

Universidad de Oviedo

Programa de Doctorado en “Biomedicina y Oncología Molecular”

Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias

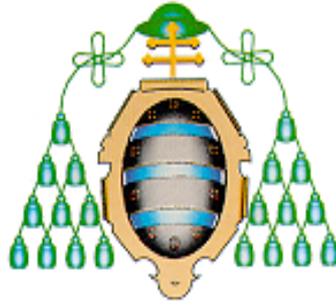
“Expresión de E-cadherina y Beta-catenina en carcinomas epidermoides de cabeza y cuello”

TESIS DOCTORAL

Autor:

Dña. Patricia García-Cabo Herrero

Mayo 2019



Universidad de Oviedo

Programa de Doctorado en “Biomedicina y Oncología Molecular”

Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias

“Expresión de E-cadherina y Beta-catenina en carcinomas epidermoides de cabeza y cuello”

TESIS DOCTORAL

Autor:

Dña. Patricia García-Cabo Herrero

Mayo 2019

Directores:

Dr. D. Juan Pablo Rodrigo Tapia

Dra. D. Juana María García Pedrero

Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias

RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Expresión de E-cadherina y β -catenina en carcinomas epidermoides de cabeza y cuello	Inglés: Expresión of E-cadherin and β -catenin in head and neck squamous cell carcinoma

2.- Autor	
Nombre: Patricia García-Cabo Herrero	DNI/Pasaporte/NIE
Programa de Doctorado: Biomedicina y oncología molecular	
Órgano responsable: Universidad de Oviedo	

RESUMEN (en español)

El cáncer de cabeza y cuello es la sexta neoplasia maligna más común. Entre los muchos factores predictivos ya identificados en carcinomas de cabeza y cuello, algunos son particularmente importantes y universalmente aceptados, como el tabaco y el alcohol y estado del virus del papiloma humano (VPH), mientras que el papel de otros marcadores moleculares, como la E-cadherina y la expresión de β -catenina, resulta más controvertido.

Hipótesis: Basado en los datos previos, planteamos que la expresión de la E-cadherina y la β -catenina se halla alterada en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello (CECC), y que la alteración de su expresión puede estar relacionada con la agresividad tumoral y el pronóstico de los pacientes.

Objetivo: El objetivo global de esta tesis fue investigar la expresión de E-cadherina y β -catenina en CECC de diferentes localizaciones no relacionados con el VPH y su posible significado pronóstico.

Métodos: Se recogieron retrospectivamente muestras de tejido tumoral de 382 pacientes consecutivos con CECC: 249 de carcinomas escamosos de orofaringe, 68 carcinomas escamosos de laringe y 65 carcinomas escamosos de hipofaringe, que fueron sometidos a tratamiento quirúrgico en el Hospital Central de Asturias entre 1990 y 2009. Se construyeron matrices de tejido ("tissue microarrays"; TMAs) a partir de muestras de tejido tumoral fijadas en formol e incluidas en parafina, y se realizó el

análisis inmunohistoquímico de p16, p53, E-cadherina y β -catenina.

Resultados: Bajos niveles de expresión membranosa de E-cadherina o β -catenina, y expresión nuclear de β -catenina se asociaron con una menor supervivencia global y menor supervivencia específica de la enfermedad. En el análisis multivariante, las metástasis ganglionares y la baja expresión membranosa de β -catenina fueron los factores predictivos independientes de una menor supervivencia global y menor supervivencia específica de la enfermedad.

Conclusión: Baja expresión membranosa de β -catenina emerge como un predictor independiente de menor supervivencia global y específica de la enfermedad en pacientes con CECC negativos para el VPH.

RESUMEN (en Inglés)

Head and neck cancer is the sixth most common malignancy. Among the many predictors already identified in head and neck cancer, some are particularly important and universally accepted, such as alcohol, tobacco and the status of human papillomavirus (HPV) infection, while the role of some molecular markers, such as E-cadherin and β -catenin expression, remains controversial.

Hypothesis: Based on previous data, we propose that the expression of E-cadherin and β -catenin is altered in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC), and that altered expression may be related to tumor aggressiveness and the prognosis of patients.

Objective: The overall objective of this thesis was to investigate the expression of E-cadherin and β -catenin in HPV-negative HNSCC from different sites and its possible prognostic significance.

Methods: Tumor tissue samples were retrospectively collected from 382 consecutive patients with HNSCC: 249 oropharyngeal squamous cell carcinomas, 68 laryngeal squamous cell carcinomas and 65 hypopharyngeal squamous cell carcinomas, who underwent surgical treatment in the Hospital Universitario Central de Asturias

between 1990 and 2009. Tissue microarrays (TMAs) were constructed from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tumor samples, and protein expression of p16, p53, E-cadherin and β -catenin was analyzed by immunohistochemistry.

Results: Low membranous E-cadherin, low membranous β -catenin expression, and nuclear β -catenin expression were associated with a poorer disease-specific and overall survival. In multivariate analysis, nodal metastasis and low membranous β -catenin expression were significant independent predictors of reduced disease-specific and overall survival.

Conclusion: Low membranous β -catenin expression is a significant independent predictor of both reduced disease-specific and overall survival in patients with HPV-negative HNSCC.

**SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO
EN BIOMEDICINA Y ONCOLOGÍA MOLECULAR**

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha sido posible gracias al trabajo y dedicación, no sólo míos sino de muchas otras personas, a las que quiero manifestar mi agradecimiento.

Y quiero comenzar por mis directores de tesis; al Dr. Juan Pablo Rodrigo Tapia, por ser unos de los pilares fundamentales de mi formación y por introducirme y guiarme en el mundo de la investigación, y a la Dra. Juana García Pedrero, por ser el eje del laboratorio siempre con su humor cohesivo.

A mis compañeros durante la residencia, por sufrirme día tras día incansables, sobre todo en aquel congreso Europeo con la “E-cadherine and β -catenin”.

A todo el servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Central de Asturias, porque son mi segunda familia y consiguen hacer los días más sencillos. Y en especial, al Dr. José Luis Llorente, que siendo para mí un ejemplo profesional admirable también lo es, si cabe más, humanamente; y al Dr. Fernando López que siempre me ha ayudado y enseñando con paciencia y buena cara.

A mis amigos, porque a pesar del tiempo que he dejado de estar con ellos para dedicárselo a mi trabajo, continúan a mi lado.

Por último, y sin duda, no menos importante, gracias a mi familia porque son los que injustamente ven y se llevan mi peor lado. A pesar de ello, continúan apoyándome y estimulándome incondicionalmente.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	21
1. INTRODUCCIÓN	23
1.1. CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CABEZA Y CUELLO	25
1.1.1. Epidemiología	25
1.1.2. Orofaringe	25
Carcinoma de células escamosas de orofaringe	25
Carcinoma de células escamosas de orofaringe VPH positivo	26
1.1.3. Laringe e hipofaringe	27
1.1.4. Clínica y diagnóstico	27
1.1.5. Estadificación	29
1.1.6. Tratamiento	29
1.1.7. Pronóstico	30
1.2. TRANSICIÓN EPITELIO MESÉNQUIMA	32
1.2.1. Generalidades	32
1.2.2. E-Cadherina	36
1.2.3. β -Catenina	38
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	43
2.1. HIPÓTESIS	45
2.2. OBJETIVOS	45
3. MATERIAL Y MÉTODOS	47
3.1. PACIENTES Y ESPECIMEN DE TEJIDOS	49
3.2. CONSTRUCCIÓN DE TISSUE MICROARRAY (TMA)	51
3.3. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO	52
3.4. DETECCIÓN VPH	54
3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	55
4. RESULTADOS	57
4.1. EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN CARCINOMAS ESCAMOSOS DE CABEZA Y CUELLO	59
4.1.1. Patrones de expresión en epitelio normal y carcinomas primarios ..	59

4.1.2.	Asociación de expresión de E-cadherina y β -catenina con parámetros clínico-patológicos	60
4.1.3.	Asociación de expresión de E-cadherina y β -catenina con la recidiva tumoral	64
4.1.4.	Asociación de expresión de E-cadherina y β -catenina con la supervivencia	65
4.2.	EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN CARCINOMAS ESCAMOSOS DE OROFARINGE	70
4.2.1.	Patrones de expresión en carcinomas primarios	70
4.2.2.	Asociación de expresión de E-cadherina y β -catenina con parámetros clínico-patológicos	70
4.2.3.	Asociación de expresión de E-cadherina y β -catenina con la recidiva tumoral	72
4.2.4.	Asociación de expresión de E-cadherina y β -catenina con la supervivencia	72
4.3.	EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN CARCINOMAS ESCAMOSOS DE LARINGE	77
4.3.1.	Patrones de expresión en carcinomas primarios	77
4.3.2.	Asociación de expresión de E-cadherina y β -catenina con parámetros clínico-patológicos	77
4.3.3.	Asociación de expresión de E-cadherina y β -catenina con la recidiva tumoral	80
4.3.4.	Asociación de expresión de E-cadherina y β -catenina con la supervivencia	80
4.4.	EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN CARCINOMAS ESCAMOSOS DE HIPOFARINGE	84
4.4.1.	Patrones de expresión en carcinomas primarios	84
4.4.2.	Asociación de expresión de E-cadherina y β -catenina con parámetros clínico-patológicos	84
4.4.3.	Asociación de expresión de E-cadherina y β -catenina con la recidiva tumoral	87
4.4.4.	Asociación de expresión de E-cadherina y β -catenina con la supervivencia	88
5.	DISCUSIÓN	93
5.1	Relación de la expresión de E-cadherina y β -catenina con las características clínico-patológicas	96

5.2 Relación de la expresión de E-cadherina y β -catenina con la recidiva tumoral -----	99
5.3 Relación de la expresión de E-cadherina y β -catenina con la supervivencia -----	100
5.4 Relación de la expresión de E-cadherina y β -catenina y las metástasis ganglionares -----	103
5.5 Relación de la expresión de E-cadherina y β -catenina y localización del tumor ---	106
5.5.1 Orofaringe -----	106
5.5.2 Laringe -----	108
5.5.3 Hipofaringe -----	110
6. CONCLUSIONES -----	115
7. BIBLIOGRAFÍA -----	119

ABREVIATURAS

- AJ: Uniones adherentes ("Adherens junctions")
- AJCC: American Joint Committee on Cancer
- CCE: Carcinoma de células escamosas
- CCECC: Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello
- CCEH: Carcinoma de células escamosas de hipofaringe
- CCEL: Carcinoma de células escamosas de laringe
- CCEO: Carcinoma de células escamosas de orofaringe
- CK1 α : Caseína quinasa 1 α
- C-terminal: Carboxi-terminal
- DAB: Diaminobenzidina
- DE: Desviación estándar
- EEN: Extensión extranodal
- EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico ("Epidermal Growth Factor Receptor")
- EIA: Inmunoensayo enzimático
- FAK: Kinasa de adhesión focal ("Focal Adhesion Kinase")
- FFPE: Bloques en formol y parafina ("Formalin-fixed-paraffin-embedded")
- FSP-1: Proteína específica de fibroblastos
- GSK3 β : Glicógeno sintasa quinasa 3 β
- HR: Hazard ratio
- IC: Intervalo de confianza
- IRS: German Immunoreactive Score
- ISH: Hibridación "in situ" ("In situ hybridization")
- LEF: Leukocyte enhancer factor
- MD: Metástasis a distancia
- MMP: Metaloproteinasas de matriz celular
- N-terminal: Amino-terminal
- PA: Paquetes año
- PAAF: Punción aspiración con aguja fina
- PCR: Reacción de la cadena de polimerasa

- PET/TC: Tomografía por emisión de positrones/Tomografía computerizada
- QRT: Quimiorradioterapia
- QT: Quimioterapia
- RM: Resonancia magnética
- RT: Radioterapia
- SEE: Supervivencia específica de enfermedad
- SG: Supervivencia global.
- TC: Tomografía computerizada
- TCF: T-cell factor
- TEM: Transición epitelio-mesénquima
- TEndM: Transición endotelio-mesénquima
- TLE: Tiempo libre de enfermedad
- TMA: Tissue Microarray
- TME: Transición mesénquima-epitelio
- UICC: Unión Internacional Contra el Cáncer
- VAD: Vía aerodigestiva
- VEB: Virus Epstein Barr
- VPH: Virus del papiloma humano
- ZO-1: Zona occludens
- α -SMA: Actina de músculo α -smooth

1.INTRODUCCIÓN

1.1. CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CABEZA Y CUELLO (CCECC)

1.1.1 Epidemiología

El cáncer de cabeza y cuello es la sexta neoplasia maligna más común. La incidencia varía mucho según la localización geográfica, la raza, el sexo y la edad. También es sumamente variable la proporción relativa de cánceres en las distintas localizaciones de la cabeza y el cuello¹. Más del 95% de los cánceres de cabeza y cuello son carcinomas de células escamosas (CCE)^{2,3}.

La mayoría de los casos son resultado de factores de riesgos conocidos, incluyendo tabaco/alcohol, virus oncogénicos [virus del papiloma humano (VPH)] y [virus Epstein Barr (VEB)] y toxinas industriales (cromo, níquel y radio). El consumo de tabaco y alcohol es especialmente problemático y se asocia fuertemente con el 70% de los casos en todo el mundo².

Se han observado cambios claros en la epidemiología del cáncer de cabeza y cuello en las últimas décadas³. En regiones con exitosos programas de control de consumo de tabaco, como EEUU, Australia, Dinamarca y Canadá, la incidencia de tumores de cabeza y cuello asociados al hábito tabáquico (cavidad oral, laringe e hipofaringe) ha disminuido. Al mismo tiempo, la incidencia de carcinomas de orofaringe ha aumentado, ligado a un aumento del subgrupo de cáncer VPH positivo⁴.

1.1.2 Orofaringe

Carcinoma de células escamosas de orofaringe (CCEO)

La incidencia de carcinoma de células escamosas de orofaringe se está incrementando, mientras disminuye la de los tumores que surgen en otros subsitios de la cabeza y el cuello⁴⁻⁶. Este fenómeno se ha observado en todo el mundo, incluida España⁷.

El número de nuevos casos estimados atribuidos al cáncer de orofaringe en los Estados Unidos para el año 2019 es de 53.000 y 10.860 fallecimientos⁸.

La edad es un factor determinante tanto en la incidencia de estos tumores como

en la mortalidad. Aparecen sobre todo entre los 55 y 69 años, aunque también existen picos de incidencia en el grupo comprendido entre los 30 y 54 años. En cuanto al sexo, son tres veces más frecuentes entre los hombres que entre las mujeres⁹.

Los carcinomas escamosos de la región amigdalal suponen el 50% de los carcinomas de orofaringe. La base de lengua es el lugar de presentación del 30% de los tumores. Un 10% aparece en paladar blando y úvula, y el 10% restante a nivel de la pared posterior de orofaringe⁹.

Carcinoma de células escamosas de orofaringe VPH positivo

La incidencia de CCEO VPH positivos se ha incrementado en las últimas tres décadas⁴. Este fenómeno se ha producido en todo el mundo, observándose también en España. El norte de España tiene la mayor incidencia dentro del país, tanto para los CCECC como de CCEO¹⁰. Como se mencionó, se ha observado una tendencia opuesta en la incidencia del CCECC y en la de los CCEO que está probablemente relacionado con los dos factores etiológicos principales; mientras que el hábito tabáquico está lentamente disminuyendo, se observa una creciente prevalencia del VPH en CCECC, en particular en CCEO⁵.

Sin embargo, la prevalencia de los CCEO VPH positivos es muy variable en los diferentes estudios, con un rango entre 4,4-93% de los CCEO. Estas diferencias se han relacionado con las diferencias geográficas, la variabilidad del tiempo de diagnóstico, la localización anatómica y las diferentes técnicas de detección de VPH. En EEUU la proporción de CCEO VPH positivos presenta un rango entre 60-70%, en Australia se ha descrito un 43%, en Asia un 25-50% y en Sudamérica de un 4,4%¹⁰.

En la revisión sistemática realizada por *Herrero et al.*¹¹, que incluyeron estudios de España e Italia, observaron una proporción de CCEO VPH positivos alrededor del 13%.

*Rodrigo et al.*¹⁰ describen una incidencia en el norte de España de CCEO muy inferior al resto de España y Europa, pero creciente, incrementándose de un 1,3% entre 1990-1999 hasta un 6,1% de 2000 a 2009.

Además, las infecciones por VPH no tienen sólo un papel etiológico sino también un significado pronóstico: los casos de tumores VPH-positivo tienen una mejor supervivencia respecto a los VPH negativo^{12,13}.

1.1.3 Laringe e hipofaringe

Los carcinomas escamosos de laringe e hipofaringe representan el cáncer más frecuente de tracto respiratorio, tras el cáncer de pulmón¹⁴. Su incidencia es de 1,6-2% de todos los tumores malignos en hombres y 0,2-0,4% en mujeres¹⁵.

El National Cancer Institute¹⁶ estima 12.410 nuevos cánceres de laringe en Estados Unidos en el año 2019 con una supervivencia del 60,3% a los 5 años para el periodo 2009-2015. El cáncer de hipofaringe es poco común, con alrededor de 2.500 nuevos casos diagnosticados al año en Estados Unidos¹⁷.

La incidencia del cáncer de laringe e hipofaringe muestra una notable variabilidad entre diferentes áreas geográficas, sin que exista una explicación completamente clara para estas diferencias, aunque probablemente los desiguales consumos de tabaco y alcohol desempeñan un papel muy importante^{15,18}. La infección por VPH juega un papel limitado en la patogénesis de los carcinomas escamosos de laringe (CCEL)¹⁹.

Destaca asimismo la incidencia entre seis y siete veces mayor en los hombres que en las mujeres. En cambio, en los países del norte de Europa estas diferencias entre sexos son menores, dato que parece deberse a las diferencias en el consumo de tabaco y alcohol en las mujeres de las diferentes zonas de Europa^{15,18}.

Se observa más frecuentemente en pacientes entre la 6^a-7^a década de la vida. Raramente se han descritos casos en niños¹⁴.

1.1.4 Clínica y diagnóstico

La clínica es muy variada y depende de la localización del tumor primario.

Los tumores de la región amigdalina se caracterizan por un comienzo silente, con leves molestias a la deglución. En la tercera parte de los casos, el primer síntoma es una adenopatía laterocervical. Cuando se ulcera puede dar lugar a otalgia refleja. Puede también aparecer trismus, lo que indica la invasión de la musculatura pterigoidea. La palpación cervical y la exploración física completa de cabeza y cuello es importante ya que un 70-80%, sobre todo los tumores localizados en la base de la lengua, presentan metástasis ganglionares al diagnóstico²⁰.

Los tumores glóticos se manifiestan de forma precoz por disfonía, por lo que su detección se realiza en fases tempranas con escaso número de metástasis ganglionares (<20%); sin embargo, los tumores faríngeos y supraglóticos presentan una clínica inespecífica, por lo que su detección se retrasa en el tiempo y muchos ya presentan metástasis ganglionares en el momento diagnóstico (50-70%)²⁰.

El cáncer de hipofaringe presenta habitualmente un comportamiento agresivo, presentándose en la consulta con tumores avanzados o con afectación de los ganglios linfáticos regionales. Una masa cervical puede ser el primer y único síntoma (25% de los pacientes). El 40-70% de los pacientes tienen adenopatías cervicales en el examen inicial²⁰.

El diagnóstico se basa en la inspección por visión directa o endoscópica y mediante palpación cervical, complementándose con pruebas de imagen [Tomografía computerizada (TC), Resonancia magnética (RM), Tomografía por emisión de positrones/Tomografía computerizada (PET/TC)] que permiten conocer la extensión tumoral e identificar la presencia de adenopatías sospechosas²⁰.

El estudio histopatológico es imprescindible para el diagnóstico definitivo ya que permite conocer la estirpe y planificar el tratamiento. Se obtiene mediante biopsia del tumor primario o punción aspiración con aguja fina (PAAF) dirigida a la adenopatía metastásica y, según el grado de diferenciación, pleomorfismo y actividad mitótica, se clasifican en: bien, moderada o pobremente diferenciados. Se atribuye mayor agresividad a los tumores poco diferenciados, lo cual no siempre se relaciona con peor supervivencia. Existen múltiples sistemas de clasificación histopatológica, pero en todos ellos se comprueba que tumores similares tienen distinta evolución clínica, por lo que de modo permanente se intenta validar nuevos modelos más precisos y fiables²¹.

1.1.5 Estadificación

En 2016 la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC) y la American Joint Committee on Cancer (AJCC) publicaron la 8ª edición del Manual para la Estadificación del Cáncer, para su aplicación en la práctica clínica a partir de 2017. En el mismo, se realizaron cambios relevantes para la estadificación de algunos tumores de cabeza y cuello. Entre ellos que los tumores de orofaringe asociados a VPH (considerados como tal los que muestran positividad de la proteína p16) se clasifican de forma diferente a los VPH-negativos. La 8ª edición introduce también el uso de la extensión extranodal (EEN) como factor pronóstico²².

1.1.6 Tratamiento

En el tratamiento de los CCECC se puede emplear la cirugía, la radioterapia (RT) y la quimioterapia (QT), bien solas o de forma combinada. La cirugía y la RT se consideran curativas, y la QT se emplea asociada a la RT con fines curativos, pero la QT aislada solo se emplea con fines paliativos. En general, en estadios iniciales (I-II) se emplea un solo tratamiento, bien cirugía o bien RT; en estadios avanzados (III-IV) suelen emplearse tratamientos combinados (cirugía y RT, QT más RT, o cirugía más QT más RT).

La cirugía es el método terapéutico de elección en la mayoría de los CCECC, tanto del tumor como de las metástasis ganglionares. La resección del tumor se realiza con márgenes amplios para conseguir márgenes libres de tumor, lo cual reduce el porcentaje de recidiva local. Debido al elevado número de metástasis ocultas clínicamente, pero presentes en el estudio histopatológico (una media de 15-20%, con gran variación según la localización), es frecuente realizar un vaciamiento cervico-ganglionar profiláctico de tipo selectivo²³⁻²⁷.

La radioterapia se utiliza de modo radical en tumores T1 y T2 de cavidad oral, faringe y laringe y de modo complementario a la cirugía cuando existen factores de riesgo (bordes afectados o dudosos o metástasis ganglionares N2 o superiores)²⁸.

La quimioterapia tiene interés, en combinación con la radioterapia, en los protocolos de conservación de órgano que se plantean como alternativa a la cirugía en

pacientes seleccionados con grandes tumores que precisan técnicas muy agresivas y en los pacientes con importante diseminación metastásica. Estas terapéuticas no quirúrgicas están obteniendo muy buenos resultados e incluso, en algunos casos, han demostrado reducir el desarrollo de metástasis a distancia (MD), pero tienen asociados importantes efectos secundarios que incluso limitan el perfil de paciente seleccionado, que precisa de un estado clínico y analítico adecuado para soportar el tratamiento²⁹.

La preservación de órgano tiene como objetivo ofrecer una mejor funcionalidad y calidad de vida en pacientes con cáncer de cabeza y cuello, sin comprometer la supervivencia. La discusión de los riesgos y beneficios de la terapia de preservación de órgano es crucial. Los tratamientos de preservación de órgano pueden ser difíciles de administrar, dado que muchos pacientes presentan comorbilidades subyacentes. La selección óptima de pacientes aumenta las posibilidades de resultados exitosos³⁰.

De toda la experiencia acumulada hasta la actualidad en preservación de órgano, existen varias opciones no quirúrgicas para tratar los cánceres moderadamente avanzados de la laringe, orofaringe e hipofaringe: quimioterapia neoadyuvante, quimiorradioterapia (QRT) y la introducción de terapias moleculares. Pero, ninguno ha mostrado resultados superiores en cuanto a supervivencia a la cirugía más radioterapia. Debemos recalcar que es imprescindible un abordaje multidisciplinario para intentar seleccionar el mejor tratamiento posible para cada paciente en concreto. La discusión multidisciplinaria también ayudará a mejorar el diseño de los futuros ensayos clínicos^{24-27,29,30}.

1.1.7 Pronóstico

Los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello son una enfermedad principalmente locorregional. A pesar de los avances en el diagnóstico y tratamiento, la supervivencia no ha experimentado grandes cambios, observándose mejoras sólo en tumores localizados en la amígdala y la base de la lengua³¹, lo cual puede atribuirse al efecto de los casos VPH-positivos (que como se mencionó tienen mejor pronóstico).

La mayoría de los fallecimientos se deben a recidivas loco-regionales durante los primeros años. Sin embargo, la presencia o ausencia de metástasis ganglionares es el

factor pronóstico más importante. Por ello la identificación de aquellos pacientes con tumores primarios que tengan más riesgo de desarrollar metástasis ganglionares tiene importancia a la hora de seleccionar el tratamiento³².

También es frecuente la aparición de segundos tumores sincrónicos y metacrónicos en vía aérodigestiva (VAD), esófago o pulmón, que se estima en un 4% anual. Otra importante causa de muerte se asocia al pobre control tras el desarrollo de enfermedad metastásica a distancia. Las MD ocurren en el 10-20% de los pacientes con CCECC y se cree que esta incidencia aumentará en el futuro al mejorar el control loco-regional³³.

Aunque las nuevas técnicas diagnósticas han mejorado la detección de las metástasis en la evaluación inicial, la mayoría de estas aparecen durante el seguimiento de los pacientes. El 50% de las MD se detectan clínicamente en los primeros nueve meses tras el tratamiento y el 80% dentro de los primeros dos años³⁴.

La prevalencia descrita de metástasis a distancia en pacientes con CCECC en la presentación es entre un 4% a un 24% y es muy bajo para justificar el screening de rutina de todos los pacientes con CCECC. Para incrementar el rendimiento de las exploraciones para detectar las MD, los pacientes con factores de alto riesgo deben de seleccionarse para el screening de MD³⁵.

Se han identificado factores de alto riesgo clínico de desarrollo de metástasis a distancia: 3 o más ganglios linfáticos metastásicos, diseminación extraganglionar, metástasis ganglionar en región yugular baja, ganglios linfáticos metastásico de >6 cm, metástasis ganglionares bilaterales, segundo tumor primario de cabeza y cuello, recurrencia regional, tumor primario de faringe y estadio-T avanzado. Cuando se usan estos factores de alto riesgo la prevalencia de MD aumenta a un 44%³⁵.

1.2 TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA

1.2.1 Generalidades

En muchos casos, los efectos del cáncer sobre la función tisular normal provienen de la presión física ejercida por las masas tumorales en expansión. En otros, células del tumor primario invaden tejidos adyacentes normales y, al hacerlo, comienzan a comprometer funciones vitales.

El 90% de los pacientes que fallecen por tumores (de todo el cuerpo) lo hacen por el crecimiento en localizaciones lejanas al lugar inicial del tumor primario. Estas metástasis están formadas por células cancerígenas que han dejado la masa tumoral y viajado a través de las “autopistas” del organismo (vasos sanguíneos y linfáticos) para buscar nuevas localizaciones donde formar nuevas colonias³⁶.

La transición epitelio-mesénquima (TEM) es un mecanismo celular importante en el desarrollo embrionario, la reparación tisular y algunas enfermedades. Descrito por primera vez en 1980 como un fenómeno celular en una estirpe primitiva de embriones de pollo, la TEM dirige muchos procesos de desarrollo como la gastrulación, el desarrollo de la cresta neural, disociación somita y la fusión de labios y paladar. Un proceso similar denominado transición endotelio-mesénquima (TEndM) interviene en la transformación epitelial del endotelio vascular a células mesenquimales, que regulan la formación de válvulas y del septum del corazón en desarrollo. En el adulto este fenómeno de mecanismos de desarrollo programado puede reactivarse y frecuentemente desemboca en el desarrollo de diferentes enfermedades. Tanto la fibrosis en órganos como la metástasis cancerígena son promovidas por la TEM; el desarrollo de metástasis se debe quizás a la generación de células madre cancerosas capaces de colonizar otros tejidos para formar tumores secundarios³⁷.

*Kalluri y Weinberg*³⁸ dividen la TEM en 3 subtipos: tipo 1, TEM durante implantación, embriogénesis y desarrollo de órganos; tipo 2, TEM asociada a regeneración de tejidos y fibrosis en órganos; y tipo 3, TEM asociada con progresión de cáncer y metástasis. Si nos centramos en la tipo 3, la proliferación excesiva de células epiteliales y la angiogénesis son los “hallmarks” del inicio y crecimiento temprano de los tumores primarios epiteliales. La posterior adquisición de capacidad de invasión, manifestada inicialmente por la invasión de la membrana basal, se piensa que anuncia el

inicio de las últimas fases del proceso multietapa que lleva a la diseminación metastásica.

Los controles genéticos y mecanismos bioquímicos subyacentes a la adquisición del fenotipo invasivo y la subsiguiente diseminación sistémica de la célula cancerosa han sido áreas de intensa investigación.

La progresión de epitelio normal a carcinoma invasivo pasa por múltiples etapas (Figura 1). El estadio de carcinoma invasivo implica la pérdida de polaridad de las células epiteliales y la separación de la membrana basal. La composición de la membrana basal también cambia, alterando las interacciones de las células con la superficie de la matriz extracelular y las redes de señalización. El siguiente paso afecta a la TEM y un cambio en la angiogénesis, facilitando la fase de crecimiento maligno tumoral. La progresión desde esta etapa al cáncer metastásico también involucra la TEM, permitiendo a las células la entrada en la circulación y la salida del torrente sanguíneo en una localización lejana, donde pueden producir micro y macrometástasis, que puede involucrar la transición mesénquima-epitelio (TME) y la regresión a un fenotipo epitelial³⁸.

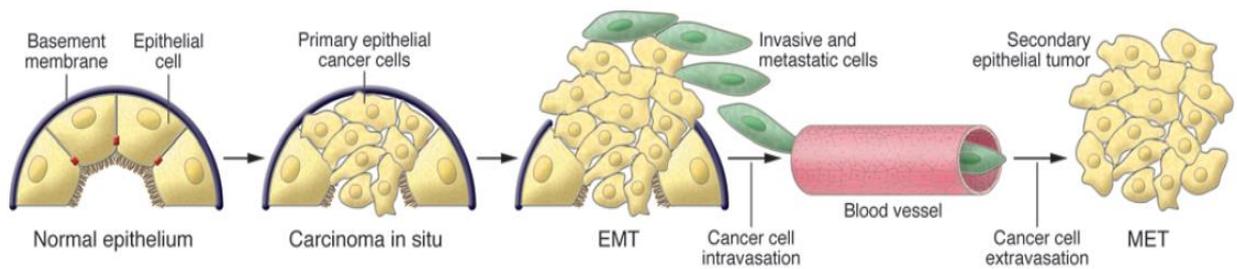


Figura 1: Contribución de la TEM a la progresión del cáncer³⁸.

Durante la TEM, las células pierden las características epiteliales, adquiriendo de esta forma un fenotipo mesenquimal de invasión y migración y un aumento de la resistencia a la apoptosis que permite a estas células abandonar el parénquima tisular y entrar en la circulación sistémica durante las metástasis cancerígenas^{37,38}.

Las “señas de identidad” moleculares de la TEM incluyen la pérdida de expresión o función de E-cadherina y la reducción de las proteínas de unión (como Zona ocludens (ZO-1) y occludina) y de citoqueratinas, así como el incremento concomitante de los marcadores mesenquimales, como la vimentina, fibronectina, proteína específica de fibroblastos (FSP-1), actina de músculo liso- α (α -SMA), y N-cadherina. La pérdida de adhesión entre las uniones de células desencadena un cambio en la composición del citoesqueleto y la estructura celular que altera su polaridad para formar células fusiformes. Estas nuevas células mesenquimales invaden la superficie de la matriz extracelular y migran a través de los tejidos adyacentes a través de la formación de matriz secretada de fibronectina (Figuras 2 y 3)^{36,38}.

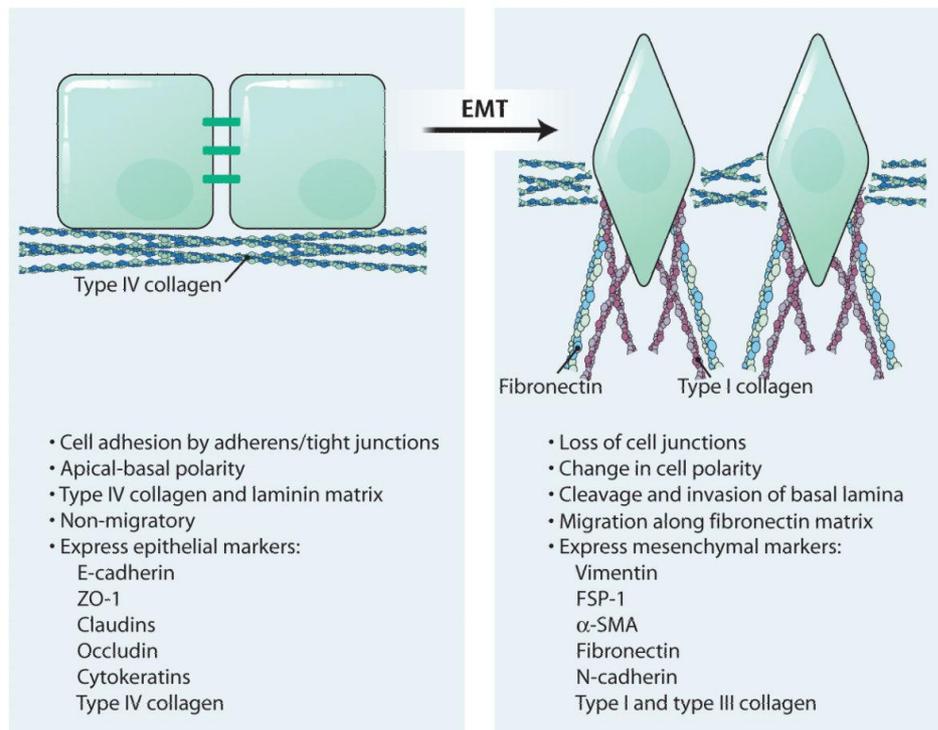


Figura 2. Las células epiteliales presentan una polaridad apical-basal, mostrando una fuerte adhesión célula-célula a través de las uniones adherentes, y presentan una superficie de la matriz formada primariamente por colágeno tipo IV y laminina (izquierda). Tras la inducción de la TEM, las células pierden su adhesión, cambian su morfología y adquieren una polaridad frontal de extremo a extremo (derecha). Estas células se rompen e invaden la lámina basal y migran a través de la nueva matriz formada por fibronectina y colágeno tipo I. El número de biomarcadores epiteliales es reducido, mientras que se elevan los marcadores mesenquimales³⁷.

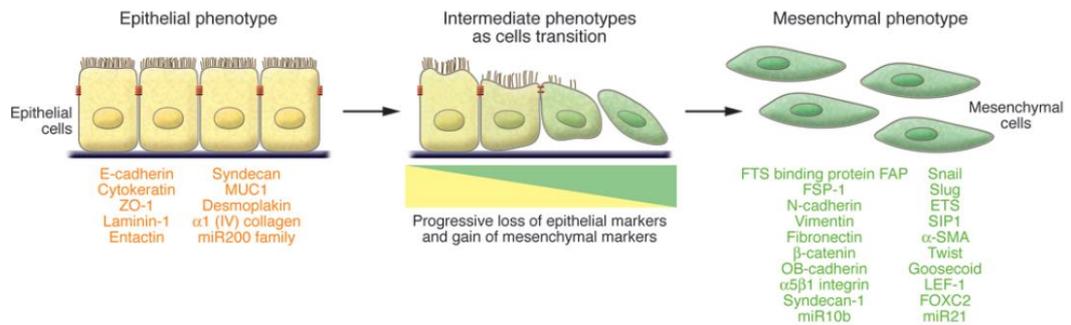


Figura 3. La TEM implica una transición funcional de las células epiteliales polarizadas a células mesenquimales móviles y la secreción de componentes mesenquimales a la matriz extracelular³⁸.

Las células epiteliales de las capas polarizadas se hayan unidas gracias a distintas moléculas de adhesión, como las claudinas y la E-cadherina. Por debajo de esta capa de células, la membrana basal ancla las células epiteliales a la superficie de la matriz extracelular manteniendo la polaridad apical-basal a través de las conexiones entre los filamentos intermedios y los hemidesmosomas. La adhesión entre la membrana basal y las células adyacentes es fundamental para el mantenimiento del fenotipo epitelial. Por otra parte, en las uniones adherentes intercelulares, el dominio citoplasmático de las moléculas de E-cadherina se encuentra unido a las fibras de actina del citoesqueleto por el complejo α - y β -catenina y otras proteínas de anclaje. El citoesqueleto de actina aporta resistencia a la tracción de la célula³⁶. Por lo tanto, tejiendo juntos el citoesqueleto de actina de las células adyacentes, las moléculas de E-cadherina ayudan a la capa de células epiteliales a resistir las fuerzas mecánicas que, de lo contrario, la desgarrarían. Una vez que se elimina la expresión de E-cadherina, muchos de los otros cambios fisiológicos celulares asociados con la TEM parecen seguir el mismo camino^{36,38}.

El papel fundamental de la pérdida de función de la E-cadherina en la adquisición del fenotipo celular maligno se ve respaldado por estudios que indican que el gen *CDH1*, que codifica la E-cadherina, está reprimido por la metilación del promotor en muchos tipos de carcinomas invasivos humanos y, en otros, por ciertos

supresores de la transcripción. Hasta ahora, la pérdida de la expresión o la expresión de proteínas mutadas de E-cadherina se ha documentado en carcinomas avanzados de mama, colon, próstata, estómago, hígado, esófago, piel, riñón y pulmón^{36,38}.

Además, en estudios de distintos tipos de carcinoma con pérdida de expresión de E-cadherina, la re-expresión de esta proteína suprime fuertemente la capacidad de invasión y la diseminación metastásica de las células cancerosas. Para el desarrollo de metástasis, las células necesitan romper las uniones con sus vecinas, migrar a través de la membrana basal y la matriz intersticial e invadir los sistemas de transporte linfáticos y hemáticos. La pérdida de expresión de E-cadherina, relacionado con la disminución de la adhesión célula-célula, al igual que el aumento del marcador mesenquimal vimentina, son eventos distintivos de la TEM y común en carcinomas metastásicos^{32,39}.

En conjunto, estas observaciones indican que los niveles de E-cadherina son determinantes del comportamiento biológico de las células epiteliales cancerosas y que las uniones construidas entre células por las E-cadherinas impiden la invasión y, por lo tanto, la metástasis.

1.2.2 E- Cadherina

La E-cadherina, previamente conocida como ARC 1, uvomorulina, cell-CAM 120/80 o I-CAM, es una proteína transmembrana de 120 kDa de la familia de las glicoproteínas integrales de membrana dependientes de calcio (cadherinas tipo 1) responsables de la adhesión célula-célula (figura 4)^{40,41}. Está codificada por el gen *CDH1*, localizado en la región cromosómica 16q22., se halla presente en la membrana plasmática de la mayoría de las células epiteliales y se ha visto implicada como supresor tumoral en diferentes tipos de tumores epiteliales humanos, inhibiendo la migración y la metástasis³².

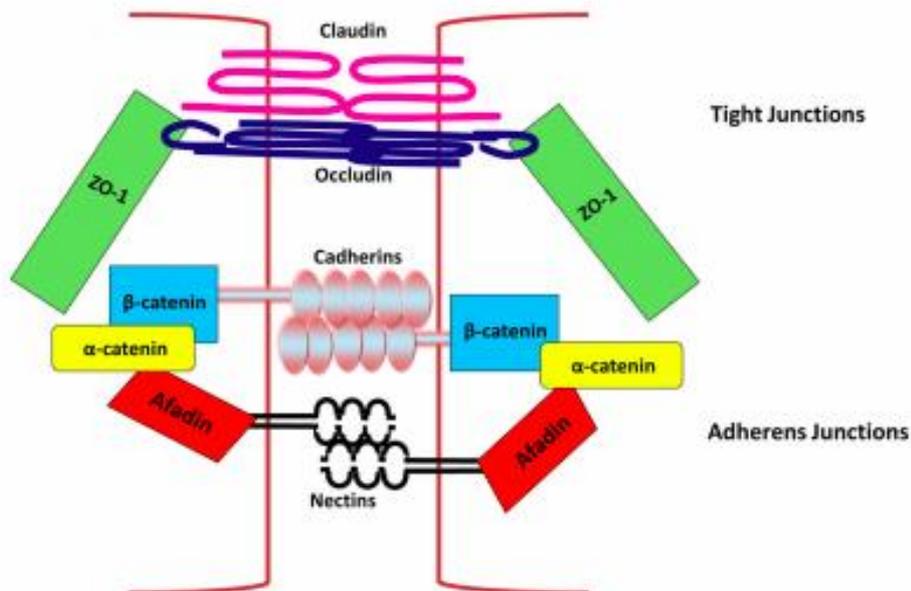


Figura 4. Esquema de las uniones adherentes y uniones estrechas. Las uniones adherentes están compuestas por adhesiones de nectinas y de cadherinas. El dominio extracelular de las nectinas dimerizan con nectinas vecinas y la cola citoplasmática recluta la afadina. Del mismo modo, las cadherinas se unen a cadherinas adyacentes. La cola citoplasmática de cadherina recluta β -catenina que a su vez se une a α -catenina. Más apical a las uniones adherentes son las uniones estrechas. Los principales constituyentes de las uniones estrechas son dos proteínas transmembrana (occludina y claudina). La occludina recluta ZO-1, una proteína de unión a la actina, que puede durante la formación de uniones célula-célula, unirse a la proteína de unión adherente, la α -catenina. Las líneas marrones indican la membrana plasmática de dos células adyacentes⁴¹.

El extremo citoplasmático de la molécula de E-cadherina se liga al citoesqueleto de actina a través de las α -catenina y β -catenina^{42,43}. Así, también la regulación negativa de la α - y β -catenina está asociada con disfunción de la adhesión celular mediada por la E-cadherina y aumento del potencial metastásico^{32,44}.

La familia de las cadherinas se subdivide en 2 ramas, C-1 y C-2, que en conjunto consisten en 8 familias de proteínas. La rama C-1 incluye las cadherinas “clásicas” tipo I, las cadherinas atípicas tipo II, cadherinas desmosómicas (desmocolinas y desmogleinas) y la familia de 7D-cadherinas. La otra subdivisión (C-2) está compuesta por el resto de las tres familias, las cadherinas tipo III, cadherinas Flamingo/CELSR y un nuevo grupo denominado cadherinas tipo IV (DE-cadherina,

Gb1-cadherina, Fc1-cadherina y Af1-cadherina)^{32,45,46,47}.

Dada su función clave en el mantenimiento de la adhesión celular y del fenotipo epitelial, se ha postulado que los cambios o alteraciones en la expresión y/o función de estas moléculas de adhesión célula a célula son un acontecimiento temprano en el proceso de desarrollo de tumores⁴⁸. La E-cadherina funcionaría como un gen supresor tumoral, de modo que su pérdida de expresión favorecería la invasión tumoral⁴⁹.

Por otro lado, E-cadherina inhibe la activación de ligandos dependientes del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Además, otros estudios indican que la vía de señalización del EGFR es capaz de regular la expresión de proteínas que están implicadas en la TEM. Sin embargo, existen estudios que han investigado acerca de la expresión de E-cadherina y su relación con EGFR, y aún no está claro si existe una correlación entre la E-cadherina y la vía de señalización de EGFR dentro del contexto tisular^{39,50}.

Así, estudios previos en CCECC que describen tumores primarios con expresión baja E-cadherina y elevada vimentina (fenotipo TEM), tienen dos veces más de riesgo de presentar metástasis a distancia comparado con tumores CCECC que no tienen la firma de TEM^{32,39, 51,52}.

1.2.3. β -catenina

La β -catenina, codificada por el gen *CTNNB1*, es una proteína de 88 kDa y es miembro de la vía de Wnt que incluye potentes reguladores celulares de proliferación y diferenciación. Se descubrió a finales de los años 80 como una proteína asociada a la E-cadherina. El gen *Wnt1* de ratón, originalmente denominado *Int-1*, fue identificado en 1982 por *Nusse* y *Varmus*⁵³ como un sitio de integración preferencial para el Virus del Tumor Mamario de Ratón en cánceres de mama inducidos por virus.

La β -catenina celular existe en tres localizaciones diferentes: membranoso, citoplasmático y nuclear (figura 5).

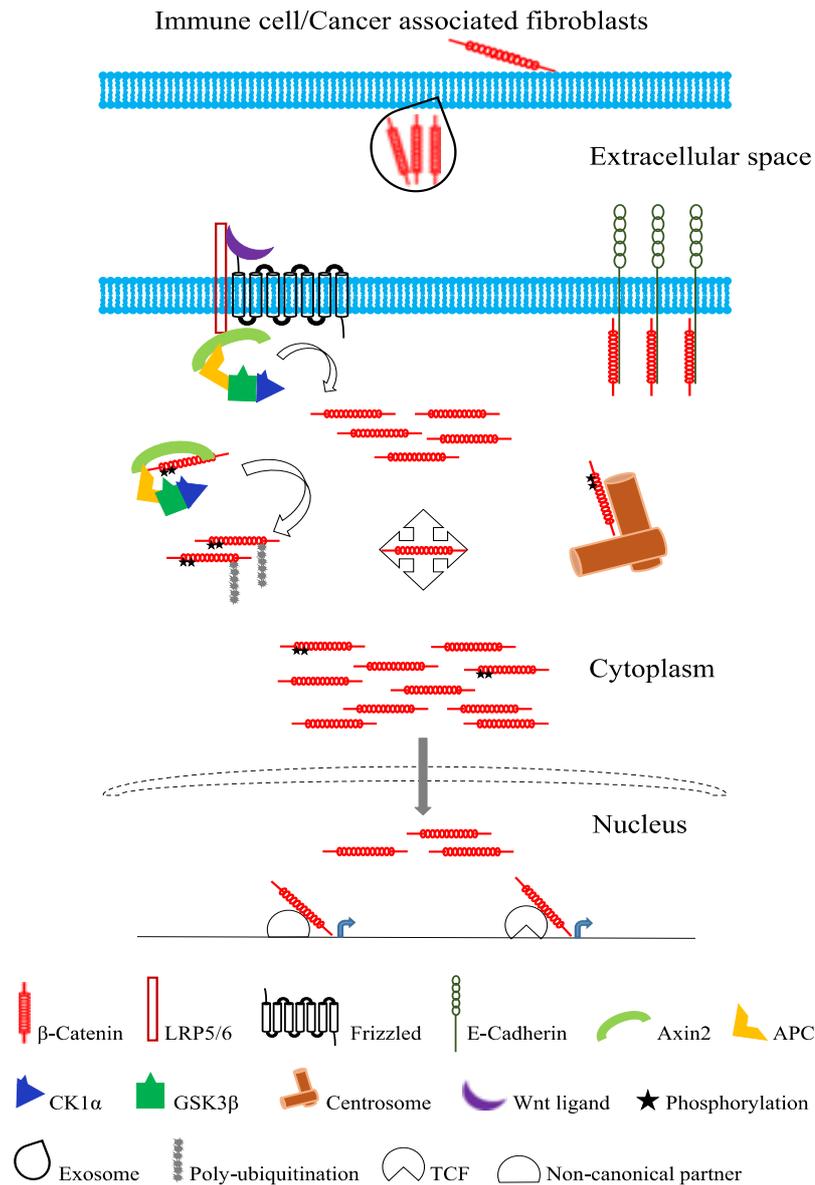


Figura 5. Representación en diagrama de las diferentes localizaciones de la β -catenina⁵⁴.

La β -catenina recién sintetizada se localiza en las Uniones Adherentes (AJ) a través de la interacción con la E-cadherina (combinación membranosa), mientras que el exceso de β -catenina es capturado por un complejo de destrucción (acumulación citoplásmica). En presencia de un complejo de destrucción que funciona de manera subóptima, el exceso de β -catenina se transloca al núcleo (grupo nuclear)⁵⁴.

Esta proteína de 781 aminoácidos consta de tres dominios: amino-terminal (N-terminal), carboxi-terminal (C-terminal) y central. El dominio N-terminal, de 150

aminoácidos, es la región de unión a α -catenina; en este dominio se localizan los sitios de fosforilación de las quinasas en la vía de señalización Wnt/ β -catenina, la glicógeno sintasa quinasa 3 β (GSK3 β) y la caseína quinasa 1 α (CK1 α). El dominio C-terminal, de unos 100 aminoácidos, puede translocarse al interior del núcleo, donde interacciona con factores de transcripción [Leukocyte enhancer factor (LEF) y T-cell factor (TCF)]. La acumulación de β -catenina y TCF/LEF regulan la transcripción de genes diana implicados en la proliferación celular como *CCND1* (que codifica la ciclina D1) y *C-MYC* y metaloproteinasas de matriz celular (MMP-2, 3, 7, 9, 13)^{55,56,57}. La ciclina D1 es un regulador del ciclo celular que impulsa el ciclo celular desde la fase G1 a la fase S y, posteriormente, conduce a la proliferación e invasión de células tumorales. La ciclina D1 puede ser inhibida por los inhibidores correspondientes del ciclo celular p21 y p27 y está aumentada, por ejemplo, en el carcinoma de orofaringe, tiroides, mama, hepatocelular, esofágico y gástrico, así como en tumores malignos linfoides como el Linfoma de células B⁵⁵. El dominio central de 550 aminoácidos está formado por una secuencia de 42 aminoácidos que se repite 12 veces, dominio conocido como “repeticiones armadillo”; esta región que presenta una estructura en hélice, tiene como función la interacción con proteínas como E-cadherina, axina, APC y Tcf/Lef⁵⁶⁻⁵⁹.

Mediante el secuestro de la β -catenina en la superficie celular, la E-cadherina antagoniza las vías de señalización de la β -catenina e induce la inhibición del crecimiento celular^{60,61}. La expresión de E-cadherina puede agotar los niveles de β -catenina citoplasmática y antagonizar el acúmulo de β -catenina nuclear, con una señalización diferente de la adhesión^{56,61}.

Las mutaciones o deleciones de la cola citoplasmática de la E-cadherina donde se ensambla la β -catenina dan como resultado el desmontaje de los complejos de adhesión célula-célula^{62,63}.

Cabe destacar que la β -catenina se asocia con diversas afecciones patológicas como el cáncer, los trastornos neurodegenerativos y la osteoporosis. Esta se encuentra aumentada en una variedad de tumores malignos como los carcinomas de células escamosas de mama, cabeza y cuello, esófago, estómago, colon y cáncer de hígado y se asocia con la invasión y la metástasis⁵⁴.

El acúmulo de β -catenina nuclear/citoplasmática se considera el paso final de la activación de la vía de señalización de WNT con la metilación epigenética de inhibidores de WNT. Se describe un aumento de la expresión de β -catenina nuclear en tumores poco diferenciados, presencia de metástasis ganglionares y tumores con peor pronóstico⁶⁴.

2.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

Estudios previos, asocian cambios en la expresión de E-cadherina y β -catenina con el desarrollo de carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello. Una pérdida de expresión de las moléculas de adhesión se ha relacionado con fenotipos más agresivos, con mayor capacidad de invasión y metástasis^{32,65}. Sin embargo, estos datos son inconsistentes entre diferentes estudios, debido fundamentalmente a la inclusión de tumores de diferentes localizaciones, tratados de muy diversa forma y sin tener en cuenta la infección por el VPH.

Basado en los datos previos, se plantea que la expresión de la E-cadherina y la β -catenina se halla alterada en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello, y que la alteración de su expresión puede estar relacionada con la agresividad tumoral (especialmente con la capacidad metastásica) y el pronóstico de los pacientes.

2.2 OBJETIVOS

El objetivo global de este trabajo es investigar la expresión de E-cadherina y β -catenina en los carcinomas epidermoides de diferentes localizaciones de cabeza y cuello no relacionados con el VPH y su posible significado pronóstico.

Planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Estudio de la expresión de las proteínas E-cadherina y β -catenina en tres grupos de pacientes con carcinoma epidermoide de orofaringe, laringe e hipofaringe.
2. Análisis de la expresión de las proteínas estudiadas y su relación con las características clinicopatológicas.
3. Análisis de la expresión de las proteínas estudiadas y su relación con la supervivencia.
4. Identificación de un perfil de expresión de estas proteínas indicativo de un mayor riesgo de metástasis.

3.MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 PACIENTES Y MUESTRAS TISULARES

Se obtuvieron muestras de tejido tumoral de 382 pacientes consecutivos con carcinomas escamosos de cabeza y cuello: 249 de carcinomas escamosos de orofaringe (108 con origen en amígdala y 141 en base de lengua), 68 carcinomas escamosos de laringe y 65 carcinomas escamosos de hipofaringe, que fueron sometidos a tratamiento quirúrgico en el Hospital Central de Asturias entre 1990 y 2009, recogidos retrospectivamente. El estudio fue aprobado por el comité de ética en investigación clínica del hospital y se obtuvo consentimiento informado de todos los pacientes. Todos los pacientes incluidos fueron tratados quirúrgicamente del tumor primario con intención curativa y 234 (61%) recibieron radioterapia postoperatoria cuando estaba indicado; como regla general recibieron radioterapia los pacientes con tumores clasificados como T4, los pacientes con metástasis ganglionares clasificadas como N2 o superiores, los pacientes con bordes quirúrgicos próximos (<5mm) o afectados, y los casos con extensión extraganglionar (independientemente de la clasificación N).

Los criterios inclusión para cada paciente fueron: (1) diagnóstico de CCE de orofaringe, laringe e hipofaringe, confirmado por biopsia; (2) pacientes no tratados previamente de otra neoplasia; (3) ausencia de infección detectable por VPH; y (4) cirugía curativa como primer tratamiento.

Los criterios de exclusión fueron: (1) enfermedad inoperable o tumores irsecables; (2) presencia de metástasis a distancia en el momento del diagnóstico; (3) presencia de otros tumores primarios; y (4) pacientes que rechazaron el tratamiento quirúrgico.

En conjunto, todos los pacientes tenían un único tumor primario y no recibieron tratamiento previo a la cirugía; se excluyeron aquellos pacientes con tumores VPH positivos para obtener una muestra más homogénea desde el punto de vista biológico. Sólo 10 casos mostraban infección por el VPH (8 en orofaringe, 1 en laringe y otro en hipofaringe), por lo que la muestra final fue de 372 pacientes.

Los datos de los pacientes fueron recogidos de la historia clínica hospitalaria y se incluyeron el sexo, edad, consumo de tabaco y/o alcohol, localización y tamaño del tumor, clasificación pT y pN, tratamiento (cirugía, RT postoperatoria) y seguimiento clínico (recurrencia, desarrollo de segundo tumor primario y muerte). Los pacientes

fueron seguidos un mínimo de 60 meses o hasta su fallecimiento. El tiempo medio de recurrencia fue de 14,4 meses.

Las secciones representativas de tejido tumoral fueron obtenidas del archivo del Servicio de Anatomía Patológica, donde habían sido fijadas con formol e incluidas en bloques en parafina, y el diagnóstico histológico de carcinoma epidermoide fue confirmado por un patólogo experto en estos carcinomas. El grado histológico fue determinado de acuerdo con el grado de diferenciación del tumor (clasificación de Broders). Las series incluían 152 tumores bien diferenciados, 149 moderadamente diferenciados, 80 pobremente diferenciados y 1 verrucoso.

Sólo 16 pacientes eran mujeres, la edad media fue de 59 años (rango entre 30 y 86 años) y la mediana de 58 años. Todos, excepto 14, eran fumadores habituales; 180 moderados (1-50 paquetes/año) y 183 con consumo elevado (> 50 paquetes/año). Y 348 eran consumidores habituales de alcohol; 148 leves-moderados (< 40 gr/día) y 201 con consumo elevado (> 41 gr/día). En los 5 casos restantes se desconocían los hábitos tóxicos.

El estadio del tumor fue determinado de acuerdo con el sistema TNM de la Unión Internacional Contra el Cáncer (7ª edición): 21 tumores eran estadio I, 26 estadio II, 59 estadio III y 276 estadio IV.

Entre los 249 casos de localización orofaríngea sólo 10 pacientes eran mujeres y la edad media fue de 58 años (mediana también de 58 años y rango entre 30 y 85 años). Todos, excepto 7 pacientes, eran fumadores habituales; 115 moderados (1-50 paquetes/año) y 122 con consumo elevado (> 50 paquetes/año); y 235 eran consumidores habituales de alcohol, 80 leve-moderado (< 40 gr/día) y 155 con consumo elevado (> 41 gr/día); en 5 casos no estaba documentado el consumo de alcohol y tabaco. Siete tumores eran estadio I, 21 estadio II, 41 estadio III y 180 estadio IV. 167 pacientes (67%) recibieron RT postoperatoria.

En los tumores localizados en laringe, de los 68 pacientes todos eran hombres, excepto 2 mujeres, y la edad media fue de 62 años (mediana 62, rango entre 36 y 86 años). Todos, excepto 6, eran fumadores habituales, 27 moderados (1-50 paquetes/año) y 35 con consumo elevado (> 50 paquetes/año); 37 eran consumidores leve-moderados de alcohol y 15 con consumo alto. Doce tumores fueron clasificados en estadio I, uno

en estadio II, 17 en estadio III y 38 en estadio IV. 21 pacientes (31%) recibieron RT postoperatoria.

Entre los localizados en hipofaringe, de 65 pacientes 61 eran hombres, con una edad media de 59 años (mediana 58 años, rango entre 43 y 80 años). Excepto un paciente, eran todos fumadores, de los cuales 38 eran fumadores moderados y 26 eran fumadores con consumo elevado. 62 pacientes eran consumidores de alcohol de los cuales 31 con consumo leve-moderado y 31 con consumo elevado. Dos tumores eran estadio I, 4 estadio II, 1 estadio III y 58 eran estadio IV. 46 pacientes (71%) recibieron RT postoperatoria.

3.2 CONSTRUCCIÓN DE LAS MATRICES TISULARES (TISSUE MICROARRAY, TMA)

La serie completa de 382 pacientes afectados por carcinomas de células escamosas de orofaringe, hipofaringe y laringe, fue seleccionada para construir TMAs a partir de muestras de dichos carcinomas fijadas en formol e incluidas en parafina en el archivo del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Central de Asturias con la aprobación del comité de ética en investigación clínica del hospital (Figura 6). El portaobjetos original archivado empleado para el diagnóstico, teñido con hematoxilina-eosina, fue revisado por un Anatomopatólogo que seleccionó tres áreas representativas de diferentes partes del tumor para obtener una muestra de cada una de ellas. De dichas áreas se obtuvieron cilindros de tejido de 1 mm de diámetro que se transfirieron de los bloques donantes a un bloque maestro en forma de rejilla (de 9x10 cilindros de tamaño) usando un instrumento manual de construcción de TMAs. En total, tres núcleos de tejido fueron obtenidos del tejido donante e incluidos en el TMA para representar en su totalidad cada caso. Además, cada TMA contenía 3 cilindros de epitelio normal (de amígdala, laringe e hipofaringe obtenido de cirugía no oncológica) para control interno. Para comprobar el diagnóstico histopatológico y la adecuada representatividad de los tejidos incluidos en los TMAs, una sección de cada uno era teñido con hematoxilina-eosina y evaluada con el microscopio óptico.

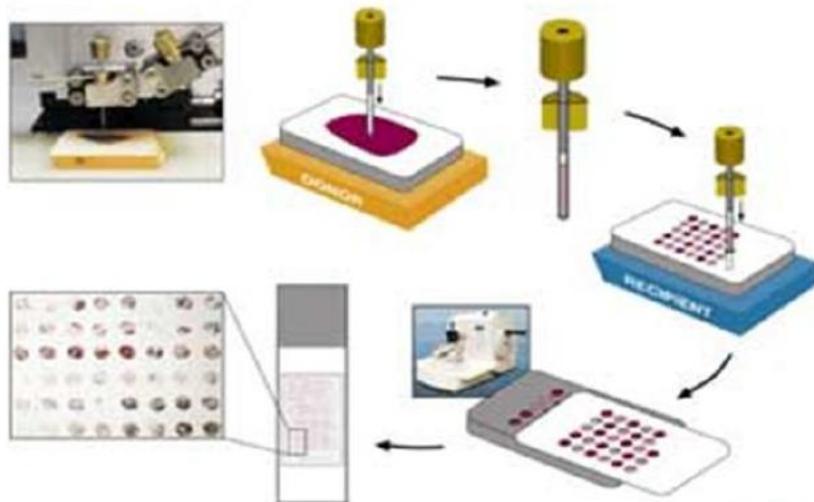


Figura 6. Pasos necesarios para la construcción de TMAs. Los núcleos de tejido se extraen de los bloques existentes y se colocan en un solo bloque que contiene múltiples casos. Las secciones se cortan para crear portaobjetos microscópicos que contienen decenas de muestras para análisis de laboratorio⁶⁶.

3.3 ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO

Los TMAs se cortaron en secciones de 3 μm y fueron secados en un portaobjetos de microscopio Flex IHC (DakoCytomation,). Las secciones fueron desparafinizadas en xileno y rehidratadas con un gradiente de alcoholes. La recuperación del antígeno fue llevada a cabo calentando la preparación durante 5 minutos en un tampón de citrato. La tinción se realizó a temperatura ambiente en un Dispositivo Automático de Tinción (Dako Autostainer, Dako Cytomation), usando el Envision peroxidase mouse system (Envision Plus, DakoCytomation). Los portaobjetos fueron colocados en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% durante 20 minutos y luego se les dejó reaccionar con los siguientes anticuerpos: anti-p53 (clon DO-7, Dako Cytomation) a una dilución de 1:50, anti-p16 (clon E6H4, Roche) a una dilución de 1:100, anti-E-Cadherina (BD Biosciences) con una dilución de 1:4000, y anti- β -Catenina (BD Biosciences) con una dilución de 1:200.

La Inmunodetección se llevó a cabo por medio del sistema Envision Plus, utilizando diaminobenzidina (DAB) como sustrato cromógeno (Dako). El paso final fue la contratinción con hematoxilina durante 1 min. Después de la tinción, los portaobjetos

fueron deshidratados nuevamente a través de un gradiente de alcoholes y se finalizó la preparación colocando un cubreobjetos utilizando un medio estándar.

Las muestras fueron evaluadas por dos observadores independientes con desconocimiento de los datos clínicos. La inmunotinción fue cuantificada de la siguiente forma:

1. p16: La tinción de p16 fue puntuada como negativa (0) cuando no había tinción; tinción leve a moderada (1+) cuando había expresión nuclear y/o citoplasmática en menos del 70% de las células; y tinción fuerte (2+) cuando había tinción difusa nuclear y citoplasmática en más del 70% de las células tumorales. Puntuaciones ≥ 2 se consideraron como expresión positiva de p16.
2. p53: La tinción nuclear de más del 10% de las células malignas se consideró tinción positiva para p53.
3. E-cadherina y β -catenina: Según el porcentaje de células teñidas, se asignaron puntuaciones de 0 a 3 con una tinción de la membrana del 0%, del 1% al 10%, del 11% al 50% y del 51% al 100% respectivamente. La intensidad de tinción se clasificó en una escala de 0 a 2 (0 = negativo, 1 = débil, 2 = fuerte). Los datos sin procesar se convirtieron a la Puntuación de Inmunorreactividad Alemana (German Immunoreactive Score, IRS), multiplicando las puntuaciones de cantidad e intensidad de tinción. Teóricamente, las puntuaciones tenían un rango de 0 a 6. Una puntuación de IRS igual o por encima de la media (4 o superior) se consideró expresión fuerte y de 0 a 3 expresión débil. En el caso de β -catenina nuclear, la tinción nuclear de más del 10% de las células tumorales se consideró tinción nuclear positiva.

Para p53 se utilizó como control positivo una muestra de adenocarcinoma de colon que se sabía que expresaba p53. Para p16 se empleó como control positivo una muestra de carcinoma de cérvix uterino. Para E-cadherina y β -catenina el control positivo fue epitelio faríngeo normal. Como control negativo se incluyó una muestra de la preparación no expuesta al antisuero.

3.4 DETECCIÓN DE VPH

La detección de ADN de VPH de alto riesgo y genotipado se realizó según se ha descrito previamente^{10,67,68} y se resume a continuación.

Todos los casos fueron evaluados mediante la determinación inmunohistoquímica de la expresión de p16 y p53, y aquellos casos que presentaban una tinción positiva para p16, fueron sometidos a detección del ADN de VPH de alto riesgo y genotipado mediante la reacción de la cadena de polimerasa (PCR) empleando los cebadores de consenso GP5+/6+, y posterior genotipado mediante inmunoensayo enzimático (EIA) para la detección de 14 subtipos de VPH de alto riesgo (VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68). El genotipado de los casos positivos en el EIA se llevó a cabo por hibridación, empleando la plataforma Luminex. Los casos positivos al realizar la PCR con los cebadores GP5+/6+ fueron sometidos para confirmación adicional a una PCR específica para VPH 16 usando cebadores localizados en el gen E7 (fw: GAGGAGGAGGATGAAATAGATGGT, y re: TTGTACGCACAACCGAAGC). En todos los experimentos se realizaron en paralelo reacciones sin añadir muestra alguna para descartar contaminación.

Para una mayor seguridad en la detección del ADN viral se llevó a cabo también una hibridación “in situ” (ISH) con sondas de ADN de VPH biotinilado que reaccionaba con los tipos de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68 (kit Y1443, Dako) en secciones de tejido fijados con formalina e incluidos en parafina.

Secciones de tejido de 4 micrómetros fueron desparafinizadas en xileno, rehidratadas con alcohol y secadas al aire. Las secciones fueron luego tratadas con proteinasa K para que las muestras de ADN fueran accesibles a las sondas biotiniladas y posteriormente fueron nuevamente deshidratadas mediante un gradiente de alcoholes. A continuación, las sondas de ADN fueron añadidas a la preparación y se colocó un cubre-objetos.

Las sondas y el ADN diana fueron desnaturalizados colocando los portaobjetos en una superficie calentadora plana a 92°C durante 5 minutos. Tras la desnaturalización, los portaobjetos fueron colocados en una cámara húmeda pre-calentada a 37°C durante 16 horas para que se produjese la hibridación. La detección de la sonda hibridada se llevó a cabo usando el GenPoint Detection System (K0620, Dako) siguiendo las

instrucciones proporcionadas con el kit.

Como control positivo se emplearon muestras de carcinoma de cérvix uterino positivas para el VPH-16. Los resultados fueron evaluados por dos observadores independientes. La tinción focal con Diaminobenzidina en el núcleo de las células tumorales se consideró VPH positivo.

De las 382 muestras, 10 pacientes [(8 pacientes con CCEO, 1 con CCEL y 1 con carcinoma de células escamosas de hipofaringe (CCEH)] fueron positivos para la infección por VPH: presentaron expresión positiva de p16 y negativa de p53, con detección del ADN del VPH, y resultado positivo en la ISH; en todos los casos se trataba del VPH-16. Estos casos VPH-positivos se excluyeron del estudio final para obtener una muestra más homogénea.

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El test de χ^2 y test exacto de Fisher se usaron para comparar las variables categóricas. Para el análisis temporal, se realizaron curvas de Kaplan-Meier. Se emplearon los modelos de riesgo proporcional de Cox para el análisis univariante y multivariante. Se obtuvieron *hazard ratios* (HR) con un intervalo de confianza (IC) del 95% y un valor P . Todos los test eran bimodales. Los valores de $P \leq 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1 EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN CARCINOMAS ESCAMOSOS DE CABEZA Y CUELLO

4.1.1 Patrones de expresión en epitelio normal y carcinomas primarios

Tanto E-cadherina como β -catenina mostraron una fuerte tinción de membrana en todas las células (IRS=6) en el epitelio escamoso normal usado como control positivo.

Ejemplos de tinción de epitelio normal se muestran en las Figuras 7 y 8.

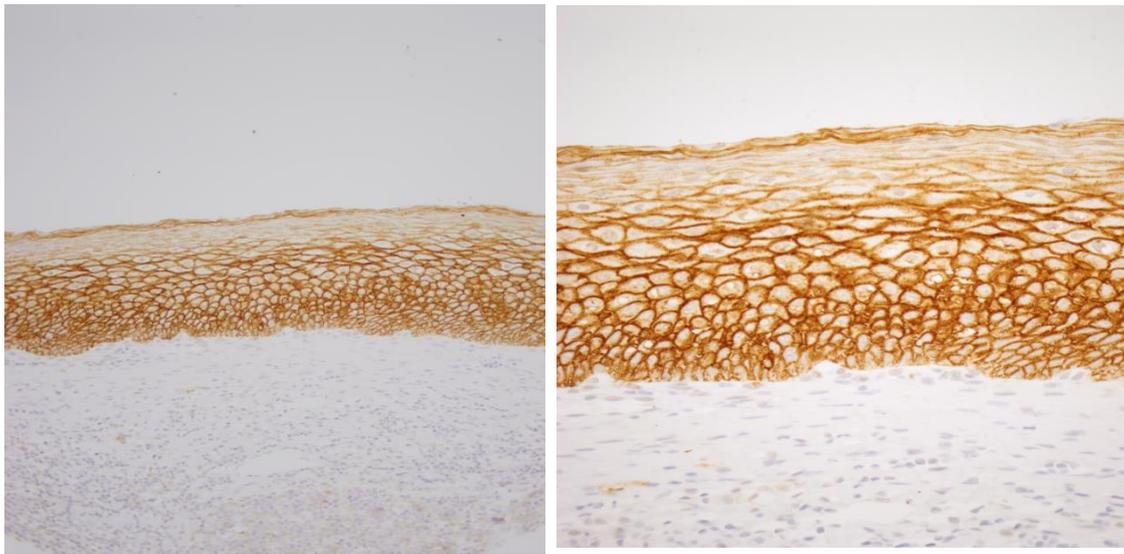


Figura 7: Tinción de E-cadherina en el epitelio normal: (A) 200x (B) 400x.

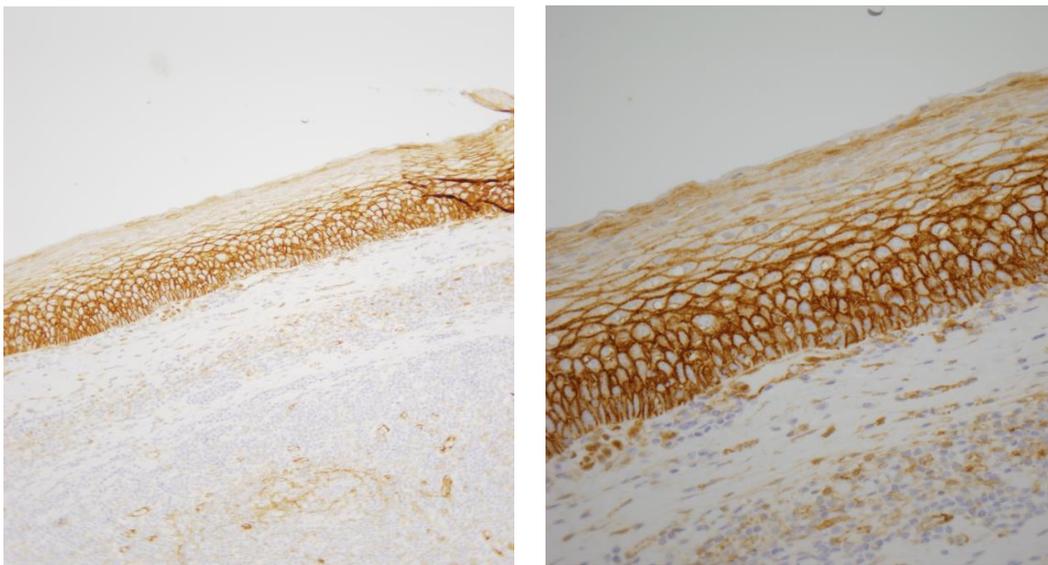


Figura 8: Tinción de β -catenina en el epitelio normal: (A) 200x (B) 400x.

Se evaluó la expresión de E-cadherina y β -catenina en 349 casos. En los 36 casos restantes no se pudo evaluar por problemas con la representatividad y/o calidad de las muestras. 340 carcinomas mostraron algún tipo de tinción de E-cadherina. La expresión fue generalmente más débil en relación a la tinción del epitelio normal; la puntuación IRS media [(+/- desviación estándar (DE))] para los carcinomas fue de 4,3 +/- 1,8 (mediana 4).

Se observó expresión de β -catenina de membrana en 327 casos. Similar a la E-cadherina, la tinción de β -catenina de membrana era más débil respecto al epitelio normal, con una puntuación media IRS de 4 +/-2 (mediana 3). La expresión de β -catenina nuclear se observó en 46 casos (13,3%) y, en general, estos casos presentaban una tinción de membrana negativa o muy débil.

Ejemplos de tinción negativa y positiva para E-cadherina y β -catenina se muestran en las figuras 9 y 10.

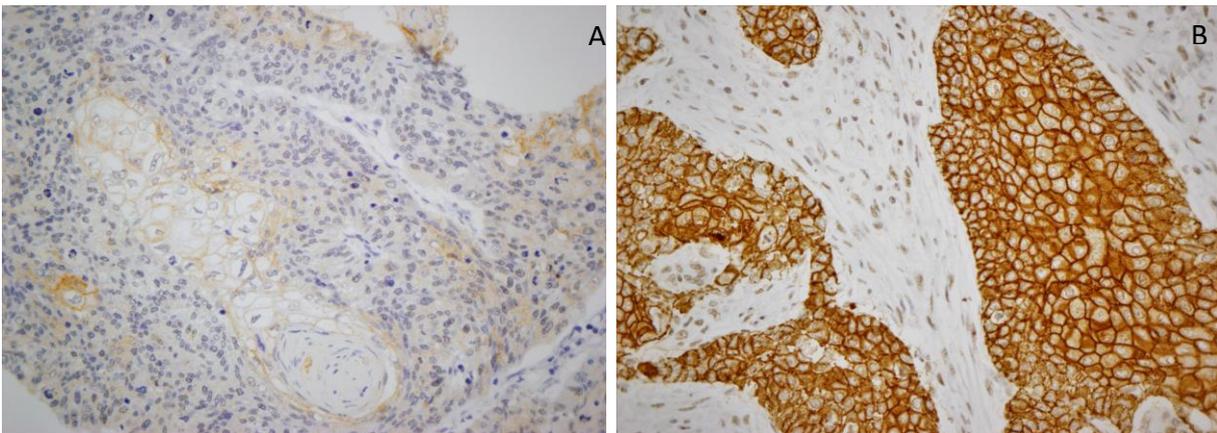


Figura 9: Tinción de E-cadherina en carcinomas (x400): (A) Tinción negativa y (B) tinción positiva de membrana.

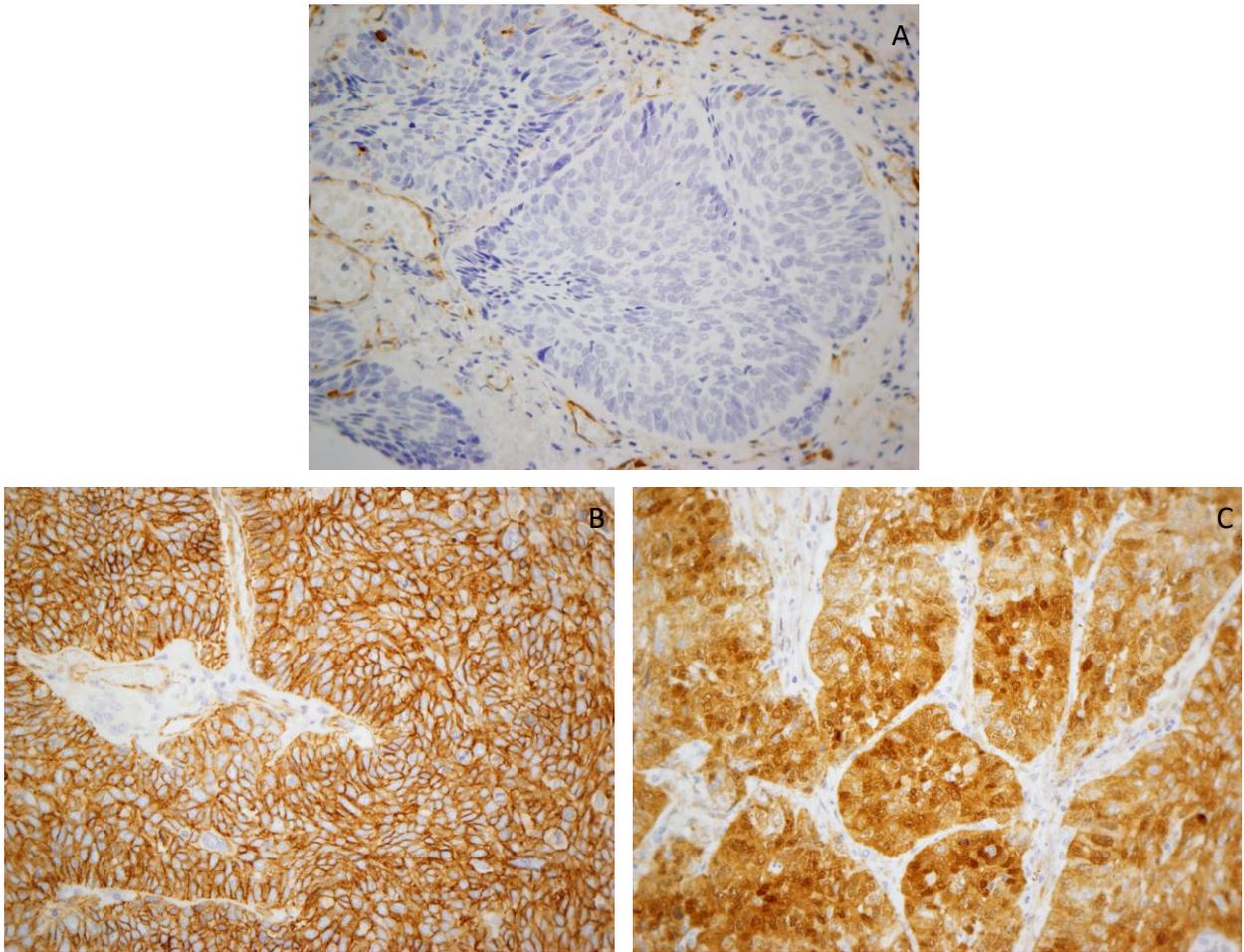


Figura 10: Tinción de β -catenina en carcinomas (x400): (A) tinción negativa, (B) tinción positiva de β -catenina de membrana y (C) tinción positiva de β -catenina nuclear.

Se observó una fuerte correlación entre la expresión de E-cadherina y β -catenina de membrana (coeficiente de correlación de Pearson de 0.604, $P < 0,001$) y una correlación inversa entre la expresión de E-cadherina y β -catenina de membrana y la expresión de β -catenina nuclear (-0,258, $P < 0,001$ para E-cadherina, y -0,321, $P < 0,001$ para β -catenina).

4.1.2 Asociación de expresión de E-cadherina y β -catenina con parámetros clínico-patológicos

La tabla 1 resume las correlaciones entre la expresión de E-cadherina y de β -catenina (de membrana/nuclear) con el consumo de tabaco y alcohol, localización tumoral, clasificación pT, metástasis ganglionares, estadio de enfermedad y grado histológico.

Se observó una asociación significativa con la localización a nivel de faringe y una baja expresión de β -catenina de membrana ($P < 0,05$) y casi significativa con la expresión positiva de β -catenina nuclear ($P = 0,06$).

Se asoció también de forma significativa una baja expresión de β -catenina de membrana en tumores avanzados T3-T4 ($P = 0,005$). También se observó que una baja expresión de E-cadherina y una expresión positiva de β -catenina nuclear fue más frecuente en tumores avanzados T3-T4 ($P = 0,097$ y $P = 0,192$, respectivamente) y estadios avanzados III-IV ($P = 0,117$ y $P = 0,064$, respectivamente).

Tabla 1. Expresión de E-cadherina y β -catenina en relación con las características clínico-patológicas en paciente con CCE de orofaringe, laringe e hipofaringe

Características	Nº de casos	Baja expresión E-cadherina (%)	Valor <i>P</i>	Baja expresión Beta-catenina	Valor <i>P</i>	Expresión Beta catenina nuclear	Valor <i>P</i>
Consumo tabaco - Nunca - Leve-Moderado (<50 PA) - Elevado (>50 PA) - Sin datos	10 162 172 5	3 (30) 78 (48) 72 (42)	0,331	5 (50) 85 (53) 89 (49)	0,855	2 (20) 19 (12) 28 (16)	0,429
Consumo alcohol - Nunca - Leve - Moderado - Elevado - Sin datos	22 35 92 195 5	4 (18) 17 (49) 50 (54) 82 (42)	0,015	7 (32) 15 (43) 48 (52) 105 (54)	0,183	2 (9) 5 (14) 9 (10) 33 (17)	0,373
Clasificación pT - T1-T2 - T3 - T4	104 117 128	37 (36) 53 (45) 62 (49)	0,097	43 (41) 54 (46) 77 (38)	0,005	17 (16) 11 (9) 21 (17)	0,192
Clasificación pN - N0 - N1-3	93 256	36 (38) 117 (46)	0,244	47 (50) 128 (50)	0,929	11 (12) 38 (15)	0,473
Estadio - I-II - III - IV	36 59 254	10 (28) 28 (47) 115 (45)	0,117	14 (39) 27 (46) 134 (53)	0,226	4 (11) 3 (5) 42 (16)	0,064
Grado histológico - Bien - Moderado - Pobre - Verrucoso	136 139 73 1	64 (47) 53 (38) 36 (49)	0,192	75 (55) 62 (45) 38 (52)	0,205	20 (15) 13 (9) 16 (22)	0,042
Recurrencia - No - Si	135 214	54 (40) 99 (46)	0,251	57 (42) 118 (55)	0,019	12 (9) 37 (17)	0,028
Localización - Orofaringe - Laringe - Hipofaringe	232 59 58	106 (46) 20 (34) 27 (47)	0,239	124 (52) 21 (36) 30 (52)	0,048	39 (17) 3 (5) 7 (12)	0,061
Casos totales	349	153 (44)		175 (50)		49 (14)	

Abreviatura: PA, paquetes año

4.1.3 Asociación de la expresión de E-cadherina y β -catenina con la recidiva tumoral

La tabla 2 resume las correlaciones entre la expresión de E-cadherina y β -catenina (de membrana/nuclear) y las recidivas tumorales.

Se observó una correlación entre la baja expresión β -catenina de membrana y la expresión positiva de β -catenina nuclear y la recidiva tumoral ($P=0,019$ para la β -catenina de membrana, y $P=0,028$ para la β -catenina nuclear).

Tabla 2. Expresión de E-cadherina y β -catenina en relación con la recidiva tumoral en pacientes con CCE de orofaringe, laringe e hipofaringe.

Características	Nº de casos	Baja expresión E-cadherina (%)	Valor <i>P</i>	Baja expresión Beta-catenina	Valor <i>P</i>	Expresión Beta catenina nuclear	Valor <i>P</i>
Recurrencia							
- No	135	54 (40)	0,251	57 (42)	0,019	12 (9)	0,028
- Si	214	99 (46)		118 (55)		37 (17)	
Tipo de recidiva							
- No	135	54 (40)	0,068	57 (42)	0,142	12 (9)	0,042
- Local	53	17 (32)		29 (55)		8 (15)	
- Regional	30	11 (37)		13 (43)		3 (10)	
- Locorregional	63	33 (56)		36 (57)		14 (22)	
- Metástasis a distancia	35	18 (51)		19 (54)		9 (26)	
- Locorregional y MD	33	18 (55)		21 (64)		3 (9)	
Casos totales	349	153 (44)		175 (50)		49 (14)	

Abreviaturas: MD, metástasis a distancia

4.1.4 Asociación de expresión de E-cadherina y β -catenina con la supervivencia

El análisis de regresión univariante de Cox mostró que pacientes con baja expresión de E-cadherina presentaban una peor supervivencia global y específica para enfermedad, (HR 1,37; 95% IC 1,07-1,75; $P=0,013$ y HR 1,31; 95% IC 0,99-1,73; $P=0,059$, respectivamente).

Pacientes con tumores con elevada expresión de E-cadherina presentaron una supervivencia global a los 5 años del 33%, frente al 21% en aquellos que presentaban una baja expresión de E-cadherina (Figura 11).

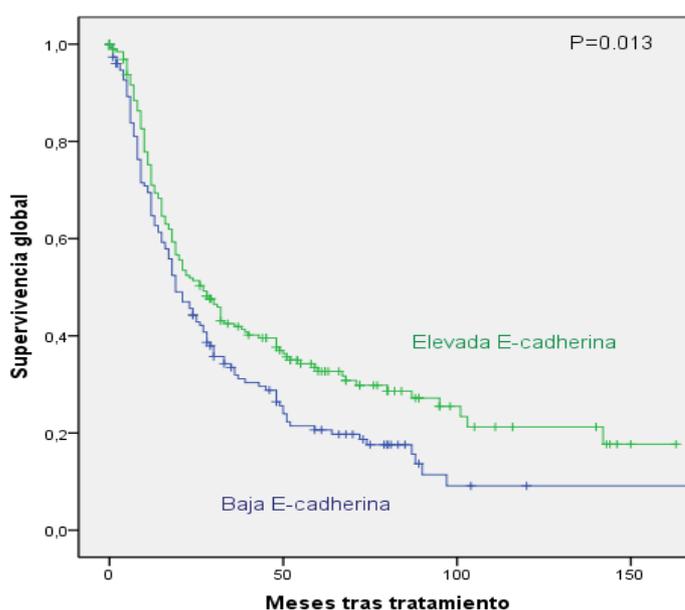


Figura 11: Supervivencia global en función de la expresión de E-cadherina.

Se observó una supervivencia específica para enfermedad del 31% a los 5 años en los casos con baja expresión de E-cadherina, frente a un 40% en los casos con elevada expresión de E-cadherina (Figura 12).

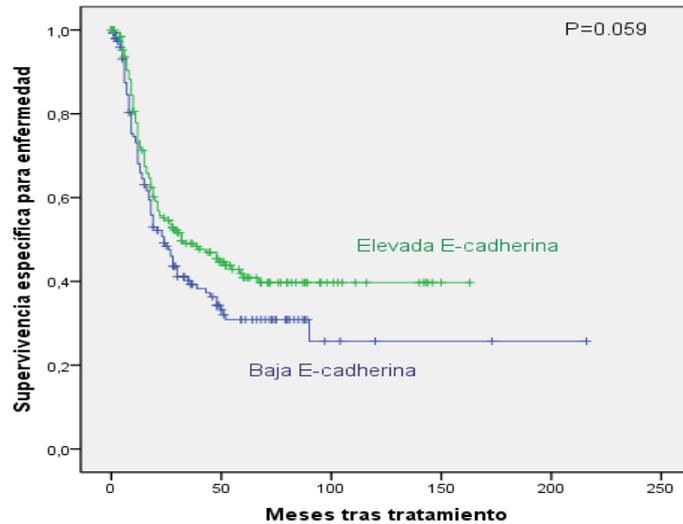


Figura 12: Supervivencia específica para la enfermedad en función de la expresión de E-cadherina.

Los pacientes con una baja expresión de β -catenina de membrana presentaban una peor supervivencia tanto global como específica para enfermedad (HR 1,463; 95% IC 1,14-1,87; $P=0,03$ y HR 1,54; 95% IC 1,16-2,04; $P=0,003$, respectivamente). La supervivencia global a los 5 años fue del 35% en pacientes con elevada expresión de β -catenina de membrana, frente a un 20% con baja expresión de β -catenina de membrana (Figura 13).

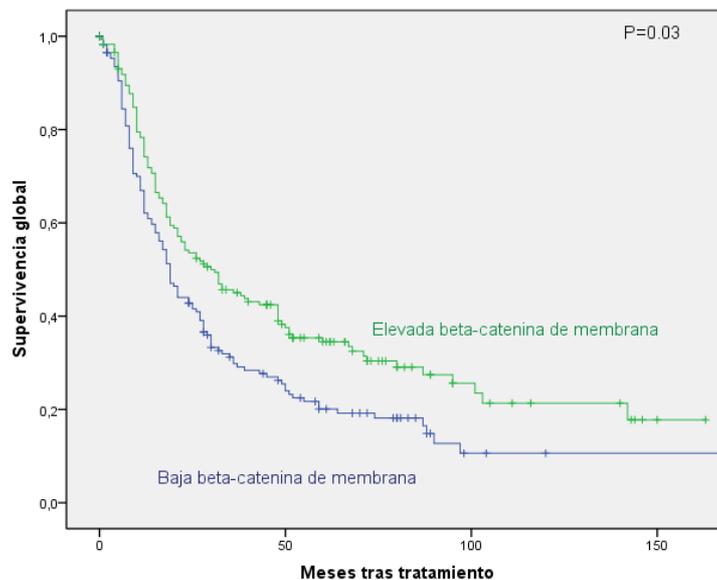


Figura 13: Supervivencia global en función de la expresión de membrana de β -catenina.

Se observó una supervivencia específica para enfermedad del 29% a los 5 años en pacientes con tumores con baja expresión de β -catenina de membrana, frente a un 45% en pacientes con tumores con elevada expresión de β -catenina de membrana. (Figura 14).

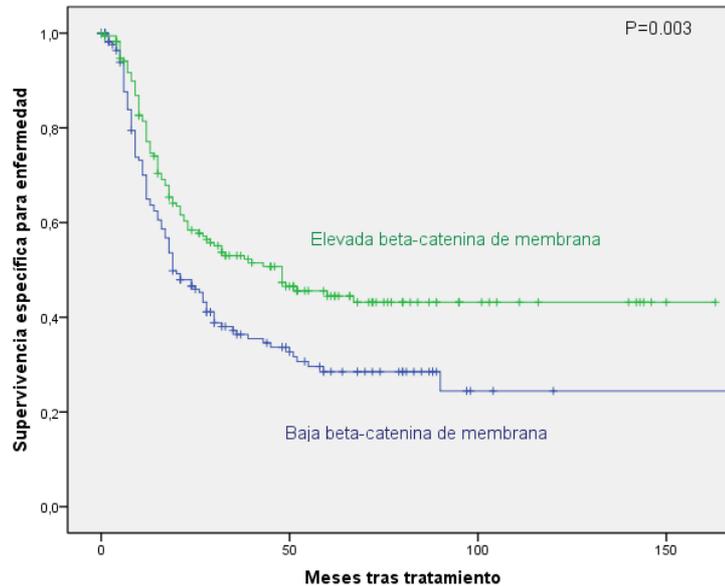


Figura 14: Supervivencia específica para la enfermedad en función de la expresión de β -catenina.

La expresión de β -catenina nuclear se asoció a una peor supervivencia global y específica para enfermedad (HR 0,73; 95% IC 0,52-1,04; $P=0,084$ y HR 0,64; 95% IC 0,44-0,93; $P=0,019$). Pacientes con tumores con expresión positiva de β -catenina nuclear presentaron una supervivencia global a los 5 años del 14%, frente al 30% en aquellos que presentaba expresión negativa de β -catenina nuclear (Figura 15).

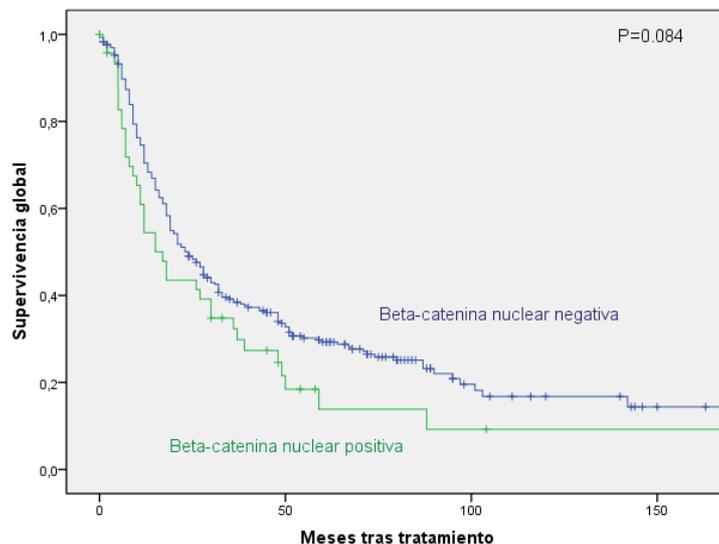


Figura 15: Supervivencia global en función de la expresión nuclear de β -catenina.

Se observó una supervivencia específica para enfermedad del 23% a los 5 años en pacientes con tumores con expresión positiva de β -catenina nuclear, frente a un 39% en pacientes con tumores con expresión negativa de β -catenina nuclear (Figura 16).

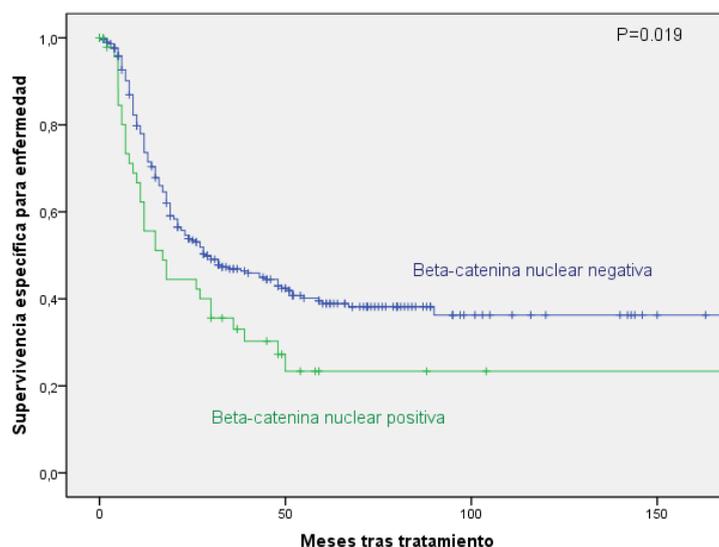


Figura 16: Supervivencia específica para la enfermedad en función de la expresión nuclear de β -catenina.

Se realizó un análisis multivariante de Cox incluyendo tamaño del tumor (dicotomizando T1-T2 frente a T3-T4), metástasis ganglionares (N0 frente a N+),

expresión de E-cadherina y expresión de β -catenina de membrana y nuclear. Este modelo mostró que en tumores avanzados T3-T4, la presencia de metástasis ganglionares y la baja expresión de β -catenina de membrana eran predictores independientes de disminución de la supervivencia global y específica para enfermedad (Tabla 3).

Tabla 3: Análisis multivariante de Cox en pacientes con CCE de orofaringe, laringe e hipofaringe

Parámetro	HR (95% IC) SEE	Valor P	HR (95% IC) SG	Valor P
Clasificación pT				
- T1-T2	1	0,013	1	0,008
- T3-T4	1,58 (1,1-2,28)		1,54 (1,12-2,11)	
Clasificación pN				
- N0	1	0,001	1	0,001
- N1-3	2,53 (1,72-3,71)		2,12 (1,55-2,9)	
Expresión E-cadherina				
- Elevada	1	0,63	1	0,659
- Baja	0,91 (0,64-1,31)		1,07 (0,77-1,48)	
Expresión β -catenina de membrana				
- Elevada	1	0,031	1	0,084
- Baja	1,49 (1,03-2,14)		1,33 (0,96-1,85)	
Expresión β -catenina nuclear				
- Negativa	1	0,11	1	0,426
- Positiva	1,39 (0,92-2,09)		1,16 (0,8-1,68)	

Abreviaturas: IC, intervalo de confianza; HR, hazard ratio; SEE, supervivencia específica de enfermedad; SG, supervivencia global.

4.2 EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN CARCINOMAS ESCAMOSOS DE OROFARINGE

4.2.1 Patrones de expresión en carcinomas primarios

Se pudo evaluar la expresión de E-cadherina y β -catenina en 232 de los 241 casos localizados en la orofaringe. En los restantes 9 casos no se ha podido evaluar por problemas con la representatividad y/o calidad de las muestras. Todos excepto 5 carcinomas mostraron algún tipo de tinción de E-cadherina. La expresión fue generalmente más débil que en el epitelio normal; la puntuación IRS media (+/- desviación estándar) para los carcinomas fue de 4,2 +/- 1,8 (mediana 4).

Se observó expresión de β -catenina de membrana en 223 casos. Similar a la E-cadherina, la tinción de β -catenina de membrana era más débil que la del epitelio normal, con una puntuación media IRS de 3,9 +/-1,9 (mediana 4). La expresión de β -catenina nuclear se observó en 40 casos (17%) y, en general, estos casos presentaban una tinción de membrana negativa o muy débil.

Existía una fuerte correlación entre la expresión de E-cadherina y β -catenina de membrana (coeficiente de correlación de Pearson de 0,626, $P<0,001$), y una correlación inversa entre la expresión de E-cadherina y β -catenina de membrana y la expresión de β -catenina nuclear (-0,259, $P<0,001$ para E-cadherina y -0,304, $P<0,001$ para β -catenina).

4.2.2 Asociación de la expresión de E-cadherina y β -catenina con los parámetro clínico-patológicos

La tabla 4 resume las correlaciones entre la expresión de E-cadherina y de β -catenina (de membrana/nuclear) con el consumo de tabaco y alcohol, clasificación pT, metástasis ganglionares, estadio de enfermedad y grado histológico.

Ningún parámetro se asoció de forma significativa a la expresión baja de E-cadherina y de β -catenina de membrana ni a la expresión de β -catenina nuclear. Sin embargo, una baja expresión de E-cadherina fue más frecuente en los tumores avanzados: T3-T4, N+ y estadio III-IV, aunque sin diferencias significativas.

Tabla 4. Expresión de E-cadherina y β -catenina en relación con las características clínico-patológicas en paciente con CCE de orofaringe

Características	Nºde casos	Baja expresión E-cadherina (%)	Valor P	Baja expresión Beta-catenina	Valor P	Expresión Beta catenina nuclear	Valor P
Consumo tabaco - Nunca - Leve-Moderado (<50 PA) - Elevado (>50 PA) - Sin datos	5 119 103 5	3 (60) 57 (48) 46 (45)	0,74	3 (50) 66 (52) 55 (53)	0,92	2 (40) 17 (14) 20 (19)	0,23
Consumo alcohol - Nunca - Leve - Moderado - Elevado - Sin datos	5 14 56 152 5	2 (40) 7 (50) 33 (59) 64 (43)	0,18	1 (20) 8 (57) 32 (57) 83 (55)	0,45	0(0) 3 (21) 8 (14) 28(18)	0,63
Clasificación pT - T1-T2 - T3 - T4	71 78 83	27 (38) 41 (52) 38 (46)	0,20	32 (45) 41 (52) 51 (61)	0,12	13 (18) 10 (13) 16 (19)	0,50
Clasificación pN - N0 - N1-3	58 174	21 (36) 85 (49)	0,13	34 (58) 90 (52)	0,45	8 (14) 31 (18)	0,55
Estadio - I-II - III - IV	24 39 169	7 (29) 19 (49) 80 (47)	0,23	12 (50) 21 (54) 91 (54)	0,94	4 (17) 2 (5) 33 (19)	0,09
Grado histológico - Bien - Moderado - Pobre	108 86 39	52 (48) 36 (42) 18 (46)	0,69	63 (58) 44 (51) 17 (43)	0,23	20 (18) 11 (13) 8 (20)	0,46
Recurrencia - No - Si	93 139	39 (42) 67 (48)	0,42	45 (48) 79 (57)	0,29	12 (13) 27 (19)	0,21
Casos totales	232	106 (46)		124 (53)		39 (17)	

Abreviatura: PA, paquetes año

4.2.3 Asociación de expresión de E-cadherina y β -catenina con la recidiva tumoral

La tabla 5 resume las correlaciones entre la expresión de E-cadherina y β -catenina (de membrana/nuclear) y las recidivas tumorales.

No se observó asociación de forma significativa entre la baja de expresión de E-cadherina y de β -catenina de membrana y la recidiva tumoral.

Tabla 5. Expresión de E-cadherina y β -catenina en relación con la recidiva tumoral en pacientes con CCE de orofaringe

Características	Nº de casos	Baja expresión E-cadherina (%)	Valor P	Baja expresión Beta-catenina	Valor P	Expresión Beta catenina nuclear	Valor P
Recurrencia							
- No	95	40 (42)	0,42	45 (48)	0,29	12 (13)	0,21
- Sí	137	65 (47)		79 (57)		27 (19)	
Tipo de recidiva							
- No	95	40 (42)	0,15	45 (48)	0,62	12 (13)	0,13
- Local	46	19 (41)		27 (58)		9 (19)	
- Regional	17	7 (41)		9 (52)		2 (12)	
- Locorregional	32	17 (53)		18 (56)		5 (16)	
- Metástasis a distancia	29	17 (59)		18 (62)		9 (31)	
- Locorregional y MD	13	6 (46)		7 (41)		2 (12)	
Casos totales	232	106 (45)		124 (53)		39 (17)	

Abreviaturas: MD, metástasis a distancia

4.2.4 Asociación de expresión de E-cadherina y β -catenina con la supervivencia

El análisis de regresión univariante de Cox mostró que pacientes con baja expresión de E-cadherina presentaban una peor supervivencia global y específica para enfermedad, aunque las diferencias fueron significativas sólo en la supervivencia global (HR 1,44; 95% IC 1,07-1,94; $P=0,017$ y HR 1,33; 95% IC 0,95-1,9; $P=0,09$, respectivamente; Figura 17). La supervivencia específica y global a los 5 años en pacientes con baja expresión de E-cadherina es del 31% y del 19%, respectivamente; frente a un 44% y un 34% en elevada expresión de E-cadherina.

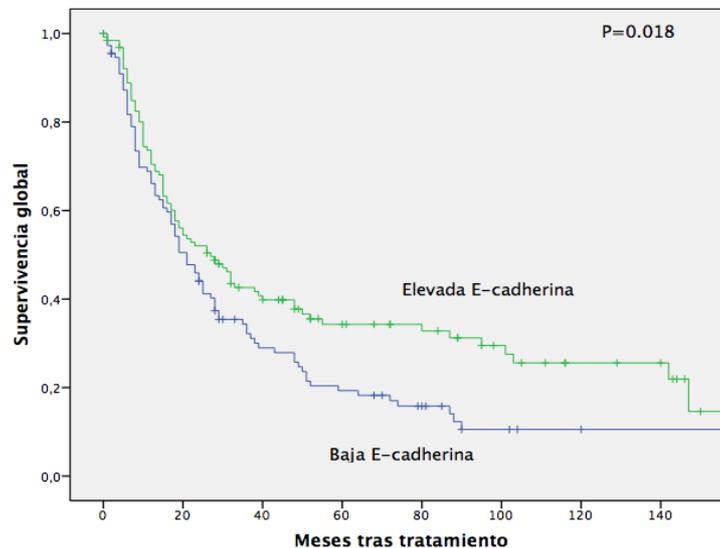
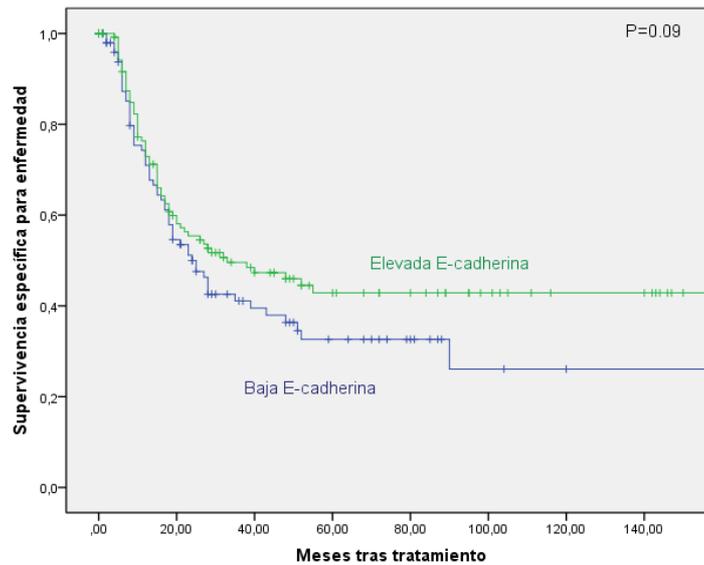


Figura 17: Supervivencia específica para la enfermedad (arriba) y global (abajo) en pacientes con carcinoma de orofaringe en función de la expresión de E-cadherina.

Los pacientes con tumores con una baja expresión de β -catenina de membrana presentaban también una peor supervivencia tanto global como específica para enfermedad (HR 1,45; 95% IC 1,07-1,96; $P=0,016$ y HR 1,5; 95% IC 1,05-2,14; $P=0,024$, respectivamente; Figura 18). La supervivencia global a los 5 años en pacientes con baja expresión de β -catenina de membrana fue del 20%, frente a un 33% en tumores con elevada expresión de β -catenina de membrana, y la supervivencia específica para la enfermedad fue del 31% a los 5 años en tumores con baja expresión

de β -catenina de membrana, frente a un 45% en los casos con elevada expresión.

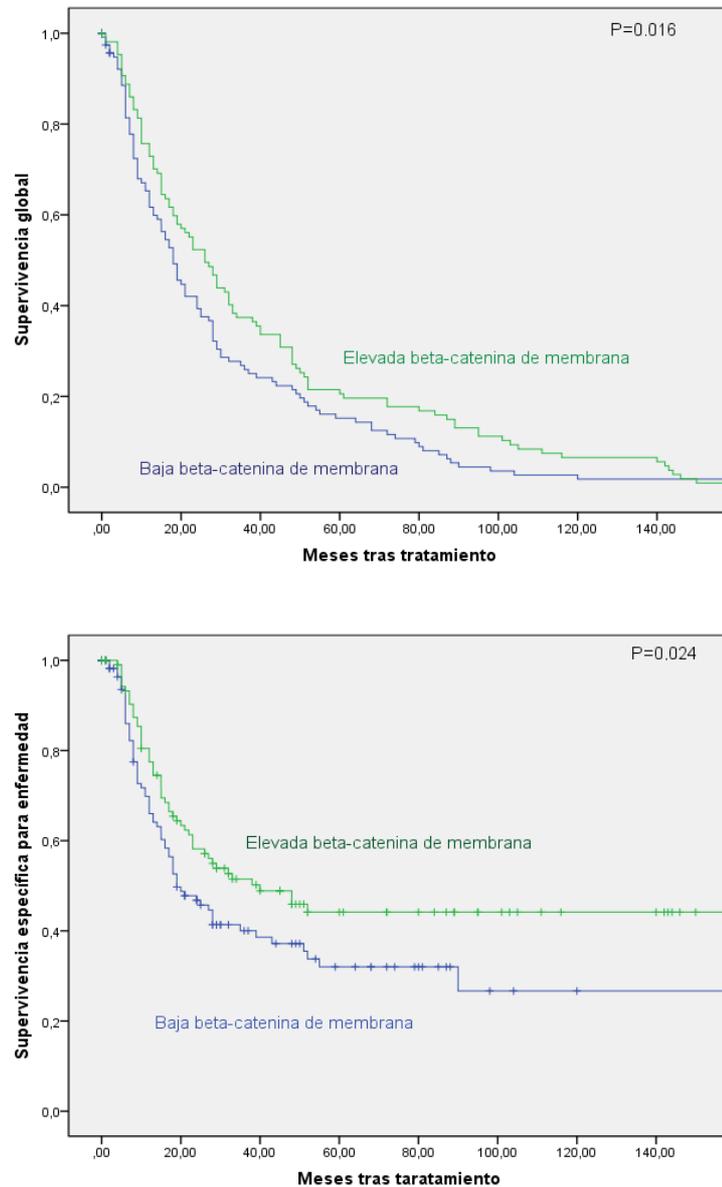


Figura 18: Supervivencia global (arriba) y específica para la enfermedad (abajo) en pacientes con carcinoma de orofaringe en función de la expresión de β -catenina.

La expresión de β -catenina nuclear se asoció de forma significativa a una peor supervivencia específica para enfermedad (HR 1,6; 95% IC 1,04-2,49; $P=0,033$) y de forma casi significativa a una peor supervivencia global (HR 1,35; 95% IC 0,91-2,0; $P=0,14$; Figura 19). Se observó una supervivencia específica para enfermedad del 24% a los 5 años en tumores con expresión positiva de β -catenina nuclear, frente a un 40% en tumores con expresión negativa de β -catenina nuclear, y la supervivencia global a los

5 años fue del 13% en tumores con expresión positiva de β -catenina nuclear, frente a un 29% en tumores con expresión negativa.

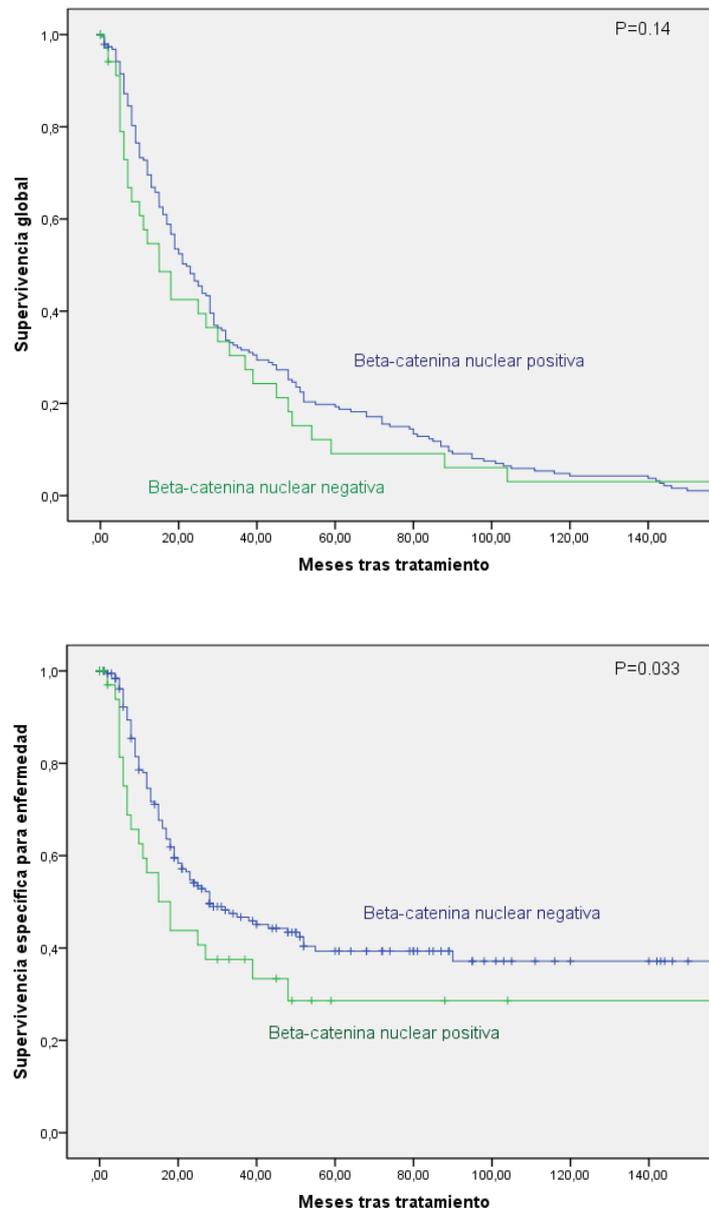


Figura 19: Supervivencia global (arriba) y específica para la enfermedad (abajo) en pacientes con carcinoma de orofaringe en función de la expresión de β -catenina nuclear.

Para analizar la influencia de forma independiente de los diferentes parámetros clínico-patológicos y moleculares en el pronóstico de los pacientes se realizó un análisis multivariante de Cox, incluyendo el tamaño del tumor (dicotomizando T1-T2 frente a T3-T4), la presencia de metástasis ganglionares (N0 frente a N+), la expresión de E-cadherina y la expresión de β -catenina de membrana y nuclear. Este modelo mostró

que la presencia de metástasis ganglionares y la baja expresión de β -catenina de membrana eran predictores independientes de disminución de la supervivencia específica para enfermedad y de la supervivencia global, y que la clasificación de los tumores como T3-T4 también lo era para la supervivencia global (Tabla 6).

Tabla 6: Análisis multivariante de los factores de riesgo para la supervivencia específica y global

Parámetro	HR (95% IC) SEE	Valor P	HR (95% IC) SG	Valor P
Clasificación pT				
- T1-T2	1	0,068	1	0,043
- T3-T4	1,43 (0,97-2,18)		1,42 (1,01-1,99)	
Clasificación pN				
- N0	1	0,001	1	0,001
- N1-3	2,25 (1,4-3,6)		1,88 (1,29-2,73)	
Expresión E-cadherina				
- Elevada	1	0,44	1	0,78
- Baja	1,2 (0,75-1,94)		1,06 (0,70-1,61)	
Expresión β -catenina de membrana				
- Elevada	1	0,017	1	0,009
- Baja	1,55 (1,08-2,23)		1,52 (1,11-2,07)	
Expresión β -catenina nuclear				
- Negativa	1	0,14	1	0,43
- Positiva	1,41 (0,89-2,23)		1,18 (0,78-1,78)	

Abreviaturas: IC, intervalo de confianza; HR, hazard ratio; SEE, supervivencia específica de enfermedad; SG, supervivencia global.

4.3 EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN CARCINOMAS ESCAMOSOS DE LARINGE (CCEL)

4.3.1 Patrones de expresión en carcinomas primarios

Se evaluó la expresión de E-cadherina y β -catenina de membrana y nuclear en 59 carcinomas escamosos primarios de laringe. En los 9 casos restantes no se pudo evaluar por problemas con la representatividad y/o calidad de las muestras.

Presentaron algún tipo de tinción de E-cadherina 58 carcinomas. En general la expresión de E-cadherina fue más débil que en el epitelio normal. La expresión media de IRS (+/- DE) en carcinomas fue de 4,8 +/- 1,7 (mediana 4).

Se observó expresión de β -catenina de membrana en 55 casos. Al igual que la E-cadherina, la expresión de β -catenina fue más débil que en el epitelio normal, con una media de IRS de 4,6 +/- 1,9 (mediana 3,5).

La expresión de β -catenina nuclear fue positiva en 3 carcinomas (5%) y en general estos casos presentaban una expresión de membrana débil.

Se observó una fuerte correlación entre baja expresión de E-cadherina y baja expresión de β -catenina de membrana (Coeficiente de correlación de Pearson 0,467; $P < 0,01$); y una correlación inversa entre la expresión de β -catenina de membrana y la expresión de β -catenina nuclear (Coeficiente de correlación de Pearson -0,346; $P = 0,009$).

4.3.2 Asociación entre la expresión de E-cadherina y β -catenina con parámetros clínico-patológicos

La tabla 7 resume las correlaciones entre la expresión de E-cadherina y β -catenina (de membrana/nuclear) y el consumo de tabaco y alcohol, clasificación pT, presencia de metástasis ganglionares, estadio de enfermedad, grado histológico y recidiva.

Se observó una asociación significativa entre la baja expresión de β -catenina de membrana y la presencia de metástasis ganglionares (N+) y la recurrencia tumoral; y

una asociación casi significativa con estadios avanzados (III-IV). Ningún parámetro se asoció de forma significativa a la baja de expresión de E-cadherina y de β -catenina nuclear.

Tabla 7. Expresión de E-cadherina y β -catenina en relación con las características clínico-patológicas en pacientes con CCE de laringe

Características	Nº de casos	Baja expresión E-cadherina (%)	Valor P	Baja expresión β -catenina (%)	Valor P	Expresión β -catenina nuclear (%)	Valor P
Consumo tabaco							
- Nunca	4	0 (0)	0,255	2 (50)	0,812	0 (0)	0,829
- Leve-moderado (<50 PA)	24	10 (42)		8 (33)		1 (4)	
- Elevado (>50 PA)	31	10 (32)		11 (35)		2 (7)	
Consumo alcohol							
- Nunca	14	1 (7)	0,079	4 (29)	0,745	1 (7)	0,802
- Leve	16	7 (44)		5 (31)		1 (6)	
- Moderado	14	7 (50)		5 (36)		0 (0)	
- Elevado	15	5 (33)		7 (47)		1 (7)	
Clasificación pT							
- T1-T2	16	4 (25)	0,173	3 (19)	0,018	0 (0)	0,39
- T3	23	6 (26)		6 (26)		1 (4)	
- T4	20	10 (50)		12 (60)		2 (10)	
Clasificación pN							
- N0	27	11 (41)	0,308	9 (33)	0,739	1 (4)	0,657
- N1-3	32	9 (28)		12 (38)		2 (6)	
Estadio							
- I-II	9	2 (22)	0,621	1 (11)	0,054	0 (0)	0,752
- III	17	7 (41)		4 (24)		1 (6)	
- IV	33	11 (33)		16 (49)		2 (6)	
Grado histológico							
- Bien	18	6 (33)	0,385	7 (39)	0,371	0 (0)	0,108
- Moderado	29	8 (28)		8 (28)		1 (3)	
- Pobre	12	6 (50)		6 (50)		2 (17)	
Recurrencia							
- No	28	10 (36)	0,779	6 (21)	0,031	0 (0)	0,091
- Sí	31	10 (32)		15 (48)		3 (10)	
Casos totales	59	20 (34)		21 (36)		3 (5)	

Abreviatura: PA, paquetes año

4.3.3 Asociación de expresión de E-cadherina y β -catenina con la recidiva tumoral

La tabla 8 resume las correlaciones entre la expresión de E-cadherina y β -catenina (de membrana/nuclear) y las recidivas tumorales.

No se observó asociación de forma significativa entre la baja de expresión de E-cadherina y de β -catenina de membrana y la recidiva tumoral.

Tabla 8. Expresión de E-cadherina y β -catenina en relación con la recidiva tumoral en pacientes con CCE de laringe

Características	Nº de casos	Baja expresión E-cadherina (%)	Valor P	Baja expresión Beta-catenina (%)	Valor P	Expresión Beta-catenina nuclear (%)	Valor P
Recurrencia							
- No	28	10 (36)	0,779	6 (21)	0,031	0 (0)	0,091
- Si	31	10 (32)		15 (48)		3 (10)	
Tipo de recidiva							
- No	28	10(36)	0,057	6 (21)	0,011	0 (0)	0,437
- Local	7	1 (14)		4 (57)		1 (14)	
- Regional	3	0 (0)		1 (33)		0 (0)	
- Locorregional	7	2 (29)		2 (29)		1 (14)	
- Metástasis a distancia	4	0 (0)		0 (0)		0 (0)	
- Locorregional y MD	10	7 (70)		8 (80)		1 (10)	
Casos totales	59	20 (34)		21 (36)		3 (5)	

Abreviaturas: MD, metástasis a distancia

4.3.4 Asociación de expresión de E-cadherina y β -catenina con la supervivencia

El análisis de regresión univariante de Cox no observó asociación significativa entre la expresión de E-cadherina y la supervivencia global ni específica para enfermedad (HR 1,21; 95% IC 0,55-2,61; $P=0,62$ y HR 1,13; 95% IC 0,49-2,6; $P=0,75$, respectivamente; Figura 20). La supervivencia tanto global como específica para enfermedad a los 5 años en CCEL era peor en pacientes con elevada expresión de E-cadherina con un 39% y un 47% frente a un 47 y 57%, respectivamente, en tumores con baja expresión de E-cadherina.

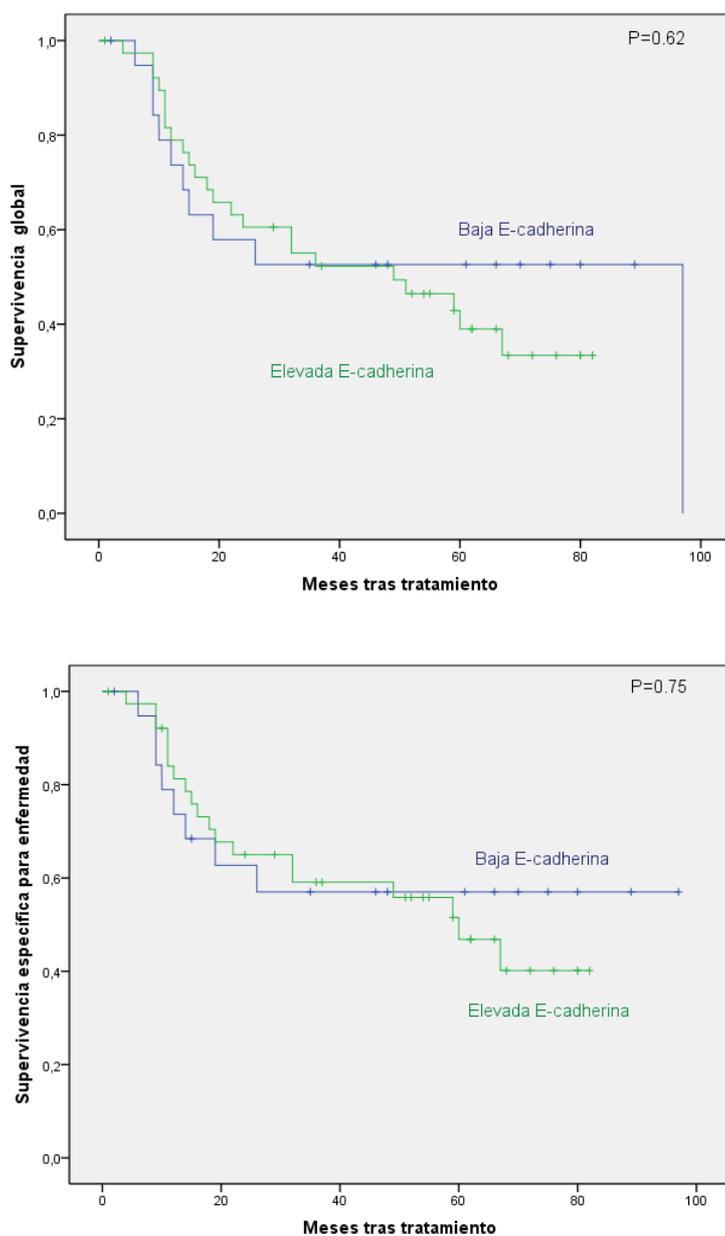


Figura 20: Supervivencia global (arriba) y específica para enfermedad (abajo) en pacientes con carcinoma de laringe en función de la expresión de E-cadherina

Una baja expresión de β -catenina de membrana presentaba una peor supervivencia global y específica para enfermedad, sin embargo los resultados no alcanzaron significación estadística (HR 1,3; 95% IC 0,63-2,67; $P=0,46$ y HR 1,69; 95% IC 0,79-3,62; $P=0,17$; Figura 21). La supervivencia global a los 5 años en pacientes con baja expresión de β -catenina de membrana fue del 37%, frente a un 47%

en tumores con elevada expresión de β -catenina de membrana, y la supervivencia específica para la enfermedad fue del 37% a los 5 años en tumores con baja expresión de β -catenina de membrana, frente a un 58% en los casos con elevada expresión.

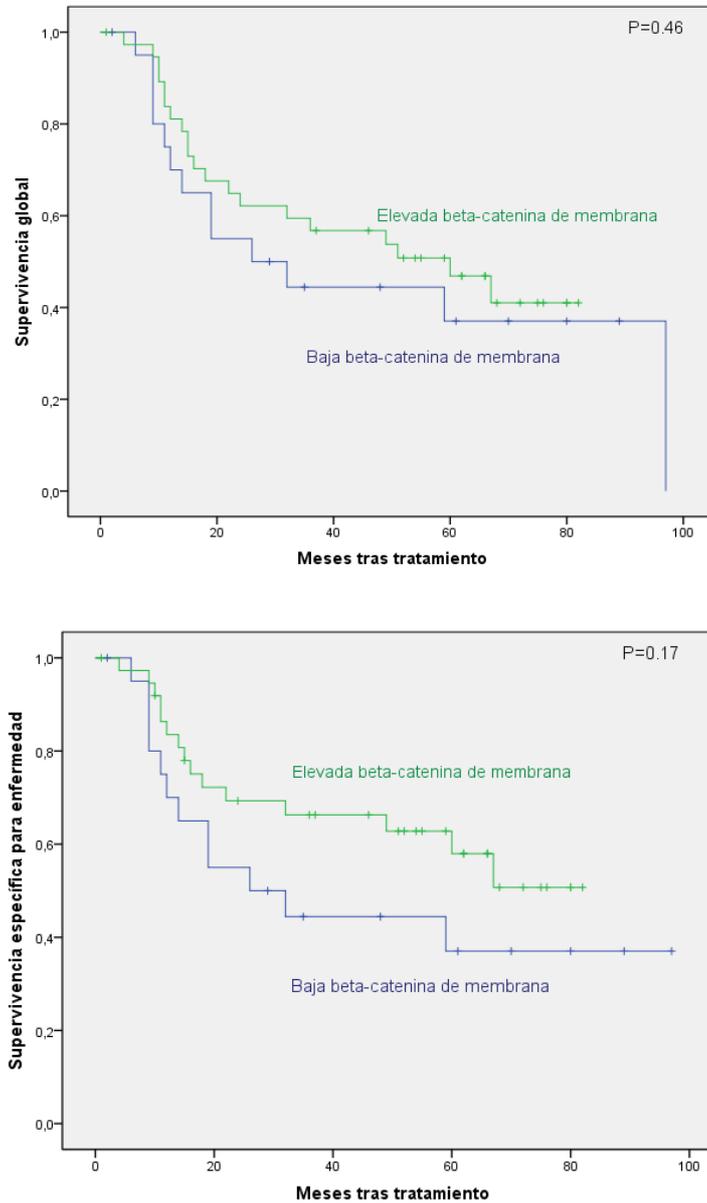


Figura 21: Supervivencia global (arriba) y específica para enfermedad (abajo) en pacientes con carcinoma de laringe en función de la expresión de β -catenina de membrana.

No se observó asociación significativa entre la expresión de β -catenina nuclear y una peor supervivencia global ni específica para enfermedad (HR 1,61; 95% IC 0,38-

6,83; $P=0,51$ y HR 1,9; 95% IC 0,44-8,14; $P=0,38$, respectivamente; Figura 22); podría estar debido al pequeño número de muestras con expresión positiva de β -catenina nuclear.

Se observó una supervivencia global del 0% a los 5 años en tumores con expresión positiva de β -catenina nuclear, frente a un 44% en tumores con expresión negativa de β -catenina nuclear, y la supervivencia específica para enfermedad a los 5 años fue del 0% en tumores con expresión positiva de β -catenina nuclear, frente a un 52% en tumores con expresión negativa.

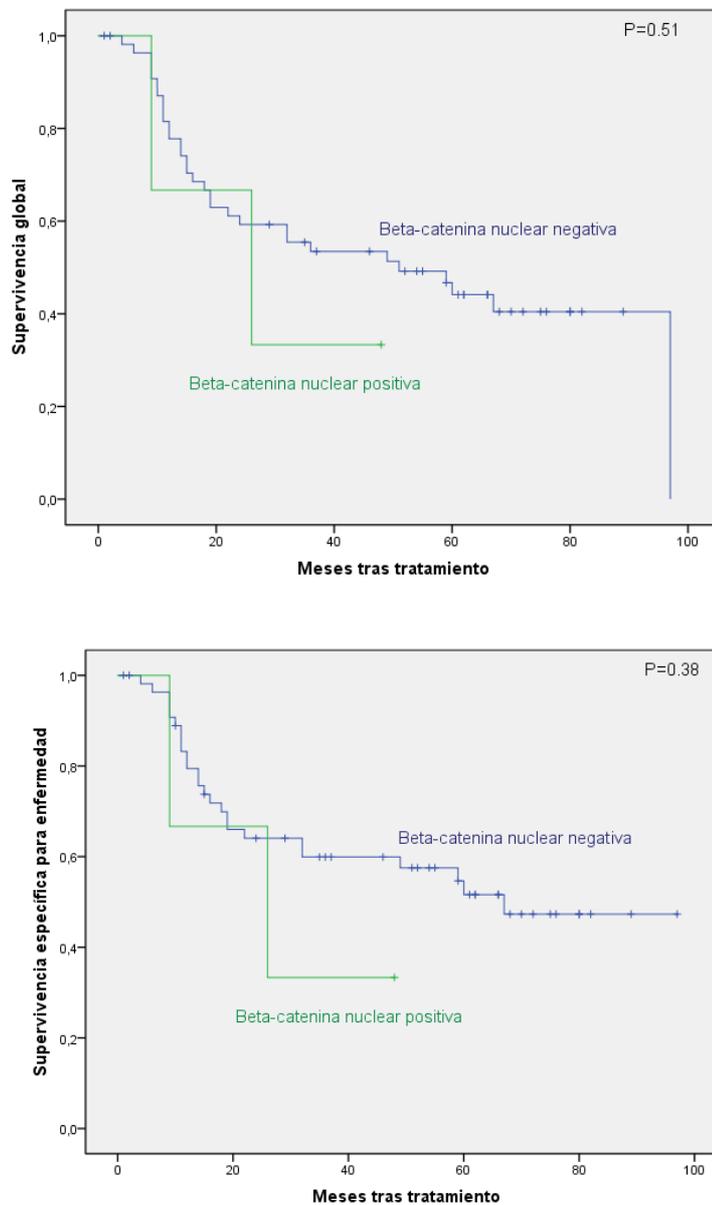


Figura 22: Supervivencia específica para la enfermedad (arriba) y global (abajo) en pacientes con carcinoma de laringe en función de la expresión de β -catenina nuclear

Se realizó análisis multivariante de Cox incluyendo tamaño del tumor (dicotomizando T1-T2 frente a T3-T4), metástasis ganglionares (N0 frente a N+), expresión de E-cadherina y expresión de β -catenina de membrana y nuclear. Este modelo mostró que sólo la presencia de metástasis ganglionares es un factor predictor independiente de peor supervivencia global y específica para enfermedad en CCE de laringe (Tabla 9).

Tabla 9: Análisis multivariante de los factores de riesgo para la supervivencia específica y global

Parámetro	HR (95% IC) SEE	Valor P	HR (95% IC) SG	Valor P
Clasificación pT				
- T1-T2	1	0,248	1	0,58
- T3-T4	1,92 (0,63-5,82)		1,28 (0,52-3,11)	
Clasificación pN				
- N0	1	0,003	1	0,001
- N1-3	4,43 (1,67-1,78)		3,94(1,69-9,21)	
Expresión E-cadherina				
- Elevada	1	0,79	1	0,82
- Baja	0,85(0,28-2,63)		0,89 (0,32-2,48)	
Expresión β -catenina de membrana				
- Elevada	1	0,231	1	0,46
- Baja	1,78 (0,69-4,57)		1,39 (0,57-3,42)	
Expresión β -catenina nuclear				
- Negativa	1	0,79	1	0,76
- Positiva	1,24 (0,23-6,48)		1,28 (0,25-6,52)	

Abreviaturas: IC, intervalo de confianza; HR, hazard ratio; SEE, supervivencia específica de enfermedad; SG, supervivencia global.

4.4 EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN CARCINOMAS ESCAMOSOS DE HIPOFARINGE (CCEH)

4.4.1 Patrones de expresión en epitelio normal y carcinomas primarios

Se evaluó la expresión de E-cadherina y β -catenina de membrana y nuclear en 64 carcinomas escamosos primarios de hipofaringe.

Un paciente presentó positividad para el VPH-16; se excluyó para obtener una muestra más homogénea. Presentaron algún tipo de tinción de E-cadherina y de β -catenina 58 carcinomas; en los 5 casos restantes no se pudo evaluar por problemas con la representatividad y/o calidad de las muestras. En general la expresión de E-cadherina fue más débil que en el epitelio normal. La expresión media de IRS (+/- DE) en carcinomas fue de 4,1 +/- 2,04 (mediana 5).

Se observó expresión de β -catenina de membrana en 55 casos. Al igual que la E-cadherina, la expresión de β -catenina fue más débil que en el epitelio normal, con una media de IRS de 3,7 +/- 2,33 (mediana 3).

La expresión de β -catenina nuclear fue positiva en 7 carcinomas (12%) y en general estos casos presentaban una expresión de membrana débil.

Se observó una fuerte correlación entre baja expresión de E-cadherina y baja expresión de β -catenina de membrana (Coeficiente de correlación de Pearson 0,487; $P < 0,01$), y una correlación inversa entre la expresión de E-cadherina y β -catenina de membrana y la expresión de β -catenina nuclear (-0,185, $P < 0,165$ para E-cadherina, y -0,358, $P < 0,006$ para β -catenina).

4.4.2 Asociación entre la expresión de E-cadherina y β -catenina con parámetros clínico-patológicos

La tabla 10 resume las correlaciones entre la expresión de E-cadherina y β -catenina (de membrana/nuclear) y el consumo de tabaco y alcohol, clasificación pT, presencia de metástasis ganglionares, estadio de enfermedad, grado histológico y recidiva.

Tabla 10: Expresión de E-cadherina y β -catenina en relación con las características clínico-patológicas en paciente con CCE de hipofaringe

Características	Nºcasos	Baja expresión E-cadherina (%)	Valor P	Baja expresión β -catenina (%)	Valor P	Expresión β -catenina nuclear (%)	Valor P
Consumo tabaco							
- Nunca	1	0 (0)	0,641	0 (0)	0,485	0 (0)	0,58
- Leve-moderado (<50 PA)	34	16 (47)		19 (56)		3 (9)	
- Elevado (>50 PA)	23	11 (48)		11 (48)		4 (17)	
Consumo alcohol							
- Nunca	14	1 (7)	0,9	2 (67)	0,895	1 (33)	0,411
- Leve	16	3 (60)		2 (40)		1 (20)	
- Moderado	14	10 (46)		11 (50)		1 (4)	
- Elevado	15	13 (46)		15 (54)		4 (14)	
Clasificación pT							
- T1-T2	17	6 (35)	0,201	8 (47)	0,538	4 (24)	0,116
- T3	16	6 (38)		7 (44)		0 (0)	
- T4	25	15 (60)		15 (60)		3 (12)	
Clasificación pN							
- N0	8	4 (50)	0,833	4 (50)	0,916	2 (25)	0,227
- N1-3	50	23 (46)		26 (52)		5 (10)	
Estadio							
- I-II	3	1 (33)	0,704	1 (33)	0,713	0 (0)	0,632
- III	3	2 (67)		2 (67)		0 (0)	
- IV	52	24 (46)		27 (52)		7 (14)	
Grado histológico							
- Bien	11	6 (55)	0,374	5 (46)	0,140	0 (0)	0,02
- Moderado	25	9 (36)		10 (40)		1 (4)	
- Pobre	22	12 (55)		15 (68)		6 (27)	
Recurrencia							
- No	14	5 (36)	0,351	6 (43)	0,446	0 (0)	0,111
- Sí	44	22 (50)		24 (55)		7 (16)	
Casos totales	58	27 (47)		30 (52)		7 (12)	

Abreviatura: PA, paquetes año

Sólo se observó asociación significativa entre la expresión positiva de β -catenina nuclear y un bajo grado de diferenciación histológica ($P=0,02$). Ningún parámetro se asoció de forma significativa a la baja de expresión de E-cadherina y de β -catenina de membrana.

4.4.3 Asociación de expresión de E-cadherina y β -catenina con la recidiva tumoral

La tabla 11 resume las correlaciones entre la expresión de E-cadherina y β -catenina (de membrana/nuclear) y las recidivas tumorales.

No se observó asociación de forma significativa entre la expresión de E-cadherina y de β -catenina y la recidiva tumoral.

Tabla 11: Expresión de E-cadherina y β -catenina en relación con la recidiva tumoral en pacientes con CCE de hipofaringe.

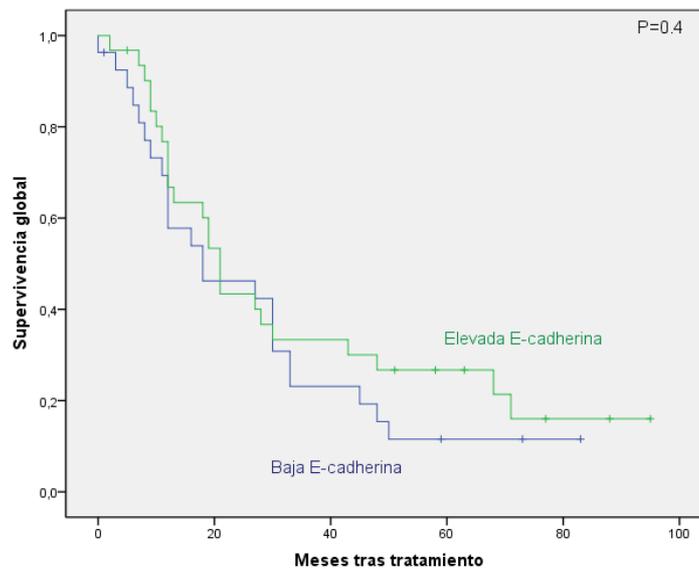
Características	Nº de casos	Baja expresión E-cadherina (%)	Valor <i>P</i>	Baja expresión Beta-catenina	Valor <i>P</i>	Expresión Beta catenina nuclear	Valor <i>P</i>
Recurrencia							
- No	14	5 (36)	0,351	6 (43)	0,446	0 (0)	0,111
- Sí	44	22 (50)		24 (55)		7 (16)	
Tipo de recidiva							
- No	14	5 (36)	0,406	6 (43)	0,729	0 (0)	0,108
- Local	2	0 (0)		1 (50)		1 (50)	
- Regional	9	3 (33)		3 (33)		1 (11)	
- Locorregional	21	13 (62)		13 (62)		5 (24)	
- Metástasis a distancia	2	1 (50)		1 (50)		0 (0)	
- Locorregional y MD	10	5 (50)		6 (60)		0 (0)	
Casos totales	58	27 (47)		30 (52)		7 (12)	

Abreviaturas: MD, metástasis a distancia

4.4.4 Asociación de expresión de E-cadherina y β -catenina con la supervivencia

El análisis de regresión univariante de Cox mostró que no había diferencias significativas en la supervivencia global y específica para enfermedad en tumores con baja expresión de E-cadherina (HR 1,274; 95% IC 0,71-2,263; $P=0,408$ y HR 1,3; 95% IC 0,71-2,39; $P=0,385$, respectivamente) y baja expresión de β -catenina de membrana (HR 1,28; 95% IC 0,72-2,86; $P=0,395$ y HR 1,306; 95% IC 0,71-2,40; $P=0,391$, respectivamente).

La supervivencia global a los 5 años de tumores con baja expresión de E-cadherina fue del 12%, frente al 27% en elevada expresión de E-cadherina. La supervivencia específica para enfermedad a los 5 años de tumores con baja expresión de E-cadherina fue del 15%, frente al 29% en elevada expresión de E-cadherina (Figura 23).



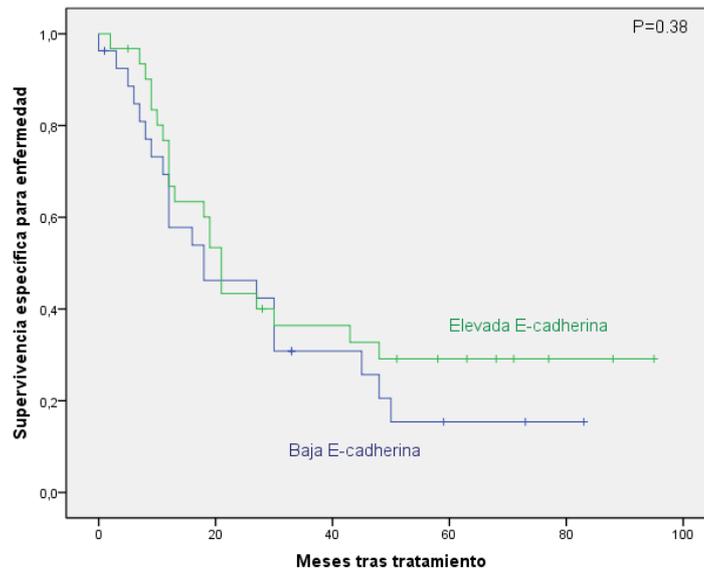
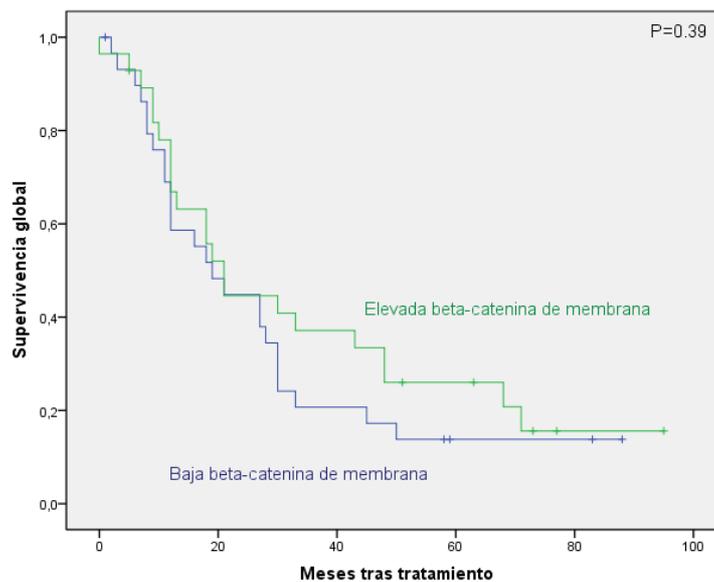


Figura 23: Supervivencia global (arriba) y específica para la enfermedad (abajo) en pacientes con carcinoma de hipofaringe en función de la expresión de E-cadherina.

La supervivencia global a los 5 años de tumores con baja expresión de β -catenina de membrana fue del 14%, frente al 26% con expresión elevada. La supervivencia específica para enfermedad a los 5 años de tumores con baja expresión de β -catenina de membrana fue del 17%, frente al 28% con expresión elevada (Figura 24).



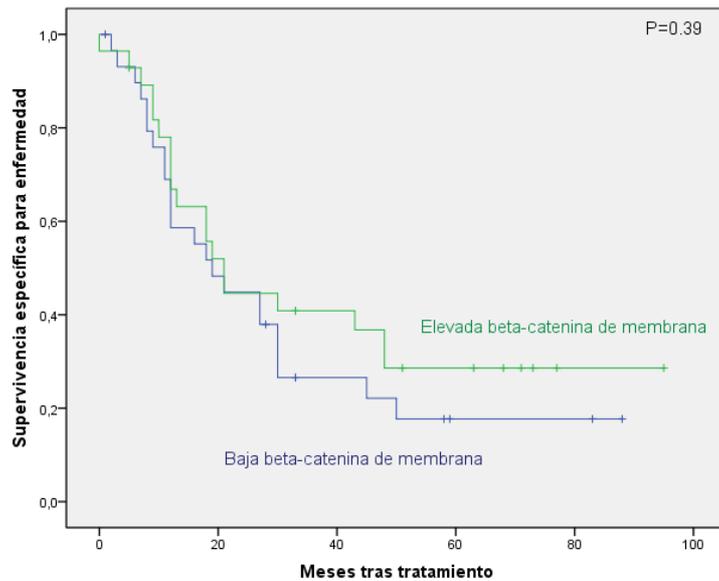


Figura 24: Supervivencia global (arriba) y específica para la enfermedad (abajo) en pacientes con carcinoma de hipofaringe en función de la expresión de β -catenina de membrana.

No se observaron diferencias significativas entre la supervivencia global y específica para enfermedad y la expresión positiva de β -catenina nuclear (HR 1,08; 95% IC 0,46-2,57; $P=0,847$ y HR 1,011; 95% IC 0,42-2,4; $P=0,908$, respectivamente).

Se observó una supervivencia global y específica para enfermedad a los 5 años del 20% y del 25%, respectivamente, en tumores con expresión negativa de β -catenina nuclear, frente a un 0% de supervivencia tanto global como específica para enfermedad en tumores con expresión positiva de β -catenina nuclear (Figura 25).

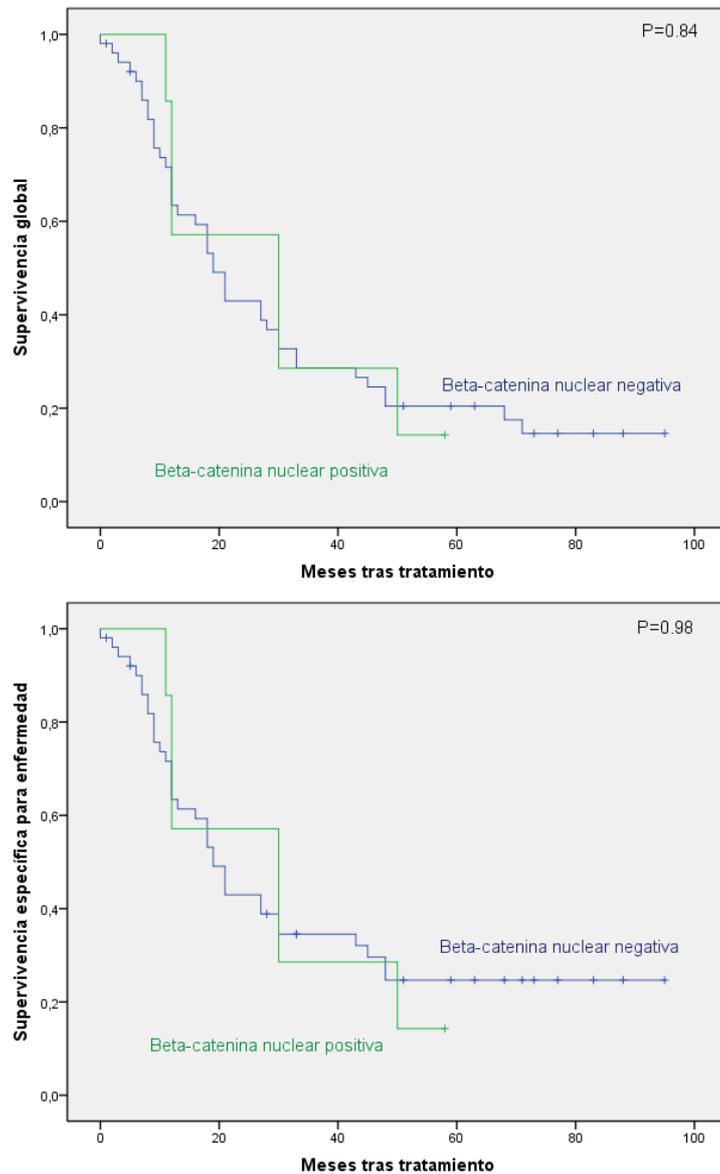


Figura 25: Supervivencia global (arriba) y específica para la enfermedad (abajo) en pacientes con carcinoma de hipofaringe en función de la expresión de β -catenina de membrana.

Se realizó análisis multivariante de Cox incluyendo tamaño del tumor (dicotomizando T1-T2 frente a T3-T4), metástasis ganglionares (N0 frente a N+), estadio del tumor (I-II frente a III-IV), expresión de E-cadherina y expresión de β -catenina de membrana y nuclear.

No se observó asociación significativa entre las variables ni una peor supervivencia (Tabla 12).

Tabla 12: Análisis multivariante de los factores de riesgo para la supervivencia específica y global

Parámetro	HR (95% IC) SEE	Valor P	HR (95% IC) SG	Valor P
Clasificación pT				
- T1-T2	1	0,62	1	0,66
- T3-T4	1,2 (0,57-2,53)		1,17 (0,57-2,37)	
Clasificación pN				
- N0	1	0,20	1	0,22
- N1-3	1,85 (0,70-4,86)		1,72 (0,71-4,18)	
Expresión E-cadherina				
- Elevada	1	0,45	1	0,50
- Baja	1,30 (0,64-2,62)		1,25 (0,64-2,42)	
Expresión β -catenina de membrana				
- Elevada	1	0,55	1	0,50
- Baja	1,24 (0,60-2,57)		1,25 (0,63-2,48)	
Expresión β -catenina nuclear				
- Negativa	1	0,76	1	0,48
- Positiva	1,17 (0,41-3,28)		1,25 (0,45-3,46)	

Abreviaturas: IC, intervalo de confianza; HR, hazard ratio; SEE, supervivencia específica de enfermedad; SG, supervivencia global.

5. DISCUSIÓN

Dado que en los estudios previos sobre el tema había mucha heterogeneidad en los pacientes incluidos en los mismos (localizaciones tumorales y tratamientos diversos) y en la mayoría no se había tenido en cuenta la presencia de infección por el VPH, el objetivo principal de este estudio fue investigar la expresión de E-cadherina y β -catenina en una larga serie de casos de tumores de cabeza y cuello con estatus VPH conocido y tratados de forma homogénea en una sola institución.

La integridad de los mecanismos de adhesión celular es fundamental para el mantenimiento de la arquitectura tisular, y su pérdida o disminución se ha relacionado con la invasividad tumoral. Por tanto, el estudio de las moléculas implicadas en el mantenimiento de la adhesión celular podría aportarnos información pronóstica⁶⁹.

Como se ha comentado, múltiples estudios se han centrado en el papel de las moléculas de adhesión en carcinomas de cabeza y cuello; pocos de estos los han clasificado según localización y ninguno se ha centrado en el significado pronóstico de estas proteínas clasificando los tumores por localización y estatus VPH conocido.

5.1 RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE E-CADHERINA Y β -CATENINA CON LAS CARACTERÍSTICAS PATOLÓGICAS

Algunos estudios^{40,70,71,72} se han centrado en la correlación entre las características clínico-patológicas y la expresión de E-cadherina y β -catenina; en general, se observó que la E-cadherina presentaba una elevada expresión en tumores bien diferenciados, que mantienen las uniones célula-célula y tienen menor capacidad de invasión; de forma inversa, se observó que existía una baja expresión de E-cadherina en tumores poco diferenciados, con pérdida de las uniones intercelulares y una mayor tendencia a la invasión.

Los primeros estudios *in vitro*^{72,73} describían una regulación a la baja de la expresión de E-cadherina en carcinomas pobremente diferenciados de cabeza y cuello, así como una expresión negativa de E-cadherina en las metástasis ganglionares, siendo más frecuentes en aquellos tumores primarios con expresión negativa de E-cadherina y una relación inversa entre la expresión de E-cadherina y la capacidad de invasión del tumor.

Pocos años más tarde *Schipper et al.*⁷² continuaron su estudio examinando 73 muestras de CCECC (5 de nasofaringe, 7 de cavidad oral, 24 de orofaringe, 18 de laringe y 19 de hipofaringe). Observaron que los tumores bien diferenciados presentaban una elevada expresión de E-cadherina, al igual que el epitelio normal, frente a una baja o negativa expresión de E-cadherina en tumores pobremente diferenciados. Analizaron igualmente la expresión de E-cadherina en las metástasis ganglionares, hallando que las metástasis clasificadas como N3 no presentaban expresión de E-cadherina.

De este modo confirmaban lo previamente publicado, que una baja expresión de E-cadherina se correlaciona con la desdiferenciación del tumor. *Bowie et al.*⁴⁰ describen los mismos resultados en 28 muestras de CCECC (17 de hipofaringe, 3 de orofaringe, 1 de laringe y 2 de cavidad oral).

*Mattijsen et al.*⁷⁵ estudiaron 50 CCECC (27 de laringe y 23 de cavidad oral), en los que observaron una correlación entre una elevada expresión de E-cadherina y tumores con grado de diferenciación bien y moderadamente diferenciados (Coeficiente de Spearman 0,43; $P=0,002$); encontrándose esta correlación tanto en laringe como en

cavidad oral.

*Liu et al.*⁷⁶ estudiaron el impacto de la E-cadherina en la invasión y metástasis de carcinomas escamosos de laringe. Usaron como control pólipos benignos vocales; observándose tinción fuerte de membrana en todas las muestras excepto una, en línea con los estudios previos; el 68% de las muestras de tumor mostraban una baja expresión de E-cadherina. Los tumores bien y moderadamente diferenciados mantenían una expresión fuerte de E-cadherina, mientras que tumores pobremente diferenciados mostraban una tinción débil o negativa.

*Rodrigo et al.*⁷⁰ observaron una disminución de la expresión de E-cadherina con la desdiferenciación del tumor, pero sin resultados significativos.

Por otro lado, *Lopez-Gonzalez et al.*⁷¹ estudiaron el papel de la β -catenina en la desdiferenciación celular, en 38 casos de CCEL. El epitelio normal presentaba tinción de β -catenina de membrana en el 100% de los casos, siendo la expresión fuerte en el 80% de los casos y moderada en el 20%, en los carcinomas bien y moderadamente diferenciados. En los carcinomas pobremente diferenciados se observó una tinción de membrana en el 57% de los casos y en 43% tinción de β -catenina citoplasmática. De modo que existía una correlación entre la localización de la β -catenina y el grado de diferenciación del tumor ($P < 0,001$). En cuanto al nivel de expresión de β -catenina, en carcinomas bien diferenciados se observó una tinción fuerte en el 72% de los casos y una expresión moderada en el 28% restante. En carcinomas pobremente diferenciados, se observó una tinción moderada en el 21% de los casos y una expresión débil en el 79% de los casos; hallándose una correlación entre el nivel de expresión de β -catenina y el grado de diferenciación de los CCEL ($P < 0,001$).

*Mandal et al.*⁷⁷ investigaron marcadores implicados en la TEM para determinar su papel en la invasión y progresión de CCECC; entre ellos, la regulación a la baja de E-cadherina debido a la sobreexpresión de src. Sus resultados mostraron que la pérdida de expresión de E-cadherina se observaba en tumores con características más agresivas. Una de las limitaciones de este estudio es que la mayoría de los tumores tenía su origen en la cavidad oral (31 en lengua, 9 en suelo de boca, 6 encías) con un pequeño porcentaje de la muestra localizados en orofaringe (4 en base de lengua) y por lo tanto no se podría extrapolar a toda la cabeza y el cuello.

*Yu et al.*⁷⁸ analizaron el papel de la β -catenina en una cohorte de 60 CCECC; los pacientes con estadio elevado de TNM tenían una elevada expresión de β -catenina; sin observarse otras asociaciones entre las variables clinicopatológicas y la expresión de β -catenina.

En contraste con lo previo y con los resultados de este estudio, *Santoro et al.*, en una larga serie de 374 casos de carcinomas de cabeza y cuello (4 de orofaringe y el resto de cavidad oral), describían que pacientes con expresión positiva de β -catenina nuclear se correlacionaba con estadios avanzados, presencia de metástasis ganglionares y un mejor pronóstico⁶⁴.

De acuerdo con la mayoría de lo publicado, en nuestro estudio se observó que la expresión de β -catenina nuclear era significativamente mayor en los CCECC y en CCE de hipofaringe pobremente diferenciados ($P=0,042$ y $P=0,02$, respectivamente). También se observó que la expresión de β -catenina de membrana en los tumores de orofaringe disminuía al incrementarse la dediferenciación, pero las diferencias no fueron significativas ($P=0,23$). Sin embargo, no se obtuvieron resultados significativos que correlacionasen la expresión de E-cadherina y la diferenciación histológica del tumor.

5.2 RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE E-CADHERINA Y β -CATENINA CON LA RECIDIVA TUMORAL

La mayoría de los estudios previamente publicados que estudian la relación entre la expresión de las moléculas de adhesión y el pronóstico se centran en la supervivencia o la presencia de metástasis; pero, pocos determinan de forma independiente la relación de estas proteínas con la recurrencia del tumor^{32,63,75-92}.

*Kaur et al.*⁹³, en su serie de carcinomas epidermoides de cavidad oral, observaron una disminución del tiempo libre de enfermedad (TLE) en tumores con baja expresión de E-cadherina, con un TLE de 15 meses frente a 78 meses en elevada expresión de E-cadherina ($P < 0,001$).

*Mattijssen et al.*⁷⁵ estudiaron 50 CCECC (laringe y cavidad oral); pacientes con elevada expresión de E-cadherina de membrana presentaban una evolución favorable, con una mayor supervivencia libre de enfermedad.

*Ahmed et al.*⁹⁴ observaron una relación significativa en CCE de laringe entre la recurrencia local y la baja expresión de E-cadherina con una media de 14,7 meses de recurrencia local en aquellos pacientes que presentaban una baja expresión de E-cadherina frente, a 30,4 meses en aquellos con elevada expresión ($P < 0,001$). *Cappellessio et al.*⁹⁵ obtuvieron también, en una serie de 37 casos de CCEL, una asociación significativa entre una baja expresión de E-cadherina y la recurrencia ($P = 0,02$).

En nuestra serie, se observó una correlación entre la baja expresión β -catenina de membrana y la expresión positiva de β -catenina nuclear y la recidiva tumoral ($P = 0,019$ para la β -catenina de membrana, y $P = 0,028$ para la β -catenina nuclear); con una media de 9,4 meses en pacientes con baja expresión de la β -catenina de membrana y 9,8 meses en pacientes con expresión positiva de β -catenina nuclear.

5.3 RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE E-CADHERINA Y β -CATENINA CON LA SUPERVIVENCIA

Dado que la disminución o pérdida de expresión de la E-cadherina y la β -catenina se asocia con una mayor capacidad de invasión y agresividad tumoral, y por lo tanto un potencial peor pronóstico^{32,75,96,97}, se ha estudiado la relación entre la expresión de estas proteínas y la supervivencia.

*Mezi et al.*⁹⁶ estudiaron 50 muestras de 46 pacientes con CCEL tratados con cirugía con intención curativa; con RT complementaria en el 8% de los casos y radioquimioterapia complementaria en el 48% de los casos. La supervivencia específica de enfermedad y supervivencia global a los 5 años fue del 48%. No encontraron correlación significativa entre la TEM y los datos clinicopatológicos e histológicos. Realizaron análisis inmunohistoquímico de la E-cadherina, α -, β - y γ -catenina y de caveolina-1. La expresión citoplasmática de E-cadherina (aberrante) se asoció de forma significativa con una peor supervivencia específica para enfermedad y peor supervivencia global. También observaron una asociación significativa entre una elevada expresión de β -catenina citoplasmática (igualmente aberrante) y estadios avanzados (T3-T4) ($P=0,017$). La adquisición de fenotipo mesenquimal en carcinomas glóticos se correlacionó de manera significativa con la recurrencia.

*Andrews et al.*³² analizaron la expresión de E-cadherina y α - y β -catenina en 51 muestras del tumor primario y de las metástasis ganglionares de 36 pacientes con carcinomas escamosos de cabeza y cuello. No hallaron asociaciones significativas en el análisis univariante ni multivariante entre el grado de diferenciación y los datos clínico-patológicos del tumor y del paciente. Ninguna muestra de tumor mostró expresión normal de E-cadherina y el 88% de los carcinomas primarios presentan $<50\%$ de las células con expresión de E-cadherina de membrana. La pérdida de expresión de E-cadherina de membrana se asoció con aumento de la expresión de E-cadherina citoplasmática. En cuanto a la relación de E-cadherina con β -catenina, sólo una muestra con elevada expresión de E-cadherina mostró baja expresión de β -catenina. No observaron correlación entre la disminución de la expresión de E-cadherina y la supervivencia.

*Bowie et al.*⁴⁰ observaron una supervivencia a los 12 meses del 83% en tumores

con elevada expresión de E-cadherina, frente al 62% en aquellos tumores con baja expresión; sin embargo, los resultados no fueron estadísticamente significativos, probablemente debido al escaso número de pacientes estudiados (28).

*Mattijssen et al.*⁷⁵ estudiaron 50 CCECC (27 de laringe y 23 de cavidad oral). No observaron correlaciones significativas entre la expresión de E-cadherina y la clasificación T y N. Pacientes con elevada expresión de E-cadherina de membrana presentaban una evolución favorable, con una mayor supervivencia libre de enfermedad.

En un metanálisis⁸¹ del valor pronóstico de la E-cadherina en tumores de cabeza y cuello se incluyeron 19 estudios con tumores de diferentes localizaciones (cavidad oral, orofaringe, laringe e hipofaringe) con un total 2012 casos. Algunos estudios, como el de *Bosch et al.*⁹⁸, mostraban que una baja expresión de E-cadherina era un factor de buen pronóstico en CCECC. Sin embargo, la mayoría de los estudios^{63,84-94} incluidos en el metaanálisis encontraban una asociación entre la expresión elevada de E-cadherina y una mayor supervivencia. El metaanálisis confirmó que la expresión elevada de E-cadherina estaba asociada a un buen pronóstico, una mejor supervivencia global (HR=0,52; 95% IC=0,4; P=0,66) y una mejora de la supervivencia libre de enfermedad (HR=0,53; 95% IC=0,42; P=0,67).

Una de las limitaciones del metaanálisis es la inclusión de estudios con diferentes localizaciones, siendo además el porcentaje más elevado de estudios de tumores de cavidad oral (11 estudios). De los 11 estudios que no encontraron asociación entre la expresión de E-cadherina y la supervivencia, 7 eran de tumores de cavidad oral, 1 de orofaringe y 3 de laringe. Además, indican que existe una elevada variabilidad en el tratamiento realizado y en el estadio tumoral, comparándose estudios con estadios tempranos frente a avanzados.

La pérdida de expresión de β -catenina se ha visto asociada a fenotipos más agresivos y metástasis en cáncer de cavidad oral^{60,96}. *Yu et al.*⁷⁸ evaluaron la asociación entre la supervivencia y la expresión de β -catenina, observándose que una baja expresión de β -catenina se asociaba a un aumento de la recidiva local a los 5 años del 79% de los pacientes. Una baja expresión de β -catenina se asociaba a una peor supervivencia a los 5 años. En el análisis multivariante, sólo el estado de β -catenina era

un factor predictor independiente de peor pronóstico ($P=0,044$).

*Pukkila et al.*⁹⁹ estudiaron 138 casos con CCECC (orofaringe e hipofaringe) y en el análisis univariante se observó una asociación entre la expresión de β -catenina nuclear y una evolución desfavorable de la enfermedad. En el análisis multivariante, la expresión de β -catenina nuclear, la clasificación T y la clasificación Karnofsky eran predictores independientes de peor pronóstico.

En cuanto a los resultados obtenidos en nuestro trabajo, apoyan lo previamente publicado, con peor supervivencia en aquellos pacientes con baja expresión de E-cadherina y β -catenina de membrana, y en aquellos con una expresión positiva de β -catenina nuclear.

La supervivencia global de todos los pacientes fue del 31% y la supervivencia específica para enfermedad del 39% a los 5 años. Pacientes con baja expresión de E-cadherina presentaban una peor supervivencia global y específica para enfermedad, las diferencias fueron significativas ($P=0,013$ y $P=0,059$, respectivamente), con una supervivencia global a los 5 años del 21% frente al 33% de los pacientes con expresión elevada, y una supervivencia específica para enfermedad del 31% en los pacientes con baja expresión, frente a un 40% en los casos con expresión elevada.

Los casos con una baja expresión de β -catenina de membrana presentaban también una peor supervivencia tanto global como específica para enfermedad, en este caso con diferencias significativas, en ambas ($P=0,03$ y $P=0,003$, respectivamente); así, en tumores con baja expresión de β -catenina de membrana la supervivencia global era del 20% y la supervivencia específica para enfermedad del 29% a los 5 años, frente a un 35% y un 45% en los pacientes con expresión elevada, respectivamente.

Del mismo modo, la expresión de β -catenina nuclear se asoció a una peor supervivencia global y específica para enfermedad, siendo casi significativa la asociación con la supervivencia global ($P=0,084$ y $P=0,019$, respectivamente). Pacientes con tumores con expresión positiva de β -catenina nuclear presentaron una supervivencia global a los 5 años del 14% y una supervivencia específica para enfermedad del 23%, frente a un 30% y un 39% en los casos con expresión elevada, respectivamente.

5.4. RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE E-CADHERINA Y β -CATENINA Y LAS METÁSTASIS GANGLIONARES

Está universalmente aceptado¹⁰⁰ que la presencia de metástasis ganglionares es factor predictor independiente de peor pronóstico en carcinomas de cabeza y cuello. La presencia o ausencia de enfermedad metastásica en ganglios linfáticos cervicales es el factor determinante más significativo de pronóstico y consecuente tratamiento de pacientes con tumores de cabeza y cuello. El estadiaje preoperatorio ha mejorado significativamente con las pruebas de imagen, pero la detección de micrometástasis ocultas sigue siendo un reto. La habilidad para predecir metástasis ganglionares cervicales de muestras del tumor primario podría aportar tremendas ventajas para la determinación del tratamiento más apropiado. Por ello, el interés de identificar marcadores tumorales que pudieran seleccionar pacientes con alto riesgo de desarrollar metástasis ganglionares. Un marcador inmunohistoquímico predictor de riesgo de metástasis ganglionar reduciría el número de pacientes sobretratados.

En este sentido, se ha investigado^{32,75,96,97} la asociación entre la expresión de E-cadherina y las metástasis ganglionares, con resultados contradictorios. En la mayoría de los estudios se observó que una baja expresión de E-cadherina se correlacionaba con un aumento del riesgo de metástasis ganglionares en CCEC^{70,86,100}. Sin embargo, otros estudios no observaron esta asociación^{32,76,80}; y, en otros estudios, la asociación entre la expresión de E-cadherina y las metástasis se limitaba a algunas localizaciones. Por ejemplo, *Takes et al.*¹⁰¹ estudiaron 121 muestras de tumores de cabeza y cuello (laringe, faringe y cavidad oral) y sólo observaron asociación significativa entre la expresión de E-cadherina y la presencia de metástasis ganglionares en tumores de cavidad oral ($P=0,04$).

Pueden sugerirse varias explicaciones para estas controversias, como características tumorales diferentes, diferentes localizaciones en cabeza y cuello incluidas en los estudios, variación en los métodos inmunohistoquímicos y en la interpretación de los resultados de expresión, el número de casos analizados o diferencias del tratamiento realizado.

Para evitar estos problemas se han analizado en esta investigación los resultados en conjunto y por localizaciones en pacientes tratados en la misma institución con el

mismo protocolo de actuación.

Para nuestro conocimiento, el presente trabajo es de lejos uno de los más grandes estudios que investiga el significado clínico de la expresión de E-cadherina y β -catenina, usando una cohorte homogénea de 372 pacientes con CCEE de cabeza y cuello VPH negativos que fueron tratados quirúrgicamente, y por tanto con información anatomopatológica del estado del cuello.

En conjunto, los hallazgos del presente trabajo se encuentran en línea con la función propuesta de la E-cadherina como molécula supresora de invasión, y a medida que se produce su pérdida se favorece o intensifica la invasión de los tejidos sanos adyacentes^{44,48}. En los pacientes se observa que la expresión baja de E-cadherina es más frecuente en los casos con metástasis ganglionares (46% vs 38%), aunque las diferencias no fueron significativas ($P=0,24$).

*Nardi et al.*¹⁰² en su estudio de 52 pacientes con CCE de supraglotis, describen relación entre una baja expresión de β -catenina de membrana y la presencia de metástasis ganglionares.

A pesar de esta posible asociación entre la disminución de la expresión de β -catenina o su expresión nuclear y la presencia de metástasis ganglionares, los pacientes no presentaban una asociación entre la expresión baja de β -catenina o la expresión positiva de β -catenina nuclear y la presencia de metástasis ganglionares ($P=0,92$ y $P=0,47$, respectivamente). Esto sugiere que es la disminución de la expresión de E-cadherina el factor más importante en la capacidad de diseminación metastásica de estos tumores.

Basados en la suposición que la metástasis está favorecida por las propiedades del tumor primario y su interacción con las estructuras adyacentes, la identificación de productos de genes envueltos en el proceso biológico de la invasión tumoral y la metástasis puede proveer marcadores que predigan la presencia de metástasis ganglionares. Sin embargo, desde que se conoce que la invasión y la metástasis son procesos de múltiples etapas, es probable que más de un marcador pudiera ser necesario para evaluar el riesgo individual del paciente de presencia de metástasis ganglionares.

Estas determinaciones pueden desarrollarse fácilmente en muestras estándar de

anatomía patológica fijadas con parafina, facilitando su inclusión en el diagnóstico y el tratamiento de estos tumores. Esto puede ser especialmente importante en el tratamiento cervical de pacientes clasificados como N0 tras la evaluación clínica y pruebas de imagen. En estos casos, estudios previos han sugerido que la expresión de E-cadherina podría desempeñar un papel en la decisión de tratamiento con disección cervical o seguimiento más cercano. Pero los resultados, aunque muestran que la presencia de metástasis es más frecuente en los tumores con baja expresión de E-cadherina, no avalan que sea un marcador lo suficientemente específico para ayudar en las decisiones terapéuticas.

5.5 RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE E-CADHERINA Y β -CATENINA Y LA LOCALIZACIÓN DEL TUMOR

Las variabilidades de comportamiento entre tumores de distintas localizaciones sugieren características diferentes intrínsecas al tumor, como se ha demostrado en artículos previos¹⁰³. En este trabajo se observa como la expresión de E-cadherina y β -catenina varía en función de la localización del tumor: la expresión baja de E-cadherina y β -catenina era menos frecuente en los tumores de laringe, así como también era menos frecuente en estos tumores la expresión nuclear de β -catenina. Estas diferencias en expresión de estas moléculas de adhesión pueden estar implicadas en el diferente comportamiento biológico de los tumores de laringe y de faringe, pues estos últimos se sabe que son más agresivos y con más tendencia a la diseminación metastásica.

Para evitar el problema de la influencia de las localizaciones tumorales, se han clasificado los tumores por esta variable y se han analizado los resultados en función de esto.

5.5.1 Orofaringe

*Stener et al.*¹⁰⁴ estudiaron una serie pequeña de 48 muestras de carcinoma de amígdala (23 VPH-negativos), y descubrieron que la expresión de E-cadherina en los carcinomas no relacionados con VPH era significativamente menor en las metástasis que en los tumores primarios, sugiriendo que la regulación a la baja de E-cadherina debe de ser un escalón fundamental para la progresión y diseminación tumoral.

Además de esto, el estudio de *Wakisaka et al.*¹⁰⁵ con una serie de 53 CCE de orofaringe (31 VPH negativos), describieron que los tumores E-cadherina negativos se correlacionaban de forma significativa con estadios ganglionares más avanzados.

En contraste con los datos previos y los resultados obtenidos en esta investigación, *Ukpo et al.*⁸⁷ no hallaron ninguna asociación entre la expresión de E-cadherina y la presencia de metástasis ganglionares, metástasis a distancia ni la supervivencia. Es importante mencionar que aquel estudio analizó 155 muestras de tumores de orofaringe, incluyendo sólo una pequeña proporción de tumores VPH negativos (55 casos). Por lo tanto, tomando esto en consideración, el significado pronóstico del VPH (64%) habría podido influenciar los resultados en esta cohorte.

En relación a la β -catenina, su pérdida se ha visto asociada a fenotipos más agresivos y metástasis en cáncer de cavidad oral^{68,106}. En contraste con estos hallazgos, en un estudio de una larga serie de casos que incluyen 374 casos de carcinomas de orofaringe y cavidad oral (aunque sólo 4 eran de orofaringe), los autores describen que todos los carcinomas presentan alteraciones significativas en la expresión de β -catenina⁶⁴. La proteína de β -catenina se detecta principalmente en el citoplasma de las células cancerígenas y sólo se observó positividad focal en el núcleo. Además, una elevada expresión citoplasmática se correlacionó significativamente con peor grado de diferenciación histológica, estadio avanzado y peor pronóstico del paciente, sugiriendo que la traslocación intracelular de β -catenina es importante en la activación de la señalización de Wnt en el cáncer de cavidad oral y, en consecuencia, favorecen el crecimiento y agresividad del tumor. Sin embargo, este estudio no incluye el estatus de VPH ni de p16.

*Yu et al.*⁷⁸ analizaron 94 pacientes con CCE de orofaringe (aunque sin datos de VPH) y encontraron que los pacientes con tumores clasificados como de baja expresión de β -catenina presentaban un aumento de riesgo de recurrencia local hasta de 3,5 veces comparado con el grupo de β -catenina elevada ($P=0,0021$). En contraste con estos resultados, otro estudio con 208 pacientes con CCE de orofaringe, de los cuales 138 eran p16 positivos, observaron una correlación significativa entre bajos niveles de β -catenina de membrana y una mejor supervivencia específica para enfermedad en todos los pacientes y en el subgrupo de p16 positivo⁸⁷. Curiosamente, la expresión de β -catenina estaba principalmente localizada en la membrana celular de los CCEE de orofaringe p16 negativos, al igual que en la presente serie de investigación; sin embargo, en los casos p16 positivos, los niveles β -catenina disminuyen en la membrana. Estos resultados reflejan la influencia del estatus p16 positivo en la expresión de β -catenina, que podría también explicar las discrepancias entre los diferentes estudios de CCEE de orofaringe. Además, dada la relación entre la expresión de p16 y el estatus de VPH, remarca la importancia del estudio del significado pronóstico de la expresión de β -catenina en relación con el estatus de VPH, particularmente en CCEE de orofaringe, en el cual la infección de VPH representa un factor etiológico importante.

En nuestra serie, excepto 10 CCE de orofaringe, expresan algún tipo de tinción de E-cadherina. Se observaron bajos niveles de expresión de E-cadherina en tumores en

comparación con el epitelio normal, asociándose con características de peor pronóstico (tumores T3-T4, metástasis ganglionares y estadio de tumor III-IV) y disminución de la supervivencia. Se observó en pacientes con baja expresión de E-cadherina una supervivencia específica para enfermedad del 36% a los 5 años, frente a un 45% en elevada expresión de E-cadherina.

De igual forma, la expresión baja de β -catenina se asociaba de carcinomas de orofaringe con una peor supervivencia global y específica para la enfermedad. Se ha observado también que la expresión de β -catenina nuclear en CCEE de orofaringe VPH negativos es rara (17%) y está asociada con un peor pronóstico. Siendo comparable a resultados descritos en cánceres de hipofaringe/orofaringe⁹⁹.

Sin embargo, *Hu et al.*¹⁰⁷, observaron que la expresión de β -catenina nuclear era común (54%) y relacionada con la positividad de p16. Además, los niveles de β -catenina nuclear se asociaron de forma significativa con una disminución de la supervivencia específica para enfermedad sólo en el subgrupo de p16 positivo, pero no en el conjunto total de pacientes. Estos pacientes, con una expresión positiva de β -catenina nuclear presentaban una supervivencia específica para enfermedad del 25% a los 5 años, frente a un 40% en β -catenina nuclear negativa.

5.5.2 Laringe

En nuestros resultados, pacientes con CCEL presentaron una supervivencia global a los 5 años del 48% y la supervivencia específica para enfermedad del 56%.

No se observó asociación significativa entre la expresión de E-cadherina y la supervivencia global ni específica para enfermedad ($P=0,62$ y $P=0,75$, respectivamente). Los casos con una baja expresión de β -catenina de membrana presentaban una peor supervivencia global y específica para enfermedad, sin embargo, los resultados no alcanzaron significación estadística ($P=0,42$ y $P=0,17$). Se observó una supervivencia específica para enfermedad a los 5 años en tumores con baja expresión de β -catenina de membrana del 47%, frente a un 57% en tumores con elevada expresión. Tampoco se observó asociación significativa entre la expresión de β -catenina nuclear y la supervivencia; podría estar debido al pequeño número de muestras con

expresión positiva de β -catenina nuclear. Sin embargo, la supervivencia a los 5 años específica para enfermedad de aquellos tumores con expresión positiva de β -catenina nuclear fue del 37%, frente al 58% en tumores con expresión negativa de β -catenina nuclear.

*Liu et al.*⁷⁶ estudiaron el impacto de la E-cadherina en la invasión y metástasis de carcinomas escamosos de laringe. Usaron como control pólipos benignos vocales; observándose tinción fuerte de membrana en todas las muestras excepto una. El 68% de las muestras de tumor mostraban una baja expresión de E-cadherina. Los tumores bien y moderadamente diferenciados mantenían una expresión fuerte de E-cadherina mientras que tumores pobremente diferenciados mostraban una tinción débil o negativa. Estos hallazgos están de acuerdo con lo publicado previamente.

En un estudio previo de nuestro grupo⁷⁰, analizaron 101 muestras de pacientes varones de carcinoma de células escamosas de laringe supraglótica, tratados quirúrgicamente de forma primaria en 2 instituciones. El 49% de los pacientes recibieron tratamiento complementario con RT. Se observaron diferencias significativas en la expresión de E-cadherina entre los tumores con y sin metástasis ganglionares; con baja expresión de E-cadherina en tumores con metástasis ganglionares ($P=0,007$). En el análisis multivariante se obtuvo que la clasificación T, el grado histológico y la expresión de E-cadherina en factores predictores independientes de aparición de metástasis ganglionares. También observaron una peor supervivencia específica para enfermedad a los 5 años en baja expresión de E-cadherina.

*Zou et al.*⁸⁹ analizaron la expresión de E-cadherina y fascina-1 en 159 pacientes con CCEL, con una correlación entre la expresión de E-cadherina y el estadio T, el grado histológico y la presencia de metástasis ganglionares; y una baja expresión de E-cadherina era más frecuente en pacientes con recurrencia loco-regional con una supervivencia de estos pacientes del 45% a los 3 años frente a un 83% en pacientes con expresión elevada de E-cadherina. Sin embargo, la expresión de E-cadherina no era un factor predictor independiente de metástasis ganglionares ni de supervivencia.

*Li et al.*⁸⁶ estudiaron 64 muestras de CCEL observando que pacientes con tumores pobremente diferenciados tenían una baja expresión de E-cadherina pero sin correlación estadísticamente significativa, y que aquellos tumores que presentaban

metástasis ganglionares tenían una baja expresión de E-cadherina con resultado estadísticamente significativo ($P < 0,05$).

*Psyrris et al.*⁶³ analizaron 209 muestras de carcinomas escamosos de laringe con estadios de I-IVA, siendo el 78% estadios T3-T4 y mayoritariamente N0 clínico. Observaron que aquellos pacientes que tenían una mayor expresión de E-cadherina y β -catenina de membrana presentaban una mayor supervivencia libre de enfermedad y mayor supervivencia global.

*Ahmed et al.*⁹⁴ estudiaron el papel de la E-cadherina y la ciclina D1 en la progresión de los CCEL. Observaron una asociación significativa entre la baja expresión de E-cadherina y la diferenciación tumoral, la presencia de metástasis ganglionares, la clasificación TNM y la recurrencia ($P=0,004$; $P=0,006$; $P=0,001$ y $P=0,001$, respectivamente). El tiempo medio de recurrencia fue de $22 \pm 1,6$ meses, con un tiempo medio de recurrencia local del 14,7 meses en aquellos pacientes con baja expresión de E-cadherina ($P < 0,0001$). La supervivencia global de aquellos pacientes con baja expresión de E-cadherina fue de 26 meses, frente a 35 meses de media del total de pacientes. En el análisis multivariante sólo la localización de tumor (región supraglótica), las metástasis ganglionares y estadio TNM eran factores predictivos independientes.

*Bayram et al.*⁸⁰ evaluaron el valor pronóstico de la expresión de E-cadherina y la molécula de adhesión celular epitelial (Ep-CAM) en 30 pacientes con carcinoma epidermoide supraglótico pN0 y 30 pacientes pN+. No encontraron diferencias significativas en la expresión de E-cadherina y Ep-CAM entre ambos grupos. Tampoco hallaron correlación entre ambas moléculas de adhesión.

*Quian et al.*⁹⁷ realizaron un estudio in vitro y en vivo, para evaluar las implicaciones pronósticas de la expresión de la E-cadherina en metástasis de cáncer de laringe y observaron que existía una correlación con significación estadística entre la baja expresión de E-cadherina y la supervivencia ($P < 0,05$); no observaron relación entre la sobreexpresión de E-cadherina con otros parámetros clínico-patológicos. La baja expresión de E-cadherina puede asociarse a crecimiento de tumores con mayor capacidad de invasión y peor pronóstico. Sin embargo, en sus resultados no se observó asociación entre la expresión de E-cadherina y las metástasis tumorales.

Uno de los últimos estudios publicados es el realizado por *Zhu et al.*¹⁰⁸. Se trata de un estudio retrospectivo que incluye 76 pacientes con CCEL con estadios de I-IVa. La expresión de E-cadherina y β -catenina se asociaba de forma significativa con la presencia de metástasis ganglionares ($P=0,02$ y $P=0,002$), estadio T ($P=0,004$ y $P=0,003$) y diferenciación histológica ($P=0,028$ y $P<0,001$). Se observó una disminución de la tinción de E-cadherina de membrana y un aumento de la β -catenina nuclear en la mayoría de los pacientes con CCEL con metástasis ganglionares, estadio T4 y/o tumores pobremente diferenciados. Sin embargo, la expresión de E-cadherina y/o β -catenina no eran factores predictores independientes de peor supervivencia.

En otro estudio⁸³, el análisis univariante se observó que pacientes con tumores con sobreexpresión de E-cadherina citoplasmática y de membrana presentaban una peor supervivencia global a los 3 años (48% vs. 79%, HR 0.30, $P=0,0004$; 58% vs. 72%, HR 0,42, $P=0,006$, respectivamente). Y pacientes con tumores con sobreexpresión de E-cadherina citoplasmática presentaban una peor supervivencia específica para enfermedad a los 3 años con resultado estadísticamente significativo (67% vs. 84%, HR 0,33, $P=0,012$). La supervivencia específica para enfermedad fue significativamente mejor en aquellos pacientes con tumores que sobreexpresaban β -catenina citoplasmática (84% vs. 56%, HR: 2,71, $P=0,008$). En el análisis multivariante observaron que la sobreexpresión de E-cadherina era un factor independiente de peor pronóstico (HR 2,98, 95% IC 1,11-8; $P=0,03$).

Estos resultados son contrarios a otros publicados y a nuestros resultados, ya que está descrito que una elevada expresión de E-cadherina está asociada a una estabilización del complejo cadherina/catenina. Explican que las discrepancias se basan en que teóricamente la E-cadherina de membrana y la citoplasmática deberían tener significados pronósticos opuestos y por lo tanto su expresión debe diferenciarse.

Nuestros resultados están en desacuerdo con la mayoría de artículos publicados previamente, dado que no se encuentra asociación significativa entre la expresión de la moléculas de adhesión y tumores más agresivos histológicamente y una peor supervivencia. Sin embargo, si se observó asociación significativa entre una baja expresión β -catenina de membrana y tumores avanzados T3-T4 y estadios III-IV ($P=0,018$ y $P=0,05$, respectivamente) así como con la recurrencia tumoral ($P=0,031$).

5.5.3 Hipofaringe

Ningún estudio previo se ha centrado en el estudio de las proteínas de adhesión en tumores de hipofaringe; la mayoría incluyen tumores de diferentes localizaciones y el que hace referencia a tumores de hipofaringe, incluye también tumores de laringe.

*Liu et al.*⁷⁹ estudiaron el valor pronóstico de la expresión de moléculas de adhesión en carcinomas primarios de células escamosas de laringe e hipofaringe. Observaron que todas las muestras de tumor excepto una mostraban algún tipo de expresión de E-cadherina de membrana, al igual que la serie a estudio, y disminución de la expresión en los nidos carcinomatosos. Describen también que tumores clasificados como pT4 y pobremente diferenciados presentaban una baja tinción de E-cadherina de membrana. A nivel de las metástasis ganglionares, todas las muestras analizadas presentaban expresión de E-cadherina. Sin embargo, no se encontró correlación significativa entre la expresión de E-cadherina y el aumento de riesgo de metástasis ganglionares.

*Pukkila et al.*⁹⁶ estudiaron 138 casos con CCECC (88 casos de orofaringe y 50 de hipofaringe), en el análisis univariante se observó una asociación entre la expresión de β -catenina nuclear y una evolución desfavorable de la enfermedad ($P=0,001$). En el análisis multivariante, la expresión de β -catenina nuclear era predictor independiente de peor pronóstico.

En cuanto a los resultados de la presente investigación, todas las muestras presentaron algún tipo de tinción de E-cadherina y en general la expresión de E-cadherina fue más débil que en el epitelio normal.

Se observó asociación significativa entre la expresión positiva de β -catenina nuclear y un bajo grado de diferenciación histológica ($P=0,02$). Ningún otro parámetro se asoció de forma significativa a la expresión de moléculas de adhesión.

En CCEH la supervivencia global a los 5 años del 20% y específica para enfermedad del 23%. Lo resultados de supervivencia son inferiores a lo previamente publicado^{27,29,109}; esto podría a ser debido a un mayor porcentaje de tumores en estadios avanzados, ya que un 85% de los pacientes estaban clasificados en estadio IV en nuestra serie.

Los CCE localizados en hipofaringe presentan un peor pronóstico y no siguen la línea de otros CCECC como orofaringe y laringe; las moléculas de adhesión tienen correlación con la presencia de metástasis ganglionares pero no con una peor supervivencia. Por lo tanto, deberemos buscar otros marcadores que nos complementen la información pronóstica en estos tumores.

6. CONCLUSIONES

1. La expresión de las moléculas de adhesión E-cadherina y β -catenina se encuentra disminuida en un elevado porcentaje de los CCECC (44-55%), respecto al epitelio normal.
2. La expresión nuclear de β -catenina es poco frecuente en los CCECC.
3. La expresión de membrana de E-cadherina se correlaciona con la de β -catenina y ambas muestran una correlación inversa con la expresión nuclear de β -catenina.
4. La expresión de membrana de ambas proteínas es más elevada en los carcinomas de laringe que en los de faringe.
5. Niveles bajos de expresión de E-cadherina y de β -catenina, y la expresión nuclear de β -catenina son más frecuentes en tumores localmente más avanzados.
6. La expresión baja de E-cadherina se asocia a una mayor frecuencia (aunque no significativa) de metástasis ganglionares.
7. La expresión baja de β -catenina de membrana se correlaciona significativamente con una mayor tasa de recidivas tumorales.
8. La expresión baja de E-cadherina y β -catenina de membrana, así como la expresión nuclear de β -catenina, se asocian con una menor supervivencia global y menor supervivencia específica de enfermedad, aunque sólo la expresión baja de β -catenina de membrana resultó ser un predictor independiente en el análisis multivariante.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. American Cancer Society.
https://cancerstatisticscenter.cancer.org/?_ga=1.174693282.1291166078.1467194316#/cancer-site/Oralcavityandpharynx
2. Mifsud M, Eskander A, Irish J, Gullane P, Gilbert R, Brown D, de Almeida JR, Urbach DR, Goldstein DP. Evolving trends in head and neck cancer epidemiology: Ontario, Canada 1993-2010. *Head&Neck*.2017;39:1770-1778
3. Simard EP, Torre LA, Jemal A. Intrnational trends in head and neck cancer incidence retes: Differences by country, sex and anatomic site. *Oral oncol*. 2014; 50: 387-403
4. Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol*. 2008;26:612–619
5. Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated head and neck cancer: A virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol* 2010;11:781– 789.
6. de Camargo Cancela M, De Souza DLB, Curado MP. International incidence of oropharyngeal cancer: A population-based study. *Oral Oncol* 2012;48:484–490.
7. de Souza DL, de Camargo Cancela M, Pérez MM, Curado MP. Trends in the incidence of oral cavity and oropharyngeal cancers in Spain. *Head Neck* 2012;34:649-654
8. National Cancer Institute. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/oralcav.html>
9. Suárez C, Gil-Carcedo LM, Marco J, Medina JE, Ortega P, Trinidad J. Características clínicas de los tumores de la orofaringe. *Tratado de Otorrinolaringología y Cirugía de cabeza y Cuello*. 2o ed. Editorial Médica Panamericana (2009). Págs. 3395-3400
10. Rodrigo JP, Heideman DA, García-Pedrero JM, Fresno MF, Brakenhoff RH, Diaz Molina JP, Snijders PJ, Hermsen MA. Time trends in the prevalence of HPV in oropharyngeal squamous cell carcinomas in northern Spain (1990-2009). *Int J Cancer*. 2014; 134:487-492
11. Herrero R, Castellsagué X, Pawlita M, Lissowka J, Kee F, Balaram P, Rajkumar T, Sridhar H, Rose B, Pintos J, Fernández L, Idris A, Sánchez MJ, Nieto A, Talamini R, Tavani A, Bosch FX, Reidel U, Snijders PJF, Meijer CJLM, Viscidi R, Muñoz N, Franceschi S. Human Papillomavirus an Oral Cancer: The International Agency FOR Reseach on Cancer Multicenter Study. *J Natl Cancer*

Inst 2003; 95:1772-83

12. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Lu C, Kim H, Axelrod R, Silverman CC, Redmond KP, Gillison ML. Human papillomavirus as a marker of the natural history and response to therapy of head and neck squamous cell carcinoma. *N Engl J Med.* 2010; 363(1):24-35
13. Ragin CC, Taioli E. Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis. *Int J Cancer.* 2007; 121(8):1813-1820
14. Cattaruzza MS, Maisonneuve P, Boyle P. Epidemiology of laryngeal cancer. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1996; 32B(5):293-305
15. Suárez C, Gil-Carcedo L.M, Marco J, Medina JE, Ortega P, Trinidad J. Características clínicas de los tumores de la laringe. *Tratado de Otorrinolaringología y Cirugía de cabeza y Cuello.* 2o ed. Editorial Médica Panamericana (2009). Págs. 3515-3527
16. National Cancer Institute. https://www.cancer.gov/types/head-and-neck/hp/adult/laryngeal-treatment-pdq#link/_299_toc
17. National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/types/head-and-neck/hp/adult/hypopharyngeal-treatment-pdq>
18. El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ. Tumours of the hypopharynx, larynx, trachea and parapharyngeal space. *WHO Classification of Head and Neck Tumours.* 4th Edition. International Agency for Research Cancer (2017). Págs. 79-104
19. Halec G, Holzinger D, Schmitt M, Flechtenmacher C, Dyckhoff G, Lloveras B, Höfler D, Bosch FX, Pawlita M. Biological evidence for a causal role of HPV16 in a small fraction of laryngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2013; 109:172-83
20. Suárez C, Gil-Carcedo LM, Marco J, Medina JE, Ortega P, Trinidad J. Características clínicas de los tumores de la hipofaringe y la porción cervical del esófago. *Tratado de Otorrinolaringología y Cirugía de cabeza y Cuello.* 2o ed. Editorial Médica Panamericana (2009). Págs. 3433-3441

21. Brandein-Gensler M, Smith RV, Wang B, Penner C, Theilken A, Broughel D, Schiff B, Owen RP, Smith J, Sarta C, Hebert T, Nason R, Ramer M, Delacure M, Hirsch D, Myssiorek D, Heller K, Prytowsky M, Schlecht NF, Negassa A. Validation of the histologic risk model in a new cohort of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2010;34:676-88
22. Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, Gershenwald JE, Compton CC, Hess KR, Sullivan DC, Jessup JM, Brierley JD, Gaspar LE, Schilsky RL, Balch CM, Winchester DP, Asare EA, Madera M, Gress DM, Meyer LR. *AJCC Cancer Staging Manual.* 8th ed. New York, NY: Springer, 2017
23. Marioni G, Marchese-Ragona R, Cartei G, Marchesa F, Staffieri. Current opinion in diagnosis and treatment of laryngeal carcinoma. *Cancer Treat Rev.* 2006;32(7):504-15
24. Lefebvre JL. Surgery for laryngopharyngeal SCC in the era of organ preservation. *Clin Exp Otorhinolaryngol.* 2009;2:159-63
25. Rades D, Schroeder U, Bajrovic A, Schild SE. Radiochemotherapy versus surgery plus radio(chemo)therapy for stage T3/T4 larynx and hypopharynx cancer-Results of a matched pair analysis. *Eur J Cancer.* 2011;47:2729-34
26. Rodrigo JP, López F, Llorente JL, Álvarez-Marcos C, Suárez C. Resultados de la laringectomía total en carcinoma localmente avanzado de laringe en la era de la organopreservación. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2015;66:132-8
27. García-Cabo Herrero P, Fernández-Vañes L, López Álvarez F, Álvarez Marcos C, Llorente JL, Rodrigo JP. Resultados de la laringectomía total en carcinomas localmente avanzados de hipofaringe. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2017;68(6):328-335
28. Suárez C, Gil-Carcedo LM, Marco J, Medina JE, Ortega P, Trinidad J. Tratamiento con radioterapia de los tumores de laringe e hipofaring. *Tratado de Otorrinolaringología y Cirugía de cabeza y Cuello.* 2o ed. Editorial Médica Panamericana (2009). Págs. 3529-3558.
29. Harris BN, Biron VL, Donald P, Farwell DG, Luu QC, Bewley AF, et al. Primary surgery vs chemoradiation treatment of advanced-stage hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 2015;141:636-40

30. American Society of Clinical Oncology, Pfiser DG, Laurie SA, Weinstein GS, Mendehall WM, Adelstein DJ, Ang KK, Clayman GL, Fisher SG, Forastiere AA, Harrison LB, Lefebvre JL, Leupold N, List MA, O'Malley BO, Patel S, Posner MR, Schwartz MA, Wolf GT. American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline for the use of larynx-preservation strategies in the treatment of laryngeal cancer. *J Clin Oncol.* 2006; 24:3693-704
31. Coca-Pelaz A, Rodrigo JP, Suárez C. Clinicopathologic analysis and predictive factors for distant metastases in patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck.* 2012; 34(6):771-5.
32. Andrews NA, Jones AS, Helliwell TR, Kinsella AR. Expression of the E-cadherine-catenin cell adhesion complex in primary squamous cell carcinomas of the head and neck and their nodals metastasis. *Br J Cancer* 1997;75(10):1474-1480
33. Spector JG, Sessions DG, Haughey BH, Chao KSC, Simpson J, El Mofty S, Perez CA. Delayed regional metastases, distant metastases, and second primary malignancies in squamous cell carcinomas of the larynx and hypopharynx. *Laryngoscope.* 2001;111:1079-87
34. Merino OR, Lindberg RD, Fletcher GH. An analysis of distant metastases from squamous cell carcinoma of the upper respiratory and digestive tracts. *Cancer* 1977;40:145-51
35. Bree R, Senft A, Coca-Pelaz A, Kowalski L, López F, Mendenhall W, Quer M, Rinaldo A, Shaha AR, Strojan P, Takes RP, Silver CE, Leemans CR, Ferlito A. Detecction of Distant Metastases in Head and Neck Cancer: Changing Landscape. *Adv Ther.* 2018;35:161-172
36. Weinberg RA. Moving out: Invasion and metastasis. *The biology of Cancer.* 2nd Edition. Garland Science. 2014. Pages 641-722
37. Gonzalez DM and Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesechymal transition. *Sci Signal.* 2014; 23;7(344).
38. Kalluri R and Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 2009;119:1420-1428
39. Nijkamp MM, Span PN, Hoogsteen IJ, van der Kogel AJ, Kaanders JH, Bussink J. Expression of E-cadherin and vimentin correlates with metastasis formation in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Radiother Oncol* 2011;99:344-

40. Bowie GL, Caslin AW, Roland NJ, Field JK, Jones AS, Kinsella AR. Expression of the cell-cell adhesion molecule E-cadherin in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 1993; 18:196-201
41. Campbell HK, Maiers JL, DeMali KA. Interplay between tight junctions & adherens junctions. *Exp Cell Res.* 2017 Sep 1;358(1):39-44.
42. Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signaling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;4:118-132
43. Wong TS, Gao W, Chan JY. Interactions between E-cadherin and microRNA deregulation in head and neck cancers:the potential interplay. *Biomed Res Int.* 2014;2014:126038
44. Wijnhoven BPL, Dinjens WNM, Pignatelli M. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br J Surg* 2000;87:992-1005
45. Redies C, Vanhalst K, Roy FV. Delta-Protocadherins: unique structures and functions. *Cell Mol Life Sci.* 2005 Dec;62(23):2840-52.
46. Van Roy F, Berx G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherine. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65:3756-88
47. Hulpiau P. and van Roy F. Molecular evolution of the cadherin superfamily. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2009 Feb;41(2):349-69
48. Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Ben-Ze'ev A. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J Clin Invest* 2002;109:987-991
49. Hirohashi S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol* 1998; 153:333-339.
50. Cavallaro U, Dejana E. Adhesion molecule signalling: not always a sticky business. *Nat Rev Mol Cell Bio.* 2011; 12(3):189-97
51. Smith A, Teknos TN, Pan Q. Epithelial to Mesenchymal Transition in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Oral Oncol.* 2013; 49(4):287-292
52. Yang T, Wu C, Ko J, Wang C, Lou P, Chang Y. Significance of tumor satellite variables in reflecting the epithelial-mesenchymal transition of tongue cancer. *Oral Oncology.* 2011; 47(8):720-724
53. Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumour virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell.* 1982 Nov;31(1):99-109.

54. Kumar R, Bashyam. Multiple oncogenic roles of nuclear beta-catenin. *J Biosci.* 2017 Dec;42(4):695-707.
55. Lill C, Schneider S, Ghanim B, Brunner M, Heiduschka G, Loewe R, Thurnher D. Expression of β -catenin and cyclin D1 in Merkel cell carcinomas of the head and neck. *Wien Klin Wochenschr.* 2013 Sep;125(17-18):501-7.
56. Clevers H1. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell.* 2006 Nov 3;127(3):469-80.
57. Mantilla C, Suárez-Mellado, Duque-Jaramillo A, Navas MC. Mecanismos de señalización por β -catenina y su papel en la carcinogénesis. *Rev CES Med* 2015;29(1):109-128
58. Chen YT, Stewart DB, Nelson WJ. Coupling assembly of the E-cadherine/ β -catenin complex to efficient endoplasmic reticulum exit and basal-lateral membrane targeting of E-cadherine in polarized MDCK cells. *J Cell Biol.* 1999;144:687-99
59. Davis MA, Ireton RC, Reynolds AB. A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J Cell Biol.* 2003; 163:525-34
60. van Noort M, Meeldijk J, van der Zee R, Destree O, Clevers H. Wnt signaling controls the phosphorylation status of beta-catenin. *J Biol Chem* 2002;277:17901–5
61. Fagotto F, Funayama N, Gluck U, Gumbiner BM. Binding to cadherins antagonizes the signaling activity of beta-catenin during axis formation in *Xenopus*. *J Cell Biol* 1996;132:1105–14
62. Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 2000;14:1837-1851
63. Psyrris A, Kotoula V, Fountzilias E, Alexopoulou Z, Bobos M, Televantou D, Karayannopoulou G, Krikelis D, Markou K, Karasmanis I, Angouridakis N, Kalogeras KT, Nikolaou A, Fountzilias G. Prognostic significance of the Wnt pathway in squamous cell laryngeal. *Oral Oncol.* 2014; 50(4):298-305
64. Santoro A, Pannone G, Papagerakis S, et al. Beta-catenin and epithelial tumors: A study based on 374 oropharyngeal cancers. *Biomed Res Int* 2014;2014: 948264
65. Bánkfalvi A, Krabort M, Buchwalow IB, Végh A, Felszeghy E, Piffkó J. Gains and losses of adhesion molecules (CD44, E-cadherin, and β -catenin) during oral carcinogenesis and tumour progression. *J Pathol.* 2002;198:343–351
66. Brown JP, Chandra A. Science made simple: tissue microarrays (TMAs). *BJU*

Int. 2014 Aug;114(2):294-5

67. Rietbergen MM, Leemans CR, Bloemena E, Heideman DAM, Braakhuis BJM, Hesselink AT, Witte BI, Baatenburg de Jong RJ, Meijer CJLM, Snijders PJF, Brankenhoff RH. Increasing prevalence rates of HPV attributable oropharyngeal squamous cell carcinomas in the Netherlands as assessed by a validated test algorithm. *Int J Cancer*. 2013;132(7):1565–71
68. Smeets SJ, Hesselink AT, Speel E-JM, Haesevoets A, Snijders PJF, Pawlita M, Meijer CJ, Braakhuis BJ, Leemans CR, Brankenhoff RH. A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int J Cancer*. 2007;121(11):2465–72
69. Rodrigo Tapia JP, Dominguez Iglesias F, Álvarez Marcos C, González Meana MV, García Pedrero J, Suárez Nieto C. Significado pronóstico de la expresión de las moléculas de adhesión E-cadherina, CD44s y CD44v6 en los carcinomas epidermoides supraglóticos. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2002; 53:745-751
70. Rodrigo JP, Domínguez F, Alvarez C, Manrique C, Herrero A, Suárez C. Expression of E-cadherin in squamous cell carcinomas of the supraglottic larynx with correlations to clinicopathological features. *Eur J Cancer* 2002;38:1059-1064.
71. Lopez-Gonzalez JS, Cristerna-Sanchez L, Vazquez-Manriquez ME, Jimenez-Orci G, Aguilar-Cazares D. Localization and level of expression of β -catenin in human laryngeal squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004 Jan;130(1):89-93
72. Schipper JH, Unger A, Jahnke K. E-cadherin as a functional marker of the differentiation and invasiveness of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1994; 19:381-4
73. Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Löchner D, Birchmeier W. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* 1991;113:173-185
74. Schipper JH, Frixen UH, Behrens J, Unger A, Jahnke K, Birchmeier W. E-cadherin expression in squamous cell carcinomas of head and neck: inverse correlation with tumor dedifferentiation and lymph node metastasis. *Cancer Res*. 1991;51(23 Pt 1):6328-37
75. Mattijssen V, Peters HM, Schalkwijk L, Van't Hof-Grootenboer B, Ruiter DJ, Manni JJ. E-cadherin expression in head and neck squamous cell carcinoma in

- associated with clinical outcome. *Int J Cancer* 1993;55:580-585
76. Liu M, Lawson G, Delos M, Jamart J, Remacle M. Expression of E-cadherin adhesion molecule in vocal cord carcinomas. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1997; 254: 417-421
 77. Mandal M, Myers JN, Lippman SM, Johnson FM, Williams MD, Rayala S, Ohshiro K, Rosenthal DI, Weber RS, Gallick GE, El-Naggar AK. Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous carcinoma: association of Src activation with E-cadherin down-regulation, vimentin expression, and aggressive tumor features. *Cancer.* 2008 May 1;112(9):2088-100.
 78. Yu Z, Weinberger PM, Provost E, et al. Beta-Catenin functions mainly as an adhesion molecule in patients with squamous cell cancer of the head and neck. *Clin Cancer Res.* 2005;11:2471-2477
 79. Liu M, Lawson G, Delos M, Jamart J, Chaletain B, Remacle M, Marbaix E. Prognostic value of cell proliferation makers, tumour suppressor proteins and cell adhesion molecules in primary squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2003;260:28-34
 80. Bayram A, Yüce I, Çaglı S, Canöz Ö, Güney E. Predictive value of E-cadherine and Ep-CAM in cervical lymph node metastasis of supraglottic larynx carcinoma. *Am J Otolaryngol.* 2015 Nov-Dec;36(6):736-40
 81. Ren X, Wang J, Lin X, Wang X. E-cadherin expression and prognosis of head and neck squamous cell carcinoma: evidence from 19 published investigations. *Onco Targets Ther.* 2016; 26;9:2447-53
 82. Goulioumis AK, Varakis J, Goumas P, Papadaki H. Differential beta-catenin expression between glottic and supraglottic laryngeal carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2010;267(10):1573-8
 83. Greco A, De Virgilio A, Rizzo MI, Pandolfi F, Rosati D, De Vicentiis M. The Prognostic Role of E-Cadherin and β -Catenin Overexpression in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Laryngoscope.* 2016;126(4):E148-55
 84. Da Silva SD, Morand GB, Alobaid FA, Hier MP, Mlynarek AM, Alaoui-Jamali MA, Kowalski LP. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers have prognostic impact in multiple primary orals squamous cell carcinoma. *Clin Exp Metastasis.* 2015; 32 (1):55-63
 85. Imajyo I, Sugiura T, Kobayashi Y, Shimoda M, Ishii K, Akimoto N, Yoshihama N, Kobayashi I, Mori Y. T-box transcription factor Brachyury expression is

- correlated with epithelial-mesenchymal transition and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2012; 41(6):1985-95
86. Li JJ, Zhang GH, Yang XM, Li SS, Liu X, Yang QT, Li Y, Ye J. Reduced E-cadherin expression is associated with lymph node metastases in laryngeal squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx*. 2012 Apr;39(2):186-92
 87. Ukpo OC, Thorstad WL, Zhang Q, Lewis JS. Lack of Association of Cadherin Expression and Histopathologic Type, Metastasis, or Patient Outcome in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma: A Tissue Microarray Study. *Head Neck Pathol*. 2012;6:38–47
 88. Zhu R, Jiang XY, Song XL, Zhang W, Chen S, Liu LK. Expression of E-cadherin and beta-catenin in oral squamous cell carcinomas of tongue: correlation with the clinicopathologic features and patient prognosis. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2010; 45(5):295-8
 89. Zou J, Yang H, Chen F, Zhao H, Lin P, Zhang J, Ye H, Wang L, Liu S. Prognostic significance of fascin-1 and E-cadherin expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer Prev*. 2010; 19(1):11-7
 90. Hung KF, Chang CS, Liu CJ, Lui MT, Cheng CY, Kao SY. Differential expression of E-cadherin in metastatic lesions comparing to primary oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2006; 35(10):589-94
 91. Ueda G, Sunakawa H, Nakamori K, Shinya T, Tshako W, Tamura Y, Kosugi T, Sato N, Ogi K, Hiratsuka H. Aberrant expression of beta- and gamma-catenin is an independent prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2006;35(4):356-61
 92. Nakanishi Y, Akimoto S, Sato Y, Kanai Y, Sakamoto M, Hirohashi S. Prognostic significance of dysadherin expression in tongue cancer: immunohistochemical analysis of 91 cases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2004;12(4):32
 93. Kaur J, Sawhney M, DattaGupta S, Shukla NK, Srivastava A, Walfish PG, Ralhan R. Clinical Significance of Altered Expression of β -Catenin and E-Cadherin in Oral Dysplasia and Cancer: Potential Link with ALCAM Expression. *PLoS One*. 2013 Jun 28; 8(6):e67361
 94. Ahmed RA, Shawky AE, Hamed RH. Prognostic significance of cyclin D1 and E-cadherin expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Pathol Oncol Res*. 2014;20(3):625-33

95. Cappelleso R, Marioni G, Crescenzi M, Giacomelli L, Guzzardo V, Mussato A, Staffieri A, Martini A, Blandamura S, Fassina A. The prognostic role of the epithelial-mesenchymal transition markers E-cadherin and Slug in laryngeal squamous cell carcinoma. *Histopathology*, 2015 Oct;67(4):491-500
96. Mezi S, Chiappetta C, Carletti R, Nardini A, Cortesi E, Orsi E, Piesco G, Di Gioia C. Clinical significance of epithelial-to mesenchymal transition in laryngeal carcinoma: Its role in the different subsites. *Head & Neck*. 2017;39:1806-1818
97. Qian A, Ma X, Zhou H, Yu C, Zhang Y, Yang X, Shen X, Gao X. Expression and prognostic value of E-cadherin in laryngeal cancer. *Acta Otolaryngol*. 2016 Jul;136(7):722-8
98. Bosch FX, Andl C, Abel U, Kartenbeck J. E-cadherin is a selective and strongly dominant prognostic factor in squamous cell carcinoma: a comparison of E-cadherin with desmosomal components. *Int J Cancer* 2005;114:779-790
99. Pukkila MJ, Virtaniemi JA, Kumpulainen EJ, et al. Nuclear beta-catenin expression is related to unfavourable outcome in oropharyngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol*. 2001;54:42-47.
100. Rodrigo JP, Dominguez F, Suárez V, Canel M, Secades P, Chiara MD. Focal adhesion kinase and E-cadherin as markers for nodal metastasis in laryngeal cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2007 Feb;133(2):145-50
101. Takes RP, Baatenburg de Jong RJ, Alles MJRC, Meeuwis CA, Marres HAM, Knegt PPM, de la Riviere GB, de Wilde PCM, Mooi WJ, Hermans J, van Krieken JHJM. Markers for Nodal Metastasis in Head and Neck Squamous Cell Cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002;128:512-518
102. Nardi CE, Dedivitis RA, Camillo de Almeida R, de Matos LL, Cernea CR. The role of E-cadherin and β -catenin in laryngeal cancer. *Oncotarget*. 2018 Jul 10;9(53):30199-30209.
103. Rodrigo JP, Suárez C, González MV, Lazo PS, Ramos S, Coto E, Álvarez I, García LA, Martínez JA. Variability of genetic alterations in different sites of head and neck cancer. *Laryngoscope*. 2001;111(7):1297-301
104. Stenner M, Yosef B, Huebbers CU, et al. Nuclear translocation of β -catenin and decreased expression of epithelial cadherin in human papillomavirus-positive tonsillar cancer: An early event in human papillomavirus-related tumour progression? *Histopathology*. 2011;58:1117–1126
105. Wakisaka N, Yoshida S, Kondo S, et al. Induction of epithelial-mesenchymal

- transition and loss of podoplanin expression are associated with progression of lymph node metastases in human papillomavirus-related oropharyngeal carcinoma. *Histopathology*. 2015;66:771-780
106. Tanaka N, Odajima T, Ogi K, Ikeda T, Satoh M. Expression of E-cadherin, α -catenin, and β -catenin in the process of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2003;89:557-563.
107. Hu Z, Müller S, Qian G, et al. Human papillomavirus 16 oncoprotein regulates the translocation of β -catenin via the activation of epidermal growth factor receptor. *Cancer* 2015;121:214-225
108. Zhu GJ, Song PP, Zhou H, Shen XH, Wang JG, Ma XF, Gu YJ, Liu DD, Feng AN, Qian XY, Gao X. Role of epithelial-mesenchymal transition markers E-cadherin, N-cadherin, β -catenin and ZEB2 in laryngeal squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*. 2018;15(3):3472-3481
109. León X, López M, García J, Rovira C, Casasayas M, Quer M. Patients with locally advanced hypopharyngeal carcinoma. Results over a 30-year period. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2018 Dec 5