

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Programa de doctorado de biomedicina y oncología molecular.

**“EXPRESIÓN DE ANEXINAS A9 Y A10 EN
CANCER EPIDERMÓIDE DE CABEZA Y
CUELLO.”**

MARIA CECILIA SALOM LUCENA

Tesis doctoral

Junio 2019



Universidad de Oviedo

Programa de doctorado de biomedicina y oncología molecular

“EXPRESIÓN DE ANEXINAS A9 Y A10 EN
CANCER EPIDERMÓIDE DE CABEZA Y
CUELLO.”

Autor

María Cecilia Salom Lucena

Director/Departamento

Juan P. Rodrigo Tapia
Cirugía y especialidades
Médico-quirúrgicas

Directora/Departamento

Juana García Pedrero
IUOPA



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Expresión de anexinas A9 y A10 en cáncer epidermoide de cabeza y cuello.	Inglés: Annexin A9 and A10 expression in head and neck squamous cell carcinoma.
2.- Autor	
Nombre: María Cecilia Salom Lucena	DNI/Pasaporte/NIE: P
Programa de Doctorado: Biomedicina y Oncología Molecular	
Órgano responsable: IUOPA, Universidad de Oviedo	

RESUMEN (en español)

INTRODUCCION:

Las anexinas son una superfamilia de proteínas calcio dependientes y con capacidad de unirse a fosfolípidos, que participan en la regulación de una amplia gama de procesos moleculares y celulares. Las anexinas se han implicado en múltiples procesos fisiológicos y patológicos, incluida la carcinogénesis. La expresión de varias anexinas se ha encontrado frecuentemente alterada y relacionada con el desarrollo y la progresión de diversas neoplasias malignas humanas. Sin embargo, no existe información sobre la expresión y el papel de las anexinas A9 (ANXA9) y A10 (ANXA10) en los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (CECC).

OBJETIVOS:

El objetivo global de esta tesis ha sido investigar el significado clínico y biológico de la expresión de ANXA9 y ANXA10 en la progresión de los CECC y contribuir a un mejor conocimiento de los mecanismos y consecuencias de la expresión alterada de dichas proteínas, así como su impacto en el pronóstico de los pacientes y el resultado de la enfermedad.

MATERIALES Y METODOS:

Para ello, se seleccionó una serie homogénea de muestras de tejido de 382 pacientes con diagnóstico de CECC y tratados quirúrgicamente en el Hospital Universitario Central de Asturias. La expresión proteica de ANXA9 y ANXA10 fue evaluada mediante inmunohistoquímica utilizando microarrays de tejido HNSCC, y se correlacionó con los parámetros clínico-patológicos y el resultado de la enfermedad.

RESULTADOS:

Se detectó bajada de la expresión de ANXA9 en el 42% de las muestras de tejido de CECC, comparado con el epitelio sano. La expresión de ANXA9 en tumores se asoció significativamente con la localización orofaríngea y el grado de diferenciación histológica ($P < 0,001$). En marcado contraste, la ANXA10 no se expresa en el epitelio normal, mientras que se detecta de forma variable en el citoplasma de las células cancerosas. La expresión positiva de ANXA10 se encontró en el 64% de los tumores, y se asoció significativamente con el grado de diferenciación ($P < 0,001$), siendo también más frecuente en los tumores orofaríngeos ($P = 0,019$). Mediante el análisis bioinformático de los datos del transcriptoma de la cohorte de CECC del TCGA se demostró que los niveles de ARNm de ANXA9 disminuyen significativamente en los tumores primarios en comparación con muestras del correspondiente tejido normal ($P < 0,001$), mientras que los niveles de ARNm de ANXA10 aumentan en los tumores frente al tejido normal ($P < 0,001$).

CONCLUSIONES:

Estos resultados revelan que la expresión de ANXA9 y ANXA10 está frecuentemente alterada en CECC tanto a nivel de mRNA como de proteína. Además, la expresión de ANXA9 y ANXA10 se asoció al grado de diferenciación tumoral, lo que sugiere que podrían estar implicados en la patogénesis de estos cánceres.



RESUMEN (en inglés)

INTRODUCTION:

Annexins are a superfamily of calcium-dependent proteins with the ability to bind phospholipids, which have been involved in a wide range of molecular and cellular processes. In addition, annexins have been implicated in multiple physiological and pathological processes, including carcinogenesis. The expression of several annexins has been found frequently altered and linked to the development and progression of various human malignancies. However, there is no information on the role of annexin A9 (ANXA9) and A10 (ANXA10) in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC).

OBJECTIVES:

The overall objective of this thesis was to investigate the clinical and biological significance of ANXA9 and ANXA10 in the progression of HNSCC and to contribute to a better understanding of the mechanisms and consequences of the altered expression of both proteins, and also the impact on patient prognosis and disease outcome.

MATERIALS AND METHODS:

To accomplish this, a homogenous series of surgical tissue samples from 382 HNSCC patients diagnosed and treated at the Hospital Universitario Central de Asturias were selected for study. ANXA9 and ANXA10 protein expression was evaluated by immunohistochemistry using HNSCC tissue microarrays, and correlated with the clinicopathologic parameters and patient outcome.

RESULTS:

Down-regulation of ANXA9 expression was found in 42% of HNSCC tissue samples, compared to normal epithelia. ANXA9 expression in tumors was significantly associated with oropharyngeal location and histological differentiation grade ($P < 0.001$). In marked contrast, ANXA10 expression was absent in normal epithelium, while variably detected in the cytoplasm of cancer cells. Positive ANXA10 expression was found in 64% of tumors, and was significantly

associated with differentiation grade ($P < 0.001$), being also more frequent in oropharyngeal tumors ($P = 0.019$).

In silico analysis of the transcriptome data from the TCGA HNSCC cohort further contributed to demonstrate that the ANXA9 mRNA levels also decreased significantly in primary tumors compared to normal tissue samples ($P < 0.001$), while ANXA10 mRNA levels increased in tumors *versus* normal tissue ($P < 0.001$).

CONCLUSIONS:

These results reveal that the expression of both ANXA9 and ANXA10 is frequently altered in HNSCC at both mRNA and protein level. In addition, the expression of both ANXA9 and ANXA10 was associated to the tumor differentiation grade, suggesting that they could be implicated in the pathogenesis of these cancers.

AGRADECIMIENTOS:

DAR GRACIAS A DIOS Y A LA VIRGEN, por poner en mi camino a toda la gente maravillosa que han hecho posible este sueño.

A mis tutores: Dra. Juana García Pedrero, por poner el modelo de mujer emprendedora, así como sus conocimientos, su tiempo, sus consejos y su paciencia . A mi tutor Dr. Juan Pablo Rodrigo Tapia por que me ha enseñado mucho en estos años, dentro del quirófano, en la práctica clínica, en la actividad investigadora y hasta en la vida familiar, pero sobre todo en ofrecer su amistad y mostrarme que con mucho empeño y teniendo los pies en la tierra se puede llegar muy lejos, a los dos infinitas GRACIAS.

A todo el equipo del IUOPA, que hacen que el trabajo de esta humilde servidora sea más fácil de alcanzar.

Gracias a todo el Servicio ORL del HUCA de Oviedo, por formarme para la vida profesional, y a mis antiguos jefes, Dr. Carlos Suárez Nieto y al Dr. José Luis Llorente Péndas, mantener el espíritu de investigar y pasarlo a cada residente que pasa por su servicio.

A mis compañeros de residencia, LOS CONSPIRADORES, sin duda me gané la lotería con cada uno de ustedes, desde el minuto que los conocí han estado a mi lado, en los momentos buenos, pero también, en los muy malos, creíamos que la amistad se acababa después de la residencia, pero con esfuerzo aquí seguimos, estoy orgullosa de mantenerlos en mi vida.

A mi actual Servicio de ORL del HUC, donde he dado mis primeros pasos como adjunta, y que me ha apoyado en cada idea nueva que se me ocurre y están luchando cada día para ser un gran servicio..

A mis hermanas de otra madre, Andrea, Astrid, Nancy y Valentina, 30 años de amistad o 15 años, se dicen fácil, pero no lo son, con ustedes chicas empezó la aventura de España, y la aventura dió frutos.

A mis Hermanas, Esperanza y Estefania, las personas que han nacido para empujarme a ser cada día mejor desde que tenía uso de razón.

A mi madre, porque eres la mujer valiente que conozco, la que me obligó a subirme en un avión en contra de mi voluntad porque era por mi bien, la mujer que sigue empujándome a seguir adelante, tras un WhatsApp o una videollamada, la mujer que ve la vida con esperanza y con una gran sonrisa, GRACIAS MAMI!!!

A mi ángel del cielo, mi padre, han sido 6 años muy difíciles sin ti, doy gracias porque siempre creíste en mi y me enseñaste que el limite es el cielo, y luchando todo es posible...

A TODOS UNA Y MIL VECES GRACIAS...

Tesis doctoral

Contenido

<i>Agradecimientos:</i>	11
<i>Figuras</i>	16
<i>Tablas</i>	16
<i>Abreviaturas</i>	17
1. INTRODUCCIÓN	20
1.1.1 Epidemiología	21
1.1.2 Etiología	21
1.1.3 Clínica y diagnóstico.	22
1.1.4 Estadificación	23
1.1.5 Tratamiento	23
1.1.6 Pronóstico	26
2. Anexinas:	31
2.1.1 Generalidades de las anexinas	32
2.1.2.-Tipos de anexinas	35
2.1.3.- Funciones de las anexinas	35
2.1.4 Las Anexinas como herramientas de diagnóstico para enfermedades humanas.	37
2.2.-ASPECTOS GENERALES DE LA ANEXINA A9.	43
2.3-ASPECTOS GENERALES DE LA ANEXINA A10.	48
2.4.-ANEXINA A9 Y CANCER.	53
2.5.-ANEXINA A10 Y CANCER.	56
3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	61
4.MATERIALES Y METODOS:	64
4.1.-Muestras de tejidos	65
4.2. Detección de VPH	68
4.3.- Estudio inmunohistoquímico de la expresión de las anexinas A9 y A10	70
4.4.- Análisis “in silico” de la expresión del ARNm de ANXA9 y ANXA10 utilizando los datos del cáncer de cabeza y cuello del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA)	71
4.5.- Análisis estadístico	71
5. RESULTADOS	74
5.1.-ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO	75
5.1.1. Expresión de las anexinas A9 y A10 en epitelio normal	75
5.1.2.- Expresión de la anexina A9 en los carcinomas	77
5.1.3.- Expresión de la anexina A10 en los carcinomas	78

5.2. Análisis “in silico” de la expresión del ARNm de ANXA9 y ANXA10 utilizando los datos de cáncer de cabeza y cuello del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA).....	81
5.3.- Análisis de Supervivencia.....	83
<i>6. DISCUSIÓN</i>	<i>90</i>
<i>CONCLUSIONES.....</i>	<i>106</i>
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	<i>109</i>
<i>ANEXOS.....</i>	<i>123</i>
Congresos:.....	124
Artículo:	134

FIGURAS

Figura 1: Capacidades biológicas clásicas de las células tumorales

Figura 2: Capacidades biológicas emergentes de las células tumorales

Figura 3: Estructura típica de una molécula de anexina

Figura 4. Localización cromosómica de las anexinas humanas

Figura 5. Representación esquemática de los procesos de tráfico de membranas en los que participan algunas anexinas

Figura 6: Roles de las anexinas individuales en la tumorigenesis

Figura 7 : Análisis de la expresión génica de las anexinas humanas en diferentes tejidos, mediante RT-PCR

Figura 8: Modelo tridimensionales de ANXA9 humana

Figura 9: Modelo tridimensionales de ANXA10 humana

Figura 10. Análisis inmunohistoquímico de anexinas A9 (ANXA9) y A10 (ANXA10) expresión en carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) muestras de tejido.

Figura 11: Expresión de las proteínas ANXA9 y ANXA10 en muestras de CCC según el grado de diferenciación.

Figura 12. Análisis de la expresión del ARNm de ANXA9 y ANXA10 utilizando datos RNAseq de las cohortes de cáncer de cabeza y cuello del TCGA.

Figura 13: Curvas de supervivencia específica para la enfermedad en función de la localización tumoral (A), clasificación T (B), clasificación N (C) y estadio tumoral (D).

Figura 14: Curvas de supervivencia libre de enfermedad de los pacientes en función de la expresión de la ANXA9 en la serie global (A), en los casos de orofaringe (B), de hipofaringe (C), y de laringe (D).

FIGURA 15: Curvas De Supervivencia Libre De Enfermedad De Los Pacientes En Función De La Expresión De La Anxa10 En La Serie Global (A), En Los Casos De Orofaringe (B), De Hipofaringe (C), Y De Laringe (D).

TABLAS

Tabla 1: Relación de los cambios de expresión de las anexinas en diferentes tipos de tumores.

Tabla 2. Resumen de las características clinicopatológicas de los pacientes con carcinomas epidermoides de cabeza y cuello

Tabla 3: Relación entre la expresión de ANXA9 y ANXA10 y parámetros clinicopatológicos en casos VPH-negativos

Tabla 4: Relación entre la expresión de las anexinas A9 y A10 con las recidivas tumorales

ABREVIATURAS

Anexina humana (ANXA)

Anexina A9 (ANXA9)

Anexina A10 (ANXA10)

Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (CECC)

Vías aerodigestivas superiores (VAS)

virus del papiloma humano (VPH)

Punción aspiración con aguja fina (PAAF)

receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

receptor de muerte celular programada-1 (PD-1; Programmed Death-1)

ligando PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1)

metástasis a distancia (MD)

análisis de la secuencia expresada (ESTs)

Hibridación genómica comparativa (CGH)

Virus del papiloma humano (VPH)

Metástasis a distancia (MD)

Análisis de la secuencia expresada (ests)

Copia DNA (cDNA)

Banco de datos (dbest)

Análisis en serie de la expresión génica (SAGE).

Carcinoma hepatocelular (HCC)

Alfafetoproteína (AFP)

La hepatitis B (VHB)

Hormona tiroidea (TH).

El tejido linfoide asociado al intestino (GALT)

Placas de Peyer (PP)

Epitelio asociado a los folículos (FAE)

Colitis ulcerosa (CU)

PCR en tiempo real (qPCR)

Colitis ulcerosa (CU)

Carcinoma in situ (CIS)

Carcinomas epidermoides orales (OSCC)

líneas celulares de cáncer de mama (MCF7)

Bases de datos de secuencias expresadas (ESTs)

Leucemia mieloide aguda (LMA)

Tiroxina (T4)

Hibridación in situ fluorescente (FISH)

Matrices tisulares (*tissue arrays*, TMA)

Cadena de polimerasa (PCR)

Línea celular derivada de hepatocarcinoma humano (HepG2)

Adenocarcinoma esofágico (AE)

Carcinoma escamoso esofágico (ESCC)

Esófago de Barrett (EB)

Carcinomas hepatocelulares (CHC)

Pólipos serrados/sésiles (SSA / Ps)

Pólipos hiperplásicos microvesiculares (MVHP)

carcinomas colorrectales esporádicos (CCR)

inestabilidad de microsatélites (MSI-H)

adenocarcinoma de páncreas (PDAC)

Neoplasia intraepitelial pancreática (PanIN)

Pancreatitis crónica (CP)

Neoplasia mucinosa papilar intraductal (IPMN)

Cáncer de vejiga(CV)

1. INTRODUCCIÓN

1.1.1 Epidemiología

El carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (CECC) es el sexto tumor más frecuente en el mundo ¹; cada año se diagnostican aproximadamente medio millón de nuevos casos de CECC, que viene a representar entre el 5-10% de todos los tumores malignos. El cáncer de cabeza y cuello representa más de 380,000 muertes al año en todo el mundo. En Europa, en 2012, hubo aproximadamente 250,000 casos y 63,500 muertes debido a malignidad en esta área². La mayoría de los tumores de cabeza y cuello se originan en las vías aerodigestivas superiores (VAS), siendo el órgano más afectado la laringe (50%), seguido de la cavidad oral (30%) y faringe (10-15%), mientras que el resto de localizaciones son excepcionales. Dentro de la laringe predomina la localización supraglótica (70%), mientras que los glóticos son menos frecuentes (30%) y los subglóticos muy raros. En la faringe destacan orofaringe e hipofaringe, con una incidencia similar, mientras que los tumores de rinofaringe son escasos.

Los CECC son tumores de predominio masculino (95%), con una edad media entre los 60 y 70 años, aunque la edad de aparición en laringe y faringe disminuye en pacientes inmunodeprimidos³.

1.1.2 Etiología

La etiología del CECC es desconocida, pero existen factores ambientales y genéticos relacionados con su aparición. El consumo de tabaco presenta una más que demostrada relación dosis-efecto, con un riesgo 6-15 veces superior de padecer CECC en fumadores. El consumo de alcohol también se asocia a este tipo de tumor, sobre todo en cavidad oral, faringe y supraglotis, y potencia el efecto del tabaquismo ⁴.

El virus del papiloma humano (VPH) se ha relacionado con el desarrollo de tumores malignos orofaríngeos siendo los isotipos más comunes en CECC 16 y 18⁵. La integración del ADN vírico en las células epiteliales produce la sobreexpresión de las proteínas E6 y E7 que inactivan los genes supresores p53 y Rb, que favorece la progresión maligna⁶.

El CECC no se considera un tumor hereditario, aunque sí se han observado antecedentes familiares en casi el 50% de los casos, sobre todo en asociación a neoplasias pulmonares. Esta predisposición se relaciona con una mayor susceptibilidad a los carcinógenos ambientales al tener reducida su capacidad genética para reparar el ADN.

1.1.3 Clínica y diagnóstico.

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

El diagnóstico se basa en la inspección por visión directa o fibroendoscopio y mediante palpación cervical, complementándose con pruebas de imagen (TAC, RMN, PET) que permiten conocer la extensión tumoral e identificar la presencia de adenopatías sospechosas.

El estudio histopatológico es imprescindible para el diagnóstico definitivo, ya que permite conocer la estirpe y planificar el tratamiento. Se obtiene mediante biopsias del

tumor primario o 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 fiables⁷.

1.1.4 Estadificación

El sistema TNM se utiliza como clasificación uniforme y consensuada de los CECC, se basa en el tamaño (T) y extensión tumoral, la presencia de adenopatías (N) y metástasis a distancia (M)⁸; es muy útil para estandarizar resultados terapéuticos y comparar estudios. Sin embargo, se basa únicamente en información anatómica, y está limitado para establecer el resultado y pronóstico individual del paciente, pues no contempla valores como la respuesta inmunitaria, agresividad intrínseca del tumor, estado general del paciente, etc. Se estudia incluir nuevos criterios, factores biológicos y ambientales que permitan mejorar el poder predictivo de TNM⁹

1.1.5 Tratamiento

La cirugía es el método terapéutico de elección en la mayoría de los CECC, tanto del tumor como de las metástasis ganglionares. La resección del tumor se realiza con márgenes amplios para conseguir unos márgenes libres, 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 selectivo. Una manera de indicar el vaciamiento de forma personalizada sería mediante la técnica del ganglio centinela, tan utilizado en tumores de otras localizaciones; sin embargo la mayoría de los CECC no son susceptibles de esta técnica y sólo zonas muy accesibles como la cavidad oral se benefician actualmente de su empleo¹⁰.

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 bordes afectados o dudosos, metástasis ganglionares (N2+) o rotura capsular.

La quimioterapia tiene interés, en combinación con la radioterapia, en los protocolos de conservación de órgano, que se presentan ante pacientes muy seleccionados como alternativa a la cirugía en grandes tumores que precisan técnicas muy agresivas y en los pacientes con importante diseminación metastásica. Estas terapéuticas no quirúrgicas están obteniendo muy buenos resultados¹¹, e incluso algunos han demostrado reducir el desarrollo de metástasis a distancia (MD)¹², pero tienen asociados importantes efectos secundarios, que incluso limitan el perfil de paciente seleccionado, que precisa de un estadio clínico y analítico adecuado para soportar el tratamiento.

En los últimos años y gracias a un mayor conocimiento de la biología molecular de los CECC se ha introducido la terapia con fármacos biológicos, tipo anticuerpos monoclonales e inhibidores tirosin-quinasa. El uso de estos fármacos, en combinación

con los tratamientos previamente descritos, ha demostrado mejoras en el control local y la supervivencia libre de enfermedad, pero un escaso aumento de la supervivencia global¹³.

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) se sobre-expresa en hasta el 90% de las lesiones CECC y se asocia con un resultado clínico desfavorable. Las terapias dirigidas anti-EGFR han demostrado ser efectivas en una variedad de modelos preclínicos de CECC. El cetuximab, un anticuerpo monoclonal IgG1 humanizado contra el dominio extracelular de EGFR, prolongó la mediana de supervivencia global y redujo la progresión de la enfermedad en pacientes con CECC avanzados como parte de terapias combinadas con radiación y quimioterapia. En base a estos hallazgos, cetuximab obtuvo la aprobación de la Administración de Drogas y Alimentos de EE. UU. Para su uso junto con radiación o como agente único en pacientes que no respondieron a la terapia basada en platino, y en CECC recurrente o metastásico en combinación con quimioterapia estándar¹⁴¹⁵.

Sin embargo, la respuesta general aumentada de la adición de cetuximab a la radiación y / o quimioterapia es de aproximadamente 10% a 20% mucho más baja que la esperada inicialmente, considerando el alto nivel de expresión de EGFR en CECC.

La FDA ha aprobado recientemente para pacientes con CECC dos anticuerpos monoclonales dirigidos al receptor de muerte celular programada-1 (PD-1; del inglés Programmed Death-1), los cuales inhiben su unión con su ligando PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1). La vía PD-1/PD-L1 es un punto de control inmune importante que se ha establecido como un objetivo eficaz en CECC. El nivolumab, se ha aprobado para el tratamiento del CECC recurrente y / o metastásico refractario al platino en fase III con

tasa de respuesta 14%–32%¹⁶. Y el pembrolizumab, fase II, ha demostrado una actividad antitumoral robusta y un perfil de seguridad manejable en múltiples tipos de tumores, y actualmente está aprobado para una o más neoplasias avanzadas, incluso en EE. UU. para pacientes con CECC recurrente o metastásico con progresión de la enfermedad en o después de quimioterapia con platino. La tasa de respuesta global es del 19% (intervalo de confianza del 95%, 7% -39%).^{17,18}

Existe una necesidad urgente de desarrollar nuevas estrategias efectivas para prevenir y tratar CECC. En esa dirección, comprender la contribución de las alteraciones genómicas que impulsan el inicio y la progresión de CECC puede ayudar a explorar nuevas opciones terapéuticas, como por ejemplo estrategias hacia mTOR.¹⁹

1.1.6 Pronóstico

A pesar de los avances en diagnóstico y tratamiento de las últimas décadas, la supervivencia de los pacientes afectados de CECC no ha experimentado grandes cambios. La mayoría de las defunciones se deben a recidivas loco-regionales durante los primeros años. También es frecuente la aparición de segundos tumores sincrónicos o metacrónicos en VAS, esófago o pulmón (10-40%). Otra importante causa de muerte se asocia al pobre control en el desarrollo de enfermedad metastásica a distancia. Las metástasis a distancia (MD) ocurren en el 10-20% de los pacientes con CECC^{20, 21}; y se cree que esta incidencia aumentará en el futuro²².

Aunque las nuevas técnicas diagnósticas han mejorado la detección de las metástasis en la evaluación inicial; estas aparecen durante el seguimiento de los pacientes. El 50% de las MD se detectan clínicamente en los primeros nueve meses de tratamiento; y el 80% dentro de los primeros dos años²³.

La aparición de MD implica importantes consecuencias para el paciente, ya que empobrece mucho la supervivencia, y será necesario la combinación efectiva de un tratamiento local y un tratamiento sistémico adyuvante, con la asociada toxicidad a corto y largo plazo que ello supone.

Se han identificado algunas características clínico-patológicas que se relacionan con mayor o menor incidencia de MD. Los factores de riesgo más comúnmente identificados son: localización primaria, estadio avanzado, edad joven, y sobre todo, la presencia de adenopatías y la extensión extracapsular^{24,25,26,27}; en pacientes con múltiples adenopatías metastásica, especialmente más de 3 y bilaterales, el riesgo de desarrollar MD es mayor al 50%^{28,29}. Pero estos factores clínicos han demostrado ser poco precisos y eficaces para evaluar el riesgo de cada paciente de manera individualizada, pues menos del 50% de este grupo tendrá MD.

CARCINOGENESIS

El desarrollo carcinogénico es un proceso multietapa en que la célula va acumulando mutaciones para adquirir las funciones biológicas necesarias para promover el crecimiento y desarrollo tumoral. Clásicamente se describen seis funciones biológicas adquiridas durante varios pasos³⁰ (Figura 1):

- Mantenimiento de las señales de proliferación
- Bloqueo de señales supresoras
- Resistencia a la apoptosis
- Inmortalidad replicativa
- Inducción de angiogénesis

- Activación de invasión y metástasis ¹³

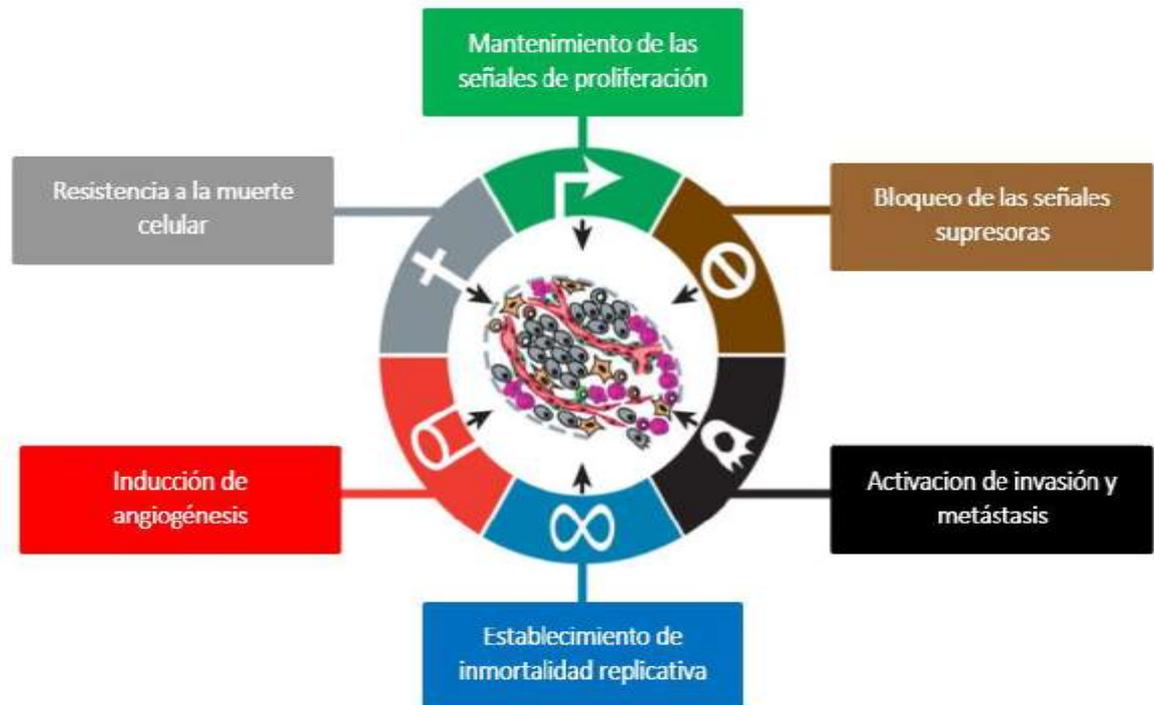


Figura 1: Capacidades biológicas clásicas de las células tumorales

(Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000; 100:57-70)

Y durante la última década este modelo se ha revisado añadiendo otras características emergentes³¹ (Figura 2):

- Evasión de la respuesta inmunológica
- Reprogramación del metabolismo energético
- Inestabilidad genómica
- Activación de fenómenos inflamatorios

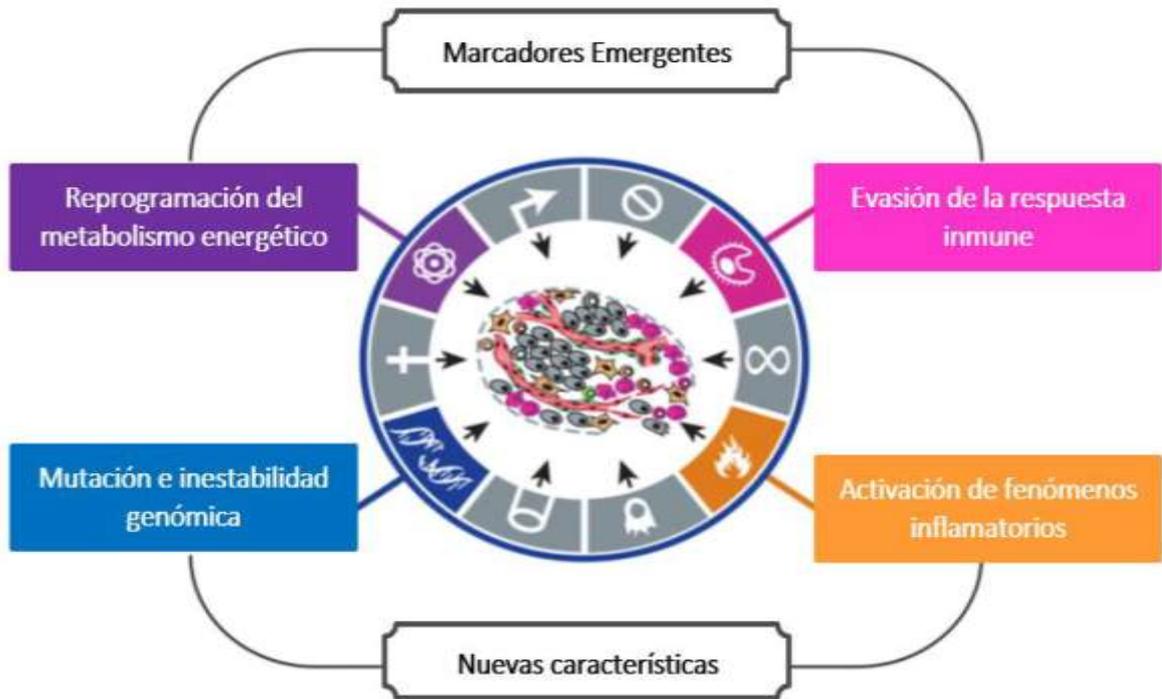


Figura 2: Capacidades biológicas emergentes de las células tumorales

(Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011; 144:646-74).

2. ANEXINAS:

2.1.1 Generalidades de las anexinas

El nombre ANEXINA se deriva del griego anexo, que significa "traer / mantener juntos" y se eligió para describir la propiedad principal de todas o al menos casi todas las anexinas, es decir, la unión y posible unión de ciertas estructuras biológicas, en particular las membranas. El nombre también tiene un sabor algo histórico, ya que tiene en cuenta el hecho de que varios de los grupos que, independientemente el uno del otro, descubrieron anexinas, estaban en busca de ese andamiaje o puente de proteínas. Sin embargo, inicialmente, es decir, en la fecha de sus descubrimientos a fines de la década de 1970 y principios de la de 1980, las anexinas recibieron nombres diversos y no relacionados que se referían a sus propiedades bioquímicas³².

Las anexinas son una superfamilia de proteínas que se caracterizan por unirse o anexionarse a fosfolípidos en presencia de calcio. Poseen una única estructura que les permite anclarse a las membranas de una forma periférica y reversible. El conservado módulo de unión a calcio y membrana es el dominio "core" de la anexina, el cual consiste en cuatro hélices repetidas, cada una de las cuales tiene 70 residuos de longitud³³.

Es una hélice α que forma un compacto y ligeramente curvado disco que tiene una superficie convexa, que posee el sitio de unión al calcio y membrana, y una cóncava que apunta hacia fuera de la membrana y sirve para otros tipos de interacción/regulación (Figura 4)^{33,32}. La región N-terminal precede al dominio "core" y es variada en secuencia y longitud. Media interacciones reguladoras con sus proteínas ligando y regula la asociación anexina-membrana

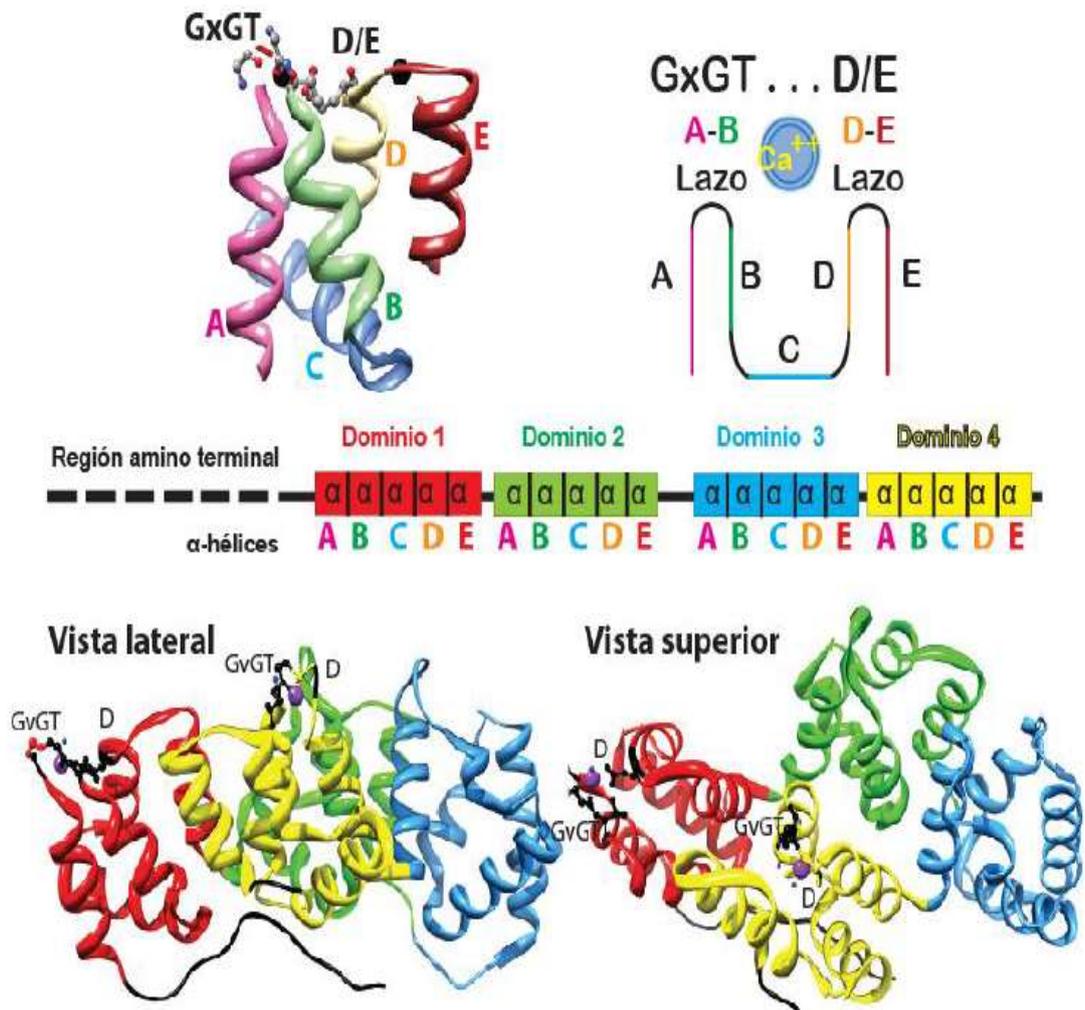


Figura 3: Estructura típica de una molécula de anexina³⁴.

En la parte superior se muestra el dominio típico anexina formado por cinco hélices α en cintas de colores y el motivo tipo II de unión a calcio (localizado en las regiones interhélice) representado por esferas y varillas. Se incluye una representación esquemática de la disposición de las hélices α y su implicación en la interacción con el ión calcio. En el medio se representa de forma lineal la estructura de una anexina típica en la que se observa la región amino (en trazo discontinuo negro) y la región carboxilo constituida por cuatro dominios formados cada uno por cinco hélices α (representadas en cuadritos). En la parte inferior se muestran una vista lateral y superior de la molécula entera, en este caso de la anexina A5, con el extremo amino representado en negro, el carboxilo en cintas de distintos colores (dominio 1-rojo, dominio 2- verde, dominio 3-azul y dominio 4-amarillo) destacando con esferas y varillas los aminoácidos responsables de la interacción con los átomos de calcio que ocupan los sitios de unión tipo II y tipo III de los dominios 1 y 2 en esferas moradas. Tomado de: Sopkova, J., Gallay, J., Vincent, M., Pancoska, P. & Lewit-Bentley, A. The dynamic behavior of annexin V as a function of calcium ion binding: a circular dichroism, UV absorption, and steady-state and time-resolved fluorescence study. *Biochemistry* **33**, 4490–9 (1994).

La secuencia consenso de los sitios tipo II de unión a calcio se encuentra altamente conservada en la mayoría de las anexinas, siendo las excepciones más llamativas los casos de las anexinas A9 y A10. Ambas presentan alteraciones puntuales de la secuencia consenso en cada uno de los 4 dominios, con excepción de la repetición 2 de la anexina A9 en peces y de la anexina A10 en mamíferos³⁵. En las demás especies, estas anexinas han perdido por completo la estructura y funcionalidad de los sitios tipo II de unión a calcio y se estima que en conjunto, una tercera parte del total de estos motivos se ha perdido en algunos dominios de las 150 subfamilias que comprenden la superfamilia³⁶.

Los 12 genes de anexinas humanas (familia A) comprenden un rango de tamaño que va desde las 15 Kb (ANXA9) a las 96 Kb (ANXA10) y se encuentran localizados a lo largo de todo el genoma (Figura 5) en los cromosomas 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10 y 15³⁷. Los mapas genéticos de las anexinas humanas demuestran que los 12 genes humanos están repartidos en esos 8 cromosomas (Figura 5), una dispersión que también ocurre en muchas otras especies.

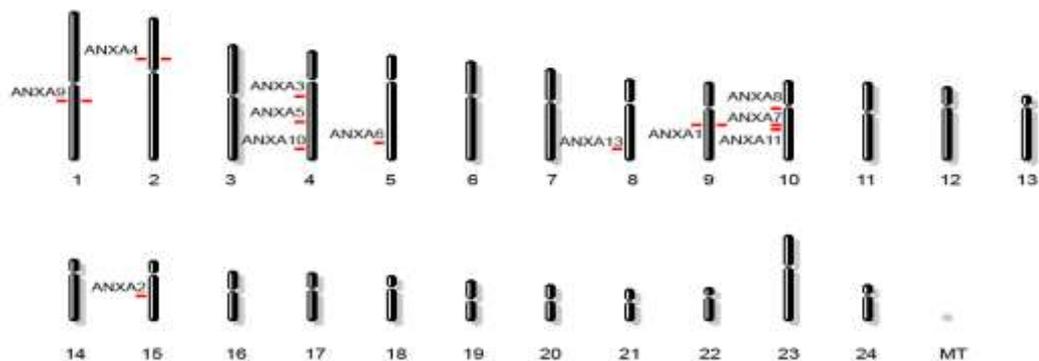


Figura 4. Localización cromosómica de las anexinas humanas. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). MT: mitocondrial.

2.1.2.-Tipos de anexinas

La familia de las anexinas comprende más de 500 productos génicos expresados en la mayoría de las especies³⁸. En los vertebrados, 12 subfamilias de anexinas (A1-A11 y la A13), con sus diferentes variantes, han sido identificadas. Tienen distintos dominios N-terminal y posicionadas de diferente forma las uniones de calcio y de membrana dentro del dominio “core”. El análisis de las propiedades bioquímicas y localizaciones subcelulares de las anexinas, y estudios posteriores de los efectos de anticuerpos anti-anexinas y anexinas mutantes, principalmente en sistemas celulares permeabilizados, han permitido que varias potenciales funciones fisiológicas hayan sido asignadas a las diferentes anexinas.

Debido a la variabilidad en longitud y secuencia del extremo amino, las anexinas se pueden clasificar en función a su longitud. De esta manera podemos hablar de un grupo de anexinas con una extensión de la región amino inferior a 20 aminoácidos (ANXA3, A4, A5, A6, A10 y A13a), un segundo grupo constituido por las anexinas con una región amino terminal de longitud intermedia entre 33 y 47 aminoácidos (ANXA1, A2, A9 y A13b) y finalmente un grupo con un extremo amino largo con más de 100 aminoácidos (ANXA7 y A11).

2.1.3.- Funciones de las anexinas

Se ha propuesto que actúan como mediadores de las uniones membrana-membrana o membrana-citoesqueleto y por ello han sido implicadas en procesos de exocitosis regulada por calcio, en ciertos aspectos sobre la endocitosis, y en la estabilización de dominios específicos de organelas de membrana y de la membrana

plasmática. Sin embargo, otras potenciales funciones han sido propuestas; por ejemplo, aquellas que implican a la capacidad de unión al ARN de algunas anexinas³⁹, la regulación de su localización nuclear⁴⁰ o actividades específicas de unión a nucleótidos. Debido a que algunas anexinas se localizan extracelularmente, podrían también funcionar fuera de la célula, aunque su secreción (directa o indirecta) no es bien conocida.

La característica bioquímica principal de las anexinas es su unión regulada por calcio a la periferia de las membranas que contienen fosfolípidos. Esto puede permitirles organizar la interacción del citoplasma (o citoesqueleto) y la cara citoplasmática de las membranas celulares.

Los lugares en los que se ensambla la actina en las membranas celulares han sido identificados en distintos sistemas celulares como puntos en los cuales las anexinas son específicamente reclutadas. Por ejemplo, en las membranas de las células musculares lisas la organización de los microdominios en balsas (del inglés “raft”: áreas de membrana ricas en glicoesfingolípidos y colesterol resistente a la extracción con Triton X-100 en frío) o no-balsas (“non-raft”: ricas en glicerofosfolípidos) es regulada por la anexina A2 y la A6. Ambas se asocian con los dominios en balsas y parece que median la interacción con el citoesqueleto⁴¹. Otras estructuras que aportan ejemplos de reclutamiento de anexinas a áreas de membrana asociadas a actina son las uniones adherentes endoteliales (las cuales emplean anexinas A2, junto con la Tirosina fosfatasa Shp2, en una forma dependiente de colesterol) y las uniones adherentes epiteliales (en las cuales la anexina A2 se asocia con complejos que poseen Rac1 y las moléculas de adhesión CEACAM⁴²). En células epiteliales polarizadas, la anexina A2 y su proteína ligando intracelular S100A10 son la diana de las uniones apicales ricas en actina, donde su función, en un complejo con

la gran proteína AHNAK, es organizar la porción cortical del citoesqueleto durante la polarización⁴³. Además, la anexina A2 se localiza en dominios de membrana altamente dinámicos que sirven de plataformas de ensamble de la actina-F. Estos incluyen sitios accesorios para el enteropatógeno no invasivo *Escherichia coli*, la cual manipula el citoesqueleto de la célula huésped para formar pedestales ricos en actina debajo de la bacteria adherida, y también los puntos de contacto actina-F de la membrana de los pinosomas, los cuales se emplean para el movimiento intracelular⁴⁴. En el último caso, la expresión de una anexina A2 mutante dominante-negativa anula la formación de los pinosomas móviles, aportando una fuerte evidencia del rol de la proteína en el ensamble de la actina en determinados sitios de la membrana.

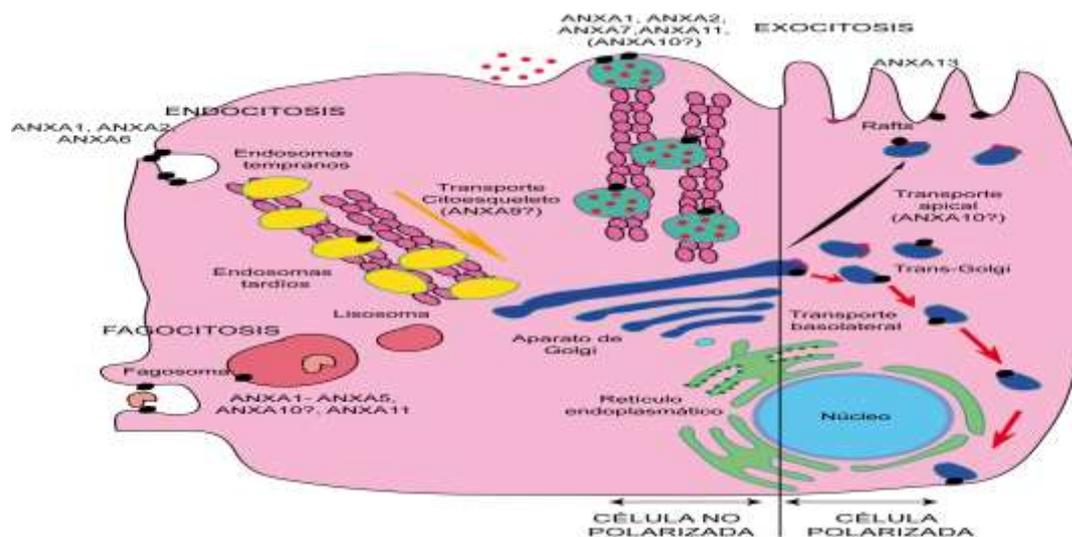


Figura 5. Representación esquemática de los procesos de tráfico de membranas en los que participan algunas anexinas. Se muestran en la figura ejemplos de anexinas de las cuales se dispone de evidencias experimentales a favor de su implicación en procesos de endocitosis y exocitosis. La interacción de las anexinas con el citoesqueleto mediante su asociación a vesículas puede jugar un papel importante en la organización de subdominios de membrana y en el transporte de vesículas de la región trans-Golgi a la membrana plasmática y viceversa.⁴⁵

2.1.4 Las Anexinas como herramientas de diagnóstico para enfermedades humanas.

Aunque no existe evidencia directa que implique a ningún miembro individual de la familia de las anexinas como un gen causante de enfermedad, en ciertas condiciones clínicas, los cambios en los niveles de expresión de la anexina o la localización pueden contribuir a la progresión de la enfermedad. De esta forma, las anexinas están indirectamente relacionadas con algunas de las patologías humanas más graves, incluidas las enfermedades cardiovasculares y el cáncer.

A pesar de la gran cantidad de datos experimentales, en el caso de estas "anexinopatías", la traducción de los resultados científicos en conceptos terapéuticos está en estadios iniciales, mientras tanto, la importancia de las anexinas como herramienta diagnóstica se está reconociendo cada vez más. Por lo tanto, la capacidad de las anexinas para responder a las alteraciones del entorno celular relacionadas con la enfermedad y el estrés y restaurar la homeostasis intracelular hace que esta familia de proteínas sea importante⁴⁶.

Estas descripciones adquieren real importancia dado los roles de las anexinas individuales en la tumorigenesis. Las anexinas tienen una variedad de funciones celulares, incluida la participación en las vías de señalización celular, la proliferación celular y la apoptosis. Actualmente los cambios en la expresión de las anexinas, excepto la anexina A9 y la anexina A13, se han observado en tipos individuales de cáncer, lo que implica las anexinas y cambios en su expresión en el desarrollo y progresión tumoral (Figuras 6 y 7; Tabla 1)^{47,46}.

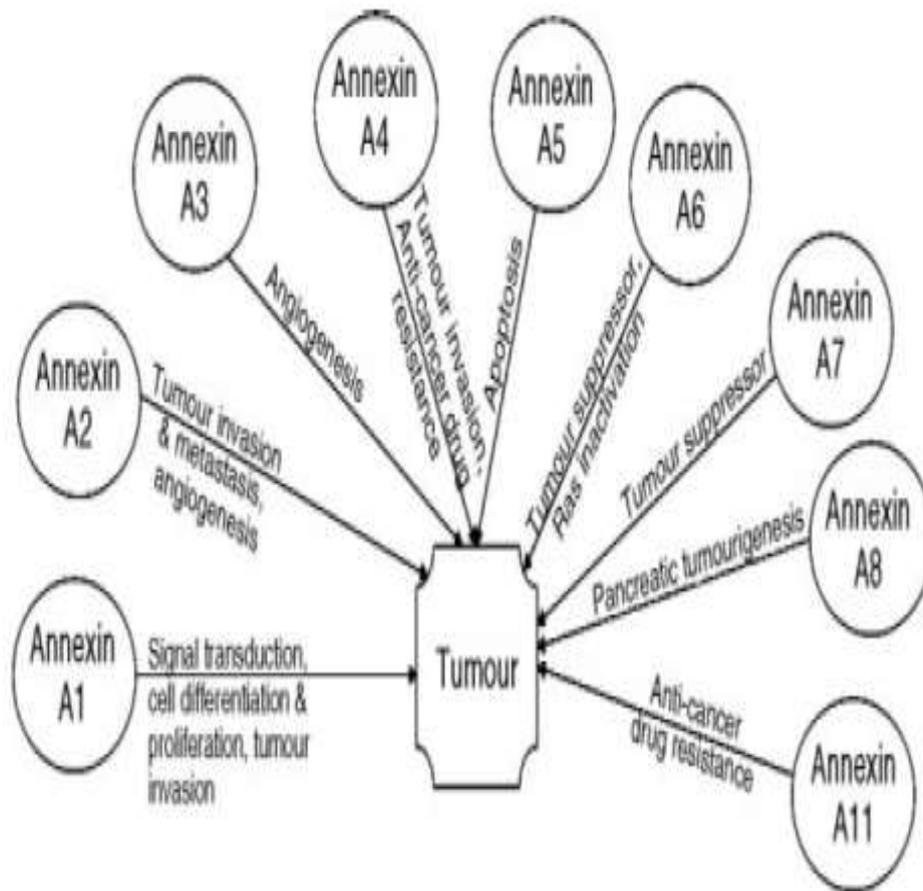


Figura 6: Roles de las anexas individuales en la tumorigenesis.

Tomado de: Mussunoor, S. & Murray, G. I. The role of annexins in tumour development and progression. *Journal of Pathology* **216**, 131–140 (2008).

Tabla 1: Relación de los cambios de expresión de las anexas en diferentes tipos de tumores. ^{47,45}.

Anexinas	Expresión aumentada	Expresión disminuida
A1	Adenocarcinoma de esófago Adenocarcinoma de estómago Adenocarcinoma colorectal Adenocarcinoma de páncreas Carcinoma de riñón Hepatocarcinoma Adenocarcinoma de pulmón Leucemia linfoide	Adenocarcinoma de próstata Carcinoma escamoso de esófago Carcinoma escamoso de cabeza y cuello Carcinoma de mama Carcinoma de cérvix (Wang y col., 2008)
A2	Adenocarcinoma de estómago Adenocarcinoma colorectal Adenocarcinoma de páncreas Carcinoma de riñón Glioma Hepatocarcinoma	Adenocarcinoma de próstata
A3	Carcinoma colorectal Adenocarcinoma de próstata Cáncer de ovario (Yan y col., 2010)	
A4	Adenocarcinoma colorectal Carcinoma de riñón Cáncer de ovario (Miao y col., 2009)	Carcinoma de próstata
A5	Carcinoma de cabeza y cuello (Melle y col., 2003)	
A6	Melanoma	
A7	Adenocarcinoma de mama Glioma	Adenocarcinoma de próstata
A8	Adenocarcinoma de páncreas Leucemia promielocítica aguda	Adenocarcinoma de mama
A9		Carcinoma escamoso de cabeza y cuello (Resultados preliminares del grupo)
A10		Carcinoma de hígado Carcinoma gástrico (Kim y col., 2009)
A11	Adenocarcinoma colorectal	Carcinoma de próstata Cáncer de ovario

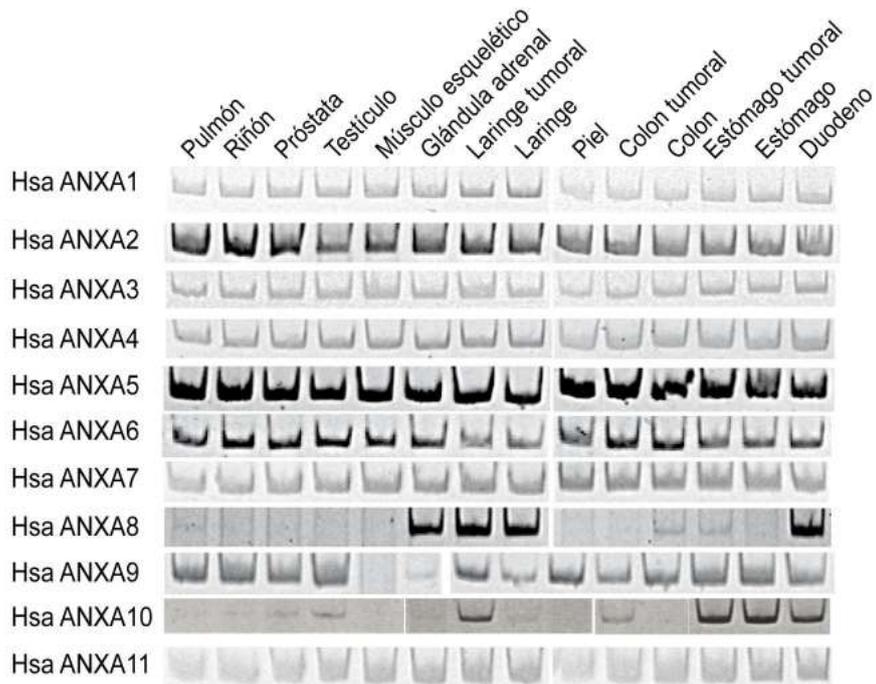


Figura 7: Análisis de la expresión génica de las anexinas humanas en diferentes tejidos, mediante RT-PCR.⁴⁵

García, M. Anexinas - Evolución Molecular, Predicción de Nuevos Motivos Funcionales y Estudios Experimentales de Modelos Atípicos TESIS DOCTORAL. Universidad de Oviedo (2011).

2.2.-ASPECTOS GENERALES DE LA ANEXINA A9.

La Anexina A9 (ANXA9) es un miembro de superfamilia de las anexinas; su gen fue primero identificado por el análisis de la secuencia expresada (ESTs) en copias del cDNA del dbEST del hígado/ bazo fetales ³⁸. Conocida también con los siguientes sinónimos: annexin-9, annexin-31, annexin XXXI, pemphaxin; se localiza en 1q21, y su masa molecular (número de aminoácidos) es de 38 364 Da (345)⁴⁷.

La comparación de las secuencias reveló que el más cercano homólogo a la anexina A9 es la anexina A2 ,con una semejanza que alcanza aproximadamente el 40% a nivel de la proteína ⁴⁴. Este descubrimiento hace de la ANXA9 un objeto interesante para estudios bioquímicos y moleculares ⁴⁸.

La anexina A9 humana se localiza en la capa de piel más queratinizada y externa, en el túbulo contorneado distal de riñón y en células de mama, pudiendo ser buenos modelos de estudio con importancia funcional y presentando importantes diferencias en comparación con otras anexinas. La anexina A9 se localiza en el citoplasma celular y presenta una destacada localización con proteínas marcadoras de citoesqueleto (queratinas y tubulinas), pudiendo sugerir un papel en procesos de tráfico de membranas y/o dinámica del citoesqueleto. La anexina A9 presenta en regiones accesibles motivos “KGD” precedidos por regiones ricas en aminoácidos básicos e hidrofóbicos, siendo estos motivos “KGD” dianas de la señalización, responsables de la morfología fibrilar observada en experimentos de mutagénesis y transfección celular ⁴⁹.

La anexina A9 humana, que procede de una duplicación génica de la anexina A2, presenta la pérdida completa de los cuatro sitios tipo II de unión a calcio mediante selección evolutiva y también presenta en zonas adyacentes y accesibles a posibles ligandos, motivos “H/R/KGD” y regiones con una concentración de carga negativa (parches) en su superficie (Figura 9) ⁵⁰.

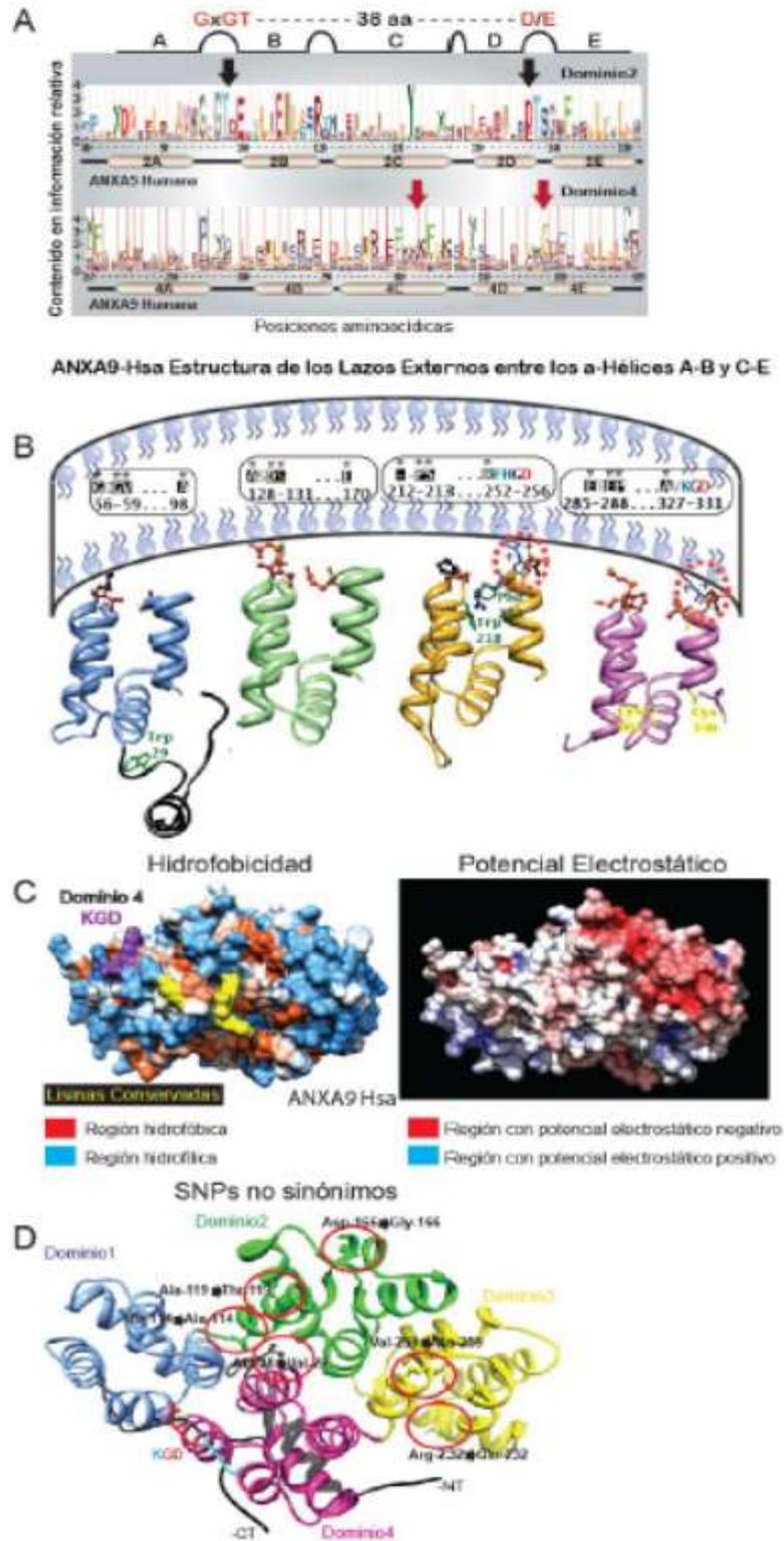


Figura 9: Modelo tridimensionales de ANXA9 humana.

Figura 8: Estructura de la ANXA9

Panel A: comparación de los pHMM del cuarto dominio de las anexinas humanas ANXA5 y ANXA9 donde se destaca, con flechas negras, la importancia funcional de los motivos

de unión calcio “GxGT...38 residuos...E/D” y con flechas rojas el motivo “KGD” precedido por una región rica en residuos de lisina.

Panel **B**: modelos de mecanismos de interacción con ligandos con la representación tridimensional, con cintas, de los cuatro dominios anexina de ANXA9 humana por separado en vista lateral, destacando los residuos aminoacídicos, representados con esferas y bastones, responsables de posibles interacciones y los motivos “R/H/KGD” representados en bastones y círculo rojo de trazo discontinuo.

Panel **C**: análisis de la topología de la superficie de ANXA9 humana con la identificación de regiones con interés funcional basado en sus propiedades de hidrofobicidad y de potencial electrostático.

Panel **D**: vista superior del modelo estructural de la ANXA9 humana representado con cintas y destacando las mutaciones de un nucleótido (SNPs) no sinónimas en bastones y esferas con un círculo rojo de trazo continuo.

García, M. Anexinas - Evolución Molecular, Predicción de Nuevos Motivos Funcionales y Estudios Experimentales de Modelos Atípicos TESIS DOCTORAL. *Universidad de Oviedo* (2011).

2.3-ASPECTOS GENERALES DE LA ANEXINA A10.

La anexina A10 (ANXA10) es una relativamente nueva adición a la familia de las anexinas. La A10 se identificó en 1999 a partir del análisis informático de secuencias expresadas (ESTs) presentes en el correspondiente banco de datos (dbEST) mediante la comparación con las secuencias de todas las subfamilias conocidas hasta entonces. Las ESTs humana y murina, secuenciadas totalmente, procedían de fibroblastos embrionarios de pulmón, para el caso de la anexina A10 humana, mientras que la de ratón procedía de una genoteca embrionaria total. A partir de las secuencias de nucleótidos de estos cDNAs se dedujeron las secuencias proteicas correspondientes. El grado de identidad nucleotídica (86,9%) y aminoacídica (89,2%) entre la secuencia humana y murina confirmó que se trataba de ortólogos del mismo gen, que se denominó anexina A10 siguiendo las nuevas normas de nomenclatura ³⁶.

El gen de la Anexina A10 se encuentra en el cromosoma 4q33, y su masa molecular (cantidad de aminoácidos) es de *37 278 Da (324)*.⁴⁷

La estructura primaria de esta anexina resulta atípica al carecer de los 4 sitios tipo II de unión a calcio, conservando únicamente el de la repetición 2 de la tétrada en mamíferos euterios y metaterios. Esta característica podría tener consecuencias en las propiedades de agregación y asociación a membranas que pueda presentar esta proteína, si bien la retención de un único motivo de unión a calcio en la repetición 2 puede tener un significado especial en la capacidad de unión a membranas ⁵¹.

Los 20 primeros aminoácidos en esta proteína de 37 kDa forman el extremo amino, por lo que podríamos clasificar la anexina A10 dentro del grupo de anexinas que presentan un extremo amino relativamente corto, pero ligeramente hidrofóbico (Phe-2)

y potencialmente reactivo (Cys-3). Otra diferencia es que el punto isoeléctrico (pI) de esta anexina es de 5.4, ligeramente más ácido que el correspondiente a la mayoría de anexinas humanas y de ratón (pI= 5.95 \pm 0.85). La composición aminoacídica general de esta proteína presenta diferencias notables con respecto a otras anexinas, como son un bajo contenido en Glu, Ser y Thr y un alto contenido en His, Asn y Pro, que afectarían a su estabilidad conformacional, y en Trp, Phe y Met que podrían desempeñar una importante función en la interacción con membranas. La anexina A10 humana que conserva sólo un sitio tipo II de unión a calcio en el dominio 2 (o ninguno en al menos 6 mamíferos) pero posee en su lugar en los dominios 1, 3 y 4, en los lazos interhélice, aminoácidos como por ejemplo fenilalanina, triptófano y un número elevado de residuos de cisteína en su secuencia. Estos aminoácidos, debido a sus características fisicoquímicas (hidrofóbica, aromática y de gran tamaño) o a su disposición tridimensional, junto con el hecho de estar localizados en zonas accesibles de la molécula, pueden definir nuevos mecanismos de interacción de estas anexinas atípicas con ligandos intra o extracelulares. La importancia de los residuos de Cys reside principalmente en que podrían participar activamente formando enlaces covalentes por puentes disulfuro dependiendo del estado de óxido-reducción celular. Los aminoácidos como Trp y Phe (aminoácidos aromáticos) serían capaces de alterar la hidrofobicidad y mediante resonancia electrónica favorecerían la interacción con lípidos dentro de la membrana ⁵⁰.

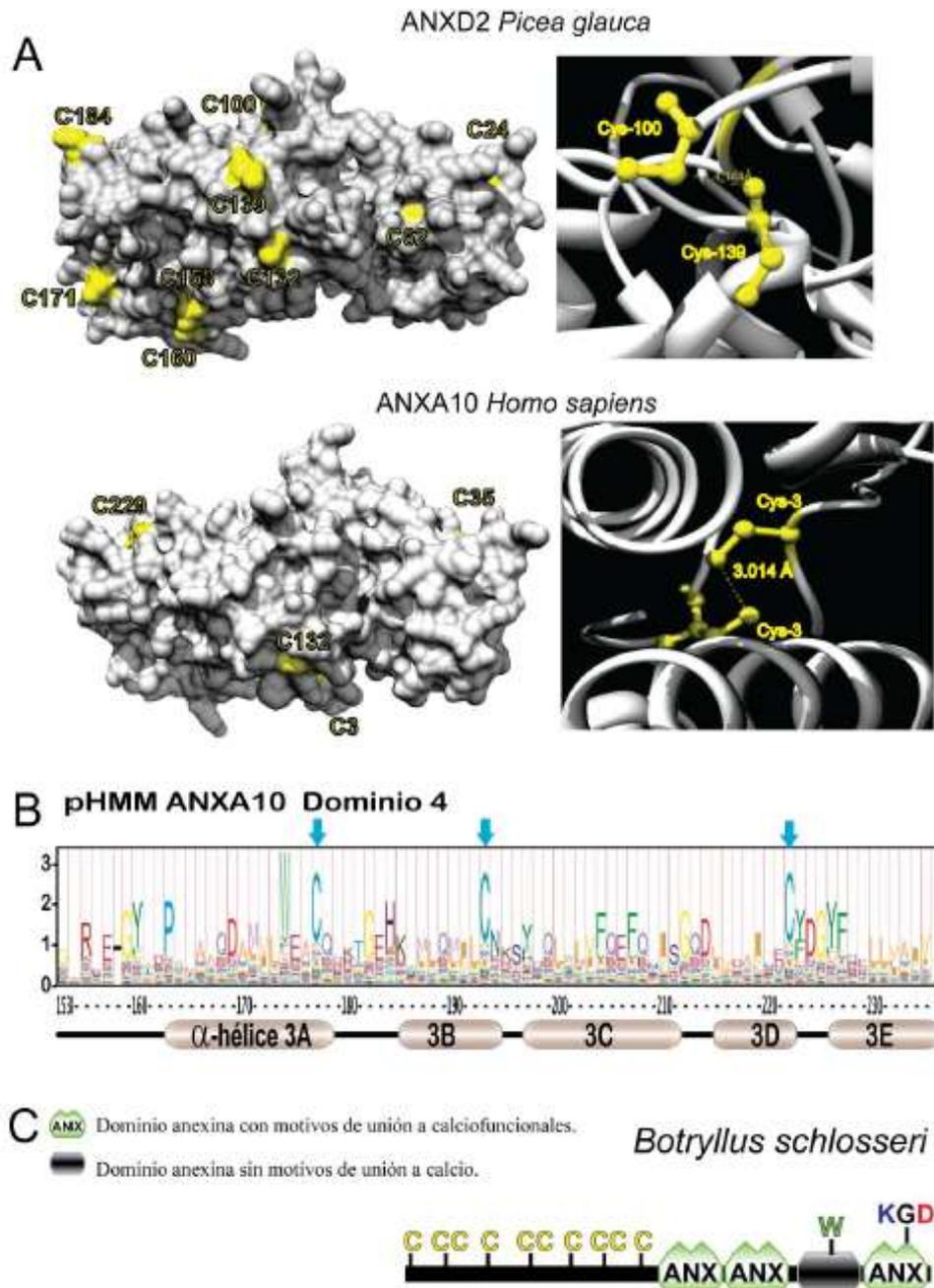


Figura 9: Modelo tridimensionales de ANXA10 humana.

Nuevos mecanismos independientes de calcio: papel de los residuos de Cisteína.

Panel A: modelos tridimensionales de análisis de la topología de las anexinas ANXA10 humana (10 Cys) y ANXD2 de *Picea glauca* (16Cys) donde se destacan en amarillo la localización de los residuos de Cys en la superficie de las moléculas. También se muestra un detalle del mecanismo de dimerización a través de un puente disulfuro (Cluspro 2.0).

Panel B: modelo pHMM correspondiente al cuarto dominio de ANXA10 destacando con flechas azules la gran importancia funcional que poseen los residuos Cys, su frecuencia y su localización (próxima a los lazos interhélice).

Panel C: representación esquemática de la anexina del tunicado *Botryllus schlosseri* que presenta un extremo amino muy rico en residuos de Cys (15) y un motivo “KGD” en el dominio 4.

Silvia Martín Almedina. ANEXINA A10, un nuevo modelo estructural con expresión génica y función asociada a procesos de secreción celular. (Universidad de Oviedo, 2010).

2.4.-ANEXINA A9 Y CANCER.

El gen de la anexina A9 se expresa abundantemente en líneas celulares de cáncer de mama (MCF7) y en tejidos y células de tipo epidérmico. Se ha detectado también la expresión del mRNA de la anexina A9 en una gran variedad de tejidos humanos, observándose variaciones en los niveles de expresión en algunos tejidos y siendo estos niveles más elevados en riñón y piel. El gen de la anexina A9 presenta variaciones en los niveles de expresión en tejidos como colon, laringe y estómago, asociadas al desarrollo de procesos tumorales ⁴⁵.

No existen datos suficientes sobre la expresión de la anexina A9 en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello, siendo así mismo escasos los estudios sobre su expresión en la mucosa normal de la vía aéreo-digestiva superior o en relación con otra patología, lo cual añade un especial interés a su estudio.

2.5.-ANEXINA A10 Y CANCER.

La información de la que disponemos sobre los patrones de expresión génica y la regulación del gen de la anexina A10 no es muy abundante, y la mayor parte de esta información proviene del análisis de las bases de datos de secuencias expresadas (ESTs) y de hibridación de *microarrays* ⁴⁵.

Estudios de este tipo ya han puesto en evidencia la presencia de la expresión génica de esta anexina en estómago, páncreas e intestino ⁵². De hecho, una de las secuencias correspondientes al cDNA de la anexina A10, se describió como la de un gen expresado de forma diferencial en un adenocarcinoma de páncreas aislado de la metástasis en hígado⁴⁵.

Un estudio clínico realizado en pacientes con diferentes subtipos de leucemia mieloide aguda (LMA) ha identificado a la anexina A10 como una de las proteínas cuya expresión se vio más significativamente alterada con respecto al grupo control. Según los datos publicados, la expresión génica de la anexina A10 se ve reducida en todos los subtipos de AML estudiados, excepto en leucemia monocítica aguda ⁵³.

El estudio de la regulación de la expresión génica de anexinas en pituitaria anterior ha revelado la sobreexpresión del gen de la anexina A10 en ratones sin tiroides y cómo esta expresión se vuelve a normalizar cuando los ratones son tratados durante 3 días con tiroxina (T4) ⁵⁴.

La caracterización de los perfiles de expresión génica en mastocitos aislados de la mucosa y submucosa gástrica murina ha permitido identificar a la anexina A10 como uno de los genes altamente expresados en aquellos mastocitos localizados en la mucosa ⁵⁵. Estudios similares encaminados a la búsqueda de genes marcadores de células M han

revelado la expresión de esta anexina en este tipo celular localizado en el epitelio folicular de las placas de Peyer intestinales⁵⁶. La Anexina A10 ha sido implicada en funciones celulares como endocitosis y exocitosis, actividad anticoagulante, interacciones con el citoesqueleto, diferenciación y proliferación celular, y se ha relacionado su actividad en esófago de Barret, cáncer gástrico^{57,58}, vejiga⁵⁹ y hepatocarcinoma, así como su expresión en carcinoma de orofaringe⁶⁰. Estudios más concretos y centrados expresamente en el estudio de esta nueva anexina han revelado que los niveles de expresión génica de la anexina A10 se reducen drásticamente en cáncer hepatocelular y gástrico^{61,36}. En el primero de los casos, la reducción de la expresión del gen de la anexina A10 se ha correlacionado con mutaciones en p53, fenotipo maligno de los hepatocitos, invasión vascular y progresión del cáncer hepatocelular. El gen de la anexina A10 humano se ha localizado, mediante la técnica de hibridación in situ fluorescente (FISH), en el cromosoma 4q33^{47,62}. Precisamente, el cromosoma 4q contiene una de las regiones con mayor frecuencia de pérdida alélica en hepatocarcinoma^{63,61}, por lo que la reducción de la expresión de este gen se ha relacionado con dicho fenómeno, no sólo en cáncer hepatocelular sino también en cáncer gástrico. Mediante hibridación genómica comparativa se ha detectado pérdida del locus correspondiente al gen de la anexina A10 en el cromosoma 4q33 en varias líneas celulares de carcinoma gástrico asociada a una disminución de la expresión del gen⁶⁴. Estos resultados sugieren que la anexina A10 podría funcionar como un gen supresor de tumores en tejido hepático y gástrico. Como confirmación adicional de este carácter de gen supresor, recientemente se ha incluido a la anexina A10 en un grupo de 12 genes que se expresan de forma diferencial en carcinoma de vejiga y que se proponen como de gran utilidad en el diagnóstico de este tipo de cáncer⁶⁵.

La expresión de ANXA10 es rara y ha sido descrita en el hígado y en las células del sistema MALT en el tracto gastrointestinal. Además, ANXA10 se ha relacionado con el mal pronóstico tanto en el carcinoma hepatocelular como en el carcinoma gástrico. De esta forma, ANXA10 disminuido se ha correlacionado con invasión aumentada en una línea celular del cáncer colorrectal y con proliferación aumentada y migración en cáncer gástrico. Además, la sobrerregulación de S100A4, que es considerado un mediador en las metástasis, ha sido asociado con niveles disminuidos de ANXA10 en una línea celular de cáncer de pulmón. Estudios recientes en líneas celulares de cáncer de vejiga, demuestran que niveles disminuidos de ANXA10 inducen la regulación de S100A4 relacionándose con el fenotipo de invasión y metástasis. La disminución de función de ANXA10 en una línea celular de cáncer de vejiga causó un aumento de la proliferación y la migración ⁵⁹. Estos resultados concuerdan con estudios en líneas celulares, revelando que la disminución en la expresión de la ANXA10 se correlacionó con un aumento de la invasión, la proliferación y la migración en una línea celular de cáncer colorrectal ⁶⁵.

El análisis de todos estos hechos nos llevó a enfocar nuestro interés en el estudio de la expresión de las anexinas A9 y A10 en la progresión tumoral de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello (CECC), dada la ausencia de datos sobre su posible papel en estos carcinomas.

3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

El objetivo global de esta tesis ha sido investigar el significado clínico y biológico de la expresión de las Anexinas A9 y A10 en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello y contribuir a un mejor conocimiento de los mecanismos y las consecuencias de la expresión alterada de dichas proteínas, así como su impacto en el pronóstico de los pacientes y el resultado de la enfermedad. Consideramos que desentrañar el papel que las alteraciones en la expresión de las Anexinas A9 y A10 tienen en el crecimiento y la invasividad de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello, reviste interés no sólo por su contribución a un mejor conocimiento de la biología tumoral, sino porque permitiría ampliar extraordinariamente las perspectivas de descubrir nuevos biomarcadores y nuevas dianas moleculares para el desarrollo de futuras terapias.

Planteamos los siguientes objetivos específicos:

- 1.- Analizar la expresión de las Anexinas A9 y A10 en carcinomas epidermoides de cabeza y cuello, comparándola con la del epitelio sano adyacente.
- 2.- Determinar la relación entre la expresión de dichas anexinas y las características clinico-patológicas de los tumores.
- 3.- Establecer la correlación entre los niveles de expresión de las Anexinas A9 y A10 en los tumores y la evolución clínica de los pacientes.
- 4.- Validar los resultados mediante análisis *in silico* de datos transcriptómicos de la cohorte de carcinomas epidermoides de cabeza y cuello de la TCGA.

4.MATERIALES

Y

METODOS:

4.1.-Muestras de tejidos

Para disponer de una muestra homogénea, se obtuvieron del archivo de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Central de Asturias muestras de tejidos quirúrgicos de 382 pacientes diagnosticados de carcinoma epidermoide (140 de amígdala , 109 de base de la lengua, 65 de hipofaringe y 68 laríngeos). El epitelio normal se obtuvo de hombres adultos, no fumadores y no bebedores, pacientes operados de amigdalectomía debido a amigdalitis crónica y pacientes operados de lesiones de cuerdas vocales benignas (por ejemplo, pólipos, quistes). En total se construyeron 15 matrices tisulares (*tissue arrays, TMA*) con muestras obtenidas de dichos casos, cada una de las cuales contenía epitelio normal. Las muestras fueron obtenidas del biobanco del HUCA, siguiendo las guías del comité de ética del Hospital. Se seleccionaron secciones representativas de los tejidos para el estudio y el diagnóstico fue confirmado para cada lesión por un patólogo. Todos los pacientes fueron tratados quirúrgicamente, y ninguno había recibido radioterapia y/o quimioterapia previa a la intervención, y tenían un seguimiento de por lo menos 5 años o hasta el fallecimiento por el tumor. Los TMAs fueron construidos en el Biobanco del HUCA, seleccionando 3 áreas representativas de cada tumor, de las cuales se obtuvieron cilindros de 1mm que fueron incluidos en el TMA. En cada TMA se incluyeron también representaciones de mucosa normal.

Las características de los pacientes estudiados y los rasgos clínico-patológicos de sus tumores (localización, clasificación pT, clasificación pN, estadio de la enfermedad, y grado histopatológico) se muestran en la tabla 2. El estadio de la enfermedad fue determinado después de la resección quirúrgica del tumor, de acuerdo con el sistema TNM de la Unión internacional contra el Cáncer (7ª edición). El grado histológico fue

determinado de acuerdo con el grado de diferenciación del tumor (Clasificación de Broders). Sólo 16 pacientes eran mujeres, la edad media fue de 59 años (rango entre 30 y 86 años) y la mediana de 57 años. Todos excepto 17 eran fumadores habituales; 205 moderados (1-50 paquetes/año) y 151 con consumo elevado (> 50 paquetes/año). Y 343 eran consumidores habituales de alcohol; 142 moderados (< 40 gr/día) y 201 con consumo elevado (> 41 gr/día).

Tabla 2. Resumen de las características clinicopatológicas de los pacientes con carcinomas epidermoides de cabeza y cuello

Característica	Número total de pacientes
Promedio de edad a la resección (rango):	59(30-86 años)
Localización	
Orofaringe	249 (65%)
Hipofaringe	65(17%)
Laringe	68(18%)
Clasificación pT	
T1	39 (10%)
T2	81(21%)
T3	129(34%)
T4	133(35%)
Clasificación pN	
N0	107 (28%)
N1	47(12%)
N2	186 (49%)
N3	42(11%)
Estadio de la enfermedad	
I	21(5%)
II	26 (7%)
III	66 (17%)
IV	269(71%)
Grado histopatológico	
Bien-diferenciado	152(40%)
Moderadamente-diferenciado	149(39%)
Pobremente-diferenciado	81(21%)

Total	382
-------	-----

4.2. Detección de VPH

La detección de ADN de VPH de alto riesgo y genotipado se realizó empleando un triple método (inmunohistoquímico, PCR, e hibridación “in situ”) como 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 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 (HPV 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 HPV 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 en todos los casos una hibridación “in situ” (ISH) con sondas de ADN de VPH biotinilado

que reaccionaba con los tipos de HPV 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 HPV-16. Los resultados fueron evaluados por dos observadores independientes. La tinción focal con diaminobenzidina en el núcleo de las células tumorales se consideró HPV positivo.

De las 382 muestras, 10 pacientes (8 pacientes con carcinoma de orofaringe, 1 con carcinoma de hipofaringe, y 1 con carcinoma de laringe) 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. Dado que los tumores de etiología por VPH son clínica y molecularmente

diferentes de los no relacionados con el VPH, los casos VPH-positivos se excluyeron del análisis de las correlaciones clínico-patológicas para obtener una muestra más homogénea.

4.3.- Estudio inmunohistoquímico de la expresión de las anexinas A9 y A10

Secciones seriadas de 3 μm de cada TMA (“tissue array”) fueron adheridas en portas siliconizados Flex IHC microscope (DAKO, Glostrup, Dinamarca), desparafinadas con xileno e hidratadas en concentraciones graduales decrecientes de alcohol según el modo convencional. A continuación, se llevó a cabo el desenmascaramiento antigénico utilizando proteinasa K durante 10 minutos. La tinción de las secciones se realizó automáticamente a temperatura ambiente en una estación de trabajo (Dako Autostainer Plus) utilizando anticuerpos primarios policlonales anti-anexina A9 o anti-anexina A10 (generados en el laboratorio de la Dra. Pilar Fernández, Departamento de Bioquímica, Universidad de Oviedo) a una dilución de 1:100 durante 30 ó 45 minutos, respectivamente. La inmunodetección se realizó utilizando como sistema de visualización el kit Dako EnVision Flex + (Dako Autostainer), empleando como cromógeno diaminobenzidina.

Como último paso se contrastó la preparación con hematoxilina durante 8 minutos. Después de la tinción, los portaobjetos fueron deshidratados mediante alcoholes de graduación creciente y montados con un cubreobjetos usando un medio estándar.

Los portaobjetos fueron analizados de forma aleatoria, sin datos clínicos por dos investigadores. Se asignó una puntuación en función de la intensidad de la tinción citoplasmática y/o membranosa de forma semicuantitativa en tres grados: nula (0), débil

(1), o fuerte (2). Con fines estadísticos la intensidad de la tinción se dicotomizó en nula y débil-fuerte. En todos los experimentos se utilizaron controles de mucosa normal, controles positivos (muestras tumorales que expresaban ambas anexinas), y controles negativos, en los que se omitió el anticuerpo primario.

4.4.- Análisis “in silico” de la expresión del ARNm de ANXA9 y ANXA10 utilizando los datos del cáncer de cabeza y cuello del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA)

Para ampliar y confirmar nuestros resultados, también realizamos el análisis de los datos del transcriptoma de la cohorte de cáncer de cabeza y cuello del atlas TCGA, a la que se accedió a través de la publicación original⁶⁶, o utilizando la plataforma cBioPortal de Genómica del Cáncer (<http://cbioportal.org/>) y las herramientas web de la UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/>).

4.5.- Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado con ayuda del paquete estadístico SPSS versión 19.0. Las puntuaciones de tinción inmunohistoquímica fueron comparadas dentro de los grupos estratificados con respecto a parámetros clínico-patológicos (clasificación T, clasificación N, grado de diferenciación, estadio y recidiva) y dentro del grupo en conjunto. Para esta comparación usamos el test de Chi-cuadrado.

Las curvas de supervivencia fueron calculadas usando el método de Kaplan-Meier. Las muertes por causas distintas al tumor índice o sus metástasis no fueron consideradas fallos del tratamiento, y estos pacientes fueron censurados del análisis final de la supervivencia específica para la enfermedad. Las diferencias entre las curvas de

supervivencia fueron analizadas por el método Long Rank. Los valores de P de <0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

5. RESULTADOS

5.1.-ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

5.1.1. Expresión de las anexinas A9 y A10 en epitelio normal

El epitelio escamoso estratificado no queratinizado mostró diferentes patrones de expresión para las dos anexinas estudiadas. La expresión de ANXA9 estuvo ausente en las células basales y parabasales, mientras que la expresión aumentó hacia las capas más diferenciadas del epitelio (Figura 10A). En contraste con esto, se detectó una expresión de ANXA10 negativa en todas las capas celulares del epitelio normal, con tinción sólo en la superficie (Figura 10D).

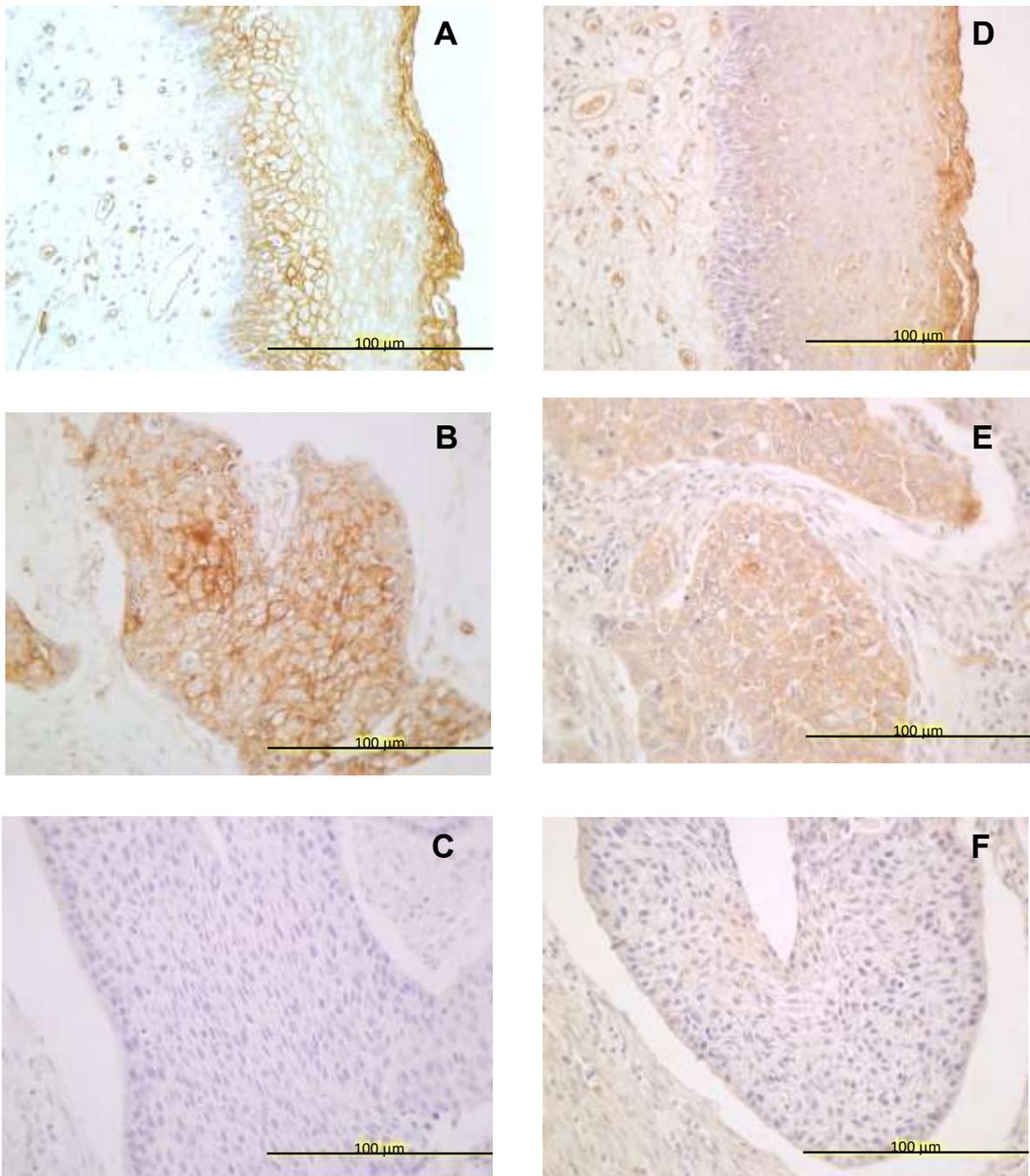


Figura 10. Análisis inmunohistoquímico de anexinas A9 (ANXA9) y A10 (ANXA10) expresión en carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) muestras de tejido. Ejemplos representativos de la expresión de ANXA9 (A) y ANXA10 (D) en epitelio normal, expresión de ANXA9 (B) y ANXA10 (E) positiva en carcinomas y expresión de ANXA9 (C) y ANXA10 (F) negativa en carcinomas. Ampliación original $\times 40$.

5.1.2.- Expresión de la anexina A9 en los carcinomas

El análisis inmunohistoquímico de la expresión de ANXA9 se evaluó con éxito en 36 de 382 muestras de tumores: 152 (43%) mostraron expresión negativa, 166 (47%) expresión débil, y 38 (10%) expresión fuerte. Es decir, 152 casos se consideraron negativos (43%) y 204 (57%) positivos. En relación con el VPH, de los 10 casos VPH positivos, 6 casos mostraron expresión negativa y 4 positiva, es decir, el porcentaje de casos negativos era más elevado entre los VPH+, aunque sin diferencias significativas ($P=0,33$).

De los 346 casos VPH-negativos, doscientos de ellos (58%) mostraron una expresión positiva de ANXA9 predominantemente con un patrón membranoso, aunque en algunos casos también se observó expresión citoplásmica (Figura 11B, C). La relación entre la expresión de ANXA9 y las características clínico-patológicas se muestra en la Tabla 3. La expresión positiva de ANXA9 se asoció de manera fuerte y significativa con el grado de diferenciación de los tumores ($P < 0,001$). Se puede observar como la expresión de ANXA9 se encontró principalmente en tumores bien diferenciados, mientras que la expresión se redujo en tumores moderadamente y pobremente diferenciados (Figura 12A, C). También observamos diferencias en la expresión de ANXA9 entre las diferentes localizaciones de CCC, siendo la expresión de ANXA9 significativamente mayor en los tumores orofaríngeos ($P < 0,001$).

No observamos relación entre la expresión de la ANXA9 y el tamaño del tumor primario ($P=0,377$). Tampoco observamos diferencias significativas en la expresión de la anexina A9 entre los casos con y sin metástasis ganglionares ($p=0,616$). En cuanto a la distribución por estadios, no se observan diferencias ($P=0,124$), aunque se aprecia que

la expresión positiva es más frecuente en los casos en estadios avanzados (III-IV) . Tampoco se observó una relación significativa entre la expresión de la ANXA9 y la recurrencia tumoral ($p=0.91$).

5.1.3.- Expresión de la anexina A10 en los carcinomas

La expresión de ANXA10 inmunohistoquímica se evaluó con éxito en 350 de 382 muestras de tumores. 127 (36%) mostraron expresión negativa, 196 (56%) expresión débil, y 27 (8%) expresión fuerte. Es decir, 127 casos se consideraron negativos (36%) y 223 (64%) positivos. En relación con el VPH, de los 10 casos VPH positivos, 6 casos mostraron expresión negativa y 4 positiva, es decir, al igual que en caso de la ANXA9, el porcentaje de casos negativos era más elevado entre los VPH-positivos, aunque sin diferencias significativas ($P=0,179$).

En los casos VPH-negativos, la expresión positiva de ANXA10 se observó en un total de 219 casos (64%), principalmente detectados en el citoplasma de las células cancerosas (Figura 11 E, F). Además, la expresión de ANXA9 y ANXA10 se correlacionaron significativamente (coeficiente de correlación de Spearman 0,459, $P < 0,001$).

Similar a ANXA9, la expresión de ANXA10 fue significativamente mayor en los tumores orofaríngeos ($P=0,019$). Además, la expresión de ANXA10 también se asoció significativamente con el grado de diferenciación de los tumores (expresión disminuida con dediferenciación, $P < 0,001$, Figura 12 B, D). Y también al igual que en el caso de la ANXA), no se observaron asociaciones con las clasificaciones T y N, el estadio de la enfermedad, o la recidiva tumoral (Tabla 3).

Tabla 3: Relación entre la expresión de ANXA9 y ANXA10 y parámetros clinicopatológicos en casos VPH-negativos

Características	No. Casos ANXA9	Expresión positiva de ANXA9 (%)	P	No. Casos para ANXA10	Expresión positiva para ANXA10 (%)	P
Localización						
Orofaringe	234	166 (71)		231	160 (69)	
Hipofaringe	58	17 (29)	0,000 #	55	28 (51)	0,019 #
Laringe	54	17 (31)		54	31 (57)	
pT Clasificación						
T1-T2	100	52 (52)		95	58 (61)	
T3	120	73 (61)	0,377 #	119	75 (63)	0,591 #
T4	126	73 (59)		123	83 (67)	
pN Clasificación						
N0	87	48 (55)		87	53 (61)	
N1-3	259	152 (59)	0,616 †	253	166 (66)	0,439 †
Estadío						
I-II	33	14 (42)		32	19 (59)	
III	61	39 (64)	0,124 #	60	39 (65)	0,822 #
IV	252	147 (58)		248	161 (65)	
Grado de diferenciación						
Bien-diferenciado	136	98 (72)		134	103 (77)	
Moderadamente-diferenciado	137	73 (53)	0,000 #	137	85 (62)	0,000 #
Pobrememente-diferenciado	73	29 (40)		69	31 (45)	
Recurrencia						
No	132	77 (58)		132	80 (61)	
Si	214	123 (57)	0,91 †	208	139 (67)	0,248 †
Total	346	200 (58)		340	219 (64)	

Chi-cuadrado and † Prueba exacta de Fisher.

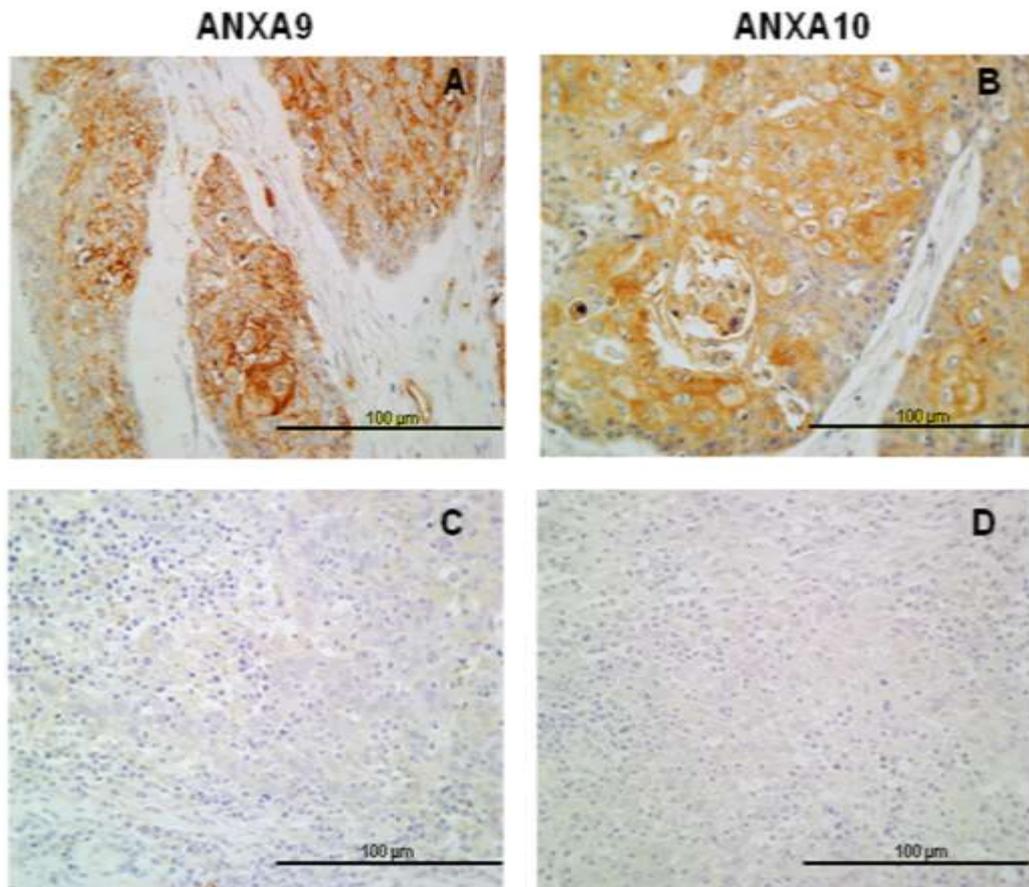


Figura 11: Expresión de las proteínas ANXA9 y ANXA10 en muestras de CCC según el grado de diferenciación. Ejemplos representativos de tumores bien diferenciados que muestran expresión positiva de ANXA9 (A) y ANXA10 (B), y tumores poco diferenciados que muestran expresión negativa de expresión de ANXA9 (C) y ANXA10 (D) en carcinomas. Ampliación original 40 x.

5.2. Análisis “in silico” de la expresión del ARNm de ANXA9 y ANXA10 utilizando los datos de cáncer de cabeza y cuello del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA)

Mediante el análisis bioinformático de los datos del transcriptoma de la cohorte de cáncer de cabeza y cuello del TCGA se encontró que los niveles de ARNm de ANXA9 disminuyeron significativamente en los tumores primarios en comparación con las muestras de tejido normal ($P < 0,001$; Figura 13A), mientras que los niveles de ARNm de ANXA10 aumentaron en los tumores frente al tejido normal ($P < 0,001$; Figura 3B). Estos resultados están de acuerdo con nuestras observaciones a nivel de proteína. Además, se evaluaron las posibles correlaciones entre la expresión del ARNm de ANXA9 y ANXA10 y el grado de diferenciación del tumor utilizando una cohorte homogénea de 243 pacientes con carcinomas de cabeza y cuello negativos al VPH, como los de nuestra serie. Encontramos que los niveles de ARNm de ANXA9 se correlacionaron inversa y significativamente con el grado de diferenciación histológica (coeficiente de correlación de Spearman -0.244 , $P < 0.001$; Figura 13C). De acuerdo con nuestros datos de expresión de proteína por inmunohistoquímica, los niveles de ARNm de ANXA9 fueron más altos en tumores bien diferenciados que en tumores moderadamente y poco diferenciados. Sin embargo, los niveles de ARNm de ANXA10 no se correlacionaron significativamente con el grado del tumor ($P = 0.605$; Figura 13D), en contra de nuestros resultados a nivel de proteína.

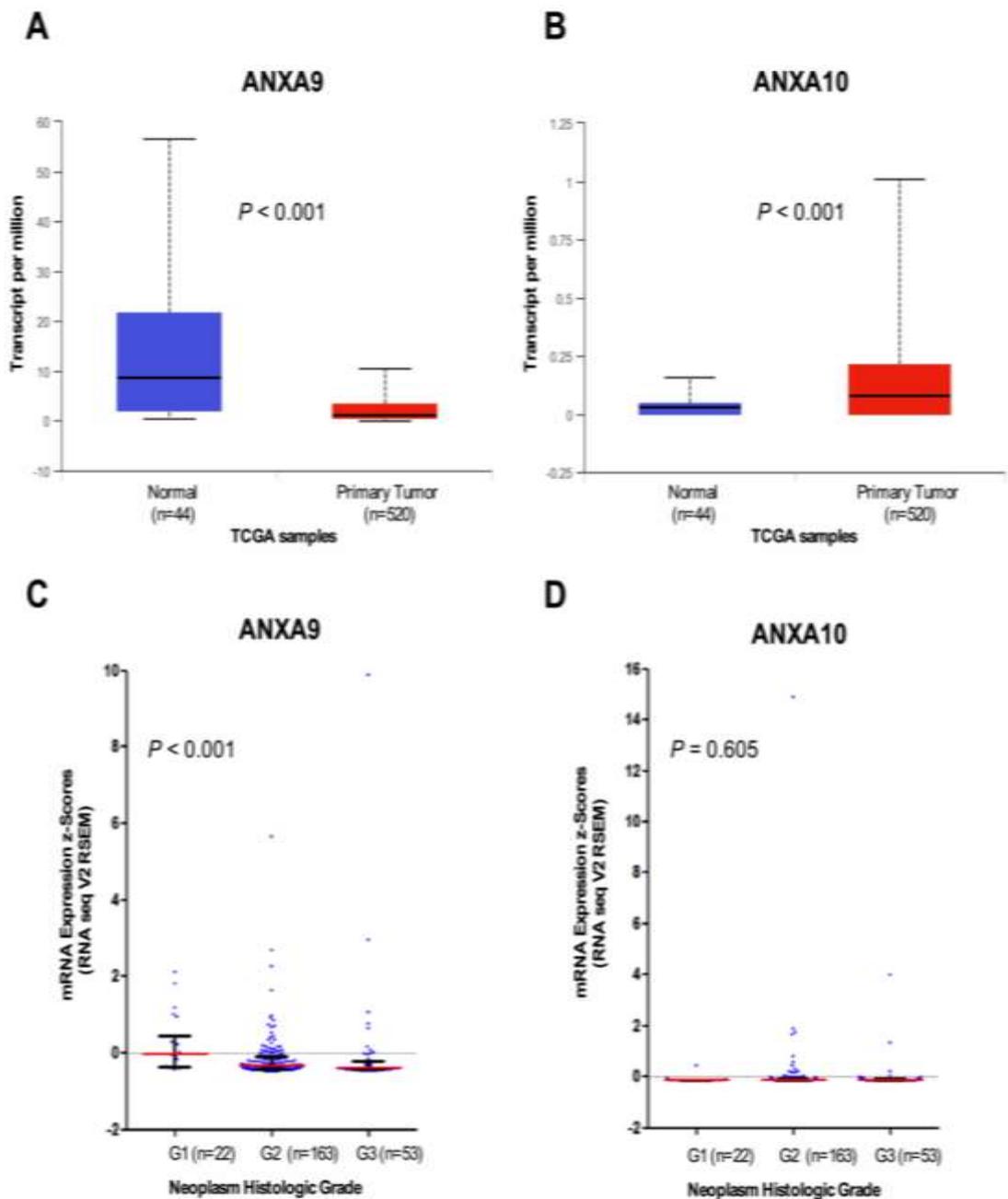


Figura 12. Análisis de la expresión del ARNm de ANXA9 y ANXA10 utilizando datos RNAseq de las cohortes de cáncer de cabeza y cuello del TCGA. Las gráficas de caja comparan los niveles de expresión de ARNm de ANXA9 (A) y ANXA10 (B) en tumores primarios (rojo) versus tejido normal (azul) utilizando los recursos en línea de UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/>). Se muestran la mediana, los cuartiles y el rango de valores. La expresión de ANXA9 (C) y ANXA10 (D) (RNA seq V2 RSEM, z-score umbral ± 2) se analizó

en relación con el grado de diferenciación del tumor, categorizado como bien diferenciado (G1), moderadamente diferenciado (G2) y poco diferenciado (G3) utilizando la cohorte TCGA HPV-negativa (n = 243). Las líneas horizontales (rojo) representan los valores medianos, con rango intercuartil.

5.3.- Análisis de Supervivencia

De los 382 pacientes incluidos en el estudio, no presentaron recidiva durante el seguimiento 153 casos (40%), 57 presentaron recidiva local (15%), 31 regional (8%), 69 metástasis a distancia (18%), 37 recidiva locorregional (10%), y 35 recidiva locorregional y metástasis (9%). 42 pacientes (11%) presentaron un segundo tumor primario (la localización más frecuente fue el pulmón). Al final del periodo de seguimiento 113 pacientes se hallaban vivos sin tumor (30%), 206 habían fallecido por el tumor (54%), y 63 habían fallecido por otra causa (16%). La supervivencia específica a los 5 años fue del 40% y la supervivencia global del 31%.

Si consideramos los casos HPV-positivos, 5 casos no presentaron recidiva (50%), uno presentó recidiva local (10%), dos regional (20%), y dos locorregional (20%). Ningún caso presentó metástasis a distancia ni desarrolló segundos tumores primarios. Al final del seguimiento 6 pacientes se hallaban vivos sin tumor (60%) y 4 habían fallecido por el tumor (40%). La supervivencia específica a los 5 años de estos casos fue del 57% y la supervivencia global también del 57%. Como se puede apreciar, los pacientes HPV-positivos presentan mejor pronóstico, aunque es escaso número de casos impide realizar un estudio estadístico. Estos casos se eliminan para el resto del análisis de supervivencia.

En los casos HPV-negativos se observó que, tal como sería de esperar, la localización tumoral, la clasificación T, la clasificación N, y el estadio se asociaban de forma significativa con la supervivencia específica para la enfermedad (Figura 14).

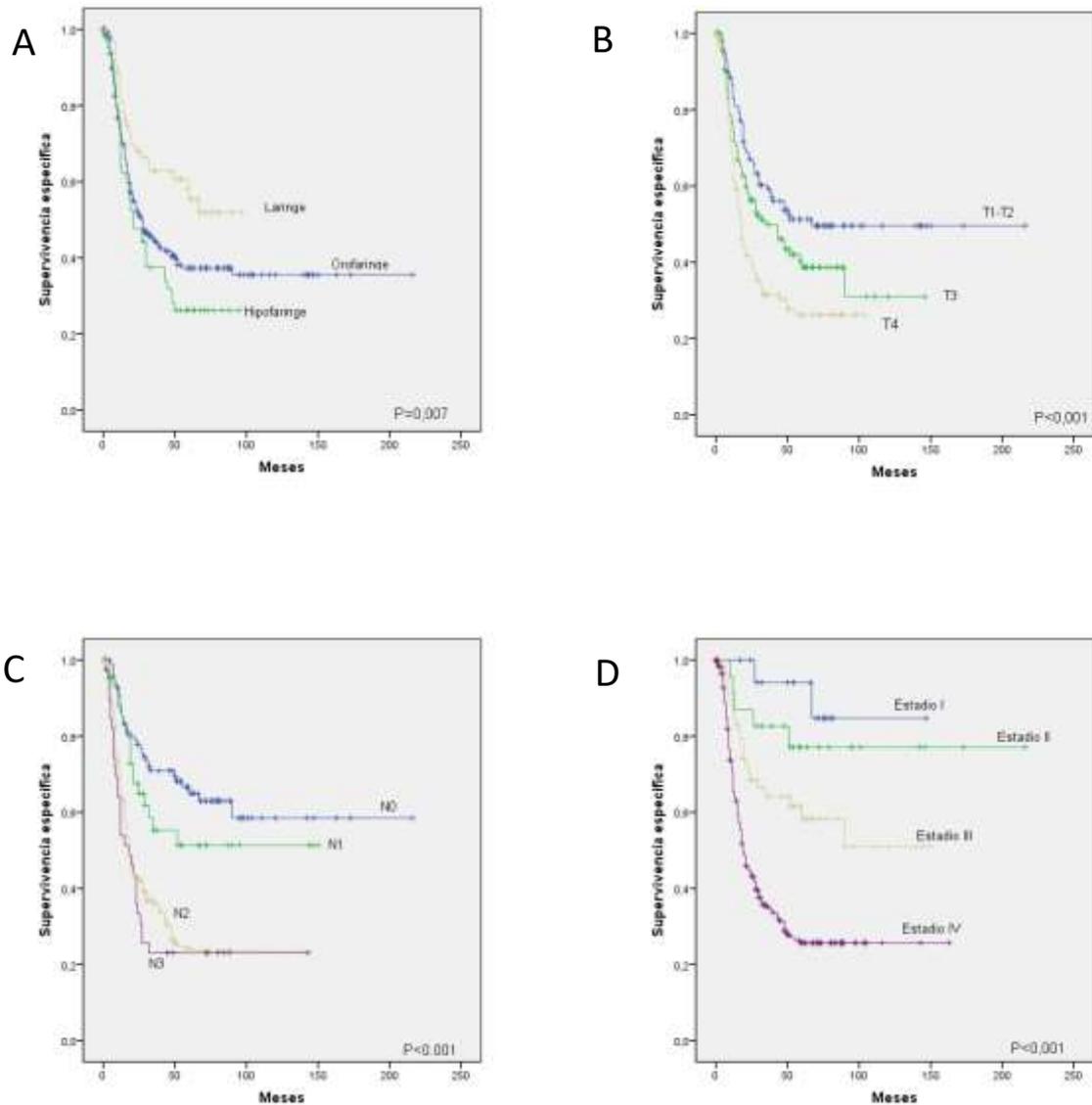


Figura 13: Curvas de supervivencia específica para la enfermedad en función de la localización tumoral (A), clasificación T (B), clasificación N (C) y estadio tumoral (D).

La relación entre la expresión de las anexinas A9 y A10 y las recidivas tumorales se muestra en la tabla 4. Aunque globalmente no hay una diferencia significativa entre los casos con y sin recidiva tumoral en función de la expresión de la ANXA9, se aprecia como la positividad de la expresión de la ANXA9 es más frecuente en los casos con recidiva local y/o regional, y sin embargo más baja en los casos con metástasis a distancia.

Tabla 4: Relación entre la expresión de las anexinas A9 y A10 con las recidivas tumorales

Recidiva tumoral	Número de casos	ANXA9 Positiva	P	Número de casos	ANXA10 Positiva	P
No	132	77 (58%)	0,024	132	80 (61%)	0,160
Local	55	38 (69%)		53	38 (72%)	
Regional	30	21 (70%)		29	21 (72%)	
Metástasis	62	32 (52%)		61	33 (54%)	
Locorregional	35	21 (60%)		35	24 (68%)	
Loc-reg. y metástasis	32	11 (34%)		30	23 (77%)	
Total	346	200 (58%)		340	219 (64%)	

Igualmente, la positividad de la expresión de la ANXA10 es más frecuente en los casos con recidiva local y/o regional que en los casos sin recidiva o con metástasis a distancia.

En cuanto a la relación de la expresión de la ANXA9 y ANXA10 con la supervivencia específica para la enfermedad, no se aprecian diferencias significativas en función de la expresión de estas proteínas, ni en la serie global, ni considerando las diferentes

localizaciones separadamente (Figuras 14 y 15). Aunque si se aprecia que la supervivencia específica es menor en los casos con expresión positiva en el caso de la ANXA10, en la que en la serie completa las diferencias son casi significativas ($P=0,077$).

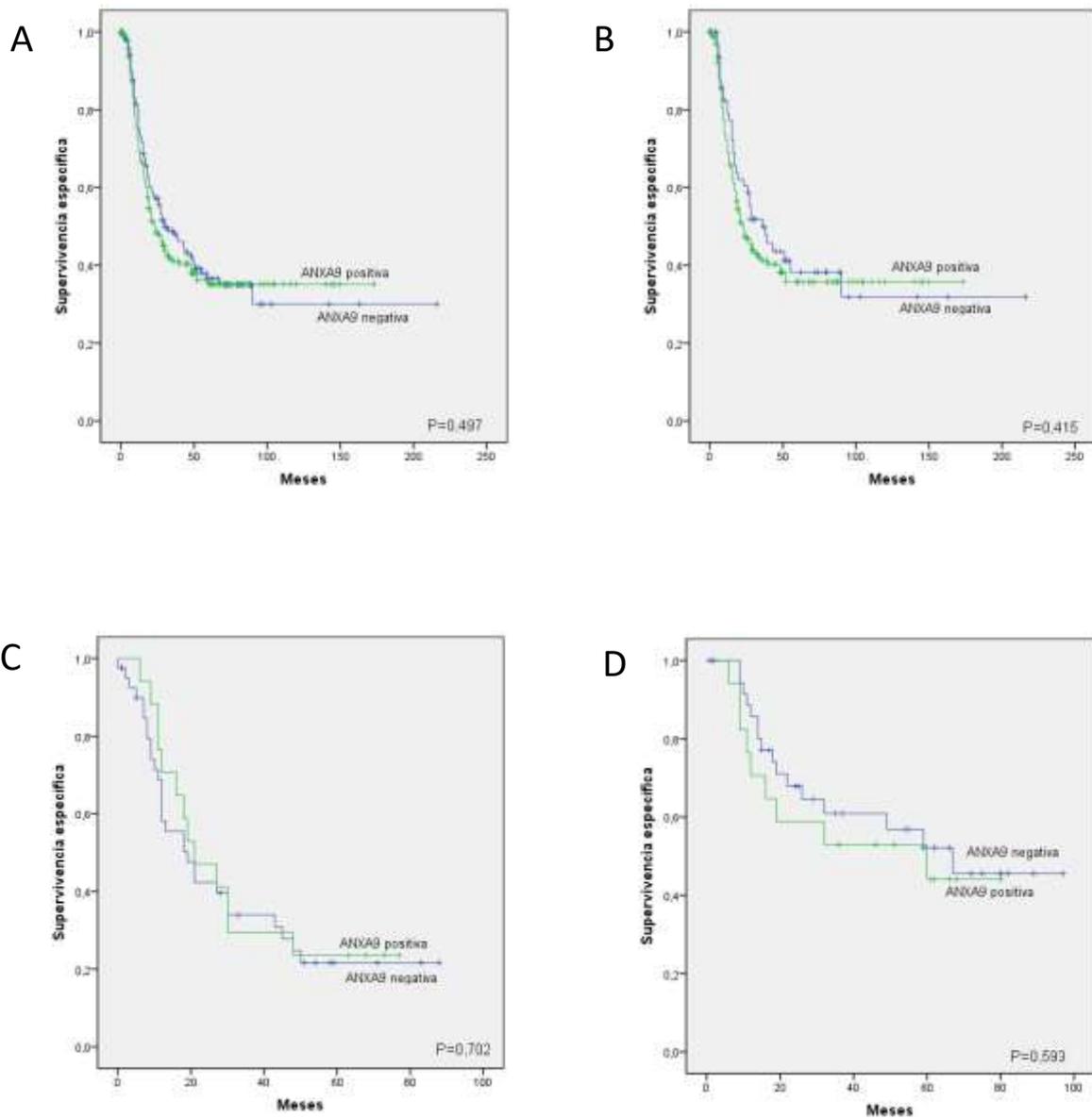


Figura 14: Curvas de supervivencia libre de enfermedad de los pacientes en función de la expresión de la ANXA9 en la serie global (A), en los casos de orofaringe (B), de hipofaringe (C), y de laringe (D).

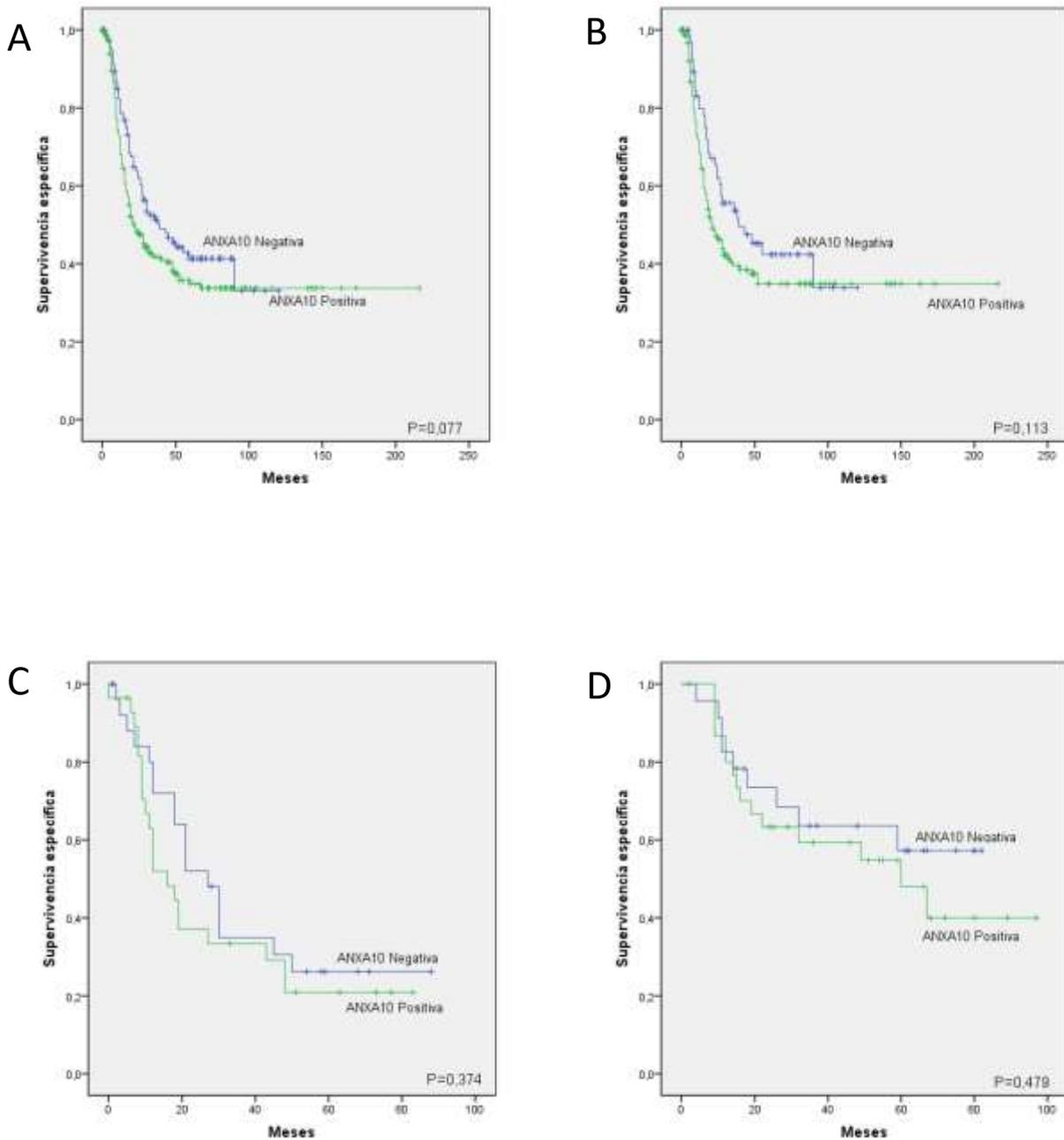


Figura 15: Curvas de supervivencia libre de enfermedad de los pacientes en función de la expresión de la ANXA10 en la serie global (A), en los casos de orofaringe (B), de hipofaringe (C), y de laringe (D).

6. DISCUSIÓN

Muchos de los complejos fundamentos biológicos de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello siguen siendo poco conocidos a pesar de los intensivos estudios. Al igual que otras neoplasias epiteliales, la carcinogénesis de cabeza y cuello parece desarrollarse a través de un proceso con múltiples pasos que involucra cambios biomoleculares sucesivos⁴⁶. De esta manera, la carcinogénesis epitelial ha sido dividida en 3 fases de iniciación, promoción y progresión que involucra alteraciones genéticas, desregulación de la diferenciación epitelial, proliferación anormal, y efectos reguladores alterados asociados con la anormal expresión de factores celulares que regulan el crecimiento y desarrollo. La identificación de las alteraciones moleculares asociadas con estos eventos podría dar paso al conocimiento de los mecanismos de iniciación y progresión de las neoplasias y aportar nuevas herramientas de diagnóstico, tratamiento y prevención.

La importancia de las anexinas como herramienta diagnóstica esta cada día incrementando su valor. Su habilidad para responder ante la enfermedad y el estrés celular apunta a considerarlas como un objetivo para el diagnóstico y tratamiento³². El alcance actual del análisis global de la expresión génica utilizando la proteómica y la tecnología de chips de ADN lo ha puesto de manifiesto⁶⁷. En este estudio se ha descrito, por primera vez, los patrones de expresión de las proteínas ANXA9 Y ANXA10 en carcinomas epidermoides de cabeza y cuello (orofaringe, laringe e hipofaringe), así como sus correlaciones con parámetros clínico patológicos y la evolución de la enfermedad.

ANEXINA A9

La anexina A9 es un miembro novedoso de la familia de las anexinas cuya secuenciación muestra mutaciones en residuos considerados cruciales para la coordinación de Ca^{2+} con otras anexinas⁶⁸.

La comparación de secuencias reveló que el homólogo más cercano a la anexina A9 es la anexina A2, con una similitud que alcanza aproximadamente el 40% de la proteína^{69,70}.

Para dilucidar si la proteína Anexina A9 se expresa como tal y para caracterizar sus propiedades bioquímicas se ha probado en extractos celulares con anticuerpos específicos anti-anexina A9. Estos estudios mostraron que la ANXA9 se encuentra en la línea celular derivada de hepatocarcinoma humano HepG2, y también se ve expresada abundantemente en el citosol de las células HeLa (de carcinoma de útero).

En base a los análisis de los datos de microarrays, la anexina A9 se expresa de forma ubicua en todos los tejidos, pero a diferencia de otras anexinas, en niveles relativamente bajos. Con el fin de confirmar y ampliar estos datos, se llevó a cabo el análisis comparativo de la expresión génica de todas las anexinas, incluida la anexina A9, en distintos tejidos humanos. La anexina A9 humana se expresa en todos los tejidos ensayados a excepción del músculo esquelético. Mediante la técnica de RT-PCR se realizó el estudio de expresión de la anexina A9 en diferentes líneas celulares humanas. Los niveles de mRNA más elevados se encuentran en las líneas celulares MCF7, derivadas de

cáncer de mama, y la A431 que es una línea celular de carcinoma epidermoide de piel. También resultan muy destacados los altos niveles de expresión de la anexina A9 en la línea celular Hacat (queratinocitos inmortalizados). Estos resultados confirmarían los datos de microarrays, donde se observaba que las líneas celulares de cáncer de mama presentaban niveles de expresión génica de la anexina A9 más altos.⁴⁵

La expresión de la ANXA9 ha sido estudiada también en algunos tumores sólidos. En un estudio compuesto por 100 pacientes intervenidos quirúrgicamente por cáncer colo-rectal mostró que los pacientes con alta expresión de ANXA9 presentaban a un pronóstico significativamente peor, y aquellos con baja expresión de ANXA9 mostraron una mayor supervivencia en comparación con aquellos con alta expresión. Además, este estudio mostró que la expresión de ANXA9 es un factor de pronóstico independiente para el cáncer colo-rectal. Esto sugiere que la malignidad tumoral se correlaciona con la expresión de ANXA9 y que esto también puede afectar los valores de otros factores pronósticos en el análisis multivariante, como la metástasis a distancia. Los autores sugieren que una vía dependiente de ANXA9 puede estar involucrada en la progresión del cáncer colo-rectal⁷¹.

En otro estudio en cáncer colorrectal, los pacientes con alta expresión del gen ANXA9 también tuvieron una supervivencia general más baja⁷¹. Y en un tercero, la expresión de la proteína ANXA9 en el cáncer colorrectal fue mayor que en la mucosa normal, y se asoció con invasión y metástasis linfáticas y, en consecuencia, un peor pronóstico ⁷². En cáncer de mama, también se observó que la expresión del gen ANXA9 se asocia con metástasis óseas⁷³. Estos estudios sugieren un papel para ANXA9 en la

invasión y la metástasis, pero este papel no se pudo confirmar en los cánceres de cabeza y cuello de nuestro estudio, aunque los pacientes con expresión elevada de ANXA9 si que presentaban una mayor incidencia de recidivas loco-regionales (pero no significativa).

De forma similar comprobamos en nuestro estudio las observaciones descritas anteriormente con respecto al carcinoma de laringe ⁴⁵, y realizamos por primera vez la descripción de su expresión en carcinomas de hipofaringe.

Observamos una expresión de ANXA9 membranosa débil en las células más diferenciadas en el epitelio normal. En las células tumorales, la expresión es principalmente membranosa, similar a la observada para ANXA2⁷⁴ y la expresión de ANXA9 se asocia principalmente con el grado de diferenciación del tumor, con una mayor expresión en casos bien diferenciados. Esto es consistente con el aumento de ANXA9 observado en la diferenciación de los queratinocitos ⁷⁵. Sin embargo, la expresión de ANXA9 no se asoció con ningún otro parámetro clínico y patológico o con el pronóstico de los carcinomas de cabeza y cuello. Se obtuvieron resultados análogos al analizar los datos de RNAseq de las cohortes del TCGA de cáncer de cabeza y cuello disponibles. Por consiguiente, la regulación negativa de ANXA9 se detectó con frecuencia en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello a niveles tanto de ARNm como de proteína. Además, la expresión de ARNm de ANXA9 en los tumores se correlacionó inversamente con el grado de diferenciación histológica, lo que confirma nuestros datos de proteína IHC. Por lo tanto, en conjunto, estos resultados reflejan que los mecanismos reguladores de la transcripción contribuyen a la pérdida de expresión de ANXA9 en carcinomas

epidermoides de cabeza y cuello, como hemos demostrado previamente para los miembros relacionados funcionalmente y evolutivamente ANXA1 y ANXA2 ^{76,77}.

ANEXINA A10

Otro ejemplo de anexina atípica es la subfamilia anexina A10, caracterizada por la desaparición de tres o cuatro motivos tipo II de unión a calcio en distintas especies.

En este estudio describimos por vez primera la expresión de ANXA10 en carcinomas epidermoides de orofaringe, laringe e hipofaringe, hallando su expresión en el 64% de los casos. En relación a los parámetros patológicos, sólo se encontró relación con el grado de diferenciación, siendo menor la expresión en los tumores pobremente diferenciados. También se apreció una tendencia a una mayor expresión en los casos con recidiva tumoral, y en consecuencia a una menor supervivencia en los casos con expresión de ANXA10, aunque sin diferencias significativas.

La frecuente sobreexpresión hallada en nuestro estudio, y la ausencia de relación con parámetros patológicos, sugiere que la expresión de la anexina A10 podría tener un papel en la iniciación tumoral en cáncer de cabeza y cuello, pero no en la progresión.

En nuestro estudio confirmamos que, la anexina A10 no se expresaba (o muy débilmente) en el epitelio normal. También observamos que ANXA10 se expresaba de manera variable en el citoplasma de las células cancerosas. De acuerdo con esto, el análisis de los datos del transcriptoma del TCGA de cáncer de cabeza y cuello también demostró la regulación positiva de la expresión de ARNm de ANXA10 en tumores en comparación con el tejido normal correspondiente.

Además, encontramos que la expresión de ANXA10, como ANXA9, fue menor en los tumores poco diferenciados, pero no se relacionó con otros parámetros clínico-patológicos ni con el pronóstico. Sin embargo, no pudimos confirmar la correlación de la expresión de la proteína ANXA10 con el grado histológico utilizando los datos de RNAseq. Sin embargo, estos resultados aparentemente contradictorios pueden reflejar la contribución de mecanismos reguladores adicionales (por ejemplo, traslacionales o postraduccionales) que conducen a la frecuente regulación por incremento de la proteína ANXA10 en más del 60% de las muestras de tumores.

En otros carcinomas de cabeza y cuello, los carcinomas epidermoides orales, también se ha observado una sobreexpresión de la Anexina A10 en líneas celulares derivadas de estos carcinomas⁷⁸. Además, la regulación negativa de la ANXA10 produjo una disminución de la proliferación celular por inactivación de ERK. El análisis del ciclo celular también mostró que la detención en G1 se produjo en las células sin ANXA10 a través de la expresión disminuida de los inhibidores de las quinasas dependientes de ciclina (CDKIs: p21Cip1 y p27Kip1). También se observó que, como en nuestro estudio, ANXA10 se regulaba al alza con frecuencia en los carcinomas orales primarios, y la expresión más alta de ANXA10 se asociaba con un mayor tamaño tumoral ($p = 0,027$). Estos resultados sugieren que la ANXA10 está relacionada con la regulación del ciclo celular en la fase G1 y puede jugar un papel importante en la progresión tumoral en los carcinomas orales. Para determinar si la función de la ANXA10 es relevante para la progresión de los carcinomas orales, se realizaron estudios funcionales usando shRNA, observando que la supresión de ANXA10 disminuía significativamente la proliferación celular como resultado de la vía de señalización inhibida de MAPK con regulación negativa

de pERK. Estos resultados indicaron que la expresión de ANXA10 era relevante para la fosforilación de ERK y la activación de la vía de señalización ERK / MAPK. La vía ERK / MAPK está estrechamente controlada por mecanismos de señales extracelulares. Esto incluye el control de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular, lo que permite que el Ca^{2+} sirva como un segundo mensajero⁷⁹. Las anexinas, una familia de proteínas altamente protegidas como Ca^{2+} , se caracterizan por su capacidad de unirse a los fosfolípidos de una manera dependiente de Ca^{2+} y la mayoría de las funciones de anexina están relacionadas con su capacidad para interactuar con las membranas celulares de manera regulada^{32,80}. En base a estas evidencias combinadas con los resultados descritos, sugieren que ANXA10 puede afectar la homeostasis del Ca^{2+} intracelular y que interactúa directa o indirectamente con la activación de las vías de señalización de ERK / MAPK⁸¹. En conclusión, este estudio indica que la ANXA10 se sobreexpresa con frecuencia en los carcinomas orales y que esta sobreexpresión puede asociarse con progresión tumoral al promover la progresión del ciclo celular en la fase G1 a través de la activación de la vía de señalización ERK / MAPK, lo que conduce a la disminución de la expresión de CDKIs. Aunque se necesitan más estudios para estudiar la interacción de ANXA10 y la vía de señalización ERK / MAPK, estos datos sugieren que ANXA10 desempeña un papel importante en la proliferación celular y es probable que la expresión sea un biomarcador de progresión y un posible objetivo terapéutico en los carcinomas orales.

Otros cánceres relacionados con los de cabeza y cuello son los de esófago. Los dos tipos principales de cáncer de esófago son el adenocarcinoma esofágico (AE) y el carcinoma escamoso esofágico (ESCC). En un estudio que evaluó el transcriptoma de AE

en comparación con el esófago de Barrett (EB), el epitelio metaplásico que predispone a AE, y el transcriptoma de ESCC con el epitelio escamoso esofágico normal, también se halló una expresión aumentada de la ANXA10 en el ESCC y en el EB^{82,57}. Estos datos, junto con los anteriormente comentados, sugieren que la expresión aumentada de la ANXA10 parece un evento común a los carcinomas escamosos aerodigestivos.

Pero la ANXA10 también se ha descrito desregulada en muchos otros tipos tumorales, pero en sentido contrario: la disminución de su expresión asociada a la progresión tumoral. Un estudio analizó la expresión del ARNm de ANXA10 en varios carcinomas comunes de otros sitios anatómicos como: carcinoma hepatocelular (n=182), hepatoblastoma (n=5), colangiocarcinoma (n=2), carcinoma colorrectal metastásico (n=10), hiperplasia nodular focal (n=9), carcinoma de ovario (n=16), carcinoma de pulmón (n=3), y carcinoma de mama (n=10). El ARNm de ANXA10 se expresó en lesiones hepáticas benignas, como la hiperplasia nodular focal, y disminuyó drásticamente en el hepatoblastoma. El ARNm de ANXA10 se redujo también en 121 (66%) carcinomas hepatocelulares, y era indetectable o débilmente expresado en carcinomas de ovario, mama, colon y pulmón, y carcinomas metastásicos de hígado. Además, el HCC con regulación negativa de ANXA10 se asoció con una tasa de supervivencia del paciente menor a los 4 años que el CHC con expresión normal de ANXA10 (54% versus 33%, P= 0,0014)⁸³.

También en el cáncer gástrico la disminución de la expresión de la ANXA10 se ha asociado con la progresión tumoral. La pérdida de ADN del locus ANXA10 se encontró en

varias líneas celulares de cáncer gástrico mediante la hibridación genómica comparativa (CGH), y estas líneas celulares mostraron expresión disminuida de ANXA10 mediante análisis de microarrays de oligonucleótidos. Para evaluar más a fondo la importancia de la expresión proteica ANXA10 en el carcinoma gástrico, se completó el estudio con inmunohistoquímica en 585 pacientes utilizando anticuerpo policlonal ANXA10. Mientras que ANXA10 se observó principalmente en el núcleo del epitelio gástrico normal, se obtuvieron resultados de tinción nuclear débil o negativa para 289 (49,4%) de los 585 carcinomas gástricos. Cuando se analizaron las asociaciones entre la regulación negativa de ANXA10 y los parámetros clinicopatológicos, la pérdida de ANXA10 se encontró correlacionada con T ($p=0,011$), estadio avanzado ($p=0,001$) y metástasis ganglionares ($p=0,001$). Además, las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier revelaron que los pacientes con un nivel bajo de proteína ANXA10 tenían un pronóstico desfavorable ($p<0,016$). Sin embargo, no hubo diferencias significativas de supervivencia en el análisis multivariado entre los sujetos con carcinomas gástricos positivos ANXA10 y aquellos con carcinomas gástricos negativos ANXA10. Estos autores expandieron el análisis de expresión a otros cánceres humanos primarios, y se encontró que ANXA10 se redujo notablemente en la mayoría de las muestras de cáncer.

En este estudio, se demostró también una correlación entre la expresión de ANXA10 y la diferenciación del carcinoma gástrico mediante examen histológico. La expresión de ANXA10 se redujo en el adenocarcinoma mucinoso, lo que sugiere que la pérdida de ANXA10 puede reflejar la pérdida de la función exocitótica durante el proceso de dediferenciación en la carcinogénesis gástrica. Además, la baja expresión de ANXA10 también se asoció con un mal pronóstico. Estos hallazgos sugieren que el gen ANXA10 es un supresor tumoral en el carcinoma gástrico y que puede desempeñar un papel similar

en otros carcinomas También sugieren que la inactivación de ANXA10 por eliminación cromosómica puede desempeñar un papel durante la progresión del cáncer gástrico⁶¹. Los resultados de este estudio son consistentes con los hallazgos previos que sugieren que ANXA10 podría actuar como un supresor tumoral en las células del cáncer gástrico al restringir el crecimiento celular e inducir la apoptosis basal⁵².

En relación con el cáncer colo-rectal, en un estudio se identificaron tres genes (TFF2, FABP6 y ANXA10) como candidatos cuya expresión puede diferenciar los pólipos serrados/sésiles (SSA / Ps, con riesgo de malignización) de los pólipos hiperplásicos microvesiculares (MVHP, sin riesgo de malignidad), y las diferencias en la expresión se confirmaron mediante RT-PCR cuantitativa. ANXA10 mostró la mayor capacidad para diferenciar estos pólipos, por lo que su expresión se evaluó mediante inmunohistoquímica en muestras de SSA / Ps (n = 26), MVHP (n = 21) y colon normal (n = 9)⁸⁴.

De acuerdo con los microarrays y los experimentos cuantitativos de RT-PCR, la expresión inmunohistoquímica de ANXA10 se incrementó marcadamente en SSA / Ps en comparación con los MVHP ($p < 0,0001$). Un puntaje ANXA10 ≥ 3 tiene una sensibilidad del 73% y una especificidad del 95% en el diagnóstico de un SSA / P. La expresión de ANXA10 puede ser un marcador potencial de la vía serrada para el cáncer de colon⁶⁵.

Aunque se cree que la vía de la neoplasia serrada está implicada en la mayoría de los carcinomas colorrectales esporádicos (CCR) con inestabilidad de microsatélites (MSI-H), las implicaciones clinicopatológicas de la expresión de ANXA10 en CCR eran desconocidas hasta que se evaluó el estado de expresión ANXA10 en 168 CRCs MSI-H por

inmunohistoquímica. Se hallaron 28 casos (17%) con tumores ANXA10 positivos (ANXA10+) nuclear. La mayoría de los tumores ANXA10+ se localizaron en el colon proximal (96%, $p < 0,001$). El análisis de supervivencia no reveló una importancia pronóstica de la expresión de ANXA10 en MSI-H CRC. Pero los tumores ANXA10+ se asociaron significativamente con cánceres en estadio más avanzado (estadio III o IV, $p = 0,008$), esta asociación implica que la expresión de ANXA10 puede estar relacionada con la promoción de la invasión tumoral o el potencial metastásico en CRC^{85,84,86,87,88}. Por tanto, dependiendo del tipo histológico y la localización tumoral, la expresión de la ANXA10 parece ser favorecedora o inhibidora del crecimiento tumoral.

La sobreexpresión de ANXA10 también se ha relacionado con el adenocarcinoma de páncreas. Está ampliamente aceptado que el adenocarcinoma de páncreas (PDAC) se desarrolla a través de una serie de lesiones precursoras llamadas neoplasia intraepitelial pancreática (PanIN); se realizó un ensayo de inmunotinción para evaluar la expresión de ANXA10 en 155 muestras de tejido humano, incluyendo páncreas normal, pancreatitis crónica (CP), adenocarcinoma pancreático (PDAC), neoplasia intraepitelial pancreática (PanIN, el precursor más importante de PDAC), y neoplasia mucinosa papilar intraductal (IPMN). El resultado de la inmunotinción mostró que ANXA10 estaba significativamente sobreexpresada en PanINs, IPMN y PDAC, pero era negativo en páncreas normal y en la mayoría de los tejidos de pancreatitis crónica. El análisis estadístico reveló que la expresión de ANXA10 se asoció significativamente con PDAC y sus lesiones precursoras ($p < 0,0001$). La expresión abundante de ANXA10 estaba predominantemente presente en células epiteliales ductales pancreáticas de PanINs, IPMN y células tumorales de PDAC. Dado que PDAC se desarrolla a través de una serie de PanINs que a su vez surgen de

conductos pancreáticos, la sobreexpresión consistente de ANXA10 en células epiteliales ductales en PanINs y PDACs pero negativa en conductos pancreáticos normales sugiere que ANXA10 podría servir como un marcador potencial que indica la presencia de PDAC en sus primeras etapas precancerosas⁸⁹.

Otros trabajos han descrito la asociación de la ANXA10 y la progresión del cáncer de vejiga^{90,91}. Pero nuevamente, en esta localización, es la expresión disminuida la que se asocia con la progresión tumoral. Analizando los perfiles de expresión génica tumoral de pacientes con cáncer de vejiga (CV) T1G3 progresivo y no progresivo, un total de 1294 genes se encontraron diferencialmente expresados entre pacientes progresivos y no progresivos. La expresión diferencial de 15 genes fue validada por qPCR en un conjunto adicional de muestras. Una firma de expresión de cinco genes (ANXA10, DAB2, HYAL2, SPOCD1 y MAP4K1) discriminó a los pacientes con CV T1G3 progresivo y no progresivo con una sensibilidad del 79% y una especificidad del 86% (AUC = 0,83), sirviendo para identificar pacientes con T1G3 BC con un alto riesgo de progresión⁹².

Otro estudio en carcinoma de vejiga muestra que la baja expresión de ARNm de ANXA10 se asoció con la presencia de carcinoma in situ y una menor supervivencia libre de progresión. Además, la expresión determinada por inmunohistoquímica de ANXA10 fue capaz de estratificar a los pacientes en riesgo de progresión de la enfermedad en tumores de vejiga no músculo-invasivos y en riesgo de desarrollar metástasis en cánceres invasivos del músculo. Además, la regulación negativa de ANXA10 en una línea celular de cáncer de vejiga indujo una mayor proliferación y migración. Estos resultados indican que la expresión baja de ANXA10 es un marcador de metástasis en el cáncer de vejiga invasivo muscular^{58,59}.

Los autores concluyen que la expresión de la ANXA10 puede ser un marcador clínico relevante para predecir el resultado tanto en etapas tempranas como avanzadas del cáncer de vejiga⁹³.

Las estatinas han sido recientemente estudiadas por sus efectos proapoptóticos y antimetastásicos. Sin embargo, los mecanismos exactos de sus acciones contra el cáncer siguen sin estar claros. Usando microarrays, se descubrió la regulación positiva de anexina A10 (ANXA10) en líneas celulares de cáncer prostático humano después del tratamiento con simvastatina. La simvastatina inhibió la proliferación, la migración y la invasión de celular y el nivel de expresión de ANXA10 estaba regulado positivamente. En muestras de biopsia de próstata humana, la expresión de ARNm de ANXA10 fue significativamente menor en el grupo de cáncer de próstata que en el grupo de hiperplasia prostática benigna. También se apreció que la regulación positiva de ANXA10 en los cultivos celulares dio como resultado la disminución de la proteína de unión a calcio S100 A4 (S100A4), que se ha correlacionado con agresividad y un peor pronóstico para pacientes con diferentes tipos de carcinomas. Estos resultados sugieren nuevamente que es la expresión disminuida de la ANXA10 la que se asocia con la progresión del cáncer de próstata. Y que a través de la regulación de la expresión de la ANXA10, las estatinas pueden ser beneficiosas en la prevención y / o tratamiento del cáncer de próstata⁹⁴.

En conjunto, los resultados de nuestro estudio y los publicados sobre otras localizaciones sugieren que la ANXA10 puede comportarse como oncogén o gen supresor tumoral dependiendo de la localización y tipo histológico tumoral. Parece comportarse como oncogén en los carcinomas escamosos de la vía aerodigestiva y como gen supresor tumoral en adenocarcinomas de diferentes localizaciones

CONCLUSIONES

De la interpretación de nuestros resultados y de su discusión obtenemos las siguientes conclusiones:

1. La expresión de Anexina A9 en el epitelio escamoso estratificado no queratinizado se restringe a las capas diferenciadas del epitelio, con ausencia de expresión en las células basales y parabasales.
2. La expresión de la Anexina A9 se encuentra frecuentemente disminuida en el 42% de los carcinomas epidermoides de laringe y faringe, respecto al epitelio sano.
3. La Anexina A10 no se expresa en el epitelio sano, mientras se detectó de forma variable en el citoplasma de las células cancerosas. El 64% de los tumores mostraban expresión positiva de Anexina A10.
4. La expresión de las Anexinas A9 y A10 en tumores se asoció significativamente con el grado de diferenciación histológico y con la localización orofaríngea. No se hallaron correlaciones con otros parámetros clínico-patológicos, ni con el pronóstico o supervivencia de los pacientes.
5. Se encontró una correlación significativa entre la expresión de las Anexinas A9 y A10.
6. El análisis bioinformático de datos procedentes de la TCGA permitió demostrar que los niveles de ARNm de ANXA9 disminuyen significativamente en los tumores primarios en comparación con el correspondiente tejido normal, mientras que los niveles de ARNm de ANXA10 aumentan en los tumores frente al tejido normal.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bordonaro, M., Lazarova, D. L., Augenlicht, L. H. & Sartorelli, A. C. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int. J. Cancer* **97**, 72–81 (2002).
2. Drop, B., Strycharz-Dudziak, M., Kliszczewska, E. & Polz-Dacewicz, M. Coinfection with Epstein–Barr Virus (EBV), Human Papilloma Virus (HPV) and Polyoma BK Virus (BKPyV) in Laryngeal, Oropharyngeal and Oral Cavity Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 2752 (2017).
3. Boyle, P. & Ferlay, J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **16**, 481–8 (2005).
4. Sturgis, E. M. The international head and neck cancer epidemiology consortium. *Head Neck* **33**, 141–141 (2011).
5. Torrente, M. C. *et al.* Human papillomavirus infections in laryngeal cancer. *Head Neck* **33**, 581–6 (2011).
6. Rautava, J. & Syrjänen, S. Biology of human papillomavirus infections in head and neck carcinogenesis. *Head Neck Pathol.* **6 Suppl 1**, S3-15 (2012).
7. Brandwein-Gensler, M. *et al.* Validation of the histologic risk model in a new cohort of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* **34**, 676–88 (2010).
8. Pfister, D. G. *et al.* Head and neck cancers, Version 2.2014. Clinical practice guidelines in oncology. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* **12**, 1454–87 (2014).

9. Takes, R. P. *et al.* Future of the TNM classification and staging system in head and neck cancer. *Head Neck* **32**, 1693–711 (2010).
10. Stoeckli, S. J., Alkureishi, L. W. T. & Ross, G. L. Sentinel node biopsy for early oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* **266**, 787–93 (2009).
11. Díaz-Molina, J. P. *et al.* Functional and oncological results of non-surgical vs surgical treatment in squamous cell carcinomas of the oropharynx. *Acta Otorrinolaringol. Esp.* **63**, 348–54 (2012).
12. American Society of Clinical Oncology, D. G. *et al.* American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline for the use of larynx-preservation strategies in the treatment of laryngeal cancer. *J. Clin. Oncol.* **24**, 3693–704 (2006).
13. Bonner, J. A. *et al.* Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N. Engl. J. Med.* **354**, 567–78 (2006).
14. Wang, Z. *et al.* mTOR Co-Targeting in Cetuximab Resistance in Head and Neck Cancers Harboring PIK3CA and RAS Mutations. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **106**, (2014).
15. Leemans, C. R., Braakhuis, B. J. M. & Brakenhoff, R. H. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 9–22 (2011).
16. Economopoulou, P., Kotsantis, I. & Psyrri, A. The promise of immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma: combinatorial immunotherapy approaches. *ESMO Open* **1**, e000122 (2017).
17. Chow, L. Q. M. *et al.* Antitumor Activity of Pembrolizumab in Biomarker-

- Unselected Patients With Recurrent and/or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Results From the Phase Ib KEYNOTE-012 Expansion Cohort. *J. Clin. Oncol.* **34**, 3838–3845 (2016).
18. Tahara, M. *et al.* Pembrolizumab in Asia-Pacific patients with advanced head and neck squamous cell carcinoma: Analyses from KEYNOTE-012. *Cancer Sci.* **109**, 771–776 (2018).
 19. Wang, Z., Valera, J. C., Zhao, X., Chen, Q. & Silvio Gutkind, J. mTOR co-targeting strategies for head and neck cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev.* **36**, 491–502 (2017).
 20. Leemans, C. R., Tiwari, R., Nauta, J. J., van der Waal, I. & Snow, G. B. Regional lymph node involvement and its significance in the development of distant metastases in head and neck carcinoma. *Cancer* **71**, 452–6 (1993).
 21. Al-Othman, M. O. F., Morris, C. G., Hinerman, R. W., Amdur, R. J. & Mendenhall, W. M. Distant metastases after definitive radiotherapy for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* **25**, 629–633 (2003).
 22. Taneja, C., Allen, H., Koness, R. J., Radie-Keane, K. & Wanebo, H. J. Changing patterns of failure of head and neck cancer. *Arch. Otolaryngol. Head. Neck Surg.* **128**, 324–7 (2002).
 23. Merino, O. R., Lindberg, R. D. & Fletcher, G. H. An analysis of distant metastases from squamous cell carcinoma of the upper respiratory and digestive tracts. *Cancer* **40**, 145–51 (1977).
 24. Li, X. *et al.* Clinicopathologic risk factors for distant metastases from head and neck

- squamous cell carcinomas. *Eur. J. Surg. Oncol.* **35**, 1348–53 (2009).
25. Coca-Pelaz, A., Rodrigo, J. P. & Suárez, C. Clinicopathologic analysis and predictive factors for distant metastases in patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck* **34**, 771–5 (2012).
 26. Ferlito, A., Shaha, A. R., Silver, C. E., Rinaldo, A. & Mondin, V. Incidence and sites of distant metastases from head and neck cancer. *ORL. J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.* **63**, 202–7 (2001).
 27. León, X., Quer, M., Orús, C., del Prado Venegas, M. & López, M. Distant metastases in head and neck cancer patients who achieved loco-regional control. *Head Neck* **22**, 680–6 (2000).
 28. de Bree, R., Deurloo, E. E., Snow, G. B. & Leemans, C. R. Screening for distant metastases in patients with head and neck cancer. *Laryngoscope* **110**, 397–401 (2000).
 29. Alvi, A. & Johnson, J. T. Development of distant metastasis after treatment of advanced-stage head and neck cancer. *Head Neck* **19**, 500–5 (1997).
 30. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
 31. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–74 (2011).
 32. Gerke, V. & Moss, S. E. Annexins : From Structure to Function. *Physiol. Rev* **82**, 331–371 (2002).
 33. Rescher, U. Annexins - unique membrane binding proteins with diverse functions.

- J. Cell Sci.* **117**, 2631–2639 (2004).
34. Sopkova, J., Gallay, J., Vincent, M., Pancoska, P. & Lewit-Bentley, A. The dynamic behavior of annexin V as a function of calcium ion binding: a circular dichroism, UV absorption, and steady-state and time-resolved fluorescence study. *Biochemistry* **33**, 4490–9 (1994).
 35. Rescher, U., Ruhe, D., Ludwig, C., Zobiack, N. & Gerke, V. Annexin 2 is a phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding protein recruited to actin assembly sites at cellular membranes. *J. Cell Sci.* **117**, 3473–80 (2004).
 36. Morgan, R. O. *et al.* Novel Human and Mouse Annexin A10 Are Linked to the Genome Duplications during Early Chordate Evolution. *Genomics* **60**, 40–49 (1999).
 37. Moss, S. E. & Morgan, R. O. The annexins. *Genome Biol.* **5**, 219 (2004).
 38. Morgan, R. O. & Fernandez, M. P. Expression profile and structural divergence of novel human annexin 31. *FEBS Lett.* **434**, 300–4 (1998).
 39. Filipenko, N. R., MacLeod, T. J., Yoon, C.-S. & Waisman, D. M. Annexin A2 is a novel RNA-binding protein. *J. Biol. Chem.* **279**, 8723–31 (2004).
 40. Tomas, A. & Moss, S. E. Calcium- and cell cycle-dependent association of annexin 11 with the nuclear envelope. *J. Biol. Chem.* **278**, 20210–6 (2003).
 41. Babiychuk, E. B. & Draeger, A. Annexins in cell membrane dynamics. Ca²⁺-regulated association of lipid microdomains. *J. Cell Biol.* **150**, 1113–24 (2000).
 42. Burkart, A., Samii, B., Corvera, S. & Shpetner, H. S. Regulation of the SHP-2 tyrosine

- phosphatase by a novel cholesterol- and cell confluence-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **278**, 18360–7 (2003).
43. Benaud, C. *et al.* AHNAK interaction with the annexin 2/S100A10 complex regulates cell membrane cytoarchitecture. *J. Cell Biol.* **164**, 133–44 (2004).
 44. Morgan, R. O., Bell, D. W., Testa, J. R. & Fernandez, M. P. Human annexin 31 genetic mapping and origin. *Gene* **227**, 33–8 (1999).
 45. Garcia, M. Anexinas - Evolución Molecular , Predicción de Nuevos Motivos Funcionales y Estudios Experimentales de Modelos Atípicos TESIS DOCTORAL. *Universidad de Oviedo* (2011).
 46. Monastyrskaya, K., Babiychuk, E. B. & Draeger, A. The annexins: Spatial and temporal coordination of signaling events during cellular stress. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 2623–2642 (2009).
 47. Mussunoor, S. & Murray, G. I. The role of annexins in tumour development and progression. *Journal of Pathology* **216**, 131–140 (2008).
 48. Huber, R. *et al.* Crystal and molecular structure of human annexin V after refinement. Implications for structure, membrane binding and ion channel formation of the annexin family of proteins. *J. Mol. Biol.* **223**, 683–704 (1992).
 49. Goosney, D. L., DeVinney, R. & Finlay, B. B. Recruitment of cytoskeletal and signaling proteins to enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* pedestals. *Infect. Immun.* **69**, 3315–22 (2001).
 50. Morgan, R. O., Martin-Almedina, S., Garcia, M., Jhoncon-Kooyip, J. & Fernandez, M.-P. Deciphering function and mechanism of calcium-binding proteins from their

- evolutionary imprints. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**, 1238–49 (2006).
51. Bitto, E. & Cho, W. Roles of individual domains of annexin I in its vesicle binding and vesicle aggregation: a comprehensive mutagenesis study. *Biochemistry* **37**, 10231–7 (1998).
 52. Kim, J. K. *et al.* Decreased expression of Annexin A10 in gastric cancer and its overexpression in tumor cell growth suppression. *Oncol. Rep.* **24**, 607–612 (2010).
 53. López-Pedrerera, C. *et al.* Proteomic analysis of acute myeloid leukemia: Identification of potential early biomarkers and therapeutic targets. *Proteomics* **6 Suppl 1**, S293-9 (2006).
 54. Mittag, J. *et al.* Expression and thyroid hormone regulation of annexins in the anterior pituitary. *J. Endocrinol.* **195**, 385–92 (2007).
 55. Tsuchiya, S. *et al.* Characterization of gene expression profiles for different types of mast cells pooled from mouse stomach subregions by an RNA amplification method. *BMC Genomics* **10**, 35 (2009).
 56. Nakato, G. *et al.* New approach for m-cell-specific molecules screening by comprehensive transcriptome analysis. *DNA Res.* **16**, 227–35 (2009).
 57. Van Baal, J. W. P. M. *et al.* MICROARRAYS AND OTHER NEW TECHNOLOGIES A Comparative Analysis by SAGE of Gene Expression Profiles of Barrett's Esophagus, Normal Squamous Esophagus, and Gastric Cardia. doi:10.1053/j.gastro.2005.07.026
 58. Liu, S.-H. *et al.* Down-Regulation of Annexin A10 in Hepatocellular Carcinoma Is Associated with Vascular Invasion, Early Recurrence, and Poor Prognosis in Synergy

- with p53 Mutation. *Am. J. Pathol.* **160**, 1831–1837 (2002).
59. Munksgaard, P. P. *et al.* Low ANXA10 expression is associated with disease aggressiveness in bladder cancer. *Br. J. Cancer* **105**, 1379–87 (2011).
60. Shimizu, T. *et al.* Annexin A10 in Human Oral Cancer: Biomarker for Tumoral Growth via G1/S Transition by Targeting MAPK Signaling Pathways. *PLoS One* **7**, 1–9 (2012).
61. Kim, J., Kim, M. A., Chang, D. J., Eun, J. J. & Woo, H. K. Reduced expression and homozygous deletion of annexin A10 in gastric carcinoma. *Int. J. Cancer* **125**, 1842–1850 (2009).
62. Bando, K. *et al.* Identification of a 1-cM region of common deletion on 4q35 associated with progression of hepatocellular carcinoma. *Genes. Chromosomes Cancer* **25**, 284–9 (1999).
63. Wong, N. *et al.* Assessment of Genetic Changes in Hepatocellular Carcinoma by Comparative Genomic Hybridization Analysis Relationship to Disease Stage, Tumor Size, and Cirrhosis. *Am. J. Pathol.* **154**, 37–43 (1999).
64. Mengual, L. *et al.* Gene Expression Signature in Urine for Diagnosing and Assessing Aggressiveness of Bladder Urothelial Carcinoma. *Imaging* doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-3373
65. Gonzalo, D. H. *et al.* Gene expression profiling of serrated polyps identifies annexin A10 as a marker of a sessile serrated adenoma/polyp. *J. Pathol.* **230**, 420–429 (2013).
66. Cancer Genome Atlas Network, T. C. G. A. N. Comprehensive genomic

- characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* **517**, 576–582 (2015).
67. Elsner, M. *et al.* MALDI imaging mass spectrometry reveals COX7A2, TAGLN2 and S100-A10 as novel prognostic markers in Barrett's adenocarcinoma. *J. Proteomics* **75**, 4693–704 (2012).
68. Goebeler, V., Ruhe, D., Gerke, V. & Rescher, U. Atypical properties displayed by annexin A9, a novel member of the annexin family of Ca²⁺ and lipid binding proteins. (2003). doi:10.1016/S0014-5793(03)00634-3
69. Chlystun, M., Markoff, A. & Gerke, V. Structural and functional characterisation of the mouse annexin A9 promoter. (2004). doi:10.1016/j.bbamcr.2004.08.017
70. Morgan, R. O., Bell, D. W., Testa, J. R. & Fernandez, M. P. Human annexin 31 genetic mapping and origin. *Gene* **227**, 33–8 (1999).
71. Miyoshi N, Yamamoto H, Mimori K, Yamashita S, Miyazaki S, Nakagawa S, Ishii H, Noura S, Ohue M, Yano M, Doki Y, M. M. ANXA9 gene expression in colorectal cancer: A novel marker for prognosis. *Oncol. Lett.* **8**, 2313–2317 (2014).
72. Yu, S., Bian, H., Gao, X. & Gui, L. Annexin A9 promotes invasion and metastasis of colorectal cancer and predicts poor prognosis. *Int. J. Mol. Med.* **41**, 2185–2192 (2018).
73. Smid, M. *et al.* Genes associated with breast cancer metastatic to bone. *J. Clin. Oncol.* **24**, 2261–7 (2006).
74. Pablo, J. *et al.* Annexin A2 Expression in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **58**, 257–262 (2015).

75. Nguyen, V. T., Ndoye, A. & Grando, S. A. Pemphigus Vulgaris Antibody Identifies Pemphaxin A NOVEL KERATINOCYTE ANNEXIN-LIKE MOLECULE BINDING ACETYLCHOLINE*. *J. Biol. Chem.* **275**, 29466–29476 (2000).
76. Álvarez-Teijeiro, S. *et al.* Annexin A1 down-regulation in head and neck squamous cell carcinoma is mediated via transcriptional control with direct involvement of miR-196a/b. *Sci. Rep.* **7**, 6790 (2017).
77. Pena-Alonso, E. *et al.* Annexin A2 localizes to the basal epithelial layer and is down-regulated in dysplasia and head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Lett.* **263**, 89–98 (2008).
78. Yamano, Y. *et al.* Hyaluronan-mediated motility: a target in oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Oncol.* **32**, 1001–9 (2008).
79. Cook, S. J. & Lockyer, P. J. Recent advances in Ca(2+)-dependent Ras regulation and cell proliferation. *Cell Calcium* **39**, 101–12 (2006).
80. Gerke, V., Creutz, C. E. & Moss, S. E. Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 449–61 (2005).
81. Shimizu, T. *et al.* Annexin A10 in Human Oral Cancer: Biomarker for Tumoral Growth via G1/S Transition by Targeting MAPK Signaling Pathways. *PLoS One* **7**, e45510 (2012).
82. Van Baal, J. W. P. M. *et al.* A comparative analysis by SAGE of gene expression profiles of esophageal adenocarcinoma and esophageal squamous cell carcinoma. *Cell. Oncol.* **30**, 63–75 (2008).
83. Liu, S.-H. *et al.* Down-regulation of annexin A10 in hepatocellular carcinoma is

- associated with vascular invasion, early recurrence, and poor prognosis in synergy with p53 mutation. *Am. J. Pathol.* **160**, 1831–7 (2002).
84. Tsai, J.-H. *et al.* Aberrant expression of annexin A10 is closely related to gastric phenotype in serrated pathway to colorectal carcinoma. *Mod. Pathol.* **28**, 268–78 (2015).
 85. Kim, J. H. *et al.* Annexin A10 expression correlates with serrated pathway features in colorectal carcinoma with microsatellite instability. *Apmis* **122**, 1187–1195 (2014).
 86. Sajanti, S. A. *et al.* Annexin A10 is a marker for the serrated pathway of colorectal carcinoma. *Virchows Arch.* **466**, 5–12 (2015).
 87. Väyrynen, S. A. *et al.* Ectopic crypt foci in conventional and serrated colorectal polyps. 1063–1069 (2016). doi:10.1136/jclinpath-2015-203593
 88. Bae, J. M. *et al.* Annexin A10 expression in colorectal cancers with emphasis on the serrated neoplasia pathway. *World J. Gastroenterol.* **21**, 9749–57 (2015).
 89. Zhu, J. *et al.* Annexin A10 is a candidate marker associated with the progression of pancreatic precursor lesions to adenocarcinoma. *PLoS One* **12**, e0175039 (2017).
 90. Lu, S. H., Yuan, R. H., Chen, Y. L., Hsu, H. C. & Jeng, Y. M. Annexin A10 is an immunohistochemical marker for adenocarcinoma of the upper gastrointestinal tract and pancreatobiliary system. *Histopathology* **63**, 640–648 (2013).
 91. Pichler, R. *et al.* Increased accuracy of a novel mRNA-based urine test for bladder cancer surveillance. *BJU Int.* **121**, 29–37 (2018).

92. Van Der Heijden, A. G. *et al.* A five-gene expression signature to predict progression in T1G3 bladder cancer ScienceDirect. *Eur. J. Cancer* **64**, 127–136 (2016).
93. F., M. *et al.* Annexin A10 (ANXA10) is a marker for metastasis and disease progression in bladder cancer. *European Journal of Cancer, Supplement* **8**, 36–37 (2010).
94. Miyazawa, Y. *et al.* Simvastatin Up-Regulates Annexin A10 That Can Inhibit the Proliferation, Migration, and Invasion in Androgen-Independent Human Prostate Cancer Cells. *Prostate* **77**, 337–349 (2017).

ANEXOS

Congresos:

65 Congreso Nacional de la SEORL PCF

Madrid, 17 al 20 de octubre de 2014

Reg. n.º 323

El Dr. Miguel A. Aristegui Ruiz, Secretario General de la Sociedad Española de Otorrinolaringología y Patología Cérvico-Facial

CERTIFICA

Que la COMUNICACIÓN FÓRUM DE INVESTIGACIÓN titulada

"Expresión de anexinas A9 y A10 en cáncer epidermoide de cabeza y cuello"

de los Dres. Salom Lucena, Ma. Cecilia; Rodrigo Tapia, Juan*; García Pedrero, Juana**; Pacheco Coronel, Esteban*; Suárez Nieto, Carlos*.*

**Hospital Universitario Central de Asturias. **Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias.*

ha sido presentada y leída durante el 65 Congreso Nacional de la Sociedad Española de Otorrinolaringología y Patología Cérvico-Facial, celebrado en Madrid del 17 al 20 de octubre de 2014.

Y para que conste y a instancias del interesado, lo firma en Madrid, a veinte de octubre de dos mil catorce.



Miguel A. Aristegui Ruiz
Secretario General



Prague, 22nd February 2016

CONFIRMATION

We hereby confirm that the following abstracts were presented at the
3rd Congress of European ORL-HNS,
held in Prague, Czech Republic on 7-11 June 2015:

Title: ANNEXIN A9 AND A10 EXPRESSION IN HEAD AND NECK SQUAMOUS
CELL CARCINOMA

Authors: Salom M. C., Rodrigo J. P., Garcia J., Pacheco E. R., Rivas F. J., Garcia F.

Presentation format: poster

Title: PRELIMINARY RESULTS OF A CONSERVATIVE TREATMENT PROTOCOL
ORGAN IN ADVANCED CANCER OF THE LARYNX AND HYPOPHARYNX

Authors: Salom M. C., Martinez P., Pacheco E. R., Blay P., De la Rúa A., Alonso R.,
Rodrigo J. P.

Presentation format: poster

On behalf of the Organizing Committee

Jan Betka, MD, DrSc, FCMA
Professor of Otolaryngology
Congress President ORL-HNS 2015

Congress Secretariat
GUARANT International

Na Pankrácí 17, 140 21 Prague 4, Czech Republic, tel.: +420 284 001 444, fax: +420 284 001 448, e-mail: orl-hns2015@guarant.cz

ACTIVIDADES

TRANSVERSALES:



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
 University of Oviedo

EXP-00066445

RESOLUCIÓN DE LA SOLICITUD DE RECONOCIMIENTO DE FORMACIÓN TRANSVERSAL

Examinada la solicitud de don/doña MARIA CECILIA SALOM LUCENA con DNI Y1679730P, la Comisión Académica del PROGRAMA OFICIAL DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA Y ONCOLOGÍA MOLECULAR en su reunión del 17 de mayo de 2019 acordó reconocer la formación denominada "Curso de estadística multivariante práctica Tenerife, 11 de octubre de 2018. 4 horas" como 4 horas de formación transversal.

Compruebe que esta resolución ha sido correctamente subida a su carpeta de Colab "Anexos/Actividades Formativas transversales"

Contra la Resolución, cabe recurso de alzada ante el Rectorado, en el plazo de un mes, a partir del día siguiente al de la notificación, de conformidad con el art. 122 de la Ley 39/2015, de 1 de octubre, de Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas

E/ La Presidenta/ta de la Comisión Académica

Código de Verificación Electrónica: 56266445-9a26-44bf-8366-c231327c7f5e Permita la verificación de la integridad de una copia de este documento electrónico en la dirección http://sede.uniovi.es/validador/validacion		
Firmante	Universidad de Oviedo	
Fecha y hora de la firma	17/05/2019 14:33:08 GMT+0200	
Emisor del certificado firmante	O=FNMT-RCM, C=ES, OU=AC Componentes Informáticos	



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
 University of Oviedo

LA UNIVERSIDAD DE OVIEDO

CERTIFICA

Que

MARIA CECILIA SALOM LUCENA

con Documento Identificativo nº Y1679730P

ha asistido al curso

**BÚSQUEDAS BIBLIOGRÁFICAS Y GESTIÓN DE LA INFORMACIÓN PARA LA
 INVESTIGACIÓN. FUENTES DE REFERENCIA (NIVEL I)**

desarrollado por esta Universidad dentro del Programa de Formación Transversal de Doctorado del Centro Internacional de Postgrado celebrado en las fechas siguientes

Fechas de impartición	11 y 12 de noviembre de 2016
Horas lectivas	20

Y para que conste, a los efectos oportunos, expide el presente Certificado en Oviedo a
 23 de enero de 2017

Código de Verificación Electrónica: 4f88aedf-8287-4368-8b0f-b882488d790f Permite la verificación de la integridad de una copia de este documento electrónico en la dirección http://sede.uniovi.es/validador/codigoverificacion		
Firmante	Universidad de Oviedo	
Fecha y hora de la firma	23/01/2017 16:57:20 GMT+0100	
Emisor del certificado firmante	C=FNMT-RCM, C=ES, OU=AC Componentes Informáticos	



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

LA UNIVERSIDAD DE OVIEDO

CERTIFICA

Que

MARIA CECILIA SALOM LUCENA

con Documento Identificativo nº Y1679730P

ha asistido al curso

CÓMO CITAR Y ELABORAR LA BIBLIOGRAFÍA EN UN TRABAJO ACADÉMICO

desarrollado por esta Universidad dentro del Programa de Formación Transversal de Doctorado del Centro Internacional de Postgrado celebrado en las fechas siguientes

Fechas de impartición	3 y 4 de noviembre de 2016
Horas lectivas	20

Y para que conste, a los efectos oportunos, expide el presente Certificado en Oviedo a
30 de enero de 2017

Código de Verificación Electrónica: 6e9671aa-8226-4e4b-a7a8-3b1e89a98384 Permite la verificación de la integridad de una copia de este documento electrónico en la dirección http://sede.uniovi.es/validador/codigoverificacion		
Firmante	Universidad de Oviedo	
Fecha y hora de la firma	30/01/2017 12:59:56 GMT+0100	
Emisor del certificado firmante	C=FNMT-RCM, C=ES, OU=AC Componentes Informáticos	



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
 University of Oviedo

EXP-00096438

RESOLUCIÓN DE LA SOLICITUD DE RECONOCIMIENTO DE FORMACIÓN TRANSVERSAL

Examinada la solicitud de don/doña MARIA CECILIA SALOM LUCENA con DNI Y1679730P, la Comisión Académica del PROGRAMA OFICIAL DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA Y ONCOLOGÍA MOLECULAR en su reunión del 17 de mayo de 2019 acordó **reconocer** la formación denominada "Aspectos legales de las profesiones sanitarias. 17-18 de febrero de 2015" como 10 horas de formación transversal.

Compruebe que esta resolución ha sido correctamente subida a su carpeta de Colab "Anexos/Actividades Formativas transversales"

Contra la Resolución, cabe recurso de alzada ante el Rectorado, en el plazo de un mes, a partir del día siguiente al de la notificación, de conformidad con el art. 122 de la Ley 39/2015, de 1 de octubre, de Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas

Ei/La Presidente/a de la Comisión Académica

Código de Verificación Electrónica: 88388074-63ae-4024-8923-60b16eb103a8 Permite la verificación de la integridad de una copia de este documento electrónico en la dirección http://sede.uniovi.es/validador/codigoverificacion		
Firmante	Universidad de Oviedo	
Fecha y hora de la firma	17/05/2019 14:32:03 GMT+0200	
Emisor del certificado firmante	O=FNMT-RDM, C=ES, OU=AC Componentes Informáticos	



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

EXP-00096444

RESOLUCIÓN DE LA SOLICITUD DE RECONOCIMIENTO DE FORMACIÓN TRANSVERSAL

Examinada la solicitud de don/doña MARIA CECILIA SALOM LUCENA con DNI Y1679730P, la Comisión Académica del PROGRAMA OFICIAL DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA Y ONCOLOGÍA MOLECULAR en su reunión del 17 de mayo de 2019 acordó reconocer la formación denominada ""Habilidades de relación con el paciente para el trabajo en equipo. Nivel básico. 11-12 de marzo de 2015"" como 10 horas de formación transversal.

Compruebe que esta resolución ha sido correctamente subida a su carpeta de Colab "Anexos/Actividades Formativas transversales"

Contra la Resolución, cabe recurso de alzada ante el Rectorado, en el plazo de un mes, a partir del día siguiente al de la notificación, de conformidad con el art. 122 de la Ley 39/2015, de 1 de octubre, de Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas

El/La Presidente/a de la Comisión Académica

Código de Verificación Electrónica: a874270f-3ef1-4ed4-82fa-8087a3fb2764 Permite la verificación de la integridad de una copia de este documento electrónico en la dirección http://sede.uniovi.es/validador/codigoverificacion		
Firmante	Universidad de Oviedo	
Fecha y hora de la firma	17/05/2019 14:33:53 GMT+0200	
Emisor del certificado firmante	O=FNMT-RCM, C=ES, OU=AC Componentes Informáticos	

Artículo:

Article

Frequent Alteration of Annexin A9 and A10 in HPV-Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinomas: Correlation with the Histopathological Differentiation Grade

Cecilia Salom ^{1,†}, Saúl Álvarez-Teijeiro ^{1,2,†}, M. Pilar Fernández ³, Reginald O. Morgan ^{3,†}, Eva Allonca ^{1,2}, Aitana Vallina ⁴, Corina Lorz ^{2,5}, Lucas de Villalain ⁶, M. Soledad Fernández-García ⁴, Juan P. Rodrigo ^{1,2,*} and Juana M. García-Pedrero ^{1,2,*}

¹ Department of Otolaryngology, Hospital Universitario Central de Asturias and Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias, Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias, University of Oviedo, Avda. Roma, 33011 Oviedo, Spain; mariaceciliasalom@gmail.com (C.S.); saul.teijeiro@gmail.com (S.Á.-T.); yrnc1@hotmail.com (E.A.)

² CIBERONC, Av. Monforte de Lemos 3-5, 28029 Madrid, Spain; clorz@ciemat.es

³ Department of Biochemistry and Molecular Biology and Institute of Biotechnology of Asturias, University of Oviedo, Julian Clavería, 33006 Oviedo, Spain; pfernandez@uniovi.es (M.P.F.); morgnareginald@uniovi.es (R.O.M.)

⁴ Department of Pathology, Hospital Universitario Central de Asturias and Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias, University of Oviedo, Avda. Roma, 33011 Oviedo, Spain; alaicla@hotmail.es (A.V.); soledfgdr@hotmail.com (M.S.F.-G.)

⁵ Molecular Oncology Unit, CIEMAT (ed 70A), Av. Complutense 40, 28040 Madrid, Spain

⁶ Department of Oral Surgery, Hospital Universitario Central de Asturias and Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias, Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias, University of Oviedo, Avda. Roma, 33011 Oviedo, Spain; lvillalain@hotmail.com

* Correspondence: jprodrigo@uniovi.es (J.P.R.); juanagp.firba@gmail.com (J.M.G.-P.); Tel: +34-985-108-000 (J.P.R.); +34-985-107-937 (J.M.G.-P.)

† These authors contributed equally to this work.

Received: 3 December 2018; Accepted: 4 February 2019; Published: 10 February 2019



Abstract: The annexin protein superfamily has been implicated in multiple physiological and pathological processes, including carcinogenesis. Altered expression of various annexins has frequently been observed and linked to the development and progression of various human malignancies. However, information is lacking on the expression and clinical significance of annexin A9 (ANXA9) and A10 (ANXA10) in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). ANXA9 and ANXA10 expression was evaluated in a large cohort of 372 surgically treated HPV-negative HNSCC patients and correlated with the clinicopathologic parameters and disease outcomes. Down-regulation of ANXA9 expression was found in 42% of HNSCC tissue samples, compared to normal epithelia. ANXA9 expression in tumors was significantly associated with oropharyngeal location and histological differentiation grade ($p < 0.001$). In marked contrast, ANXA10 expression was absent in normal epithelium, but variably detected in the cytoplasm of cancer cells. Positive ANXA10 expression was found in 64% of tumors, and was significantly associated with differentiation grade ($p < 0.001$), being also more frequent in oropharyngeal tumors ($p = 0.019$). These results reveal that the expression of both ANXA9 and ANXA10 is frequently altered in HNSCC and associated to the tumor differentiation grade, suggesting that they could be implicated in the pathogenesis of these cancers.

Keywords: annexin A9; annexin A10; head and neck squamous cell carcinoma; differentiation grade; immunohistochemistry

1. Introduction

Twelve annexins comprise a ubiquitous, multigene family in vertebrates with properties that enable binding interactions with calcium and cell membrane components, including anionic phospholipids, cytoskeletal proteins and extracellular matrix glycoproteins. Annexin-knockdown or annexin-knockout models have provided limited insight into the biological functions of different annexin proteins [1] and there are only indirect links based on statistical association with genetic diseases. They have been implicated in a variety of biological processes, including membrane organization, vesicle trafficking, calcium metabolism, cell adhesion, subcellular transport, growth and differentiation, and wound healing [2,3], many of which are relevant to cancer progression.

Annexins are characterized structurally by a conserved C-terminal core that consists of a tetrad of homologous annexin (ANX) domains, each 68–69 amino acids long, harboring ligands that can coordinate calcium ions in conjunction with membrane phospholipids, or bind to other proteins and carbohydrate-containing biomolecules. The binding properties and targets of each annexin are distinct, exemplified by the apparent calcium-independence of annexins A9 and A10 [4]. The N-terminal region of each annexin is unique, with a variable length and amino acid sequence that contributes to annexin conformation, protein interactions and non-overlapping functional specificity in the biological activity of different annexins [5,6].

More than 4000 annexins have been reported in different species, widely distributed among eukaryotes and prevalent in different forms of prokaryotes and unicellular eukaryotes [1,4]. The twelve annexins common to vertebrates are referred to as annexins A1–A13 (ANXA1–ANXA13) with ANXA12 remaining unassigned. There are 13 human annexin genes, including a unique duplication of ANXA8, ranging in size from 15 kb (ANXA9) to 96 kb (ANXA10) and spread throughout the genome on chromosomes 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10 and 15 [1,7].

The expression pattern and tissue distribution of annexins vary widely. While annexins A1, A2, A4, A5, A6, A7 and A11 are ubiquitously expressed, others exhibit very restrictive expression such as ANXA3 in neutrophils, ANXA8 in placenta and skin, ANXA9 in the tongue, ANXA10 in the stomach and ANXA13 in the small intestine [7]. The promoter regulation of annexin A9 has been partially characterized [8], but distal DNA elements, regulatory RNAs and epigenetic changes are under current study in high-throughput experiments, so the molecular basis of its expression remains incomplete.

The term annexinopathy has been used to define those human diseases in which abnormal levels and pleiotropic effects of annexins contribute to the pathogenesis [9,10]. Although direct involvement of these proteins in the etiology of any genetic disease has not been demonstrated, they have been implicated in various pathologies such as diabetes, cardiovascular and autoimmune diseases, infection and cancer [10,11]. Mounting evidence shows that several annexins are frequently altered in cancers, suggesting a possible role in the process of tumorigenesis. Some annexins have been found overexpressed in specific types of tumors, while others consistently show loss of expression [9–11]. Emerging mechanistic studies are helping to relate annexin expression changes to tumor cell function, particularly tumor growth, invasion and metastasis, angiogenesis and drug resistance. The expression of individual annexins is associated with particular cancer types hence annexins could also be useful biomarkers in the clinic [10,11]. More precise localization of these proteins in different tissues could deepen our understanding of their pathophysiological functions, which continues to be a key area of investigation.

The overall goal of this study was to investigate the expression pattern and clinical significance of ANXA9 and ANXA10, specifically in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). ANXA9 shows generally restricted tissue expression but is known to exhibit altered expression in breast

cancer [12], colorectal cancer [13] and cutaneous melanoma [14]. It was also shown to be overexpressed in differentiating keratinocytes in pemphigus [15] and binds to other cytoskeletal proteins [16]. Several studies have been published to date on the expression ANXA10 in gastrointestinal cancers, and its overexpression in oral cancer is correlated with cell proliferation [17]. We focused our study on the expression and clinical significance of ANXA9 and ANXA10 specifically in HNSCC using immunohistochemistry techniques in a large homogeneous cohort of 372 surgically treated, HPV-negative, HNSCC patients.

2. Materials and Method

2.1. Patients and Tissue Specimens

Surgical tissue specimens from 372 patients with HPV-negative HNSCC who underwent resection of their tumors at the Hospital Universitario Central de Asturias between 1990 and 2009 were retrospectively collected, in accordance to approved institutional review board guidelines. All experimental protocols were approved by the Institutional Ethics Committee of the Hospital Universitario Central de Asturias and by the Regional CEIC (Comité Ético de Investigación Clínica) from Principado de Asturias (approval number: 81/2013 for the project PI13/00259). Informed consent was obtained from all patients. Representative tissue sections were obtained from archival, paraffin-embedded blocks and the histological diagnosis was confirmed by an experienced pathologist (M.S.F.-G).

All patients had a single primary tumor, microscopically clear surgical margins and received no treatment prior to surgery. Only fourteen patients were women, and the mean age was 58.6 years (range 30 to 86 years). All but twelve patients were habitual tobacco smokers, 198 moderate (1–50 pack-year) and 153 heavy (>50 pack-year), and 335 were alcohol drinkers. The stage of the tumors was determined according to the TNM system of the International Union Against Cancer (7th Edition). Two hundred and thirty (62%) of 372 patients received postoperative radiotherapy. Patients were followed-up for a minimum of 36 months. The mean follow-up for the whole series was 34.6 months (median, 21.5 months); for the patients without recurrence, 71 months (median, 67 months); and for the patients dead by the tumor, 18 months (median, 13.5 months). Recurrence was defined as relapse of the tumor in the five first years after treatment at any site: local recurrence, nodal metastasis, or distant metastasis. Information on HPV status was available for all the patients. HPV status was analyzed using p16-immunohistochemistry, high-risk HPV DNA detection by in situ hybridization and genotyping by GP5+/6+-PCR, as previously reported [18,19]. The characteristics of the studied cases are shown in Table 1.

2.2. Tissue Microarray (TMA) Construction

Three morphologically representative areas were selected from each individual tumor paraffin block. Subsequently, three 1 mm cylinders were taken to construct TMA blocks, as described previously [20,21], containing a total of 372 HNSCC (134 tonsillar, 107 base of tongue, 64 hypopharyngeal and 67 laryngeal carcinomas). In addition, each TMA included three cores of normal epithelium as an internal negative control. The normal epithelium was obtained from adult male, non-smokers and non-drinkers, patients that were operated from tonsillectomy due to chronic tonsillitis, and patients operated from benign vocal cord lesions (e.g., polyps, cysts).

Table 1. Clinicopathologic characteristics of the tumors studied.

Characteristic	No. Cases (%)
Age, mean (range)	58.6 (30–86 years)
Location	
Oropharynx	241 (65)
Hypopharynx	64 (17)
Larynx	67 (18)
pathologic T classification	
T1	38 (10)
T2	77 (21)
T3	125 (34)
T4	132 (35)
pathologic N classification	
N0	103 (28)
N1	46 (12)
N2	183 (49)
N3	40 (11)
Stage	
I	20 (5)
II	24 (6)
III	64 (17)
IV	264 (71)
Degree of differentiation	
Well-differentiated	147 (39)
Moderately-differentiated	148 (40)
Poorly-differentiated	77 (21)
Total	372

2.3. Immunohistochemical Study

The formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples were cut into 3- μ m sections and dried on Flex IHC microscope slides (Dako, Glostrup, Denmark). The sections were deparaffinized with standard xylene and hydrated through graded alcohols into water. Antigen retrieval was performed with proteinase K and the samples were placed for 15 min in hydrogen peroxide at 3%. Staining was done at room temperature on an automatic staining workstation (Dako Autostainer Plus) using the following primary antibodies (developed by Dr. MP Fernández, Department of Biochemistry, University of Oviedo [4]) and conditions: Anti-ANXA9 at a concentration of 1:100 for 30 min and anti-ANXA10 at a concentration of 1:100 for 45 min. Immunodetection was carried out with the Dako EnVision Flex + Visualization System (Dako Autostainer), using diaminobenzidine as a chromogen. Counterstaining with hematoxylin for 7 min was the final step.

After staining, the sections were dehydrated and set up in a slide in a standard medium. Negative controls were carried out without the primary antibody. The vascular endothelium, in which the expression of both annexins had previously been shown, was used as a positive control.

Since staining showed a homogeneous distribution, a semiquantitative scoring system based on staining intensity was applied. Immunostaining was scored blinded to clinical data by two independent observers as negative (0), weak to moderately (1+), and strongly positive (2+) based on staining intensity. Scores ≥ 1 were considered as positive expression.

3. Results

3.1. Expression of ANXA9 and ANXA10 in Normal Epithelia

Non-keratinized stratified squamous epithelium showed different expression patterns for the two annexins studied. ANXA9 expression was absent in basal and parabasal cells, while expression

increased towards the most differentiated layers of the epithelium (Figure 1A). Contrasting this, negative ANXA10 expression was detected in all cell layers of normal epithelium (Figure 1D).

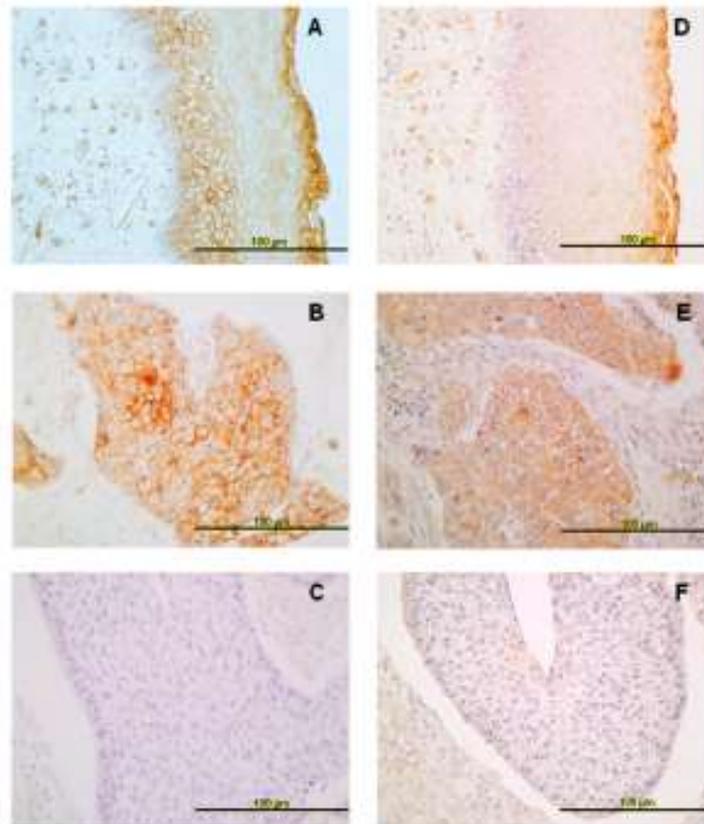


Figure 1. Immunohistochemical analysis of annexins A9 (ANXA9) and A10 (ANXA10) expression in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) tissue specimens. Representative examples of ANXA9 (A) and ANXA10 (D) expression in normal epithelium, positive ANXA9 (B) and ANXA10 (E) expression in carcinomas, and negative ANXA9 (C) and ANXA10 (F) expression in carcinomas. Original magnification $\times 40$.

3.2. Expression of ANXA9 in HNSCC Tissue Specimens

Immunohistochemical analysis of ANXA9 expression was successfully evaluated in 346 of 372 tumor samples. Two-hundred of them (58%) showed positive ANXA9 expression predominantly with a membranous pattern, although cytoplasmic expression was also observed in some cases (Figure 1B,C). The relationship between the expression of ANXA9 and clinicopathologic characteristics is shown in Table 2. Positive ANXA9 expression was strongly and significantly associated with the degree of differentiation of the tumors ($p < 0.001$). Thus, ANXA9 expression was mainly found in well-differentiated tumors whereas expression was reduced in moderately and poorly differentiated tumors (Figure 2A,C). We also observed differences in ANXA9 expression between the different HNSCC subsites, with ANXA9 expression being significantly higher in oropharyngeal tumors ($p < 0.001$).

Table 2. Relationship between ANXA9 and ANXA10 expression and clinicopathological parameters.

Characteristic	No. Cases for ANXA9	Positive ANXA9 Expression (%)	<i>p</i>	No. Cases for ANXA10	Positive ANXA10 Expression (%)	<i>p</i>
Location						
Oropharynx	234	166 (71)	0.000 #	231	160 (69)	0.019 #
Hypopharynx	58	17 (29)		55	28 (51)	
Larynx	54	17 (31)		54	31 (57)	
pT Classification						
T1-T2	100	52 (52)	0.377 #	95	58 (61)	0.591 #
T3	120	73 (61)		119	75 (63)	
T4	126	73 (59)		123	83 (67)	
pN Classification						
N0	87	48 (55)	0.616 †	87	53 (61)	0.439 †
N1-3	259	152 (59)		253	166 (66)	
Stage						
I-II	33	14 (42)	0.124 #	32	19 (59)	0.822 #
III	61	39 (64)		60	39 (65)	
IV	252	147 (58)		248	161 (65)	
Degree of differentiation						
Well-differentiated	136	98 (72)	0.000 #	134	103 (77)	0.000 #
Moderately-differentiated	137	73 (53)		137	85 (62)	
Poorly-differentiated	73	29 (40)		69	31 (45)	
Recurrence						
No	132	77 (58)	0.91 †	132	80 (61)	0.248 †
Yes	214	123 (57)		208	139 (67)	
Total	346	200 (58)		340	219 (64)	

Chi-square and † Fisher's exact tests.

No associations were found between ANXA9 expression and T and N classifications or tumor recurrence ($p = 0.91$). In addition, ANXA9 expression was not associated with disease-specific survival (log rank $p = 0.497$) nor overall survival (log rank $p = 0.406$) (data not shown).

3.3. Expression of ANXA10 in HNSCC Specimens

Immunohistochemical ANXA10 expression was successfully evaluated in 340 of 372 tumor samples. Positive ANXA10 expression was observed in a total of 219 (64%) cases, mainly detected in the cytoplasm of cancer cells (Figure 1E,F). Furthermore, ANXA9 and ANXA10 expression were significantly correlated (Spearman correlation coefficient 0.459, $p < 0.001$).

Similar to ANXA9, ANXA10 expression was significantly higher in oropharyngeal tumors ($p = 0.019$). Also, ANXA10 expression was significantly associated with the degree of differentiation of the tumors (decreased expression with dedifferentiation, $p < 0.001$, Figure 2B,D). No associations were observed with T and N classifications, disease stage, or tumor recurrence (Table 2). In addition, ANXA10 expression was not associated with either disease-specific (log rank $p = 0.077$) or overall survival (log rank $p = 0.167$).

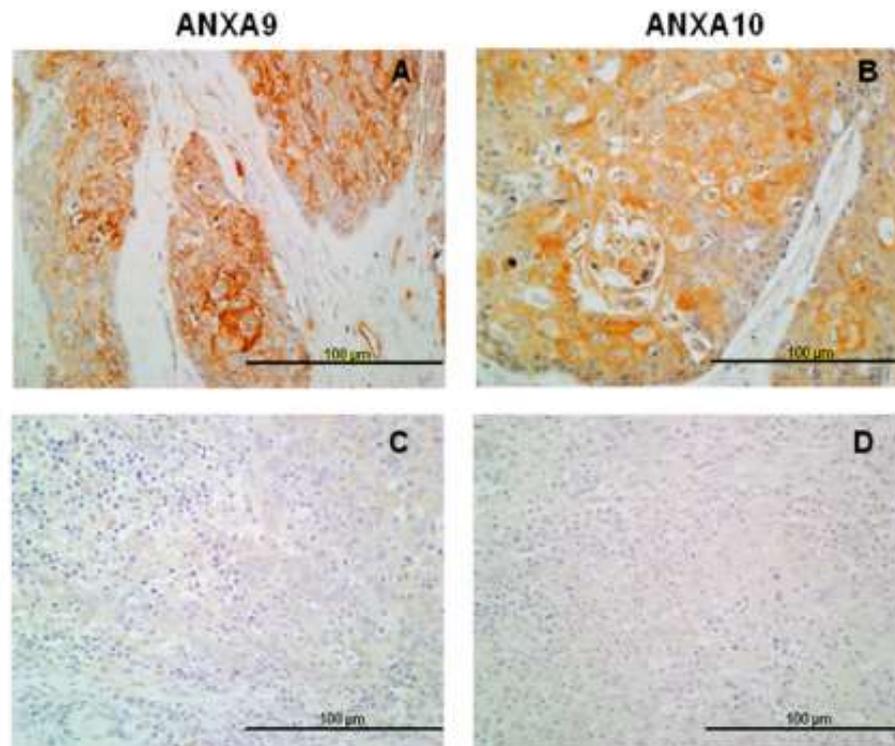


Figure 2. ANXA9 and ANXA10 protein expression in HNSCC specimens according to the degree of differentiation. Representative examples of well-differentiated tumors showing positive expression of ANXA9 (A) and ANXA10 (B), and poorly differentiated tumors showing negative expression of ANXA9 (C) and ANXA10 (D) expression in carcinomas. Original magnification $\times 40$.

3.4. *In Silico* Analysis of ANXA9 and ANXA10 mRNA Expression Using The Cancer Genome Atlas (TCGA) HNSCC Data

In order to extend and confirm our results, we also performed analysis of the transcriptome data from the TCGA HNSCC cohort accessed via the original publication [22], or using the platform cBioPortal for Cancer Genomics (<http://cbioportal.org/>) [23] and the UALCAN web tools (<http://ualcan.path.uab.edu/>) [24]. Thus, ANXA9 mRNA levels were found to be significantly decreased in primary tumors compared to normal tissue samples ($p < 0.001$; Figure 3A), whilst ANXA10 mRNA levels increased in tumors versus normal tissue ($p < 0.001$; Figure 3B). These results are in good agreement with our observations at the protein level. In addition, possible correlations between ANXA9 and ANXA10 mRNA expression and the tumor grade were assessed using a homogeneous cohort of 243 HPV-negative HNSCC patients. We found that ANXA9 mRNA levels inversely and significantly correlated with the degree of histological differentiation (Spearman correlation coefficient -0.244 , $p < 0.001$; Figure 3C). Consistent with our IHC protein data, ANXA9 mRNA levels were higher in well-differentiated tumors than in moderately and poorly differentiated tumors. However, ANXA10 mRNA levels did not significantly correlate with the tumor grade ($p = 0.605$; Figure 3D).

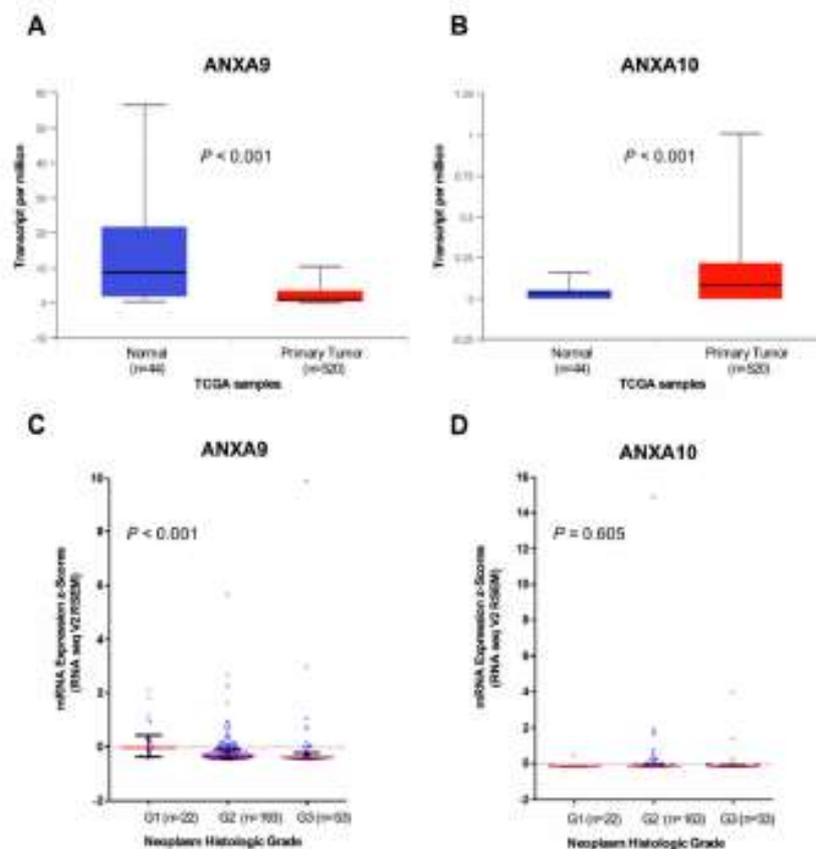


Figure 3. Analysis of ANXA9 and ANXA10 mRNA expression using RNAseq data from the TCGA HNSCC cohorts. Box plots comparing the mRNA expression levels of ANXA9 (A) and ANXA10 (B) in primary tumors (in red) versus normal tissue (in blue) using UALCAN online resources (<http://ualcan.path.usab.edu/>). The median, quartiles and range of values are shown. ANXA9 (C) and ANXA10 (D) expression (RNA seq V2 RSEM, z-score threshold ± 2) was analyzed in relation to the tumor grade, categorized as well-differentiated (G1), moderately differentiated (G2) and poorly differentiated (G3) using the TCGA HPV-negative HNSCC cohort ($n = 243$). Horizontal lines (in red) represent the median values, with interquartile range. Sigma (two-tailed) p -values.

4. Discussion

Annexins are commonly altered in cancers [9,25]. ANXA9 is a unique member of the annexin family whose intracellular activity does not appear to be regulated by calcium [10,26]. Its closest evolutionary relatives are ANXA1 and ANXA2 [1,4] and members of this clade are thought to function in the organization and regulation of membrane/ cytoskeleton linkages [4,27]. As both ANXA1 and ANXA2 have been found down-regulated in head and neck squamous cell carcinoma [28–30], it was of special interest to determine whether ANXA9 showed a similar pattern of expression as this might relate to common features in the evolution, structure and function of these clade members.

We observed a weak membranous ANXA9 expression in the most differentiated cells in normal epithelium. In tumor cells, the expression is mainly membranous, similar to that observed for ANXA2 [28] and the expression of ANXA9 is mainly associated with the degree of differentiation of the tumor, with higher expression in well differentiated cases. This is consistent with elevated ANXA9 observed in differentiating keratinocytes [15]. However, ANXA9 expression was not associated with any other clinical and pathological parameter or with the prognosis in head and neck carcinomas. Analogous findings were obtained by analyzing RNAseq data from the available TCGA HNSCC cohorts. Accordingly, ANXA9 down-regulation was frequently detected in HNSCC at both mRNA

and protein levels. Moreover, ANXA9 mRNA expression in tumors was inversely correlated with the histological differentiation grade, thus confirming our IHC protein data. Hence, together these results reflect that transcriptional regulatory mechanisms contribute to the loss of ANXA9 expression in HNSCC, as we previously demonstrated for the functionally and evolutionary-related members ANXA1 and ANXA2 [29,30].

Few studies have analyzed the expression of ANXA9 in cancers. One study showed that ANXA9 gene expression is associated with bone metastasis in breast cancer [31]. In colorectal cancer, patients with high ANXA9 gene expression also had lower overall survival [32]. ANXA9 protein expression in colorectal cancer was higher than in normal mucosa, and associated with invasion and lymphatic metastasis and, consequently, a worse prognosis [13]. These studies suggest a role for ANXA9 in invasion and metastasis, but this role could not be confirmed in head and neck cancers.

Several studies have identified ANXA10 as a tumor suppressor, diagnostic marker, potential therapeutic target, or prognostic factor in various malignancies, including bladder cancer, hepatocellular carcinoma, acute myeloid leukemia, gastric carcinoma, oral squamous cell carcinoma, pancreatobiliary adenocarcinoma, and urothelial carcinoma [33–37]. Studies have shown that ANXA10 was down-regulated in hepatocellular carcinoma and was associated with a poor prognosis [34,35]. ANXA10 has recently been identified as a marker with high specificity for the serrated histology of colorectal cancer [33,38]. The physiological importance of abundant ANXA10 expression specific to the stomach mucosa and intestinal M-cells is currently unknown.

Only one previous study has analyzed ANXA10 in head and neck cancer; Shimizu et al. [17] showed that ANXA10 is overexpressed frequently in oral squamous cell carcinomas and that this overexpression is associated with tumor size. They suggested that ANXA10 expression may be associated with tumor progression by promoting cell-cycle progression in the G1 phase through activation of the ERK/MAPK signaling pathway, leading to decreased expression of cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKIs). While further studies are needed to study the interaction of ANXA10 and the ERK/MAPK signaling pathway, these data suggested that ANXA10 plays an important role in cellular proliferation.

We also observed that ANXA10 was not visibly expressed in normal epithelium, while it was variably expressed in the cytoplasm of cancer cells. Consistent with this, analysis of the transcriptome data from the TCGA HNSCC also demonstrated the up-regulation of ANXA10 mRNA expression in tumors compared to the corresponding normal tissue. In addition, we found that ANXA10 expression, as ANXA9, was lower in poorly differentiated tumors, but it was not related to other clinicopathologic parameters or prognosis. However, we were unable to confirm the correlation of ANXA10 protein expression with the histological grade using RNAseq data. Nevertheless, these apparently contradictory results may reflect the contribution of additional regulatory mechanisms (e.g., translational or post-translational) leading to the frequent up-regulation of ANXA10 protein in over 60% of tumor samples.

5. Conclusions

These original results indicate that the expression of annexins A9 and A10 is frequently altered in HNSCC at both mRNA and protein level, suggesting that they could be implicated in the pathogenesis or compensatory mechanisms of these cancers. Additional studies are ongoing to establish the pathogenic roles of these proteins in the progression of squamous cell carcinomas of the head and neck and especially, to determine whether their altered expression is a cause or consequence of the cancerous state. The association of ANXA9 with pathogenic prognosis in colorectal cancer [13] contrasts with a proposed tumor suppressor role for ANXA10 in gastric cancer [36]. The unique, calcium-independent actions of these two annexins may also contribute to a better understanding of their underlying mechanisms. Since these particular annexins are poorly expressed in general but exhibit highly tissue-specific expression, it will undoubtedly be important to explore the role of epigenetic regulatory changes responsible for their selective expression in normal versus cancer tissues.

Author Contributions: Conceptualization, J.P.R. and J.M.G.-P.; formal analysis, C.L. and J.P.R.; funding acquisition, J.P.R. and J.M.G.-P.; investigation, C.S., S.Á.-T., E.A., L.d.V. and M.S.F.-G.; methodology, M.P.F., R.O.M., E.A. and A.V.; project administration, J.M.G.-P.; resources, M.P.F., R.O.M. and A.V.; supervision, J.M.G.-P.; visualization, J.P.R.; writing—original draft, C.S.; writing—review and editing, M.P.F., R.O.M., C.L., J.P.R. and J.M.G.-P.

Funding: This study was supported by grants from the Plan Nacional de I+D+I 2013-2016 ISCIII (PI13/00259), RD12/0036/0015 of Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC), PI16/00280 and CIBERONC (CB16/12/00390 and CB16/12/00228), the Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), PCTI-Asturias (GRUPIN14-003), Fundación Bancaria Caja de Ahorros de Asturias-IUOPA and the FEDER Funding Program from the European Union.

Acknowledgments: We thank the samples and technical assistance kindly provided by the Principado de Asturias BioBank (PI13/0010/0046), financed jointly by Servicio de Salud del Principado de Asturias, Instituto de Salud Carlos III and Fundación Bancaria Cajastur and integrated in the Spanish National Biobanks Network.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Moss, S.E.; Morgan, R.O. The annexins. *Genome Biol.* **2004**, *5*, 219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Gerke, V.; Moss, S.E. Annexins: From Structure to Function. *Physiol. Rev.* **2002**, *82*, 331–371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Jiménez, A.J.; Pérez, E. Plasma membrane repair: The adaptable cell life-insurance. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2017**, *47*, 99–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Fernández, M.P.; García, M.; Martín-Almeida, S.; Morgan, R.O. Novel domain architectures and functional determinants in atypical annexins revealed by phylogenomic analysis. *Biol. Chem.* **2017**, *398*, 751–763. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Rescher, U.; Gerke, V. Annexins—Unique membrane binding proteins with diverse functions. *J. Cell Sci.* **2004**, *117*, 2631–2639. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Clark, G.B.; Morgan, R.O.; Fernández, M.P.; Roux, S.J. Evolutionary adaptation of plant annexins has diversified their molecular structures, interactions and functional roles. *New Phytol.* **2012**, *196*, 695–712. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Mirsaeidi, M.; Gidfar, S.; Vu, A.; Schraufnagel, D. Annexins family: Insights into their functions and potential role in pathogenesis of sarcoidosis. *J. Transl. Med.* **2016**, *14*, 89. [[CrossRef](#)]
8. Chlystun, M.; Markoff, A.; Gerke, V. Structural and functional characterisation of the mouse annexin A9 promoter. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1742*, 141–149. [[CrossRef](#)]
9. Rand, J.H. The annexinopathies: A new category of diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *149*, 169–173. [[CrossRef](#)]
10. Mussunoor, S.; Murray, G.I. The role of annexins in tumour development and progression. *J. Pathol.* **2008**, *216*, 131–140. [[CrossRef](#)]
11. Hayes, M.J.; Longbottom, R.E.; Evans, M.A.; Moss, S.E. Annexinopathies. *Subcell Biochem.* **2007**, *45*, 1–28.
12. Cosphiadi, I.; Atrnakusurnah, Y.D.; Siregar, N.C.; Muthalib, A.; Harahap, A.; Mansyur, M. Bone metastasis in advanced breast cancer: Analysis of gene expression microarray. *Clin. Breast Cancer* **2018**, *17*, 30777. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Yu, S.; Bian, H.; Gao, X.; Gui, L. Annexin A9 promotes invasion and metastasis of colorectal cancer and predicts poor prognosis. *Int. J. Mol. Med.* **2018**, *41*, 2185–2192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Amos, C.I.; Wang, L.E.; Lee, J.E.; Gershenwald, J.E.; Chen, W.V.; Fang, S.; Kosoy, R.; Zhang, M.; Qureshi, A.A.; Vattathil, S.; et al. Genome-wide association study identifies novel loci predisposing to cutaneous melanoma. *Hum. Mol. Genet.* **2011**, *20*, 5012–5023. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Nguyen, V.T.; Ndoye, A.; Grando, S.A. Pemphigus vulgaris antibody identifies pemphaxin. A novel keratinocyte annexin-like molecule binding acetylcholine. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 29466–29476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Boczonadi, V.; Määttä, A. Annexin A9 is a periplakin interacting partner in membrane-targeted cytoskeletal linker protein complexes. *FEBS Lett.* **2012**, *586*, 3090–3096. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Shimizu, T.; Kasamatsu, A.; Yamamoto, A.; Koike, K.; Ishige, S.; Takatori, H.; Sakamoto, Y.; Ogawara, K.; Shiiba, M.; Tanzawa, H.; et al. Annexin A10 in Human Oral Cancer: Biomarker for Tumoral Growth via G1/S Transition by Targeting MAPK Signaling Pathways. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e45510. [[CrossRef](#)]

18. Rodrigo, J.P.; Heideman, D.A.; Garcia-Pedrero, J.M.; Fresno, M.F.; Brakenhoff, R.H.; Diaz Molina, J.P.; Snijders, P.J.; Hermsen, M.A. Time trends in the prevalence of HPV in oropharyngeal squamous cell carcinomas in northern Spain (1990–2009). *Int. J. Cancer* **2014**, *134*, 487–492. [[CrossRef](#)]
19. Rodrigo, J.P.; Hermsen, M.A.; Fresno, M.F.; Brakenhoff, R.H.; Garcia-Velasco, F.; Snijders, P.J.; Heideman, D.A.; Garcia-Pedrero, J.M. Prevalence of human papillomavirus in laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinomas in northern Spain. *Cancer Epidemiol.* **2015**, *39*, 37–41. [[CrossRef](#)]
20. Menéndez, S.T.; Rodrigo, J.P.; Alvarez-Teijeiro, S.; Villaronga, M.A.; Allonca, E.; Vallina, A.; Astudillo, A.; Barros, F.; Suárez, C.; Garcia-Pedrero, J.M. Role of HERG1 potassium channel in both malignant transformation and disease progression in head and neck carcinomas. *Mod. Pathol.* **2012**, *25*, 1069–1078. [[CrossRef](#)]
21. Rodrigo, J.P.; Menéndez, S.T.; Hermida-Prado, E.; Alvarez-Teijeiro, S.; Villaronga, M.A.; Alonso-Durán, L.; Vallina, A.; Martínez-Cambor, P.; Astudillo, A.; Suárez, C.; et al. Clinical significance of Anoctamin-1 gene at 11q13 in the development and progression of head and neck squamous cell carcinomas. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 15698. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* **2015**, *517*, 576–582. [[CrossRef](#)]
23. Cerami, E.; Gao, J.; Dogrusoz, U.; Gross, B.E.; Sumer, S.O.; Aksoy, B.A.; Jacobsen, A.; Byrne, C.J.; Heuer, M.L.; Larson, E.; et al. The cBio cancer genomics portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* **2012**, *2*, 401–404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Chandrashekar, D.S.; Bashel, B.; Balasubramanya, S.A.H.; Creighton, C.J.; Rodriguez, I.P.; Chakravarthi, B.V.S.K.; Varambally, S. UALCAN: A portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses. *Neoplasia* **2017**, *19*, 649–658. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Fatimathas, L.; Moss, S.E. Annexins as disease modifiers. *Histol. Histopathol.* **2010**, *25*, 527–532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Goebeler, V.; Ruhe, D.; Gerke, V.; Rescher, U. Atypical properties displayed by annexin A9; a novel member of the annexin family of Ca²⁺ and lipid binding proteins. *FEBS Lett.* **2003**, *546*, 359–364. [[CrossRef](#)]
27. Morgan, R.O.; Martin-Almedina, S.; Iglesias, J.M.; Gonzalez-Florez, M.I.; Fernandez, M.P. Evolutionary perspective on annexin calcium-binding domains. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1742*, 133–140. [[CrossRef](#)]
28. Garcia-Pedrero, J.M.; Fernandez, M.P.; Morgan, R.O.; Herro Zapatero, A.; Gonzalez, M.V.; Suarez Nieto, C.; Rodrigo, J.P. Annexin A1 down-regulation in head and neck cancer is associated with epithelial differentiation status. *Am. J. Pathol.* **2004**, *164*, 73–79. [[CrossRef](#)]
29. Alvarez-Teijeiro, S.; Menéndez, S.T.; Villaronga, M.A.; Pena-Alonso, E.; Rodrigo, J.P.; Morgan, R.O.; Granda-Díaz, R.; Salom, C.; Fernandez, M.P.; Garcia-Pedrero, J.M. Annexin A1 down-regulation in head and neck squamous cell carcinoma is mediated via transcriptional control with direct involvement of miR-196a/b. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 67–90. [[CrossRef](#)]
30. Pena-Alonso, E.; Rodrigo, J.P.; Parra, I.C.; Pedrero, J.M.; Meana, M.V.; Nieto, C.S.; Fresno, M.F.; Morgan, R.O.; Fernandez, M.P. Annexin A2 localizes to the basal epithelial layer and is down-regulated in dysplasia and head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Lett.* **2008**, *263*, 89–98. [[CrossRef](#)]
31. Smid, M.; Wang, Y.; Klijn, J.G.; Sieuwerts, A.M.; Zhang, Y.; Atkins, D.; Martens, J.W.; Foekens, J.A. Genes associated with breast cancer metastatic to bone. *J. Clin. Oncol.* **2006**, *24*, 2261–2267. [[CrossRef](#)]
32. Miyoshi, N.; Yamamoto, H.; Mimori, K.; Yamashita, S.; Miyazaki, S.; Nakagawa, S.; Ishii, H.; Noura, S.; Ohue, M.; Yano, M.; et al. Anxa9 gene expression in colorectal cancer: A novel marker for prognosis. *Oncol. Lett.* **2014**, *8*, 2313–2317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Kim, J.H.; Rhee, Y.Y.; Kim, K.J.; Cho, N.Y.; Lee, H.S.; Kang, G.H. Annexin A10 expression correlates with serrated pathway features in colorectal carcinoma with microsatellite instability. *Appl. Immun.* **2014**, *122*, 1187–1195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Liu, S.H.; Lin, C.Y.; Peng, S.Y.; Jeng, Y.M.; Pan, H.W.; Lai, P.L.; Liu, C.L.; Hsu, H.C. Down-regulation of annexin A10 in hepatocellular carcinoma is associated with vascular invasion, early recurrence, and poor prognosis in synergy with p53 mutation. *Am. J. Pathol.* **2002**, *160*, 1831–1837. [[CrossRef](#)]
35. Peng, S.Y.; Ou, Y.H.; Chen, W.J.; Li, H.Y.; Liu, S.H.; Pan, H.W.; Lai, P.L.; Jeng, Y.M.; Chen, D.C.; Hsu, H.C. Aberrant expressions of annexin A10 short isoform, osteopontin and alpha-fetoprotein at chromosome 4q cooperatively contribute to progression and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Int. J. Oncol.* **2005**, *26*, 1053–1061. [[PubMed](#)]

36. Kim, J.K.; Kim, P.J.; Jung, K.H.; Noh, J.H.; Eun, J.W.; Bae, H.J.; Xie, H.J.; Shan, J.M.; Ping, W.Y.; Park, W.S.; et al. Decreased expression of annexin A10 in gastric cancer and its overexpression in tumor cell growth suppression. *Oncol. Rep.* **2010**, *24*, 607–612. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Munksgaard, P.P.; Mansilla, F.; Brems Eskildsen, A.S.; Fristrup, N.; Birkenkamp-Demtröder, K.; Ulhøi, B.P.; Borre, M.; Agerbæk, M.; Hermann, G.G.; Orntoft, T.F.; et al. Low ANXA10 expression is associated with disease aggressiveness in bladder cancer. *Br. J. Cancer* **2011**, *105*, 1379–1387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Sajanti, S.A.; Väyrynen, J.P.; Sirmiö, P.; Klintrup, K.; Mäkelä, J.; Tuomisto, A.; Mäkinen, M.J. Annexin A10 is a marker for the serrated pathway of colorectal carcinoma. *Virchows Arch.* **2015**, *466*, 5–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).