³⁶. Hasta el 50% de los pacientes diagnosticados de COCE presentan en su historia el consumo de alcohol.

Dentro de los factores etiológicos más relevantes, las oncoproteínas E6 y E7 de los HPV de alto riesgo, fundamentalmente HPV 16, pueden provocar inestabilidad genómica con mutaciones que desembocan en la transformación maligna. La E6 se une a la proteína p53 que se encarga de detener la división celular, y al unirse, ésta se degrada perdiendo su función. La proteína E7 se une a la proteína Rb, interrumpiendo de igual modo la regulación del ciclo celular³⁷. La presencia de HPV se ha demostrado en células epiteliales de lesiones *in situ*, invasivas y en metástasis ganglionares³⁸ y algunos estudios han detectado una importante asociación entre la presencia de VPH y el COCE³⁹ si bien en el momento actual esta relación no está tan claramente establecida como en otras localizaciones, como en el cáncer de cérvix y orofaringe^{40,41}.

Existen otros factores que podrían estar en relación con el desarrollo del COCE en un grado variable, como son la falta de una higiene oral adecuada⁴², la irritación mecánica crónica⁴², las radiaciones ionizantes, factores nutricionales⁴³ y ciertas exposiciones profesionales a tóxicos.

Localización

Aunque puede desarrollarse en cualquier localización, el COCE se localiza con mayor frecuencia en la lengua y en el suelo de la boca, que constituyen las regiones anatómicas más usualmente afectadas en los países desarrollados. La mucosa yugal, el triángulo retromolar, la encía y el paladar blando son las siguientes localizaciones en frecuencia y menos comúnmente a nivel de el dorso lingual y el paladar duro. En el sudeste asiático sin embargo, por el consumo de “paan” y su contacto directo con la mucosa, la localización más habitual es la región yugal, representando más del 40% de los COCE.

Al comparar el CECC entre pacientes no fumadores y no bebedores con pacientes fumadores y bebedores, Dahlstrom y cols.⁴⁴ hallaron que la localización más frecuente en ambos grupos era la lengua. En los pacientes con hábitos tóxicos el suelo de boca era la segunda región anatómica más frecuentemente afectada, seguida de la encía mandibular y el triángulo retromolar. En los pacientes que no consumían alcohol ni tabaco, el segundo lugar fue ocupado por la encía mandibular, seguido de la mucosa yugal y la encía maxilar.

En pacientes jóvenes la localización más frecuente es también la lengua^{45,46}, aunque Ribeiro y cols.⁴⁷ en su estudio llevado a cabo en Brasil se encontró una mayor incidencia de cáncer en el suelo oral (30%) que en la lengua (28%) en pacientes menores de 40 años. Girod y cols.⁴⁸ en su trabajo sobre CECC en mujeres, la localización más frecuente también fue la lengua (37,4%) seguida de la orofaringe (29,2%) y el suelo oral (8,8%).

En la siguiente tabla se reflejan diferentes estudios sobre la localización del COCE:

Tabla 1: Publicaciones acerca de las localizaciones más frecuentes del COCE/CECC

Autor	Casos	Localizacion más frecuente
Hirata y cols. ⁴⁹	478 carcinomas	Lengua (40%) Suelo de boca (33%)
Brandizzi y cols. ⁵⁰	274 COCE	Lengua (30%) Encía y reborde alveolar (29%) Mucosa yugal (18%) Suelo de boca (10%)
Girod y cols. ⁴⁸	171 COCE y carcinoma orofaríngeo	Lengua (37,4%) Orofaringe (29,2%) Suelo de boca (8,8%)
Mallet y cols. ⁵¹	52 COCE lingual	Borde lateral (51%) Cara ventral (30%) Dorso lingual (15%)
Sasaki y cols. ⁴⁶	529 COCE (<40 años)	Lengua (54,3%)
Ribeiro y cols. ⁴⁷	46 COCE	Suelo de boca (30%) Lengua (28%)
Poveda-Roda y cols. ⁵²	56 COCE (fumadores)	Lengua (44,6%) Encía (17,9%) Suelo de boca (16,1%)
	67 COCE (no fumadores)	Lengua (53,7%) Encía (25%) Mucosa yugal (11,9%)
Dahlstrom y cols. ⁴⁴	1131 CECC (pacientes fumadores y bebedores)	Lengua (58,9%) Encía 26,4%) Mucosa yugal (9,6%)
	171 CECC (pacientes no fumadores ni bebedores)	Lengua (42,3%) Suelo de boca (24,9%) Encía (20,3%)
Siriwardena y cols. ⁵³	100 COCE (<40 años)	Lengua (41%) Mucosa yugal (21%) Reborde alveolar (9%)
	100 COCE (>50 años)	Mucosa yugal (37,5%) Reborde alveolar (25%) Lengua (12%)
Chidzonga y cols. ⁵⁴	1723 COCE	Encía mandibular (27,6%) Lengua (18,4%) Suelo de boca (16,2%)

Al-Rawi y cols. ⁵⁵	1425 COCE	Lengua (20,4%) Reborde alveolar (17,8%)
Nemes y cols. ⁵⁶	119 COCE	Suelo de boca (27,7%) Lengua (22,7%)
Ariyoshi y cols. ⁵⁷	1809 COCE	Lengua (40,2%) Encía (32,7%) Mucosa yugal (10,1%) Suelo de boca (9%)

Histología

Desde una perspectiva histológica, el carcinoma oral de células escamosas se caracteriza por la proliferación de nidos, cordones o islotes neoplásicos que recuerdan, en mayor o menor grado, el epitelio escamoso de donde derivan y que penetran en el tejido conectivo. Las células presentan un citoplasma eosinófilo con núcleos grandes y una relación núcleo-citoplasmática aumentada⁵⁸. Según el grado de queratinización, el pleomorfismo celular y nuclear y la actividad mitótica se diferencian tres grados de diferenciación:

- **Bien diferenciados:**

Presentan una gran semejanza con las células epiteliales, se observa abundante formación de queratina en forma de perlas córneas o como queratinización celular individual. La atipia celular y el número de mitosis es mínima y existe un infiltrado inflamatorio crónico peritumoral bastante marcado, formado por linfocitos y células plasmáticas.

- **Moderadamente diferenciados:**

Presentan menor semejanza con las células epiteliales, y un mayor grado de atipia nuclear y número de mitosis. Existe una

disminución de la formación de perlas córneas y de la queratinización individual.

- **Pobrementemente o poco diferenciados:**

Se evidencia una mínima similitud con las células epiteliales y en ocasiones es difícil establecer el origen escamoso de estos tumores, siendo necesario recurrir a técnicas inmunohistoquímicas para demostrar la presencia de citoqueratina. Existe un gran pleomorfismo nuclear y un elevado número de mitosis.

En general, a medida que disminuye el grado de diferenciación, el comportamiento tumoral se vuelve más agresivo, con aumento de la velocidad de crecimiento y de la presencia de metástasis.

Al igual que en otras neoplasias epiteliales, el COCE parece desarrollarse mediante un proceso escalonado que involucra cambios moleculares sucesivos. En el CECC, el modelo de Califano⁵⁹ publicado en 1996, relaciona los cambios genéticos secuenciales con los clínico-patológicos que se producen desde la mucosa normal hasta la aparición de un carcinoma invasivo.

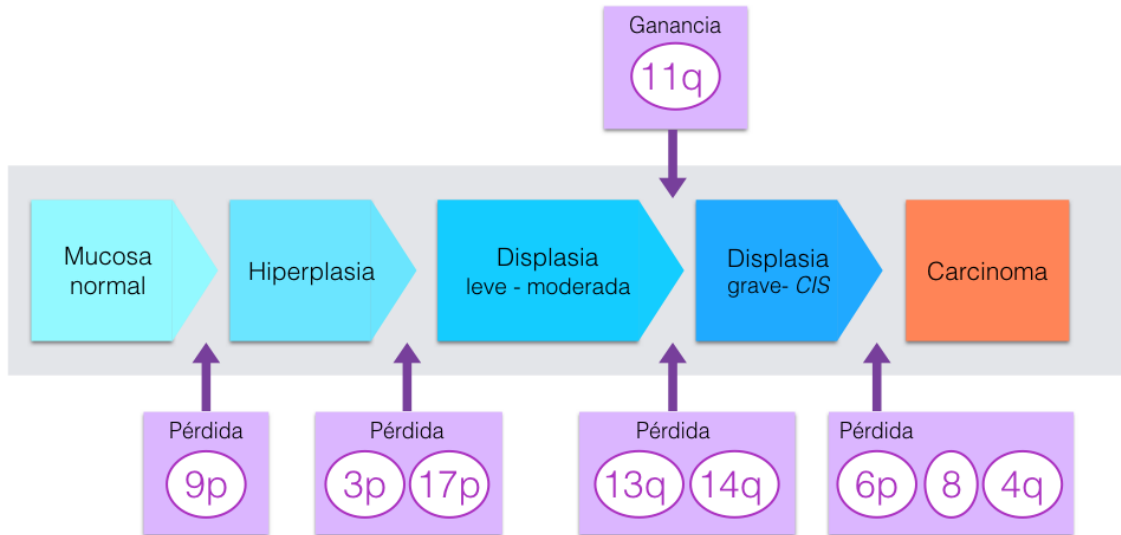


Figura 1: Modelo genético de carcinogénesis en carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello.

Las conclusiones a las que se llega en dicho estudio son:

- Las alteraciones genéticas del CECC suelen producirse en orden cronológico y determinan la progresión histopatológica. Así, aunque las manifestaciones clínicas estén ausentes, en estadios iniciales como es la hiperplasia epitelial ya aparecen pérdidas en 9p21 y 3p.
- La progresión tumoral viene determinada por las alteraciones genéticas acumuladas y no por su orden. Existen alteraciones propias de estadios tardíos que pueden constituir la única anomalía detectable en lesiones precoces.
- La participación de los genes supresores en las fases iniciales del proceso.

Alteraciones genéticas

Las alteraciones genéticas que generan anomalías en la diferenciación epitelial dando lugar a una proliferación celular anómala deben afectar a genes que codifican para proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular. Estos son fundamentalmente oncogenes promotores y genes supresores de tumores, así como los genes reparadores del ADN, encargados de detener la división celular si detectan errores en la replicación del ADN.

La carcinogénesis oral puede resumirse en los siguientes pasos:

1. Alteración genética en las células de la capa germinativa suprabasal, de forma que el cambio genético se transmite a las posteriores generaciones, sin cambios fenotípicos a nivel mucoso.
2. Si existe continuidad en la exposición a los carcinógenos, las alteraciones genéticas aumentan y se acumulan. Se produce la transformación fenotípica, apareciendo cambios en la mucosa, las lesiones precancerosas.
3. El fallo en los mecanismos de control provoca la progresión de las lesiones precancerosas hacia formas más graves o lesiones invasivas que sobrepasan la membrana basal.

Oncogenes

Son genes cuyos productos proteicos regulan el ciclo celular. Estas proteínas son fundamentalmente factores de crecimiento, receptores transmembrana, mensajeros citoplasmáticos y factores nucleares de transcripción. Al alterarse, fundamentalmente mediante amplificación génica, la proliferación celular se hace incontrolada.

La activación oncogénica más frecuentemente detectada en los carcinomas de cabeza y cuello, representando entre el 30 y el 60% de los casos, es la amplificación de la región 11q13, compuesta por 353 genes⁶⁰. Esta amplificación se relaciona con enfermedad avanzada, pobre diferenciación histológica y un tipo de crecimiento infiltrante, asociándose por todo ello a un peor pronóstico.

La región cromosómica 3q26,29, con 448 genes, es otra de las regiones cromosómicas que frecuentemente se detectan amplificadas en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello⁶¹. Se considera una alteración temprana, más frecuentemente en lesiones positivas para el HPV y también se ha relacionado con un peor pronóstico⁶².

La amplificación 8q es otra de las frecuentemente halladas en neoplasias malignas de cabeza y cuello, siendo la más conocida la subregión 8q23,24, con 273 genes.

Las amplificaciones de 3q26,29, 8q23,24 y 11q13 son, por tanto, las más frecuentemente halladas en los CECC. En dichas regiones se pueden hallar diversos genes implicados en la regulación del citoesqueleto de actina, que, a su vez, se relacionan con la motilidad

celular, la invasividad y el desarrollo de metástasis y, en último término, con la disminución de la supervivencia del paciente.

Genes supresores de tumores

Los genes supresores de tumores ejercen su acción impidiendo la perpetuación de mutaciones incompatibles con el normal funcionamiento celular mediante la interrupción del ciclo celular o la inducción de apoptosis.

Estos genes supresores han de ser inactivados a través de mutaciones puntuales, reordenaciones o deleciones de las dos copias de los genes, a diferencia de los oncogenes que pueden ser afectados por la mutación de una de las copias.

Se considera que las mutaciones en la región 9p21-22 ocurren durante un estadio precoz en el desarrollo de CECC (hiperplasia epitelial), antes del desarrollo de la atipia histológica. La inactivación del gen p16INK4a localizado en 9p21 conlleva la pérdida de expresión de p16, ha sido detectada hasta en un 83% de casos de CECC mediante inmunohistoquímica⁶³. Se considera que su inactivación es más precoz que la del gen p53⁶⁴.

El gen p53 localizado en 17p13 ha sido relacionado con prácticamente la totalidad de los cánceres humanos⁶⁵. En condiciones normales, ante la detección de un error en el ADN durante el ciclo celular, aumentan los niveles de p53 y se frena la replicación, dando tiempo a la reparación del ADN y conduciendo la célula a apoptosis si ésta no es posible. Si p53 está inactivado se permite que se acumulen

daños en el ADN que a la larga pueden conllevar la transformación maligna⁶⁶.

En CECC se detecta la función anormal de p53 hasta en un 50% de los casos⁶⁷ y se ha detectado su alteración en lesiones displásicas, por lo que es considerado un fenómeno precoz en la carcinogénesis de cabeza y cuello⁶⁸.

Cancerización de campo

El término cancerización de campo fue originalmente acuñado por Slaughter y cols. en su estudio sobre cáncer oral⁶⁹ en el que encontraron anormalidades histopatológicas en el epitelio en torno al carcinoma invasivo así como una incidencia aumentada de segundos primarios en la región de la cabeza y el cuello. Así, el término cancerización de campo fue empleado para describir el fenómeno por el cual un área entera de tejido desarrolla una transformación maligna o premaligna en respuesta a un carcinógeno.

La importancia de la cancerización de campo reside en su alta frecuencia como en su influencia negativa sobre el pronóstico que conlleva la aparición de los segundos primarios, que en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello representan entre un 3 y un 30% de los casos, con tasas mas altas de incidencia en carcinomas de la cavidad oral⁷⁰.

El origen de este fenómeno reside probablemente en las células progenitoras de la capa basal del epitelio. En estas células, mutaciones del gen p53 y la subsiguiente alteración de la expresión proteica, pueden ser transferidas a su descendencia formando parches constituidos por

menos de 200 células portadoras de la alteración genética, lo que presumiblemente podría representar la primera manifestación del COCE⁷¹. La mutación media la pérdida del control del ciclo celular, confiriendo una clara ventaja proliferativa a las células del parche, dando como resultado una expansión de la población clonal de progenitoras y ampliando así el número de dianas sobre las que actúan los siguientes eventos oncológicos. Los parches se extenderían lateralmente transformándose en campos precancerosos genéticamente alterados que pueden afectar áreas muy extensas de la cavidad oral⁷².

Tratamiento

A pesar de los avances acontecidos en los últimos años en la terapia de el COCE, tanto a nivel quirúrgico, como en radio y quimioterapia, la supervivencia sólo ha mejorado de manera marginal.

El tratamiento del COCE es multidisciplinar, y participan diversos especialistas formando comités clínicos, en los cuales se planifica de manera protocolarizada la terapia a aplicar en cada caso. Fundamentalmente son empleadas la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia de manera conjunta, secuencial o aislada según el estadio, la situación basal del paciente y sus preferencias.

El tratamiento quirúrgico estándar consiste en la resección con márgenes suficientes de la lesión oral y el tratamiento las áreas de drenaje linfático mediante disección celuloganglionar cervical. Ésta última será más o menos extensa según los hallazgos pre e intraoperatorios. En general, aunque es fuente de controversia, los pacientes sin evidencia de metástasis en el cuello (N0) se tratan

mediante una disección cervical selectiva, generalmente supraomohioidea y en algunos casos mediante la técnica del ganglio centinela. En los casos en los que están presentes metástasis ganglionares cervicales (N+) el tratamiento dependerá de la afectación de estructuras como la vena yugular interna, el músculo esternocleidomastoideo o el nervio espinal. Se realizarán por tanto vaciamientos radicales en caso de afectación de las tres estructuras o vaciamientos radicales modificados en caso de no ser así.

La radioterapia sigue teniendo un importante papel en el tratamiento del COCE. La radioterapia radical es cada vez más indicada en tumores con origen o extensión orofaríngea, preservando la función de las estructuras afectadas y mejorando en general la calidad de vida del paciente. La radioterapia adyuvante se indica tras la cirugía en las siguientes situaciones:

- Borde quirúrgico próximo o afecto.
- T3 o T4 con gran invasión local.
- Lesiones poco diferenciadas o indiferenciadas.
- Invasión perineural, vascular o linfática.
- Afectación ósea o de cartílago.
- Afectación ganglionar múltiple, presencia de una adenopatía metastásica mayor de 1,5 cm o ganglios en diversos niveles.
- Extensión extracapsular ganglionar con infiltración de partes blandas.

Por último, la radioterapia paliativa puede ser efectiva en el control de síntomas en pacientes no subsidiarios de tratamiento con intención curativa.

La quimioterapia es empleada como tratamiento de inducción en tumores localmente avanzados, de manera concomitante con la radioterapia radical o adyuvante, en los tratamientos de preservación de órgano y en enfermedad metastásica. Para la indicación de quimioterapia concomitante con la radioterapia se establece que deben existir al menos un factor adverso “mayor” como la afectación de márgenes quirúrgicos o la invasión extracapsular ganglionar o dos o mas factores adversos menores como pT3 o pT4 del primario excepto T3N0 laríngeo, estadio ganglionar N2 o N3, afectación de ganglios en niveles IV o V en primarios orales u orofaríngeos, invasión perineural y embolismo vascular.

Otras posibilidades terapéuticas de reciente aparición son el cetuximab, un anticuerpo monoclonal contra el dominio extracelular del factor de crecimiento epidérmico (EGF), que está indicado en combinación con la radioterapia en el CECC localmente avanzado. Los inhibidores de la tirosín cinasa, como gefitinib y erlotinib, así como los inhibidores de la angiogénesis, como el bevacizumab, se encuentran todavía en fase de investigación.

Pronóstico

El diagnóstico precoz es, al igual que en el resto de neoplasias malignas, fundamental para la mejora del pronóstico. La tasa de supervivencia en el COCE a los 5 años es del 80% en estadios iniciales, desciende al 40% en los casos con afectación ganglionar y es menor del 20% en pacientes con metástasis a distancia⁷³.

Entre los factores con más repercusión en la supervivencia, la presencia de metástasis ganglionares es el más relevante,

reduciéndose aquella a la mitad en los casos donde se produce⁷⁴. La afectación de los márgenes de resección produce un claro impacto negativo en la supervivencia así como el grado histológico, la infiltración neural y la afectación ósea⁷⁵.

El riesgo de segundos primarios en la vía aerodigestiva superior produce también un impacto negativo en la supervivencia. En cuanto a las muertes en pacientes diagnosticados de COCE, la mitad se producen por el primario, un 25% por segundos primarios y el resto por otras causas⁷⁶.

2. Trastornos orales potencialmente cancerizables (TOPC)

Definición

Se definen como lesiones orales potencialmente cancerizables aquellas que⁷⁷:

- Se han identificado previamente como lesiones precancerosas, y durante el seguimiento se ha constatado su malignización.
- Se han detectado coexistiendo con carcinomas orales de células escamosas en los márgenes de los mismos.
- Se han objetivado alteraciones morfológicas y citológicas similares a las observadas en lesiones epiteliales malignas, pero no invaden el tejido conectivo.
- Se han hallado alteraciones cromosómicas, genéticas o moleculares presentes en carcinomas orales invasivos.

La leucoplasia oral es definida por la OMS como una placa blanca con riesgo de malignización cuestionable habiendo excluido otras enfermedades o alteraciones conocidas que no conllevan un riesgo aumentado de cáncer⁷⁷. La prevalencia de la leucoplasia oral oscila entre el 1,72% y el 2,60% variando según sexo, edad, raza y factores geográficos y de hábitos de vida⁷⁸, fundamentalmente en relación con el consumo de tabaco y alcohol, siendo éstos los agentes etiológicos más frecuentemente identificados. Son más frecuentes en varones de entre 40 y 50 años y en cuanto a su localización, las más habituales son la encía y la mucosa yugal^{79,80}.

Tabla 2: Trastornos orales potencialmente cancerizables

TRASTORNOS ORALES POTENCIALMENTE CANCERIZABLES

- Leucoplasia
- Eritroplasia
- Lesiones palatinas en el hábito de fumar invertido
- Fibrosis oral submucosa
- Queratosis actínica
- Liquen plano
- Lupus eritematoso discoide
- Enfermedades hereditarias:
 - Disqueratosis congénita
 - Epidermolisis bullosa

Parece existir una estrecha asociación entre esta entidad y el cáncer de cabeza y cuello, ya que en el momento del diagnóstico, entre un 16 y un 62% de los COCE se han asociado con leucoplasias orales⁸¹. Dicha leucoplasia puede preceder a la aparición del cáncer en meses o años y/o simultanear su presencia. Existen ciertos factores que aumentan el riesgo de transformación maligna, como son la localización en la lengua o el suelo de la boca, la presencia de displasia epitelial y las leucoplasias no homogéneas⁸².

Las alteraciones histológicas presentes en la leucoplasia oral oscilan entre reacciones fisiológicas normales hasta cambios benignos, premalignos y malignos. La hiperqueratosis moderada y la hiperplasia

epitelial sin displasia son los hallazgos histológicos más frecuentemente descritos en la leucoplasia⁴⁹.

Tabla 3: TOPC según su potencial de malignización aproximado⁸³.

POTENCIAL MALIGNO APROXIMADO	TOPC	FACTOR ETIOLÓGICO CONOCIDO
Muy alto (85%)	Eritroplasia	Tabaco/alcohol
Alto según las circunstancias (30%)	Queilitis actínica	Exposición solar
	Candidiasis crónica	<i>Candida albicans</i>
	Disqueratosis congénita	Genética
	Leucoplasia (no homogénea)	Tabaco/alcohol
	Leucoplasia verrugosa proliferativa	VPH
	Queratosis sublingual	Tabaco/alcohol
	Fibrosis submucosa	Nuez de areca
	Leucoplasia sifilítica	<i>Treponema pallidum</i>
	Xeroderma pigmentosum	Genética
Bajo (<5%)	Atipia en pacientes inmunocomprometidos	VPH
	Lupus eritematoso discoide	Autoinmune
	Síndrome de Fanconi	Genética
	Leucoplasia homogénea	Fricción/tabaco/alcohol
	Liquen plano	Idiopático
	Síndrome de Plummer-Vinson	Déficit de hierro
	Esclerodermia	Autoinmune

El tratamiento de estas lesiones consiste, inicialmente, en la eliminación de posibles factores etiológicos, y en caso de no existir respuesta, se han propuesto diversos tratamientos (retinoides, antimicóticos, escisión quirúrgica, criocirugía o tratamiento con láser), aunque ninguno ha demostrado efectividad en la prevención de la transformación maligna de la leucoplasia o en evitar su recidiva⁸⁴. Los pacientes han de ser seguidos de por vida a intervalos que pueden variar entre 3 y 12 meses.

Clasificación

La clasificación de la OMS⁸⁵ reconoce 5 estadios histopatológicos en los TOPC:

- **Hiperplasia escamosa:** suele acontecer en el estrato espinoso (acantosis) y/o en el estrato basal/parabasal (hiperplasia de células basales). No existe atipia y la estratificación es normal.
- **Displasia leve:** la alteración de la arquitectura y la atipia quedan limitados al tercio inferior del epitelio.
- **Displasia moderada:** la alteración se extiende hasta el tercio medio del epitelio. El grado de atipia celular podría requerir encuadrar la lesión en un grado superior de displasia.
- **Displasia grave:** la alteración de la arquitectura y la atipia afectan a más de dos tercios del epitelio.
- **Carcinoma *in situ*:** Alteración de la arquitectura casi completa en conjunción con atipia celular muy pronunciada. Suelen existir mitosis atípicas y anormalmente superficiales

Tabla 4: Criterios usados para el diagnóstico de displasia. Warnakulasuriya 2007⁷⁷.

Arquitectura	Citología
<ul style="list-style-type: none">• Estratificación irregular del epitelio• Pérdida de polaridad de las células basales• Crestas interpapilares delgadas y alargadas• Aumento del número de figuras de mitosis• Mitosis en las capas superficiales• Queratinización individual (disqueratosis)• Globos córneos en las crestas interpapilares	<ul style="list-style-type: none">• Variación anormal del tamaño nuclear (anisocariosis)• Variación anormal de la forma nuclear (pleomorfismo nuclear)• Variación anómala del tamaño celular (anisocitosis)• Variación anormal del tamaño celular (pleomorfismo celular)• Aumento de la proporción núcleo/citoplasma• Aumento del tamaño nuclear• Figuras de mitosis atípicas• Aumento del tamaño y número de los nucléolos• Hiperchromasia

El diagnóstico histopatológico de displasia no es un marcador pronóstico fiable de la progresión a malignidad, ya que no existe una correlación individual directa entre el grado de displasia y el desarrollo de cáncer invasivo. Se han detectado alteraciones cromosómicas y moleculares precoces en lesiones normales desde el punto de vista clínico e histológico⁸⁶. Se hace necesaria, por tanto, la búsqueda de nuevos marcadores complementarios al diagnóstico histológico que puedan aportar más información sobre el riesgo de progresión a malignidad.

3. Canales de potasio

En el genoma humano se encuentran más de 400 genes codificadores de canales iónicos, representando aproximadamente el 1,5% del genoma humano¹³. Estos canales poseen una gran diversidad estructural y funcional, regulando la distribución de los iones de potasio, sodio, calcio y cloruro contribuyendo a la homeostasis celular y participando prácticamente en todos los procesos celulares fundamentales.

La bomba de sodio-potasio ($\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa) transporta 2 moléculas de potasio al interior celular y tres moléculas de sodio al exterior de la célula hidrolizando una molécula de ATP, con el consiguiente aumento del potasio intracelular. Cuando un canal de potasio se abre, permite la salida de potasio a favor de gradiente, llevando al potencial transmembrana celular al equilibrio. En células no excitables o en las excitables en su estado basal, el potencial de reposo de membrana es generalmente mantenido en valores negativos que oscilan entre -30 a -85mV. Desde el potencial de reposo el potencial de membrana puede volverse más negativo (hiperpolarización) o más positivo (despolarización) mediante la apertura de varios canales iónicos. Como los canales de potasio dominan la conductancia en estado de reposo, los potenciales de membrana en reposo son ligeramente más positivos que el potencial de equilibrio para el potasio. Así, en general, la activación de los canales de potasio causan hiperpolarización mientras que la apertura de canales de sodio o de cloruro causarían despolarización.

Los canales iónicos de potasio son un conjunto de proteínas cuyo origen podría haber sido simultáneo con el origen de la vida en la Tierra⁸⁷. Forman el grupo más numeroso de canales específicos para un ion en particular. A través de los estudios mediante cristalografía de rayos X, se

ha podido localizar y caracterizar la región formadora de poro, conservada ampliamente en todas las familias de canales de potasio. Por el contrario, el resto de la secuencia de estos canales presenta una gran variabilidad.

Los canales de potasio están formados por subunidades principales denominadas subunidades α , y por subunidades accesorias. La subunidad α de estos canales es una proteína multimérica, que por si sola no forma un canal para el paso de iones y debe de asociarse con otras subunidades para que el canal sea funcional. Las subunidades accesorias pueden ser citoplasmáticas, extracelulares o transmembranales y su función es la de modular las propiedades de la subunidad principal.

La estructura básica y compartida por todos los canales de potasio está formada por dos dominios transmembrana (2TM) conectados por una región bucle que entra y sale de la bicapa lipídica por el lado exterior de la membrana plasmática. Este bucle, llamado dominio P, forma parte esencial del poro del canal. En el caso de los canales de cuatro segmentos transmembrana esta estructura básica está repetida.

Los dominios P de los canales de potasio tienen una secuencia de aminoácidos altamente conservada : TxxTxG(Y/F)GD (correspondiendo la x con cualquier aminoácido). Esta secuencia constituye parte esencial del filtro de selección del canal de tal manera que las mutaciones en los aminoácidos de esta secuencia provocan la pérdida de selectividad del canal por el ion potasio.

Sobre la base de la estructura, se pueden diferenciar tres grandes grupos:

- **Canales con dos segmentos transmembrana y un dominio formador de poro (2TM - 1P):** Este grupo está compuesto por la familia de canales KIR (del inglés, *inward rectifier K⁺ channels*), y su estructura es similar a la del primer canal de potasio cristalizado. Cada subunidad de los canales de esta familia, posee 2 regiones de transmembrana (TM) conectadas por 1 dominio formador de poro (P), y se ensamblan como tetrámeros.

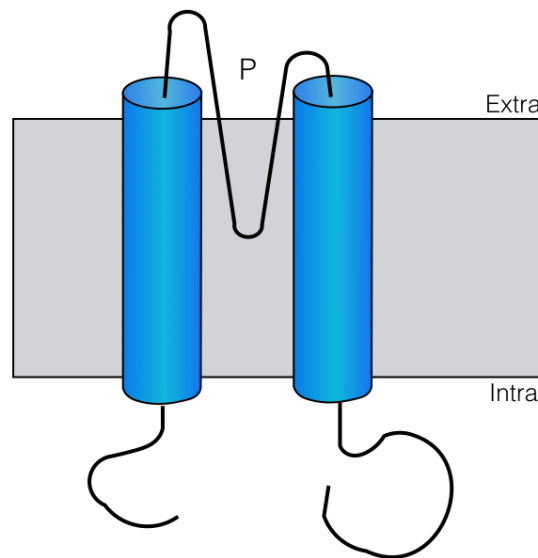


Figura 2: Representación esquemática de los canales con dos segmentos transmembrana y un dominio formador de poro (2TM - 1P)

- **Canales con 4 segmentos transmembrana y 2 dominios formadores de poro (4TM - 2P):** formado por la familia de canales K2P (del inglés, *two pore domain K⁺ channels*). Son los canales de potasio de descubrimiento más reciente⁸⁸ y se caracterizan por poseer en cada subunidad 2 dominios formadores de poro y 4 segmentos transmembrana. A diferencia del resto de los canales de potasio, el canal se forma como dímero.

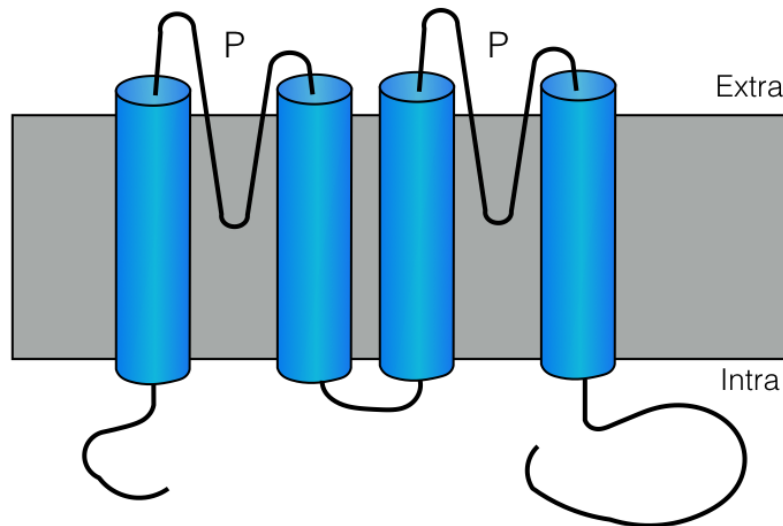


Figura 3: Representación esquemática de los canales con cuatro segmentos transmembrana y dos dominios formadores de poro (4TM - 2P)

- **Canales con 6 segmentos transmembrana y un dominio formador de poro (6TM - 1P):** Es el grupo más numeroso de canales de potasio e incluye a 3 familias. Están formados por tetrámeros cuyas subunidades poseen 6 segmentos transmembrana (S1 - S6) que acompañan a 1 dominio formador de poro. Dentro de este grupo podemos encontrar a la familia de canales de potasio operados por voltaje o Kv, que presentan como característica estructural una región en el segmento de transmembrana S4 que presenta 4 aminoácidos cargados positivamente y que funciona como sensor de voltaje. Esta es otra de las características de la estructura de canales iónicos que está altamente conservada en otras familias de canales iónicos de potasio, sodio y calcio que presentan sensibilidad al voltaje.

Este grupo se completa con 2 familias de canales de potasio sensibles a la concentración de calcio intracelular (KCa). La primera se denomina SKCa (del inglés, *small conductance calcium sensitive K⁺ channel*), compuesta por una serie de canales potasio de

conductancia intermedia y baja con actividad independiente del voltaje. Mientras que la segunda se denomina familia de los *Slo*, cuyo miembro más relevante es el canal de K⁺ de alta conductancia sensible al calcio y al voltaje, conocido como BKCa.

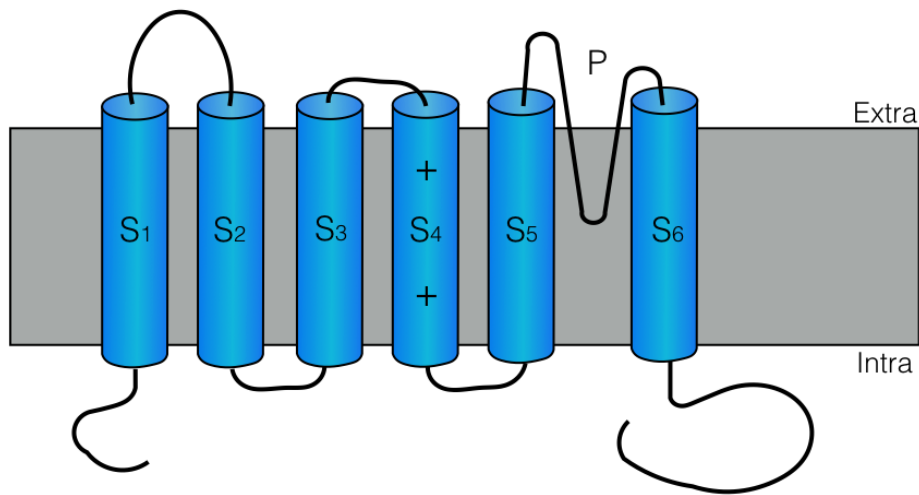


Figura 4: Representación esquemática de los canales con seis segmentos transmembrana un dominio formador de poro (6TM - 1P)

Con 78 miembros, los canales de potasio pueden ser divididos en cinco clases principales basándose en su estructura de dominio y en su mecanismo de activación.

FAMILIA DE LOS CANALES DE POTASIO *Slo*

Esta familia está constituida por los canales codificados por los genes *Slo* (*Slo1*, *Slo2.1*, *Slo2.2* y *Slo3*), y tienen como característica general y diferencial, el presentar un valor elevado de conductancia iónica⁸⁹.

El canal codificado por *Slo1*, es el canal de esta familia más estudiado, se denomina también canal de potasio de alta conductancia activado por

voltaje y calcio intracelular, canal maxi-K o BKCa (del inglés, *big conductance potassium channel*). Los canales de tipo *Slo*, además de su alta conductancia, se caracterizan por la capacidad que presentan de responder a cambios en la concentración intracelular de determinados iones (H^+ , Ca^{2+} , Cl^- y Na^+ , según el subtipo).

A pesar de que se los incluye dentro de los canales 6TM, presentan en el extremo amino terminal un dominio transmembrana extra denominado S0, es decir son 7TM - 1P. La región formadora de poro se sitúa en la conexión entre los segmentos S5 y S6, mientras que en el segmento S4 de los *Slo1* y *3* se halla el sensor del voltaje (al igual que en los canales Kv). La región carboxilo terminal es la responsable de la mayor parte de las regulaciones que presentan estos canales.

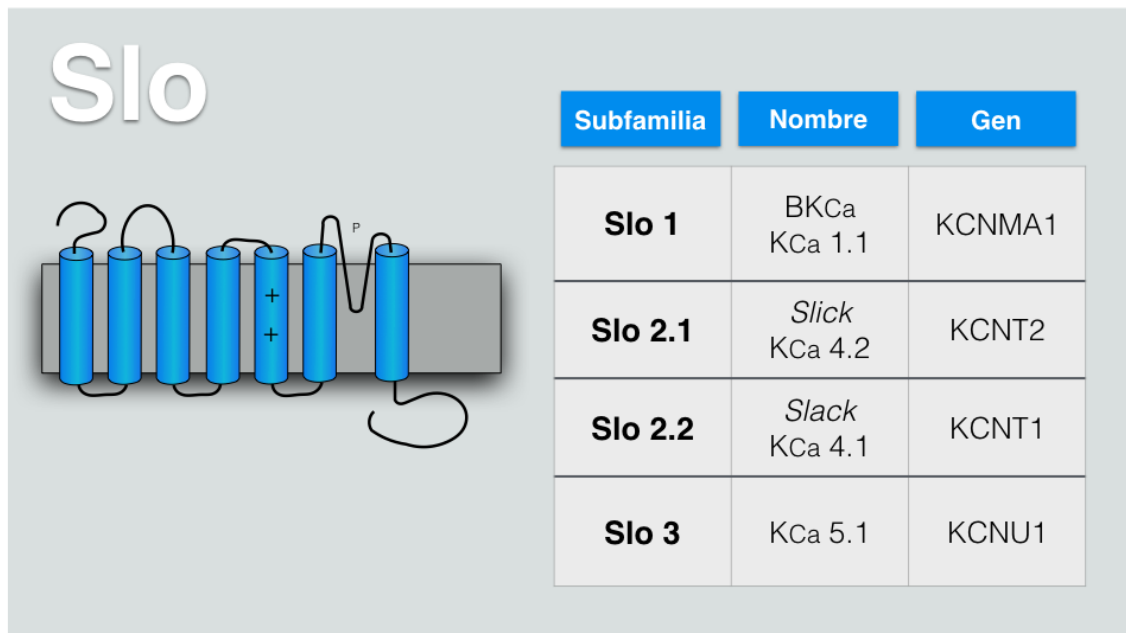


Figura 5: Familia de canales de potasio Slo

FAMILIA DE LOS CANALES DE POTASIO DE BAJA CONDUCTANCIA SENSIBLES AL CALCIO (SKCa, KCNN)

Si bien pertenecen a 2 familias distintas, este grupo de canales generalmente se halla descrito junto al canal BKCa, debido a que estos canales también se activan por el incremento en la concentración de calcio intracelular, comparten la estructura 6TM - 1P y la denominación en base al valor de la conductancia unitaria del canal⁹⁰. Las diferencias de esta familia respecto al canal BKCa radican en el menor valor de la conductancia, la presencia de sólo 2 argininas en el segmento S4, que explica su actividad independiente del voltaje, y la ausencia del segmento S0⁹¹.

Esta familia está compuesta por 4 genes, y se divide en 2 subfamilias basándose en la conductancia de canal único, los canales SKCa propiamente dichos y los canales de conductancia intermedia, IKCa,

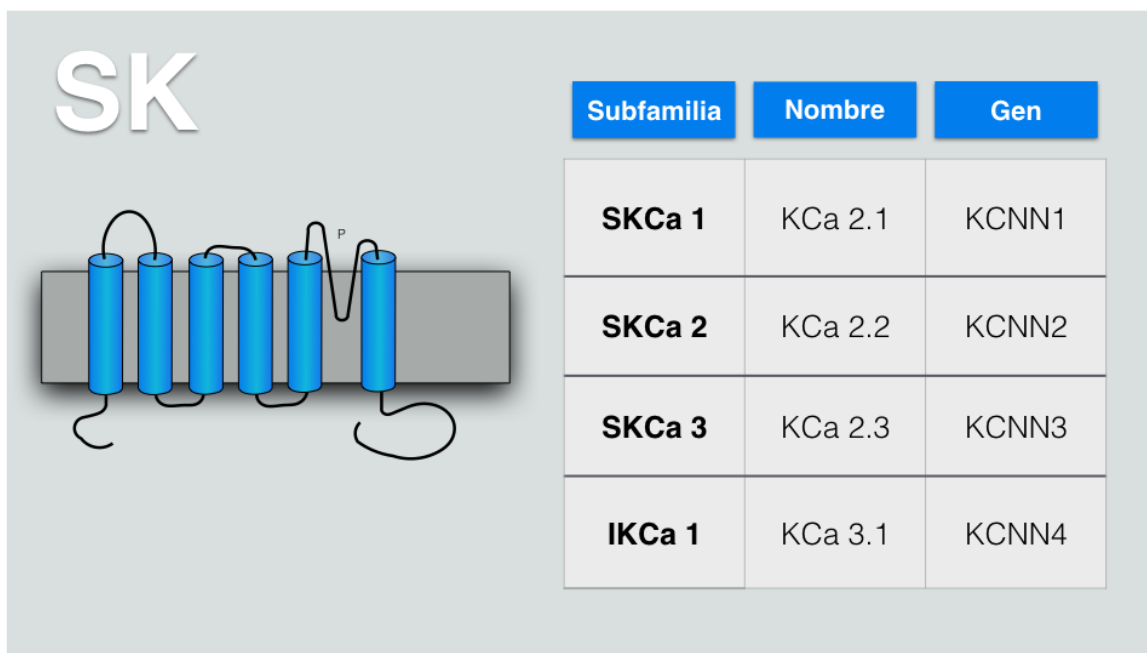


Figura 6: Familia de canales de potasio de baja conductancia sensibles al calcio (SK)

FAMILIA DE LOS CANALES KIR (KCNJ)

Los canales de potasio de rectificación entrante, hacia dentro o anómala (Kir) se denominan así debido al fenómeno por el cual su relación entre la corriente macroscópica y el voltaje de la membrana no sigue un comportamiento lineal u óhmico como se espera para un canal independiente de voltaje, presentando una mayor conductancia iónica a potenciales más negativos que el potencial de equilibrio para el potasio. Esto es producido por un bloqueo dependiente de voltaje por magnesio o poliamidas intracelulares⁹², las cuales, a medida que el potencial de membrana adquiere valores más positivos, obstruyen el poro del canal impidiendo el paso de corriente en dirección saliente.

Existen canales KIR con distintos grados de rectificación. Así encontramos rectificadores fuertes, intermedios y débiles. Esta característica viene determinada por la presencia de un aminoácido cargado negativamente (Asp) en la posición 172 del segmento S2 para los rectificadores fuertes, que es ocupada por un aminoácido neutro (Asn) en los débiles⁹³.

Existen 15 genes que codifican para canales KIR que, a su vez, pueden subdividirse en cuatro grupos funcionales: los KIR clásicos, los acoplados a proteína G (GIRK), los sensibles al ATP intracelular (KATP) y los canales transportadores.

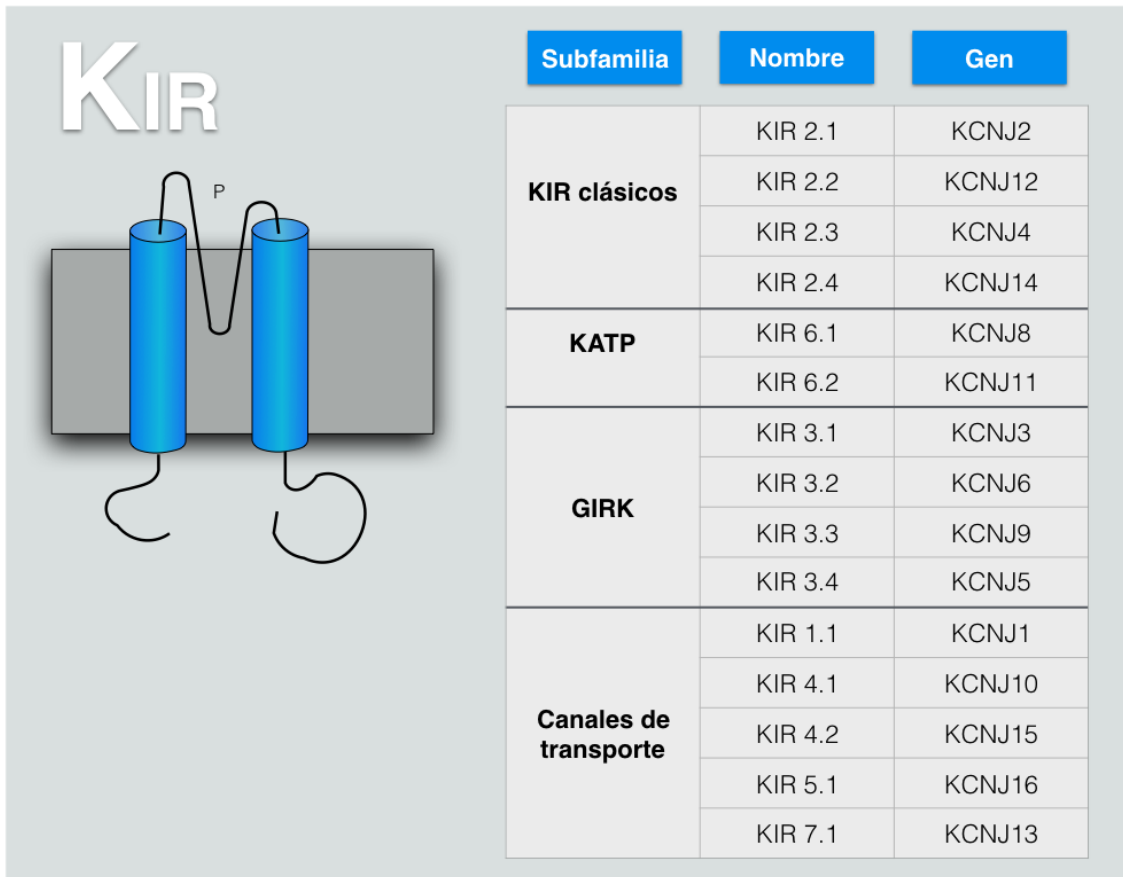


Figura 7: Familia de canales de potasio de rectificación hacia dentro (Kir)

FAMILIA DE LOS CANALES K2P (KCNK) :

Los canales de potasio de dominio de dos poros (K2P) son los más recientemente descritos dentro de los canales de potasio, con diferencias importantes no solo a nivel estructural sino también a nivel funcional. Son considerados como canales “de fuga” debido a que permanecen abiertos prácticamente a todos los valores de potencial de membrana, con poca dependencia del voltaje (la mayor parte de los casos presentan rectificaciones débiles). De esta manera comparten con los KIR un rol principal en la determinación del valor del potencial de membrana de reposo en diferentes tipos celulares.

En esta familia los canales iónicos son codificados por 15 genes. Se los clasifica en 6 familias:

- Canales rectificadores entrantes débiles (TWIK)
- Canales relacionados con el TWIK sensibles al ácido araquidónico (TREK)
- Canales inhibidos por el descenso del pH intracelular (TASK)
- Canales activados por alcalinización (TALK)
- Canales inhibidos por el halotano (THIK)
- Canales presentes en la médula espinal (TRESK)

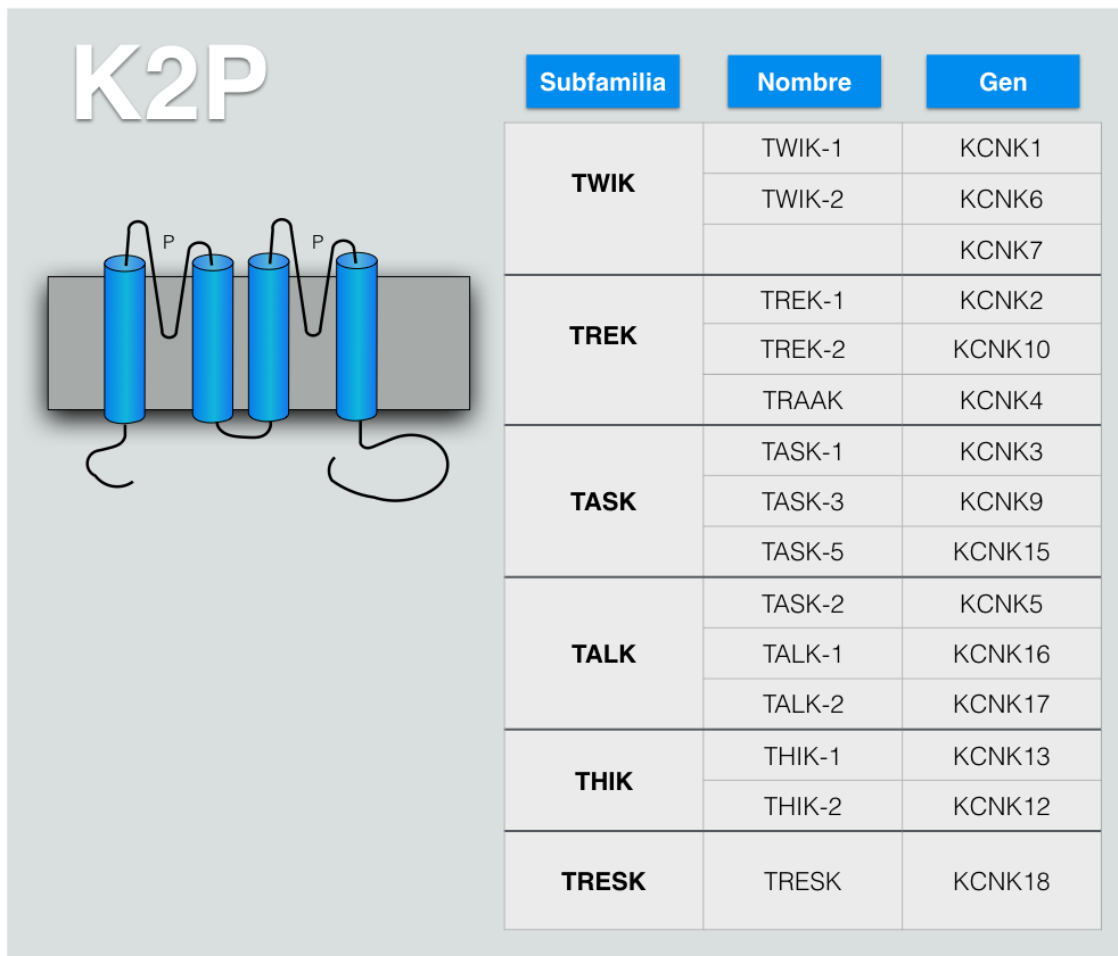


Figura 8: Familia de canales de potasio con dos dominios formadores de poro (K2P)

FAMILIA DE LOS CANALES DEPENDIENTES DEL VOLTAJE Kv:

En esta familia se encuentra la mayor diversidad de canales de potasio codificada por 40 genes⁹⁴. La actividad de estos canales depende del voltaje de la membrana, siendo activados por la despolarización de la misma.

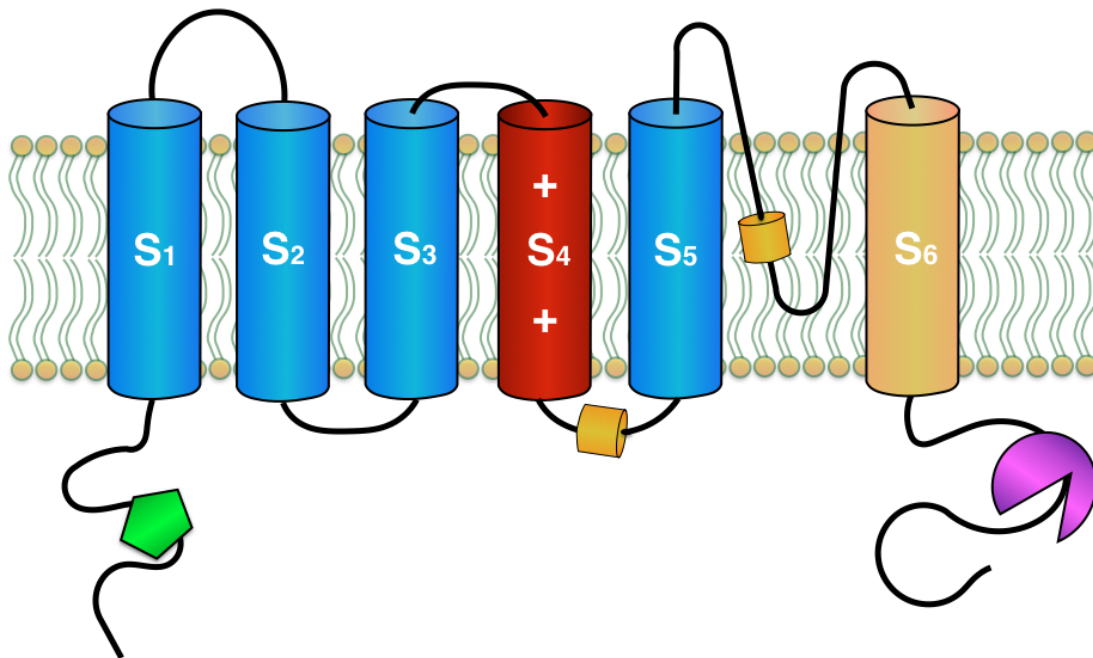


Figura 9: Representación de la subunidad alfa de un canal de potasio Kv

La subunidad α está constituida por 6 segmentos transmembrana S1, S2, S3, S4, S5 y S6 con extremos amino- y carboxilo-terminal citoplasmáticos. Cada subunidad consta de dos módulos funcionalmente distintos: el sensor de voltaje formado por segmentos S1-S4 y el poro del canal constituido por S5-S6. El segmento S4 contiene residuos de arginina o lisina cada tres posiciones y es el único dominio transmembrana que está positivamente cargado. La despolarización de la membrana causa un movimiento de los residuos positivos del S4, y este movimiento de cargas a través del campo eléctrico de la membrana media la apertura del canal.

Por otra parte, el bucle que une los segmentos S5-S6 constituye la vía de permeación de iones, que contiene el filtro de selectividad del canal.

Al no ser suficiente una subunidad α para formar el poro, para formar un canal de potasio funcional tienen que agruparse 4 subunidades α . Cuando las subunidades α son todas iguales el canal es un homotetrámero. Aunque a veces pueden formarse homotetrámeros, la mayoría de los canales de potasio de las células excitables están formados por el ensamblaje de subunidades α diferentes y son por tanto heterotetrámeros.

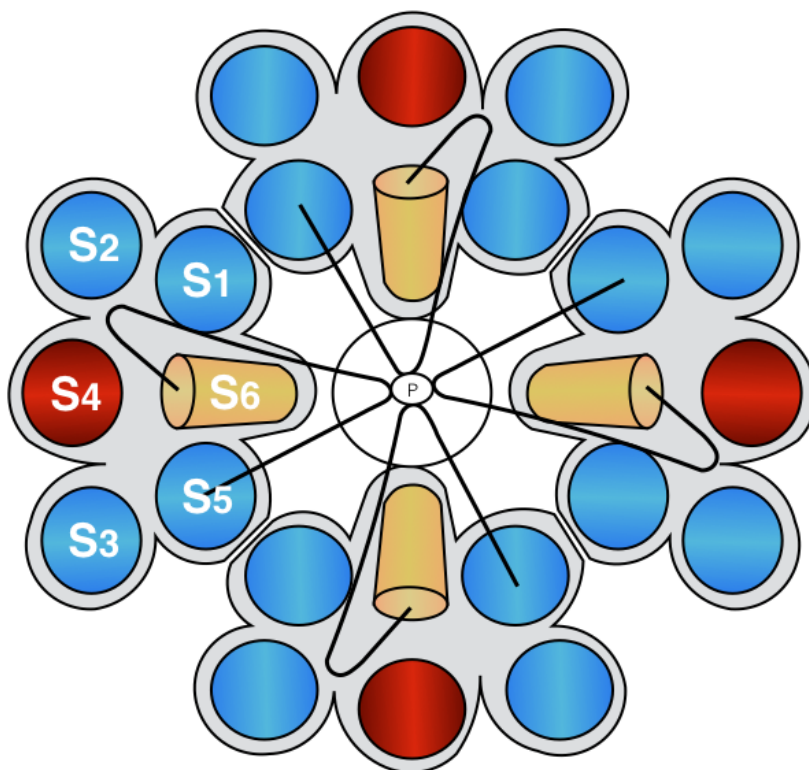


Figura 10: Formación de tetrámeros por las subunidades alfa.

Además del elevado número de genes que codifica para este tipo de canales la diversidad funcional que presentan se ve incrementada por⁹⁴:

1. Formación de heteromultímeros entre miembros de una misma subfamilia.
2. Formación de heteromultímeros con miembros de las subfamilias de subunidades silentes.
3. Regulación por medio de subunidades accesorias: $\beta 1 - \beta 3$, KCHIP1, minK y KCNE⁹⁵.
4. Desarrollo de *splicing* alternativo en casi todas las subfamilias⁹⁶.
5. Edición del ARN y modificaciones postranscripcionales^{97,98}.

Este grupo de canales se divide en 12 subfamilias según su similitud genética y a su vez, en base a su funcionalidad, se distinguen 2 subgrupos: por un lado los canales Kv propiamente dichos (Kv1-4, Kv7 y Kv10-12) y por el otro, la subunidades silentes (Kv5, Kv6, Kv8 y Kv9) que como homómeros no generan canales funcionales, pero sí lo hacen al heteromerizarse con miembros de la subfamilia Kv2⁹⁴.

Por su parte, las 8 subfamilias que incluyen los canales Kv funcionales se han clasificado en base a las propiedades electrofisiológicas de sus corrientes macroscópicas como:

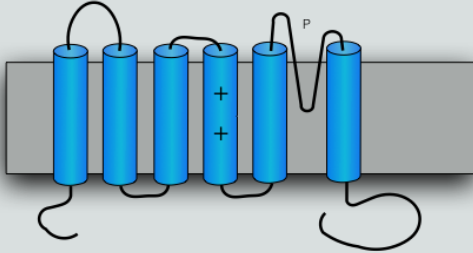
- I. Canales con corrientes de tipo A. Median corrientes transitorias que se activan con la despolarización de la membrana mostrando una cinética de activación rápida seguida de una inactivación completa en el lapso de aproximadamente 100 ms⁹⁴.
- II. Canales con corrientes de tipo rectificador tardío, involucrados en corrientes macroscópicas inducidas por la despolarización que presentan activación lenta e inactivación leve o nula. Estos canales participan de la repolarización que finaliza los potenciales de acción, restableciendo los valores de conductancia al potasio como

dominante en la determinación del valor de potencial de membrana celular⁹⁹.

Mientras que el dominio del poro de todos los canales de potasio mantiene un GYG/GFG *signature motif* altamente conservado, que contribuye a la selectividad del filtro en estos canales, la diversidad molecular de los canales de potasio es inmensa. Los canales de potasio forman complejos homoméricos o heteroméricos ensamblados con subunidades alfa de la misma subfamilia. La presencia de subunidades auxiliares puede modificar las propiedades funcionales diversificando más estos canales. Por ejemplo, un canal BK puede ser activado en potencial de reposo sin que exista incremento de la concentración intracelular de calcio mediante la formación de un complejo con una proteína auxiliar.

El ARN mensajero de los canales de potasio está sujeto a edición del ARN, a *splicing* alternativo y las proteínas pueden ser modificadas a nivel post-traducciona l mediante fosforilación ¹⁰⁰ , sumoilacion ¹⁰¹ , palmitoilacion¹⁰² y glicosilación^{103,104} .Las modificaciones a nivel de ARN y proteínas junto con la mezcla y unión de subunidades del canal favorecen la gran versatilidad de los comportamientos de los canales.

K_v



Subfamilia	Nombre	Gen
K_v 1.x (tipo <i>Shaker</i>)	K _v 1.x	KCNA1
	K _v 1.2	KCNA2
	K _v 1.3	KCNA3
	K _v 1.4	KCNA4
	K _v 1.5	KCNA5
	K _v 1.6	KCNA6
	K _v 1.7	KCNA7
	K _v 1.8	KCNA10
K_v 2 (tipo <i>Shab</i>)	K _v 2.1	KCNB1
	K _v 2.2	KCNB2
K_v 3 (tipo <i>Shaw</i>)	K _v 3.1	KCNC1
	K _v 3.2	KCNC2
	K _v 3.3	KCNC3
	K _v 3.4	KCNC4
K_v 4 (tipo <i>Shal</i>)	K _v 4.1	KCND1
	K _v 4.2	KCND2
	K _v 4.3	KCND3
K_v 5	K _v 5.1	KCNF1
K_v 6	K _v 6.1	KCNG1
	K _v 6.2	KCNG2
	K _v 6.3	KCNG3
	K _v 6.4	KCNG4
K_v 7	K _v 7.1	KCNQ1
	K _v 7.2	KCNQ2
	K _v 7.3	KCNQ3
	K _v 7.4	KCNQ4
	K _v 7.5	KCNQ5
K_v 8	K _v 8.1	KCNV1
	K _v 8.2	KCNV2
K_v 9	K _v 9.1	KCNS1
	K _v 9.2	KCNS2
	K _v 9.3	KCNS3
K_v 10 (tipo <i>eag</i>)	K _v 10.1	KCNH1
	K _v 10.2	KCNH5
K_v 11 (tipo <i>erg</i>)	K _v 11.1	KCNH2
	K _v 11.2	KCNH6
	K _v 11.3	KCNH7
K_v 12 (tipo <i>elk</i>)	K _v 12.1	KCNH8
	K _v 12.2	KCNH3
	K _v 12.3	KCNH4

Figura 11: Familia de canales de potasio sensibles al voltaje (K_v)

4. Canales de Potasio y cáncer

Existen numerosos estudios acerca de la desregulación de la expresión de canales de potasio en el cáncer, perteneciendo los canales de potasio implicados a las cuatro principales clases. Como ejemplos, se pueden citar los siguientes:

- Se ha descrito la elevación de la expresión de Kv1.3 en cáncer de mama, colon y próstata¹⁰⁵.
- La expresión aumentada de HERG1 (Kv11.1) es un importante marcador en tumores sólidos y hematológicos¹⁰⁶.
- La sobreexpresión de Kv 10.1 (EAG1) puede ser hallada en más del 70% de cáncer en humanos en diversos órganos¹⁰⁷.
- La sobreexpresión de proteína G activada en canales de rectificación anómala GIRK1 (KCNJ3) esta correlacionada con la presencia y el grado de metástasis linfáticas en el cáncer de mama¹⁰⁸.
- El aumento de la expresión de una isoforma específica del canal BK se corresponde con el grado de malignidad del glioma¹⁰⁹.
- El canal K2P KCNK9 esta sobreexpresado en el cáncer de pulmón y de mama¹¹⁰.

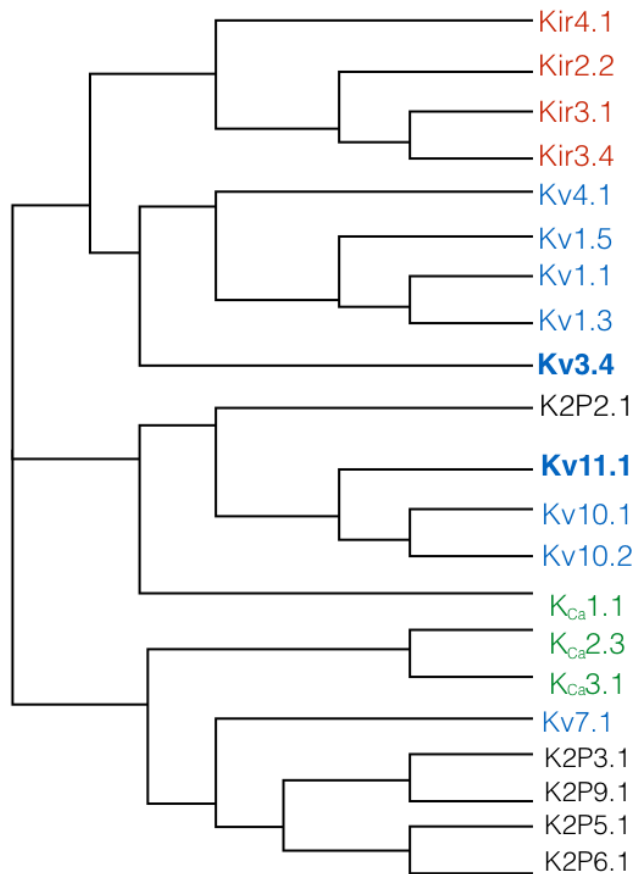


Figura 12: Dendrograma filogenético representando los canales de potasio relacionados con el cáncer. Existen canales de cada una de las familias de canales de potasio implicados en la carcinogénesis. (Adaptado de Huang y cols.¹³)

Tabla 5: Expresión de los canales de potasio implicados en el cáncer. Los cuadros rojos representan los tumores donde se ha observado sobreexpresión de los canales de potasio favoreciendo la proliferación, la migración celular o las metástasis, como HERG1 en carcinomas de cabeza y cuello (C y C). Los cuadros verdes representan los canales cuya expresión esta relacionada de manera inversa con la malignidad y la agresividad clínica como el KCNA5 en el glioma o en el linfoma o el KCNQ1 en el cáncer colorrectal. El cuadro azul representa la presencia de mutaciones somáticas recurrentes en el gen KCNJ5 en los adenomas suprarrenales. (Adaptado de Huang y cols.¹³)

Tipo de cáncer	Gen de canal																					
	Kv 1.1 KCNA1	Kv 1.3 KCNA3	Kv 1.5 KCNA5	Kv 3.4 KCNA4	Kv 4.1 KCNQ1	Kv 7.1 KCNQ2	Kv 10.1 KCNH1	Kv 10.2 KCNH5	Kv 11.1 KCNH2	KCa 1.1 KCNMA1	KCa 2.3 SK3	KCa 3.1 K1	Kir 2.2 KCNJ12	Kir 3.1 KCNJ3	Kir 3.4 KCNJ5	Kir 4.1 KCNJ10	Kir 6.1 KCNJ8	Kir 6.2 KCNJ11	K2P 2.1 KCNK2	K2P 3.1 KCNK3	K2P 5.1 KCNK5	K2P 9.1 KCNK9
Adrenal															Blue					Red		
Sangre			Green				Red		Red													
Hueso			Grey				Red		Red													
Cerebro	Red		Green					Red	Red	Red		Red				Red	Red	Red				Red
Mama		Red			Red		Red		Red	Red	Red	Red	Red									
Cervix							Red		Red													Red
Gastroint.					Red	Green	Red		Red		Red	Red	Red									
C y C				Red			Red		Red													
Riñón							Red		Red													Red
Pulmón		Red							Red					Red								
Linfoma		Red							Red													Red
Melanoma									Red	Red	Red						Red	Red				
Ovario							Red		Red	Red							Red	Red				
Pancreas		Red					Red							Red								
Próstata		Red								Red		Red	Red						Red			
Sarcoma							Red															
Tiroides									Red													
Utero																	Red	Red				

La cuestión que surge a continuación es si la desregulación de la expresión de los canales de potasio (fundamentalmente la sobreexpresión) inicia la tumorigenesis, confiere ventajas para el crecimiento de neoplasias malignas o para su diseminación metastásica o, simplemente, esa expresión anómala es consecuencia de una transformación neoplásica sin un significado funcional. Dos canales de potasio han mostrado capacidad tumorigénica cuando son expresados de forma ectópica en sistemas heterólogos. Así, por ejemplo, es posible inducir el crecimiento tumoral agresivo transfectando EAG1 en células de ovario de hámster chino (CHO)¹¹¹. Esto también es posible mediante la inducción retroviral de la expresión de KCNK9 en células normales de glándula mamaria en ratones y en células embrionarias de ratón¹¹⁰. Sin embargo, estas células ya poseen un potencial proliferativo ilimitado en cultivos. Considerando el hecho de que la inhibición farmacológica o la supresión genética de los canales de potasio reduce el crecimiento en varios tipos de cáncer^{112,113}, es posible que la mayoría de los canales de potasio tengan un papel permisivo funcionando básicamente como reguladores esenciales para varias funciones celulares de células malignas, como la proliferación y la migración, y su sobrerregulación provee un repertorio suficiente para la actividad del canal cuando es necesario.

A pesar de que en la mayoría de los casos la expresión de los canales de potasio es mayor en el tejido neoplásico que en el normal adyacente, la expresión baja del canal KCNQ1 está significativamente asociada con una pobre supervivencia en pacientes con cáncer colorrectal¹¹⁴. De manera consistente, se observó que la pérdida de expresión de KCNQ1 en un modelo animal de tumor intestinal en ratones, supuso una mayor agresividad del cáncer¹¹⁴, lo que sugiere que KCNQ1 podría actuar como supresor tumoral.

La desregulación de la expresión de los canales de potasio se ha detectado a niveles genómicos, transcripcionales, post-traduccionales y epigenéticos. Por ejemplo, KCNK9 está amplificado de 3 a 10 veces en el 10% de los cánceres de mama¹¹⁰, y la amplificación genómica de EAG1 fue hallada en el 10% de los carcinomas de cabeza y cuello¹¹⁵. Otro estudio mostró como el silenciado epigenético de la expresión de HERG por hipermetilación es un marcador de buen pronóstico en el carcinoma de células claras ovárico, lo que es consistente con la noción de que este canal promueve el crecimiento maligno tumoral¹¹⁶.

Los canales de potasio en la proliferación y el crecimiento tumoral.

La implicación de los canales de potasio en la proliferación celular fue descrita por primera vez en el trabajo pionero de DeCoursey¹⁴ quien demostró que los canales de potasio activados por voltaje son los canales predominantes en los linfocitos T proliferativos. Observó que la aplicación de un factor mitogénico promovía la apertura de canales a un potencial de membrana más negativo, y la utilización de bloqueadores de los canales inhibía la síntesis de ADN.

Este descubrimiento incitó nuevas investigaciones sobre la fisiología de los canales de potasio durante la progresión del ciclo celular. De hecho, estudios iniciales en oocitos de ratón no fertilizados mostraron que los canales de potasio de gran conductancia están activados durante la fase M y G1 y se inactivan en la fase S y G2. Esta modulación de la actividad de la actividad del canal es independiente de la síntesis de proteínas específicas del ciclo celular. Resulta interesante que la actividad regulada

del canal de potasio está correlacionada con una oscilación del potencial de membrana, en la que la célula está más despolarizada en S y G2¹¹⁷. Desde entonces, la expresión, localización y actividad de los canales de potasio dependientes de la fase del ciclo celular han sido encontradas en múltiples tipos celulares^{118,119}, lo que sugiere que podría ser un fenómeno general que acompaña a la proliferación. A la pregunta de cómo regulan los canales de potasio la progresión del ciclo celular, la evidencia actual ha llevado a proponer cuatro mecanismos principales:

1. Configurando la oscilación del potencial de membrana

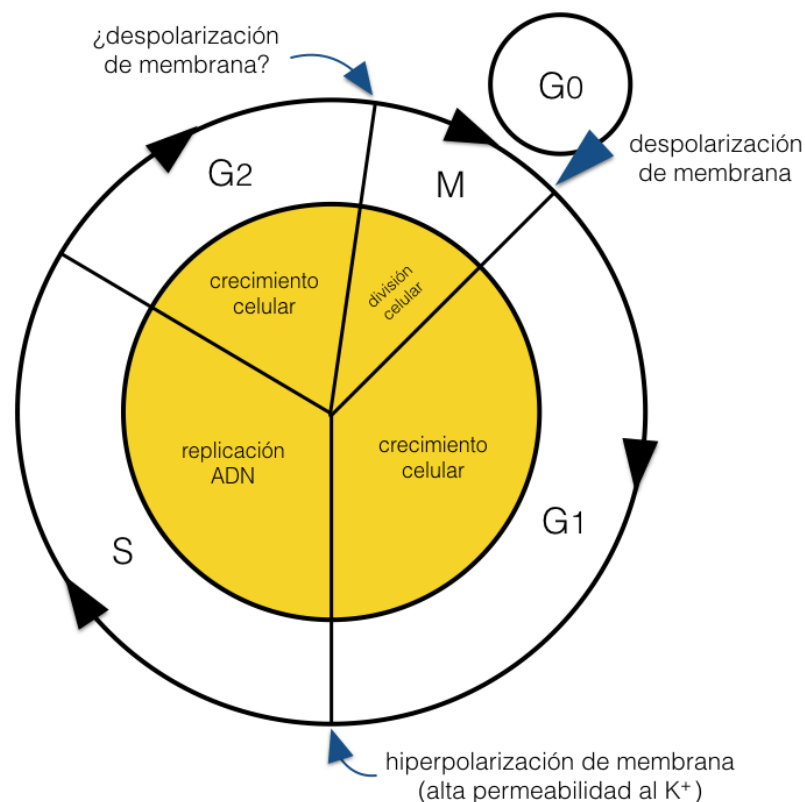


Figura 13: La oscilación en el potencial de membrana ha sido observada en numerosos tipos celulares proliferantes. Una hiperpolarización transitoria en la transición G1-S está acompañada de una actividad aumentada de los canales de potasio. La despolarización puede inducir la actividad mitótica en varios tipos celulares diferenciados. También se ha observado una despolarización transitoria en la transición G2-M, sin embargo, en el momento actual no está claro el papel de los canales de potasio en esta despolarización ni su relevancia fisiológica. (Adaptado de Huang y cols.¹³)

2. Controlando la dinámica del volumen celular

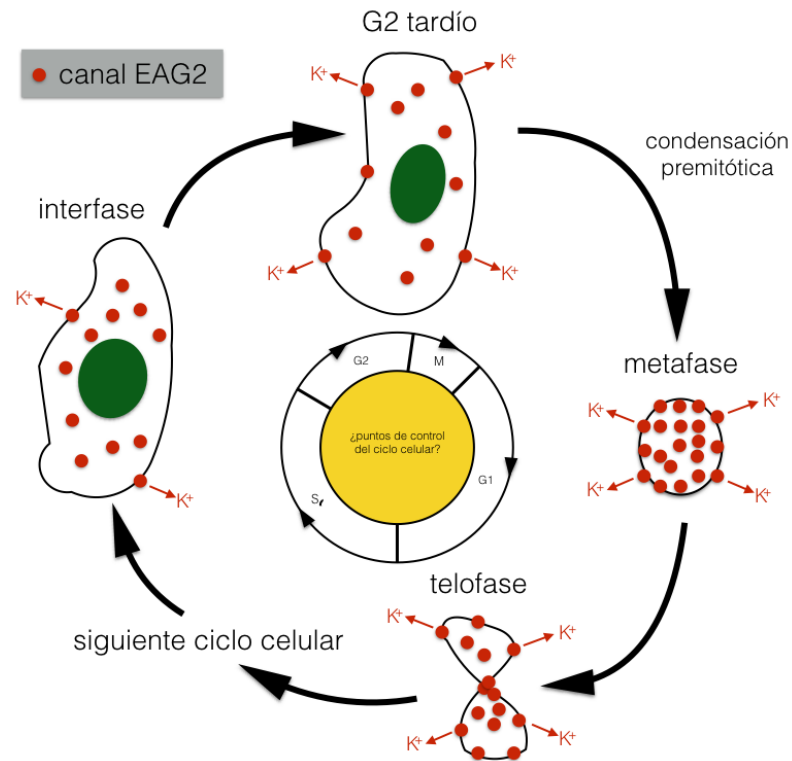


Figura 14: Los canales de potasio pueden regular la proliferación celular mediante el control del volumen de la célula durante el ciclo celular. Por ejemplo, el canal sensible al voltaje EAG2 tiene una localización específica en la membrana dependiente de la fase del ciclo celular. EAG2 se localiza a nivel intracelular durante la interfase pero aumenta su expresión a nivel de la membrana durante la fase G2 tardía y la mitosis. Este aumento de la expresión de EAG2 a nivel de la membrana promueve un flujo eferente de potasio para la condensación premitótica que es esencial para la entrada en mitosis, así como regula la morfología celular durante la mitosis para una progresión exitosa del ciclo celular. (Adaptado de Huang y cols.¹³)

3. Regulando la señalización de calcio

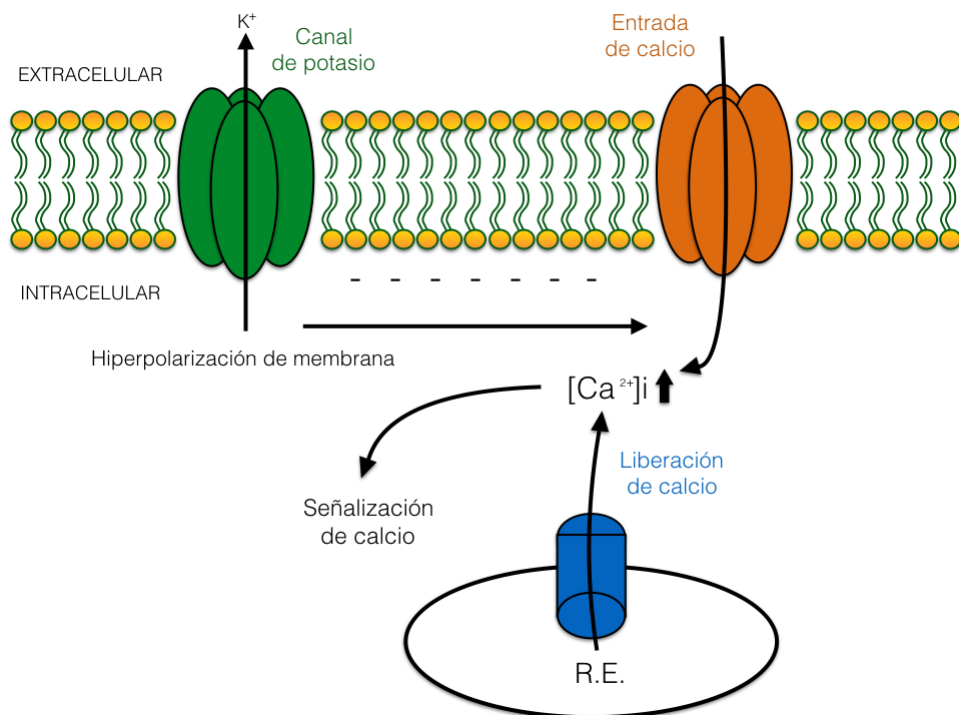


Figura 15: El flujo hacia el compartimento extracelular de potasio a través de los canales específicos puede llevar a una hiperpolarización de membrana, que incrementa el flujo de calcio al interior celular a través de canales permeables al calcio localizados en la membrana. Esta entrada de calcio puede disparar la liberación de calcio desde depósitos intracelulares y el aumento de la concentración de calcio intracelular puede provocar la señalización dependiente de calcio y promover la proliferación celular. (Adaptado de Huang y cols.¹³)

4. Promoviendo el crecimiento por vías no canónicas independientes de la permeabilidad a iones.

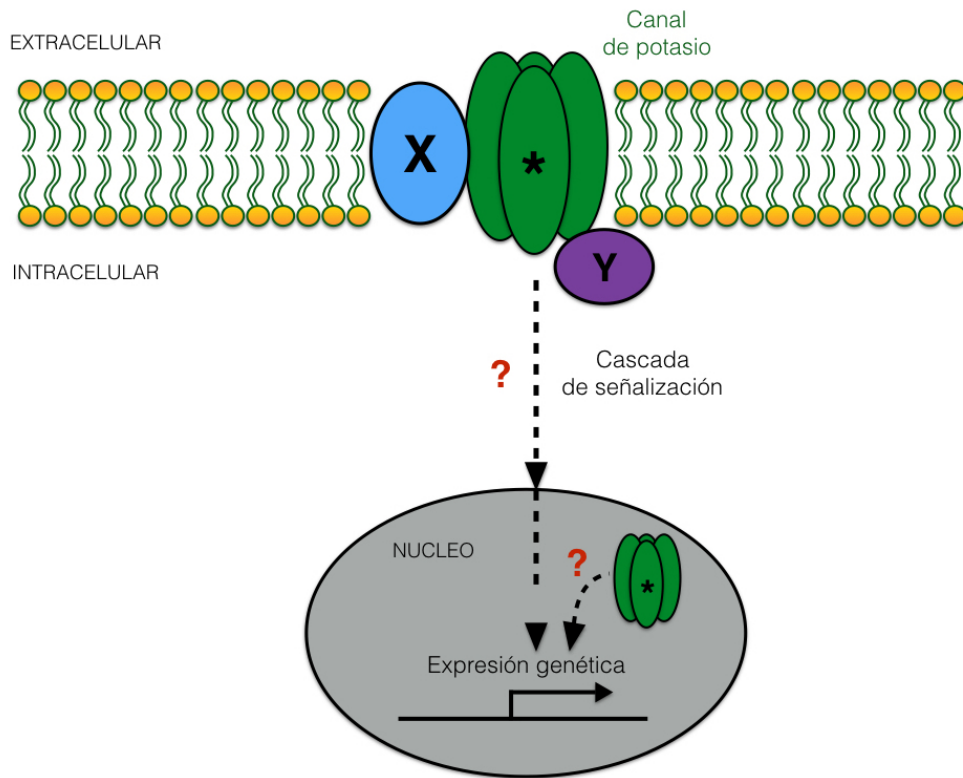


Figura 16: Los canales de potasio pueden regular la proliferación celular por vías no canónicas independientes de su permeabilidad a los iones de potasio (representado por el canal con un asterisco). El canal de potasio puede interactuar con proteínas de membrana (X) o intracelulares (Y) para iniciar la cascada de señalización. Por otra parte, canales de potasio que han perdido parte de sus dominios podrían entrar en el núcleo para modular la función celular⁹⁶. La manera en la que los canales de potasio llevan a cabo sus funciones no canónicas para regular la proliferación celular es desconocida. (Adaptado de Huang y cols.¹³)

Los canales de potasio en la migración celular y las metástasis.

Las metástasis ocasionan el 90% de las muertes por cáncer¹²⁰. La cascada metastásica es un proceso con múltiples pasos que comprenden la movilización de células tumorales primarias por migración, invasión de regiones adyacentes no tumorales, entrada en el torrente circulatorio, salida hacia los lugares secundarios donde se van a establecer las metástasis y, finalmente, la colonización de los mismos. Como primer paso, la migración celular tiene un papel integral en la metástasis, y dicta el éxito de la diseminación maligna. Las células migratorias son polarizadas con lamellipodios móviles en la vanguardia y con contractilidad del cuerpo celular en la retaguardia. La movilidad celular depende de manera crítica de la regulación dinámica del volumen. Existen cambios locales volumétricos durante la migración celular, incrementando en la vanguardia con la protusión de los lamellipodios y disminuyendo en la retaguardia mediante retracción. Las funciones mejor caracterizadas de los canales de potasio para facilitar la migración es la capacidad de realizar modificaciones volumétricas mediante su influencia en el flujo de potasio. Los canales de potasio también pueden regular la migración celular en el cáncer mediante funciones no canónicas. El mejor ejemplo lo constituye el canal HERG, que puede formar una macromolécula con VEGFR-1 y beta1-integrilina. El ensamblaje de este complejo proteico confiere un fenotipo pro-migratorio en la leucemia, lo que puede ser inhibido mediante la aplicación de un bloqueante de canales HERG. En ese sentido, la expresión de HERG en pacientes con leucemia esta asociado con una mayor probabilidad de recaída y una disminución de la supervivencia¹²¹.

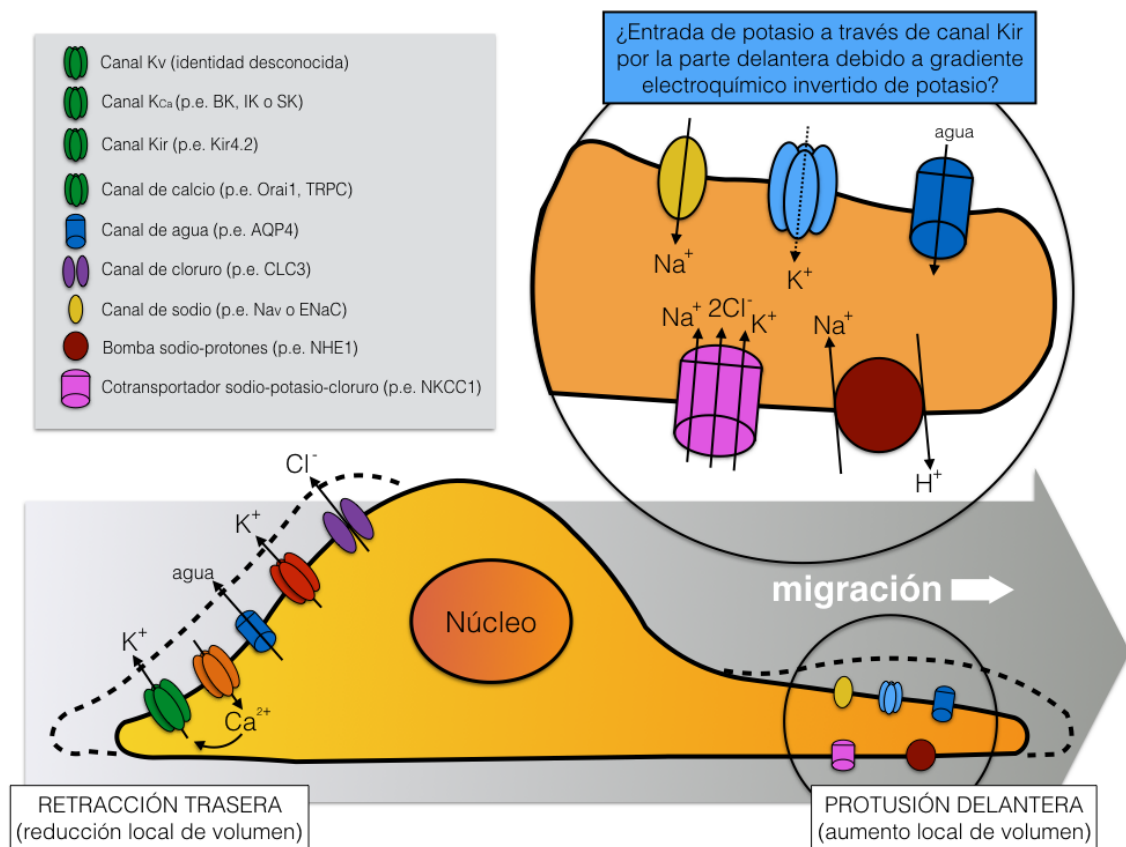


Figura 17: Los cambios locales en el volumen celular y, con ellos, la migración de la célula son llevados a cabo mediante flujos polarizados de iones y agua. La migración celular está caracterizada por procesos moleculares y celulares polarizados que ocasionan una protusión en el borde delantero (por aumento del volumen local) y una retracción en el borde trasero (por disminución del volumen local). La entrada de iones y agua en el borde delantero y la salida de los mismos en el borde posterior son los responsables de estos cambios hidrodinámicos, debido a la localización polarizada de diversos transportadores y canales iónicos durante la migración celular. En el borde posterior, la entrada de calcio por canales específicos puede activar los canales de potasio sensibles al calcio y promover la salida de potasio al medio extracelular. La apertura de los canales de cloruro mantiene la electroneutralidad y fomenta la salida de iones, que es seguido de la salida de agua por las acuaporinas. En el borde delantero, un surtido de canales con flujo hacia el medio intracelular, como canales de sodio activados por voltaje (Nav), canales de sodio epiteliales (ENaC), transportadores como intercambiadores de sodio y protones (NHE1), o cotransportadores de sodio, potasio y cloruro (NKCC1) junto con las acuaporinas, regulan el influjo de agua e iones. Este aumento de iones y agua en el medio intracelular conlleva un aumento de volumen y, con él, la protusión del lamelipodio en el borde delantero. La salida de protones y la acidificación subsiguiente del medio extracelular mediante el NHE1 puede facilitar la degradación de proteínas de la matriz extracelular y la promover la invasión celular. (Adaptado de Huang y cols.¹³)

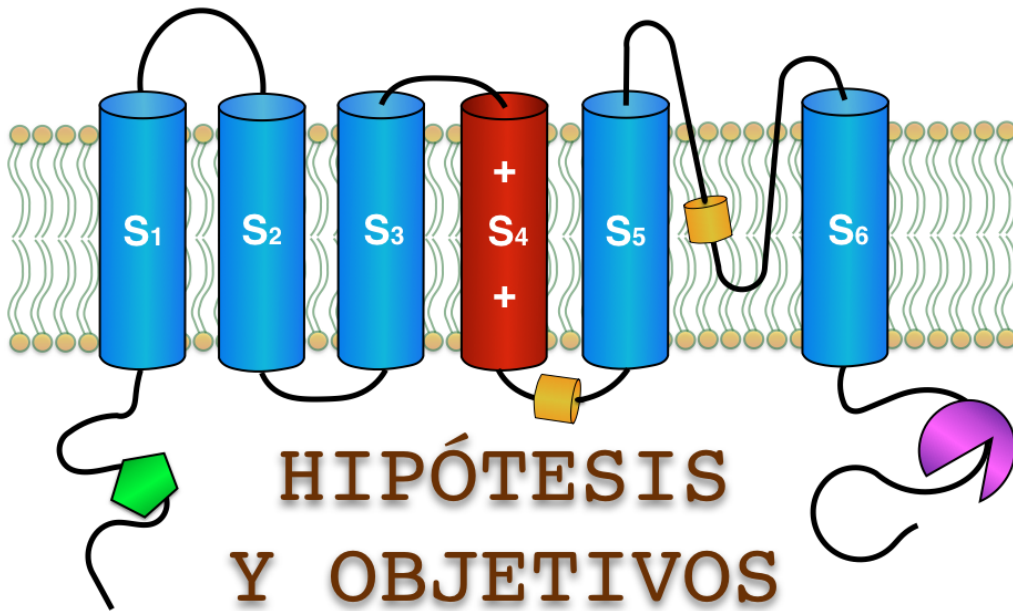
Los canales de potasio como dianas terapéuticas

A pesar de que se han realizado con éxito tratamientos de diabetes, hipertensión, epilepsia y arritmias cardíacas teniendo como objetivos los canales KATP, KCNQ y HERG, el tratamiento del cáncer mediante el uso de compuestos con diana en los canales iónicos se encuentra aún en estadios iniciales.

La inhibición farmacológica de los canales HERG reduce la proliferación y entorpece la invasividad en varios tipos de células cancerosas¹²². El canal HERG media la fase de repolarización del potencial de acción cardíaco, con lo que habría que tenerlo en cuenta a la hora de tratar humanos para no producir arritmias potencialmente fatales como el síndrome de QT largo.

La utilización de anticuerpos monoclonales contra proteínas de superficie ha demostrado su efectividad en diferentes tipos de cáncer. La utilización de anticuerpos monoclonales altamente específicos contra EAG1 ha mostrado actividad antitumoral en ratones¹²³ y podrían ser utilizados en conjunción con agentes citotóxicos para la eliminación de células tumorales que expresan EAG1¹²⁴.

Un volumen importante de evidencia sugiere que la desregulación de los canales de potasio está asociado con factores cruciales del cáncer, y que establecer dichos canales como objetivo terapéutico puede ser un tratamiento viable y efectivo.



HIPÓTESIS

En la génesis del carcinoma oral de células escamosas (COCE) intervienen diversas alteraciones a nivel genético, transcripcional, post-traduccional y epigenético que desembocan en una proliferación celular incontrolada. Se ha observado que la existencia de una desregulación de los canales de potasio en diversos tipos de cáncer, favorece el desarrollo y la progresión tumoral así como la migración celular y las metástasis. El conocimiento de los mecanismos que desembocan en la alteración de la regulación de dichos canales podría aportar información de gran utilidad para el diagnóstico precoz, la orientación pronóstica y tratamiento del COCE.

Las cuestiones sobre las que se fomenta el presente estudio son las siguientes:

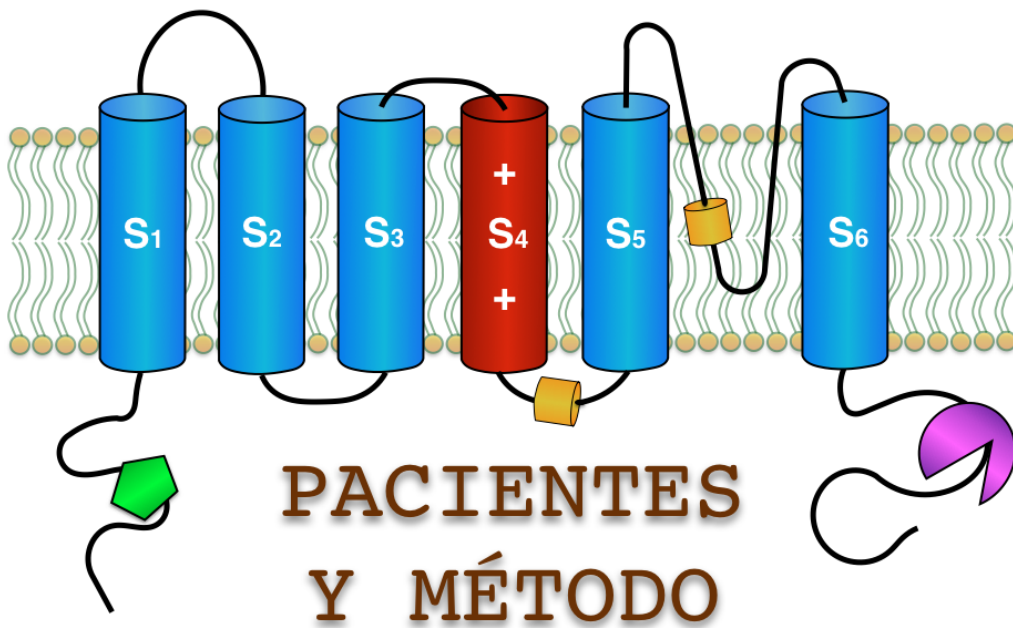
- ¿Son las alteraciones moleculares a nivel de los canales de potasio un evento más precoz en la cronología del COCE que las histológicas?
- ¿Podría el análisis inmunohistoquímico de los canales de potasio constituir una herramienta más eficaz para el diagnóstico y tratamiento tanto de trastornos orales potencialmente cancerizables como del carcinoma oral de células escamosas que las tradicionales variables clínicas e histológicas?

OBJETIVOS

El objetivo principal de este estudio es investigar el papel de los canales de potasio sensibles al voltaje HERG1 y Kv3.4 en el desarrollo y progresión del COCE así como su relevancia en la transformación maligna de los TOPC y su influencia sobre el pronóstico en el COCE.

Para esta investigación se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar la expresión de HERG1 y Kv3.4 en los trastornos orales potencialmente cancerizables (TOPC).
2. Evaluar la potencial asociación entre la expresión proteica de HERG1 y Kv3.4 mediante inmunohistoquímica y la transformación maligna de los TOPC.
3. Estudiar la expresión de HERG1 y Kv3.4 en los COCE.
4. Analizar la posible asociación entre la expresión HERG1 y Kv3.4 y las variables clinicopatológicas relevantes.
5. Evaluar el valor pronóstico de la expresión de HERG1 y Kv3.4 en los COCE.



PACIENTES Y MÉTODO

1. SELECCIÓN DE PACIENTES

Para la realización del presente estudio se seleccionaron dos cohortes de pacientes. Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética Institucional del Hospital Universitario Central de Asturias (aprobado el 9 de Julio de 2013) y por el Comité Ético de Investigación Clínica Regional del Principado de Asturias (aprobado el 18 de Julio de 2013 - número de aprobación: 81/2013) para el proyecto PI13/00259. A todos los pacientes se les entregó un consentimiento informado.

- I) Cohorte prospectiva de pacientes diagnosticados de trastornos orales potencialmente cancerizables (TOPC)
- II) Cohorte “retrospectiva” de pacientes diagnosticados de carcinoma de células escamosas de la cavidad oral (COCE)

TRASTORNOS ORALES POTENCIALMENTE CANCERIZABLES

Se obtuvieron de manera prospectiva muestras tisulares de 62 pacientes con trastornos orales potencialmente cancerizables de la cavidad oral tratados quirúrgicamente en el Hospital Universitario Central de Asturias.

Los pacientes con TOPC incluidos en este estudio cumplieron los siguientes criterios de inclusión:

- Lesiones orales clínicamente compatibles con leucoplasia o eritroplasia.
- Diagnóstico patológico de hiperplasia epitelial oral o displasia
- Ausencia de historia previa de cáncer en la cabeza y el cuello
- Biopsia escisional completa de la lesión

En los pacientes con múltiples biopsias, fueron seleccionadas las primeras en orden cronológico en las que histológicamente se demostró la presencia de displasia.

Las muestras tisulares escogidas para la tinción fueron obtenidas de bloques parafinados archivados. La totalidad de la sección tisular del bloque de biopsia utilizado para el diagnóstico histológico fue subsiguientemente teñido y evaluado

El seguimiento de los pacientes fue realizado según el siguiente protocolo: cada dos meses durante los primeros 6 meses tras el diagnóstico, cada tres meses hasta el segundo año y posteriormente cada 6 meses hasta el final del estudio.

Los pacientes fueron revisados durante un mínimo de 5 años o hasta que existió progresión a malignidad.

CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS

Se incluyeron 100 pacientes de manera retrospectiva diagnosticados de carcinoma oral de células escamosas e intervenidos quirúrgicamente en el Hospital Universitario Central de Asturias en el periodo comprendido entre 1995 y 2006 con los siguientes criterios de exclusión:

- Falta de documentación en la historia clínica
- Insuficiencia de material histológico almacenado para el estudio
- No realización de disección cervical, por contraindicación para la anestesia general o por tratamiento mediante la técnica del ganglio centinela
- Historia previa de carcinomas escamosos en cabeza y cuello
- Tratamiento previo con quimio o radioterapia en la región cervicofacial.

Las muestras tisulares escogidas para la tinción fueron obtenidas de bloques parafinados archivados. Se seleccionó para la tinción una sección representativa del tumor que incluyese el borde tumoral (conteniendo la interfase entre los nidos tumorales, cordones o láminas con el estroma) y tejido epitelial adyacente normal.

El grado histológico fue determinado según el grado de diferenciación del tumor (clasificación de Broder). Todos los pacientes fueron tratados con intención curativa y 42 (42%) de ellos fueron sometidos a radioterapia complementaria, recibiendo entre 40 y 70 Gy, de acuerdo a las siguientes indicaciones: T4, tumores mal diferenciados, márgenes positivos y metástasis cervicales. Los márgenes fueron libres de tumor en 90 de los 100 casos. La supervivencia libre de recurrencia y la supervivencia de los

pacientes fueron recogidas en cada caso. Al final del estudio 49 pacientes (49%) habían fallecido por recurrencia tumoral y 41 casos (41%) estaban vivos y libres de recurrencia. Diez casos fueron perdidos durante el seguimiento.

Los pacientes fueron sometidos a seguimiento según el protocolo establecido durante un mínimo de 5 años. Las revisiones fueron realizadas cada dos meses los 6 primeros meses, seguidamente en intervalos de 3 meses hasta los dos años y cada 6 meses desde entonces.

2. VARIABLES ANALIZADAS

En todos los pacientes analizados fueron recogidas las siguientes variables:

Tabla 6: Variables demográficas y de hábitos tóxicos recogidas en los pacientes del estudio.

DEMOGRÁFICAS	
<ul style="list-style-type: none">• Edad• Sexo	
HÁBITOS TÓXICOS	
<ul style="list-style-type: none">• Tabaco	<ul style="list-style-type: none">• El consumo de tabaco fue registrado en número de cigarrillos por día así como años de consumo• Se consideraron como ex-fumadores aquellos pacientes en los que había transcurrido al menos dos años tras el abandono del hábito
<ul style="list-style-type: none">• Alcohol	<ul style="list-style-type: none">• El consumo de alcohol fue descrito en términos de consumo de cerveza, vino o licores.• Los pacientes definidos como bebedores lo fueron en cuanto consumiesen cuatro o más bebidas alcohólicas al día durante al menos 10 años.• Para poder establecer comparaciones, una bebida es equivalente a 14g de etanol, que generalmente corresponde con 330ml de cerveza, 150ml de vino o 36ml de licores.

TRASTORNOS ORALES POTENCIALMENTE CANCERIZABLES

Tabla 7: Variables recogidas en los pacientes con TOPC.

HISTOLOGÍA

(según criterios de la OMS)

- Hiperplasia
- Displasia leve
- Displasia moderada
- Displasia grave o carcinoma *in situ*

EVOLUCIÓN

- Sin progresión
- Progresión a carcinoma de células escamosas infiltrante
- Evolución a carcinoma verrucoso

TIEMPO DE SEGUIMIENTO

CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS

Tabla 8: Variables recogidas en los pacientes con COCE.

CLÍNICA	
<ul style="list-style-type: none">• Localización	<ul style="list-style-type: none">• Lengua• Suelo de boca• Mucosa yugal• Paladar• Encía• Trígono retromolar/orofaringe
<ul style="list-style-type: none">• Tamaño de la lesión (T)• Metástasis en ganglios cervicales (N)• Metástasis a distancia (M)• Estadío tumoral• Infiltración de tejido óseo• Tipo de reconstrucción del defecto	
<ul style="list-style-type: none">• Recidiva (número y localización)	<ul style="list-style-type: none">• Local• Regional• A distancia
<ul style="list-style-type: none">• Tratamiento complementario con radioterapia• Tratamiento complementario con quimioterapia	
<ul style="list-style-type: none">• Estado tras seguimiento	<ul style="list-style-type: none">• Vivo libre de enfermedad• Muerto por enfermedad o recidiva no tratable• Perdido o muerto por otra causa
HISTOLOGÍA	
<ul style="list-style-type: none">• Diferenciación histológica	<ul style="list-style-type: none">• Bien diferenciado• Moderadamente diferenciado• Mal diferenciado
<ul style="list-style-type: none">• Bordes de resección	<ul style="list-style-type: none">• Se consideraron positivos si:<ul style="list-style-type: none">- Márgenes afectados- Distancia al margen menor de 1mm
TIEMPO DE SEGUIMIENTO	

Tabla 9: Clasificación TNM del American Joint Committee on Cancer¹²⁵

TAMAÑO DEL TUMOR PRIMARIO (T)	
Tx	Tumor primario no puede ser valorado
T0	No existe evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Lesión menor de 2 cm en su diámetro máximo
T2	Lesión mayor de 2 cm y menor de 4 cm en su diámetro máximo
T3	Lesión de más de 4 cm en su diámetro máximo
T4	Lesión que invade estructuras adyacentes (hueso, piel, músculos extrínsecos)

GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES (N)		
Nx	Adenopatía cervical no valorable	
N0	Sin adenopatías cervicales clínicamente positivas	
N1	Un ganglio homolateral positivo de 3 cm o menos de diámetro	
N2	N2a	Un ganglio homolateral positivo mayor de 3cm y menor de 6cm de diámetro
	N2b	Múltiples ganglios homolaterales positivos menores de 6cm de diámetro
	N2c	Ganglios bilaterales o contralaterales positivos, menores de 6cm de diámetro
N3	Uno o más ganglios positivos mayores de 6cm de diámetro	

METASTASIS A DISTANCIA (M)	
Mx	Metástasis a distancia no valorables
M0	No existe metástasis a distancia
M1	Existe metástasis a distancia

Tabla 10: Estadiaje TNM del American Joint Committee on Cancer¹²⁵.

ESTADIOS	T	N	M
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio I	T1	N0	M0
Estadio II	T2	N0	M0
Estadio III	T3	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
Estadio IVA	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	Cualquier T	N2	M0
Estadio IVB	Cualquier T	N3	M0
Estadio IVC	Cualquier T	Cualquier N	M1

3. MUESTRAS HISTOLÓGICAS, ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO y DE ARNm

Se obtuvieron muestras representativas de las lesiones conservadas en bloques parafinados en el archivo anatomopatológico del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA)

En los TOPC se distinguieron cuatro categorías: hiperplasia o displasia leve, displasia moderada o displasia grave, según la clasificación de la OMS. En los casos en los que existió una progresión a carcinoma de células escamosas se obtuvieron asimismo muestras representativas de tejido tumoral.

Como control negativo, se utilizó mucosa oral de pacientes sanos procedente de la extirpación de terceros molares no erupcionados previo consentimiento informado del paciente.

En las muestras de COCE, procedentes del archivo anatomopatológico del HUCA en bloques parafinados, fueron valorados la diferenciación tumoral y la proximidad de los bordes de resección. Al no estar recogidos de manera uniforme en todos los pacientes, la profundidad tumoral, el patrón de invasión o la presencia de infiltración perineural no pudieron ser tenidos en cuenta.

Para el análisis de ARNm, las muestras de cuatro pacientes tratados quirúrgicamente de COCE en el Hospital Universitario Central de Asturias fueron recogidas de manera prospectiva. Las biopsias fueron extirpadas, depositadas en tubos estériles y congeladas a -80°C en solución estabilizadora RNAlater. Dieciocho muestras de tejido de CECC tratado quirúrgicamente congeladas en fresco fueron obtenidas del biobanco del

hospital así como también fueron recogidas muestras de tejido de pacientes no oncológicos.

Técnica de Inmunohistoquímica

HERG1

Los tejidos fijados en formalina y parafinados fueron cortados en secciones de 3µm y secados en láminas portaobjetos Flex IHC (Dako). Las secciones fueron desparafinadas con xileno estándar e hidratadas mediante concentraciones graduales decrecientes de alcohol.

El desenmascaramiento antigénico fue realizado utilizando Envision Flex Target Retrieval Solution a pH alto (Dako). La tinción se llevó a cabo a temperatura ambiente en una estación de trabajo automática (Dako Autostainer Plus) con anticuerpo primario policlonal de conejo anti-HERG1 (CT) (pan) (Enzo Life Sciences) a una dilución de 1:200 empleando el sistema de visualización Dako Envision Flex + (Dako Autostainer).

El paso final fue la contratinción con hematoxilina durante 8 minutos.

Tras la tinción, las preparaciones fueron deshidratadas mediante el empleo de alcoholes de graduación creciente y montadas con cubreobjetos según el método estándar.

Kv3.4

Los tejidos fijados en formalina y parafinados fueron cortados en secciones de 4µm y secados en láminas portaobjetos Flex IHC (Dako). Las secciones

fueron desparafinadas con xileno estándar e hidratadas mediante concentraciones graduales decrecientes de alcohol.

El desenmascaramiento antigénico fue realizado utilizando Envision Flex Target Retrieval Solution a pH alto (Dako). La tinción fue llevada a cabo a temperatura ambiente en una estación de trabajo automática (Dako Autostainer Plus) con anticuerpo primario policlonal de conejo anti-Kv3.4 (Laboratorios Alomone Ltd, Jerusalem, Israel) a una dilución de 1:150 empleando el sistema de visualización Dako Envision Flex + (Dako Autostainer).

La contratinción con hematoxilina durante 8 minutos fue el paso final.

Tras la tinción, las preparaciones fueron deshidratadas mediante el empleo de alcoholes de graduación creciente y montadas con cubreobjetos según el método estándar.

PCR en tiempo real (RT-PCR)

Se obtuvo el ARN total utilizando reactivo TRIzol (Invitrogen Life Technologies) y el ADN complementario fue sintetizado con el sistema Superscript II RT-PCR (Invitrogen Life Technologies) de acuerdo a los protocolos del fabricante. La expresión génica fue analizada por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real empleando el sistema Applied Biosystems StepOnePlus siguiendo el protocolo de Applied Biosystems SYBR Green Master Mix. Las reacciones se llevaron a cabo usando cebadores específicos para HERG1 (correspondientes con los exones 5 y 6) y para el gen codificante del ribosoma L19 expresado de manera constitutiva como control interno¹²⁶. Las muestras fueron analizadas por triplicado y se incluyeron, asimismo, las plantillas en

blanco. La curva del análisis de disociación de todos los productos de PCR mostraron un único pico. La expresión relativa de ARNm fue calculada empleando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Los datos fueron expresados como el incremento en número de veces de niveles de ARNm de HERG1 en la muestra tumoral normalizados por niveles de L19 y relativos a la mucosa normal.

4. CUANTIFICACIÓN DE MARCADORES

HERG1

Como la tinción de HERG1 mostró un patrón homogéneo, se utilizó un sistema de valoración semicuantitativa basado en la intensidad de tinción. La inmunotinción fue valorada por dos observadores independientes ciegos a la información clínica como:

- negativa (0)
- débilmente positiva (1+)
- fuertemente positiva (2+).

Las discordancias puntuales fueron discutidas hasta llegar a un consenso.

Kv3.4

La expresión de Kv3.4 en el tejido muscular vascular sirvió como control positivo interno y la tinción fue abolida mediante preincubación del antisuero primario con el antígeno peptídico.

Como la tinción de Kv 3.4 mostró un patrón homogéneo, se utilizó un sistema de valoración semicuantitativa basado en la intensidad de tinción. La inmunotinción fue valorada por dos observadores independientes ciegos a la información clínica como:

- negativa (0)
- débilmente positiva (1+)
- fuertemente positiva (2+).

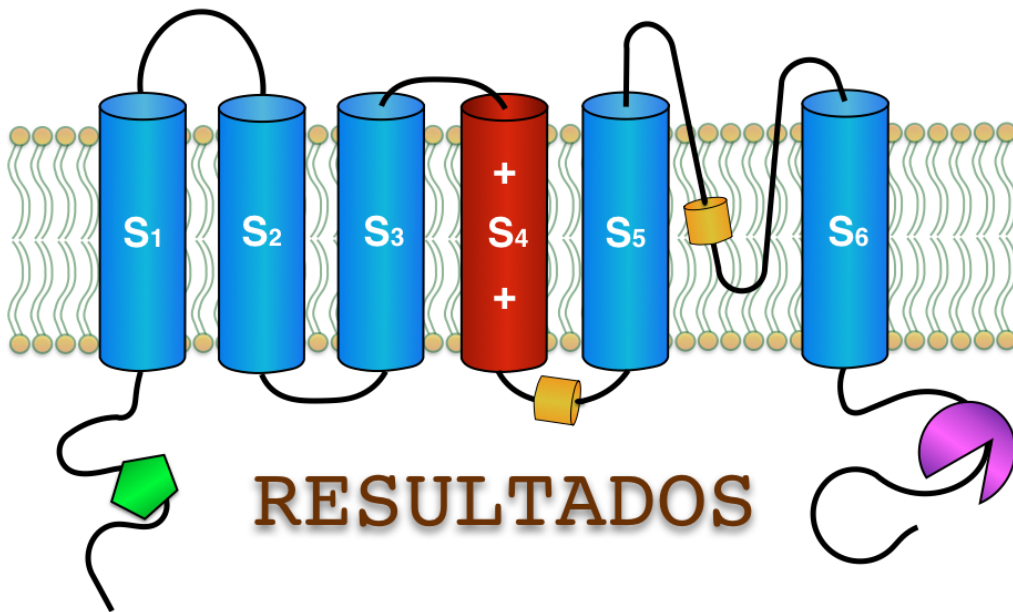
Las puntuaciones iguales a 2 fueron consideradas como expresión positiva de Kv3.4.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos categóricos fueron comparados usando χ^2 o prueba exacta de Fisher (cuando los efectivos esperados en alguna casilla eran menores de cinco).

La comparación entre los niveles de ARNm de HERG1 en los tumores y en la mucosa normal fue evaluada mediante la prueba t de Student.

Las curvas de supervivencia fueron calculadas utilizando el test de Kaplan Meier. Las diferencias entre los tiempos de supervivencia fueron analizados mediante el método de log-rank. Todos los test eran de doble cola (bilaterales) con valores de $p \leq 0,05$ como límite para ser considerados estadísticamente significativos. Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa informático PASW Statistics 18 (SPSS Inc, Chicago, Illinois, Estados Unidos de América).



RESULTADOS

1. TRASTORNOS ORALES POTENCIALMENTE CANCERIZABLES

A) Descripción de la muestra

La muestra de TOPC analizada en el presente estudio constaba de 62 pacientes, treintaicinco de los cuales eran mujeres y 27 varones. La edad media fue de 61,08 años (DS 12,44), con un rango entre 30 y 85 años.

El diagnóstico histológico de los trastornos orales potencialmente cancerizables fue de hiperplasia en 43 de los pacientes (69,3%), displasia leve en 8 (12,9%), displasia moderada en 7 (11,3%) y displasia grave en 4 (6,4%).

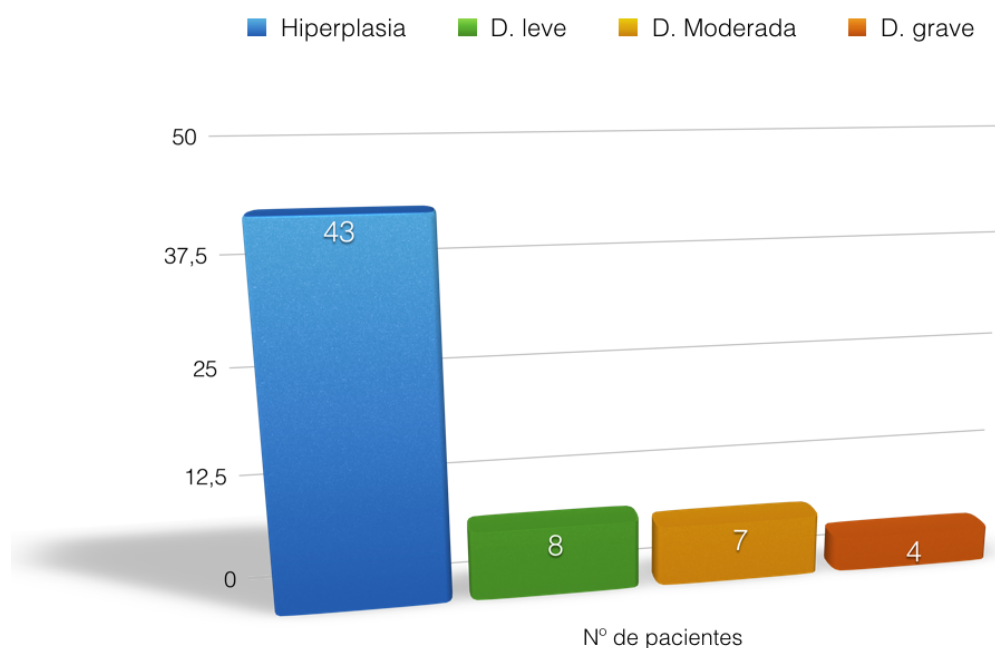


Figura 18: Clasificación de los TOPC en el análisis de HERG1 y Kv3.4

Durante el seguimiento, veintisiete (43%) de los TOPC sufrieron progresión a malignidad. En concreto, catorce (32,5%) de las lesiones hiperplásicas, 5 (62,5%) de las displasias leves, 5 (71,4%) de las displasias moderadas y 3 (75%) de las displasias graves, mostraron esta progresión.

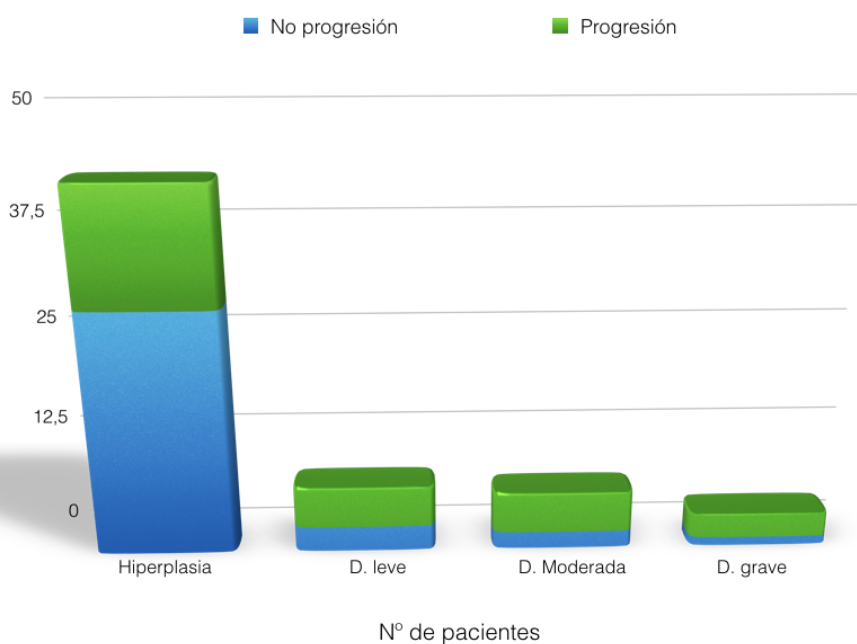


Figura 19: Progresión a COCE de pacientes diagnosticados de TOPC según el diagnóstico histológico inicial.

En cuanto a la localización de las TOPC, veintiocho (45,1%) de ellas se localizaron en la lengua, dos (3,2%) en el suelo oral, 12 (19,3%) en la encía, 4 (6,4%) en el paladar, 12 (19,3%) en la mucosa yugal, una (1,6%) en la orofaringe y 3 (4,8%) fueron multicéntricas.

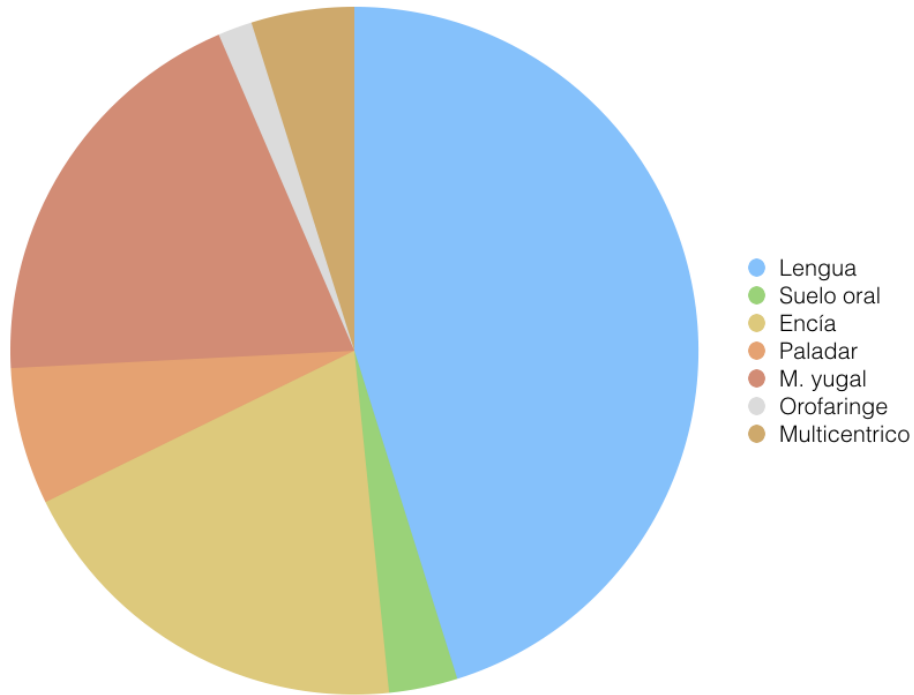


Figura 20: Localización de los TOPC

Con respecto al consumo de tabaco, en los casos sin progresión a malignidad, se hallaron 21 (60%) no fumadores, 11 (31,4%) fumadores y 3 (8,5%) exfumadores. En los casos con progresión 13 (48,1%) fueron no fumadores, 10 (37%) fumadores y 7 (25,9%) exfumadores.

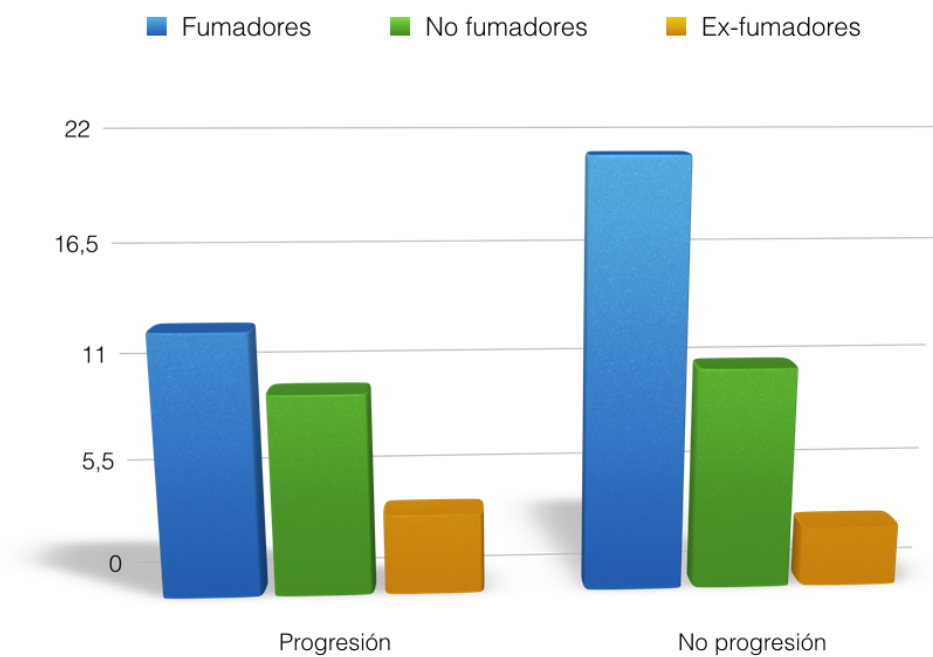


Figura 21: Consumo de tabaco en los pacientes con TOPC.

El consumo de alcohol tuvo la siguiente distribución: en pacientes en los que no existió progresión a carcinoma 30 (85%) no eran consumidores de alcohol, 5 (14,2%) eran bebedores y no se contabilizó ningún ex bebedor. En los casos con diagnóstico posterior de COCE 18 (66,6%) eran no bebedores, 5 (18,5%) bebedores habituales y 4 (14,8%) ex bebedores.

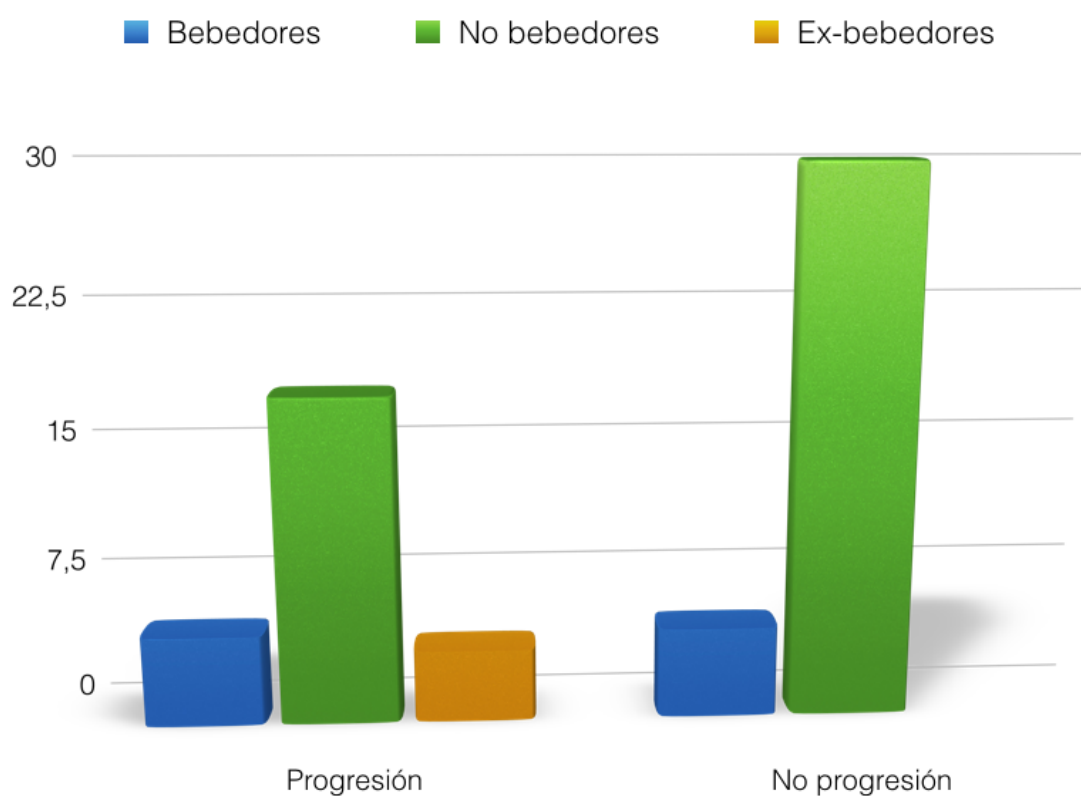


Figura 22: Consumo de alcohol en los pacientes con TOPC.

B) HERG1

La expresión proteica de HERG1 fue evaluada mediante inmunohistoquímica en 62 pacientes con trastornos potencialmente cancerizables de la cavidad oral (leucoplasias). En uno de los 62 casos la inmunohistoquímica no fue evaluable.

La expresión positiva de HERG1 fue detectada en 22 (36%) de las 62 leucoplasias orales, mientras que la tinción inmunohistoquímica fue inapreciable en las células estromales y en el epitelio adyacente.

La inmunotinción positiva para HERG1 fue observada en 14 (32%) de las 43 lesiones con hiperplasia, en 5 (62%) de las 8 lesiones con displasia leve y en 3 (30%) de las 10 lesiones con displasia moderada o grave ($p = 0,26$). Por tanto, el 32% de las leucoplasias con hiperplasia y el 44% de las lesiones con displasia ($p=0,37$) mostraron inmunotinción positiva para HERG1.

La evolución a carcinoma invasivo en relación con el diagnóstico histopatológico, consumo de tabaco o alcohol y la expresión proteica de HERG1 se muestra en la tabla 11.

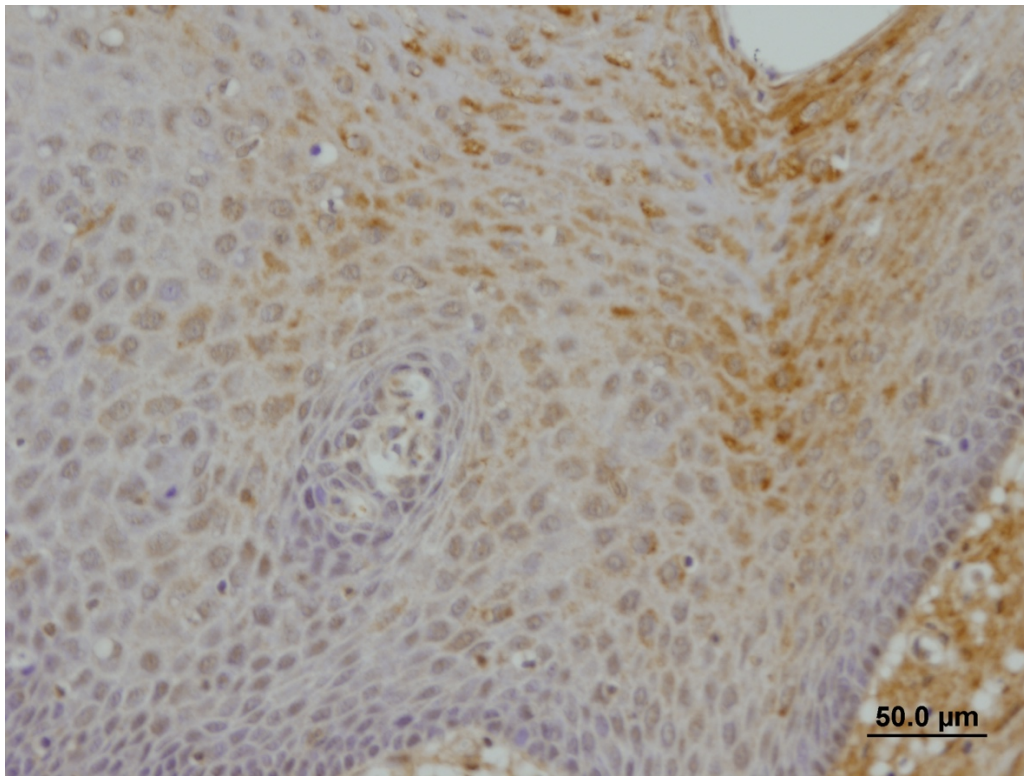


Figura 23: Trastorno oral potencialmente cancerizable con inmunotinción negativa (magnificación original x200)

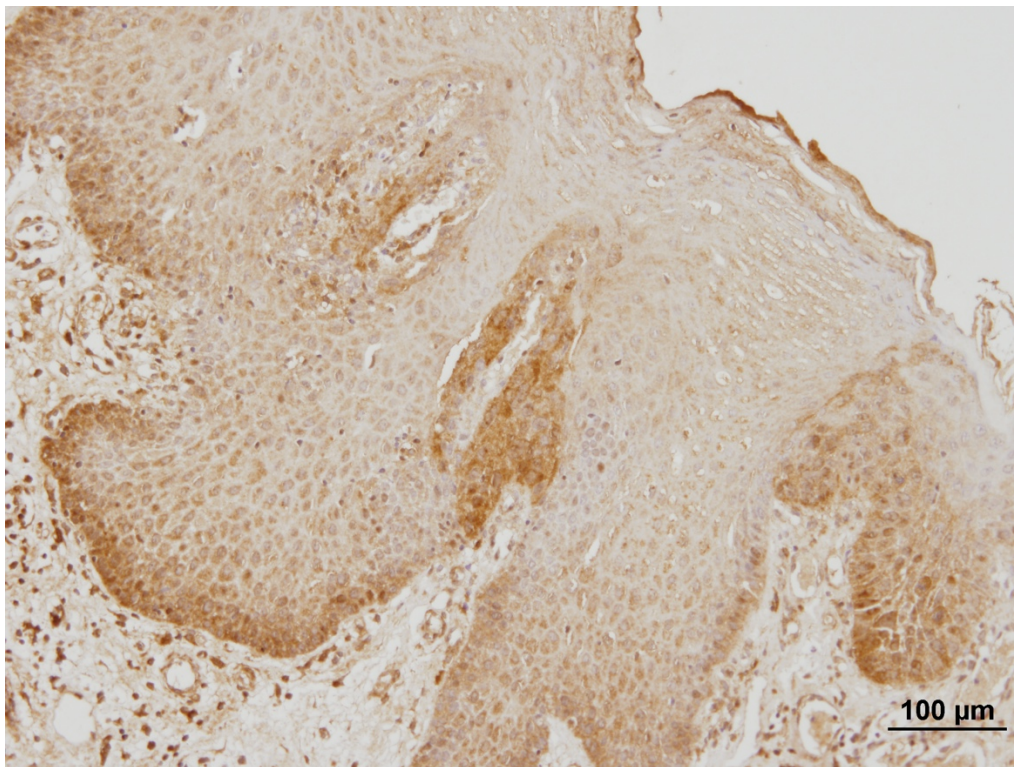


Figura 24: TOPC con tinción positiva para HERG1 (magnificación original x200)

Tabla 11: Evolución de los TOPC en relación con el diagnóstico histopatológico y la expresión de HERG1.

Característica	Número de casos (%)	Progresión a carcinoma (%)	p
Histopatología			
Hiperplasia	43 (69)	14 (32)	0,009
Displasia	19 (31)	13 (68)	
Expresión de HERG			
Negativa	39 (64)	18 (46)	0,45
Positiva	22 (36)	8 (36)	
Consumo de tabaco			
No	34 (55)	13 (38)	0,61
Si	21 (34)	10 (48)	
Ex-fumador	7 (11)	4 (57)	
Consumo de alcohol			
No	48 (77)	18 (37)	0,04
Si	10 (16)	5 (50)	
Ex-bebedor	4 (7)	4 (100)	

Durante el periodo de seguimiento, 27 (43,5%) de los 62 pacientes desarrollaron un carcinoma invasivo en el mismo sitio del TOPC previo. El tiempo medio para el diagnóstico de cáncer en los casos donde hubo progresión fue de 60,2 meses, siendo la mediana de tiempo 39 meses (rango 7-226 meses).

Existe asociación estadísticamente significativa entre la presencia de displasia epitelial o el consumo de alcohol y la progresión a COCE invasivo, pero no entre la expresión de HERG1 o el consumo de tabaco y dicha progresión. Así, 8 (36%) de 22 pacientes con TOPC positivos para HERG1 desarrollaron cáncer oral, comparadas con 18 (46%) de 39 pacientes que mostraron expresión negativa de HERG1.

C) Kv3.4

La expresión proteica de Kv3.4 fue también evaluada mediante inmunohistoquímica en 62 trastornos orales potencialmente cancerizables para determinar la cronología de expresión de Kv3.4 en la tumorigénesis de COCE.

En tres casos (4,8%) la inmunohistoquímica no fue evaluable (una lesión hiperplásica y dos displasias graves). Dieciocho (31%) de las 59 lesiones mucosas analizadas no mostraron tinción proteica de Kv3.4. De los casos restantes, 28 (47%) de las 59 lesiones orales mucosas mostraron una tinción positiva débil y 13 (22%) casos mostraron una tinción fuerte (figura 1). Por tanto, el 22% de las TOPC fueron consideradas como positivas en la expresión de Kv3.4.

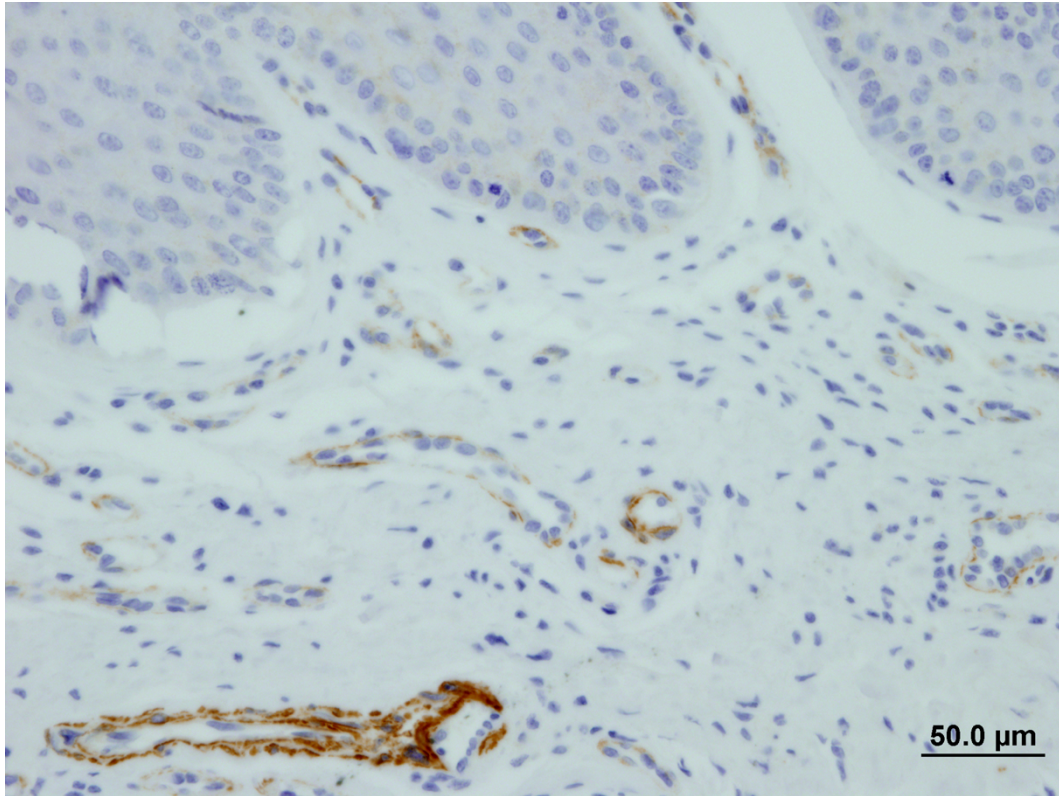


Figura 25: Trastorno oral potencialmente cancerizable con inmunotinción negativa para Kv3.4

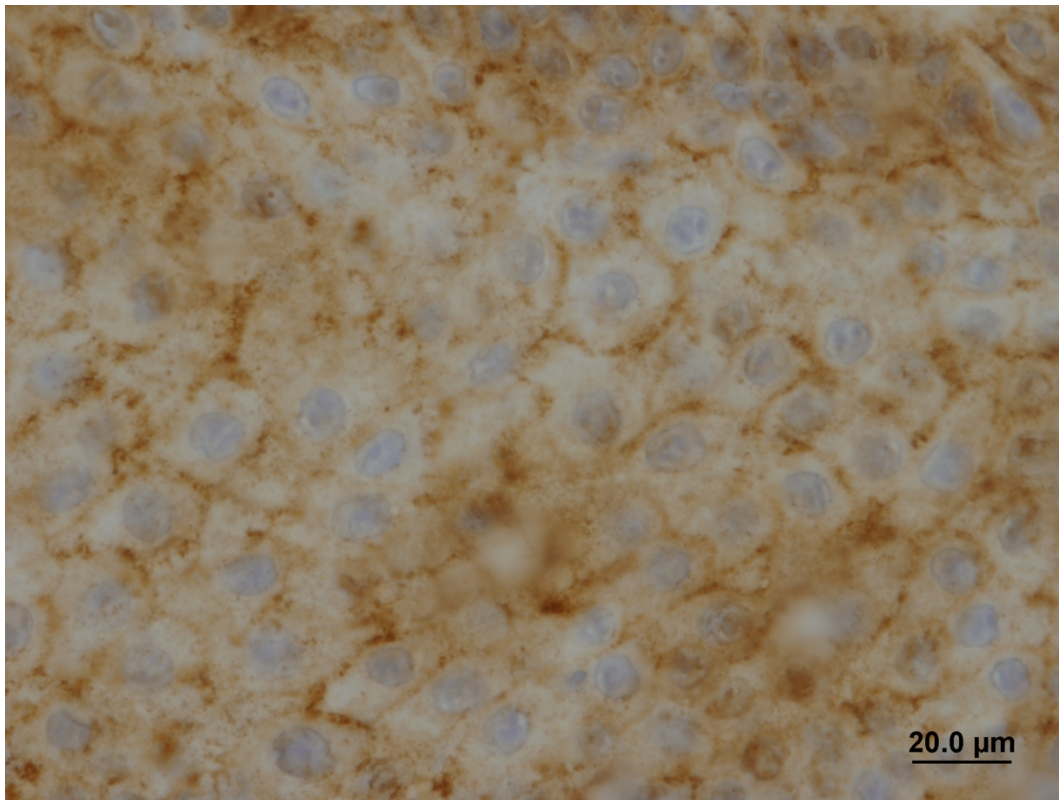


Figura 26: TOPC con expresión positiva de Kv3.4.

La evolución a carcinoma invasivo en relación con el diagnóstico histológico y la expresión proteica de Kv3.4 se muestra en la tabla a continuación.

Tabla 12: Evolución de los TOPC en relación con el diagnóstico histopatológico y la expresión de Kv3.4.

Característica	Número de casos (%)	Progresión a carcinoma (%)	<i>p</i>
Histopatología			
Hiperplasia	43 (69)	14 (33)	0,009
Displasia	19 (31)	13 (68)	
Expresión de kv3.4			
Negativa	44 (75)	17 (39)	0,58
Positiva	15 (25)	7 (47)	

Entre los 62 casos de TOPC estudiados, 43 (69%) mostraron hiperplasia epitelial, mientras en los 19 restantes (31%) se hallaron diferentes grados de displasia (ocho con displasia leve, siete moderada y cuatro grave). Todos estos casos fueron incluidos en el análisis final.

Durante el período de seguimiento, 27 (43%) de los 62 pacientes desarrollaron un carcinoma invasivo en el mismo sitio que la lesión premaligna previa. La media y la mediana del tiempo transcurrido hasta el diagnóstico de cáncer en los casos que progresaron fue de 55 y 24,5 meses, respectivamente (rango 7-308 meses). Los pacientes con lesiones orales epiteliales con displasia mostraron un mayor riesgo de progresión a COCE comparados con aquellos que mostraron lesiones hiperplásicas ($p=0,009$). Los pacientes que tenían lesiones positivas para Kv3.4 también mostraron un riesgo ligeramente mayor de progresión que las Kv3.4 negativas, aunque las diferencias no alcanzaron significación estadística ($p=0,58$). Además, la expresión de Kv3.4 se correlacionó significativamente con la histología. Así, la inmunotinción positiva fue detectada en siete (16%) de 43 lesiones hiperplásicas y en 8 (50%) de 16 lesiones con displasia ($p=0,008$).

La tinción positiva para kv3.4 fue observada en tres (37%) de las ocho displasias leves y en cinco (71%) de las siete displasias moderadas. Desafortunadamente, esta cohorte prospectiva incluyó solamente cuatro lesiones con displasia grave, siendo disponibles los datos de inmunohistoquímica solo en dos, ninguno de los cuales mostró tinción positiva para kv3.4.

La expresión de Kv3.4 también fue evaluada en 16 de los 27 COCE invasivos desarrollados en esta cohorte y la inmunotinción fue comparada con la que presentaban los mismos pacientes en las TOPC. Sin embargo, no se observó correlación entre la expresión de Kv3.4 en las muestras pareadas por paciente (TOPC vs. COCE) ($p = 0,86$). En dos (67%) de las tres lesiones Kv3.4 positivas, la inmunotinción se mantuvo en los carcinomas invasivos. Sin embargo, en ocho (61,5%) de

las 13 TOPC con expresión negativa de Kv3.4 se objetivo expresión fuerte de Kv3.4 en el COCE desarrollado subsiguientemente.

2. CARCINOMA ORAL DE CELULAS ESCAMOSAS

A) HERG1

Expresión proteica de HERG1 en el carcinoma de células escamosas de cavidad oral

La tinción inmunohistoquímica fue evaluada de manera satisfactoria en 95 de los 100 casos. Cuarenta y siete tumores (49% del total analizado) mostraron expresión positiva de HERG1 (expresión fuerte) mientras que la expresión de HERG1 fue despreciable en el epitelio normal y en el estroma. La expresión de HERG1 fue preferentemente detectada en el citoplasma, con enriquecimiento de proteínas en la periferia, en algunos casos.

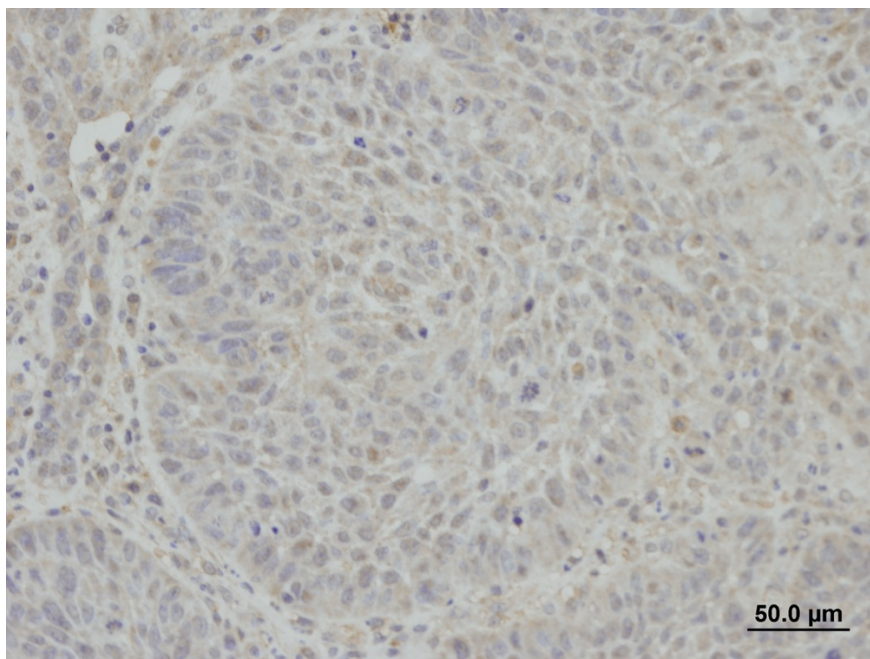


Figura 27: Carcinoma oral de células escamosas con inmunotinción negativa para HERG1 (magnificación original x200)

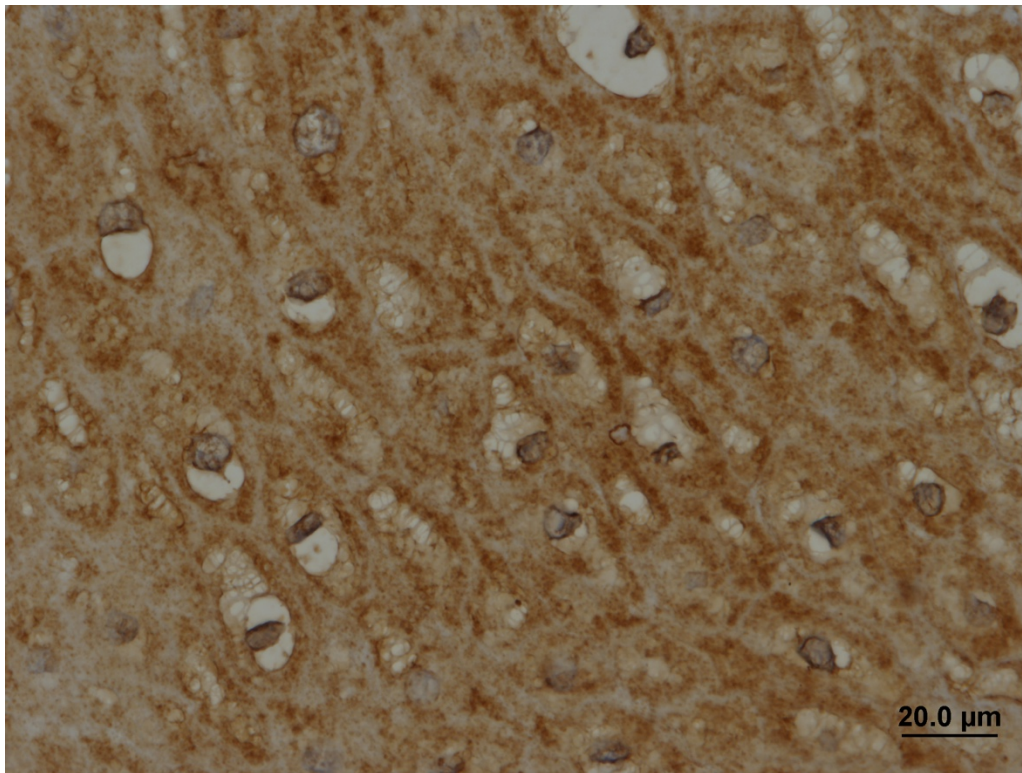


Figura 28: CECO con tinción fuertemente positiva para HERG1 (magnificación original x400)

Asociaciones de la expresión proteica de HERG1 con parámetros clinicopatológicos y evolución de los pacientes.

Las relaciones entre la expresión proteica y las variables clínicas y patológicas son mostradas en la tabla 13.

Tabla 13: Asociaciones entre la expresión de HERG1 y los hallazgos clínico-patológicos.

Característica	Número de casos	Expresión de HERG1 Número (%)	p
Localización del tumor primario			
Lengua	43	16 (37)	0,24
Suelo de boca	26	15 (58)	
Encía	19	11 (58)	
Paladar	2	1 (50)	
Mucosa yugal	4	0 (0)	
Trígono retromolar	6	4 (67)	
pT			
T1-2	54	24 (44)	0,26
T3-4	41	23 (56)	
pN			
N0	60	24 (40)	0,06
N1-3	40	23 (57)	
Estadio clínico			
I-II	39	12 (31)	0,03
III-IV	61	35 (57)	
Diferenciación tumoral			
Bien diferenciado	64	23 (36)	0,01
Moderadamente diferenciado	30	19 (63)	
Mal diferenciado	6	5 (83)	
Recurrencia			
No	64	26 (41)	0,05
Si	36	21 (58)	
Estado clínico al final del seguimiento			
Vivo sin recurrencia	41	13 (32)	0,05
Muerto por la enfermedad	49	28 (57)	
Perdido o muerto por otras causas	10	6 (60)	

La expresión de HERG1 se asoció significativamente con el estadio clínico (III y IV vs. I y II, $p=0,03$), y con el grado de diferenciación tumoral (bien diferenciado vs. moderadamente vs. pobremente, $p=0,01$). Además, la expresión de HERG1 se aproxima a la significación estadística en el consumo de tabaco (fumadores vs. no fumadores o exfumadores, $p=0,05$), recurrencia tumoral ($p=0,05$) y situación clínica al final del seguimiento (muerte a causa del tumor vs. vivo, $p=0,05$). Además, la asociación entre expresión de HERG1 y la afectación ganglionar cervical mostró tendencia hacia la significación ($p=0,06$). Con respecto a estos datos, conviene mencionar que el número de pacientes incluidos en algunas categorías, en concreto en los tumores pobremente diferenciados y en los pacientes fallecidos por causa del tumor, fueron pequeños (6 y 10, respectivamente). Por ello es necesario tomar estos resultados con cautela hasta que puedan ser confirmados mediante el análisis de muestras de mayor tamaño.

La mediana de seguimiento de toda la muestra fue de 56,7 meses (rango 7 a 195 meses), la mediana de seguimiento de los pacientes vivos en la última visita fue de 89 meses (rango 9 a 195 meses) y la mediana de seguimiento de pacientes fallecidos por el cáncer oral en la última visita fue de 31,6 meses (rango 7 a 141 meses). De todos ellos, 10 pacientes resultaron muertos por otras causas sin relación con el tumor primario tras 0 a 134 meses de seguimiento. Estos casos fueron excluidos del análisis de recurrencias. En esta serie solo 3 pacientes desarrollaron metástasis a distancia. HERG1 no se asoció con ellas.

En el análisis univariante de Kaplan Meier se observó una asociación estadísticamente significativa entre la expresión positiva de HERG1 y la reducción de supervivencia enfermedad-específica (test log Rank, $p=0,03$; Figura 21).

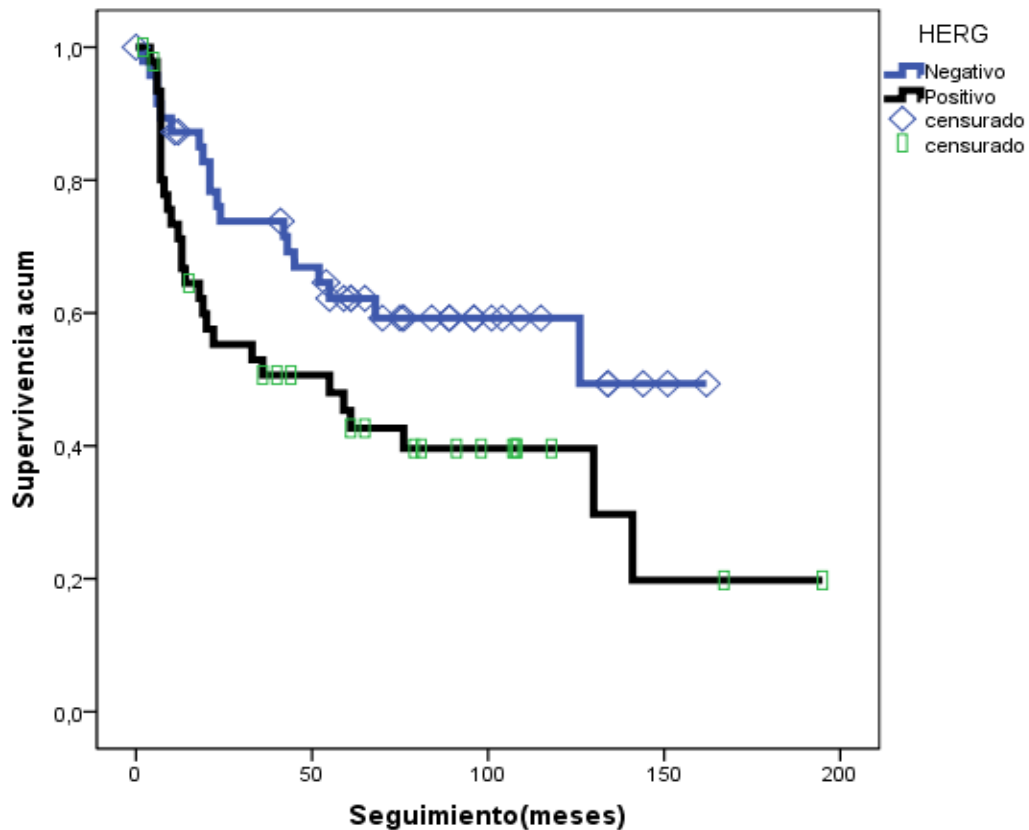


Figura 29: Curva de supervivencia de Kaplan-Meier en pacientes con COCE categorizados por la expresión de HERG1 (log-rank $p=0,03$)

Otras variables asociadas con peor pronóstico fueron estadificación T3-T4 ($p=0,03$), metástasis ganglionares cervicales ($p=0,01$), estadio clínico III o IV ($p=0,01$) y margen quirúrgico afectado por el tumor ($p<0,0005$). Sin embargo, en el análisis multivariante, las únicas variables asociadas independientemente con una disminución de la supervivencia específica de enfermedad, fueron la presencia de recidiva tumoral, los márgenes quirúrgicos afectados por el tumor (10%) y los estadios III y IV de la clasificación TNM (tabla 14).

Tabla 14: Análisis multivariante de Cox.

Variable	Coficiente B (SE)	Hazard Ratio	Intervalo de confianza del 95% de HR	p
TNM				
I+II	-	1 (Ref.)		0,037
III+IV	0,701 (0,336)	2,016	1,043-3,896	
Margen quirúrgico				
Libre	-	1 (Ref.)		<0,0005
Afecto	1,538 (0,412)	4,654	2,075-10,439	
Recurrencia				
No	-	1 (Ref.)		<0,0005
Si	1,733 (0,324)	5,569	2,996-10,690	

Expresión de ARNm HERG1 en COCE y otros subtipos de CECC

La expresión de ARNm de HERG1 fue analizada mediante PCR-RT en tiempo real en una serie de 22 especímenes tisulares frescos de CECC, incluyendo tumores primarios de diferentes localizaciones (cavidad oral, orofaringe, hipofaringe y laringe).

Como controles sin tumor, fueron utilizados queratinocitos primarios y mucosa normal de pacientes no oncológicos sin exposición a carcinógenos del tabaco (obtenida en cirugía de labio y paladar hendido o de amigdalectomía).

El análisis cuantitativo de la expresión de HERG1 reveló que los niveles de ARNm están significativamente elevados en los tumores (rango 0,86 a 439; media 79) comparados con los queratinocitos primarios y la mucosa normal (rango 1 a 17; media 8) ($p = 0,013$; t de Student).

Así, una considerable proporción de los tumores (80%, 18 casos) mostraron unos niveles de ARNm HERG1 incrementados en comparación con los controles no tumorales, aunque con variaciones dependiendo de la localización tumoral como se observa en la figura 30.

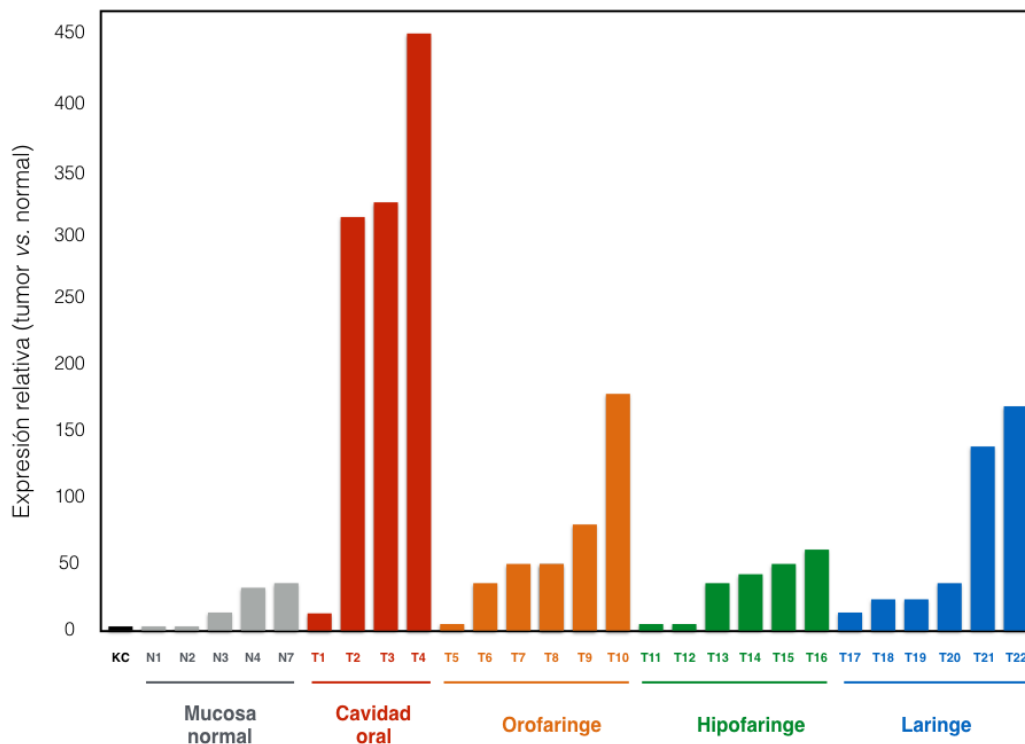


Figura 30: Análisis de los niveles de ARNm mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en carcinomas primarios de cabeza y cuello

en diferentes localizaciones. Los datos están expresados en cambio en número de veces de los niveles de HERG1A en la muestra tumoral normalizado por los niveles de ARNm de L19 y en relación a la mucosa normal.

B) Kv3.4

Expresión proteica de Kv3.4 en COCE invasivo

Para determinar el patrón y la distribución celular de expresión proteica de Kv3.4, el análisis inmunohistoquímico de Kv3.4 fue llevado a cabo sobre especímenes de tejido parafinado de 100 pacientes con carcinoma de células escamosas de cavidad oral. El epitelio normal no mostró expresión de Kv3.4; sin embargo, en algunos casos se observó una débil tinción positiva en las capas más superficiales del epitelio, mientras que no se objetivó tinción en las capas basal y suprabasal. Una fuerte positividad en la tinción fue encontrada en las células de músculo liso vascular que sirvieron como control positivo interno, mientras que las células estromales mostraron una expresión de kv3.4 despreciable.

Treinta y nueve de 100 tumores mostraron una tinción positiva comparados con el epitelio normal correspondiente. La expresión de Kv3.4 fue detectada en la membrana de manera preferente, aunque también se objetivó tinción citoplasmática.

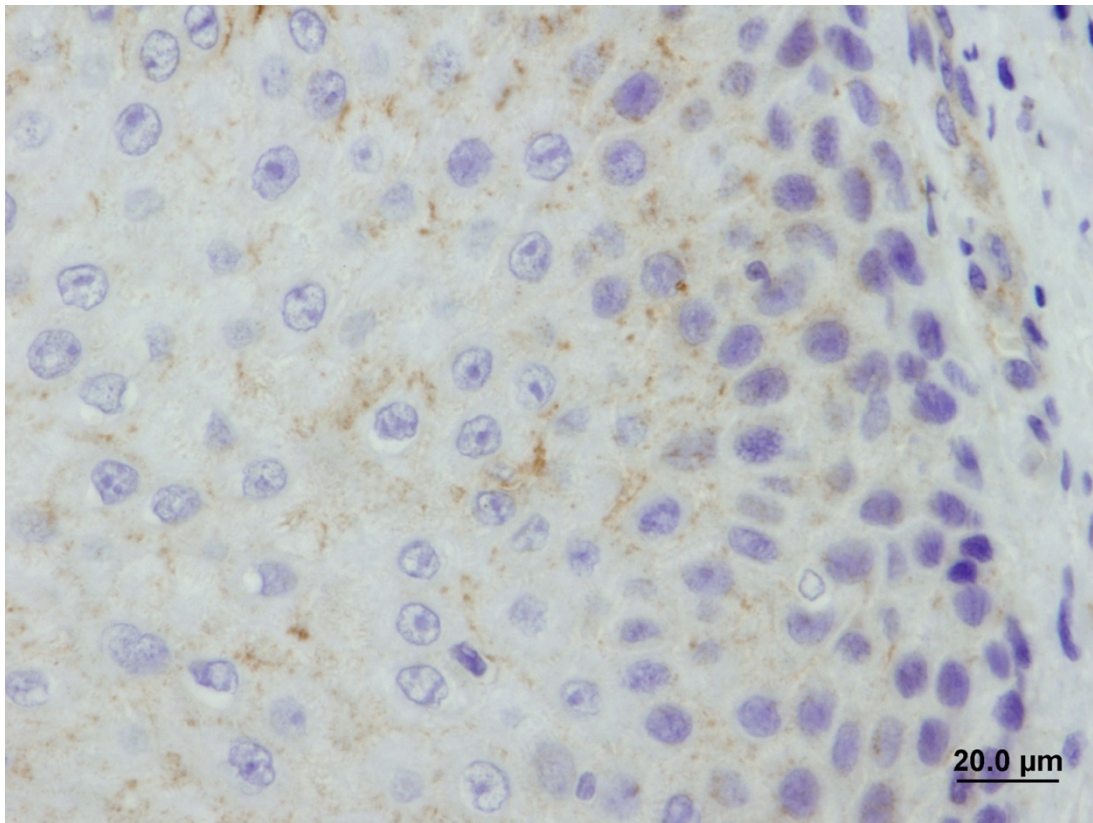


Figura 31: Inmunotinción negativa para Kv3.4 en COCE.

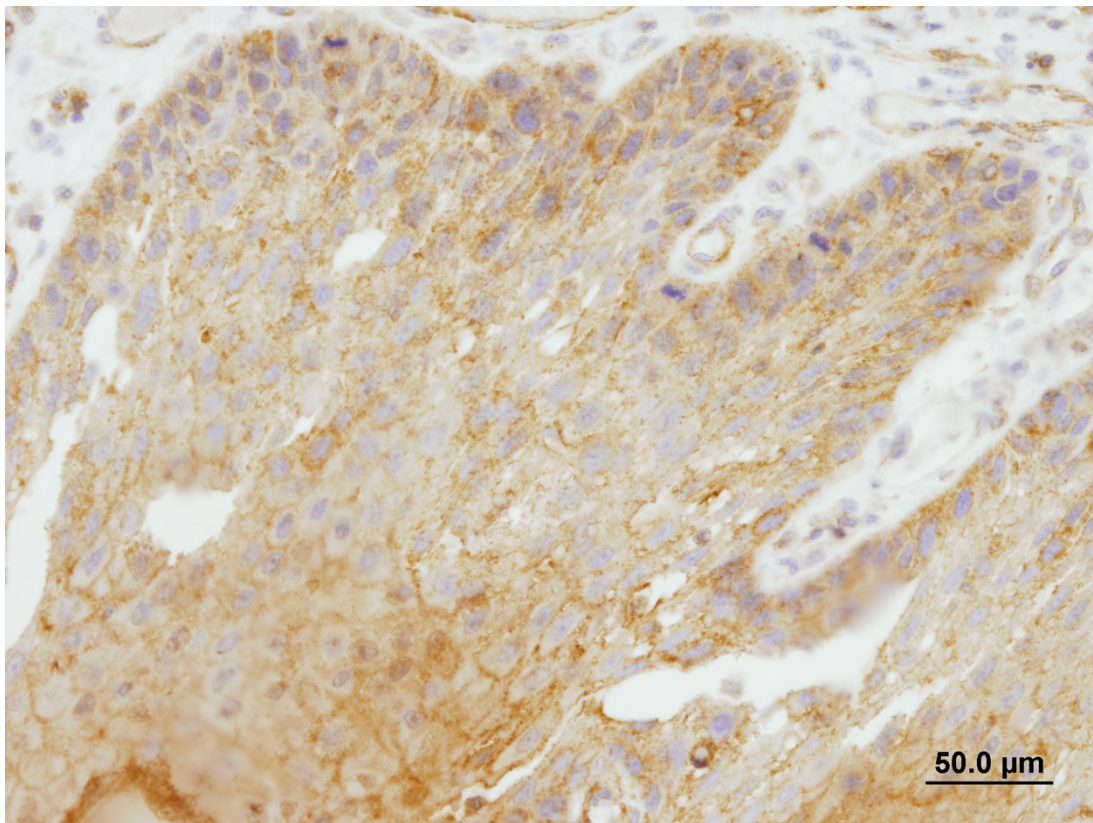


Figura 32: Inmunotinción positiva para Kv3.4 en COCE.

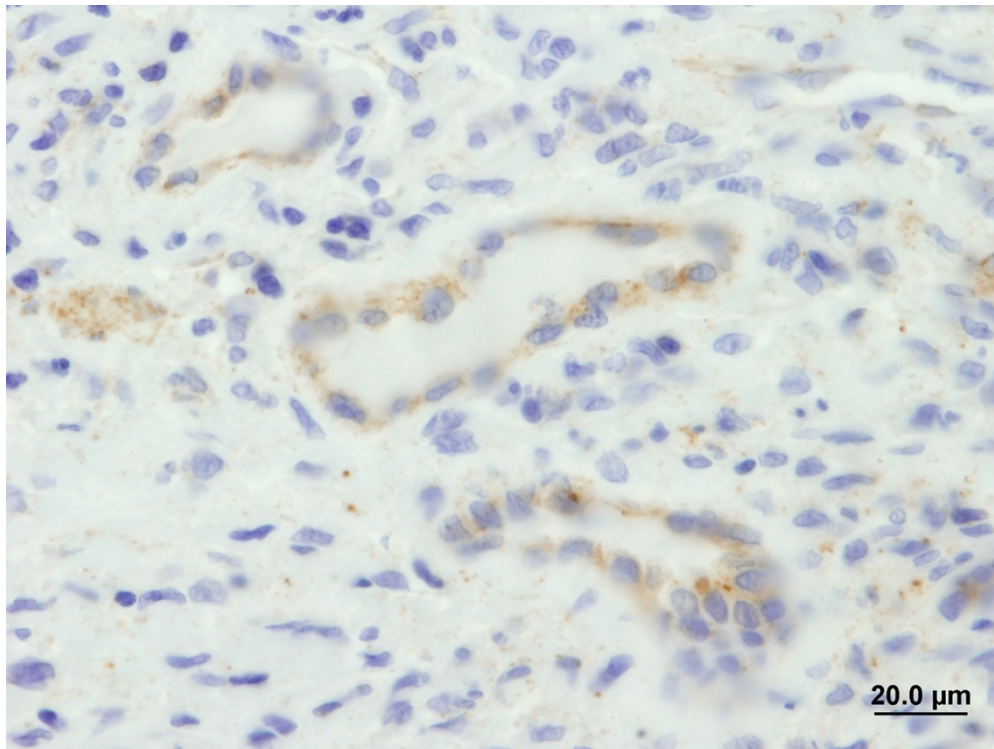


Figura 33: La inmunotinción intensa en las células musculares lisas vasculares sirvió como control interno positivo.

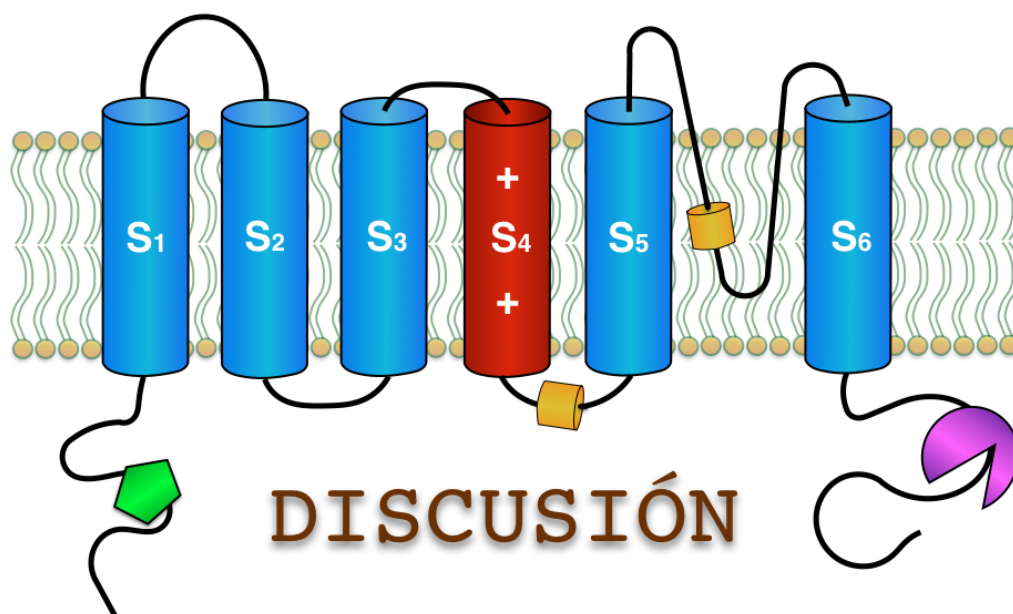
Asociación de la expresión proteica de Kv3.4 con parámetros clínico-patológicos y evolución del paciente.

Las relaciones entre la expresión de Kv3.4 y las variables clínico-patológicas son mostradas en la tabla 15. La expresión de Kv 3.4 se redujo a medida que se incrementó el tamaño y la extensión del tumor (T), la presencia de metástasis ganglionares cervicales (N) y el estadio de la enfermedad, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. De manera interesante, aunque la expresión proteica de Kv3.4 no se observó en ninguno de los tumores pobremente diferenciados, si se pudo constatar en el 54% de los moderadamente diferenciados y en el 42% de los bien diferenciados, con diferencias que fueron estadísticamente significativas ($p=0,05$).

Tabla 15: Asociaciones entre la expresión de Kv3.4 y los hallazgos clínico-patológicos.

Característica	Número de casos	Expresión de kv3.4 Número (%)	p
Localización del tumor primario			
Lengua	43	16 (40)	0,47
Suelo de boca	26	8 (36)	
Encía	19	8 (44)	
Paladar	2	0 (0)	
Mucosa yugal	4	3 (75)	
Trígono retromolar	6	4 (67)	
pT			
T1	21	9 (47)	0,96
T2	38	14 (42)	
T3	16	6 (40)	
T4	25	10 (40)	
pN			
N0	60	24 (45)	0,53
N1-3	40	15 (38)	
Estadio clínico			
I-II	39	16 (50)	0,37
III	22	8 (38)	
IV	39	15 (38)	
Diferenciación tumoral			
Bien diferenciado	64	25 (42)	0,05
Moderadamente diferenciado	30	14 (54)	
Mal diferenciado	6	0 (0)	
Recurrencia			
No	64	26 (44)	0,66
Si	36	13 (39)	
Estado clínico al final del seguimiento			
Vivo sin recurrencia	41	18 (49)	0,07
Muerto por la enfermedad	49	20 (44)	
Perdido o muerto por otras causas	10	1 (10)	

La mediana de seguimiento de toda la serie fue de 30,5 meses (rango 1-195 meses) y la media de seguimiento de los pacientes vivos en la última visita fue de 89 meses (rango 5-195 meses). Durante el periodo de seguimiento, 36 casos desarrollaron recurrencias loco-regionales. Kv 3.4 no se asoció con recurrencia tumoral ($p=0,66$) y no se encontraron diferencias en supervivencia específica ni global comparando pacientes con expresión positiva con pacientes que presentaron expresión negativa de Kv3.4 (log-rank test, $p=0,88$ y $p=0,35$ respectivamente).



DISCUSIÓN

Las alteraciones en los canales iónicos están presentes en múltiples tumores humanos¹⁵, y consecuentemente, el cáncer puede ser considerado una canalopatía¹²⁷, o una enfermedad provocada por una disfunción de los canales iónicos, debido a una disregulación de la expresión del canal u otras modificaciones que provoquen una función alterada¹²⁸. La proliferación celular fue uno de los primeros aspectos identificados de la fisiología de las células en la que los canales de potasio juegan un papel crucial, basándose en la observación de que bloqueadores de amplio espectro de los canales de potasio inhiben la proliferación¹⁴. De hecho, es comúnmente aceptado que la mayor parte de los tipos celulares se someten a una hiperpolarización transitoria durante la transición G1/S. Células con un potencial de reposo muy hiperpolarizado, como las células musculares o las neuronas, presentan ausencia de o muy poca actividad mitótica y, de manera contraria las células activamente proliferantes, como las células tumorales, están muy despolarizadas¹²⁹. El potencial de membrana no es constante durante el ciclo celular y, por tanto, son necesarios cambios de la permeabilidad de la membrana celular dependientes del ciclo celular. Pocos artículos publicados han documentado el papel de los canales de potasio en la biología de otras estipes celulares distintas de las de origen neural o linfoide. Pardo y cols.¹¹¹ han avanzado evidencias de que los canales *ether-a-go-go* (EAG) Kv juegan un papel en el control de la proliferación y la transformación de las células epiteliales.

A) HERG1

Hasta donde sabemos, este estudio es el primero en evaluar la expresión y la relevancia clínica del canal de potasio HERG1 en carcinomas escamosos de cavidad oral y trastornos orales potencialmente malignizables.

La sobreexpresión de los canales de potasio humanos del gen relacionado con el *ether à-go-go* (HERG1, Kv11.1) ha sido descrita en una amplia variedad de tumores^{130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137}. Se ha planteado la hipótesis de que el HERG1 marca un paso temprano en el desarrollo de cáncer^{132,133}, y ejerce un papel regulatorio en la modulación de la proliferación celular, invasividad y supervivencia^{113,133}. Existe evidencia de que en el esófago de Barrett¹³², el canal HERG1 está implicado en la progresión desde la normalidad a adenocarcinomas. En el presente estudio, hemos analizado la relevancia de la expresión de HERG1 y la progresión desde hiperplasia o displasia oral a carcinoma de células escamosas, pero no fue hallada una relación estadísticamente significativa entre la expresión proteica de HERG1 y el riesgo de progresión a COCE. La expresión de HERG1 no fue detectada en el epitelio normal, mientras que la expresión positiva de HERG1 fue encontrada en el 36% de las leucoplasias orales (32% de las hiperplasias y 44% de las displasias) y en el 47% de los COCE. Esto podría sugerir que la expresión de HERG1 precede los hallazgos histopatológicos de COCE y su expresión se ve aumentada a medida que la tumorigénesis progresa. Sin embargo, esta observación debe ser tomada con cautela por el pequeño tamaño muestral en este estudio.

El gen HERG1 podría ser visto como un gen relacionado con la inflamación¹³², y la presencia aumentada de células inflamatorias en muestras de displasia mucosa y cáncer de cavidad oral podría ser la responsable de la expresión de HERG1 y, por tanto, la expresión de HERG1 podría ser un factor determinante en el comienzo de la displasia o metaplasia celular. A favor de esta teoría, hasta la fecha, el canal HERG1 se ha encontrado sobreexpresado sólo en cánceres^{134,136} mientras que no ha sido hallada expresión de HERG1 en condiciones hiperproliferativas como hiperplasias endometriales o adenomas colorrectales. En el presente estudio HERG1 fue detectado en carcinomas orales y en displasias e hiperplasias apoyando la idea de que podría ser visto como un precursor del cáncer oral. De hecho 14 (33%) de 43 hiperplasias progresaron a COCE en nuestra cohorte. Además, vale la pena mencionar que en el comienzo del proceso metaplásico en la vía aerodigestiva superior es siempre estrictamente dependiente de la inflamación crónica, aparentemente de manera distinta de lo que ocurre en el cáncer colorrectal, lo que podría explicar la temprana expresión de HERG1 aberrante¹³². Se ha planteado la hipótesis de que HERG1 puede pertenecer a la clase de genes que son expresados en las células madre o progenitoras, siendo activamente transcritos a medida que estas comienzan a proliferar en respuesta a factores de crecimiento, estimulación por citocinas o transformación neoplásica¹³⁸.

La adquisición de la capacidad de invadir los tejidos circundantes confiere un fenotipo maligno a las células tumorales y es necesario para el establecimiento de metástasis. Además, HERG1 está funcionalmente ligado con la hipoxia¹³⁹ y angiogénesis¹²⁶, una condición necesaria para la progresión tumoral. Ha sido demostrado que los canales HERG1 regulan la invasividad de las células tumorales^{133,140}, posiblemente a

través de una interacción física y funcional con receptores de adhesión de la familia de las integrinas^{141,142}, y las integrinas pueden asimismo contribuir a la localización de los canales iónicos en la membrana. En este estudio no se encontró relación entre HERG1 y metástasis, probablemente porque sólo 3 pacientes desarrollaron metástasis en nuestra cohorte. A pesar de eso, existió una tendencia a una mayor prevalencia de metástasis linfáticas en los tumores que expresaron HERG1, si bien no se observó una relación estadísticamente significativa ($p=0,06$). Es interesante mencionar que la expresión de HERG1 se asoció significativamente con estadios avanzados, recurrencia tumoral y mal pronóstico, sugiriendo que la expresión de HERG1 podría contribuir a la progresión tumoral. Además, la media y la mediana de supervivencia de los pacientes con COCE HERG1 positivo fue significativamente menor que los pacientes con tumores con HERG1 negativo. Nuestros datos, sin embargo, no permiten afirmar dicha conclusión, ya que se requeriría la realización de experimentos fenotípicos para explorar el potencial rol oncogénico de HERG1. Así, de acuerdo con estos datos, la sobreexpresión de HERG1 puede ser vista como un factor de mal pronóstico y, consecuentemente, un potencial biomarcador para la supervivencia en el COCE. Todos estos resultados fueron obtenidos determinando la expresión de HERG1 mediante inmunohistoquímica, el patrón oro como herramienta diagnóstica utilizada para la determinación de la presencia o ausencia de marcadores moleculares en tejido tumoral¹⁴³. Además, hemos encontrado un aumento de los niveles de ARNm HERG1 en un alto porcentaje de COCE y CECC en diferentes localizaciones, extendiendo así el rango de aplicación de HERG1 como biomarcador.

En conclusión, los hallazgos de este estudio revelan que la expresión aberrante de HERG1 ocurre en los estadios iniciales de de la

tumorigénesis oral, incrementándose durante la progresión tumoral. De manera más importante, la expresión de HERG1 emerge como una característica relevante desde el punto de vista clínico en la progresión del COCE, así como una potencial diana molecular en el desarrollo de terapias más efectivas contra el COCE. Sin embargo, sería necesario validar estos resultados en cohortes de pacientes independientes más grandes, incluyendo también un mayor número de casos con displasia severa y moderada.

B) Kv3.4

Solo dos estudios han sido publicados hasta el momento sobre el papel del canal de potasio Kv3.4 en COCE^{144,145}. Chang y cols.¹⁴⁵ observaron la expresión de ARNm en el 64% de los COCE comparado con el 29% en el tejido no tumoral. Sin embargo, no pudieron estudiar la expresión proteica de Kv3.4 por carecer de un anticuerpo comercial apropiado. Por su parte, Lew y cols.¹⁴⁴ amplificaron la secuencia codificante de Kv3.4 mediante PCR en tiempo real y construyeron un vector que contenía esta secuencia, la cual fue transfectada a la línea celular derivada del COCE OECM-1. La sobreexpresión de Kv3.4 en las células del OECM-1 ocasionó un aumento del crecimiento celular. Menéndez y cols.¹⁴⁶ investigaron, por primera vez, la expresión proteica de Kv3.4 en carcinomas escamosos de laringe y faringe y también en una serie de displasias laríngeas. Encontraron que los pacientes con lesiones Kv3.4 positivas tenían una incidencia aumentada de carcinoma laríngeo en comparación con aquellos que no la presentaban. En contraste con esto, la expresión proteica de Kv3.4 no mostró un papel relevante en la progresión tumoral. Observaron que al disminuir la expresión de Kv3.4 en carcinomas en estadios avanzados, no existía un impacto en el pronóstico ni una correlación con el potencial de invasividad. Un hallazgo interesante fue que encontraron una inconsistencia entre los niveles de ARNm y la expresión de proteínas. Por tanto, deben de interpretarse con precaución los datos de expresión de ARNm, ya que pueden no reflejar verazmente la expresión y la función proteica de KV3.4.

Según nuestro conocimiento, este estudio es el primero en investigar el patrón de expresión de la subunidad del canal de potasio kv3.4 en COCE y en lesiones precancerosas de la cavidad oral para comprobar su papel clínico en la transformación maligna y la progresión tumoral. Nuestros hallazgos muestran que Kv3.4 es expresado de manera anormal en estadios iniciales de la tumorigenesis, siendo detectado en el 16% de las lesiones hiperplásicas y en una proporción mayor (50%) en las displasias orales, mientras que la expresión era despreciable en el epitelio normal adyacente.

A pesar de que los pacientes con expresión positiva de Kv3.4 en las lesiones displásicas mostraban un riesgo mayor de progresión, la histología, más que la expresión de Kv3.4, resultó ser el predictor significativo de desarrollo de cáncer oral en nuestra cohorte. En este estudio seleccionamos para el análisis una serie consecutiva de pacientes con el diagnóstico de leucoplasia oral, de los que sólo un 30% exhibían displasia. Esto podría explicar las discrepancias con los hallazgos previos utilizando una serie retrospectiva de displasias laríngeas¹⁴⁶. Nuestros resultados apoyan un papel del canal de potasio Kv3.4 en la tumorigenesis del COCE más que en la progresión tumoral al no haber observado un impacto de la expresión de Kv3.4 en el pronóstico del paciente, su tendencia a disminuir en el COCE avanzado y la ausencia de correlación con el potencial de invasividad. Estos datos están en armonía con los mostrados por Menendez y cols¹⁴⁶. A pesar de ello, la expresión de Kv3.4 por si sola no parece suficiente para promover tumorigenesis ya que se observó que una considerable proporción de los tumores orales se desarrollaron sobre lesiones negativas para el Kv3.4. Alternativamente, también debemos considerar que es también plausible que las lesiones que mostraron expresión negativa de Kv3.4 fueran biopsiadas antes de que la anormalidad

ocurriese; que los cánceres se desarrollaran sobre lesiones no examinadas o también las discrepancias podrían deberse a heterogeneidad clonal.

El CECC es una enfermedad muy heterogénea que incluye diferentes lugares anatómicos y el contexto celular y ambiental puede también dictar el papel biológico de este canal de potasio, pero saber si la función del Kv3.4 es específica del tipo celular o de tejidos requiere otros estudios. La transformación celular por oncogenes *Ras* y *Src*, así como los oncovirus SV y SV40 incrementan la actividad de los canales de potasio^{147,148,149,150}. En nuestro estudio estos oncogenes no fueron examinados, sin embargo, la relación entre la expresión proteica de Kv3.4 y los factores de riesgo clásicos de COCE, como el consumo de tabaco o el de alcohol, si lo fueron y no mostraron significación estadística ($p=0,51$ y $p=0,77$, respectivamente).

De acuerdo con nuestros resultados, el incremento en la expresión de Kv3.4 en leucoplasias orales puede conferir una ventaja proliferativa a las células que contienen esta alteración y, en último término, favorecen la progresión a COCE. Existen dos hipótesis fundamentales para intentar explicar los efectos de los canales Kv en la proliferación, basadas en el volumen celular y en el potencial de membrana¹⁵. Los canales de potasio pueden controlar el volumen celular afectando el flujo de potasio¹⁵¹. A pesar de que no es completamente entendido como la actividad del canal de potasio Kv3.4 influye en la proliferación celular, Lew y cols¹⁴⁴ especularon que este canal está implicado en el mantenimiento de la membrana despolarizada requerida por las células tumorales. Practicamente todos los canales Kv son regulados mediante fosforilación de residuos de serina, treonina o tirosina en los dominios intracelulares de los canales¹⁵¹. Si el papel de los canales Kv en el

cáncer fuese simplemente debido a cambios en el potencial de membrana ocasionados por corrientes de potasio, entonces la activación de la mayor parte de los canales Kv afectaría a la proliferación. Sin embargo, éste no es el caso¹⁵. Adicionalmente, los canales iónicos son objetivos de muchas vías de señalización intracelular y pueden funcionar como transductores de señal ellos mismos. Los canales de potasio pueden también regular la migración de las células cancerosas mediante funciones no canónicas. La mayoría de los canales forman complejos macromoleculares con otras proteínas que pueden cambiar profundamente las propiedades del mismo canal, así como influir en su localización. En estos complejos macromoleculares, los canales Kv actúan como sensores de voltaje, pero también pueden actuar como enlace entre el medio extracelular y el citoplasma. Por ejemplo, el canal HERG puede formar un complejo macromolecular con VEGFR-1 y β 1-integrina, y el ensamblaje de este complejo confiere un fenotipo pro-migratorio en la leucemia¹²¹.

Las debilidades que observamos en este estudio son que los 100 pacientes con COCE fueron recogidos de manera retrospectiva, en contraste con los pacientes con TOPC, siendo la calidad la información recogida sobre las variables no equiparable con respecto a los estudios prospectivos. A pesar de la selección prospectiva de TOPC, casi el 70% de estas lesiones no mostró displasia, que es considerada el patrón oro en la evaluación de riesgo de desarrollo de COCE. Además, sólo unos pocos casos exhibieron displasia grave y la inmunohistoquímica fue solo evaluable en dos de ellos, mostrando ambos tinción de kv3.4 negativa lo que puede representar otra limitación. Por otra parte, existe una variación sustancial inter e intraobservador cuando se evalúa la presencia y severidad de la displasia epitelial, y esta diversidad en la histopatología y en el comportamiento clínico hacen difícil determinar de

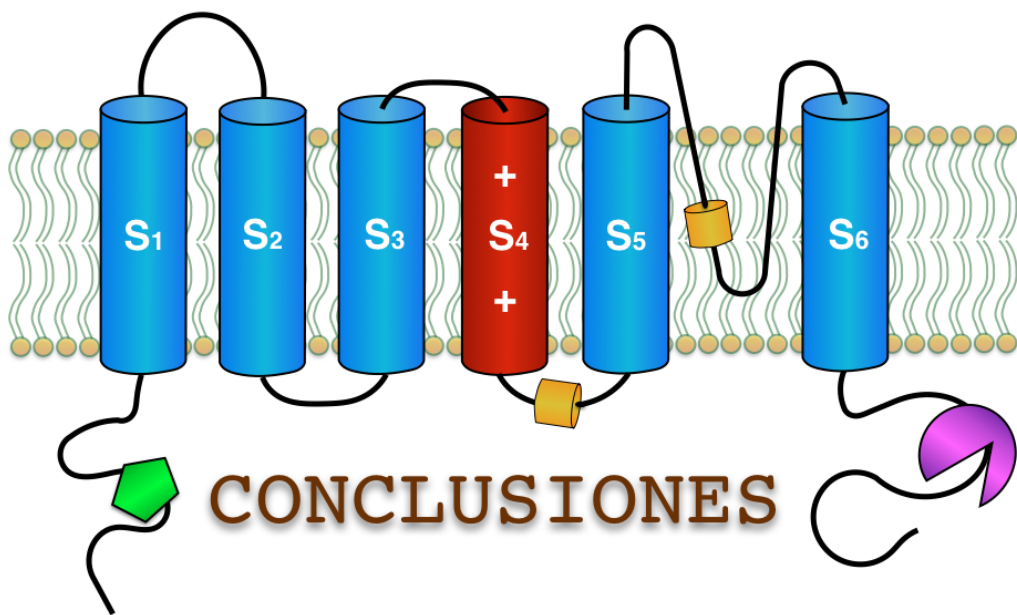
manera precisa la contribución de los canales kv3.4 en la tumorigenesis inicial. Se hacen por tanto necesarios estudios prospectivos que involucren un mayor número de pacientes con displasia para confirmar de manera mas sólida la utilidad clínica de la expresión de kv3.4 como biomarcador para la evaluación del riesgo de cáncer.

Este estudio tiene también algunos puntos fuertes. A pesar de que la hiperplasia no es considerada un estadio inicial en la carcinogénesis oral hemos observado una tendencia a la inmunopositividad desde la hiperplasia a la displasia-carcinoma, lo que resalta la potencial relevancia de los canales de potasio en la tumorigénesis y su posible utilidad en el diagnóstico precoz.

De acuerdo con nuestros resultados y los obtenidos por Menendez y cols.¹⁴⁶, Kv3.4 emerge como un prometedor marcador diagnóstico para explicar la tumorigénesis de los queratinocitos, junto con los criterios morfológicos. Así, el análisis inmunohistoquímico de Kv3.4 podría ser una herramienta útil para identificar pacientes en riesgo de desarrollo tumoral. Además, la inmunohistoquímica posee claras ventajas al ser fácil y económica pudiendo permitir la determinación de Kv3.4 la estratificación de riesgo y guiar el tratamiento. Es también plausible que el canal Kv3.4 pueda constituir una nueva y valiosa diana terapéutica de membrana para el tratamiento y la prevención del COCE. Los canales iónicos son dianas farmacológicas viables para el cáncer, y existe una confianza abrumadora en que tendrán un papel importante en el diagnóstico y en la terapia antineoplásica¹⁵².

El cáncer oral es fundamentalmente tratado mediante resección quirúrgica y radioterapia. Sin embargo, dadas la frecuencia de recidivas tumorales y de resistencias al tratamiento, deben de ser identificados

nuevos marcadores moleculares para el desarrollo de terapias alternativas. Los canales de iones se han convertido en un prometedor participante en el desarrollo de novedosas terapias anticáncer. En este estudio, mostramos evidencia original para demostrar la temprana aparición y la alta prevalencia de expresión anormal de Kv3.4 en leucoplasias orales. De manera más importante, nuestros resultados indican que la expresión anormal de Kv3.4 es una característica clínica y biológica relevante durante la tumorigénesis del COCE y la transformación maligna, aunque la expresión no parece tener un impacto fundamental en la progresión a COCE o en el pronóstico de la enfermedad.



CONCLUSIONES :

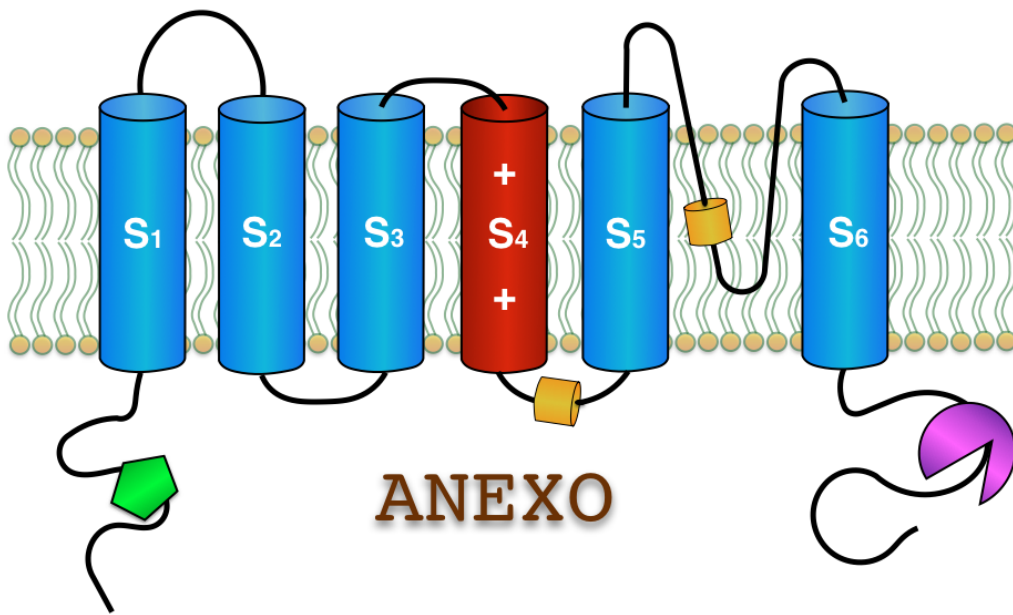
El análisis de los resultados obtenidos en el presente estudio, permite establecer las siguientes conclusiones:

- 1ª) No se halló relación estadísticamente significativa entre la inmunoexpresión de HERG1 y el riesgo de progresión a COCE.
- 2ª) La expresión de HERG no fue detectada en el epitelio normal y se vió aumentada a medida que la tumorigénesis progresa, lo que podría sugerir que la expresión de HERG1 precede a los hallazgos histopatológicos.
- 3ª) No fue hallada una relación estadísticamente significativa entre la expresión de HERG1 y metástasis. Por el contrario se observó una tendencia a una mayor prevalencia de metástasis linfáticas en tumores que expresaron HERG1, si bien no se observó una relación estadísticamente significativa ($p=0,06$).
- 4ª) La expresión de HERG1 se asoció significativamente con los estadios avanzados ($p=0,03$), el grado de diferenciación ($p=0,01$), la recurrencia tumoral ($p=0,05$) y mal pronóstico ($p=0,05$), sugiriendo que la expresión de HERG1 podría contribuir a la progresión tumoral.
- 5ª) Se observó una asociación estadísticamente significativa entre la expresión positiva de HERG1 y la reducción de supervivencia enfermedad-específica ($p=0,03$)

6ª) El análisis cuantitativo de la expresión de HERG1 reveló que los niveles de ARNm están significativamente elevados en los tumores comparados con los queratinocitos primarios y la mucosa normal ($p = 0,013$).

7ª) La expresión anormal de Kv3.4 acontece en estadíos iniciales de la tumorigénesis siendo detectada en el 16% de las lesiones hiperplásicas y en el 50% de las displasias orales, siendo despreciable en el epitelio adyacente.

8ª) En los COCE, la expresión de Kv3.4 no se observó que tuviese impacto en el pronóstico, mostró una tendencia a su disminución en el COCE avanzado y no se halló correlación con el potencial de invasividad.



HERG1 potassium channel expression in potentially malignant disorders of the oral mucosa and prognostic relevance in oral squamous cell carcinoma

Álvaro Fernández-Valle, MD,¹ Juan Pablo Rodrigo, MD, PhD,^{2,3} Tania Rodríguez-Santamarta, MD,¹ M. Ángeles Villaronga, BD, PhD,³ Saúl Álvarez-Teijeiro, MSc,³ Juana M. García-Pedrero, BD, PhD,³ Laura Suárez-Fernández, MD,³ Paloma Lequerica-Fernández, BD,⁴ Juan Carlos de Vicente, MD, DDS, PhD^{1,3*}

¹Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), Oviedo, Asturias, Spain, ²Department of Otolaryngology, Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), Oviedo, Asturias, Spain, ³Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA), Hospital Universitario Central de Asturias, Edificio Consultas Externas, Planta Baja Lab 2 ORL-IUOPA, Oviedo, Asturias, Spain, ⁴Department of Biochemistry, Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), Oviedo, Asturias, Spain.

Accepted 21 March 2016

Published online 00 Month 2016 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/hed.24493

ABSTRACT: *Background.* HERG1 potassium channel plays a critical role in the cell proliferation.

Methods. HERG1 protein expression was analyzed by immunohistochemistry (IHC) in 62 patients with oral leukoplakias and 100 patients with oral squamous cell carcinomas (OSCC). HERG1 mRNA levels were assessed by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) in 22 patients with primary head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC).

Results. Statistically significant associations were found between HERG1 expression and tobacco consumption, disease stage, tumor differentiation, tumor recurrence, and reduced survival. There was no association between HERG1 expression and the risk of progression from oral

leukoplakia to OSCC. In addition, a high proportion of tumors (80%) showed increased HERG1 mRNA levels compared to normal mucosa from nononcologic patients.

Conclusion. Aberrant HERG1 expression increases as oral tumorigenesis progresses from oral hyperplasia to OSCC. Increased HERG1 mRNA levels were also frequently detected in OSCC and other HNSCC subsites. HERG1 expression emerges as a clinically relevant feature during tumor progression and a potential poor prognostic biomarker for OSCC. © 2016 Wiley Periodicals, Inc. *Head Neck* 00: 000–000, 2016

KEY WORDS: HERG1, potassium channel, oral carcinoma, dysplasia, immunohistochemistry

INTRODUCTION

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common malignant tumor of the head and neck region and accounts for more than 90% of cancers of the oral cavity.¹ Although treatment of OSCC has advanced recently, the prognosis of this disease remains dismal. Thus, the search for novel reliable diagnostic or prognostic markers that lead to early diagnosis in the risk population may allow effective intervention that improves survival.²

Recently, increasing evidence has demonstrated that cancer cells exhibit ion channels expression, ion conductance, and electric properties, which are very different from that of resting cells.³ Ion channels are well known for their roles in a large variety of physiological functions, including electrical signaling, control of muscle contraction, volume regulation, and hormone secretion. However, mutations in genes coding for ion channel subunits or proteins that regulate them have been implicated in several diseases, showing either a primary etiologic role (channelopathies) or as mediators in pathogenesis. Specifically, potassium channels have been postulated that they are important for cell proliferation and cancer.^{4–6} Regarding proliferation, most cell types undergo a transient hyperpolarization at the exit of G1 phase and tumor cells are, on average, depolarized compared with nontumor cells, and it has been proposed that this is an essential prerogative for cells destined to unlimited growth.⁷ An increase of potassium channel activity leads to membrane hyperpolarization, whereas a decrease in activity leads to depolarization.⁶

Over 70 types of potassium channels have been identified; however, only a few have been directly implicated in control of cell proliferation and tumor growth.⁵ Within the group of potassium channels, the ether-à-go-go (EAG)

*Corresponding author: J. C. de Vicente, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Hospital Universitario Central de Asturias, School of Medicine, c/Catedrático José Serrano s/n, 33006, Oviedo, Spain.
E-mail: jvicente@uniovi.es

Contract grant sponsor: This study was supported by grants from the Plan Nacional de I+D+I 2013-2016 ISCIII (CP13/00013 and PI13/00259), RD12/0036/0015 of Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC), Spain, Fundación Bancaria Caja de Ahorros de Asturias-IUOPA, and the FEDER Funding Program from the European Union. M.A.V. is the recipient of a fellowship from ISCIII (CD13/00157) and S.A.T. is the recipient of a fellowship from PFIS ISCIII (FI12/00415).

Álvaro Fernández-Valle, Juan Pablo Rodrigo, and Tania Rodríguez-Santamarta contributed equally to this work.

potassium channel family consists of 3 subfamilies: EAG (Kv10); human EAG-related gene (HERG1; Kv11), and ELK (EAG-like; Kv12).⁸ HERG1 is composed of 4 subunits, each of which is formed by 6 transmembrane segments (S1–S6), which are assembled to form a tetramer surrounding a central aqueous pore. The S4 segment of each subunit is composed of basic amino acids (Lys and Arg) and represents the voltage sensor.⁹ HERG1 channel, first identified in neuroblastoma cells as responsible for resting-potential variations,¹⁰ has been involved in the establishment and maintenance of neoplastic growth.^{4,5} Lately, it has been observed that the HERG1 channel is overexpressed in several tumor cell lines from different histogenesis, shown to play a critical role in the cell cycle progress, proliferation, and adaptation.^{11,12} Furthermore, it has also been hypothesized that HERG1 marks an early step for cancer development¹³ and it exerts a regulatory role on the modulation of cell invasiveness.¹⁴ Therefore, the HERG1 potassium channel has emerged as a promising diagnostic and prognostic biomarker in human cancers, as well as a target for antineoplastic therapies.

The present study investigates, we believe for the first time, HERG1 protein expression in a large series of OSCCs and potentially malignant lesions of the oral mucosa to establish its clinical significance in both the development and progression of OSCC.

MATERIALS AND METHODS

Patients and tissue samples

Surgical tissue specimens from 62 patients with potentially malignant disorders (leukoplakia) of the oral cavity were prospectively collected and 100 patients with OSCC who underwent surgical treatment at the Hospital Universitario Central de Asturias between 1995 and 2006 were retrospectively collected, following institutional review board guidelines. All experimental protocols were approved by the Institutional Ethics Committee of the Hospital Universitario Central de Asturias (date of approval July 9, 2013) and by the Regional CEIC from Principado de Asturias (date of approval July 18, 2013; approval number: 81/2013) for the project PI13/00259. Informed consent was obtained from all patients.

Patients with oral leukoplakia included in this study had to meet the following criteria: (i) pathological diagnosis of oral epithelial hyperplasia or dysplasia; (ii) no medical history of head and neck cancer; (iii) complete excisional biopsy of the lesion; and (iv) a minimum follow-up of 5 years (or until progression to malignancy occurred). In OSCC, inclusion criteria were surgical treatment performed according to standard procedures and consisting of the resection of the primary tumor and a radical or selective ipsilateral or bilateral neck dissection, complete clinicopathological data, and availability of sufficient paraffin-embedded tumor material. Representative tissue samples were obtained from archival paraffin-embedded blocks. The sections were selected for study as follows: in premalignant lesions, representative areas of the lesion were included in 1 block and therefore the section used for histological diagnosis was subsequently stained and evaluated. In carcinomas, one representative section from the middle of the tumor that also included

the tumor border (containing interfaces between the tumor nests, cords or sheets, and stroma) and normal adjacent epithelium was selected for staining. Clinicopathological information on each case, including age, sex, smoking and alcohol intake history, tumor size, nodal status, location, histologic grade, treatment, and presence or absence of tumor recurrence, was obtained from patient files. All patients with OSCC included in this study had a single primary tumor and none of them had received preoperative chemotherapy or radiotherapy. Thirty-six patients (36%) were women, and the mean age of the whole sample was 61.6 (SD, 13.44; range, 30–91 years). Fifty-six patients (56%) were smokers, and 53% were alcohol consumers. The stage of disease was determined after the surgical resection of the tumor according to the TNM system of the International Union against Cancer (seven edition).¹⁵ Tobacco and alcohol consumption history was determined from the medical records. Alcohol consumption was described in terms of beer, wine, or hard liquor. A drinker was defined as a person who self-reported consuming 4 or more drinks of any alcoholic beverage type per day for at least 10 years. For comparability, 1 drink is equivalent to 14 g of ethanol, which generally corresponds to 330 mL of beer, 150 mL of wine, and 36 mL of hard liquor.¹⁶

The histological grade was determined according to the degree of differentiation of the tumor (Broder's classification). All patients had been treated surgically with curative intention, and 42 (42%) underwent postoperative radiotherapy, receiving 40 to 70 Gy, according to the following indications: T4, poorly differentiated carcinomas, tumor-positive resection margins, and metastases in neck nodes. Surgical margins of resection were free of tumor infiltration in 90 of 100 cases. The recurrence-free survival and the survival of the patients were quantified. Clinical outcome was measured by 2 end points: (1) death caused by disease recurrence; and (2) presence of untreatable disease at the end of the follow-up time. At the end of this period, 49 patients (49%) had died of tumor recurrence, and 41 patients (41%) were alive and free of recurrence. Ten patients were lost during the follow-up. Patients were followed up every 2 months for the first 6 months after completing the treatment, every 3 months until the second year, and every 6 months thereafter. The characteristics of the patients studied and the clinicopathological features of their tumors are summarized in Table 1.

The potentially malignant disorders were classified into categories of mild, moderate, or severe dysplasia, according to the World Health Organization classification.¹⁷ Forty-three cases (69.4%) did not show epithelial dysplasia (hyperplasia). Eight lesions (12.9%) were classified as showing mild dysplasia, 7 (11.3%) as moderate dysplasia, and 4 (6.5) as severe dysplasia/carcinoma in situ. Twenty-seven patients (43.5%) were men, and the mean age was 61.08 (SD, 12.44; range, 30–85 years). Twenty-eight patients (45%) were smokers, and 14 (22.6%) were also habitual alcohol drinkers.

For mRNA analysis, surgical tissue specimens from 4 patients with OSCC who underwent surgical treatment at the Hospital Universitario Central de Asturias were prospectively collected, following institutional review board

guidelines. Biopsies were sharply excised, placed in sterile tubes, and stored in RNAlater at -80°C . Fresh-frozen tissue samples from 18 surgically treated patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) were also obtained from the Biobank at the Hospital Universitario Central de Asturias. Normal mucosa was also collected from nononcologic patients.

Immunohistochemistry

The formalin-fixed paraffin-embedded tissues were cut into 3- μm thick sections and dried on Flex IHC microscope slides (Dako). The sections were dewaxed with xylene and hydrated through graded ethanol into water. Antigen retrieval was performed using Envision Flex Target Retrieval solution, high pH (Dako). Staining was carried out at room temperature on an automatic staining workstation (DakoAutostainer Plus) with rabbit polyclonal anti-HERG1 (CT) (pan) antibody (Enzo Life Sciences), at 1:200 dilution using the Dako EnVisionFlex+Visualization System (DakoAutostainer). Counterstaining with hematoxylin was the final step.

As HERG1 staining showed a homogeneous distribution, a semiquantitative scoring system based on staining intensity was applied. Immunostaining was scored as negative (0), weakly to moderately (1+), or strongly positive (2+). Scores equal to 2 were considered as HERG1-positive expression. All slides were scored by 2 investigators without knowledge of the clinical data. Occasional disagreements were discussed to reach a consensus.

Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction

Total RNA was extracted using Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies), and cDNA synthesized with Superscript II reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) System (Invitrogen Life Technologies), in accord with the manufacturer’s protocols. Gene expression was analyzed by real-time polymerase chain reaction (PCR) using the Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System, in accord with Applied Biosystems’ SYBR Green Master Mix protocol. Reactions were carried out using primers specific for HERG1 (matching exons 5 and 6) and for the constitutively expressed L19 ribosomal coding gene as internal control, as previously described.¹⁸ Samples were analyzed in triplicates and template-free blanks were also included. Dissociation curve analysis of all PCR products showed a single sharp peak. The relative mRNA expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method. The data were expressed as fold-change in HERG1 mRNA levels in the tumor sample normalized to L19 levels and relative to the normal mucosa.

Statistical analyses

An SPSS for Windows computer program (PASW Statistics 18.0, Polar Engineering and Consulting) was used for statistical analyses. The association between clinical parameters and immunohistochemical results was analyzed with the chi-square or Fisher’s exact test (if $N < 5$). Comparison between HERG1 mRNA levels in tumors and normal mucosa was evaluated by Student’s *t* test.

TABLE 1. Associations between HERG1 protein expression and clinicopathological findings.

Characteristics	No. of cases	HERG1 protein expression (%)	<i>p</i> value
Primary site			.24
Tongue	43	16 (37)	
Floor of the mouth	26	15 (58)	
Gum	19	11 (58)	
Palate	2	1 (50)	
Buccal	4	0 (0)	
Retromolar	6	4 (67)	
pT			.26
T1–T2	54	24 (44)	
T3–T4	41	23 (56)	
pN			.06
N0	60	24 (40)	
N1–N3	40	23 (57)	
Clinical stage			.03
I–II	39	12 (31)	
III–IV	61	35 (57)	
Tumor differentiation			.01
Well	64	23 (36)	
Moderately	30	19 (63)	
Poorly	6	5 (83)	
Recurrence			.05
No	64	26 (41)	
Yes	36	21 (58)	
Clinical status at the end of the follow-up			.05
Alive and without recurrence	41	13 (32)	
Dead of index cancer	49	28 (57)	
Lost or died of other causes	10	6 (60)	

Survival analysis was performed with the Kaplan–Meier product limit method and the log-rank test was used to compare survival among groups of patients. Cox proportional hazards models were utilized for multivariate analyses. The hazard ratio with 95% confidence intervals and *p* values were reported. A significance level of .05 was used for all statistical tests.

RESULTS

HERG1 protein expression in oral squamous cell carcinomas

Immunostaining was successfully evaluated in 95 of the 100 cases. Forty-seven tumors (47%) exhibited HERG1-positive expression (strong expression), whereas HERG1 expression was negligible in both normal epithelium and stromal cells (see Figure 1). HERG1 expression in tumors was preferentially detected in the cytoplasm, with protein enrichment at the cell periphery in some cases.

Associations of HERG1 protein expression with clinicopathological parameters and patient outcome

The relationships between HERG1 protein expression and the clinicopathological variables are shown in Table 1. HERG1 expression was significantly associated with clinical stage (III and IV vs I and II, *p* = .03), and degree of

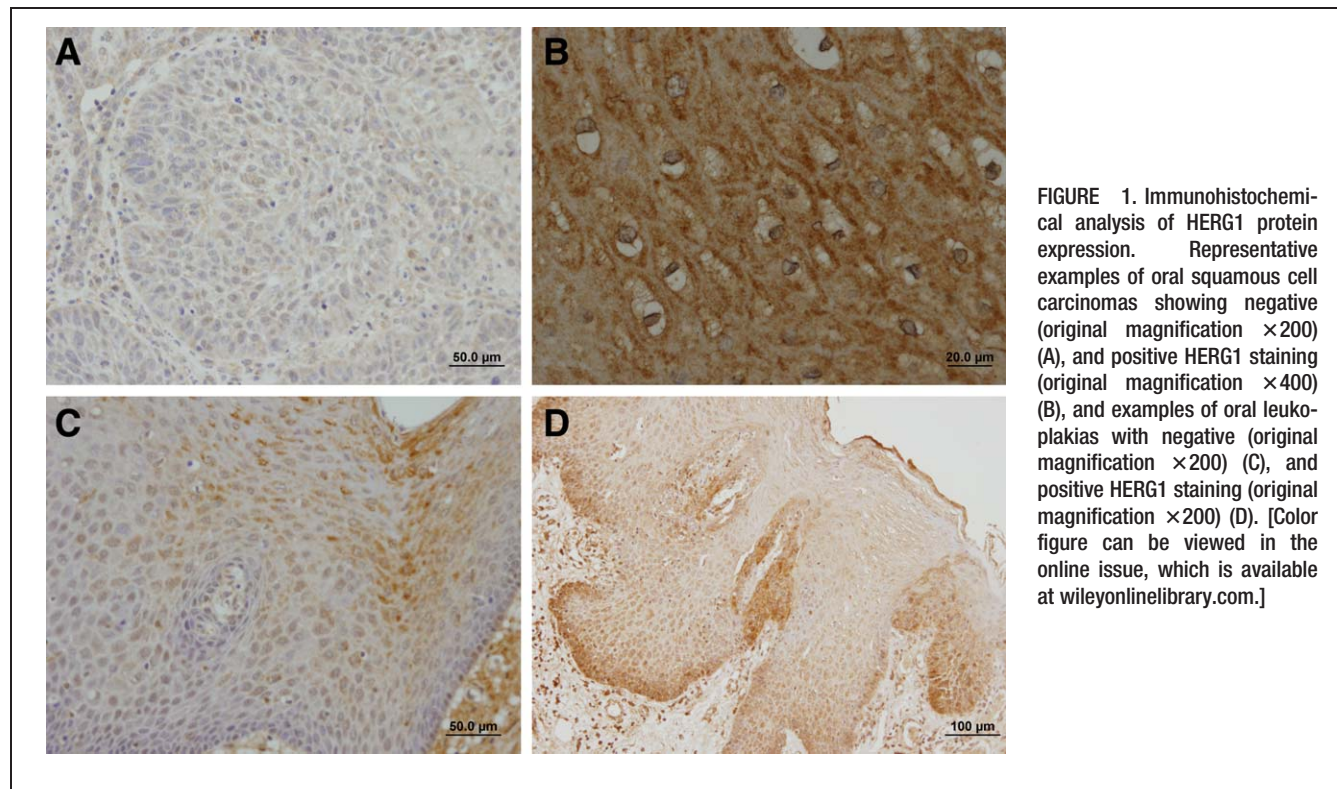


FIGURE 1. Immunohistochemical analysis of HERG1 protein expression. Representative examples of oral squamous cell carcinomas showing negative (original magnification $\times 200$) (A), and positive HERG1 staining (original magnification $\times 400$) (B), and examples of oral leukoplakias with negative (original magnification $\times 200$) (C), and positive HERG1 staining (original magnification $\times 200$) (D). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

tumor differentiation (well vs moderately vs poorly, $p = .01$). Furthermore, HERG1 expression approaches statistical significance with tobacco consumption (smokers vs nonsmokers or ex-smokers, $p = .05$), tumor recurrence ($p = .05$), and clinical status at the end of the follow-up (dead by the tumor vs alive; $p = .05$). In addition, the association between HERG1 expression and neck node metastasis showed trends toward significance ($p = .06$). Regarding these data, it is worth mentioning that the number of patients included in some categories, in particular “poorly differentiated tumors” and “patients dead of the index cancer,” were small (6 and 10, respectively). Consequently, these results should be interpreted with caution until confirmed using larger sample sizes.

The median follow-up of the whole sample was 56.7 months (range, 7–195 months), the median follow-up of the patients alive at the last visit was 89 months (range, 9–195 months), and the median follow-up of the patients who died of the oral cancer at the last visit was 31.6 months (range, 7–141 months). In all, 10 patients who died of other causes not related to the primary tumor between 0 and 134 months of follow-up were excluded from the recurrence analysis. In this series, only 3 cases developed distant metastasis. HERG1 was not found to correlate with distant metastasis.

Univariate Kaplan–Meier analysis demonstrated a significant correlation between HERG1-positive expression and reduced disease-specific survival (log-rank test, $p = .03$; Figure 2). Other variables associated with a poorer prognosis were T3 to T4 classification ($p = .03$), neck node metastasis ($p = .01$), III or IV clinical stage ($p = .01$), surgical margin involved by the tumor ($p < .0005$), and recurrence ($p < .0005$). However, in multivariate analysis, the only variables independently associated with

a reduced disease-specific survival were the presence of tumor recurrence, surgical margins involved by the tumor (10%), and III to IV TNM stage (Table 2).

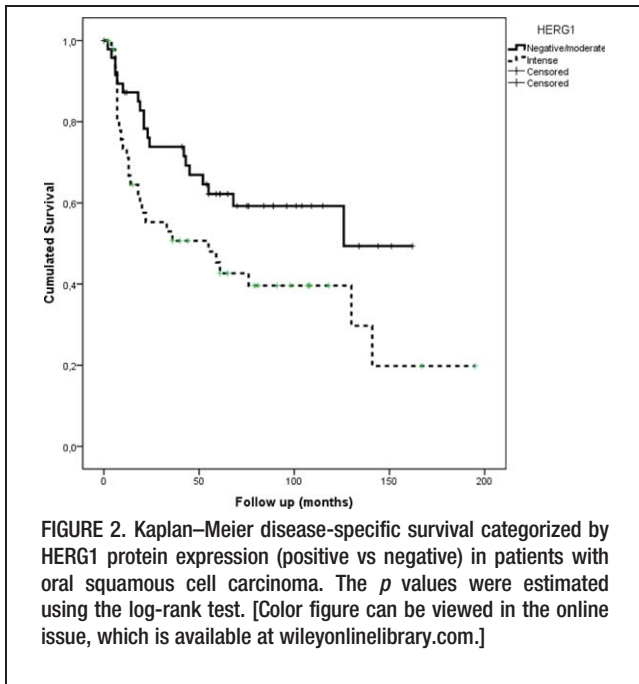
HERG1 protein expression in early stages of tumorigenesis and association with malignant progression

HERG1 protein expression was evaluated by immunohistochemistry (IHC) on a set of 62 patients with potentially malignant lesions of the oral cavity (leukoplakias). In 1 of the 62 cases, IHC was not evaluable. HERG1-positive expression was detected in 22 of the 62 oral leukoplakias (36%), whereas immunostaining was negligible in both stromal cells and normal adjacent epithelia (see Figure 1). In all, 14 of the 43 lesions (32%) with hyperplasia, 5 of the 8 lesions (62%) with mild dysplasia, and 3 of the 10 lesions (30%) with moderate or severe

TABLE 2. Multivariate survival analysis by prognostic factors using Cox proportional hazards modeling.

Variables	B coefficient (SE)	HR	95% CI	<i>p</i> value
TNM				.037
I + II	–	1 (Ref.)		
III + IV	0.701 (0.336)	2.016	1.043–3.896	
Surgical margin				< .0005
Free	–	1 (Ref.)		
Affected	1.538 (0.412)	4.654	2.075–10.439	
Recurrence				< .0005
No	–	1 (Ref.)		
Yes	1.733 (0.324)	5.659	2.996–10.690	

Abbreviations: HR, hazard ratio; CI, confidence interval; Ref. reference.



dysplasia exhibited HERG1-positive staining (*p* = .26). Thus, 32% of leukoplakias with hyperplasia and 44% of leukoplakias with dysplasia (*p* = .37) showed positive HERG1 immunostaining. The evolution to invasive carcinoma in relation to the histopathological diagnosis, tobacco or alcohol consumption, and HERG1 protein expression is shown in Table 3. During the follow-up period, 27 of 62 patients (43.5%) developed an invasive carcinoma at the same site of the previous premalignant lesion. The mean time to cancer diagnosis in the cases that progressed was 60.2 months, and the median time was 39 months (range, 7–226 months). There was a statistically significant association between the presence of epithelial dysplasia or alcohol consumption and progression to invasive OSCC, but not between HERG1 protein expression or tobacco consumption and progression to cancer. Thus, 8 of 22 patients (36%) carrying HERG1-positive leukoplakias developed oral cancer, compared to 18 of 39 patients (46%) who showed negative HERG1 expression.

HERG1 mRNA expression in oral squamous cell carcinoma and other head and neck squamous cell carcinoma subtypes

HERG1 mRNA expression was analyzed by real-time RT-PCR in a series of 22 fresh HNSCC tissue specimens, including primary tumors of different localizations (oral cavity, oropharynx, hypopharynx, and larynx). Primary keratinocytes as well as normal mucosa from nononcologic patients without exposure to tobacco carcinogens (cleft lip surgery and tonsillectomy) were used as nontumor controls. Quantitative analysis of HERG1 expression revealed that HERG1 mRNA levels significantly increased in tumors (range, 0.86 to 439-fold; mean 79) compared with primary keratinocytes and normal mucosa (range, 1 to 17-fold; mean 8; *p* = .013; Student’s *t* test).

Thus, a considerable proportion of tumors (80%; 18 cases) showed increased HERG1 mRNA levels compared with nontumor controls, although with varying levels depending on the tumor site (Figure 3).

DISCUSSION

To the best of our knowledge, this study is the first to evaluate the expression and clinical relevance of HERG1 potassium channel in OSCCs and oral leukoplakias.

The human EAG-related gene (HERG1, Kv11.1) potassium channel has been found to be overexpressed in a variety of tumors^{5,11,13,14,19–22} and it has also been hypothesized that HERG1 marks an early step for cancer development,^{13,14} and exerts a regulatory role on the modulation of cell proliferation, invasiveness, and survival.^{14,23} There is evidence that the HERG1 channel is involved in the progression of normality to adenocarcinomas through Barrett’s esophagus.¹³ In the present study, we analyzed the relevance of HERG1 expression and the progression from oral hyperplasia or dysplasia to squamous cell carcinoma, but we did not find a statistically significant relationship between HERG1 protein expression and the risk of progression to OSCC. HERG1 was not found to be expressed in normal epithelium, whereas positive HERG1 expression was detected in 36% of oral leukoplakias (32% of hyperplasias and 44% of dysplasias) and in 47% of OSCC. This suggests that HERG1 expression precedes the histopathological signs of OSCC and its expression increases as tumorigenesis progresses. However, this observation should be taken with caution because of the small sample size in this study.

The *HERG1* gene could be envisaged as an inflammatory-related gene,¹³ and a greater presence of inflammatory cells in samples of mucosal dysplasia and squamous cell carcinomas could be responsible for HERG1 gene expression and, hence, HERG1 channel expression could be a determinant factor in the switching

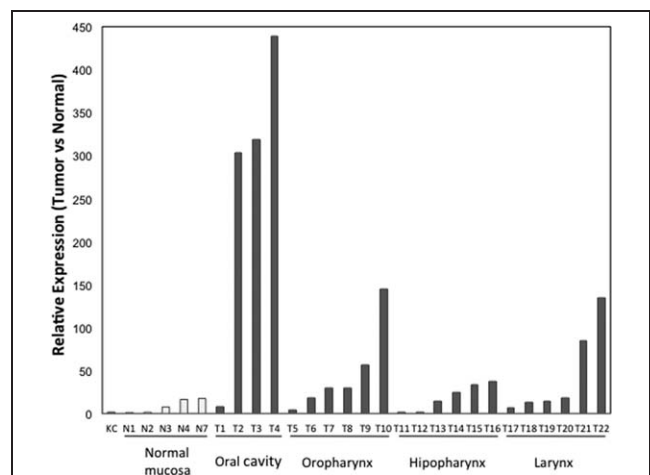


FIGURE 3. Analysis of HERG1 mRNA levels by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction in primary head and neck squamous cell carcinoma of different subsites. Data are expressed as the fold-change in HERG1A levels in the tumor sample normalized to L19 mRNA levels and relative to the normal mucosa.

TABLE 3. Evolution of the premalignant lesions in relation to histopathological diagnosis and HERG1 protein expression.

Characteristics	No. of cases (%)	Progression to carcinoma (%)	<i>p</i> value
Histopathology			.009
Hyperplasia	43 (69)	14 (32)	
Dysplasia	19 (31)	13 (68)	
HERG1 expression			.45
Negative	39 (64)	18 (46)	
Positive	22 (36)	8 (36)	
Tobacco consumption			.61
No	34 (55)	13 (38)	
Yes	21 (34)	10 (48)	
Ex-smoker	7 (11)	4 (57)	
Alcohol consumption			.04
No	48 (77)	18 (37)	
Yes	10 (16)	5 (50)	
Ex-drinker	4 (7)	4 (100)	

on of cellular metaplasia and dysplasia. In support of this statement, up to now, the HERG1 channel has been found to be overexpressed only in cancerous conditions,^{19,21} whereas no HERG1 expression was detected in hyperproliferative conditions, such as endometrial hyperplasias or colorectal adenomas. In the present study, HERG1 expression was detected in oral carcinomas, as well as epithelial hyperplasias and dysplasias supporting the idea that this could be seen as a precursor of oral cancer. In fact, 14 of 43 hyperplasias (33%) progressed to OSCC in our cohort. In addition, it is worth mentioning that the onset of the metaplastic process in the upper aerodigestive tract is always strictly dependent upon chronic inflammation, in an apparently different way that happens in colorectal carcinogenesis, which could explain the early onset of aberrant HERG1 expression.¹³ It has been hypothesized that HERG1 may belong to the class of genes that are expressed in progenitor or stem cells, being actively transcribed as these cells start to proliferate in response to growth factors, cytokine stimulation, or neoplastic transformation.²⁴

The acquisition of the capacity to invade surrounding tissues confers a more malignant phenotype to tumor cells and it is necessary for the establishment of metastases. Furthermore, HERG1 is functionally linked to hypoxia²⁵ and angiogenesis,¹⁸ which is a necessary condition for tumor progression. It has been demonstrated that HERG1 channels regulate tumor cells invasiveness,^{14,26} possibly through a physical and functional interaction with adhesion receptors of the integrin family,^{27,28} and integrins may contribute to localization of ion channels onto the membrane. We did not find a correlation between HERG1 and metastasis, probably as only 3 patients developed distant metastasis in our cohort. Nevertheless, there was a trend with a higher prevalence of lymph node metastasis in HERG1-positive cases ($p = .06$). Interestingly, HERG1 expression is significantly associated with advanced disease stages, tumor recurrence, and poor disease outcome, suggesting that HERG1 expression could contribute to disease progression. Our present data, however, do not allow such a conclusion, as this would require the performance of phenotype experiments to

explore the potential oncogenic role of HERG1. All these results were obtained determining HERG1 expression by IHC, the gold standard diagnostic tool used to assess the presence or absence of molecular markers on tumor tissues.²⁹ In addition, we also found increased HERG1 mRNA levels in a high percentage of OSCC and HNSCC of different subsites, thus further extending the application range of HERG1 as a biomarker.

In summary, the findings of this study reveal that aberrant HERG1 expression occurs in early stages of oral tumorigenesis, further increasing during tumor progression. More importantly, HERG1 expression emerges as a clinically relevant feature in OSCC progression, as well as a potential molecular target for the development of more effective drugs for patients with OSCC. However, it would be necessary to validate these results in large independent cohorts of patients, including also a higher number of cases with moderate and severe dysplasia.

REFERENCES

- Johnson NW, Jayasekara P, Amarasinghe AA. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. *Periodontol* 2000 2011;57:19–37.
- Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 2011;11:9–22.
- Kunzelmann K. Ion channels and cancer. *J Membr Biol* 2005;205:159–173.
- Wang H, Zhang Y, Cao L, et al. HERG K⁺ channel, a regulator of tumor cell apoptosis and proliferation. *Cancer Res* 2002;62:4843–4848.
- Smith GA, Tsui HW, Newell EW, et al. Functional up-regulation of HERG K⁺ channels in neoplastic hematopoietic cells. *J Biol Chem* 2002;277:18528–18534.
- Pardo LA, Contreras-Jurado C, Zientkowska M, Alves F, Stühmer W. Role of voltage-gated potassium channels in cancer. *J Membr Biol* 2005;205:115–124.
- Binggeli R, Weinstein RC. Membrane potentials and sodium channels: hypotheses for growth regulation and cancer formation based on changes in sodium channels and gap junctions. *J Theor Biol* 1986;123:377–401.
- Bauer CK, Schwarz JR. Physiology of EAG K⁺ channels. *J Membr Biol* 2001;182:1–15.
- Morais Cabral JH, Lee A, Cohen SL, Chait BT, Li M, Mackinnon R. Crystal structure and functional analysis of the HERG potassium channel N terminus: a eukaryotic PAS domain. *Cell* 1998;95:649–655.
- Arcangeli A, Bianchi L, Becchetti A, et al. A novel inward-rectifying K⁺ current with a cell-cycle dependence governs the resting potential of mammalian neuroblastoma cells. *J Physiol* 1995;489(Pt 2):455–471.
- Bianchi L, Wible B, Arcangeli A, et al. Herg encodes a K⁺ current highly conserved in tumors of different histogenesis: a selective advantage for cancer cells? *Cancer Res* 1998;58:815–822.
- Crociani O, Guasti L, Balzi M, et al. Cell cycle-dependent expression of HERG1 and HERG1B isoforms in tumor cells. *J Biol Chem* 2003;278:2947–2955.
- Lastraioli E, Taddei A, Messerini L, et al. hERG1 channels in human esophagus: evidence for their aberrant expression in the malignant progression of Barrett's esophagus. *J Cell Physiol* 2006;209:398–404.
- Menéndez ST, Rodrigo JP, Alvarez-Teijeiro S, et al. Role of HERG1 potassium channel in both malignant transformation and disease progression in head and neck carcinomas. *Mod Pathol* 2012;25:1069–1078.
- Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C, eds. TNM classification of malignant tumours, 7th edition. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2010.
- Goldstein BY, Chang SC, Hashibe M, La Vecchia C, Zhang ZF. Alcohol consumption and cancers of the oral cavity and pharynx from 1988 to 2009: an update. *Eur J Cancer Prev* 2010;19:431–465.
- Gale N, Pilch BZ, Sidransky D, Westra WH, Califano J. Epithelial precursor lesions. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, eds. World Health Organization Classification of Tumour. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon, France: IARC; 2005. pp 140–143.
- Menéndez ST, Villaronga MA, Rodrigo JP, et al. HERG1A potassium channel is the predominant isoform in head and neck squamous cell carcinomas: evidence for regulation by epigenetic mechanisms. *Sci Rep* 2016;6:19666.
- Masi A, Becchetti A, Restano-Cassulini R, et al. hERG1 channels are overexpressed in glioblastoma multiforme and modulate VEGF secretion in glioblastoma cell lines. *Br J Cancer* 2005;93:781–792.
- Lastraioli E, Guasti L, Crociani O, et al. HERG1 gene and HERG1 protein are overexpressed in colorectal cancers and regulate cell invasion of tumor cells. *Cancer Res* 2004;64:606–611.
- Ding XW, Yang WB, Gao S, et al. Prognostic significance of hERG1 expression in gastric cancer. *Dig Dis Sci* 2010;55:1004–1010.

22. Cherubini A, Taddei GL, Crociani O, et al. HERG potassium channels are more frequently expressed in human endometrial cancer as compared to non-cancerous endometrium. *Br J Cancer* 2000;83:1722–1729.
23. Urrego D, Tomczak AP, Zahed F, Stühmer W, Pardo LA. Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2014;369:20130094.
24. Li H, Liu L, Guo T, et al. Expression and functional role of HERG1, K⁺ channels in leukemic cells and leukemic stem cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2007;27:257–260.
25. Fontana L, D'Amico M, Crociani O, et al. Long-term modulation of HERG channel gating in hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;286:857–862.
26. Shao XD, Wu KC, Guo XZ, Xie MJ, Zhang J, Fan DM. Expression and significance of HERG protein in gastric cancer. *Cancer Biol Ther* 2008;7:45–50.
27. Arcangeli A, Becchetti A, Cherubini A, et al. Physical and functional interaction between integrins and hERG potassium channels. *Biochem Soc Trans* 2004;32(Pt 5):826–827.
28. Cherubini A, Hofmann G, Pillozzi S, et al. Human ether-a-go-go-related gene 1 channels are physically linked to beta1 integrins and modulate adhesion-dependent signaling. *Mol Biol Cell* 2005;16:2972–2983.
29. Taylor CR. An exaltation of experts: concerted efforts in the standardization of immunohistochemistry. *Hum Pathol* 1994;25:2–11.

Expression of the voltage-gated potassium channel Kv3.4 in oral leucoplakias and oral squamous cell carcinomas

Álvaro Fernández-Valle,^{1,*} Juan Pablo Rodrigo,^{2,3,*} Juana M García-Pedrero,^{3,*} Tania Rodríguez-Santamarta,¹ Eva Allonca,³ Paloma Lequerica-Fernández⁴ & Juan Carlos de Vicente^{1,3}

¹Department of Oral and Maxillofacial Surgery, ²Department of Otolaryngology, ³Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA), University of Oviedo, and ⁴Department of Biochemistry, Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), Oviedo, Asturias, Spain

Date of submission 2 September 2015
Accepted for publication 5 December 2015
Published online Article Accepted 9 December 2015

Fernández-Valle Á, Rodrigo J P, García-Pedrero J M, Rodríguez-Santamarta T, Allonca E, Lequerica-Fernández P & de Vicente J C

(2016) *Histopathology*. DOI: 10.1111/his.12917

Expression of the voltage-gated potassium channel Kv3.4 in oral leucoplakias and oral squamous cell carcinomas

Aims: The expression of the voltage-gated potassium channel Kv3.4 was investigated in both oral squamous cell carcinomas (OSCC) and oral leucoplakias to establish its clinical significance during the development and progression of OSCC.

Materials and methods: Tissue specimens from 62 patients with oral leucoplakia were collected prospectively and 100 patients with OSCC who underwent surgical treatment were collected retrospectively, and Kv3.4 expression was analysed by immunohistochemistry.

Results: Thirty-nine of 100 tumours exhibited Kv3.4-positive expression, and staining was associated with the degree of differentiation ($P = 0.05$) but showed no impact on patient prognosis. Abnormal Kv3.4 expression was detected in 16% (7 of 43)

hyperplastic lesions and at a significantly higher proportion in oral dysplasias (50%, 8 of 16 cases; $P = 0.008$), whereas expression was negligible in normal adjacent epithelia. Furthermore, patients carrying Kv3.4-positive lesions exhibited a higher progression risk than those with Kv3.4-negative lesions; however, histology but not Kv3.4 expression predicted oral cancer development significantly in this prospective cohort.

Conclusion: This study provides original evidence to demonstrate the early occurrence and high prevalence of abnormal Kv3.4 expression in oral leucoplakias. Our results support a role for Kv3.4 potassium channel in OSCC tumorigenesis rather than tumour progression and disease outcome.

Keywords: dysplasia, immunohistochemistry, Kv3.4, oral carcinoma, potassium channel

Introduction

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common malignant tumour of the head and neck

region, and accounts for more than 90% of cancers of the lip and oral cavity.¹ The survival of patients with OSCC has improved only marginally during recent years, despite advances in diagnosis and treatment.² Thus, novel markers are needed to distinguish differences in tumour behaviour besides the classical clinical and histopathological markers.³ Moreover, novel relevant molecules could provide molecular targets for the development of valuable alternative therapies in the fight against cancer.

Address for correspondence: J C de Vicente, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Hospital Universitario Central de Asturias, School of Medicine, c/Catedrático José Serrano s/n. 33006, Oviedo, Spain. e-mail: jvicente@uniovi.es

*These authors contributed equally to this work.

Ion channels are transmembrane proteins that regulate the flow of ions across biological membranes, showing critical roles in a large variety of physiological functions, including electrical signalling, neurone excitability, control of muscle contraction and hormone secretion. Although the knowledge on ion channels functions in excitable cells is vast, only recently have the manifold functions of ion channels in driving cancer cell behaviour been reported. There are more than 400 ion channel-encoding genes, which represent approximately 1.5% of the human genome.⁴ With 78 members, potassium channels can be divided into four main classes based on their domain structure and activation mechanism, including voltage-gated potassium channels (Kv), calcium-activated potassium channels (KCa), inward rectifying potassium channels (Kir), and two-pore domain potassium channels (K2P).⁴ The Kv family, encoded by 40 genes in humans, is the largest subset of potassium channels gated by changes in the membrane potential,⁴ and all family members share transmembrane domains that form the potassium conducting pore. Mounting evidence indicates that dysregulation of potassium channels occurs frequently in cancer, as has been demonstrated at genomic, transcriptional, post-translational and epigenetic levels. While ion channel functions were studied initially in only excitable cells, their involvement and impact on various aspects relevant to tumour cell biology, such as cell proliferation and migration, is now well established. In a seminal paper, DeCoursey *et al.*⁵ demonstrated that Kv channels are the predominant ion channels in proliferating human T lymphocytes. It has been accepted that most cell types undergo a transient hyperpolarization at the exit of G1 phase and that tumour cells are, on average, depolarized compared to non-tumour cells.⁶ Emerging evidence has shown that compared with the more hyperpolarized resting membrane potential in excitable cells, rapidly proliferating embryonic cells, stem cells or cancer cells are, in general, more depolarized, with a resting membrane potential at -20 to -85 mV.^{4,7} Therefore, one classical hypothesis is that membrane depolarization itself plays a functional role in tumour initiation or progression, while considering that the dynamic changes of membrane potential during cell cycle progression are likely to be cell-type-dependent. In addition, mammalian cells undergo marked cell volume and shape changes during cell cycle progression.⁸ By governing potassium ion flow and intracellular osmolarity that drive water flow across the membrane, potassium channels are central regulators for cell volume

dynamics important for cell cycle progression. The main source of evidence supporting the role of Kv channels on cell proliferation comes from experimental data showing that a broad spectrum of Kv blockers inhibit the proliferation of many cell types,⁶ including keratinocytes.^{9,10}

Kv3.4, a shaker-related Kv subfamily member, also called KCNC4, Shaw III or Raw3, acts to conduct potassium out of the cell, thereby depolarizing the cell membrane; it is characterized by a rapid inactivation of depolarized current through the occlusion of channel pore by inactivation domain¹¹ and playing a role in maintaining the resting membrane potential.¹² Chang *et al.*¹³ reported an increase of Kv3.4 mRNA expression in OSCC; however, the potential clinical relevance of Kv3.4 expression in OSCC remains to be established. In addition, the role of Kv3.4 in the early stages of oral tumorigenesis has not yet been explored. This prompted us to perform a thorough study to investigate the clinical significance of Kv3.4 in both the development and progression of OSCC by analysing Kv3.4 protein expression in a large series of 100 OSCC tissue specimens as well as 62 potentially premalignant lesions of the oral mucosa, subsequently ascertaining its involvement in both malignant transformation and disease progression.

Materials and methods

Surgical tissue specimens from 62 patients with potentially malignant disorders (leucoplakia) of the oral cavity were collected prospectively, and from 100 patients with OSCC who underwent surgical treatment at the Hospital Universitario Central de Asturias between 1995 and 2006 were collected retrospectively, in accordance with approved Institutional Review Board guidelines. All experimental protocols were approved by the Institutional Ethics Committee of the Hospital Universitario Central de Asturias (date of approval 9 July 2013) and by the Regional CEIC from Principado de Asturias (date of approval 18 July 2013; approval number: 81/2013) for project PI13/00259. Informed consent was obtained from all patients. Patients with oral leucoplakia included in this study had to meet the following criteria: (i) pathological diagnosis of oral epithelial hyperplasia or dysplasia; (ii) no previous history of head and neck cancer; (iii) complete excisional biopsy of the lesion; and (iv) a minimum follow-up of 5 years (or until progression to malignancy occurred). Representative tissue samples were obtained from archival, paraffin-embedded blocks.

The sections were selected for study as follows: in pre-malignant lesions, whole tissue sections from the biopsy blocks used for histological diagnosis were subsequently stained and evaluated. In carcinomas, one representative section from the middle of the tumour that also included the tumour border (containing interfaces between the tumour nests, cords or sheets and stroma) and normal adjacent epithelium was selected for staining.

All patients with OSCC included in this study had a single primary tumour and none had received preoperative chemotherapy or radiotherapy. Postoperative radiotherapy was administered to 59 oral cancer patients (59%). Thirty-six patients (36%) were women, and the mean age of the whole sample was 61.6 [standard deviation (SD): 13.44; range 30–91 years]. Fifty-six patients (56%) were smokers and 53% were alcohol consumers. The stage of disease was determined after the surgical resection of the tumour according to the tumour–node–metastasis (TNM) system of the International Union against Cancer (7th ed.).¹⁴ Tobacco and alcohol consumption history was determined from medical records. Alcohol consumption was described in terms of beer, wine or hard liquor. A drinker was defined as a person who self-reported consuming four or more drinks of any alcoholic beverage type per day for at least 10 years. For comparability, one drink is equivalent to 14 g of ethanol, which corresponds generally to 330 ml of beer, 150 ml of wine and 36 ml of hard liquor.¹⁵ Patients were followed-up every 2 months for the first 6 months after completing the treatment, every 3 months until the second year and every 6 months thereafter.

The epithelial precursor lesions (potentially pre-malignant lesions) were classified into categories of squamous cell hyperplasia and mild, moderate or severe dysplasia, according to the World Health Organization (WHO) classification.¹⁶ Forty-three cases (69.4%) were classified as hyperplasia, eight (12.9%) as mild dysplasia, seven (11.3%) as moderate dysplasia and four (6.5%) as severe dysplasia/carcinoma *in situ*. Twenty-seven (43.5%) patients were women, and the mean age was 61.08 (SD: 12.44; range 30–85 years). Twenty-eight (45%) patients were smokers, and 14 (22.6%) were also habitual alcohol drinkers.

IMMUNOHISTOCHEMISTRY (IHC)

The formalin-fixed, paraffin-embedded tissues were cut into 4- μ m sections and dried on capillary-gap glass slides (DakoCytomation; Dako, Carpinteria, CA,

USA). The sections were deparaffinized with standard xylene and hydrated through graded alcohol into water. Antigen retrieval was performed using Envision Flex Target Retrieval Solution pH 9.0 (Dako). Staining was carried out at room temperature on an automatic staining work-station (Dako Autostainer Plus) with rabbit polyclonal anti-Kv3.4 primary antibody (Alomone Laboratories Ltd, Jerusalem, Israel) at 1:150 dilution using the Dako Envision Flex + Visualization System (Dako). Counterstaining with haematoxylin was the final step. Kv3.4 expression in vascular smooth muscle served as an internal positive control and staining was abolished by preincubation of the primary antiserum with the peptide antigen. Because Kv3.4 staining showed a homogeneous distribution, a semi-quantitative scoring system based on staining intensity was applied. Immunostaining was scored by two independent observers blinded to clinical data as negative (0), weakly positive (1+) or strongly positive (2+). Scores equal to 2 were considered as Kv3.4-positive expression.

STATISTICAL ANALYSES

Categorical data were compared using χ^2 or Fisher's exact tests. Survival curves were calculated using the Kaplan–Meier product–limit estimate. Differences between survival times were analysed by the long-rank method. All tests were two-sided, with *P*-values ≤ 0.05 as the threshold to be considered statistically significant. All statistical analyses were performed using the computer package PASW Statistics 18 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

KV3.4 PROTEIN EXPRESSION IN INVASIVE OSCC

To determine the pattern and cellular distribution of Kv3.4 protein expression, immunohistochemical analysis of Kv3.4 was carried out in paraffin-embedded tissue specimens from 100 patients with oral squamous cell carcinomas. Normal epithelium showed no Kv3.4 expression; however, in a few cases we observed some positive membranous staining in the most superficial layers of epithelium, whereas no expression was detected in the basal and suprabasal layers. Strong positive staining was observed in vascular smooth muscle cells that served as internal positive controls, while stromal cells showed negligible Kv3.4 expression. Thirty-nine of 100 tumours exhibited Kv3.4-positive expression (Figure 1), compared

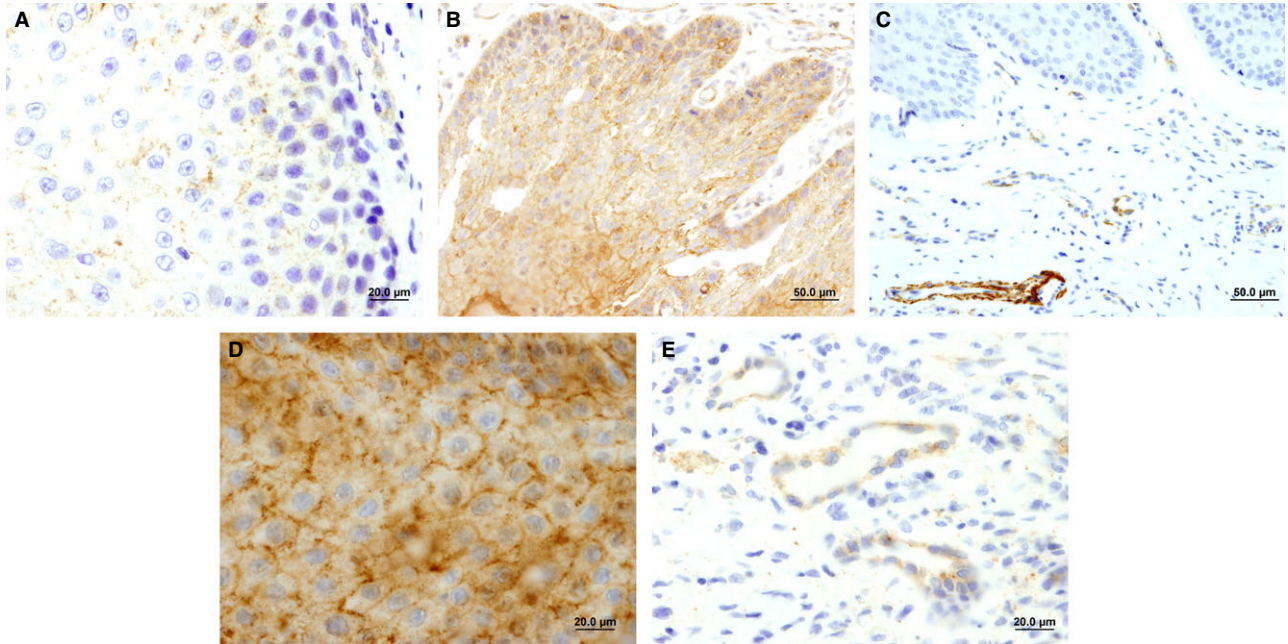


Figure 1. Immunohistochemical analysis of Kv3.4 protein expression. Representative examples of oral squamous cell carcinomas showing negative (A) and positive Kv3.4 staining (B), and examples of oral leucoplakias with negative (C) and positive Kv3.4 staining (D). The strong staining in vascular smooth muscle cells served as internal positive control (C,E).

with the corresponding normal epithelia. Kv3.4 expression in tumours was detected preferentially in the membrane, but also in the cytoplasm.

ASSOCIATIONS OF KV3.4 PROTEIN EXPRESSION WITH CLINICOPATHOLOGICAL PARAMETERS AND PATIENT OUTCOME

The relationships between Kv3.4 expression and the clinicopathological variables are shown in Table 1. Kv3.4 expression decreased with pT classification, pN classification and disease stage, although these differences did not reach statistical significance. Interestingly, Kv3.4 protein expression was not observed in any of the poorly differentiated tumours, but in 54% of moderately and in 42% of well-differentiated tumours, with differences reaching statistical significance ($P = 0.05$).

The median follow-up of the whole series was 30.5 months (range 1–195 months) and the median follow-up of patients alive at the last visit was 89 months (range 5–195 months). During the follow-up period, 36 cases developed locoregional recurrence. Kv3.4 was not associated with tumour recurrence ($P = 0.66$), and no differences in disease-specific survival or overall survival were observed when comparing patients with positive versus those

with negative Kv3.4 expression (log-rank test, $P = 0.88$ and $P = 0.35$, respectively).

KV3.4 PROTEIN EXPRESSION IN THE EARLY STAGES OF TUMORIGENESIS

Kv3.4 protein expression was also evaluated by immunohistochemistry on a set of 62 oral precursor lesions to determine the timing of Kv3.4 expression during OSCC tumorigenesis. In three cases (4.8%) the IHC staining was not evaluable (one hyperplastic lesion and two severe dysplasias). Eighteen (31%) of the 59 mucosal lesions did not show Kv3.4 protein staining. Among the remaining cases, 28 (47%) of the 59 mucosal lesions displayed a weak positive staining and 13 (22%) cases showed strong staining (Figure 1). Thus, 22% of oral premalignant lesions were considered as Kv3.4-positive expression.

The evolution to invasive carcinoma in relation to the histopathological diagnosis and Kv3.4 protein expression is shown in Table 2. Among the 62 oral leucoplakias included in this study, 43 (69%) showed an epithelial hyperplasia, while the remaining 19 (31%) cases displayed different degrees of dysplasia (eight mild, seven moderate and four severe dysplasia). All these cases were included in the final analysis. During the follow-up period, 27 (43%) of

Table 1. Association between Kv3.4 protein expression and clinicopathological findings in oral squamous cell carcinoma

Characteristic	Number of cases	Kv3.4 protein expression (%)	<i>P</i>
Primary site			
Tongue	43	16 (40)	0.47
Floor of the mouth	26	8 (36)	
Gum	19	8 (44)	
Palate	2	0 (0)	
Buccal	4	3 (75)	
Retromolar	6	4 (67)	
pT			
T1	21	9 (47)	0.96
T2	38	14 (42)	
T3	16	6 (40)	
T4	25	10 (40)	
pN			
N0	60	24 (45)	0.53
N1–3	40	15 (38)	
Clinical stage			
I–II	39	16 (50)	0.37
III	22	8 (38)	
IV	39	15 (38)	
Tumour differentiation			
Well	64	25 (42)	0.05
Moderately	30	14 (54)	
Poorly	6	0 (0)	
Recurrence			
No	64	26 (44)	0.66
Yes	36	13 (39)	
Clinical status at the end of the follow-up			
Live and without recurrence	41	18 (49)	0.07
Dead of index cancer	49	20 (44)	
Lost or died of other causes	10	1 (10)	

Table 2. Evolution of the premalignant lesions in relation to histopathological diagnosis and Kv3.4 protein expression

Characteristic	Number of cases (%)	Progression to carcinoma (%)	<i>P</i>
Histopathology			
Hyperplasia	43 (69)	14 (33)	0.009
Dysplasia	19 (31)	13 (68)	
Kv3.4 expression			
Negative	44 (75)	17 (39)	0.58
Positive	15 (25)	7 (47)	

62 patients developed an invasive carcinoma at the same site as the previous premalignant lesion. The mean and median times to cancer diagnosis in the cases that progressed were 55 and 24.5 months, respectively (range 7–308 months). Patients with oral epithelial lesions with dysplasia exhibited an increased risk of malignant progression to OSCC compared to those with hyperplastic lesions ($P = 0.009$). Patients carrying Kv3.4-positive lesions also showed a higher progression risk than Kv3.4-negative lesions, although differences did not reach statistical significance ($P = 0.58$). In addition, Kv3.4 expression was found to correlate significantly with histology. Thus, positive Kv3.4 immunostaining was detected in seven (16%) of 43 hyperplastic lesions and eight (50%) of 16 lesions with dysplasia ($P = 0.008$). Positive Kv3.4 immunostaining was observed precisely in three (37%) of eight mild dysplasias and five (71%) of seven moderate dysplasias. Unfortunately, this prospective series included only four lesions with severe dysplasia, while IHC data were available in only two cases, and none of them showed Kv3.4-positive staining.

Kv3.4 protein expression was also evaluated in 16 of the 27 invasive OSCC developed in this cohort and immunostaining was compared to that of the corresponding patient-matched premalignant lesion. Nevertheless, no correlation was observed between Kv3.4 expression in patient-matched samples (oral leucoplakia versus OSCC) ($P = 0.86$). In two (67%) of three Kv3.4-positive lesions, immunostaining was maintained in the invasive carcinomas. However, eight (61.5%) of 13 premalignant lesions with negative Kv3.4 expression showed strong Kv3.4 immunostaining in the corresponding OSCC that developed subsequently.

Discussion

Aberrances in several ion channels are present in multiple human tumours⁶ and, consequently, cancer could be considered as a channelopathy¹⁷ or a disease brought about by disturbed function of ion channels, due to dysregulation of channel expression or other modifications resulting in altered function.¹⁸ Cell proliferation was one of the first identified aspects of cell physiology where potassium channels play a crucial role based on the observation that wide-spectrum potassium channels blockers inhibit proliferation.⁵ In fact, it is largely accepted that most cell types undergo a transient hyperpolarization during the G1/S transition, cell types with a very hyperpolarized resting potential, such as muscle cells and neurones, show little or no mitotic activity and, conversely, actively proliferating cells, such as tumour cells, are highly depolarized.¹⁹ The membrane potential is not constant along the cell cycle, and thus cell-cycle-dependent changes in membrane permeability are required. Few published papers have documented the role of potassium channels in the biology of cells other than neural or lymphoid origin. Pardo *et al.*²⁰ have advanced evidence that human ether-à-go-go (EAG) Kv plays a role in controlling proliferation and transformation of epithelial cells.

Only two studies have been published so far that address the role of the potassium channel Kv3.4 in OSCC.^{11,13} Chang *et al.*¹³ reported Kv3.4 mRNA expression in 64% OSCC compared to 29% in non-cancerous matched tissue. However, Kv3.4 protein expression could not be evaluated due to the lack of an appropriate commercially available antibody. Furthermore, Lew *et al.*¹¹ amplified Kv3.4 coding sequence by reverse transcription–polymerase chain reaction (RT–PCR) and constructed an expression vector carrying this sequence that was transfected into the OSCC-derived cell line oral epidermoid carcinoma Meng-1 (OECM-1). Kv3.4 overexpression into OECM-1 cells led to increased cell growth. Menéndez *et al.*²¹ investigated Kv3.4 protein expression for the first time in laryngeal and pharyngeal squamous carcinomas and also in a series of laryngeal dysplasias. They found that patients with Kv3.4-positive lesions had a higher laryngeal cancer incidence than those with negative lesions. Contrasting this, Kv3.4 protein expression did not show a relevant role during tumour progression, as Kv3.4 expression in carcinomas was found to diminish in advanced disease stages and had no impact on patient prognosis and was not correlated with invasive potential. Interestingly, they found an inconsistency between Kv3.4 mRNA levels and protein

expression. Therefore, caution must be taken when interpreting mRNA expression data, as they may not truly reflect Kv3.4 protein expression and function.

To our knowledge, this study is the first to investigate the expression pattern of Kv3.4 potassium channel subunit in OSCC and oral precancerous lesions to ascertain its clinical role in both malignant transformation and tumour progression. Our findings demonstrate that Kv3.4 is expressed abnormally in 16% hyperplastic lesions and at a higher proportion in oral dysplasias (50%), whereas expression was negligible in normal adjacent epithelia. Even though patients carrying Kv3.4-positive dysplastic lesions exhibited a higher progression risk, histology but not Kv3.4 expression predicted oral cancer development significantly in our cohort. It is worth noting that we selected a consecutive series of patients for analysis with clinical diagnosis of oral leucoplakia, so only 30% of lesions showed dysplasia. This could explain discrepancies with previous findings using a retrospective series of laryngeal dysplasias.²¹ Our results support a role for Kv3.4 potassium channel in OSCC tumorigenesis rather than in disease progression, as Kv3.4 expression had no impact upon patient prognosis, tended to diminish in advanced OSCC and did not correlate with invasive potential. These data are in good agreement with those reported by Menendez *et al.*²¹ Nevertheless, Kv3.4 expression alone does not seem to be sufficient to promote tumorigenesis, as we observed that a considerable proportion of oral tumours developed from Kv3.4-negative lesions. Alternatively, it is also plausible that lesions showing negative Kv3.4 expression were biopsied before the abnormality occurred, the cancers developed from unexamined lesions, or due to clonal heterogeneity.

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is a highly heterogeneous disease that involves various different anatomical sites and the cellular and environmental context may also dictate the biological role of this potassium channel, but whether Kv3.4 function is cell type or tissue-specific will require further study. Cellular transformation by oncogenes *Ras* and *Src* and oncoviruses SV and SV40 increases potassium channel activity.^{22–25} In our study these oncogenes were not assessed; however, the relationship between Kv3.4 protein expression and the classical risk factors for OSCC, such as tobacco or alcohol consumption, did not show statistical significance ($P = 0.51$ and 0.77 , respectively).

According to our results, increased Kv3.4 expression in oral leucoplakias may confer a proliferative advantage to the cells carrying this alteration, ultimately favouring progression to OSCC. Two main

hypotheses attempt to explain the effects of Kv channels on proliferation: cell volume and membrane potential.⁶ Potassium channels may control the cell volume by affecting potassium flow.²⁶ Although how Kv3.4 channel activity influences cell proliferation is not understood completely, Lew *et al.*¹¹ speculated that this channel is involved in maintaining the depolarized membrane potential required for cancer cells. Nearly every type of Kv channel is regulated by phosphorylation of serine, threonine or tyrosine residues on intracellular domains of the channel.²⁷ If the role of Kv channels in cancer were due simply to membrane potential changes induced by potassium currents, then activation of most types of Kv channels would affect proliferation. However, this is not the case.⁶ Additionally, ion channels are the targets of many intracellular signalling pathways and can function as signal transducers themselves. Potassium channels can also regulate cancer cell migration via non-canonical functions. Most channels form macromolecular complexes with other proteins that can deeply change the properties of the channel itself, as well as influence its localization. In these macromolecular complexes Kv channels act as voltage sensors, but they may also act as a link between the extracellular environment and the cytoplasm. For example, the human ether-à-go-go-related gene (hERG) channel can form a macromolecular complex with vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR-1) and β 1-integrin, and assembly of this complex confers a promigratory phenotype in leukaemia.²⁸

Weaknesses of this study are that, in contrast to the oral leucoplakias, the 100 oral cancer patients were collected retrospectively, and the quality of the variables recorded in retrospective designs is not the same as in prospective ones. Even though we selected a prospective series of oral leucoplakias, almost 70% of the lesions did not show epithelial dysplasia, which is considered the gold standard for evaluating the risk of oral cancer development. In addition, only very few cases with severe dysplasia were included and IHC data were available in only two cases, both showing Kv3.4-negative staining which may represent another limitation. Conversely, there is substantial inter- and intraobserver variation when evaluating the presence and severity of epithelial dysplasia,²⁹ and such diverse histopathology and clinical behaviour make it difficult to determine accurately the contribution of Kv3.4 in early tumorigenesis. Hence, prospective studies involving larger numbers of patients with dysplasia are needed to further confirm the clinical utility of Kv3.4 expression as a biomarker for cancer risk assessment.

Nevertheless, this study also shows some strengths. Although hyperplasia is not considered an initial step of oral carcinogenesis we observed a trend of Kv3.4 immunopositivity from hyperplasia to dysplasia–carcinoma, which highlights the potential relevance of this potassium channel in tumorigenesis, and its utility in early diagnostic assessment. According to our results and those by Menendez *et al.*,²¹ Kv3.4 emerges as a promising new diagnostic candidate for explaining the tumorigenesis of keratinocytes, together with morphological criteria. Therefore, immunohistochemical analysis of Kv3.4 could be a useful tool to identify patients at risk for tumour development. Furthermore, immunohistochemistry has clear advantages, as it is easy and cost-effective, thus emphasizing that Kv3.4 determination may help to risk-stratify patients and guide treatment. It is also plausible that Kv3.4 channel may constitute a new valuable membrane therapeutic target for the treatment and prevention of OSCC. Ion channels are viable pharmacological targets for cancer, and there is an overwhelming confidence that they will have a great potential in diagnosis and anti-neoplastic therapy.³⁰

Oral cancer is treated mainly by surgically resection and radiation therapy. However, due to the frequency of cancer relapse and treatment resistance, novel molecular markers must be identified for the development of new alternative therapies. Ion channels have become a promising player for the development of novel anticancer therapies. Here, we provide original evidence to demonstrate the early occurrence and high prevalence of abnormal Kv3.4 expression in oral leucoplakias. More importantly, our results indicate that abnormal Kv3.4 expression is a clinically and biologically relevant feature during OSCC tumorigenesis and malignant transformation, although expression does not seem to have a major impact upon OSCC progression or disease outcome.

Acknowledgements

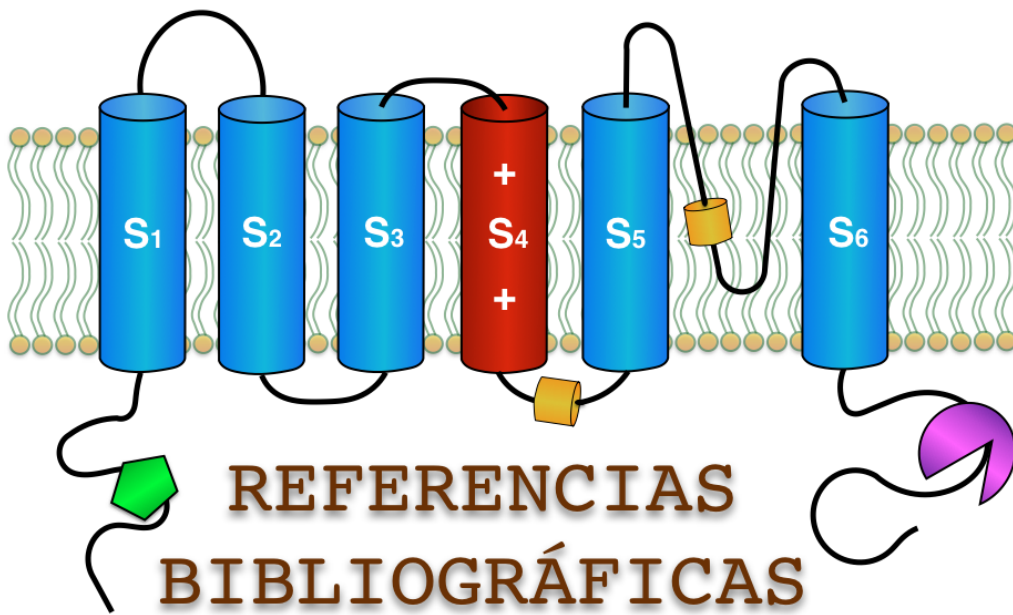
This study was supported by grants from the Plan Nacional de I+D+I 2013-2016 ISCIII (CP13/00013 and PI13/00259), RD12/0036/0015 of Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC), Spain and the FEDER Funding Program from the European Union.

Conflict of interests

No authors have any conflicts of interest to declare regarding this paper.

References

- Johnson NW, Jayasekara P, Amarasinghe AA. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. *Periodontol.* 2000; **2011**; 19–37.
- Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D. Head and neck cancer. *N. Engl. J. Med.* 2001; **345**: 1890–1900.
- Haddad RI, Shin DM. Recent advances in head and neck cancer. *N. Engl. J. Med.* 2008; **359**: 1143–1154.
- Huang X, Jan LY. Targeting potassium channels in cancer. *J. Cell Biol.* 2014; **206**: 151–162.
- DeCoursey TE, Chandy KG, Gupta S, Cahalan MD. Voltage-gated K⁺ channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis? *Nature* 1984; **307**: 465–468.
- Pardo LA, Contreras-Jurado C, Zientkowska M, Alves F, Stühmer W. Role of voltage-gated potassium channels in cancer. *J. Membr. Biol.* 2005; **205**: 115–124.
- Yang M, Brackenbury WJ. Membrane potential and cancer progression. *Front. Physiol.* 2013; **4**: 185.
- Habela CW, Sontheimer H. Cytoplasmic volume condensation is an integral part of mitosis. *Cell Cycle* 2007; **6**: 1613–1620.
- Mauro T, Dixon DB, Komuves L, Hanley K, Pappone PA. Keratinocyte K⁺ channels mediate Ca²⁺ -induced differentiation. *J. Invest. Dermatol.* 1997; **108**: 864–870.
- Wohlrab D, Markwardt F. Influence of ion channel blockers on proliferation and free intracellular Ca²⁺ concentration of human keratinocytes. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 1999; **12**: 257–265.
- Lew TS, Chang CS, Fang KP, Chen CY, Chen CH, Lin SC. The involvement of K(v)3.4 voltage-gated potassium channel in the growth of an oral squamous cell carcinoma cell line. *J. Oral Pathol. Med.* 2004; **33**: 543–549.
- Rudy B, Sen K, Vega-Saenz de Miera E, Lau D, Ried T, Ward DC. Cloning of a human cDNA expressing a high voltage-activating, TEA-sensitive, type-A K⁺ channel which maps to chromosome 1 band p21. *J. Neurosci. Res.* 1991; **29**: 401–412.
- Chang KW, Yuan TC, Fang KP *et al.* The increase of voltage-gated potassium channel Kv3.4 mRNA expression in oral squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.* 2003; **32**: 606–611.
- Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *TNM classification of malignant tumors*. 7th ed. New York: Wiley, 2009.
- Goldstein BY, Chang SC, Hashibe M, La Vecchia C, Zhang ZF. Alcohol consumption and cancers of the oral cavity and pharynx from 1988 to 2009: an update. *Eur. J. Cancer Prev.* 2010; **9**: 431–465.
- Gale N, Pilch BZ, Sidransky D, Westra WH, Califano J. Epithelial precursor lesions. In Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D eds. *World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours*. Lyon: IARC, 2005; 140–143.
- Litan A, Langhans SA. Cancer as a channelopathy: ion channels and pumps in tumor development and progression. *Front. Cell Neurosci.* 2015; **9**: 86.
- Pedersen SF, Stock C. Ion channels and transporters in cancer: pathophysiology, regulation, and clinical potential. *Cancer Res.* 2013; **73**: 1658–1661.
- Wonderlin WF, Strobl JS. Potassium channels, proliferation and G1 progression. *J. Membr. Biol.* 1996; **154**: 91–107.
- Pardo LA, del Camino D, Sánchez A *et al.* Oncogenic potential of EAG K(+) channels. *EMBO J.* 1999; **18**: 5540–5547.
- Menéndez ST, Rodrigo JP, Allonca E *et al.* Expression and clinical significance of the Kv3.4 potassium channel subunit in the development and progression of head and neck squamous cell carcinomas. *J. Pathol.* 2010; **221**: 402–410.
- Huang Y, Rane SG. Potassium channel induction by the Ras/Raf signal transduction cascade. *J. Biol. Chem.* 1994; **269**: 31183–31189.
- Repp H, Draheim H, Ruland J *et al.* Profound differences in potassium current properties of normal and Rous sarcoma virus-transformed chicken embryo fibroblasts. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1993; **90**: 3403–3407.
- Draheim HJ, Repp H, Dreyer F. Src-transformation of mouse fibroblasts induces a Ca(2+) -activated K⁺, current without changing the T-type Ca²⁺ current. *Biochim. Biophys. Acta* 1995; **1269**: 57–63.
- Teulon J, Ronco PM, Geniteau-Legendre M *et al.* Transformation of renal tubule epithelial cells by simian virus-40 is associated with emergence of Ca(2+) -insensitive K⁺ channels and altered mitogenic sensitivity to K⁺ channel blockers. *J. Cell. Physiol.* 1992; **151**: 113–125.
- Yao X, Kwan HY. Activity of voltage-gated K⁺ channels is associated with cell proliferation and Ca²⁺ influx in carcinoma cells of colon cancer. *Life Sci.* 1999; **65**: 55–62.
- Ismailov II, Benos DJ. Effects of phosphorylation on ion channel function. *Kidney Int.* 1995; **48**: 1167–1179.
- Pillozzi S, Brizzi MF, Bernabei PA *et al.* VEGFR-1 (FLT-1), beta1 integrin, and hERG K⁺ channel for a macromolecular signaling complex in acute myeloid leukemia: role in cell migration and clinical outcome. *Blood* 2007; **110**: 1238–1250.
- Shi P, Liu W, Zhou ZT, He QB, Jiang WW. Podoplanin and ABCG2: malignant transformation risk markers for oral lichen planus. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 2010; **19**: 844–849.
- Fraser SP, Pardo LA. Ion channels: functional expression and therapeutic potential in cancer. Colloquium on Ion Channels and Cancer. *EMBO Rep.* 2008; **9**: 512–515.
- Gadsby DC. Ion channels versus ion pumps: the principal difference, in principle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2009; **10**: 344–352.



-
- ¹ Johnson NW, Jayasekara P, Amarasinghe AA. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. *Periodontol* 2000 2011;57:19-37.
- ² Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D. and Bray, F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* 2015;136: E359–E386
- ³ Gandini S, Botteri E, Iodice S, Boniol M, Lowenfels AB, Maisonneuve P, et al. Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer* 2008;122:155-64.
- ⁴ Turati F, Garavello W, Tramacere I, Pelucchi C, Galeone C, Bagnardi V, Corrao G, Islami F, Fedirko V, Boffetta P, La Vecchia C, Negri E. A meta-analysis of alcohol drinking and oral and pharyngeal cancers: results from subgroup analyses. *Alcohol Alcohol* 2013;48:107-18.
- ⁵ Hashibe M, Brennan P, Chuang S-C, Boccia S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso D, Daudt AW, Fabianova E, Fernandez L, Wünsch-Filho V, Franceschi S, Hayes RB, Herrero R, Kelsey K, Koifman S, La Vecchia C, Lazarus P, Levi F, Lence JJ, Mates D, Matos E, Menezes A, McClean MD, Muscat J, Eluf-Neto J, Olshan AF, Purdue M, Rudnai P, Schwartz SM, Smith E, Sturgis EM, Szeszenia-Dabrowska N, Talamini R, Wei Q, Winn DM, Shangina O, Pilarska A, Zhang Z-F, Ferro G, Berthiller J, Boffetta P. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18:541-50.
- ⁶ Nagao T, Ikeda N, Warnakulasuriya S, Fukano H, Yuasa H, Yano M, Miyazaki H, Ito Y. Serum antioxidant micronutrients and the risk of oral leukoplakia among Japanese. *Oral Oncol.* 2000;36:466-70.
- ⁷ Nieminen MT, Uittamo J, Salaspuro M, Rautemaa R. Acetaldehyde production from ethanol and glucose by non-*Candida albicans* yeasts in vitro. *Oral Oncol* 2009;45:245-8.
- ⁸ Shillitoe EJ. The role of viruses in squamous cell carcinoma of the oropharyngeal mucosa. *Oral Oncol* 2009;45:351-5.
- ⁹ Feller L, Wood NH, Khammissa RA, Lemmer J. Human papillomavirus-mediated carcinogenesis and HPV-associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Part 1: human papillomavirus-mediated carcinogenesis. *Head Face Med* 2010;6:14.

-
- ¹⁰ Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D. Head and neck cancer. *N Engl J Med* 2001;345:1890-1900.
- ¹¹ Rapidis A, Gullane P, Langdon J, Lefebvre J, Scully C, Shah P. Major advances in the knowledge and understanding of the epidemiology, aetiopathogenesis, diagnosis, management and prognosis of oral cancer. *Oral Oncology* 2009;45:299-300.
- ¹² Haddad RI, Shin DM. Recent advances in head and neck cancer. *N Engl J Med* 2008;359:1143-1154.
- ¹³ Huang X, Jan LY. Targeting potassium channels in cancer. *J Cell Biol* 2014;206:151-162.
- ¹⁴ DeCoursey TE, Chandy KG, Gupta S, Cahalan MD. Voltage-gated K⁺ channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis? *Nature* 1984;307:465-468.
- ¹⁵ Pardo LA, Contreras-Jurado C, Zientkowska M, Alves F, Stühmer W. Role of voltage-gated potassium channels in cancer. *J Membr Biol* 2005;205:115-124.
- ¹⁶ Yang M, Brackenbury WJ. Membrane potential and cancer progression. *Front Physiol* 2013;4:185.
- ¹⁷ Habela CW, Sontheimer H. Cytoplasmic volume condensation is an integral part of mitosis. *Cell Cycle* 2007;6:1613-1620.
- ¹⁸ Mauro T, Dixon DB, Komuves L, Hanley K, Pappone PA. Keratinocyte K⁺ channels mediate Ca²⁺-induced differentiation. *J Invest Dermatol* 1997;108:864-870.
- ¹⁹ Wohlrab D, Markwardt F. Influence of ion channel blockers on proliferation and free intracellular Ca²⁺ concentration of human keratinocytes. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 1999;12:257-265.
- ²⁰ Cooper JS, Porter K, Mallin K, Hoffman HT, Weber RS, Ang KK, Gay EG, Langer CJ. National Cancer Database report on cancer of the head and neck: 10-year update. *Head Neck* 2009;31:748-758
- ²¹ Stewart BW, Kleihues P. (Eds.) *World cancer report*. IARC press: Lyon, 2003
- ²² Sugerman PB, Savage NW. Current concepts in oral cancer. *Aust Dent J* 1999;44:147-56
- ²³ Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 2013;49:1374-403

-
- ²⁴ Forman D, Bray F, Brewster DH, Gombe Mbalawa C, Kohler B, Piñeros M, Steliarova-Foucher E, Swaminathan R and Ferlay J. Cancer Incidence in Five Continents, Vol. X; IARC press: Lyon, 2009
- ²⁵ Silverman S. Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers. The outcomes, the trends, the challenge. *J Am Dent Assoc* 2001;132(supl):7-11.
- ²⁶ García-Pola Vallejo MJ. Cáncer oral. Magnitud del problema en España. *RCOE* 2009;14:167-70.
- ²⁷ Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KA. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people - a comprehensive literature review. *Oral Oncol* 2001;37:401-18.
- ²⁸ Shiboski CH, Schmidt BL, Jordan RCK. Tongue and tonsil carcinoma – increasing trends in the US population ages 20–44 years. *Cancer* 2005;103:1843-9.
- ²⁹ Schantz SP, Yu GP. Head and neck cancer incidence trends in young Americans, 1973- 1997, with a special analysis for tongue cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002;128:268-74.
- ³⁰ Annertz K, Anderson H, Biorklund A, Moller T, Kantola S, Mork J, et al. Incidence and survival of squamous cell carcinoma of the tongue in scandinavia, with special reference to young adults. *Int J Cancer* 2002;101:95-9.
- ³¹ Pelucchi C, Gallus S, Garavello W, Bosetti C, La Vecchia C. Cancer risk associated with alcohol and tobacco use: focus on upper aero-digestive tract and liver. *Alcohol Res Health* 2006;29:193-8.
- ³² Johnson N. Tobacco use and oral cancer: a global perspective. *J Dent Educ* 2001;65:328- 39.
- ³³ Ali NS, Khuwaja AK, Ali T, Hameed R. Smokeless tobacco use among adult patients who visited family practice clinics in Karachi, Pakistan. *J Oral Pathol Med* 2009;38:416-21.
- ³⁴ Chen YJ, Chang JT, Liao CT, Wang HM, Yen TC, Chiu CC, Lu YC, Li HF, Cheng AJ. Head and neck cancer in the betel quid chewing area: recent advances in molecular carcinogenesis. *Cancer Sci* 2008 Aug;99(8):1507-14.
- ³⁵ Howie NM, Trigkas TK, Cruchley AT, Wertz PW, Squier CA, Williams DM. Short-term exposure to alcohol increases the permeability of human oral mucosa. *Oral Dis* 2001;7:349-54.
- ³⁶ Kurkivuori J, Salaspuro V, Kaihovaara P, Kari K, Rautemaa R, Grönroos L, et al. Acetaldehyde production from ethanol by oral streptococci. *Oral Oncol* 2007;43:181-6.

-
- ³⁷ Campisi G, Panzarella V, Giuliani M, Lajolo C, Di Fede O, Falaschini S, et al. Human papillomavirus: its identity and controversial role in oral oncogenesis, premalignant and malignant lesions (review). *Int J Oncol* 2007;30:813-23.
- ³⁸ Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zuhurak ML, Daniel, RW, Symer DE, Shah KV, and Sidransky D. Evidence for causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000;82:709-20
- ³⁹ Syrjänen S, Lodi G, von Bültzingslöwen I, Aliko A, Arduino P, Campisi G, Challacombe S, Ficarra G, Flaitz C, Zhou HM, Maeda H, Miller C, Jontell M. Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. *Oral Dis* 2011;17 Suppl 1:58-72.
- ⁴⁰ Hobbs CG, Sterne JA, Bailey M, Heyderman RS, Birchall MA, Thomas SJ. Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Otolaryngol* 2006;31:259-66.
- ⁴¹ Nair S, Pillai MR. Human papillomavirus and disease mechanisms: relevance to oral and cervical cancers. *Oral Dis* 2005;11:350-9.
- ⁴² Velly AM, Franco EL, Schlecht N, Pintos J, Kowalski LP, Oliveira BV, Curado MP. Relationship between dental factors and risk of upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol* 1998;34:284-291
- ⁴³ De Stefani E, Deneo-Pellegrini H, Mendilaharsu M, Ronco A. Diet and risk of cancer of upper aerodigestive tract-I. *Foods*. *Oral Oncol* 1999;35:17-21.
- ⁴⁴ Dahlstrom KR, Little JA, Zafereo ME, Lung M, Wei Q, Sturgis EM. Squamous cell carcinoma of the head and neck in never smoker-never drinkers: a descriptive epidemiologic study. *Head Neck* 2008;30:75-84.
- ⁴⁵ Siriwardena BS, Tilakaratne A, Amaratunga EA, Tilakaratne WM. Demographic, aetiological and survival differences of oral squamous cell carcinoma in the young and the old in Sri Lanka. *Oral Oncol* 2006;42:831-6.
- ⁴⁶ Sasaki T, Moles DR, Imai Y, Speight PM. Clinico-pathological features of squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients <40 years of age. *J Oral Pathol Med* 2005;34:129-33.
- ⁴⁷ Ribeiro AC, Silva AR, Simonato LE, Salzedas LM, Sundefeld ML, Soubhia AM. Clinical and histopathological analysis of oral squamous cell carcinoma in young people: a descriptive study in Brazilians. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2009;47:95-8.
- ⁴⁸ Girod A, Mosseri V, Jouffroy T, Point D, Rodriguez J. Women and squamous cell carcinomas of the oral cavity and oropharynx: is there something new? *J Oral Maxillofac Surg* 2009;67:1914-20.
- ⁴⁹ Hirata RM, Jaques DA, Chambers RG, Tuttle JR, Mahoney WD. Carcinoma of the oral cavity. An analysis of 478 cases. *Ann Surg* 1975;182:98-103.

-
- ⁵⁰ Brandizzi D, Gandolfo M, Velazco ML, Cabrini RL, Lanfranchi HE. Clinical features and evolution of oral cancer: A study of 274 cases in Buenos Aires, Argentina. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2008;13:E544-8.
- ⁵¹ Mallet Y, Avalos N, Le Ridant AM, Gangloff P, Moriniere S, Rame JP, et al. Head and neck cancer in young people: a series of 52 SCCs of the oral tongue in patients aged 35 years or less. *Acta Otolaryngol* 2009;129:1503-8.
- ⁵² Poveda-Roda R, Bagán JV, Jiménez-Soriano Y, Margaix-Muñoz M, Sarrión-Pérez MG. Changes in smoking habit among patients with a history of oral squamous cell carcinoma (OSCC). *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2010 Apr 11.
- ⁵³ Siriwardena BS, Tilakaratne A, Amaratunga EA, Tilakaratne WM. Demographic, aetiological and survival differences of oral squamous cell carcinoma in the young and the old in Sri Lanka. *Oral Oncol* 2006;42:831-6.
- ⁵⁴ Chidzonga MM, Mahomva L. Squamous cell carcinoma of the oral cavity, maxillary antrum and lip in a Zimbabwean population: a descriptive epidemiological study. *Oral Oncol* 2006;42:184-9.
- ⁵⁵ Al-Rawi NH, Talabani NG. Squamous cell carcinoma of the oral cavity: a case series analysis of clinical presentation and histological grading of 1,425 cases from Iraq. *Clin Oral Investig* 2008;12:15-8.
- ⁵⁶ Nemes JA, Redl P, Boda R, Kiss C, Márton IJ. Oral cancer report from Northeastern Hungary. *Pathol Oncol Res* 2008;14:85-92.
- ⁵⁷ Ariyoshi Y, Shimahara M, Omura K, Yamamoto E, Mizuki H, Chiba H, et al; Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons, 2002. Epidemiological study of malignant tumors in the oral and maxillofacial region: survey of member institutions of the Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons, 2002. *Int J Clin Oncol* 2008;13:220-8.
- ⁵⁸ Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JM. *Oral and Maxillofacial Pathology*. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2002:295-303
- ⁵⁹ Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, Sidransky D. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 1996;56:2488-2492.
- ⁶⁰ Rodrigo JP, Garcia LA, Ramos S, Lazo PS, Suárez C. EMS1 amplification correlates with poor prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2000;6:3177-3182.
- ⁶¹ Singh B, Gogineni SK, Sacks PG, Shaha AR, Shah JP, Stoffel A, Rao PH. Molecular cyto-genetic characterization of head and neck squamous cell carcinoma and refinement of 3q amplification. *Cancer Res* 2001;61:4506-4513.
- ⁶² Singh B, Stoffel A, Gogineni S, Poluri A, Pfister DG, Shaha AR, Pathak A, Bosl G, Cordon-Cardo C, Shah JP, Rao PH. Amplification of the 3q26.3 locus is

associated with progression to invasive cancer and is a negative prognostic factor in head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Pathol* 2002;161:365-371

- ⁶³ Reed AL, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, Ahrendt S, Eby Y, Sewell D, Nawroz H, Bartek J, Sidransky D. High frequency of p16^{CDKN2/MTS-1/INK4A} inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1996;56:3630-3633.
- ⁶⁴ Van der Riet P, Nawroz H, Hruban RH, Corio R, Tokino K, Koch W, Sidransky D. Frequent loss of chromosome 9p21-22 early in head and neck cancer progression. *Cancer Res* 1994;54:1156-1158.
- ⁶⁵ Bongers V, Snow GB, Van der Waal I, Braakhuis BJM. Value of p 53 Expression in Oral Cancer and Adjacent Normal Mucosa in Relation to the Occurrence of Multiple Primary Carcinomas. *Oral Oncol, Eur J Cancer* 1995; 31-B: 392-5.
- ⁶⁶ Whyte D.A, Broton C.E, Shillitoe E.J. The unexplained survival of cells in oral cancer: what is the role of p53?. *J oral Pathol Med* 2002;31:125-33.
- ⁶⁷ Rodrigo JP, Coto E, González MV, Maldonado M, Suárez C. P53 allelic loss and the outcome of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2001;258:255-258
- ⁶⁸ Tan BT, Park CY, Ailles LE, Weissman JL. The cancer Stem cell hypothesis: a work in progress. *Lab invest* 2006;86:1203-1207.
- ⁶⁹ Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium: clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 1953;6:963-968,
- ⁷⁰ Napier S, Speight PM. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. *J Oral Pathol Med* 2008;37:1-10
- ⁷¹ van Houten VM, Tabor MP, van den Brekel MW, Kummer JA, Denkers F, Dijkstra J, Leemans R, van der Waal I, Snow GB, Brakenhoff RH. Mutated p53 as a molecular marker for the diagnosis of head and neck cancer. *J Pathol* 2002;198:476-86.
- ⁷² Tabor MP, Brakenhoff RH, van Houten VM, Kummer JA, Snel MH, Snijders PJ, Snow GB, Leemans CR, Braakhuis BJ. Persistence of genetically altered fields in head and neck cancer patients: biological and clinical implications. *Clin Cancer res* 2001;7:1523-1532.
- ⁷³ Beeken SW, Krontiras H, Maddox WA, Peters GE, Soong S, Urist MM. T1 and T2 squamous cell carcinoma of the oral tongue: prognostic factors and the role of elective lymph node dissection. *Head Neck* 1999;21:124-30.

-
- ⁷⁴ Montoro JR, Hicz HA, Souza L, Livingstone D, Melo DH, Tiveron RC, et al. Prognostic factors in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Braz J Otorhinolaryngol* 2008;74:861-6.
- ⁷⁵ Scully C, Bagan JV. Recent advances in Oral Oncology 2008; squamous cell carcinoma imaging, treatment prognostication and treatment outcomes. *Oral Oncol* 2009;45:e25-30.
- ⁷⁶ Jones AS, Morar P, Phillips DE, Field JK, Husband D, Helliwell TR. Second primary tumors in patients with head and neck cell carcinoma. *Cancer* 1995; 75:1343-53.
- ⁷⁷ Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med* 2007;36:575-80.
- ⁷⁸ Petti S. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. *Oral Oncol* 2003;39:770-780.
- ⁷⁹ Ben Slama L. Precancerous lesions of the buccal mucosa. *Rev Stomatol Chir Maxillofac* 2001;102:77-108.
- ⁸⁰ Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin* 2002;52:195-215.
- ⁸¹ Martorell-Calatayud A, Botella-Estrada R, Bagan-Sebastian JV, Sanmartin-Jimenez O, Guillen-Barona C. Oral leukoplakia: clinical, histopathologic, and molecular features and therapeutic approach. *Actas Dermosifiliogr* 2009;100:669-84.
- ⁸² Haya-Fernández MC, Bagán JV, Murillo-Cortés J, Poveda-Roda R, Calabuig C. The prevalence of oral leukoplakia in 138 patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis* 2004;10:346-8.
- ⁸³ Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol* 2009;45:301-8.
- ⁸⁴ Lodi G, Sardella A, Bez C, Demarosi F, Carrassi A. Interventions for treating oral leukoplakia. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006(4):CD001829.
- ⁸⁵ Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. Pathology & Genetics. Head and Neck Tumours. World Health Organization Classification of Tumours. IARC press: Lyon, 2005.
- ⁸⁶ Barrera JE, Ai H, Pan Z, Meyers A, Varela-García M. Malignancy detection by molecular cytogenetics in clinically normal mucosa adjacent to head and neck tumors. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;124:847-851.
- ⁸⁷ Schrempf H, Schmidt O, Kümmerlen R, Hinnah S, Müller D, Betzler M, Steinkamp T, Wagner R. A prokaryotic potassium ion channel with two predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividans*. *EMBO J*

- ⁸⁸ Goldstein SA, Price LA, Rosenthal DN, Pausch MH. ORK1, a potassium-selective leak channel with two pore domains cloned from *Drosophila melanogaster* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:13256-61.
- ⁸⁹ Salkoff L, Butler A, Ferreira G, Santi C, Wei A. High-conductance potassium channels of the SLO family. *Nat Rev Neurosci* 2006;7:921-31.
- ⁹⁰ Berkefeld H, Fakler B, Schulte U. Ca²⁺-activated K⁺ channels: from protein complexes to function. *Physiol Rev* 2010;90:1437-59.
- ⁹¹ Park YB. Ion selectivity and gating of small conductance Ca(2+)-activated K⁺ channels in cultured rat adrenal chromaffin cells, *J Physiol* 1994;481:555-570.
- ⁹² Lopatin AN, Makhina EN, Nichols CG. The mechanism of inward rectification of potassium channels: "long-pore plugging" by cytoplasmic polyamines. *J Gen Physiol* 1995;106:923-55.
- ⁹³ Wible BA, Tagliatela M, Ficker E, Brown AM. Gating of inwardly rectifying K⁺ channels localized to a single negatively charged residue. *Nature* 1994; 371:246-9.
- ⁹⁴ Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stühmer W, Wang X. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* 2005;57:473-508.
- ⁹⁵ Yan, J, Aldrich RW. LRRC26 auxiliary protein allows BK channel activation at resting voltage without calcium. *Nature* 2010;466:513-516.
- ⁹⁶ Sun XX, Bostrom SL, Griffith LC. Alternative splicing of the eag potassium channel gene in *Drosophila* generates a novel signal transduction scaffolding protein. *Mol Cell Neurosci* 2009;40:338-343.
- ⁹⁷ Garrett S, Rosenthal JJ. RNA editing underlies temperature adaptation in K⁺ channels from polar octopuses. *Science* 2012;335:848-851.
- ⁹⁸ Ryan MY, Maloney R, Fineberg JD, Reenan RA, Horn R. RNA editing in eag potassium channels: biophysical consequences of editing a conserved S6 residue. *Channels (Austin)* 2012;6:443-452.
- ⁹⁹ Lu Y, Hanna ST, Tang G, Wang R. Contributions of Kv1.2, Kv1.5 and Kv2.1 subunits to the native delayed rectifier K(+) current in rat mesenteric artery smooth muscle cells. *Life Sci* 2002;71:1465-73.
- ¹⁰⁰ Park KS, Yang YW, Seikel E, Trimmer JS. Potassium channel phosphorylation in excitable cells: providing dynamic functional variability to a diverse family of ion channels. *Physiology (Bethesda)* 2008;23:49-57.

-
- ¹⁰¹ PlantLD, Dementieva IS, Kollewe A, Olikara S, Marks JD, Goldstein SA. One SUMO is sufficient to silence the dimeric potassium channel K2P1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:10743-10748.
- ¹⁰² ShipstonMJ. Ion channel regulation by protein palmitoylation. *J Biol Chem* 2011;286:8709-8716
- ¹⁰³ Khanna R, Myers MP, Lainé M, Papazian DM. Glycosylation increases potassium channel stability and surface expression in mammalian cells. *J Biol Chem* 2001;276:34028-34034.
- ¹⁰⁴ Gong Q, Anderson CL, January CT, Zhou Z. Role of glycosylation in cell surface expression and stability of HERG potassium channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H77-H84.
- ¹⁰⁵ Comes N, Bielanska J, Vallejo-Gracia A, Serrano-Albarrás A, Marruecos L, Gómez D, Soler C, Condom E, Ramón Y Cajal S, Hernández-Losa J, Ferreres JC, Felipe A. The voltage-dependent K(+) channels Kv1.3 and Kv1.5 in human cancer. *Front Physiol* 2013;4:283.
- ¹⁰⁶ Jehle J, Schweizer PA, Katus HA, Thomas D. Novel roles for hERG K(+) channels in cell proliferation and apoptosis. *Cell Death Dis* 2011;2:e193.
- ¹⁰⁷ Hemmerlein B, Weseloh RM, Mello de Queiroz F, Knötgen H, Sánchez A, Rubio ME, Martin S, Schliephacke T, Jenke M, Heinz-Joachim-Radzun, Stühmer W, Pardo LA. Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours. *Mol Cancer*. 2006;5:41.
- ¹⁰⁸ Stringer BK, Cooper AG, Shepard SB. Overexpression of the G-protein inwardly rectifying potassium channel 1 (GIRK1) in primary breast carcinomas correlates with axillary lymph node metastasis. *Cancer Res* 2001;61:582-8.
- ¹⁰⁹ Liu X, Chang Y, Reinhart PH, Sontheimer H, Chang Y. Cloning and characterization of glioma BK, a novel BK channel isoform highly expressed in human glioma cells. *J Neurosci* 2002;22:1840-9.
- ¹¹⁰ Mu D, Chen L, Zhang X, See LH, Koch CM, Yen C, Tong JJ, Spiegel L, Nguyen KC, Servoss A, Peng Y, Pei L, Marks JR, Lowe S, Hoey T, Jan LY, McCombie WR, Wigler MH, Powers S. Genomic amplification and oncogenic properties of the KCNK9 potassium channel gene. *Cancer Cell* 2003;3:297-302.
- ¹¹¹ Pardo LA, del Camino D, Sánchez A, Alves F, Brüggemann A, Beckh S, Stühmer W. Oncogenic potential of EAG K(+) channels. *EMBO J* 1999;18:5540-7.
- ¹¹² Pardo LA, Stühmer W. The roles of K(+) channels in cancer. *Nat Rev Cancer* 2014 Jan;14:39-48.
- ¹¹³ Urrego D, Tomczak AP, Zahed F, Stühmer W, Pardo LA. Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2014;369:20130094.

-
- ¹¹⁴ Than BL, Goos JA, Sarver AL, O'Sullivan MG, Rod A, Starr TK, Fijneman RJ, Meijer GA, Zhao L, Zhang Y, Largaespada DA, Scott PM, Cormier RT. The role of KCNQ1 in mouse and human gastrointestinal cancers. *Oncogene* 2014;33:3861-8.
- ¹¹⁵ Menéndez ST, Villaronga MA, Rodrigo JP, Alvarez-Teijeiro S, García-Carracedo D, Urdinguio RG, Fraga MF, Pardo LA, Vilorio CG, Suárez C, García-Pedrero JM. Frequent aberrant expression of the human ether à go-go (hEAG1) potassium channel in head and neck cancer: pathobiological mechanisms and clinical implications. *J Mol Med* 2012;90:1173-84.
- ¹¹⁶ Cicek MS, Koestler DC, Fridley BL, Kalli KR, Armasu SM, Larson MC, Wang C, Winham SJ, Vierkant RA, Rider DN, Block MS, Klotzle B, Konecny G, Winterhoff BJ, Hamidi H, Shridhar V, Fan JB, Visscher DW, Olson JE, Hartmann LC, Bibikova M, Chien J, Cunningham JM, Goode EL. Epigenome-wide ovarian cancer analysis identifies a methylation profile differentiating clear-cell histology with epigenetic silencing of the HERG K⁺ channel. *Hum Mol Genet* 2013;22:3038-47.
- ¹¹⁷ Day ML, Pickering SJ, Johnson MH, Cook DI. Cell-cycle control of a large-conductance K⁺ channel in mouse early embryos. *Nature* 1993;365:560-2.
- ¹¹⁸ Ouadid-Ahidouch H, Roudbaraki M, Delcourt P, Ahidouch A, Joury N, Prevarskaya N. Functional and molecular identification of intermediate-conductance Ca(2⁺)-activated K(+) channels in breast cancer cells: association with cell cycle progression. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287:C125-34.
- ¹¹⁹ Huang X, Dubuc AM, Hashizume R, Berg J, He Y, Wang J, Chiang C, Cooper MK, Northcott PA, Taylor MD, Barnes MJ, Tihan T, Chen J, Hackett CS, Weiss WA, James CD, Rowitch DH, Shuman MA, Jan YN, Jan LY. Voltage-gated potassium channel EAG2 controls mitotic entry and tumor growth in medulloblastoma via regulating cell volume dynamics. *Genes Dev.* 2012;26:1780-96.
- ¹²⁰ Hanahan D , Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646–674.
- ¹²¹ Pillozzi S, Brizzi MF, Bernabei PA, Bartolozzi B, Caporale R, Basile V, Boddi V, Pegoraro L, Becchetti A, Arcangeli A. VEGFR-1 (FLT-1), beta1 integrin, and hERG K⁺ channel for a macromolecular signaling complex in acute myeloid leukemia: role in cell migration and clinical outcome. *Blood* 2007;110:1238-50.
- ¹²² Babcock JJ, Li M. hERG channel function: beyond long QT. *Acta Pharmacol* 2013;34:329–335.
- ¹²³ Gómez-Varela D, Zwick-Wallasch E, Knötgen H, Sánchez A, Hettmann T, Ossipov D, Weseloh R, Contreras-Jurado C, Rothe M, Stühmer W, Pardo LA. Monoclonal antibody blockade of the human Eag1 potassium channel function exerts antitumor activity. *Cancer Res* 2007;67:7343-9.

-
- ¹²⁴ Hartung F, Stühmer W, Pardo LA. Tumor cell-selective apoptosis induction through targeting of K(V)10.1 via bifunctional TRAIL antibody. *Mol Cancer* 2011;10:109.
- ¹²⁵ Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz AG, Balch CM, Haller DG, Morrow M. American Joint Committee on Cancer staging manual, 6th edn. 2002. Springer, New York.
- ¹²⁶ Menéndez ST, Villaronga MÁ, Rodrigo JP, Álvarez-Teijeiro S, Urdinguio RG, Fraga MF, Suárez C, García-Pedrero JM. HERG1A potassium channel is the predominant isoform in head and neck squamous cell carcinomas: evidence for regulation by epigenetic mechanisms. *Sci Rep* 2016;6:19666.
- ¹²⁷ Litan A, Langhans SA. Cancer as a channelopathy: ion channels and pumps in tumor development and progression. *Front Cell Neurosci* 2015;9:86
- ¹²⁸ Pedersen SF, Stock C. Ion channels and transporters in cancer: pathophysiology, regulation, and clinical potential. *Cancer Res* 2013;73:1658-1661.
- ¹²⁹ Wonderlin WF, Strobl JS. Potassium channels, proliferation and G1 progression. *J. Membr Biol* 1996;154:91-107.
- ¹³⁰ Smith GA, Tsui HW, Newell EW, Jiang X, Zhu XP, Tsui FW, Schlichter LC. Functional up-regulation of HERG K⁺ channels in neoplastic hematopoietic cells. *J Biol Chem* 2002;277:18528-34.
- ¹³¹ Bianchi L, Wible B, Arcangeli A, Tagliatela M, Morra F, Castaldo P, Crociani O, Rosati B, Faravelli L, Olivotto M, Wanke E. herg encodes a K⁺ current highly conserved in tumors of different histogenesis: a selective advantage for cancer cells? *Cancer Res* 1998;58:815-22.
- ¹³² Lastraioli E, Taddei A, Messerini L, Comin CE, Festini M, Giannelli M, Tomezzoli A, Paglierani M, Mugnai G, De Manzoni G, Bechi P, Arcangeli A. hERG1 channels in human esophagus: evidence for their aberrant expression in the malignant progression of Barrett's esophagus. *J Cell Physiol* 2006;209:398-404.
- ¹³³ Menéndez ST, Rodrigo JP, Alvarez-Teijeiro S, Villaronga MÁ, Allonca E, Vallina A, Astudillo A, Barros F, Suárez C, García-Pedrero JM. Role of HERG1 potassium channel in both malignant transformation and disease progression in head and neck carcinomas. *Mod Pathol* 2012;25:1069-78.
- ¹³⁴ Masi A, Becchetti A, Restano-Cassulini R, Polvani S, Hofmann G, Buccoliero AM, Paglierani M, Pollo B, Taddei GL, Gallina P, Di Lorenzo N, Franceschetti S, Wanke E, Arcangeli A. hERG1 channels are overexpressed in glioblastoma multiforme and modulate VEGF secretion in glioblastoma cell lines. *Br J Cancer* 2005;93:781-92.

-
- ¹³⁵ Lastraioli E, Guasti L, Crociani O, Polvani S, Hofmann G, Witchel H, Bencini L, Calistri M, Messerini L, Scatizzi M, Moretti R, Wanke E, Olivotto M, Mugnai G, Arcangeli A. hERG1 gene and HERG1 protein are overexpressed in colorectal cancers and regulate cell invasion of tumor cells. *Cancer Res* 2004;64:606-11.
- ¹³⁶ Ding XW, Yang WB, Gao S, Wang W, Li Z, Hu WM, Li JJ, Luo HS. Prognostic significance of hERG1 expression in gastric cancer. *Dig Dis Sci* 2010;55:1004-10.
- ¹³⁷ Cherubini A, Taddei GL, Crociani O, Paglierani M, Buccoliero AM, Fontana L, Noci I, Borri P, Borrani E, Giachi M, Becchetti A, Rosati B, Wanke E, Olivotto M, Arcangeli A. HERG potassium channels are more frequently expressed in human endometrial cancer as compared to non-cancerous endometrium. *Br J Cancer* 2000;83:1722-9.
- ¹³⁸ Li H, Liu L, Guo T, Zhang J, Li X, Du W, Liu W, Chen X, Huang S. Expression and functional role of HERG1, K⁺ channels in leukemic cells and leukemic stem cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2007;27:257-60.
- ¹³⁹ Fontana L, D'Amico M, Crociani O, Biagiotti T, Solazzo M, Rosati B, Arcangeli A, Wanke E, Olivotto M. Long-term modulation of HERG channel gating in hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;286:857-62.
- ¹⁴⁰ Shao XD, Wu KC, Guo XZ, Xie MJ, Zhang J, Fan DM. Expression and significance of HERG protein in gastric cancer. *Cancer Biol Ther* 2008;7:45-50.
- ¹⁴¹ Arcangeli A, Becchetti A, Cherubini A, Crociani O, Defilippi P, Guasti L, Hofmann G, Pillozzi S, Olivotto M, Wanke E. Physical and functional interaction between integrins and hERG potassium channels. *Biochem Soc Trans* 2004;32:826-827.
- ¹⁴² Cherubini A, Hofmann G, Pillozzi S, Guasti L, Crociani O, Cilia E, Di Stefano P, Degani S, Balzi M, Olivotto M, Wanke E, Becchetti A, Defilippi P, Wymore R, Arcangeli A. Human ether-a-go-go-related gene 1 channels are physically linked to beta1 integrins and modulate adhesion-dependent signaling. *Mol Biol Cell* 2005;16:2972-83.
- ¹⁴³ Taylor CR. An exaltation of experts: concerted efforts in the standardization of immunohistochemistry. *Hum Pathol* 1994;25:2-11.
- ¹⁴⁴ Lew TS, Chang CS, Fang KP, Chen CY, Chen CH, Lin SC. The involvement of K(v)3.4 voltage-gated potassium channel in the growth of an oral squamous cell carcinoma cell line. *J Oral Pathol Med* 2004;33:543-549.
- ¹⁴⁵ Chang KW, Yuan TC, Fang KP, Yang FS, Liu CJ, Chang CS, Lin SC. The increase of voltage-gated potassium channel Kv3.4 mRNA expression in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2003;32:606-11.

-
- ¹⁴⁶ Menéndez ST, Rodrigo JP, Allonca E, García-Carracedo D, Alvarez-Alija G, Casado-Zapico S, Fresno MF, Rodríguez C, Suárez C, García-Pedrero JM. Expression and clinical significance of the Kv3.4 potassium channel subunit in the development and progression of head and neck squamous cell carcinomas. *J Pathol* 2010;221:402-10.
- ¹⁴⁷ Huang Y, Rane SG. Potassium channel induction by the Ras/Raf signal transduction cascade. *J Biol Chem* 1994;269:31183-31189.
- ¹⁴⁸ Repp H, Draheim H, Ruland J, Seidel G, Beise J, Presek P, Dreyer F. Profound differences in potassium current properties of normal and Rous sarcoma virus-transformed chicken embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90:3403-7.
- ¹⁴⁹ Draheim HJ, Repp H, Dreyer F. Src-transformation of mouse fibroblasts induces a Ca(2+)-activated K⁺ current without changing the T-type Ca²⁺ current. *Biochim Biophys Acta* 1995;1269: 57-63.
- ¹⁵⁰ Teulon J, Ronco PM, Geniteau-Legendre M, Baudouin B, Estrade S, Cassingena R, Vandewalle A. Transformation of renal tubule epithelial cells by simian virus-40 is associated with emergence of Ca(2+)-insensitive K⁺ channels and altered mitogenic sensitivity to K⁺ channel blockers. *J Cell Physiol* 1992;151:113-25.
- ¹⁵¹ Ismailov II, Benos DJ. Effects of phosphorylation on ion channel function. *Kidney Int* 1995;48:1167-1179.
- ¹⁵² Fraser SP, Pardo LA. Ion channels: functional expression and therapeutic potential in cancer. *Colloquium on Ion Channels and Cancer. EMBO Rep* 2008 9;512-515.