

Universidad de Oviedo

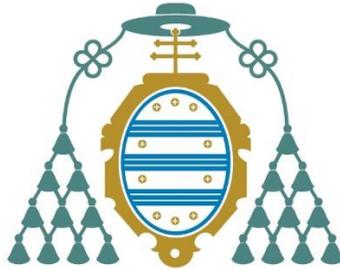
PROGRAMA DE DOCTORADO

CIENCIAS DE LA SALUD

TÍTULO

**EXPRESIÓN DE QUINASA DE ADHESIÓN FOCAL
(FAK) Y CORTACTINA COMO FACTORES
PRONÓSTICOS DE METÁSTASIS GANGLIONARES
EN EL CARCINOMA CUTÁNEO DE CÉLULAS
ESCAMOSAS DE CABEZA Y CUELLO**

Autor: Pablo Munguía Calzada



Universidad de Oviedo

PROGRAMA DE DOCTORADO

CIENCIAS DE LA SALUD

TÍTULO

**EXPRESIÓN DE QUINASA DE ADHESIÓN FOCAL
(FAK) Y CORTACTINA COMO FACTORES
PRONÓSTICOS DE METÁSTASIS GANGLIONARES
EN EL CARCINOMA CUTÁNEO DE CÉLULAS
ESCAMOSAS DE CABEZA Y CUELLO**

Autor: Pablo Munguía Calzada



Universidad de Oviedo

Expresión de quinasa de adhesión focal (FAK) y
cortactina como factores pronósticos de metástasis
ganglionares en el carcinoma cutáneo de células
escamosas de cabeza y cuello

Autor: Pablo Munguía Calzada

Directores: Francisco Vázquez López

Jorge Santos-Juanes Jiménez

Tutor: Jorge Benito Cannata Andía



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Expresión de quinasa de adhesión focal (FAK) y cortactina como factores pronósticos de metástasis ganglionares en el carcinoma cutáneo de células escamosas de cabeza y cuello	Inglés: Expression of focal adhesion kinase (FAK) and cortactin as prognostic factors for lymph node metastases in cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck

2.- Autor	
Nombre: PABLO MUNGUÍA CALZADA	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: Ciencias de la Salud. Investigación en Medicina Clínica	
Órgano responsable: Universidad de Oviedo	

RESUMEN (en español)

<p>INTRODUCCIÓN El carcinoma cutáneo de células escamosas (CCE) es la segunda neoplasia más común en la piel, suponiendo el 20% de todos los tumores cutáneos. Representa un problema de primera magnitud en las consultas de Dermatología, debido a su potencial metastásico estimado entre el 2 y el 5% y a que el 1,5% de los pacientes que lo padecen mueren por causas debidas a este tumor. El carcinoma cutáneo de células escamosas de cabeza y cuello (CCEC) representa el 90% de todos los carcinomas de células escamosas (CCEs). La sobreexpresión de quinasa de adhesión focal (FAK) y cortactina (CTTN) se detecta frecuentemente en numerosos cánceres y se ha asociado con un pobre pronóstico clínico. Sin embargo, no hay datos en el CCE.</p> <p>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS: Investigar la relación entre la expresión de FAK y CTTN y las características clinicopatológicas y el impacto en el pronóstico de pacientes con CCEC. Estudiar la expresión de FAK y CTTN en pacientes con CCEC que presentan metástasis ganglionares y compararla con pacientes con CCEC que no las presentan.</p> <p>MATERIAL Y MÉTODOS: La expresión de FAK y CTTN se analiza mediante inmunohistoquímica en muestras de tejido embebidas en parafina procedentes de 100 pacientes con CCE.</p> <p>RESULTADOS: La sobreexpresión de FAK es un factor de riesgo significativo para el desarrollo de metástasis ganglionares con ratios crudos y ajustados (HRs) de 2,04 (IC95% 1,08-3,86) ($p=0,029$) y 2,23 (IC95% 1,01-4,91) ($p=0,047$), respectivamente. La expresión de CTTN no es un factor de riesgo significativo para el desarrollo de metástasis ganglionares.</p> <p>DISCUSIÓN: En este trabajo se estudia por primera vez el significado clínico de la expresión de FAK y CTTN como factores predictores de metástasis ganglionares y de mortalidad en pacientes con CCEC. Se encuentra por primera vez que la expresión de FAK es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de metástasis ganglionares en el CCEC, al igual que sucede en otros tipos de tumores. Este hecho podría sugerir la utilización de FAK como potencial diana terapéutica en el tratamiento del CCE. Por contra, no se encuentra relación entre la sobreexpresión de CTTN y las metástasis ganglionares.</p> <p>CONCLUSIÓN: Estos hallazgos demuestran que la sobreexpresión de FAK es un predictor independiente de metástasis ganglionares que podría ser útil para la estratificación del riesgo y el manejo de pacientes con CCE.</p>



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

RESUMEN (en Inglés)

INTRODUCTION: Cutaneous squamous cell carcinoma (cSCC) is the second most common neoplasm in the skin, accounting for 20% of all skin tumours. It represents a problem in Dermatology practice. cSCC has a metastatic potential estimated between 2 and 5% and 1.5% of patients will die from causes related to it. Cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck (cSCCHN) accounts for 90% of all squamous cell carcinomas (SCCs). Focal adhesion kinase (FAK) and cortactin (CTTN) overexpression is frequently detected in a variety of cancers, and has been associated with poor clinical outcome. However, there are no data in cSCC.

HYPOTHESIS AND OBJECTIVE: To investigate the relationship of FAK and CTTN expression with the clinicopathologic features and the impact on the prognosis of cSCCHN patients. To study the expression of FAK and CTTN in patients with cSCCH who have lymph node metastases and to compare it with patients with sCCH who do not present them.

MATERIAL AND METHODS: FAK and CTTN expression was analyzed by immunohistochemistry on paraffin-embedded tissue samples from 100 patients with cSCC, and correlated with the clinical data.

RESULTS: FAK overexpression was a significant risk factor for nodal metastasis with crude and adjusted ratios (HRs) of 2.04 (95% CI 1.08-3.86) ($p=0.029$) and 2.23 (95% CI 1.01-4.91) ($p=0.047$), respectively. CTTN expression was not a significant risk factor for nodal metastasis.

DISCUSSION: The clinical significance of the expression of FAK and CTTN as predictors of lymph node metastasis and mortality in patients with cSCCHN is studied for the first time in this work. The expression of FAK is found to be an independent risk factor for the development of lymph node metastasis in the cSCCHN, as it happens in other types of tumors. This fact could suggest the utility of FAK as a potential therapeutic target in the treatment of cSCC. In contrast, there is no relationship between overexpression of CTTN and lymph node metastases.

CONCLUSION: These findings demonstrate that FAK overexpression is an independent predictor of nodal metastasis that might be helpful for risk stratification and management of patients with cSCC.

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO
EN CIENCIAS DE LA SALUD

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar y de manera muy especial quiero mostrar mi agradecimiento a mis directores de tesis: a Jorge Santos Juanes, por su inestimable ayuda a lo largo de este proyecto, por su disponibilidad absoluta y por las horas que ha dedicado a corregir y revisar esta tesis, y a Francisco Vázquez, que me ha apoyado en todo momento a lo largo de esta travesía y me ha animado a seguir adelante incluso en los momentos más difíciles.

A Pablo Martínez Cambor y a Susana Díaz Coto, matemáticos, por su ayuda con la parte estadística de este trabajo.

A Héctor Fernández Llaca y a Susana Armesto, mis profesores de Dermatología en la Facultad de Medicina de Santander y “culpables” de que yo me haya decantado por esta especialidad.

A todo el Servicio de Dermatología de Oviedo, que me ha acompañado a lo largo de mi período formativo durante estos cuatro últimos años, los mejores de mi vida. A Santiago Gómez, María López-Escobar, Cayetana Maldonado, Pablo Coto, Yolanda Hidalgo, Begoña García, Daniel González, Leire González, Cristina Fernández, Laura Palacios, Cristina Galache, Valia Beteta y Álvaro de Dios. Con especial cariño menciono a mis compañeros residentes: a Sheila Requena, Marc Mir, Celia Gómez, Javier Aubán, Felipe Valdés y Borja Gómez, de los que tanto he aprendido y con los que tanto he compartido. Y también a todo el personal auxiliar y de enfermería: a Sonia Rosete, Ana Martínez, Ana Montes, Carmen Juan de Dios, Tere Amieva, Ana Mas, Rosa González, Paz Rodríguez, Raquel Otero, Aurora de Francisco, Adrián González, Rosi Rocés, Ludi Miguens y María González.

Al Servicio de Urgencias del Hospital Universitario Central de Asturias por tantos momentos juntos y a Blanca Vivanco, patóloga.

A Jorge Soto, a Asunción Vicente, a Manuel Ángel Rodríguez Prieto y al Servicio de Dermatología de León por haberme abierto nuevas puertas en el mundo de las enfermedades cutáneas.

Finalmente pero no por ello menos importante, un cariñoso recuerdo a mis padres Fernando y Manoli, a mi hermano Juan, a mis abuelos José Luis, Manoli, Pilar y Alfonso y a mis amigos, todos ellos pilares fundamentales de mi vida y que me han apoyado en todo momento.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	4
LISTADO DE TABLAS	7
LISTADO DE FIGURAS	10
1. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1. CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS.....	13
1.1.1. DEFINICIÓN.....	13
1.1.2. EPIDEMIOLOGÍA.....	13
1.1.3. ETIOPATOGENIA Y FACTORES DE RIESGO ETIOLÓGICOS.....	15
1.1.4. CLÍNICA.....	20
1.1.5. DIAGNÓSTICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA	22
1.1.6. ESTADIFICACIÓN	27
1.1.7. FACTORES PRONÓSTICOS	34
1.1.8. TRATAMIENTO Y SEGUIMIENTO.....	35
1.1.9. PRONÓSTICO.....	39
1.2. QUINASA DE ADHESIÓN FOCAL.....	40
1.3. CORTACTINA	44
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	48
2.1. HIPÓTESIS.....	48
2.2. OBJETIVOS	48
3. MATERIAL Y MÉTODOS	50
3.1. SELECCIÓN DE PACIENTES	50
3.2. VARIABLES CLÍNICAS.....	51
3.3. VARIABLES HISTOLÓGICAS.....	51
3.4. ESTADIFICACIÓN	52
3.5. CONSTRUCCIÓN DE TISSUE MICROARRAYS.....	53
3.6. INMUNOHISTOQUÍMICA	53
3.7. CUANTIFICACIÓN DE MARCADORES	54
3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	57
4. RESULTADOS	60
4.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA Y VARIABLES CLÍNICAS	60
4.1.1. SEXO Y EDAD	60
4.1.2. LOCALIZACIÓN ANATÓMICA DEL TUMOR	61

4.1.3. TAMAÑO TUMORAL	62
4.1.4. INMUNOSUPRESIÓN	62
4.1.5. OTROS CCEs	63
4.2. VARIABLES HISTOLÓGICAS	64
4.2.1. ÍNDICE DE BRESLOW	64
4.2.2. NIVEL DE CLARK	65
4.2.3. GRADO DE DIFERENCIACIÓN	66
4.2.4. INVASIÓN PERINEURAL	67
4.2.5. DESMOPLASIA	68
4.2.6. INVASIÓN LINFOVASCULAR	68
4.2.7. CLASIFICACIÓN T PATOLÓGICA	69
4.2.8. CLASIFICACIÓN DEL HOSPITAL BRIGHAM AND WOMEN'S	70
4.2.9. GEMAS TUMORALES	71
4.3. EXPRESIÓN DE FAK Y CORTACTINA	72
4.4. EXPRESIÓN DE FAK Y CORTACTINA: MODELOS UNIVARIANTE Y MULTIVARIANTE	79
4.5. CURVAS DE SUPERVIVENCIA	81
5. DISCUSIÓN	84
5.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	84
5.2. CARACTERÍSTICAS ANATOMOPATOLÓGICAS	85
5.3. EXPRESIÓN DE QUINASA DE ADHESIÓN FOCAL (FAK) Y CORTACTINA (CTTN)	87
5.3.1. EXPRESIÓN DE QUINASA DE ADHESIÓN FOCAL (FAK)	88
5.3.2. EXPRESIÓN DE CORTACTINA (CTTN)	91
5.4. LIMITACIONES	93
6. CONCLUSIONES	95
7. BIBLIOGRAFÍA	97
8. ANEXO	119

ABREVIATURAS

AJCC: American Joint Committee on Cancer

Anti PD-1: Anti proteína de muerte programada celular 1

Arp 2/3: Proteína relacionada con la actina 2/3

BSGC: Biopsia selectiva del ganglio centinela

CCE: Carcinoma cutáneo de células escamosas

CCEC: Carcinoma cutáneo de células escamosas de cabeza y cuello

CCECs: Carcinomas cutáneos de células escamosas de cabeza y cuello

CCEM: Carcinomas cutáneos de células escamosas de cabeza y cuello metastásicos

CCENM: Carcinomas cutáneos de células escamosas de cabeza y cuello no metastásicos

CCEs: Carcinomas cutáneos de células escamosas

CDKN2A: Quinasa dependiente de ciclina 2A.

CTTN: Cortactina

DE: Desviación estándar

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

ENE: Extensión extranodal

FADD: Proteína asociada a Fas con dominio de muerte

FAK: Quinasa de adhesión focal

H&E: Hematoxilina y eosina

HR: Hazard ratio

HRs: Hazard ratios

HS1: Proteína específica hematopoyética 1

HUCA: Hospital Universitario Central de Asturias

IC95%: Intervalo de confianza al 95%

IL-10: Interleucina 10

kDA: Kilodaltons

LTh1: Linfocitos T-helper 1

LTh2: Linfocitos T-helper 2

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

NCCN: National Comprehensive Cancer Network

NOTCH 1: Notch homolog 1

PAAF: Punción aspiración con aguja fina

PD-L1: Ligando de muerte programada celular 1

RMN: Resonancia magnética nuclear

RUV: Radiación ultravioleta

RUVA: Radiación ultravioleta A

RUVB: Radiación ultravioleta B

STROBE: Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology

TAC: Tomografía axial computerizada

TMA: Tissue microarray

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

VPH: Virus del papiloma humano

v-Src: Virus del sarcoma

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1: 8º sistema de estadificación del AJCC para el CCEC. Tamaño tumoral (T).

Tabla 2: 8º sistema de estadificación del AJCC para el CCEC. Afectación de ganglios linfáticos (N).

Tabla 3: 8º sistema de estadificación del AJCC para el CCEC. Metástasis a distancia (M).

Tabla 4: Estadificación en grupos pronósticos según el AJCC.

Tabla 5: Factores de riesgo para la recurrencia local o metástasis según la National Comprehensive Cancer Network, versión 2.2019.

Tabla 6: Variables clínicas estudiadas; valor p y HR IC95%.

Tabla 7: Grosor tumoral en mm y dicotomizado; valor p y HR IC95%.

Tabla 8: Nivel anatómico de los tumores.

Tabla 9: Nivel anatómico de los tumores dicotomizado en menores de IV y mayores o iguales a IV; valor p y HR IC95%.

Tabla 10: CCE agrupados según la diferenciación y las diferentes comparaciones; valor p y HR IC95%.

Tabla 11: Presencia de invasión perineural; valor p y HR IC95%.

Tabla 12: Presencia de desmoplasia; valor p y HR IC95%.

Tabla 13: Presencia de invasión linfovascular; valor p y HR IC95%.

Tabla 14: Clasificación pT (7ª edición TNM); valor p y HR IC95%.

Tabla 15: Clasificación pT (8ª edición TNM); valor p y HR IC95%.

Tabla 16: Clasificación T (Hospital Brigham and Women's); valor p y HR IC 95%.

Tabla 17: Gemas tumorales; valor p y HR IC95%.

Tabla 18: Expresión de FAK y CTTN en CCENM y en CCEM.

Tabla 19: Asociación entre la expresión de FAK y las características clínicas e histológicas de los pacientes con CCE primario.

Tabla 20: Asociación entre la expresión de CTTN y las características clínicas e histológicas de los pacientes con CCE primario.

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1: CCE localizado en zona parietal.

Figura 2: CCE localizado en hélix.

Figura 3: CCE. Imagen clínica, imagen histológica, imagen dermoscópica.

Figura 4: Histología del CCE.

Figura 5: Estructura de los dominios principales de FAK.

Figura 6: Dominios estructurales de CTTN.

Figura 7: Análisis inmunohistoquímico de la expresión de FAK en muestras de tejido de CCE.

Figura 8: Análisis inmunohistoquímico de la expresión de CTTN en muestras de tejido de CCE.

Figura 9: Localización anatómica de los CCEs.

Figura 10: Nivel anatómico de los tumores

Figura 11: Patrones de tinción de FAK.

Figura 12: Patrones de tinción de CTTN.

Figura 13: Relación entre FAK y CTTN.

Figura 14: Estimador de Fine Gray de metástasis ganglionares en el subgrupo FAK-positivo vs. FAK-negativo y en el subgrupo CTTN-positivo vs. CTTN-negativo.

Figura 15: Estimador de Fine Gray de metástasis ganglionares en el subgrupo FAK-positivo tinción moderada e intensa vs. FAK-negativo y FAK-positivo y en el subgrupo CTTN-positivo tinción moderada e intensa vs. CTTN-negativo y CTTN-positivo tinción débil.

Figura 16: Forest plot para la incidencia por 100 pacientes/año de metástasis, mortalidad global y mortalidad específica tumoral.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS

1.1.1. DEFINICIÓN

El carcinoma cutáneo de células escamosas (CCE), carcinoma escamoso o carcinoma epidermoide cutáneo, es una neoplasia resultado de la transformación maligna de los queratinocitos de la epidermis y sus anejos. Este tumor puede aparecer “de novo” o evolucionar a partir de una serie de lesiones preexistentes.

El 60% de los carcinomas cutáneos de células escamosas (CCEs) aparecen en zonas de daño solar crónico sobre queratosis actínicas preexistentes (1). Además, existen otras lesiones precursoras como la leucoplasia oral, la eritroplasia, cicatrices, quemaduras o úlceras.

El CCE es un problema de primera magnitud en las consultas de Dermatología. La importancia creciente del CCE se debe al incremento anual de su incidencia, a su potencial metastásico que se estima entre el 2 y el 5% y a que el 1,5% de los pacientes que lo padecen mueren por causas debidas a este tumor (2, 3). El carcinoma cutáneo de células escamosas de cabeza y cuello (CCEC) representa el 90% de todos los CCEs (4).

1.1.2. EPIDEMIOLOGÍA

El CCE supone el 20% de todos los tumores cutáneos (5). Es la segunda neoplasia más común de la piel después del carcinoma de células basales, con una incidencia anual estimada de 700000 casos en Estados Unidos (2). La

incidencia del CCE se ha incrementado de forma global en los últimos 30 años entre el 50 y el 200%, con tasas de estabilización en algunos países (6, 7).

En España, la incidencia de CCE aumenta en las últimas décadas, oscilando el incremento entre el 3 y el 10% anual. La tasa anual de incidencia para el CCE en España es de 72/100000 habitantes en las mujeres y de 100/100000 habitantes en varones (8). La tasa de incidencia global para el CCE fue de 38,16 casos por cada 100000 personas-año, según un metaanálisis publicado en 2016 (9).

En la incidencia del CCE se observa una importante diferencia geográfica y racial, que varía desde 5-9 a 69-96 casos por 100000 habitantes en Europa hasta 291-499 por 100000 habitantes en Australia (10).

La tasa de mortalidad en el centro y sur de Estados Unidos debida al CCE es similar a la de otras neoplasias, como el carcinoma renal, el melanoma o el carcinoma de orofaringe (10). Se encuentra que hasta el 20% de las muertes por cáncer cutáneo se deben al CCE (11).

El CCE es un tumor que afecta fundamentalmente a un paciente tipo con las siguientes características: mayores de 70 años, género masculino, fototipos bajos y exposición crónica a la radiación ultravioleta (RUV) (12). Su aparición es excepcional en pacientes menores de 45 años, la incidencia en pacientes mayores de 75 años es entre 50 y 300 veces mayor que en pacientes menores de 45, a pesar de que en estos últimos también se está incrementando la incidencia (13, 14, 15). La ratio hombres/mujeres es de 3:1.

1.1.3. ETIOPATOGENIA Y FACTORES DE RIESGO ETIOLÓGICOS

En el desarrollo del CCE contribuyen tanto factores genéticos como factores ambientales.

1.1.3.1. Genética

El CCE se relaciona con mutaciones en diversos genes. El gen supresor de tumores más frecuentemente implicado es *P53*. Este gen forma parte de la familia de factores de transcripción que comprende p53, p63 y p73 y participa en la regulación de la transcripción a través de su efecto sobre la quinasa dependiente de ciclina (16). La mayoría de las mutaciones en p53 en los CCEs son mutaciones de transición de citosina por timina en los sitios dipirimidínicos. El gen p53 también se encuentra frecuentemente mutado en queratosis actínicas y CCEs in situ, lo que sugiere que la pérdida de p53 ocurre de forma previa a la adquisición de la capacidad invasora tumoral (17).

Se han identificado además mutaciones en los genes que codifican para la quinasa dependiente de ciclina 2A (*CDKN2A*), implicada en el ciclo celular y que codifica dos proteínas reguladoras, p16 y p14, que actúan a través de la vía del retinoblastoma y de p53 respectivamente. Las mutaciones en *CDKN2A* conllevan una pérdida de la función de las proteínas reguladoras p16 y p14 y se observan hasta en el 31% de los tumores metastásicos en comparación con el CCE primario (18).

Otro gen que se ha identificado es *RAS*, implicado en la traducción de señales celulares. La mayoría de las mutaciones que afectan a este gen son activadoras, las mutaciones en *HRAS* se relacionan más con CCEs que las presentes en las variantes *NRAS* y *KRAS*.

La vía de señalización *NOTCH* tiene un papel importante en el desarrollo y maduración epidérmica. Notch homolog 1 (*NOTCH1*) es un gen supresor tumoral cuya mutación, que conlleva la pérdida de su función, se halla hasta en el 15% de los carcinomas escamosos mucosos de cabeza y cuello (19).

Se especula con que las mutaciones en *p53*, *CDKN2A* y *RAS* puedan deberse al daño producido por la luz ultravioleta (20, 21, 22).

Varios loci relacionados con el proceso de la pigmentación se han implicado en la patogénesis de los CCEs: *MC1R*, *ASIP*, *TYR*, *SLC45A2*, *OCA2*, *IRF4* y *BNC2*; recientemente se han descrito otros nuevos: *CADMI*, *AHR* y *SEC16A* (23).

En CCEs metastásicos se describen nuevas mutaciones en *PIK3CA*, *FGFR3*, *BRAF* y *EGFR*, similares a las que se encuentran en carcinomas de células escamosas de cuello y de pulmón. Estas mutaciones se han convertido en nuevas dianas terapéuticas (24).

1.1.3.2. Factores de riesgo etiológicos

Los factores de riesgo etiológicos más importantes para el desarrollo de CCE son: la radiación ultravioleta, los fototipos bajos (I y II), la inmunosupresión, la edad avanzada, el género masculino, las radiaciones ionizantes, la infección por virus del papiloma humano (VPH), las exposiciones ambientales a sustancias como el arsénico o la presencia de síndromes familiares (25, 26, 27, 28).

1.1.3.2.1. Radiación ultravioleta

La RUV es el factor que más se relaciona con el desarrollo de CCE, así estos tumores se originan en más del 90% en áreas dañadas de forma crónica por el Sol, como cabeza, antebrazos o piernas.

Los dos tipos de RUV con mayor implicación en el desarrollo de CCE son la radiación ultravioleta B (RUVB), con una longitud de onda de entre 280 y 320 nm y la radiación ultravioleta A (RUVA), con una longitud de onda de entre 320 y 400 nm (29).

La RUVB produce el 80% del daño biológico, mientras que la RUVA es responsable del 20% restante. La RUV actúa a dos niveles a su llegada a la piel: por un lado, produce un efecto mutágeno directo, que incluye mutaciones específicas en el gen p53 y también induce la producción de 6,4 pirimidina-pirimidina y de dímeros de ciclobutano-pirimidina, que dan lugar a mutaciones genéticas CC→TT y/o C→T, considerados la “firma mutacional de la RUV” (30, 31, 32, 33, 34).

Por otro lado, la RUV tiene un efecto inmunosupresor local, altera la presentación antigénica de las células de Langerhans y facilita la producción de citocinas proinflamatorias por parte de los queratinocitos: interleucina 10 (IL-10) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Estas citocinas inhiben el desarrollo de los linfocitos T-helper 1 (LTh-1) y facilitan el desarrollo de los linfocitos T-helper 2 (LTh-2). De esta manera, se inhibe la inmunidad celular y se favorece el crecimiento de los CCEs (35, 36).

1.1.3.2.2. Fototipo

Los fototipos bajos (I y II) se consideran factores de riesgo para el desarrollo de CCE. A pesar de que en pacientes con fototipos altos es menos frecuente, en población de raza negra o asiática es el cáncer cutáneo más común, con una alta tasa de mortalidad (18%) en pacientes de raza negra (37, 38).

1.1.3.2.3. Inmunosupresión

La inmunosupresión es un factor de riesgo etiológico importante en el desarrollo de CCE. El CCE es la neoplasia más frecuente en pacientes con trasplante de órganos sólidos. El riesgo de desarrollo de CCE es entre 65 y 250 veces mayor en pacientes trasplantados en comparación con la población general (39, 40).

Los pacientes con un trasplante cardíaco o pulmonar tienen mayor riesgo de desarrollo de CCEs que los pacientes que reciben un trasplante renal, esto se atribuye a las terapias inmunosupresoras más agresivas que reciben para evitar el rechazo del órgano trasplantado (41). Los pacientes con trasplante hepático parecen tener un riesgo inferior de desarrollo de CCEs, aunque de manera paradójica presentan una tasa mayor de carcinomas basocelulares en comparación a pacientes trasplantados de otros órganos (42).

Además del aumento de riesgo de presentar CCEs, los pacientes inmunodeprimidos con CCE tienen un riesgo 1,59 mayor de presentar metástasis ganglionares con respecto a los no inmunodeprimidos (43). También se objetiva que cuanto mayor es la duración de la inmunosupresión mayor es la incidencia de aparición de CCE, entre el 10 y el 27% a los 10 años y entre el 40 y el 60% a los 20 años postransplante de órgano sólido (41).

1.1.3.2.4. Virus del papiloma humano

La infección por el VPH se relaciona con el desarrollo de CCE a nivel anogenital y periungueal, su relación con el resto de CCEs es controvertida (44).

1.1.3.2.5. Radiaciones ionizantes

Las radiaciones ionizantes, sobre todo los rayos X, son agentes etiológicos cada vez menos frecuentes para el desarrollo de CCE. Su implicación etiológica se observó en el pasado en trabajadores de servicios de Radiodiagnóstico o en pacientes con condiciones benignas como acné o hemangiomas a los que se había realizado tratamiento con radioterapia (45).

1.1.3.2.6. Carcinógenos químicos

Los carcinógenos químicos son factores ambientales menos comunes, pero también están implicados en la patogenia del CCE. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos, presentes en las breas y en la industria del aceite, el arsénico y la exposición a herbicidas y pesticidas se han relacionado con el desarrollo de CCE (29).

1.1.3.2.7. Síndromes familiares y enfermedades genéticas

El CCE se observa en relación con síndromes familiares hereditarios, como el xeroderma pigmentoso, una enfermedad de carácter autosómico recesivo caracterizada por una excesiva sensibilidad a la luz solar y por la aparición de CCEs, carcinomas basocelulares y melanomas. También puede observarse en

otras enfermedades de origen genético como las epidermólisis ampollas y el albinismo oculocutáneo (46).

1.1.4. CLÍNICA

El CCE se presenta habitualmente como una lesión única, exofítica, que crece en un período de meses, con un tamaño que oscila desde unos milímetros hasta varios centímetros, con tendencia a la ulceración y al sangrado.

Respecto a la localización, afecta de manera preferente a zonas fotoexpuestas, más frecuentemente cabeza y cuello (Figuras 1, 2, 3) (4). Se localiza también en el dorso de las manos, y en extremidades superiores e inferiores. Normalmente aparece sobre piel con daño solar crónico, en áreas con telangiectasias, arrugas y léntigos solares.

Estos pacientes suelen presentar además múltiples queratosis actínicas. Aunque la mayoría de CCEs aparecen en el contexto de pieles fotodañadas y con múltiples queratosis actínicas circundantes, la tasa de transformación de estas en un CCE invasivo es de menos de 1/1000 por año en un período de seguimiento de 5 años (1, 47).

El CCE in situ se denomina enfermedad de Bowen, y aparece como una mácula o placa eritematosa ligeramente escamosa que aparece en zonas fotoexpuestas. Puede aparecer de novo o bien a partir de queratosis actínicas preexistentes.

Hay subtipos especiales de CCE, como el queratoacantoma o el carcinoma verrucoso, presentan bajo potencial metastásico y son variantes bien diferenciadas.

El queratoacantoma se considera una lesión menos agresiva, de crecimiento rápido y normalmente no metastatiza. Se presenta como un tumor crateriforme,

habitualmente único, con un tapón queratósico central y ocasionalmente se resuelve de forma espontánea.

El carcinoma verrucoso cutáneo es una forma bien diferenciada de CCE, con capacidad destructiva local, pero bajo potencial metastásico. Tiene un aspecto exofítico, similar a una coliflor.



Figura 1. CCE localizado en zona parietal. Tumor carnososo, rojizo, con fibrina en superficie.



Figura 2. CCE localizado en hélix. Tumor carnosos y ulcerado, con queratina en superficie.

1.1.5. DIAGNÓSTICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA

El diagnóstico del CCE es clínico, dermatoscópico y anatomopatológico.

El estudio dermatoscópico muestra dos características típicas: la presencia de vasos glomerulares y de vasos puntiformes pequeños. El CCE in situ puede presentar glóbulos marrones pequeños y una coloración gris-marronácea homogénea (48). El CCE invasivo suele presentar vasos en horquilla o en “serpentina” (Figura 3) (49, 50).

En el estudio anatómo-patológico, se observa una proliferación de células escamosas epidérmicas, que cuando rompen la membrana basal y adquieren la capacidad de invadir crecen en la dermis en forma de hojas o nidos tumorales con presencia de células disqueratóticas y con formación de perlas córneas, conservación de los puentes de unión intercelulares y formación de queratina.

Las células presentan núcleos alargados y pleomórficos, así como numerosas mitosis (Figura 4).

Para caracterizar la diferenciación histológica de estos tumores se distinguen cuatro grados:

- Grado 1: tumores bien diferenciados.
- Grado 2: tumores moderadamente diferenciados.
- Grado 3: tumores pobremente diferenciados.
- Grado 4: tumores indiferenciados o anaplásicos.

Otra clasificación histológica para los CCEs es la propuesta por Broders que estadifica los CCEs en (51):

- Grado 1: más del 75% de la lesión está bien diferenciada.
- Grado 2: del 50% al 75% de la lesión está bien diferenciada.
- Grado 3: del 25% al 50% de la lesión está bien diferenciada.
- Grado 4: menos del 25% de la lesión está bien diferenciada.

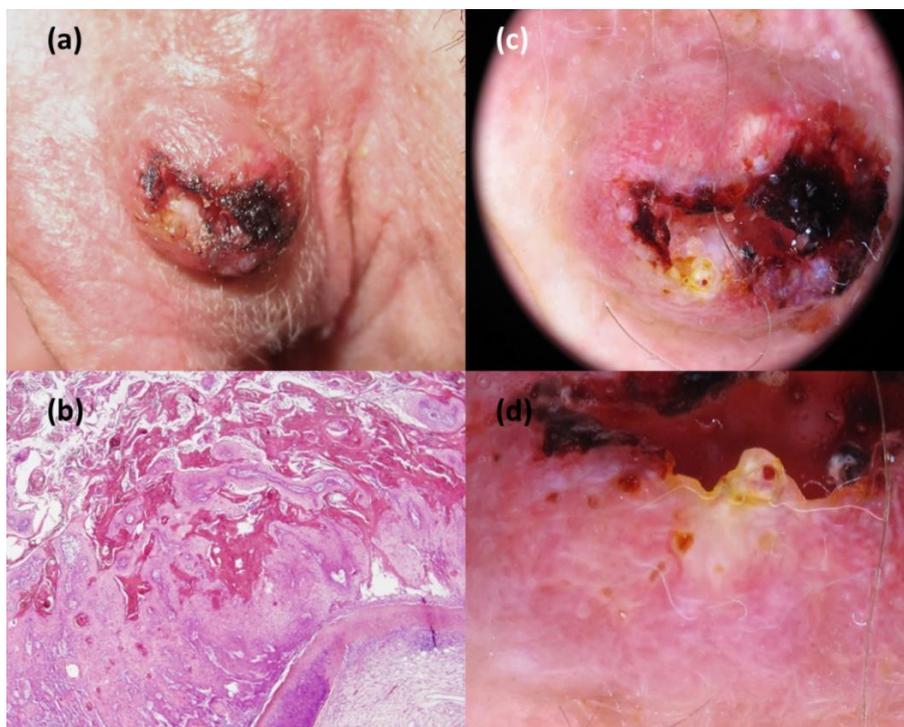


Figura 3. CCE. a) Imagen clínica: tumor rojizo con un centro queratósico, localizado en el hélix. b) Imagen histológica (H&E x 20): CCE bien diferenciado mostrando abundante queratinización. Nidos y cordones de células escamosas epiteliales infiltran la dermis reticular. c, d) Imagen dermoscópica: masa central de queratina rodeada por zonas blancas desestructuradas sin disposición radial y presencia de círculos blanquecinos.

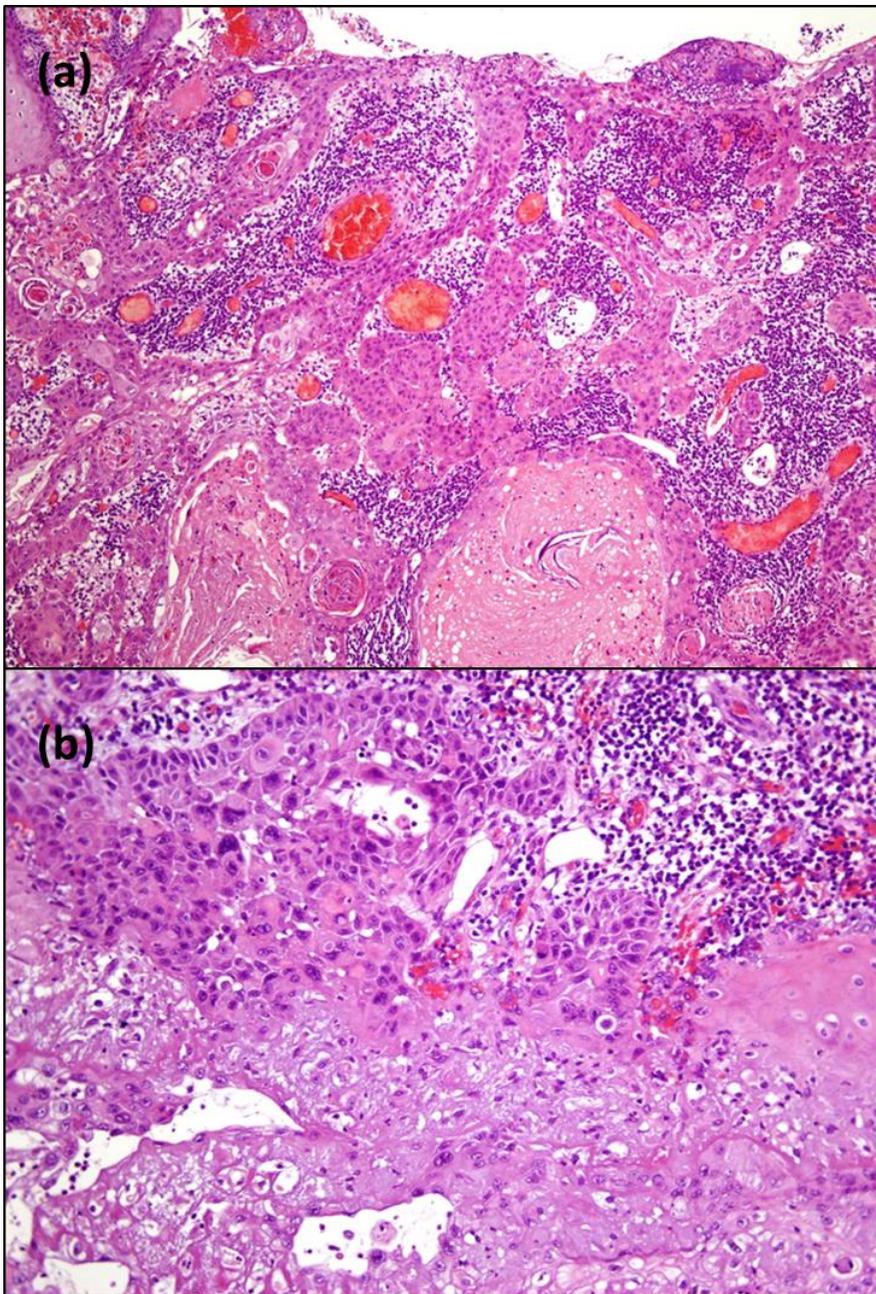


Figura 4. Histología del CCE. a) H&E x20: Proliferación de células poligonales, neoplásicas, en cordones infiltrando la dermis. b) H&Ex 40: A mayor aumento las células presentan puentes intercelulares y se observa un infiltrado linfohistiocitario.

En el informe anatómo-patológico es importante hacer constar el grosor tumoral expresado en milímetros, conocido como índice de Breslow. Para ello se mide desde la parte superior de la capa granulosa de la piel, o desde la base de la úlcera si la lesión está ulcerada, hasta el punto más profundo que alcanza la invasión tumoral. También se utiliza la clasificación de Clark, que valora la profundidad de la infiltración según el nivel que afecta:

- I: afectación de la epidermis.
- II: afectación de la dermis papilar sin llenarla ni expandirla.
- III: afectación y llenado de la dermis papilar.
- IV: afectación de la dermis reticular.
- V: invasión del tejido subcutáneo.

El informe anatómo-patológico debe recoger también si hay presencia o no de invasión perineural, perivascular o linfática, si los márgenes de la escisión están afectados y si hay características que permitan encuadrarlo en algún subtipo tumoral especial (acantolítico, fusocelular, verrucoso o desmoplásico).

El diagnóstico diferencial del CCE depende de la localización y del aspecto tumoral. Las lesiones se pueden confundir con carcinomas basocelulares, melanomas amelanóticos, tumores anexiales o fibroxantomas atípicos. Los CCEs genitales o de extremidades pueden ser malinterpretados como verrugas vulgares.

La dermatoscopia y la anatomía patológica son necesarias para un diagnóstico correcto.

1.1.6. ESTADIFICACIÓN

En la actualidad se utiliza la octava clasificación TNM (T: tumor, N: metástasis ganglionares, M: metástasis a distancia) del American Joint Committee on Cancer (AJCC) publicada en octubre de 2016 (10, 52). Esta clasificación es válida para carcinomas cutáneos de células escamosas de cabeza y cuello (CCECs) y para carcinomas escamosos que afectan al labio.

En este sistema de estadificación un tumor cuyo diámetro máximo sea menor de 2 cm es un T1. Un tumor mayor o igual de 2 cm, pero menor de 4 cm es un T2, mientras que un tumor mayor o igual de 4 cm, o que produzca erosión en el hueso o bien invasión perineural es un T3. Un tumor con invasión ósea macroscópica o bien invasión de la base del cráneo o afectación de los orificios que hay en la base del cráneo es un T4 (Tabla 1).

Las metástasis ganglionares se describen con la categoría “N”. Un único ganglio menor o igual de 3 cm será un N1. Según el tamaño, el número de ganglios afectados y la presencia de extensión extraganglionar se clasifica la afectación ganglionar no englobada en la definición de N1 como de N2a a N2c y de N3a a N3b (Tabla 2).

Las metástasis a distancia (M) se clasifican como ausentes (M0) o presentes (M1) (Tabla 3).

Entre las limitaciones de esta edición no se recoge como se deben clasificar los CCEs que afectan a otras zonas anatómicas del cuerpo. Tampoco influyen en la estadificación factores que se consideran de alto riesgo en la actualidad como la inmunosupresión, la localización en la zona de la sien o la pobre diferenciación histológica (53).

Tabla 1. 8º sistema de estadificación del AJCC para el CCEC. Tamaño tumoral (T).

TAMAÑO DEL TUMOR (T)

<i>Tx</i>	El tumor primario no puede ser identificado
<i>Tis</i>	Carcinoma in situ (carcinoma intraepidérmico)
<i>T1</i>	Tumor < 2 cm de diámetro máximo
<i>T2</i>	Tumor ≥ 2 cm pero <4 cm de diámetro máximo
<i>T3</i>	Tumor ≥ 4 cm de diámetro máximo, o erosión ósea menor o invasión perineural (definida como células tumorales en la vaina nerviosa de un nervio más profundo de la dermis o que mida ≥0,1 mm de calibre) o invasión profunda (definida como invasión de la grasa subcutánea mayor de 6 mm)
<i>T4</i>	Tumor con invasión ósea macroscópica (corteza o médula), invasión de la base del cráneo y/o afectación de los orificios de la base del cráneo
<i>T4a</i>	Tumor con invasión ósea macroscópica (corteza o médula)
<i>T4b</i>	Tumor con invasión de la base del cráneo y/o afectación de los orificios de la base del cráneo

Tabla 2. 8º sistema de estadificación del AJCC para el CCEC. Afectación de ganglios linfáticos (N).

AFECCIÓN DE GANGLIOS LINFÁTICOS (N)

<i>NX</i>	Los ganglios linfáticos regionales no pueden ser valorados
<i>N0</i>	No hay metástasis en ganglios linfáticos regionales
<i>N1</i>	Metástasis en un único ganglio linfático ipsilateral, ≤ 3 cm y ENE (extensión extranodal) (-)
<i>N2</i>	Metástasis en un único ganglio linfático ipsilateral ≤ 3 cm y ENE (+); o > 3 cm pero < 6 cm y ENE (-); o metástasis en múltiples ganglios ipsilaterales < 6 cm y ENE (-); o en ganglios linfáticos bilaterales o contralaterales < 6 cm, ENE (-)
<i>N2a</i>	Metástasis en un único ganglio linfático ipsilateral o contralateral ≤ 3 cm y ENE (+); o en un único ganglio linfático ipsilateral > 3 cm pero < 6 cm y ENE (-)
<i>N2b</i>	Metástasis en múltiples ganglios ipsilaterales < 6 cm y ENE (-)
<i>N2c</i>	Metástasis en ganglios linfáticos bilaterales o contralaterales < 6 cm, ENE (-)
<i>N3</i>	Metástasis en un ganglio linfático > 6 cm y ENE (-), o en un único ganglio linfático ipsilateral > 3 cm y ENE (+); o múltiples ganglios ipsilaterales, contralaterales o bilaterales cualquiera con ENE (+)
<i>N3a</i>	Metástasis en un ganglio linfático > 6 cm y ENE (-)
<i>N3b</i>	Metástasis en un ganglio linfático ipsilateral > 3 cm y ENE (+); o múltiples ganglios ipsilaterales, contralaterales o bilaterales con ENE (+)

Tabla 3. 8° sistema de estadificación del AJCC para el CCEC. Metástasis a distancia (M).

METÁSTASIS A DISTANCIA (M)

<i>M0</i>	No hay metástasis a distancia
<i>M1</i>	Metástasis a distancia

Tabla 4. Estadificación en grupos pronósticos según el AJCC.

ESTADIFICACIÓN EN GRUPOS PRONÓSTICOS

<i>T</i>	<i>N</i>	<i>M</i>	<i>Estadio</i>
<i>Tis</i>	N0	M0	0
<i>T1</i>	N0	M0	I
<i>T2</i>	N0	M0	II
<i>T3</i>	N0	M0	III
<i>T1</i>	N1	M0	III
<i>T2</i>	N1	M0	III
<i>T3</i>	N1	M0	III
<i>T1</i>	N2	M0	IV
<i>T2</i>	N2	M0	IV
<i>T3</i>	N2	M0	IV
<i>Cualquier T</i>	N3	M0	IV
<i>T4</i>	Cualquier N	M0	IV
<i>Cualquier T</i>	Cualquier N	M1	IV

Este 8º sistema de estadificación del AJCC (Tabla 4) se basa en múltiples estudios publicados desde que apareció la 7ª edición en el año 2010 y uno de los cambios más relevantes con respecto a la pasada edición se encuentra en la expansión de la categoría T3, que incluye un abanico más amplio de casos. Este sistema ha sido introducido recientemente, y está pendiente de su validación como herramienta pronóstica en nuevos estudios (53).

Como alternativa al 8º sistema de estadificación del AJCC para el CCE, se utiliza en los Estados Unidos de América la clasificación del Hospital Brigham and Women's (54). Se definen una serie de factores de alto riesgo para los CCEs: diámetro mayor o igual a 2 cm, tumor poco diferenciado, tumor con invasión perineural en nervios cuyo calibre es mayor o igual a 0,1 mm y tumor que invade la grasa subyacente. Según este sistema los tumores T1 tienen 0 factores de alto riesgo, los tumores T2a tienen un factor de alto riesgo, los tumores T2b tienen dos o tres factores de alto riesgo y los T3 cuatro o más factores de alto riesgo. Un tumor con invasión ósea se clasifica directamente como un T3.

Otra aproximación es la de la National Comprehensive Cancer Network (NCCN), que propone clasificar a los CCECs como de alto riesgo o bajo riesgo según una serie de características clínicas y anatomopatológicas (Tabla 5) (55).

Cañueto et al. comparan la 7ª edición del AJCC con la 8ª y con la clasificación del Hospital Brigham and Women's. Observan un peor pronóstico en los T2 en la 7ª edición, los T3 en la 8ª y los T2b/T3 en la clasificación de Brigham and Women's. Según este estudio la 8ª edición y la clasificación de Brigham and Women's muestran solapamiento entre ellas y son superiores a la 7ª edición como predictores de mal pronóstico. Los nuevos factores de riesgo incluidos en la 8ª edición se asocian de manera independiente con un pronóstico más pobre (56).

Tabla 5. Factores de riesgo para la recurrencia local o metástasis según la NCCN, versión 2.2019.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	BAJO RIESGO	ALTO RIESGO
Localización / tamaño*	Área L <20 mm Área M <10 mm	Área L ≥20 mm Área M ≥10 mm Área H
Bordes	Bien definidos	Mal definidos
Primario vs recurrente	Primario	Recurrente
Inmunosupresión	(-)	(+)
Proceso inflamatorio crónico o radioterapia previa	(-)	(+)
Tumor de rápido crecimiento	(-)	(+)
Síntomas neurológicos	(-)	(+)

**CARACTERÍSTICAS
HISTOLÓGICAS**

Grado de diferenciación

Bien o moderadamente diferenciados	Pobrementemente diferenciados
------------------------------------	-------------------------------

Subtipos: acantolítico (adenoide), adenoescamoso (con producción de mucina), desmoplásico, metaplásico (carcinosarcomatoso)

(-)	(+)
-----	-----

Profundidad, grosor o nivel de invasión

≤ 6 mm y no invasión más allá de la grasa subcutánea	>6 mm o invasión más allá de la grasa subcutánea
--	--

Invasión perineural, linfática o vascular

(-)	(+)
-----	-----

*Área H= “áreas máscara” de la cara (centro de la cara, párpados, cejas, área periorbitaria, nariz, labios (parte cutánea y bermellón), mentón, mandíbula, zona preauricular y retroauricular, sien, oreja, genitales, manos y pies. Área M= mejillas, frente, cuero cabelludo, cuello y zona pretibial. Área L= tronco y extremidades (excluyendo manos, unidades ungueales, zona pretibial, tobillos y pies)

1.1.7. FACTORES PRONÓSTICOS

Se describen en las diferentes clasificaciones características clínicas y anatomopatológicas que implican un mayor riesgo de sufrir recidivas locales, metástasis ganglionares y muerte específica por enfermedad.

El diámetro tumoral mayor de 2 cm es el factor de riesgo más frecuentemente asociado con muerte específica por CCE (2). Un tumor con un diámetro mayor de 2 cm tiene un riesgo de recurrencia dos veces mayor y un riesgo de metástasis ganglionares tres veces mayor que un tumor cuyo diámetro sea menor de 2 cm (37). En un metaanálisis reciente el riesgo relativo de muerte específica por enfermedad en CCEs mayores de 2 cm es de 19,10 respecto a los menores de 2 cm (43).

La profundidad tumoral medida en milímetros desde la capa granulosa (índice de Breslow) es el factor de riesgo anatomopatológico que más se relaciona con mayor riesgo de recurrencias locales y de metástasis ganglionares. Tumores con un espesor de Breslow mayor de 2 mm tienen un riesgo 10 veces mayor de presentar recurrencia local y tumores que invaden más allá de la grasa subcutánea (fascia, músculo, pericondrio, periostio) tienen un riesgo 11 veces mayor de presentar metástasis (43).

La invasión perineural de nervios mayores o iguales a 0,1 mm se considera otro factor de riesgo y se asocia con metástasis ganglionares y mayor mortalidad específica debida a la enfermedad.

Otros factores pronósticos son la pobre diferenciación tumoral, la localización en determinadas zonas como el pabellón auricular o la zona de la sien, la inmunosupresión, la localización del CCE sobre una cicatriz previa o el hecho de que se trate de una recurrencia (43).

Los factores de riesgo más comúnmente relacionados con la muerte específica por enfermedad son, además del diámetro tumoral mayor de 2 cm, la

pobre diferenciación histológica, la localización en la oreja o el labio, la invasión de la grasa subcutánea y la invasión perineural (43).

Un factor pronóstico independiente no incluido en este metaanálisis es la presencia de gemas tumorales, que se correlaciona con mayor riesgo de metástasis ganglionares y de mortalidad (57, 58, 59, 60). Gonzalez-Guerrero et al. describen que la presencia de múltiples gemas tumorales (>5) es un factor de riesgo para presentar metástasis ganglionares con un riesgo relativo ajustado de 8,92 (61).

Nuestro grupo de investigación ha descrito que la expresión del ligando de muerte programada celular 1 (*PD-L1*) es un factor de riesgo estadísticamente significativo para el desarrollo de metástasis ganglionares, con un riesgo relativo ajustado de 6,54 (62).

Recientemente Hernández-Ruiz et al. describen que la presencia de un patrón fibrótico mixoide inmaduro, fácilmente identificable mediante la tinción con hematoxilina y eosina (H&E), se asocia con un riesgo metastásico elevado (odds ratio de 13,81) (63).

1.1.8. TRATAMIENTO Y SEGUIMIENTO

El tratamiento de elección para el CCE es la cirugía, que muestra tasas altas de curación (64). Los márgenes necesarios para la extirpación no están bien establecidos: en tumores menores de 2 cm se ha propuesto un margen de extirpación de entre 4 y 6 mm, y en tumores mayores de 2 cm o con algún factor de alto riesgo, de 10 mm (55, 65, 66).

Según las guías de recomendación de la NCCN se admite el curetaje y electrocoagulación para CCEs de bajo riesgo que no afecten a zonas pilosas (cuero cabelludo, barba, axilas, pubis) (55).

En el CCE in situ o enfermedad de Bowen la terapia fotodinámica con ácido aminolevulínico o metilaminolevulínico es una opción terapéutica adecuada, con una tasa de respuesta de entre el 52 y el 100% (67). Las terapias superficiales, como el 5-fluorouracilo tópico, el imiquimod tópico o la crioterapia son utilizadas para el tratamiento del CCE in situ (68).

La aplicación neoadyuvante de metotrexato intralesional es eficaz en la reducción preoperatoria del tamaño tumoral (69). En el caso de queratoacantomas, sobre todo faciales, la quimioterapia intralesional con metotrexato, 5-fluorouracilo o bleomicina pueden ser consideradas como opciones terapéuticas, aunque no demuestran mayor eficacia respecto a la cirugía convencional (70, 71).

En CCEs de alto riesgo se propone la cirugía de Möhs como técnica de elección, para asegurar una correcta extirpación de todo el lecho tumoral (72).

En los tumores agresivos, de gran tamaño, alto riesgo o que comprometen estructuras profundas se utilizan pruebas complementarias que permiten una mejor delimitación anatómica de la lesión. La resonancia magnética nuclear (RMN) es la técnica más útil para valorar la invasión de partes blandas y la infiltración perineural y la tomografía axial computerizada (TAC) para la valoración de la afectación ósea (73).

En la actualidad, se recomienda la ecografía para el control de los ganglios linfáticos de la zona de drenaje del tumor. Si hay sospecha clínica o ecográfica de afectación ganglionar, se recomienda punción aspiración con aguja fina (PAAF) del ganglio o realizar una biopsia abierta (74). La PAAF bajo control ecográfico es más sensible y específica que sin guía ecográfica (75). En pacientes en estadio T2b y T3 según la clasificación de Brigham and Women's se recomienda realizar un examen radiológico (preferentemente mediante ultrasonografía) de los ganglios, aunque no haya linfadenopatías palpables, y si este examen es negativo se puede considerar la realización de la biopsia selectiva del ganglio centinela (BSGC) (76).

Hay controversia sobre cuándo es el momento oportuno para realizar la disección ganglionar, de forma profiláctica en el momento de la extirpación de la lesión primaria cutánea o bien esperar y ver (“wait and see”) y llevarla a cabo cuando se observe afectación de la cadena linfática por parte del tumor. Xiao et al. proponen realizar una parotidectomía superior y disección electiva de los ganglios del cuello en pacientes con carcinomas escamosos de cabeza y cuello en estadio T3 y T4, sin tener en cuenta otros factores de riesgo como la profundidad de la invasión tumoral o la invasión perineural (77).

El papel de la biopsia selectiva de ganglio centinela (BSGC) está en estudio, en este momento parece no aportar un beneficio respecto a otras técnicas no invasivas como la ultrasonografía y la TAC (78). La BSGC es en general una técnica segura, con un riesgo combinado de infección, hematoma y seroma del 5,1% cuando se realiza para tumores de cabeza y cuello (79).

En pacientes inoperables, la opción más extendida es el tratamiento con radioterapia, que también se utiliza como coadyuvante en pacientes tratados con cirugía (80). La radioterapia postoperatoria ha demostrado ser útil para el manejo del CCE de alto riesgo (sobre todo con infiltración perineural), en el control del CCE con márgenes afectos tras la cirugía y en el CCE localmente avanzado (con metástasis parotídeas o ganglionares) (81). La radioterapia adyuvante asociada a cirugía no tiene efectos deletéreos sobre la calidad de vida y se asocia a un riesgo menor de recurrencia local (82). No se recomienda la radioterapia en pacientes con múltiples tumores o con piel severamente fotodañada, salvo que la esperanza de vida sea corta. En CCEs verrucosos no se debe utilizar esta técnica, puesto que se observa un incremento en el riesgo de metástasis (83). La radioterapia está contraindicada en pacientes con genodermatosis que predisponen a cáncer cutáneo (xeroderma pigmentoso) o con enfermedades del tejido conectivo como la esclerodermia (84).

Según la NCCN, en CCEs en estadio IV el tratamiento adecuado es la quimioterapia, sin que se haya definido un régimen estandarizado,

generalmente se emplean derivados del platino (cisplatino o carboplatino), taxanos, gemcitabina, 5-fluorouracilo, metotrexato, adriamicina, isofosfamida o bleomicina, de manera aislada o combinados (85, 86, 87).

En la actualidad se investiga el papel que pueden desempeñar las moléculas anti programmed cell death protein 1 (*anti PD-1*) en el tratamiento de la enfermedad avanzada: en un ensayo clínico reciente con el anti PD-1 cemiplimab se produce una respuesta en aproximadamente la mitad de los pacientes con enfermedad avanzada (88).

Se han empezado a utilizar inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) como gefitinib, cetuximab o panitumumab en el tratamiento de la enfermedad avanzada (89, 90, 91).

Según la versión de 2019 de la guía de la NCCN para el CCE, se recomienda seguimiento dermatológico, exploración completa y palpación de adenopatías en los pacientes con CCE localizado sin enfermedad ganglionar o metastásica cada 3 a 12 meses durante los primeros 2 años, posteriormente cada 6 a 12 meses los siguientes 3 años, y finalmente una vez al año de por vida. En pacientes con enfermedad regional se recomienda seguimiento cada 1 a 3 meses durante el primer año, cada 2 a 4 meses durante el segundo año, cada 4 a 6 meses del tercer al quinto año y posteriormente cada 6 a 12 meses de por vida (55).

La guía de la Asociación Europea de Dermato-Oncología, publicada en 2015, recomienda el seguimiento anual de todos los pacientes con CCEs. En pacientes de alto riesgo (>2 cm de diámetro, tumores con infiltración profunda, pobre diferenciación histológica, invasión perineural, tumores recurrentes y localizados en el labio u oreja) se aconseja realizar palpación del lugar de la extirpación y de los ganglios regionales cada 3 meses durante los 2 primeros años, posteriormente cada 6 meses durante 3 años y a partir de ese momento de manera anual. En pacientes con tumores localmente avanzados y con metástasis locorregionales, se recomienda la realización de ecografía de la zona de drenaje

linfática cada 3 meses. Además, esta guía señala la importancia de hacer un seguimiento estricto (cada 6 meses) a los pacientes que presentan un alto riesgo de desarrollar nuevos tumores, como son los pacientes inmunodeprimidos (66).

Para la prevención del CCE se debe instruir al paciente en la necesidad de autoevaluación de su piel y de realizar una fotoprotección correcta.

1.1.9. PRONÓSTICO

El potencial metastásico del CCE se estima entre el 2 y el 5% y el número de muertes atribuibles a este tumor es del 1,5% (2, 3). No obstante, Schmults et al. estiman una tasa de mortalidad del 2,1% y Eigentler et al. del 3% (92, 93). La mediana de supervivencia en el estudio realizado por Eigentler es de 51,8 meses, con una supervivencia global a los 3 años del 65,7% y una supervivencia libre de enfermedad del 95,3% (93). En otro estudio se muestra sin embargo una supervivencia total del 70% en una cohorte de pacientes de alto riesgo y una supervivencia libre de enfermedad de solo el 85% (94).

Los pacientes con CCEC metastásico y que son tratados con cirugía y radioterapia postoperatoria (sobre todo aquellos inmunodeprimidos o con afectación nodal extracapsular) tienen un pronóstico relativamente pobre (95).

En general se trata de un tumor con buen pronóstico en fases iniciales, por lo que es necesario un diagnóstico precoz y un tratamiento adecuado.

1.2. QUINASA DE ADHESIÓN FOCAL

Las moléculas de adhesión focal son proteínas celulares que se sitúan en los lugares donde los receptores de integrinas agrupados interactúan con la matriz extracelular en el exterior de las células, y con el citoesqueleto de actina en el interior. Proporcionan una fuerte adhesión a la matriz extracelular y transmiten la tensión mecánica generada dentro de las células hacia el exterior a través de la membrana plasmática. Actúan como andamios para muchas vías de señalización activadas por el acoplamiento de integrinas o por la fuerza mecánica ejercida sobre las células (96).

La quinasa de adhesión focal (FAK) se describe hace más de 20 años como sustrato del producto oncogénico del virus del sarcoma (v-Src) y como una proteína altamente fosforilada al agrupar las integrinas en las adhesiones focales (97, 98). Después, el grupo de Willian Cance en la Universidad de Carolina del Norte encuentra un aumento del ácido ribonucleico mensajero (mRNA) de FAK en tumores humanos invasivos y metastásicos (99).

FAK es una tirosina quinasa citoplasmática no receptora compuesta de un dominio N-terminal FERM (banda 4.1, ezrina, radixina, homólogo de moesina), un dominio quinasa central, varios dominios ricos en prolina y un dominio C-terminal de adhesión focal (FAT) (Figura 5) (100). Ejerce sus funciones a través de multitud de señales y proteínas efectoras, regulando la adhesión intercelular, migración, invasión, polaridad, proliferación y supervivencia celular (101, 102, 103). Se codifica en el gen FAK/PTK2, localizado en el brazo largo del cromosoma 8 (8q24).

Se ha señalado que FAK participa como una llave en las vías de señalización del EGFR. La identificación de la mayoría de los procesos biológicos regulados por FAK se ha estudiado en células no neoplásicas donde se documenta cómo la activación de FAK contribuye a la regulación de las

integrinas y de las señales del factor de crecimiento epidérmico que promueven la adhesión celular, la independencia del anclaje, la motilidad celular y la apoptosis (104). También se describe que desempeña un papel en la activación de Cdc42, Rac y Rho, que regulan el citoesqueleto de actina (101, 105).

La primera evidencia experimental que implica a FAK en la formación y progresión de tumores se obtiene al utilizar ratones knock-out condicionales con supresión selectiva de FAK en la epidermis (106).

La sobreexpresión de FAK favorece la capacidad de invasión y de metástasis de las células tumorales, así como de escape de los mecanismos de apoptosis, influyendo en el control de la interacción entre las células y la matriz extracelular (107).

Recientemente se describe el papel de FAK en el sistema inmune en el que participa en la transcripción de citocinas que reclutan linfocitos T reguladores. De esta forma las células que la expresan crean un microambiente de inmunosupresión inhibiendo la actividad citotóxica de los linfocitos T-CD8 permitiendo el crecimiento tumoral (108).

La sobreexpresión de FAK se observa en tumores epiteliales (101, 109, 110). FAK tiene un papel en la génesis de tumores intestinales, en la progresión de tumores de mama y en la formación de carcinomas neuroendocrinos en modelos murinos (111, 112, 113). La sobreexpresión o hiperfosforilación de FAK está elevada en los carcinomas de mama, ovario, colon, melanoma, tiroides, endometrio, hepatocelular y de células escamosas (114, 115, 116).

En carcinomas escamosos de cabeza y cuello se ha descrito la sobreexpresión de FAK asociada a ganancias en los genes PTP4a3 y KHDRBs3, así como al oncogen C-MYC, presentes en la región 8q24 (117, 118). Choi et al. demuestran la expresión inmunohistoquímica de FAK en una serie de lesiones cutáneas premalignas y malignas: queratosis actínicas, enfermedad de Bowen y CCEs, mientras que en piel sana perilesional su expresión es negativa (119).

La depleción o inhibición de FAK puede causar la regresión de CCEs (108). En la actualidad se están llevando a cabo diferentes ensayos clínicos con moléculas de pequeño tamaño que inhiben FAK. Estos estudios demuestran que estas moléculas son eficaces al inducir la apoptosis de las células tumorales, de esta forma se reducen las metástasis y la angiogénesis tumoral (120).

1.3. CORTACTINA

La cortactina (CTTN) es una proteína de unión a los filamentos de actina, codificada por el gen CTTN (antiguamente denominado EMS1), localizado en el brazo largo del cromosoma 11, en la región 11q13 (121). La CTTN se localiza dentro del citoplasma, alrededor del núcleo celular y también junto a la actina en la membrana plasmática y en los sitios periféricos de adhesión (122). La CTTN se expresa en todo el organismo a excepción de la mayoría de las células hematopoyéticas, que expresan una proteína similar llamada hematopoietic specific protein-1 (HS1) (123).

La CTTN está formada por los siguientes dominios: un dominio ácido N-terminal, un dominio de repetición en tándem, una región rica en prolina C-terminal que contiene varios sitios de fosforilación y un dominio SH3 (Figura 6). El extremo N-terminal es crítico para regular el ensamblaje de las ramificaciones de actina, a través de interacciones conservadas con el complejo proteico Arp2/3 (proteína relacionada con la actina 2/3) de nucleación de actina ramificada y con actina filamentosa, en los dominios ácido y de repetición respectivamente.

Esta proteína participa en diversas funciones celulares: en la adhesión intercelular, la degradación de la matriz intercelular, la dinámica de la membrana celular, la formación del entramado de actina y en la invadopodia (protrusiones de la membrana plasmática ricas en actina), todas ellas implicadas en la motilidad celular y la capacidad de invasión (124). Su papel fundamental se debe a la estabilización de los filamentos de actina, activando el complejo Arp 2/3 y promoviendo la polimerización de dichos filamentos (125).

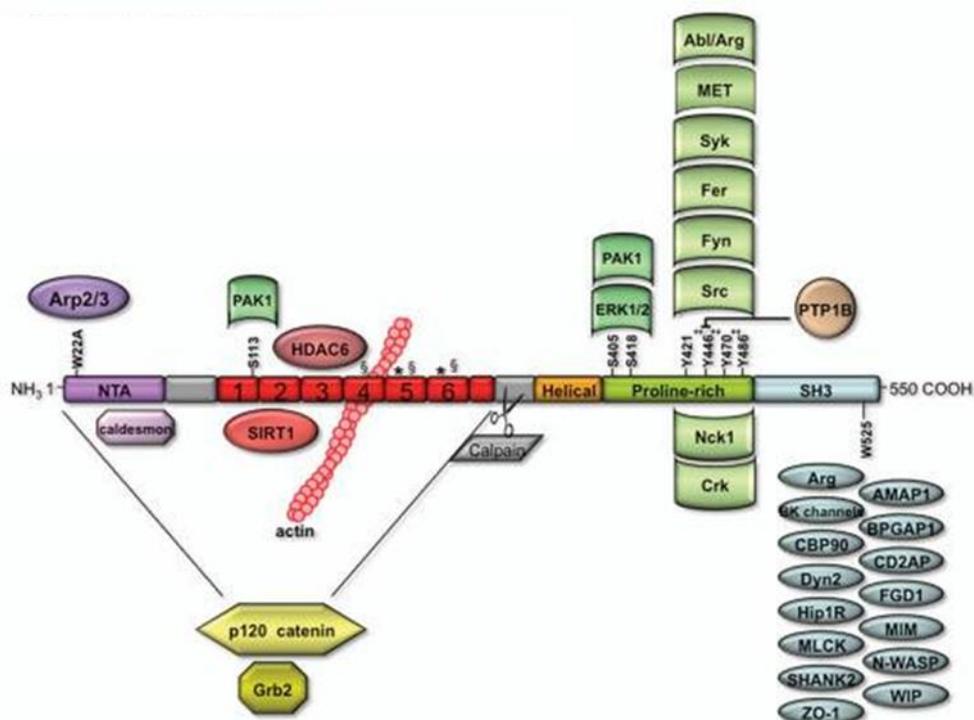


Figura 6. Dominios estructurales de CTTN. Dominio ácido N-terminal (NTA), dominio en tándem de repetición, dominio rico en prolina y dominio SH3; junto con las proteínas de unión de cada uno de los dominios. Tomada de Cell Adhesion & Migration (Kirkbride KC, Sung BH, Sinha S, Weaver AM. Cortactin: a multifunctional regulator of cellular invasiveness. Cell Adh Migr. 2011;5:187-98.).

El complejo Arp 2/3 está implicado en la formación de contactos de adhesión basados en E-cadherina. De esta manera, la CTTN está implicada en la estabilización de la red de actina y su actividad se relaciona con la motilidad.

La sobreexpresión de CTTN se detecta en numerosos tumores: la amplificación del gen CTTN se observa en un 15% de los tumores primarios de mama metastásicos y en aproximadamente un 30% de los carcinomas escamosos de cabeza y cuello (126, 127).

La ampliación del gen CTTN contribuye a la agresividad tumoral de los carcinomas escamosos de cabeza y cuello, incrementando los niveles de mRNA y de la proteína CTTN, y por tanto favorece la proliferación tumoral. Rodrigo et al. describen que la expresión de CTTN en los cánceres de laringe es un predictor de la mortalidad específica por enfermedad de manera independiente de la ciclina D1 y de la proteína FADD (Fas-associated protein with death domain) (128).

El papel de la CTTN también se describe en tumores de esófago, gástricos, hepáticos y colorrectales, así como en cáncer de ovario, melanoma y leucemia linfática crónica (121, 129, 130, 131).

La sobreexpresión de CTTN y/o la amplificación del gen CTTN se asocia con peor pronóstico en estos tumores (121).

En la actualidad, se están realizando estudios en cáncer de pulmón con moléculas dirigidas contra el gen CTTN, como miR-182, con capacidad para suprimir la formación de invadopodia y que por tanto reducen la capacidad metastatizante de los tumores (132). Se ha demostrado además que la terapia dual contra EGFR y CTTN es superior a la anti EGFR en el carcinoma de células escamosas oral (133).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

Se postula la hipótesis de que los pacientes con carcinomas cutáneos de células escamosas de cabeza y cuello (CCECs) que expresan quinasa de adhesión focal (FAK) o cortactina (CTTN) tienen un riesgo mayor de presentar metástasis ganglionares.

Para contrastar esta hipótesis se diseña un estudio de casos y controles, hospitalario, retrospectivo.

2.2. OBJETIVOS

a) Estudiar la expresión de FAK y CTTN en CCECs que presentan metástasis ganglionares y compararla con CCECs que no las presentan.

b) Analizar la posible asociación entre la inmunoexpresión de FAK y CTTN y las variables clinicopatológicas más relevantes.

c) Evaluar el valor pronóstico de la expresión de FAK y CTTN en el desarrollo de metástasis ganglionares y la supervivencia global de los pacientes.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Se diseña un estudio de casos y controles. Para realizar el estudio se obtiene la aprobación del Comité de Ética e Investigación Clínica del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA). El estudio se realiza siguiendo los parámetros de la guía STROBE (Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology) para estudios de casos y controles (134).

3.1. SELECCIÓN DE PACIENTES

Se realiza una búsqueda en la base de datos del Servicio de Anatomía Patológica del HUCA entre el año 1998 y 2008, para seleccionar a los pacientes que han desarrollado metástasis ganglionares a partir de un CCEC.

Se seleccionan los tumores primarios que han sido extirpados con cirugía convencional. Los pacientes que presentan afectación tumoral de los márgenes histológicos de la pieza de extirpación son excluidos, de forma similar son excluidos los pacientes que han recibido alguna forma de terapia adyuvante tras la cirugía.

Con estas premisas se localizan 50 pacientes que desarrollan metástasis ganglionares durante este período. Se obtiene el material biológico guardado en los bloques de parafina de todos los pacientes. Los controles (50 pacientes) se seleccionan de manera aleatoria entre aquellos pacientes con CCECs primarios que no desarrollan ningún tipo de metástasis tras un período de seguimiento de 4 años.

Los datos clínicos relacionados con el paciente son recogidos de manera retrospectiva. La edad del paciente se define como aquella que tiene en el momento de la resección del tumor.

3.2. VARIABLES CLÍNICAS

Las variables clínicas estudiadas en los pacientes incluidos en el estudio son:

- Edad: aquella que presenta el paciente en el momento del diagnóstico del CCEC.
- Sexo: masculino o femenino.
- Localización: pabellón auricular, zona preauricular, zona retroauricular, cuero cabelludo, zona malar, frente, nariz, mentón o mejilla.
- Inmunosupresión: paciente inmunocompetente o inmunodeprimido.
- Tamaño del tumor: medido en milímetros (dicotomizado como ≤ 20 mm o >20 mm).
- Presencia de otros CCEs en los pacientes incluidos en la muestra: definida como presente o ausente.

3.3. VARIABLES HISTOLÓGICAS

En los casos y controles en los que se conservan las laminillas con la tinción de H&E, el estudio de las variables se hace sobre esos cristales. En aquellos en los que no se pueden localizar, se realiza un corte a partir del bloque de parafina y se realiza una tinción estándar con H&E. En cada muestra se valoran y se registran las siguientes características histológicas:

- Grosor tumoral o índice de Breslow: profundidad tumoral media medida en milímetros y dicotomizado como ≤ 6 mm o >6 mm.

- Nivel anatómico (nivel de Clark): I, II, III, IV o V (dicotomizado como $<IV$ o $\geq IV$).
- Grado histológico de diferenciación: caracterizado como bien diferenciado, moderadamente diferenciado y pobremente diferenciado.
- Desmoplasia: caracterizada como presente o ausente.
- Invasión perineural: caracterizada como presente o ausente.
- Invasión linfovascular: caracterizada como presente o ausente.
- Clasificación T patológica: pT1 o pT2 según la 7ª edición del AJCC; pT1, pT2 o pT3 según la 8ª edición del AJCC.
- Clasificación del Hospital Brigham and Women's: T1, T2 o T3.
- Presencia y número de gemas tumorales (tumor buds): presencia o ausencia y dicotomizado como de baja intensidad (<5) o de alta intensidad (≥ 5).

3.4. ESTADIFICACIÓN

La estadificación de los tumores se realiza según la 8ª clasificación del AJCC, la 7ª clasificación del AJCC y la clasificación del Hospital Brigham and Women's (52).

3.5. CONSTRUCCIÓN DE TISSUE MICROARRAYS

En cada tumor se seleccionan y marcan en la laminilla de H&E las áreas morfológicamente representativas. En el bloque parafinado de esa laminilla se toman 3 cilindros de 1 mm de material tumoral para la construcción de los tissue microarrays (TMAs). Se construyen en total 4 TMAs, conteniendo tres “cores” de cada uno de los 100 CCECs. Para evitar sesgos cada caso y control con sus tres “cores” se colocan de forma aleatoria. En cada TMA se incluyen además tres “cores” de piel normal como control interno.

3.6. INMUNOHISTOQUÍMICA

Los TMAs se cortan en secciones de 3 micras y se adhieren en portas Flex IHC (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca). Las secciones se desparafinan con Xyleno estándar y se hidratan en concentraciones graduales decrecientes de alcohol.

La recuperación de antígenos se realiza calentando las secciones utilizando la solución Envision Flex Target Retrieval (Dako), a pH 9,0 en ambos marcadores.

El protocolo específico para cada marcador se realiza de la siguiente manera:

-FAK: La tinción se lleva a cabo a temperatura ambiente en una estación de trabajo de tinción automática (*Dako Autostainer Plus*) utilizando el anticuerpo monoclonal anti-FAK clon 4.47 (*Upstate Biotechnology, Lake Placid, New York*) en dilución 1:250. Se utiliza como sistema de visualización el kit Dako Envision Flex (*Dako Autostainer*).

-CTTN: La tinción se lleva a cabo a temperatura ambiente en una estación de trabajo de tinción automática (*Dako Autostainer Plus*) utilizando el

anticuerpo monoclonal anti-CTTN clon 30 (*BD Biosciences Pharmingen, San Diego, California*) en dilución 1:200. Se utiliza como sistema de visualización el kit Dako Envision Flex (*Dako Autostainer*).

3.7. CUANTIFICACIÓN DE MARCADORES

Las preparaciones se analizan por dos observadores de forma independiente y sin conocimiento de ningún dato clínico. Las discrepancias interobservador, inferiores al 5% del total de las muestras estudiadas, se resuelven por consenso.

Los controles de piel normal no muestran expresión de FAK y CTTN. La tinción con CTTN y FAK se distribuye de forma homogénea en las muestras. La inmunotinción se valora de forma semicuantitativa, de acuerdo con la intensidad de la tinción. Se considera positiva si la tinción se observa en al menos el 1% del core estudiado (128, 135):

- *Negativa* (0).
- *Débil* (+).
- *Moderada* (++)
- *Intensa* (+++). (Figuras 7,8)

Las tres muestras de cada tumor muestran una tinción prácticamente similar en todos los casos, en aquellos casos en los que existen discrepancias entre las tres muestras se selecciona el valor de la que presenta mayor intensidad.

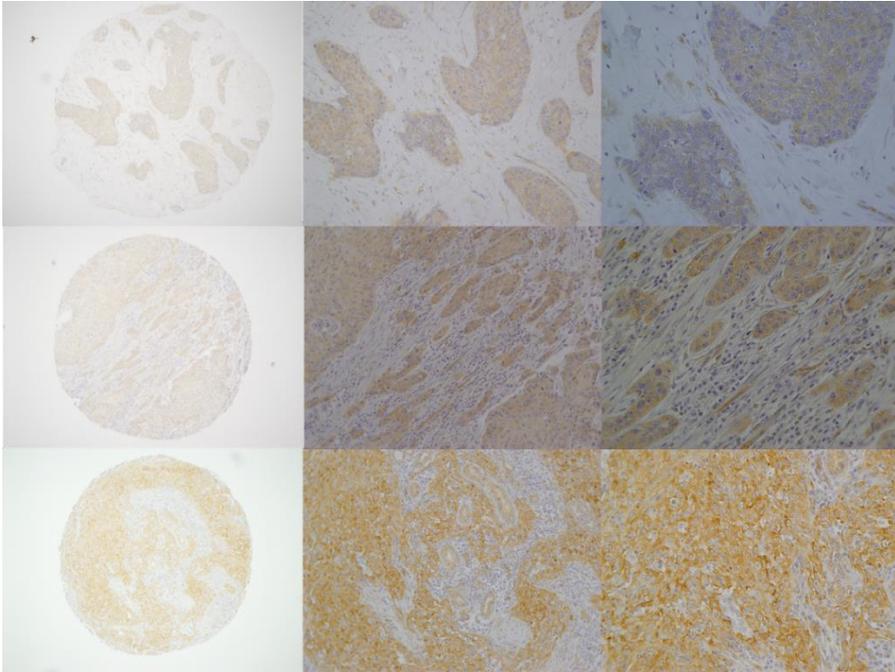


Figura 7. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de FAK en muestras de tejido de CCE.

Fila superior, de izquierda a derecha: FAK x10, x20, x40, tinción débil.

Fila central, de izquierda a derecha: FAK x10, x20, x40, tinción moderada.

Fila inferior, de izquierda a derecha: FAK x10, x20, x 40, tinción intensa.

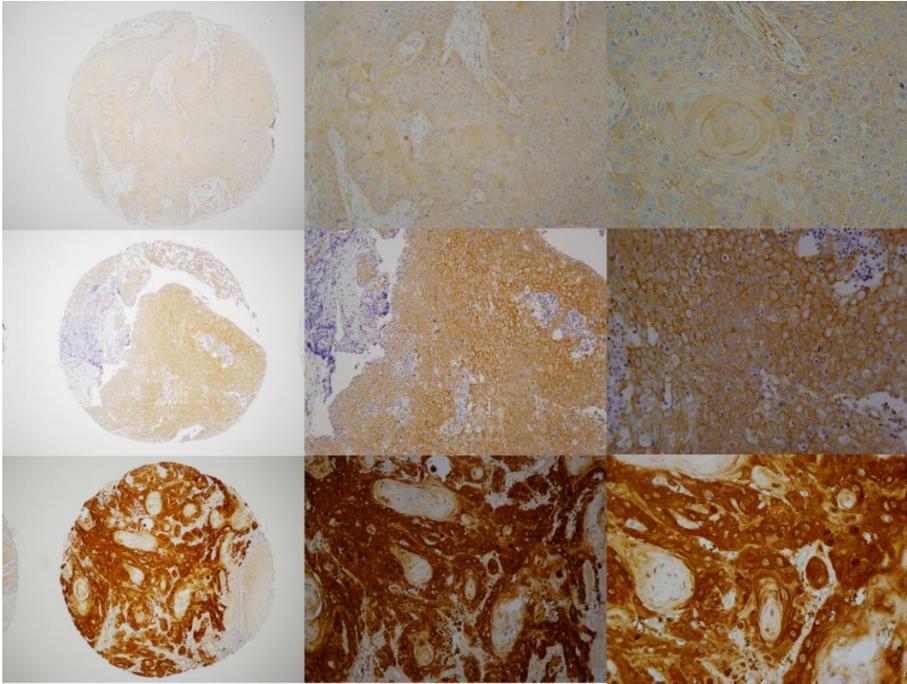


Figura 8. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de CTTN en muestras de tejido de CCE.

Fila superior, de izquierda a derecha: CTTN x10, x20, x40, tinción débil.

Fila central, de izquierda a derecha: CTTN x10, x20, x40, tinción moderada.

Fila inferior, de izquierda a derecha: CTTN x10, x20, x 40, tinción intensa.

3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las características clínicas y demográficas de los pacientes y los datos histológicos se estudian mediante un análisis estadístico descriptivo estándar. Se utiliza el test exacto de Fisher y el chi-cuadrado para la comparación entre variables categóricas y el coeficiente de correlación no paramétrico de Spearman para la comparación entre la expresión de ambas proteínas.

Los puntos de salida primarios (endpoints) son el tiempo hasta que se producen las metástasis ganglionares, definido como el tiempo desde la fecha de diagnóstico del tumor primario hasta la fecha del diagnóstico de la metástasis ganglionar, y el tiempo hasta la muerte, definido como el tiempo desde la fecha de diagnóstico del tumor primario hasta la fecha de la muerte atribuibles a cualquier causa incluida la muerte por el tumor.

De manera convencional, dependiendo de su simetría y naturaleza, las variables se describen utilizando la media \pm desviación estándar, medianas con percentiles 25 y 75 y frecuencias absolutas y relativas. El impacto de los eventos estudiados en la cohorte considerada se resume en tasas de incidencia e intervalos de confianza al 95%.

Se calculan las curvas de incidencia acumulada para las metástasis ganglionares. Se utiliza el estimador de Gray para su estimación y se comparan a partir del procedimiento descrito en el mismo (136).

Se usan los modelos de regresión de riesgos proporcionales propuestos por Fine y Gray para calcular los índices de riesgo, *hazard ratios* (HRs), utilizados como una medida del tamaño del efecto promedio, crudos y ajustados por potenciales factores de confusión (137). Este mismo procedimiento se emplea también para calcular los HRs para el modelo específico de muerte debida a tumor. Se calculan los intervalos de confianza al 95% para los HRs.

La influencia de los factores sobre la mortalidad se analiza utilizando modelos estándar de regresión de Cox. Se calculan los HRs crudos y ajustados

con sus intervalos de confianza al 95%. Los modelos ajustados incluyen variables relacionadas con el peor pronóstico del tumor, presencia o ausencia de gemas tumorales y adicionalmente la presencia de metástasis ganglionares (esta variable se incluye como covariable dependiente del tiempo).

Los valores de $p < 0,05$ se consideran estadísticamente significativos. Todos los análisis se realizan utilizando el free environment R (www.r-project.org), en concreto los paquetes `package survival` y `cmprsk`.

4. RESULTADOS

4.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA Y VARIABLES CLÍNICAS

4.1.1. SEXO Y EDAD

Se incluyen 100 pacientes en el estudio. De ellos 78 (78%) son varones y 22 (22%) son mujeres con una edad media de $79,0 \pm 8,1$ años. En el subgrupo de carcinomas cutáneos de células escamosas de cabeza y cuello metastásicos (CCEM) 40 (80%) son varones y 10 (20%) son mujeres con una edad media de $79,2 \pm 7,8$ años. En el subgrupo de carcinomas cutáneos de células escamosas de cabeza y cuello no metastásicos (CCENM) 38 (76%) son varones y 12 (24%) son mujeres con una edad media de $78,7 \pm 8,4$ años.

No se encuentran diferencias en cuanto a las variables sexo HR (Hazard ratio) = 0,77 (IC95% = 0,38-1,69) ($p=0,472$) ni edad HR = 1,00 (IC95% = 0,97-1,04) ($p=0,834$) entre ambos grupos.

En global, el tiempo medio de seguimiento es de 4,17 años (rango 0,70-12 años), con un total de 439,5 años-paciente. En el grupo de CCEM son 151 años-paciente y en el grupo CCENM son 288 años-paciente ($p<0,001$).

4.1.2. LOCALIZACIÓN ANATÓMICA DEL TUMOR

Los tumores primarios se localizan de la siguiente forma: 20 en el pabellón auricular, 17 en el cuero cabelludo, 17 en la frente, 12 en la mejilla, 12 en la zona preauricular, 8 en la región malar, 7 en la nariz, 4 en la zona retroauricular, 2 en región periocular y 1 en el mentón. En la figura 9 se muestra la relación de la localización de los CCECs incluidos, de forma global y desglosados en metastásicos y no metastásicos (Figura 9).

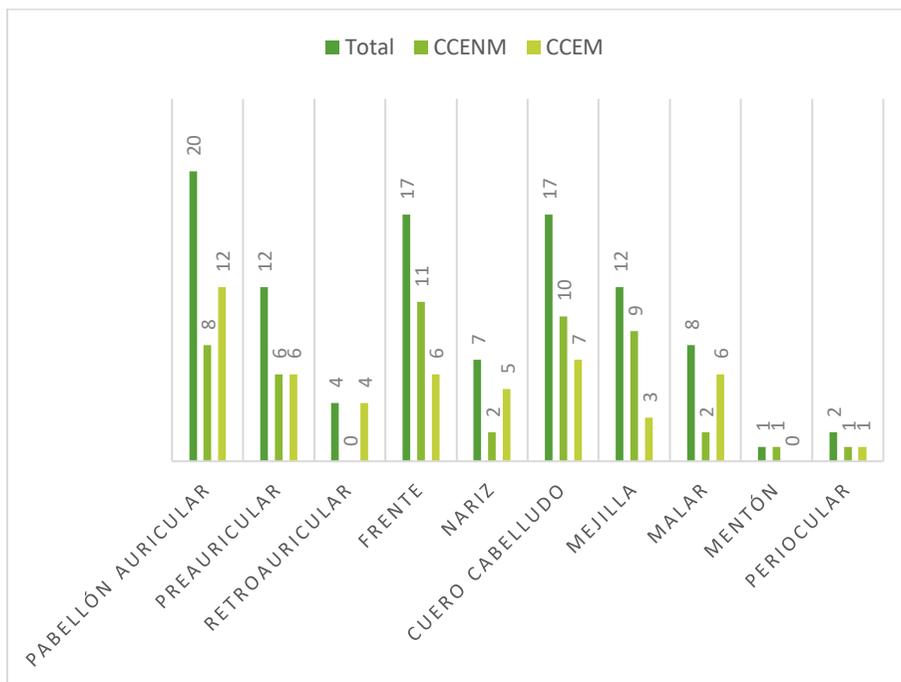


Figura 9. Localización anatómica de los CCEs.

El pabellón auricular presenta mayor número de tumores metastásicos que no metastásicos. Al agrupar entre la zona del pabellón auricular, localización que se asocia clásicamente a riesgo aumentado de producirse metástasis, y el resto de las localizaciones no se encuentran diferencias entre el subgrupo de CCEM y el de los CCENM. El HR es de 0,76 (IC95%= 0,39-1,45) (Tabla 6).

4.1.3. TAMAÑO TUMORAL

La media de tamaño tumoral en el grupo de los CCEM es de $28,5 \pm 16,4$ mm y en el grupo de los CCENM es de $16,8 \pm 8,3$ mm ($p < 0,001$). Al dicotomizar la muestra con el punto de corte establecido de 20 mm el HR es 4,01 (IC95%= 2,26-7,09) (Tabla 6).

4.1.4. INMUNOSUPRESIÓN

Entre los 11 pacientes que presentan inmunosupresión se producen metástasis ganglionares en 6 de ellos: 3 pacientes trasplantados renales, 2 con leucemia linfática crónica y 1 trasplantado hepático. Por el contrario, en 5 pacientes inmunosuprimidos no se presentan metástasis: 2 pacientes trasplantados renales, 1 trasplantado cardíaco, 1 con policitemia vera en tratamiento con hidroxiurea y 1 con un linfoma B difuso de célula grande.

No se encuentra diferencia estadística significativa entre los dos subgrupos (Tabla 6).

4.1.5. OTROS CCEs

Respecto a la existencia de otros CCEs, su frecuencia es ligeramente superior en el grupo de los CCENM en relación con el de los CCEM, sin alcanzar diferencias estadísticas significativas (HR= 0,80; IC95%= 0,42-1,51) (Tabla 6).

Tabla 6. Variables clínicas estudiadas; valor p y HR IC95%.

	Total (%) <i>N=100</i>	CCENM <i>(%) N=50</i>	CCEM <i>(%) N=50</i>	Valor <i>p</i>	HR (IC 95%)
Localización tumoral					
<i>Pabellón Auricular</i>	20 (20)	8 (16)	12 (24)	0,454	1 (Ref)
<i>Otras localizaciones</i>	80 (80)	42 (84)	38 (76)	0,454	0,76 [0,39-1,45]
Tamaño tumor horizontal					
<i>Media ± DE, mm</i>	22,6 ± 14,2	16,8 ± 8,3	28,5 ± 16,4	<0,001	1,04 [1,03-1,06]
≤ 20mm	65 (65)	42 (84)	23 (46)	<0,001	1 (Ref)
> 20 mm	35 (35)	8 (16)	27 (54)	<0,001	4,01 [2,26-7,09]
Inmunosupresión					
<i>Inmunocompetentes</i>	89 (89)	45 (90)	44 (88)	1,000	1 (Ref)
<i>Inmunodeprimidos</i>	11 (11)	5 (10)	6 (12)	1,000	0,96 [0,41-2,25]
Otros CCE					
<i>No</i>	71 (71)	35 (70)	36 (72)	0,500	1 (Ref)
<i>Si</i>	29 (29)	15 (30)	14 (28)	0,500	0,80 [0,42-1,51]

4.2. VARIABLES HISTOLÓGICAS

4.2.1. ÍNDICE DE BRESLOW

La profundidad tumoral media medida en milímetros (índice de Breslow) es mayor de forma estadísticamente significativa en los CCEM con respecto a los CCENM: $12,3 \pm 7,0$ mm en los CCEM y $5,6 \pm 3,9$ mm en CCENM, con un HR= 1,10 (IC95%= 1,07-1,14) ($p<0,001$).

Ninguno de los tumores de la serie presenta un grosor menor de 2 mm. Al dicotomizar la muestra entre tumores de menos de 6 mm de grosor y mayores de 6 mm, se observa que el número de casos con grosor de más de 6 mm es significativamente mayor en los CCEM, con un HR= 5,73 (IC95% = 2,91-11,29) ($p<0,001$) (Tabla 7).

Tabla 7. Grosor tumoral en mm y dicotomizado; valor p y HR IC95%.

<i>Grosor tumoral</i>	<i>Total (%)</i> (N=100)	<i>CCENM (%)</i> (N=50)	<i>CCEM (%)</i> (N=50)	<i>Valor p</i>	<i>HR (95% IC)</i>
Media \pm DE, mm	8,95 \pm 6,6	5,6 \pm 3,9	12,3 \pm 7,0	<0,001	1,10 [1,07-1,14]
0-6mm	50 (50)	38 (76)	12 (24)	<0,001	1
> 6mm	50 (50)	12 (24)	38 (76)	<0,001	5,73 [2,91-11,29]

4.2.2. NIVEL DE CLARK

Al clasificar los tumores según niveles anatómicos (clasificación de Clark), se observa que todos ellos presentan al menos un nivel III (Tabla 8, Figura 10). Los tumores de un nivel mayor o igual a IV presentan una invasión significativamente más profunda, con un HR=11,49 (IC95%= 2,78-47,41) ($p<0,001$) en relación a los que son incluidos en el nivel III (Tabla 9).

Tabla 8. Nivel anatómico de los tumores.

Nivel anatómico	CCENM (%) (N=50)	CCEM (%) (N=50)	Total (%) (N=100)
Clark III	22 (44%)	2 (4%)	24 (24%)
Clark IV	25 (50%)	22 (44%)	47 (47%)
Clark V	3(6%)	26 (52%)	29 (29%)

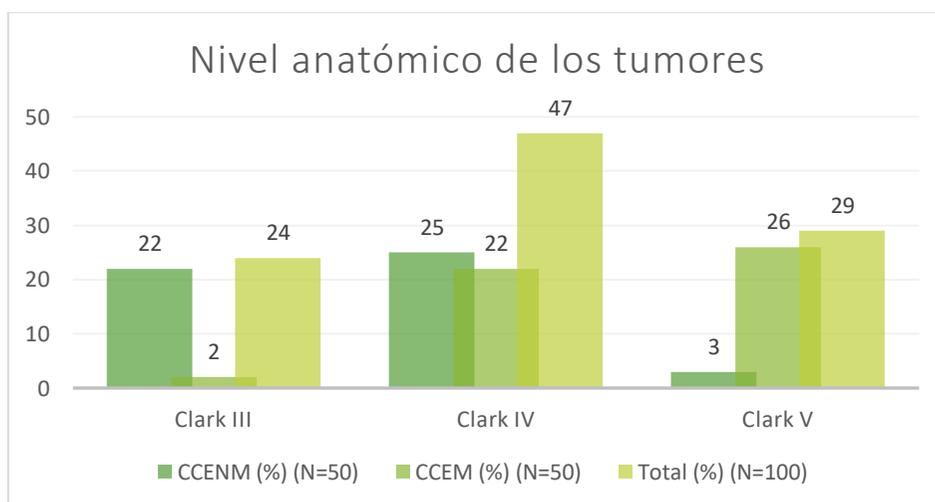


Figura 10. Nivel anatómico de los tumores.

Tabla 9. Nivel anatómico de los tumores dicotomizado en menores de IV y mayores o iguales a IV; valor p y HR IC95%.

<i>Nivel anatómico</i>	<i>Total (%) (N=100)</i>	<i>CCENM (%) (N=50)</i>	<i>CCEM (%) (N=50)</i>	<i>Valor p</i>	<i>HR (IC 95%)</i>
<IV	24 (24)	22 (44)	2 (4)	<0,001	1 (Ref)
≥IV	76 (76)	28 (56)	48 (96)	<0,001	11,49 [2,78-47,41]

4.2.3. GRADO DE DIFERENCIACIÓN

De los 50 CCENM presentes en la muestra se observan 34 tumores bien diferenciados, 16 moderadamente diferenciados y ninguno pobremente diferenciado. En el grupo de los 50 CCEM se observan 18 tumores bien diferenciados, 28 moderadamente diferenciados y 4 pobremente diferenciados. Al comparar entre los tres grupos se observa que en los CCEM son más frecuentes los tumores moderada y pobremente diferenciados: el HR en el subgrupo de los tumores moderadamente diferenciados es de 2,44 (IC95%= 1,52-3,29) y en el de los tumores pobremente diferenciados de 5,68 (IC95%= 1,78-18,96), ambos con significación estadística (Tabla 10).

RESULTADOS

Tabla 10. CCE agrupados según la diferenciación y las diferentes comparaciones; valor p y HR IC95%.

<i>Diferenciación</i>	<i>Total (%)</i> (N=100)	<i>CCENM (%)</i> (N=50)	<i>CCEM (%)</i> (N=50)	<i>Valor p</i>	<i>HR (IC 95%)</i>
<i>Bien diferenciado</i>	53 (53)	34 (68)	18 (36)	0,001	1 (Ref)
<i>Moderado</i>	43 (43)	16 (32)	28 (56)	0,040	2,44 [1,52-3,29]
<i>Pobre</i>	4(4)	0(0)	4(8)	0,226	5,68 [1,78-18,96]
<i>Bien + Moderado</i>	96 (96)	50 (100)	46 (92)	0,117	1 (Ref)
<i>Pobre</i>	4 (4)	0 (0)	4 (8)	0,126	3,53 [1,27-10,41]
<i>Bien</i>	53 (53)	34 (68)	18 (36)	0,005	1 (Ref)
<i>Moderado + Pobre</i>	47 (47)	16 (32)	32 (64)	0,005	2,76 [1,56-4,21]

4.2.4. INVASIÓN PERINEURAL

Respecto a la invasión perineural, esta fue significativamente más frecuente en los CCEM (12 casos) respecto a los CCENM (2 casos) (Tabla 11), con un HR=3,74 (IC95%= 1,94-7,22).

Tabla 11. Presencia de invasión perineural; valor p y HR IC95%.

<i>Invasión perineural</i>	<i>Total (%)</i> (N=100)	<i>CCENM (%)</i> (N=50)	<i>CCEM (%)</i> (N=50)	<i>Valor p</i>	<i>HR (IC 95%)</i>
<i>No presente</i>	86 (86)	48 (96)	38 (76)	0,008	1 (Ref)
<i>Presente</i>	14 (14)	2 (4)	12 (24)	0,008	3,74 [1,94 -7,22]

4.2.5. DESMOPLASIA

En 14 pacientes de la muestra se observa desmoplasia, 12 en el grupo de los CCEM y 2 en el de los CCENM. Las diferencias son significativas, con un HR=3,09 (IC95%= 1,6-5,98) (Tabla 12).

Tabla 12. Presencia de desmoplasia; valor p y HR IC95%.

<i>Desmoplasia</i>	<i>Total (%)</i> (N=100)	<i>CCENM (%)</i> (N=50)	<i>CCEM (%)</i> (N=50)	<i>Valor p</i>	<i>HR (IC 95%)</i>
<i>No</i>	86 (86)	48 (96)	38 (76)	0,007	1 (Ref)
<i>Si</i>	14 (14)	2 (4)	12 (24)	0,007	3,09 [1,6-5,98]

4.2.6. INVASIÓN LINFOVASCULAR

La invasión linfovascular es más frecuente en los CCEM, está presente en 3 de ellos frente a ninguno de los CCENM, con significación estadística HR=5,95 (IC95%= 1,73-20,4) (Tabla 13).

Tabla 13. Presencia de invasión linfovascular; valor p y HR IC95%.

<i>Invasión linfovascular</i>	<i>Total</i> (N=100)	<i>CCENM (%)</i> (N=50)	<i>CCEM (%)</i> (N=50)	<i>Valor p</i>	<i>HR (IC 95%)</i>
<i>No presente</i>	97 (97)	50 (100)	47 (94)	0.242	1 (Ref)
<i>Presente</i>	3 (3)	0 (0)	3 (6)	0.242	5.95 [1,73-20,4]

4.2.7. CLASIFICACIÓN T PATOLÓGICA

Siguiendo la 7ª edición del AJCC, 50 CCEM son estadíos pT2 (todos), mientras que en el grupo de los CCENM hay 13 pacientes con estadío pT1 y 37 con pT2, las diferencias entre ambos subgrupos son estadísticamente significativas HR=28,2 (IC95%= 1,28-62,145) (Tabla 14).

Tabla 14. Clasificación pT (7ª edición TNM); valor p y HR IC95%.

<i>Estadio patológico 7ª edición</i>	<i>Total (%) (N=100)</i>	<i>CCENM (%) (N=50)</i>	<i>CCEM (%) (N=50)</i>	<i>Valor p</i>	<i>HR (IC 95%)</i>
<i>pT1</i>	13 (13)	13 (26)	0 (0)	<0,001	1 (Ref)
<i>pT2</i>	87 (87)	37 (74)	50 (100)	<0,001	28,2 [1,28-62,145]

Según la clasificación patológica de la 8ª clasificación del AJCC, en el subgrupo de los CCENM hay 34 pT1, 3 pT2 y 13 pT3, mientras que en el subgrupo de los CCEM hay 3 pT1, 3 pT2 y 44 pT3, con significación estadística de pT2 y pT3 frente a pT1, HR=11,4 (IC95%= 1,91-68,92) (Tabla 15).

Tabla 15. Clasificación pT (8ª edición TNM); valor p y HR IC95%.

<i>Estadio patológico 8ª edición</i>	<i>Total (%) (N=100)</i>	<i>CCENM (%) (N=50)</i>	<i>CCEM (%) (N=50)</i>	<i>Valor p</i>	<i>HR (IC 95%)</i>
<i>pT1</i>	37(37)	34(68)	3(6)	<0,001	1 (Ref) 11,4 [1,91-68,92]
<i>pT2</i>	6(6)	3 (6)	3(6)	<0,001	
<i>pT3</i>	57(57)	13(26)	44(88)	<0,001	

4.2.8. CLASIFICACIÓN DEL HOSPITAL BRIGHAM AND WOMEN'S

Según la clasificación del hospital Brigham and Women's, en el subgrupo de los CCEM 26 tumores corresponden al estadio T3, 16 al estadio T2 y 8 al estadio T1, mientras que en el subgrupo de los CCENM hay 5 tumores en estadio T3, 10 en estadio T2 y 35 en estadio T1. Se encuentra diferencia estadísticamente significativa entre los tumores T3 frente a los T1 y T2 HR= 4,28 (IC95%= 2,42-7,58) (Tabla 16).

Tabla 16. Clasificación T (Hospital Brigham and Women's); valor p y HR IC95%.

<i>Estadio Brigham and Women's</i>	<i>Total (%) (N=100)</i>	<i>CCENM (%) (N=50)</i>	<i>CCEM (%) (N=50)</i>	<i>Valor p</i>	<i>HR (IC 95%)</i>
<i>T1</i>	43(43)	35(70)	8(16)	<0,001	
<i>T2</i>	26(26)	10(20)	16(32)	<0,001	1(Ref)
<i>T3</i>	31(31)	5(10)	26(52)	<0,001	4,28 [2,42-7,58]

4.2.9. GEMAS TUMORALES

En los casos de CCEM se encuentran mayor número de tumores que presentan gemas tumorales que en los CCENM ($p < 0,001$). Los tumores que han presentado metástasis tienen además alta intensidad de gemación, 5 o más focos de gemas tumorales en el frente del tumor en comparación con los que no metastatizan, entre los que no hay ninguno que presente alta intensidad (Tabla 17).

Tabla 17. Gemas tumorales; valor p y HR IC95%.

<i>Gemas tumorales</i>	<i>Total (%)</i> <i>(N=100)</i>	<i>CCENM</i> <i>(%)</i> <i>(N=50)</i>	<i>CCEM</i> <i>(%)</i> <i>(N=50)</i>	<i>Valor</i> <i>p</i>	<i>HR (95% IC)</i>
<i>Media ±DE <5</i>	2,64±3,90	0,26±0,80	5,02±4,29	<0,001	1,60 [1,35-1,90]
<i>Media ±DE ≥5</i>	8,85±3,86	0	8,85±3,86	<0,001	1,18[1,12-1,25]
<i>No identificadas</i>	55 (55)	44 (88)	11 (22)	<0,001	1(Ref)
<i>Presentes</i>	45 (45)	6 (12)	39 (78)	<0,001	9,29[4,57-18,85]
<i>Número de gemas</i>					
<5	80 (69)	50 (100)	30 (40)	<0,001	1 (Ref)
≥5	20 (31)	0 (0)	20 (60)	<0,001	5,76[3,14-10,54]

4.3. EXPRESIÓN DE FAK Y CORTACTINA

De manera previa al inicio del estudio se evalúan 10 biopsias de piel normal, ninguna de las cuales presenta expresión de FAK y/o CTTN. La expresión de FAK en al menos el 1% de las células tumorales se observa en 69 pacientes (69%). Se clasifica la expresión en débil (26 tumores), moderada (24 tumores) e intensa (19 tumores) de manera cualitativa.

La expresión de CTTN en al menos el 1% del tumor se detecta en 64 pacientes (64%). Se clasifica la expresión en débil (14 tumores), moderada (34 tumores) e intensa (16 tumores) (Tabla 18).

Tabla 18. Expresión de FAK y CTTN en CCENM y en CCEM.

FAK	<i>Ninguna</i>	<i>Débil</i>	<i>Moderada</i>	<i>Intensa</i>	<i>Chi cuadrado (p)</i>
CCENM	20 (40%)	17 (34%)	8 (16%)	5 (10%)	0,007
CCEM	11 (22%)	9 (18%)	16 (32%)	14 (28%)	
CTTN	<i>Ninguna</i>	<i>Débil</i>	<i>Moderada</i>	<i>Intensa</i>	
CCENM	19 (38%)	10 (20%)	16 (32%)	5 (10%)	0,168
CCEM	17 (34%)	4 (8%)	18 (36%)	11 (22%)	

Como se ilustra en las figuras 11 y 12, la expresión de FAK y CTTN tiene predominantemente un patrón citoplasmático homogéneo en las células tumorales, aunque algunos casos muestran un enriquecimiento de la proteína en la periferia celular y en otros casos se localiza en el frente de invasión tumoral (Figuras 11, 12). No se encuentra una correlación entre la expresión de FAK y CTTN: el coeficiente de correlación de Spearman entre la expresión de FAK y CTTN es de 0,493 (IC95%= 0,317-0,653) (Figura 13).

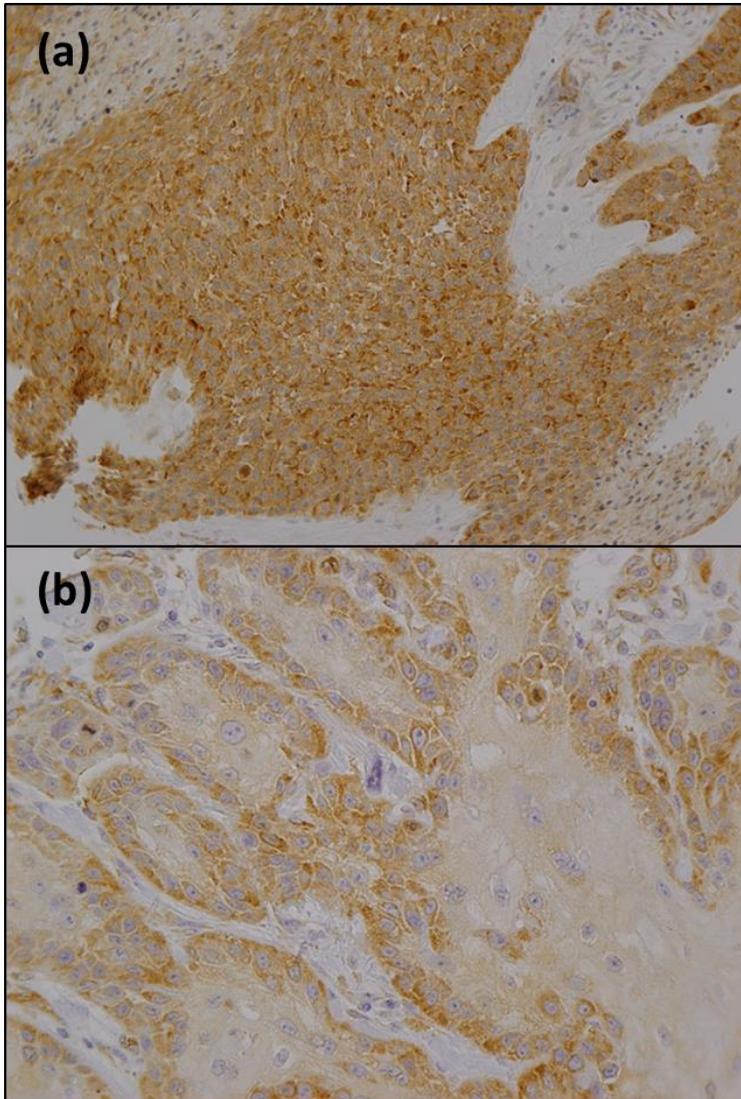


Figura 11. Patrones de tinción de FAK. a) FAK x 20. Tinción de intensidad fuerte homogénea. Alguna de las células expresa refuerzo periférico. b) FAK x 40. Tinción de intensidad media con refuerzo periférico en borde de avance de tumor.

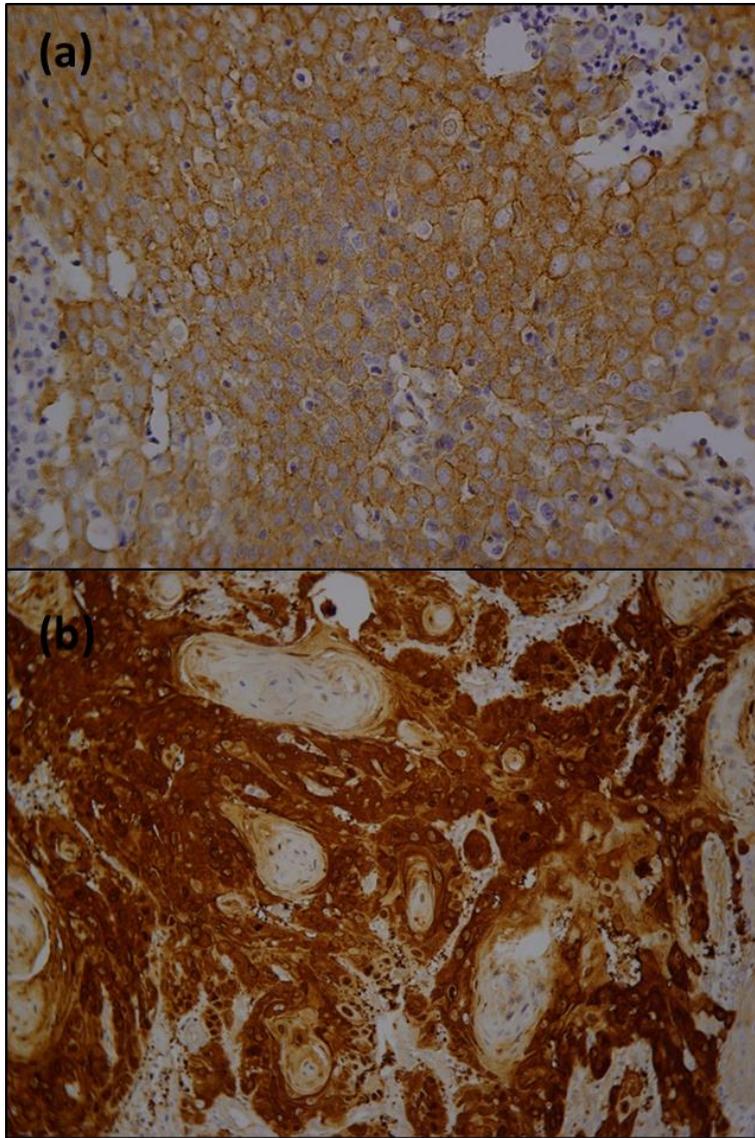


Figura 12. Patrones de tinción de CTTN. a) CTTN x 40. Tinción de intensidad media homogénea y algunas células muestran refuerzo periférico. b) CTTN x 20. Tinción de intensidad fuerte homogénea.

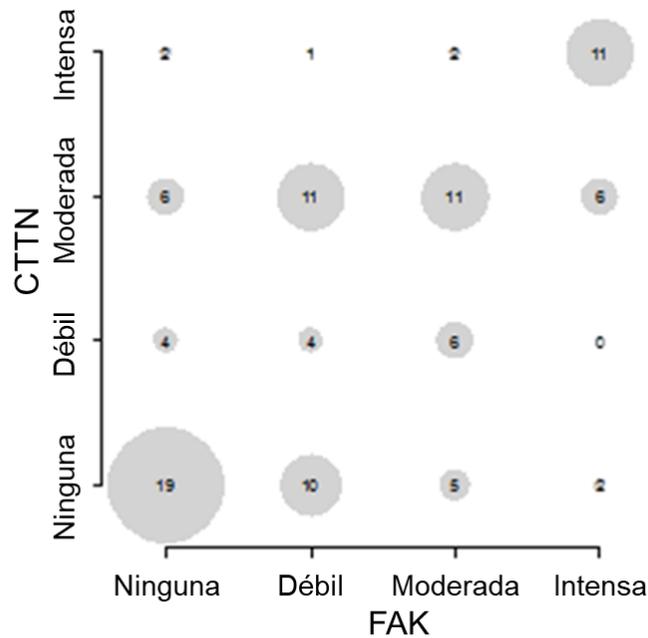


Figura 13. Relación entre FAK y CTTN. El grosor de los puntos es proporcional al número de individuos, incluido explícitamente.

La edad media (\pm desviación estándar) de los pacientes con tumores positivos para FAK es de $78,80 \pm 8,73$ años, y de $79,35 \pm 6,43$ años para los pacientes con tumores FAK-negativos.

La edad media de los pacientes con tumores positivos para CTTN (\pm desviación estándar) es de $78,91 \pm 8,05$ años y de $79,08 \pm 8,18$ años para los pacientes con tumores negativos para CTTN.

Al relacionar las características clínico-patológicas de los pacientes con CCEs con la expresión de FAK, no se observa asociación de manera significativa con ninguna variable estudiada (Tabla 19).

Respecto a la expresión de CTTN solo encontramos la expresión negativa de CTTN asociada a invasión perineural (Tabla 20).

En este punto del estudio de las asociaciones cabe señalar que se observa una correlación entre la expresión de FAK y el grosor tumoral, aunque esta no alcanza la significación estadística: encontramos 39 CCEs > 6 mm FAK positivos (56,5% de la muestra FAK positivo) versus 11 CCEs > 6 mm FAK-negativos (35,5% de la muestra FAK negativo) ($p=0,053$) (Tabla 19).

RESULTADOS

Tabla 19. Asociación entre la expresión de FAK y las características clínicas e

	Total N=100	Expresión de FAK		valor- p
		Ninguna N= 31	Otras N=69	
<i>Sexo, varón</i>	78	27 (87,1%)	51 (73,9%)	0,111
<i>Edad, Media ± desviación típica</i>	78,97 ± 8,06	79,35 ± 6,43	78,80 ± 8,73	0,722
<i>Grosor tumoral, mm</i>				
<i>Media ± desviación típica</i>	8,95 ± 6,56	7,39 ± 5,55	9,65 ± 6,89	0,085
<i>>6mm</i>	50	11 (35,5%)	39 (56,5%)	0,053
<i>Nivel anatómico, ≥IV</i>	75	21 (67,7%)	54 (78,3%)	0,190
<i>Diámetro tumoral, mm</i>				
<i>Media ± desviación típica, mm</i>	22,64 ± 14,20	21,26 ± 11,84	23,26 ± 15,18	0,477
<i>>20mm</i>	35	12 (38,7%)	23 (33,3%)	0,381
<i>Difereciación tumoral, 3/4</i>	96	30 (96,8%)	66 (95,7%)	0,635
<i>Desmoplasia</i>	14	5 (16,1%)	9 (13,0%)	0,449
<i>Localización tumoral, oreja</i>	36	12 (38,7%)	24 (34,8%)	0,436
<i>TNM, pT2=2</i>	86	25 (80,6%)	61 (88,4%)	0,231
<i>Inflamación</i>				0,820
<i>0</i>	25	9 (29,0%)	16 (23,2%)	
<i>1</i>	61	18 (58,1%)	43 (62,3%)	
<i>2</i>	14	4 (12,9 %)	10 (14,5%)	
<i>Otro CCE</i>	29	9 (29,0%)	20 (29,0%)	0,587
<i>Inmunosupresión</i>	11	3 (9,7%)	8 (11,6%)	0,539
<i>Invasión perineural</i>	14	5 (16,7%)	9 (13,2%)	0,435
<i>Invasión linfovascular</i>	4	1 (3,2%)	3 (4,3%)	0,635
<i>Gemas tumorales, >0</i>	45	11 (35,5%)	34 (49,3%)	0,143
<i>Gemas tumorales, >5</i>	20	4 (12,9%)	6 (23,2%)	0,180

Tabla 20. Asociación entre la expresión de CTTN y las características clínicas e histológicas de los pacientes con CCE primario.

	Expresión de CTTN		valor-p
	Ninguna N= 36	Otras N=64	
Sexo, varón	29 (80,6%)	49 (76,6%)	0,422
Edad, Media ± desviación típica	79,08 ± 8,18	78,91 ± 8,05	0,917
Grosor tumoral, mm			
<i>Media ± desviación típica</i>	10,11 ± 7,71	8,30 ± 5,78	0,224
<i>>6mm</i>	19 (52,8%)	31 (48,4%)	0,418
Nivel anatómico, ≥IV	28 (77,8%)	47 (73,4%)	0,409
Diámetro tumoral, mm			
<i>Media ± desviación típica, mm</i>	25,62 ± 17,48	20,80 ± 11,72	0,122
<i>>20mm</i>	16 (44,4%)	19 (29,7%)	0,103
Difereciación tumoral, 3/4	34 (94,4%)	62 (96,9%)	0,455
Desmoplasia	6 (16,7%)	8 (12,5%)	0,384
Localización tumoral, oreja	13 (36,1%)	23 (25,9%)	0,577
TNM, pT2=2	30 (83,3%)	56 (87,5%)	0,384
Inflamación			0,067
<i>0</i>	13 (36,1%)	12 (18,8%)	
<i>1</i>	21 (58,3%)	40 (62,5%)	
<i>2</i>	2 (5,6%)	12 (18,8%)	
Otro CCE	9 (25,0%)	20 (31,3%)	0,336
Inmunosupresión	5 (13,9%)	6 (9,4%)	0,352
Invasión perineural	9 (35,7%)	5 (7,9%)	0,019
Invasión linfovascular	2 (5,6%)	2 (3,1%)	0,455
Gemas tumorales, >0	20 (55,6%)	25 (39,1%)	0,084
Gemas tumorales, >5	7 (19,4%)	13 (20,3%)	0,568

4.4. EXPRESIÓN DE FAK Y CORTACTINA: MODELOS UNIVARIANTE Y MULTIVARIANTE

Al analizar el significado pronóstico de la expresión de FAK mediante un modelo univariante, encontramos que la expresión positiva de FAK es un predictor significativo de mayor riesgo de metástasis ganglionares (HR=2,04; IC95%= 1,08-3,86; p= 0,029). Este efecto se modula cuando se realiza un ajuste con los potenciales factores de confusión (Tabla 21).

El grosor tumoral, el diámetro tumoral y la diferenciación son los factores que demuestran un impacto significativo en el riesgo de metástasis, la mortalidad atribuible al tumor y en general en todas las causas de mortalidad. Estos factores se introducen en el modelo multivariante y la expresión de FAK se muestra como un predictor independiente estadísticamente significativo (HR=2,23; IC95%= 1,01-4,91; p=0,047).

Por el contrario, la expresión de CTTN no es un predictor significativo para el desarrollo de metástasis ganglionares en el modelo univariante ni en el modelo multivariante (Tabla 21).

RESULTADOS

Tabla 21. Modelo univariante y multivariante para el efecto de la expresión de FAK y de CTTN en las metastasis ganglionares y en la supervivencia global.

	Metástasis		Mortalidad tumoral		Mortalidad global	
<i>Expresión de</i>	HR (IC 95%)	Valor-p	HR (IC 95%)	Valor-p	HR (IC 95%)	Valor-p
FAK						
<i>Univariante</i>	2,04 (1,08-3,86)	0,029	1,55 (0,76-3,14)	0,230	0,92 (0,56-1,50)	0,731
<i>Multivariante</i>	2,23 (1,01-4,91)	0,047	1,40 (0,53-3,70)	0,500	1,05 (0,62-1,77)	0,848
<i>Edad</i>	1,00 (0,97-1,04)	0,820	1,03 (0,99-1,08)	0,170	1,08 (1,04-1,12)	<0,001
<i>Género</i>	0,81 (0,33-1,95)	0,640	0,55 (0,22-1,36)	0,190	0,57 (0,30-1,07)	0,082
<i>Grosor tumoral</i>	3,05 (1,40-6,65)	0,005	3,95 (1,61-9,71)	0,003	1,32 (0,71-2,47)	0,384
<i>Diámetro tumoral</i>	3,03 (1,50-6,12)	0,002	2,71 (1,24-5,92)	0,012	2,73 (1,41-5,30)	0,003
<i>Diferenciación tumoral</i>	0,43 (0,23-0,80)	0,008	0,29 (0,13-0,64)	0,002	0,39 (0,22-0,68)	0,001
CTTN						
<i>Univariante</i>	1,02 (0,56-1,85)	0,950	0,99 (0,51-1,91)	0,970	0,74 (0,46-1,20)	0,225
<i>Multivariante</i>	0,90 (0,49-1,67)	0,740	0,88 (0,43-1,81)	0,730	0,75 (0,46-1,23)	0,248
<i>Edad</i>	1,00 (0,96-1,04)	1,000	1,03 (0,98-1,09)	0,220	1,09 (1,04-1,13)	<0,001
<i>Género</i>	0,72 (0,34-1,52)	0,380	0,51 (0,22-1,19)	0,120	0,53 (0,29-0,99)	0,046
<i>Grosor tumoral</i>	4,10 (1,90-8,82)	<0,001	4,60 (1,96-10,77)	0,004	1,57 (0,84-2,92)	0,151
<i>Diámetro tumoral</i>	2,26 (1,15-4,43)	0,018	2,37 (1,07-5,26)	0,033	2,36 (1,25-4,45)	0,008
<i>Diferenciación tumoral</i>	0,43 (0,23-0,81)	0,010	0,30 (1,37-0,66)	0,003	0,39 (0,22-0,68)	0,001

4.5. CURVAS DE SUPERVIVENCIA

Como se ilustra en la figura 14 (Figura 14) se observa una gran diferencia en la supervivencia libre de metástasis entre los grupos FAK-positivos y FAK-negativos ($p=0,031$). Sin embargo, los pacientes con tumores FAK-positivos no muestran un riesgo incrementado de mortalidad en comparación a los pacientes con tumores FAK-negativos ($p=0,621$). En el caso de la CTTN no se observan diferencias entre los grupos CTTN-positivos y CTTN-negativos para las tasas de supervivencia para los pacientes con metástasis ganglionares ($p=0,947$) ni para la supervivencia global ($p=0,863$). Estos resultados también se encuentran en ambos grupos, FAK y CTTN, si dicotomizamos la muestra entre los subgrupos FAK-negativo y FAK-positivo tinción débil versus FAK-positivo tinción moderada e intensa y CTTN-negativo y CTTN-positivo tinción débil versus CTTN-positivo tinción moderada e intensa (Figura 15).

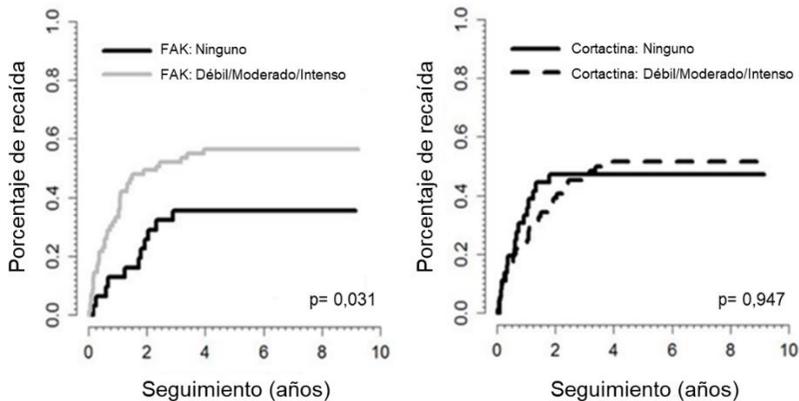


Figura 14. Estimador de Fine Gray de metástasis ganglionares en el subgrupo FAK-positivo vs. FAK-negativo (izquierda), y en el subgrupo CTTN-positivo vs. CTTN-negativo (derecha).

RESULTADOS

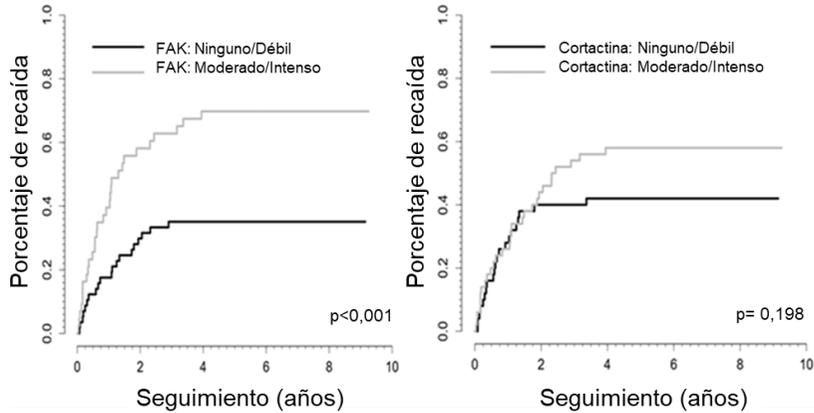


Figura 15. Estimador de Fine Gray de metástasis ganglionares en el subgrupo FAK-positivo tinción moderada e intensa vs. FAK-negativo y FAK-positivo tinción débil (izquierda), y en el subgrupo CTTN-positivo tinción moderada e intensa vs. CTTN-negativo y CTTN-positivo tinción débil (derecha).

La figura 16 (Figura 16) muestra la incidencia por 100 pacientes/año (IC 95%) en datos globales y por niveles de FAK. La incidencia de metástasis es similar entre ninguna expresión y expresión débil (8,9% vs 8,3%) y entre media y fuerte expresión (22,4% vs 29,8%). Se observa una tendencia similar para la muerte específica por CCEC, pero no para la mortalidad por todas las causas.

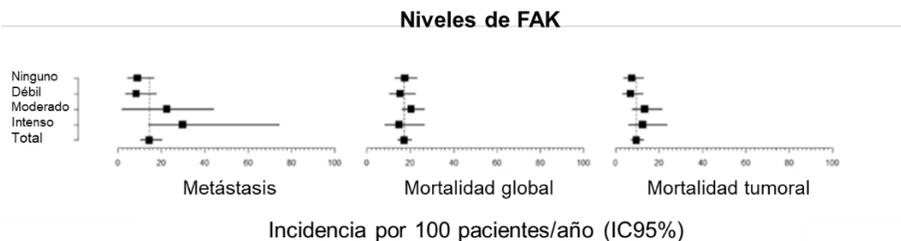


Figura 16. Forest plot para la incidencia por 100 pacientes/año de metástasis, mortalidad global y mortalidad específica tumoral. Efecto global y según niveles de tinción.

5. DISCUSIÓN

En el momento actual y debido fundamentalmente al aumento exponencial de la incidencia del CCE existe un gran interés en la identificación de las diferentes variables clínicas, histológicas y moleculares que ayuden a predecir el riesgo de los tumores potencialmente metastatizantes.

En el presente trabajo se plantea el estudio de la inmunoexpresión de las proteínas FAK y CTTN como posibles marcadores de riesgo para sufrir metástasis ganglionares en una serie de pacientes diagnosticados de CCEC.

Previamente a la discusión de los dos marcadores inmunohistoquímicos objeto de este estudio se van a considerar de forma breve las características clínico-patológicas de nuestra serie de tumores, ampliamente estudiadas en la literatura, con datos muy similares a los 98 pacientes de nuestra línea de investigación recientemente publicada (61, 138).

5.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Respecto a las características clínicas de los pacientes, no se observan diferencias estadísticamente significativas en los parámetros sexo (varón vs. mujer) y edad, de manera similar a los estudios que los recogen (3, 139).

A diferencia de la mayoría de los trabajos previos no encontramos diferencias respecto a la localización (pabellón auricular vs. otras localizaciones), inmunosupresión (pacientes inmunosuprimidos vs. pacientes inmunocompetentes) o presencia de otros CCEs (presencia vs. ausencia), hecho que atribuimos a que se trata de un estudio exclusivo de cabeza y cuello con todos los tumores de mal pronóstico con un grosor superior a 2mm (3, 43, 139, 140, 141, 142).

Es interesante señalar que en la clasificación del Hospital Brigham and Women's no se recogen como factores de mal pronóstico la localización en el pabellón auricular, la inmunosupresión o la presencia de otros CCEs entre los pacientes que han sufrido metástasis ganglionares con respecto a los que no las han sufrido, datos similares a los presentados en un trabajo previo con menor número de pacientes (2 pacientes menos) de nuestro grupo (54, 61).

Respecto al tamaño tumoral, al dicotomizar el tamaño de los tumores entre ≤ 20 mm y > 20 mm se ve que estos últimos tienen un riesgo mayor de presentar metástasis ganglionares (HR=4,01, IC95%=2,26-7,09), similar a lo comunicado en la literatura (3, 37, 43, 92, 143, 144). El consenso sobre el valor del tamaño tumoral es tal que se recoge en la 7ª y la 8ª ediciones del AJCC, en la clasificación de Brigham and Women's y en la guía de la NCCN (52, 54, 55).

No hemos encontrado que la expresión de FAK y CTTN se correlacione con ninguna de las variables clínicas estudiadas.

5.2. CARACTERÍSTICAS ANATOMOPATOLÓGICAS

Respecto a las características anatomopatológicas estudiadas encontramos diferencias estadísticamente significativas en el grosor tumoral, medido este como índice de Breslow (HR=5,73, IC95%=2,91-11,29) o como nivel anatómico de Clark (HR=11,49, IC95%=2,78-47,41) datos similares a los encontrados en otros estudios (3, 43, 139).

En el grado de diferenciación tumoral, estudiada cada categoría de forma aislada o bien agrupadas las diferentes categorías para el desarrollo de metástasis ganglionares, se encuentran datos similares a los comunicados en la literatura (HR=2,44, IC95%=1,52-3,29, en los carcinomas moderadamente

diferenciados; HR=5,68, IC95%=1,78-18,96, en los pobremente diferenciados) (3, 43,145).

En este trabajo se encuentra que los CCEs que muestran desmoplasia presentan un HR=3,09 (IC95%=1,6-5,98) para el desarrollo de metástasis ganglionares, valor similar a los encontrados por Brantsch y Breuninger (3, 146).

Los datos de nuestro trabajo respecto al aumento de riesgo de metástasis ganglionares en los pacientes que presentan invasión perineural (HR=3,74, IC95%=1,94-7,22), desmoplasia (HR=3,09, IC95%=1,6-5,98) e invasión linfovascular (HR=5,95, IC95%=1,73-20,4), son prácticamente similares a los estudios en los que se recogen estas variables (43, 140, 147, 148).

Los resultados de gemación tumoral para el riesgo de metástasis ganglionares (HR=9,29, IC95%=4,57-18,85) son similares a los previamente publicados por nuestro grupo (61, 138).

Respecto a la estadificación tumoral, en nuestro trabajo se realiza con los tres sistemas más difundidos en la actualidad y en todos ellos el HR es mayor en los estadíos superiores. De manera similar al estudio realizado por Cañueto et al. se encuentra un peor pronóstico en los T2 clasificados según la 7ª edición del AJCC (HR=28,2, IC95%=1,28-62,145), en los T3 clasificados según la 8ª edición del AJCC (HR=11,4, IC95%=1,91-68,92) y en los T3 según la clasificación del Hospital Brigham and Women's (HR=4,28, IC95%=2,42-7,58) (56).

No se encuentra que la expresión de FAK se correlacione con ninguna de las variables clínicopatológicas estudiadas, sin embargo presenta una correlación con el grosor tumoral dicotomizado en mayor y menor de 6 mm sin alcanzar la significación estadística ($p=0,053$), lo cual puede ser debido a que el estudio presente una baja potencia estadística, un error de tipo β (la diferencia existe, pero no hay suficiente número de pacientes para encontrarla).

Se encuentra correlación entre la ausencia de tinción con CTTN y la invasión perineural de forma estadísticamente significativa ($p=0,019$), dato que no se encuentra en ningún otro cáncer en la literatura. Como se señala en la introducción la presencia de CTTN se asocia a peor pronóstico y a variables de peor pronóstico, en concreto en sólo un trabajo se relaciona la expresión positiva de CTTN e invasión perineural en cáncer de laringe (149).

5.3. EXPRESIÓN DE QUINASA DE ADHESIÓN FOCAL (FAK) Y CORTACTINA (CTTN)

La realización de estudios de expresión proteica mediante inmunohistoquímica es un método con bajo coste-efectividad, que puede ser fácil y rápidamente integrado en la práctica anatomopatológica diaria cuando se encuentran resultados positivos (16).

De forma ideal se plantea que la búsqueda y utilización de patrones clínicos, anatomopatológicos e inmunohistoquímicos en los pacientes oncológicos permita una mejor planificación de los tratamientos y los planes de seguimiento, diferenciando entre pacientes con bajo y alto riesgo de metástasis. El objetivo final es un tratamiento personalizado que evite cirugías y tratamientos más cruentos en pacientes de bajo riesgo, reservando los tratamientos más agresivos para pacientes de alto riesgo. Aplicando una metodología similar a la empleada con los arrays de expresión proteica es lógico esperar, al igual que en otros tipos de cáncer, la detección de patrones inmunohistoquímicos que se asocien a fenotipos tumorales metastásicos (128, 150, 151).

En primer lugar, hay que señalar que en nuestro trabajo se estudia por primera vez el significado clínico de la expresión de FAK y CTTN como factores predictores de metástasis ganglionares y de mortalidad en pacientes con CCEs.

Se ha analizado de manera retrospectiva la expresión de las proteínas FAK y CTTN utilizando una serie homogénea de pacientes con CCECs.

Se selecciona el estudio de la expresión de estas dos proteínas debido al papel que desempeñan en la motilidad celular y en la capacidad de invasión, lo que se traduce en un curso clínico más agresivo y con metástasis ganglionares en otros tipos de cáncer (117, 152).

La valoración inmunohistoquímica se realiza utilizando el método más simple, fácil y reproducible, con un grado de concordancia total entre los dos observadores al agrupar los tumores en los que no expresan tinción y los que sí la expresan; y con un grado de concordancia casi total al valorar los distintos grados de tinción positiva (95%).

5.3.1. EXPRESIÓN DE QUINASA DE ADHESIÓN FOCAL (FAK)

Alt-Holland et al. describen en un modelo de tejido humano tridimensional que simula los estadios iniciales del CCE que la supresión de E-cadherina incrementa los niveles de mRNA y los niveles de expresión proteica de FAK, favoreciendo el crecimiento tumoral. El efecto promotor tumoral desencadenado por la supresión de E-cadherina, un hecho conocido en el desarrollo de CCEs, es exacerbado además por la degradación de E-cadherina inducida a su vez por FAK (153).

La expresión de FAK en piel normal o lesional solo ha sido estudiada por Choi et al. Estos autores describen la ausencia de expresión de FAK en la piel sana y la presencia de la inmunotinción en lesiones premalignas intraepiteliales y en CCECs (119). Sugieren que FAK juega un papel activo en la proliferación celular, pero no estudian su rol como factor pronóstico en CCEs. En nuestro estudio hallamos que el 69% de los CCECs expresan FAK, el 60% de los CCENM y el 78% de los CCEM. De manera similar a lo descrito por Choi et

al. no encontramos positividad para FAK en las representaciones de piel normal.

En este estudio se encuentra por primera vez que la expresión de FAK es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de metástasis ganglionares en pacientes con CCECs. Se obtienen resultados similares al realizar análisis desde otros puntos de vista, considerando un efecto lineal de los marcadores, datos no agrupados y otros puntos de corte para la expresión proteica (como una tinción fuerte-moderada contra otros).

Como se ha señalado en la introducción, la sobreexpresión y/o hiperfosforilación de FAK ha sido frecuentemente detectada en diferentes tipos de cáncer, incluyendo de cabeza y cuello, colon, mama, melanoma, endometrio, ovario, tiroides y hepatocarcinoma (116, 154). Sin embargo, en la mayoría de estos trabajos no se estudia la correlación entre la expresión de FAK y otras variables como el estadio de la enfermedad, el estado general del paciente o su pronóstico.

Respecto a las metástasis ganglionares nuestros resultados muestran un mayor riesgo de producirse en pacientes con expresión de FAK de forma independiente (HR= 2,21, IC95%= 1,01-4,91). Estos hallazgos son similares a los comunicados en otros cánceres como el carcinoma de mama, donde Pan et al. estiman un HR= 4,688 (IC95%= 1,04-21,128) (p=0,0443) (154). En el cáncer de mama Cance et al. observan positividad moderada o intensa en la tinción de FAK en 14 de 18 muestras de carcinomas invasivos (155). Rodrigo et al. describen que niveles bajos de E-cadherina se correlacionan con mayor riesgo de metástasis ganglionares en carcinomas escamosos de laringe (p=0,006), y si los niveles bajos de E-cadherina se combinan con positividad para la expresión de FAK se incrementa la correlación con las metástasis ganglionares (p=0,001) (101, 105, 156). FAK ha sido relacionado con la progresión de carcinomas escamosos de cabeza y cuello a través del incremento de la producción de MMP-2 y al promover la motilidad celular (117). En el

carcinoma de células escamosas esofágico Miyazaki et al. estiman una correlación entre la expresión positiva de FAK y y las metástasis ganglionares ($p=0,0097$) (157). Theocharis et al. comunican que la expresión proteica de FAK no está incrementada en el adenocarcinoma de colon, sin embargo, Cance et al. describen una tinción positiva moderada o intensa para FAK en 13 de 15 muestras de adenocarcinoma de colon (155, 158). En el cáncer de páncreas se ha encontrado una correlación positiva entre la expresión de FAK y el tamaño tumoral ($p=0,004$) pero no con las metástasis ganglionares (159). Panera et al. describen que la inhibición de FAK en el hepatocarcinoma disminuye el crecimiento del tumor y la aparición de metástasis (115).

En relación con la supervivencia global, los pacientes con expresión positiva para FAK muestran tasas de supervivencia más bajas en comparación con aquellos con expresión negativa para FAK en el modelo multivariante, sin que estas diferencias alcancen significación estadística ($HR=1,05$, $IC95\%=0,62-1,77$, valor- p 0,848). Respecto a la mortalidad tumoral, los pacientes con expresión positiva para FAK también muestran tasas más bajas de supervivencia en el modelo multivariante con respecto a aquellos con expresión negativa para FAK, también sin significación estadística ($HR=1,40$, $IC95\%=0,53-3,70$).

En la literatura se señala de forma uniforme que el CCEC con metástasis ganglionares es una enfermedad agresiva asociada con recurrencias y disminución de la supervivencia global (139, 160, 161).

La ausencia de significación estadística puede ser debida a la alta mediana de edad de los pacientes (mueren los pacientes sin metástasis por cualquier otra causa) o bien otra posible explicación puede ser que el número de pacientes en la serie sea bajo para detectar diferencias significativas, es decir que se trate de un error tipo β .

En cualquiera de los casos, los resultados que se muestran en el “forest plot” indican que la expresión de FAK es muy específica de la enfermedad (Figura 16).

Recientemente se ha descrito que la inhibición de FAK incrementa la respuesta inmune en el adenocarcinoma pancreático (162). Se están realizando varios ensayos clínicos para comprobar la utilidad de inhibidores de FAK como defactinib y un anti-PD-1 como pembrolizumab en el cáncer de páncreas avanzado (clinicalTrials.gov NCT02546531) y de defactinib y pembrolizumab en carcinoma pancreático, carcinoma de pulmón no microcítico y mesotelioma (clinicalTrials.gov NCT02758587) (163). Un estudio reciente ha demostrado utilizando un modelo murino con CCEs que FAK nuclear regula la transcripción de citocinas que favorecen el reclutamiento de células T reguladoras que a su vez crean un microambiente supresor tumoral inhibiendo linfocitos citotóxicos CD8+ (108). Estos datos en combinación sugieren que además de la aplicación de FAK como biomarcador para la estratificación del riesgo de metástasis, también es una potencial diana terapéutica para el tratamiento, sobre todo en CCEs inoperables o metastásicos (164).

5.3.2. EXPRESIÓN DE CORTACTINA (CTTN)

El análisis inmunohistoquímico de la expresión de CTTN no ha sido descrito en CCEs. El único estudio que incluye la CTTN en cáncer de piel es el estudio en dos casos de queratoacantomas subungueales que muestran amplificación del número de copias de CTTN frente a tres CCEs subungueales que no la muestran (165). En nuestro estudio el 64% de los CCEs expresan CTTN, el 62% de los CCENM y el 66% de los CCEM.

La sobreexpresión de CTTN se observa en múltiples cánceres, incluyendo carcinoma escamoso de cabeza y cuello, escamoso pulmonar, escamoso oral, gliosarcoma, cáncer de mama, colorrectal y melanoma (124, 166). La CTTN se

asocia con una mayor dispersión del tumor y fenotipos agresivos y se sugiere como un biomarcador para predecir metástasis (167). Sin embargo y en marcado contraste con estos datos, en nuestra serie no se encuentran correlaciones entre la expresión de CTTN evaluada con diferentes métodos (correlaciones lineales, agrupadas en no tinción versus tinción, tinción débil o ausente versus tinción moderada o intensa) y las metástasis ganglionares ni tampoco entre la expresión de CTTN y la supervivencia específica de enfermedad y supervivencia global. Nuestros datos están en concordancia con los publicados por Sato et al. en CCECs de cabeza y cuello y por De Vicente et al. en carcinomas escamosos orales y Rodrigo et al. en carcinomas escamosos de faringe (151, 167, 168).

En el momento actual es de gran interés conocer la expresión de moléculas diana en el CCE como predictores de respuesta a los nuevos fármacos ya aprobados y a otros, actualmente en fase de ensayo clínico (169). Se han propuesto los métodos inmunohistoquímicos como los más apropiados para la selección de los pacientes susceptibles de ser tratados con estos fármacos (170, 171).

5.4. LIMITACIONES

Este estudio presenta una serie de limitaciones:

1. Se trata de un estudio retrospectivo, con los posibles sesgos que acompañan este tipo de estudios.

2. Se limita a carcinomas escamosos de cabeza y cuello.

3. La serie se basa en pacientes tratados en un hospital de tercer nivel, por lo que el porcentaje de tumores de mal pronóstico puede ser mayor que en la realidad.

4. El estudio se realiza en un único hospital.

5. El análisis inmunohistoquímico se lleva a cabo utilizando TMAs, si bien hay que señalar que el patrón de expresión de FAK y CTTN es homogéneo y concordante en los tres cores representativos del tejido seleccionados de cada tumor.

6. CONCLUSIONES

1. En pacientes con un carcinoma escamoso cutáneo de cabeza y cuello (CCEC) la inmunexpresión de quinasa de adhesión focal (FAK) ocurre más frecuentemente en los carcinomas metastásicos que en los no metastásicos, diferencia que no se encuentra en la expresión de cortactina (CTTN).
2. La expresión de quinasa de adhesión focal (FAK) y cortactina (CTTN) no se correlaciona con ninguna de las variables clínico-patológicas estudiadas.
3. La expresión de quinasa de adhesión focal (FAK) es un factor pronóstico independiente para el desarrollo de metástasis ganglionares en pacientes con carcinomas escamosos cutáneos de cabeza y cuello.
4. La expresión de cortactina (CTTN) no es un factor pronóstico para el desarrollo de metástasis ganglionares en pacientes con carcinomas escamosos cutáneos de cabeza y cuello.
5. La expresión de quinasa de adhesión focal (FAK) y cortactina (CTTN) no se asocia con un aumento de la mortalidad global o de la mortalidad específica atribuible a la enfermedad.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Werner RN, Sammain A, Erdmann R, Hartmann V, Stockfleth E, Nast A. The natural history of actinic keratosis: a systematic review. *Br J Dermatol*. 2013;169:502–18.
2. Karia PS, Han J, Schmults CD. Cutaneous squamous cell carcinoma: estimated incidence of disease, nodal metastasis, and death from disease in the United States, 2012. *J Am Acad Dermatol*. 2013;68:957-66.
3. Brantsch KD, Schonfisch B, Trilling B, Wehner-Caroli J, Rocken M, Breuinger H. Analysis of risk factors determining prognosis of cutaneous squamous cell carcinoma: a prospective study. *Lancet Oncol*. 2008;9:713-20.
4. Cheng J, Yan S. Prognostic variables in high-risk cutaneous squamous cell carcinoma: a review. *J Cutan Pathol*. 2016;43:994-1004.
5. Rogers HW, Weinstock MA, Harris AR, Hinckley MR, Feldman SR, Fleischer AB et al. Incidence estimate of nonmelanoma skin cancer in the United States, 2006. *Arch Dermatol*. 2010;146:283–7.
6. Glass A, Hoover RN. The emerging epidemic of melanoma and squamous cell skin cancer. *JAMA*. 1989;262:2097–100.
7. Lomas A, Leonardi-Bee J, Bath-Hextall F. A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol*. 2012;166:1069–80.
8. Díaz-Corpas T, Morales-Suárez-Varela M, Rausell Fontestad N, Fuertes Prósper A, Marquina-Vila A, Jordá-Cuevas E. Squamous Cell Carcinoma: Clinical and Pathological Features and Associated Risk Factors in an Observational Study of 118 Patients. *Actas Dermosifiliogr*. 2015;106:806-15.
9. Tejera-Vaquerizo A, Descalzo-Gallego MA, Otero-Rivas MM, Posada-García C, Rodríguez-Pazos L, Pastushenko I et al. Skin Cancer Incidence and

Mortality in Spain: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Actas Dermosifiliogr.* 2016;107:318-28.

10. Que SKT, Zwald FO, Schmults CD. Cutaneous squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol.* 2018;78:237-47.

11. Gurney B, Newlands C. Management of regional metastatic disease in head and neck cutaneous malignancy. *Cutaneous squamous cell carcinoma. Br J Oral Maxillofac Surg.* 2014;52:294-300.

12. Schmitt J, Seidler A, Diepgen TL, Bauer A. Occupational ultraviolet light exposure increases the risk for the development of cutaneous squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Br J Dermatol.* 2011;164:291-307.

13. Karagas MR, Greenberg ER, Spencer, SK, Stukel TA, Mott LA. Increase in incidence rates of basal cell and squamous cell skin cancer in New Hampshire, USA. *New Hampshire Skin Cancer Study Group. Int J Cancer.* 1999;81:555-59.

14. Gray DT, Suman VJ, Su WP, Clay RP, Harmsen WS, Roenigk RK. Trends in the population-based incidence of squamous cell carcinoma of the skin first diagnosed between 1984 and 1992. *Arch Dermatol.* 1997;133:735-40.

15. Christenson LJ, Borrowman TA, Vachon CM, Tollefson MM, Otley CC, Weaver AL et al. Incidence of basal cell and squamous cell carcinomas in a population younger than 40 years. *JAMA.* 2005;294:681-90.

16. Ashford BG, Clark J, Gupta R, Iyer NG, Yu B, Ranson M. Reviewing the genetic alterations in high-risk cutaneous squamous cell carcinoma: A search for prognostic markers and therapeutic targets. *Head Neck.* 2017; 39:1462-69.

17. Boukamp P. Non-melanoma skin cancer: what drives tumor development and progression? *Carcinogenesis.* 2005;26:1657-67.

18. Soufir N, Molès JP, Vilmer C, Moch C, Verola O, Rivet J et al. P16 UV mutations in human skin epithelial tumors. *Oncogene*. 1999;18:5477–81.
19. Agrawal N, Frederick MJ, Pickering CR, Bettegowda C, Chang K, Li RJ et al. Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science*. 2011;333:1154–7.
20. Nelson MA, Einspahr JG, Alberts DS, Balfour CA, Wymer JA, Welch KL et al. Analysis of the p53 gene in human precancerous actinic keratosis lesions and squamous cell cancers. *Cancer Lett*. 1994;85:23-29.
21. Campbell C, Quinn AG, Ro YS, Angus B, Rees JL. p53 mutations are common and early events that precede tumor invasion in squamous cell neoplasia of the skin. *J Invest Dermatol*. 1993;100:746-8.
22. Spencer JM, Kahn SM, Jiang W, DeLeo VA, Weinstein IB. Activated ras genes occur in human actinic keratoses, premalignant precursors to squamous cell carcinomas. *Arch Dermatol*. 1995;131:796-800.
23. Chahal HS, Lin Y, Ransohoff KJ, Hinds DA, Wu W, Dai HJ et al. Genome-wide association study identifies novel susceptibility loci for cutaneous squamous cell carcinoma. *Nat Commun*. 2016;7:12048.
24. Li YY, Hanna GJ, Laga AC, Haddad RI, Lorch JH, Hammerman PS. Genomic analysis of metastatic cutaneous squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2015;21:1447–56.
25. Xiang F, Lucas R, Hales S, Neale R. Incidence of nonmelanoma skin cancer in relation to ambient UV radiation in white populations, 1978–2012: empirical relationships. *JAMA Dermatol* 2014;150:1063–71.
26. Aldabagh B, Angeles JG, Cardones AR, Arron ST. Cutaneous squamous cell carcinoma and human papillomavirus: is there an association? *Dermatol Surg*. 2013;39:1-23.

27. Torchia D, Massi D, Caproni M, Fabbri P. Multiple cutaneous precanceroses and carcinomas from combined iatrogenic/professional exposure to arsenic. *Int J Dermatol.* 2008;47:592-3.
28. Jaju PD, Ransohoff KJ, Tang JY, Sarin KY. Familial skin cancer syndromes: increased risk of nonmelanotic skin cancers and extracutaneous tumors. *J Am Acad Dermatol.* 2016;74:437-51.
29. Green AC, Olsen CM. Cutaneous squamous cell carcinoma: an epidemiological review. *Br J Dermatol.* 2017;177:377-81.
30. Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ, Simon JA, Sharma HW, Kimmelman J et al. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature.* 1994;372:773-6.
31. Brash DE. UV signature mutations. *Photochem Photobiol.* 2015;91:15-26.
32. Melnikova VO, Ananthaswamy HN. Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer. *Mutat Res.* 2005;571:91-106..
33. Jhappan C, Noonan FP, Merlino G. Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma. *Oncogene.* 2003;22:3099-112.
34. Sinha RP, Häder DP. UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem Photobiol Sci.* 2002;1:225-36.
35. Welsh MM, Karagas MR, Applebaum KM, Spencer SK, Perry AE, Nelson HH. A role for ultraviolet radiation immunosuppression in non-melanoma skin cancer as evidenced by gene-environment interactions. *Carcinogenesis.* 2008;29:1950-4.
36. Murphy GM. Ultraviolet radiation and immunosuppression. *Br J Dermatol.* 2009;161:90-5.
37. Rowe DE, Carroll RJ, Day CL. Prognostic factors for local recurrence, metastasis and survival rates in squamous cell carcinoma of the skin, ear and lip. *J Am Acad Dermatol.* 1992;26:976-90.

38. Mora RG, Perniciaro C. Cancer of the skin in blacks. I. A review of 163 black patients with cutaneous squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol.* 1981;5:535-43.
39. Jensen P, Hansen S, Møller B, Leivestad T, Pfeffer P, Geiran O et al. Skin cancer in kidney and heart transplant recipients and different long-term immunosuppressive therapy regimens. *J Am Acad Dermatol.* 1999;40:177-86.
40. Lindelöf B, Sigurgeirsson B, Gäbel H, Stern RS. Incidence of skin cancer in 5356 patients following organ transplantation. *Br J Dermatol.* 2000;143:513-9.
41. Zwald FO, Brown M. Skin cancer in solid organ transplant recipients: advances in therapy and management: part I. Epidemiology of skin cancer in solid organ transplant recipients. *J Am Acad Dermatol.* 2011;65:253-61.
42. Marqués Medina E, Jiménez Romero C, Gómez de la Cámara A, Rota Bernal A, Manrique Municipio A, Moreno González E. Malignancy after liver transplantation: cumulative risk for development. *Transplant Proc.* 2009;41:2447-9.
43. Thompson AK, Kelley BF, Prokop LJ, Murad MH, Baum CL. Risk Factors for Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Recurrence, Metastasis, and Disease-Specific Death: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Dermatol.* 2016;152:419-28.
44. zur Hausen. Papillomaviruses in the causation of human cancers – a brief historical account. *Virology.* 2009;384:260-5.
45. Cuperus E, Leguit R, Albregts M, Toonstra J. Post radiation skin tumors: basal cell carcinomas, squamous cell carcinomas and angiosarcomas. A review of this late effect of radiotherapy. *Eur J Dermatol.* 2013;23:749-57.

46. Box NF, Duffy DL, Irving RE, Russell A, Chen W, Griffyths LR et al. Melanocortin-1 receptor genotype is a risk factor for basal and squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol.* 2001;116:224–9.
47. Marks R, Rennie G, Selwood TS. Malignant transformation of solar keratoses to squamous cell carcinoma. *Lancet* 1988;1:795–7.
48. Zalaudek I, Argenziano G, Leinweber B, Citarella L, Hofmann-Wellenhof R, Malvehy J et al. Dermoscopy of Bowen's disease. *Br J Dermatol.* 2004; 150:1112-6.
49. Zalaudek I, Giacomel J, Schmid K, Bondino S, Rosendahl C, Cavicchini S et al. Dermoscopy of facial actinic keratosis, intraepidermal carcinoma, and invasive squamous cell carcinoma: a progression model. *J Am Acad Dermatol.* 2012;66:589-97.
50. García-García B, Munguía-Calzada P, Aubán-Pariente J, Junceda-Antuña S, Zaballos P, Argenziano G et al. Dermoscopy of chondrodermatitis nodularis helioides. *Arch Dermatol Res.* 2018. doi: 10.1007/s00403-018-1844-6. [Epub ahead of print].
51. Broders AC. Squamous cell epithelioma of the skin. *Ann Surg.* 1921;73:141-60.
52. Amin MB, Edge S, Greene, F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK et al. *AJCC Cancer Staging Manual.* 8 ed. New York, Springer; 2017.
53. Cañueto J, Román-Curto C. Novel Additions to the AJCC's New Staging Systems for Skin Cancer. *Actas Dermosifiliogr.* 2017;108:818-26.
54. Karia PS, Jambusaria-Pahlajani A, Harrington DP, Murphy GF, Qureshi AA, Schmultz CD. Evaluation of American Joint Committee on Cancer, International Union Against Cancer, and Brigham and Women's Hospital tumor staging for cutaneous squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2014;32:327-34.

55. National Comprehensive Cancer Network. Squamous Cell Skin Cancer (Version 2.2019).
https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/squamous.pdf.
Accessed January 7, 2019.
56. Cañueto J, Burguillo J, Moyano-Bueno D, Viñolas-Cuadros A, Conde-Ferreirós A, Corchete-Sánchez LA et al. Comparing the eighth and the seventh editions of the American Joint Committee on Cancer staging system and the Brigham and Women's Hospital alternative staging system for cutaneous squamous cell carcinoma: Implications for clinical practice. *J Am Acad Dermatol*. 2019;80:106-13.
57. Santos-Juanes J, Rodrigo JP, Gonzalez-Guerrero M, Martínez-Cambor P. Reply to: "Prognostic significance of tumor budding in cutaneous squamous cell carcinoma". *J Am Acad Dermatol*. 2018 ;79(1):e7.
58. Kanitakis J, Karayannopoulou G. Prognostic significance of tumor budding in cutaneous squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol*. 2018;79(1):e5.
59. Karayannopoulou G, Euvrard S, Kanitakis J. Tumour Budding Correlates with Aggressiveness of Cutaneous Squamous-cell Carcinoma. *Anticancer Res*. 2016;36:4781-5.
60. Fujimoto M, Yamamoto Y, Matsuzaki I, Warigaya K, Iwahashi Y, Kojima F et al. Tumor budding is an independent risk factor for lymph node metastasis in cutaneous squamous cell carcinoma: a single center retrospective study. *J Cutan Pathol*. 2016;43:766-71.
61. Gonzalez-Guerrero M, Martínez-Cambor P, Vivanco B, Fernández-Vega I, Munguía-Calzada P, Gonzalez-Gutierrez MP et al. The adverse prognostic effect of tumor budding on the evolution of cutaneous head and neck squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol*. 2017;76:1139-45.

62. García-Pedrero JM, Martínez-Cambor P, Díaz-Coto S, Munguia-Calzada P, Vallina-Alvarez A, Vazquez-Lopez F et al. Tumor programmed cell death ligand 1 expression correlates with nodal metastasis in patients with cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Am Acad Dermatol.* 2017;77:527-33.
63. Hernández-Ruiz E, Hernández-Muñoz I, Masferrer E, Ferrándiz-Pulido C, Andrades E, Gimeno J et al. A Myxoid Fibrotic Reaction Pattern is Associated with Metastatic Risk in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Acta Derm Venereol.* 2019;99:89-94.
64. Clark JR, Rumcheva P, Veness MJ. Analysis and comparison of the 7th edition American Joint Committee on Cancer (AJCC) nodal staging system for metastatic cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. *Ann Surg Oncol.* 2012;19:4252-8.
65. Nahhas AF, Scarbrough CA, Trotter S. A Review of the Global Guidelines on Surgical Margins for Nonmelanoma Skin Cancers. *J Clin Aesthet Dermatol.* 2017;10:37-46.
66. Stratigos A, Garbe C, Lebbe C, Malvey J, del Marmol V, Pehamberger H et al. Diagnosis and treatment of invasive squamous cell carcinoma of the skin: European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur J Cancer.* 2015;51:1989-2007.
67. O'Connell KA, Okhovat JP, Zeitouni NC. Photodynamic Therapy for Bowen's Disease (Squamous Cell Carcinoma in situ) Current Review and Update. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018;24:109-114.
68. Overmark M, Koskenmies S, Pitkanen S. A Retrospective Study of Treatment of Squamous Cell Carcinoma In situ. *Acta Derm Venereol.* 2016;96:64-7.

69. Salido-Vallejo R, Cuevas-Asencio I, Garnacho-Sucedo G, González-Menchen A, Alcántara-Reifs C, De la Corte-Sánchez S et al. Neoadjuvant intralesional methotrexate in cutaneous squamous cell carcinoma: a comparative cohort study. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2016;30: 1120-4.
70. Odom RB, Goette DK. Treatment of keratoacanthomas with intralesional fluorouracil. *Arch Dermatol*. 1978;114:1779-83.
71. Annest NM, VanBeek MJ, Arpey CJ, Whitaker DC. Intralesional methotrexate treatment for keratoacanthoma tumors: a retrospective study and review of the literature. *J Am Acad Dermatol* 2007;56:989–93.
72. Fu T, Aasi SZ, Hollmig ST. Management of High-Risk Squamous Cell Carcinoma of the Skin. *Curr Treat Options Oncol*. 2016;17:34.
73. Humphreys TR, Shah K, Wysong A, Lexa F, MacFarlane D. The role of imaging in the management of patients with nonmelanoma skin cancer: When is imaging necessary? *J Am Acad Dermatol*. 2017;76:591-607.
74. Que SKT, Zwald FO, Schmults CD. Cutaneous squamous cell carcinoma: Management of advanced and high-stage tumors. *J Am Acad Dermatol*. 2018;78:249-61.
75. Griffith JF, Chan AC, Ahuja AT, Leung SF, Chow LT, Chung SC et al. Neck ultrasound in staging squamous oesophageal carcinoma -a high yield technique. *Clin Radiol*. 2000;55:696-701.
76. Fox M, Brown M, Golda N, Goldberg D, Miller C, Pugliano-Mauro M et al. Nodal Staging of High Risk Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *J Am Acad Dermatol*. 2018. pii: S0190-9622(18)32573-8. doi: 10.1016/j.jaad.2018.09.006. [Epub ahead of print].
77. Xiao Y, Yuan S, Liu F, Liu B, Zhu J, He W et al. Comparison between wait-and-see policy and elective neck dissection in clinically N0 cutaneous

squamous cell carcinoma of head and neck. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97:e10782.

78. Navarrete-Dechent C, Veness MJ, Droppelmann N, Uribe P. High-risk cutaneous squamous cell carcinoma and the emerging role of sentinel lymph node biopsy: A literature review. *J Am Acad Dermatol*. 2015;73:127-37.

79. Moody JA, Ali RF, Carbone AC, Singh S, Hardwicke JT. Complications of sentinel lymph node biopsy for melanoma - A systematic review of the literature. *Eur J Surg Oncol*. 2017;43:270-7.

80. Veness MJ. The important role of radiotherapy in patients with non-melanoma skin cancer and other cutaneous entities. *J Med Imaging Radiat Oncol*. 2008;52:278–86.

81. Cañueto J, Jaka A, Toll A. The Value of Adjuvant Radiotherapy in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: A Review. *Actas Dermosifiliogr*. 2018;109:176-84.

82. Yan BY, Kim SK, Ma J, Barker CA. Local recurrence and quality of life after adjuvant radiation therapy in high-risk squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2018. doi: 10.1111/bjd.17244. [Epub ahead of print].

83. Sciubba JJ, Helman JI. Current management strategies for verrucous hyperkeratosis and verrucous carcinoma. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2013;25:77–82.

84. Neville JA, Welch E, Leffell DJ. Management of nonmelanoma skin cancer in 2007. *Nat Clin Pract Oncol*. 2007;4:462–9.

85. Sadek H, Azli N, Wendling JL, Cvitkovic E, Rahal M, Mamelle G et al. Treatment of advanced squamous cell carcinoma of the skin with cisplatin, 5-fluorouracil, and bleomycin. *Cancer*. 1990;66:1692-6.

86. Miller SJ, Alam M, Andersen J, Berg D, Bichakjian CK, Bowen G et al. Basal cell and squamous cell skin cancers. *J Natl Compr Cancer Netw.* 2007;5:506-29.
87. Cartei G, Cartei F, Interlandi G, Meneghini G, Jop A, Zingone G et al. Oral 5-fluorouracil in squamous cell carcinoma of the skin in the aged. *Am J Clin Oncol.* 2000;23:181-4.
88. Migden MR, Rischin D, Schmults CD, Guminski A, Hauschild A, Lewis KD et al. PD-1 Blockade with Cemiplimab in Advanced Cutaneous Squamous-Cell Carcinoma. *N Engl J Med.* 2018;379:341-51.
89. William WN Jr, Feng L, Ferrarotto R, Ginsberg L, Kies M, Lippman S et al. Gefitinib for patients with incurable cutaneous squamous cell carcinoma: A single-arm phase II clinical trial. *J Am Acad Dermatol.* 2017; 77:1110-3.
90. Alter M, Satzger I, Mattern A, Kapp A, Gutzmer R. Treatment of advanced cutaneous squamous cell carcinomas with epidermal growth factor receptor inhibitors. *Dermatology.* 2013;227:289-94.
91. Foote MC, McGrath M, Guminski A, Hughes BG, Meakin J, Thomson D et al. Phase II study of single-agent panitumumab in patients with incurable cutaneous squamous cell carcinoma. *Ann Oncol.* 2014;25:2047-52.
92. Schmults CD, Karia PS, Carter JB, Han J, Qureshi AA. Factors predictive of recurrence and death from cutaneous squamous cell carcinoma: a 10-year, single-institution cohort study. *JAMA Dermatol.* 2013;149:541-7.
93. Eigentler TK, Leiter U, Häfner HM, Garbe, Röcken M, Breuninger H. Survival of Patients with Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: Results of a Prospective Cohort Study. *J Invest Dermatol.* 2017;137:2309-15.
94. Clayman GL, Lee JJ, Holsinger FC, Zhou X, Duvic M, El-Naggar AK et al. Mortality risk from squamous cell skin cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23:759-65.

95. Varra V, Woody NM, Reddy C, Joshi NP, Geijer J, Adelstein DJ et al. Suboptimal Outcomes in Cutaneous Squamous Cell Cancer of the Head and Neck with Nodal Metastases. *Anticancer Res.* 2018;38:5825-30.
96. Burridge K. Focal adhesions: a personal perspective on a half century of progress. *FEBS J.* 2017;284:3355-61.
97. Kanner SB, Reynolds AB, Vines RR, Parsons JT. Monoclonal antibodies to individual tyrosine-phosphorylated protein substrates of oncogene-encoded tyrosine kinases. *Proc. Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:3328–32.
98. Lipfert L, Haimovich B, Schaller MD, Cobb BS, Parsons JT, Brugge JS. Integrin-dependent phosphorylation and activation of the protein tyrosine kinase pp125FAK in platelets. *J. Cell Biol.* 1992;119:905–12.
99. Weiner TM, Liu ET, Craven RJ, Cance W. Expression of focal adhesion kinase gene and invasive cancer. *Lancet.* 1993;342:1024–5.
100. Mousson A, Sick E, Carl P, Dujardin D, De Mey J, Rondé P. Targeting Focal Adhesion Kinase Using Inhibitors of Protein-Protein Interactions. *Cancers (Basel).* 2018;10. pii: E278.
101. Gabarra-Niecko V, Schaller MD, Dunty JM. FAK regulates biological processes important for the pathogenesis of cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2003;22:359–74.
102. Frame MC, Patel H, Serrels B, Lietha D, Eck MJ. The FERM domain organizing the structure and function of FAK. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11:802-14.
103. Kleinschmidt EG, Schlaepfer DD. Focal adhesion kinase signaling in unexpected places. *Curr Opin Cell Biol.* 2017;45:24-30.
104. Parsons TJ, Martin KH, Slack JK, Taylor JM, Weed SA. Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene.* 2000;19:5606-13.

105. Rodrigo JP, Dominguez F, Suarez V, Canel M, Secades P, Chiara MD. Focal adhesión kinase and E-cadherin as markers for nodal metastasis in laryngeal cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2007;133:145-50.
106. McLean GW, Komiyama NH, Serrels B, Asano H, Reynolds L, Conti F et al. Specific deletion of focal adhesion kinase suppresses tumor formation and blocks malignant progression. *Genes Dev.* 2004;18:2998–3003.
107. Serrels A, McLeod K, Canel M, Kinnaird A, Graham K, Frame MC et al. The role of focal adhesion kinase catalytic activity on the proliferation and migration of squamous cell carcinoma cells. *Int J Cancer.* 2012;131:287-97.
108. Serrels A, Lund T, Serrels B, Byron A, McPherson RC, von Kriegsheim A et al. Nuclear FAK controls chemokine transcription, Tregs, and evasion of anti-tumor immunity. *Cell.* 2015;163:160-73.
109. Siesser PM, Hanks SK. The signaling and biological implications of FAK overexpression in cancer. *Clin Cancer Res.* 2006;12:3233–7.
110. van Nimwegen MJ, van de Water B. Focal adhesion kinase: a potential target in cancer therapy. *Biochem Pharmacol.* 2007;73:597–609.
111. Ashton GH, Morton JP, Myant K, Pheese TJ, Ridgway RA, Marsh V et al. Focal adhesion kinase is required for intestinal regeneration and tumorigenesis downstream of Wnt/c-Myc signaling. *Dev Cell.* 2010;19:259-69.
112. Lahlou H, Sanguin-Gendreau V, Zuo D, Cardiff RD, McLean GW, Frame MC et al. Mammary epithelial-specific disruption of the focal adhesion kinase blocks mammary tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:20302-7.
113. Luo M, Fan H, Nagy T, Wei H, Wang C, Liu S et al. Mammary epithelial-specific ablation of the focal adhesion kinase suppresses mammary tumorigenesis by affecting mammary cancer stem/progenitor cells. *Cancer Res.* 2009;69:466-74.

114. Chatzizacharias NA, Giaginis C, Gatzidou E, Tsourouflis G, Sfiniadakis I, Alexandrou P et al. Expression and clinical significance of FAK and Src proteins in human endometrial adenocarcinoma. *Pathol Oncol Res.* 2011;17:277-85.
115. Panera N, Crudele A, Romito I, Gnani D, Alisi A. Focal Adhesion Kinase: Insight into Molecular Roles and Functions in Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2017;18 (1). pii: E99.
116. Golubovskaya VM. Targeting FAK in human cancer: From finding to first clinical trials. *Front Biosci.* 2014;19,687–706.
117. Canel M, Secades P, Garzón-Arango M, Allonca E, Suarez C, Serrels A et al. Involvement of focal adhesión kinase in celular invasion of head and neck squamous cell carcinomas via regulation of MMP-2 expression. *Br J Cancer.* 2008;98:1274-84.
118. Canel M, Secades P, Rodrigo JP, Cabanillas R, Herrero A, Suárez C et al. Overexpression of focal adhesión kinase in head and neck squamous cell carcinoma is independent of FAK gene copy number. *Clin Cancer Res* 2006; 12:3272-9.
119. Choi CW, Kim YH, Sohn JH, Lee H, Kim WS. Focal adhesion kinase and Src expression in premalignant and malignant skin lesions. *Exp Dermatol.* 2015;24:361-4.
120. Ly PC, Jiang AQ, Zhang WM, Zhu HL. Fak inhibitors in Cancer, a patent review. *Expert Opin Ther Pat.* 2018;28:139-45.
121. Kirkbride KC, Sung BH, Sinha S, Weaver AM. Cortactin: a multifunctional regulator of cellular invasiveness. *Cell Adh Migr.* 2011;5:187-98.
122. Belsches AP, Haskell MD, Parsons SJ. Role of c-Src tyrosine kinase in EGF-induced mitogenesis. *Front Biosci.* 1997;2:d501–d518.

123. van Rossum AG, Schuurin-Scholtes E, van Buuren-van Seggelen V, Kluin PM, Schuurin E. Comparative genome analysis of cortactin and HS1: the significance of the F-actin binding repeat domain. *BMC Genom.* 2005;6:15.
124. Rothschild BL, Shim AH, Ammer AG, Kelley LC, Irby KB, Head JA et al. Cortactin overexpression regulates actin-related protein 2/3 complex activity, motility, and invasion in carcinomas with chromosome 11q13 amplification. *Cancer Res* 2006;66:8017-25.
125. Helwani FM, Kovacs EM, Paterson AD, Verma S, Ali RG, Fanning AS. Cortactin is necessary for E-acherin mediated contact formation and actin reorganization. *J Cell Biol.* 2004;164:899-910.
126. Akervall JA, Jin Y, Wennerberg JP, Zätterström UK, Kjellén E, Mertens F. Chromosomal abnormalities involving 11q13 are associated with poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer.* 1995;76:853-9.
127. Buday L, Downward J. Roles of cortactin in tumor pathogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1775:263- 73.
128. Rodrigo JP, Alvarez-Alija G, Menéndez ST, Mancebo G, Allonca E, García-Carracedo D et al. Cortactin and focal adhesion kinase as predictors of cancer risk in patients with laryngeal premalignancy. *Cancer Prev Res (Phila).* 2011;4:1333-41.
129. Xu XZ, Garcia MV, Li TY, Khor LY, Gajapathy RS, Spittle C et al. Cytoskeleton alterations in melanoma: aberrant expression of cortactin, an actin-binding adapter protein, correlates with melanocytic tumor progression. *Mod. Pathol.* 2010;23,187-96.
130. Weaver AM. Cortactin in tumor invasiveness. *Cancer Lett.* 2008;265:157-66.

131. Martini V, Gattazzo C, Frezzato F, Trimarco V, Pizzi M, Chiodin G et al. Cortactin, a Lyn substrate, is a checkpoint molecule at the intersection of BCR and CXCR4 signalling pathway in chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol.* 2017;178:81–93.
132. Li Y, Zhang H, Gong H, Yuan Y, Li Y, Wang C et al. miR-182 suppresses invadopodia formation and metastasis in non-small cell lung cancer by targeting cortactin gene. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018;37:141.
133. Bissinger O, Kolk A, Drecoll E, Straub M, Lutz C, Wolff KD et al. EGFR and Cortactin: Markers for potential double target therapy in oral squamous cell carcinoma. *Exp Ther Med.* 2017;14:4620-6.
134. von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP et al. The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *Lancet Lond Engl.* 2007;370:1453-7.
135. Menéndez ST, Rodrigo JP, Alvarez-Teijeiro S, Villaronga MÁ, Allonca E, Vallina A et al. Role of HERG1 potassium channel in both malignant transformation and disease progression in head and neck carcinomas. *Mod Pathol* 2012;25:1069-78.
136. Gray RJ. A class of K-sample tests for comparing the cumulative incidence of a competing risk. *Ann Statist.* 1998;16:1141-54.
137. Fine JP, Gray RJ. A proportional hazards model for the subdistribution of a competing risk. *J Am Stat Assoc.* 1999;94:496-509.
138. González-Guerrero M. Estudio de factores pronósticos clínico-patológicos de carcinomas escamosos cutáneos de cabeza y cuello [tesis doctoral]. Oviedo: Repositorio Institucional de la Universidad de Oviedo, Universidad de Oviedo; 2018.

139. Haisma MS, Plaat BEC, Bijl HP, Roodenburg JLN, Diercks GFH, Romeijn TR et al. Multivariate analysis of potential risk factors for lymph node metastasis in patients with cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Am Acad Dermatol.* 2016;75:722-30.
140. Brougham NDLS, Dennett ER, Cameron R, Tan ST. The incidence of metastasis from cutaneous squamous cell carcinoma and the impact of its risk factors. *J Surg Oncol.* 2012;106:811-5.
141. Toll A, Masferrer E, Hernández-Ruiz ME, Ferrandiz-Pulido C, Yébenes M, Jaka A et al. Epithelial to mesenchymal transition markers are associated with an increased metastatic risk in primary cutaneous squamous cell carcinomas but are attenuated in lymph node metastases. *J Dermatol Sci.* 2013;72:93-102.
142. Krediet JT, Beyer M, Lenz K, Ulrich C, Lange-Asschenfeldt B, Stockfleth E et al. Sentinel lymph node biopsy and risk factors for predicting metastasis in cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 2015;172:1029-36.
143. Skulsky SL, O'Sullivan B, McArdle O, Leader M, Roche M, Conlon PJ et al. Review of high-risk features of cutaneous squamous cell carcinoma and discrepancies between the American Joint Committee on Cancer and NCCN Clinical Practice Guidelines In Oncology. *Head Neck.* 2017;39:578-94.
144. Burton KA, Ashack KA, Khachemoune A. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: A Review of High-Risk and Metastatic Disease. *Am J Clin Dermatol.* 2016;17:491-508.
145. Brinkman JN, Hajder E, van der Holt B, Den Bakker MA, Hovius SER, Mureau MAM. The Effect of Differentiation Grade of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma on Excision Margins, Local Recurrence, Metastasis, and Patient Survival: A Retrospective Follow-Up Study. *Ann Plast Surg.* 2015;75:323-6.

146. Breuninger H, Black B, Rassner G. Microstaging of squamous cell carcinomas. *Am J Clin Pathol.* 1990;94:624-7.
147. Karia PS, Morgan FC, Ruiz ES, Schmults CD. Clinical and Incidental Perineural Invasion of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review and Pooled Analysis of Outcomes Data. *JAMA Dermatol.* 2017;153:781-8.
148. Moore BA, Weber RS, Prieto V, ElNaggar A, Holsinger FC, Zhou X et al. Lymph node metastases from cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. *The Laryngoscope.* 2005;115:1561-7.
149. Ambrosio EP, Rosa FE, Domingues MA, Villacis RA, Coudry Rde A, Tagliarini JV et al. Cortactin is associated with perineural invasion in the deep invasive front area of laryngeal carcinomas. *Hum Pathol.* 2011;42:1221-9.
150. Villaronga MÁ, Hermida-Prado F, Granda-Díaz R, Menéndez ST, Álvarez-Teijeiro S, Quer M et al. Immunohistochemical Expression of Cortactin and Focal Adhesion Kinase Predicts Recurrence Risk and Laryngeal Cancer Risk Beyond Histologic Grading. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2018;27:805-13.
151. de Vicente JC, Rodrigo JP, Rodríguez-Santamarta T, Lequerica-Fernández P, Allonca E, García-Pedrero JM. Cortactin and focal adhesion kinase as predictors of cancer risk in patients with premalignant oral epithelial lesions. *Oral Oncol.* 2012;48:641-6.
152. Kelley LC, Shahab S, Weed SA. Actin cytoskeletal mediators of motility and invasion amplified and overexpressed in head and neck cancer. *Clin Exp Metastasis* 2008; 25:289–304.
153. Alt-Holland A, Sowalsky AG, Szwec-Levin Y, Shamis Y, Hatch H, Feig LA et al. Suppression of E-cadherin function drives the early stages of Ras-

induced squamous cell carcinoma through upregulation of FAK and Src. *J Invest Dermatol.* 2011;131:2306-15.

154. Pan MR, Hou MF, Ou-Yang F, Wu CC, Chang SJ, Hung WC et al. FAK is Required for Tumor Metastasis-Related Fluid Microenvironment in Triple-Negative Breast Cancer. *J Clin Med.* 2019 ;8(1). pii: E38. doi: 10.3390/jcm8010038.

155. Cance WG, Harris JE, Iacocca MV, Roche E, Yang X, Chang J et al. Immunohistochemical analyses of focal adhesion kinase expression in benign and malignant human breast and colon tissues: correlation with preinvasive and invasive phenotypes. *Clin Cancer Res.* 2000; 6:2417-23.

156. Zhao J, Guan JL. Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2009;28:35-49.

157. Miyazaki T, Kato H, Nakajima M, Sohda M, Fukai Y, Masuda N et al. FAK overexpression is correlated with tumour invasiveness and lymph node metastasis in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2003;89:140-5.

158. Theocharis SE, Kouraklis GP, Kakisis JD, Kanelli HG, Apostolakou FE, Karatzas GM et al. Focal adhesion kinase expression is not a prognostic predictor in colon adenocarcinoma patients. *Eur J Surg Oncol.* 2003;29:571-4.

159. Furuyama K, Doi R, Mori T, Toyoda E, Ito D, Kami K et al. Clinical significance of focal adhesion kinase in resectable pancreatic cancer. *World J Surg.* 2006;30:219-26.

160. Amoils M, Lee CS, Sunwoo J, Aasi SZ, Hara W, Kim J, et al. Node-positive cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck: Survival, high-risk features, and adjuvant chemoradiotherapy outcomes. *Head Neck.* 2017;39:881-5.

161. Tseros EA, Gebiski V, Morgan GJ, Veness MJ. Prognostic Significance of Lymph Node Ratio in Metastatic Cutaneous Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Ann Surg Oncol*. 2016;23:1693-8.
162. Jiang H, Hegde S, Knolhoff BL, Zhu Y, Herndon JM, Meyer MA et al. Targeting focal adhesion kinase renders pancreatic cancers responsive to checkpoint immunotherapy. *Nat Med*. 2016; 22:851-60.
163. Symeonides SN, Anderton SM, Serrels A. FAK-inhibition opens the door to checkpoint immunotherapy in Pancreatic Cancer. *J Immunother Cancer*. 2017;21:5-17.
164. Sulzmaier FJ, Jean C, Schlaepfer DD. FAK in cancer: Mechanistic findings and clinical applications. *Nat Rev Cancer* 2014;14:598-610.
165. Honma M, Kato N, Hashimoto M, Takahashi H, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H. Subungual keratoacanthoma: analysis of cell proliferation and copy number variation of oncogenes compared with periungual squamous cell carcinoma. *Clin Exp Dermatol*. 2011;36:57-62.
166. MacGrath SM, Koleske AJ. Cortactin in cell migration and cancer at a glance. *J Cell Sci*. 2012;125:1621-6.
167. Sato H, Hatanaka KC, Hatanaka Y, Hatakeyama H, Hashimoto A, Matsuno Y et al. High level expression of AMAP1 protein correlates with poor prognosis and survival after surgery of head and neck squamous cell carcinoma patients. *Cell Commun Signal* 2014;12:12-7.
168. Rodrigo JP, García-Carracedo D, García LA, Menéndez S, Allonca E, González MV et al. Distinctive clinicopathological associations of amplification of the cortactin gene at 11q13 in head and neck squamous cell carcinomas. *J Pathol*. 2009;217:516-23.

169. Dempke WCM, Fenchel K, Uciechowski P, Dale SP. Second and third-generation drugs for immune-oncology treatment-The more the better? *Eur J Cancer*. 2017;74:55-72..

170. Zhou C, Tang J, Sun H, Zheng X, Li Z, Sun T et al. PD –L1 expression as poor prognostic factor in patients with non-squamous small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2017;8:58457-68

171. Gibney GT, Weiner LM, Atkins MB, Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Lancet Oncol*. 2016;17:e-542-51.

8. ANEXO

Received: 14 May 2018 | Revised: 14 August 2018 | Accepted: 9 November 2018
 DOI: 10.1002/hed.25556

WILEY

ORIGINAL ARTICLE

Correlation of focal adhesion kinase expression with nodal metastasis in patients with head and neck cutaneous squamous cell carcinoma

Pablo Munguía-Calzada MD¹ | Iván Fernández-Vega MD, PhD² | Pablo Martínez-Cambor PhD^{3,4} |
 Susana Díaz-Coto MSc⁵ | Juana María García-Pedrero PhD^{6,7} | Blanca Vivanco MD, PhD² |
 Cristina Galache Osuna MD, PhD¹ | Francisco Vazquez-Lopez MD, PhD¹ |
 Juan Pablo Rodrigo MD, PhD^{6,7} | Jorge Santos-Juanes MD, PhD¹

¹Service of Dermatology, Hospital Universitario Central de Asturias, Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain

²Service of Pathology, Hospital Universitario Central de Asturias, Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain

³Geisel School of Medicine at Dartmouth, Dartmouth College, Hanover, New Hampshire

⁴Universidad Autónoma de Chile, Santiago, Chile

⁵Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain

⁶Department 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, Oviedo, Spain

⁷CIBERONC, Madrid, Spain

Correspondence

Jorge Santos-Juanes, Servicio de Dermatología, Hospital Universitario Central de Asturias, Avda Roma s/n, 33011 Oviedo, Spain.
 Email: jorgesantosjuanes@gmail.com

and

Juan Pablo Rodrigo, Servicio de Otorrinolaringología, Hospital Universitario Central de Asturias, Avda Roma s/n, 33011 Oviedo, Spain.
 Email: jprodrigo@uniovi.es

Funding information

CIBERONC, Grant/Award Number: (CB16/1200390); Instituto de Salud Carlos III, Grant/Award Number: (PI1300259)

Abstract

Background: Focal adhesion kinase (FAK) and cortactin overexpression is frequently detected in a variety of cancers, and has been associated with poor clinical outcome. However, there are no data in cutaneous squamous cell carcinoma (cSCC).

Objective: To investigate the relationship of FAK and cortactin expression with the clinicopathologic features and the impact on the prognosis of cSCC patients.

Methods: FAK and cortactin expression was analyzed by immunohistochemistry on paraffin-embedded tissue samples from 100 patients with cSCC, and correlated with the clinical data.

Results: FAK overexpression was a significant risk factor for nodal metastasis with crude and adjusted ratios (HRs) of 2.04, (95% CI [1.08-3.86], $P = 0.029$) and 2.23 (95% CI [1.01-4.91], $P = 0.047$), respectively. Cortactin expression was not a significant risk factor for nodal metastasis.

Conclusion: These findings demonstrate that FAK overexpression is an independent predictor of nodal metastasis that might be helpful for risk stratification and management of patients with cSCC.

KEYWORDS

cortactin, cutaneous squamous cell carcinoma, focal adhesion kinase, nodal metastasis, prognosis

1 | INTRODUCTION

Cutaneous squamous cell carcinoma (cSCC) is the second most common malignancy of the skin after basal cell carcinomas, with an estimated annual incidence of 700 000 cases in the

United States.^{1,2} There are high geographic and racial variations in the incidence of cSCC, ranging in Europa from 5.9 to 68.96 per 100 000 inhabitants to 291-499 per 100 000 in Australia.³

Although basal cell carcinomas are the most common skin cancers, cutaneous SCC has greater metastatic potential.

The exact incidence of metastases for cSCC is not truly known but is estimated to be around 2%-5%.¹ Given this low metastatic rate, most head and neck cSCC are not investigated or treated for occult metastases but rather treated based on positive clinical examination. Nevertheless, there are certain characteristics to a primary lesion that imply a higher risk of metastasis: primary lesion >2 cm in diameter; tumor thickness >6 mm; tumor on or around the ear; recurrent lesions; poorly differentiated grade; desmoplastic growth microvascular, lymphatic, or perineural invasion; advanced age; and a cSCC in an immunocompromised host.^{4,5} Even though the role of molecular factors in the lymphatic dissemination of cSCC has been studied; however, currently there are no clinically useful biomarkers of metastatic potential in primary cSCC.⁶ Coordinated regulation of the actin cytoskeleton is central to cell motility, invasion, and metastasis. Focal adhesion kinase (FAK) and cortactin are two proteins known to play central roles in actin regulation and/or participate in tumor motility in other cancers. These proteins may be equally important in cSCC and therefore should be good candidates for metastasis risk assessment of these patients.⁷⁻¹¹

FAK is a non-receptor tyrosine kinase that regulates diverse cellular functions, including adhesion, migration, invasion, polarity, proliferation, and survival.¹¹⁻¹⁵ Increased expression and/or activity of FAK in tumors has been associated with more invasive and aggressive phenotypes.^{16,17} Consequently, FAK emerges as a key regulator of multiple biological processes that may have a major impact on the malignant phenotype,^{12,17} although the clinical significance of FAK expression in cSCC remains unexplored. FAK is encoded by the *FAK/PTK2* gene, located at 8q24; gains of this locus around *MYC* gene have been recurrently found in metastatic cSCCs,¹⁸ suggesting also its possible implication in the development of more aggressive phenotypes in this cancer type.

Cortactin is an actin-binding protein encoded by *CTTN* gene, located at 11q13 that regulates membrane dynamics, actin network assembly, cell-cell adhesion, invadopodia formation and matrix degradation, thereby promoting cell motility and invasion.¹⁹ Cortactin overexpression has been frequently and widely detected in multiple cancers, including head and neck squamous cell carcinoma, liver, breast, esophageal, ovarian, melanoma, gastric and colorectal cancer. Cortactin expression and/or gene amplification has been strongly associated with poor prognosis, and often found as an independent predictor of disease recurrence.²⁰

The overall goal of our study was to analyze FAK and cortactin expression in a large series of patients with cSCC of the head and neck (cSCCHN), and to establish associations with clinicopathologic features and the possible impact on patient prognosis.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Patients and procedures

The Department of Pathology electronic database at the Hospital Universitario Central de Asturias was searched to locate all the patients who had developed nodal metastases from cSCC of the head and neck (metastatic cSCCHN) between 1998 and 2008. All the electronic medical records were reviewed to determine whether outcomes of interest occurred. Finally, a total of 50 primary cSCCHN who developed histologically confirmed lymph node metastasis were included. Controls (50 patients) were randomly selected among those patients with cSCCHN who did not develop any metastases and had a minimum follow-up of 4 years.

All the tumors were excised with conventional surgery. Patients with positive margins were excluded. None of the patients received any form of adjuvant therapy after their surgery. Ethics approval was obtained from the Hospital Universitario Central de Asturias Committee. Written informed consent was obtained from all patients. The Study was conducted, and the results were reported according to the Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology guidelines for case-control studies. Clinical patient-related data were collected retrospectively. Patient age was defined as the age at the time of resection. Immunosuppressed patients included are chronic lymphatic leukemia,² liver transplant,¹ kidney transplant,⁵ heart transplant,¹ diffuse large lymphoma B cell,¹ and polycythemia vera treated with hydroxyurea.¹

Pathologic tumor staging based on the 7th AJCC classification was also registered.²¹ Outcome data were based on one tumor *per* patient.

2.2 | Histopathologic evaluation

Each sample was analyzed and registered the following histopathologic features using hematoxylin-eosin stained slides: maximum diameter, tumor thickness (dichotomized as ≤ 6 mm or >6 mm; none lower than 2 mm), anatomic level (Clark's level), histopathologic degree of differentiation classified as well differentiated,¹ moderately differentiated,² and poorly differentiated,³ presence of desmoplasia, perineural or perivascular invasion, and the presence and number of tumor budding. Tumor budding is defined as the presence of either isolated single cells or small cell clusters (≤ 4) scattered in the stroma ahead of the invasive tumor front. The intensity of tumor budding (budding index) was classified as low (<5 buds) or high (≥ 5 buds).²²⁻²⁴

2.3 | Tissue microarray construction

Morphologically representative areas were selected from each individual tumor paraffin block for the construction of a tissue microarray (TMA). Three 1 mm cylinders were taken to construct TMA blocks, as described previously.²⁵ A total of four

TMA was created, containing three tissue cores from each of the 100 cSCCHN. In addition, each TMA included three cores of normal skin as an internal control.

2.4 | Immunohistochemistry

The TMAs were cut into 3- μ m sections and dried on Flex IHC microscope slides (DakoCytomation, Glostrup, Denmark). The sections were deparaffinized with standard xylene and hydrated through graded alcohols into water. Antigen retrieval was performed heating the sections using Envision Flex Target Retrieval solution, high pH (Dako). Staining was done at room temperature on an automatic staining workstation (Dako Autostainer Plus) with mouse anti-cortactin monoclonal antibody Clone 30 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, California) at 1:200 dilution, mouse anti-FAK monoclonal antibody Clone 4.47 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, New York) at 1:250 dilution + Visualization System (Dako Autostainer). Counterstaining with hematoxylin was the final step.

As cortactin and FAK staining showed a homogeneous distribution, a semiquantitative scoring system based on staining intensity was applied, as previously reported^{25,26} (Figure 1A-C). As normal skin showed negative expression of both proteins, scores were dichotomized as negative versus positive (weak, moderate, and strong) expression.

2.5 | Statistical analysis

Baseline demographic and clinical characteristics of the patients and pathological data were summarized with standard descriptive statistics. The primary endpoints were time to lymph-node metastasis and time to all-causes death, defined as the time from date of diagnosis of the primary tumor to date of diagnosis of metastasis or death for any cause, respectively. Tumor-specific deaths were also considered.

Conventionally, depending of their symmetry and nature, variables are described by using mean \pm SD, medians with

25 and 75 percentiles or relative and absolute frequencies. The impact of the studied events on the considered cohort was summarized by incidence rates and 95% bootstrap confidence intervals.

As the main studied outcome (ie, presence of relapse) is not a final event and therefore potentially affected by competing risk-death without relapse is its competing event-, the cumulative incidence curves for relapsing were computed. The Gray estimator²⁷ was used to estimate them and they were compared from the procedure described therein. Then, proportional hazard regression models proposed by Fine and Gray²⁸ were used to compute the hazard ratios (HR)—used as average effect size measure—crude and adjusted by potential confounders. This procedure was also employed for computing the HRs for the tumor-specific death. The 95% confidence intervals for the HRs were also reported.

The influence of the factors on mortality was analyzed by using standard proportional hazard Cox regression models. Crude and adjusted HRs and 95% confidence intervals were provided. Adjusted models include variables related with severity of disease, buds and, additionally, the presence of relapse. This variable was included as time-dependent covariate.

Differences reporting *P*-values below 0.05 were considered statistically significant. All analyses were made by using the free environment R (www.r-project.org). Particularly, package survival and cmprsk were used.

3 | RESULTS

One hundred white patients were enrolled in the study. Seventy-eight out of 100 patients were men (78%), and the mean age was 79 years (Table 1). FAK expression in at least more than 1% of tumor cells was observed in 69 cases (59%) (weak *n* = 26; medium *n* = 24; strong *n* = 19). Cortactin expression in at least more than 1% of tumor cells was detected in 64 cases (weak *n* = 14; medium *n* = 34; strong



FIGURE 1 Immunohistochemical analysis of cortactin and FAK expression in cSCC tissue specimens (x20). A, cortactin: weak; B, cortactin: moderate; C, cortactin: strong; D, FAK: weak; E, FAK: medium; F, FAK: strong [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

TABLE 1 FAK and cortactin expression in SCCHN and McSCCHN

	None	Weak	Medium	Strong	P-value
FAK					
cSCCHN	20 (40%)	17 (34%)	8 (16%)	5 (10%)	0.007
McSCCHN	11 (22%)	9 (18%)	16 (32%)	14 (28%)	
Cortactin					
cSCCHN	19 (38%)	10 (20%)	16 (32%)	5 (10%)	0.168
McSCCHN	17 (34%)	4 (8%)	18 (36%)	11 (22%)	

Note: McSCCHN, metastatic cutaneous squamous cell carcinoma of head and neck; SCCHN, cutaneous squamous cell carcinoma of head and neck.

$n = 16$) (Table 1) (64%). As illustrated in Figure 1, FAK and cortactin expression had predominantly a homogeneous pattern in the tumor cells. We did not find a correlation between FAK and cortactin expression; the Spearman correlation coefficient between the FAK and cortactin expression was 0.493 (CI 95%, [0.317-0.653]).

Figure 2 shows the incidence per 100 patients/year (95% CI) in global data and by FAK levels. The incidence of metastasis is similar between none and weak expression (8.9% vs 8.3%) and medium and strong (22.4% vs 29.8%). Similar trends were observed for the specific death, but not for all causes mortality.

The mean age of patients with FAK-positive tumors (\pm SD) was 79.35 ± 6.43 years, and 78.97 ± 6.43 years for the FAK-negative subgroup. The mean age of patients with cortactin-positive tumors (\pm SD) was 78.91 ± 8.05 years, and 79.08 ± 8.17 years for the cortactin-negative subgroup.

In relation to the clinicopathologic features of cSCC patients, positive FAK expression was not significantly associated with any variable and negative cortactin expression with perineural invasion; no other significant associations were observed (Table 2). It is worth to mention that a borderline association was observed between FAK expression and tumor thickness, which has been well-documented as strong predictor of nodal metastases. Thus, we found a 56.5% of cSCC >6 mm with positive FAK versus 35.5% of cSCC >6 mm with negative FAK ($P = 0.053$).

When analyzing the prognostic significance of FAK expression on univariate model, we found that FAK positive expression significantly predicted increased risk of nodal metastasis (HR = 2.04, 95% CI 1.08-3.86; $P = 0.029$). This effect was modulated when adjusted by different potential confounders (Table 3). Furthermore, FAK expression was found a significant independent predictor in multivariate model (HR = 2.23, 95% CI 1.01-4.91; $P = 0.047$). Thickness, tumor horizontal size, and tumor differentiation are the

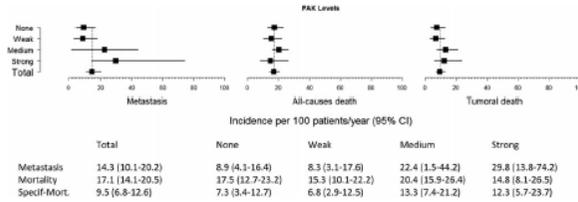


FIGURE 2 Incidence rate per 100 patients/year and 95% confidence interval for Metastasis, Death and Specific-Death for the whole cohort and by FAK levels

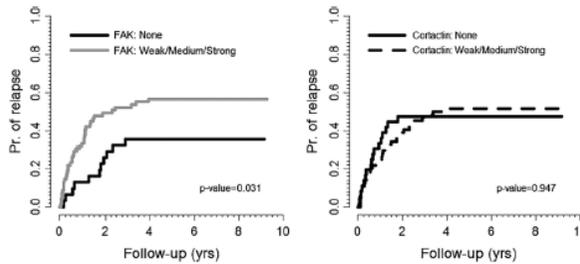


FIGURE 3 Fine gray estimates of nodal metastasis after resection of the cSCC on FAK-positive versus FAK-negative subgroups (left), and on cortactin-positive versus cortactin-negative subgroups (right)

TABLE 2 Association between FAK and cortactin expression and clinicopathologic features of patients with primary cutaneous squamous cell carcinoma

	Global N = 100	FAK expression			Cortactin expression		
		None N = 31	Others N = 69	P-value	None N = 36	Others N = 64	P-value
Sex, male	78	27 (87.1%)	51 (73.9%)	0.111	29 (80.6%)	49 (76.6%)	0.422
Age, mean ± SD	79.0 ± 8.1	79.3 ± 6.4	78.8 ± 8.7	0.722	79.1 ± 8.2	78.9 ± 8.1	0.917
Tumor thickness, mm							
Mean ± SD	8.95 ± 6.56	7.39 ± 5.55	9.65 ± 6.89	0.085	10.11 ± 7.71	8.30 ± 5.78	0.224
>6 mm	50	11 (35.5%)	39 (56.5%)	0.053	19 (52.8%)	31 (48.4%)	0.418
Anatomic level, ≥4	75	21 (67.7%)	54 (78.3%)	0.190	28 (77.8%)	47 (73.4%)	0.409
Tumor horizontal size							
Mean ± SD, mm	22.6 ± 14.2	21.3 ± 11.8	23.3 ± 15.2	0.477	25.6 ± 17.5	20.8 ± 11.7	0.122
>20 mm	35	12 (38.7%)	23 (33.3%)	0.381	16 (44.4%)	19 (29.7%)	0.103
Tumor differ, 1-2	96	30 (96.8%)	66 (95.7%)	0.635	34 (94.4%)	62 (96.9%)	0.455
Desmoplastic growth	14	5 (16.1%)	9 (13.0%)	0.449	6 (16.7%)	8 (12.5%)	0.384
Tumor site, ear	36	12 (38.7%)	24 (34.8%)	0.436	13 (36.1%)	23 (25.9%)	0.577
TNM, pT2 = 2	86	25 (80.6%)	61 (88.4%)	0.231	30 (83.3%)	56 (87.5%)	0.384
Inflammation				0.820			
None (0)	25	9 (29.0%)	16 (23.2%)		13 (36.1%)	12 (18.8%)	
Mild (1)	61	18 (58.1%)	43 (62.3%)		21 (58.3%)	40 (62.5%)	
Strong (2)	14	4 (12.9%)	10 (14.5%)		2 (5.6%)	12 (18.8%)	
Other SCC,	29	9 (29.0%)	20 (29.0%)	0.587	9 (25.0%)	20 (31.3%)	0.336
Immunosup.	11	3 (9.7%)	8 (11.6%)	0.539	5 (13.9%)	6 (9.4%)	0.352
Perineural invasion,	14	5 (16.7%)	9 (13.2%)	0.435	9 (35.7%)	5 (7.9%)	0.019
Lymph-Vasc. Invas.	4	1 (3.2%)	3 (4.3%)	0.635	2 (5.6%)	2 (3.1%)	0.455
Tumor buds, >0	45	11 (35.5%)	34 (49.3%)	0.143	20 (55.6%)	25 (39.1%)	0.084
Tumor buds, >5	20	4 (12.9%)	6 (23.2%)	0.180	7 (19.4%)	13 (20.3%)	0.568

Tumor differentiation: 1, well differentiated; 2, moderately differentiated; 3, poor differentiated.

factors that showed a significant impact on metastasis, tumor mortality, and all causes mortality. Potential confounding factors that could influence or contribute to tumor progression in our cohort study have been extensively discussed in Gonzalez-Guerrero et al.²² In contrast, cortactin expression

did not significantly predict the risk of nodal metastasis (Table 3). As illustrated in Figure 3 (left panel), a striking difference in nodal metastasis-free survival rates was observed between FAK-positive and FAK-negative patient subgroups ($P = 0.031$). However, patients with FAK-

TABLE 3 Univariate and multivariate model for the effect of FAK and cortactin expression on nodal metastasis and overall survival

	Metastasis		Tumor mortality		All-causes mortality	
	HR (95% CI)	P-value	HR (95% CI)	P-value	HR (95% CI)	P-value
FAK expression						
Univariate	2.04 (1.08-3.86)	0.029	1.55 (0.76-3.14)	0.230	0.92 (0.56-1.50)	0.731
Multivariate	2.23 (1.01-4.91)	0.047	1.40 (0.53-3.70)	0.500	1.05 (0.62-1.77)	0.848
Age	1.00 (0.97-1.04)	0.820	1.03 (0.99-1.08)	0.170	1.08 (1.04-1.12)	<0.001
Sex	0.81 (0.33-1.95)	0.640	0.55 (0.22-1.36)	0.190	0.57 (0.30-1.07)	0.082
Thickness	3.05 (1.40-6.65)	0.005	3.95 (1.61-9.71)	0.003	1.32 (0.71-2.47)	0.384
Tumor horizontal size	3.03 (1.50-6.12)	0.002	2.71 (1.24-5.92)	0.012	2.73 (1.41-5.30)	0.003
Tumor differentiation	0.43 (0.23-0.80)	0.008	0.29 (0.13-0.64)	0.002	0.39 (0.22-0.68)	0.001
Cortactin expression						
Univariate	1.02 (0.56-1.85)	0.950	0.99 (0.51-1.91)	0.970	0.74 (0.46-1.20)	0.225
Multivariate	0.90 (0.49-1.67)	0.740	0.88 (0.43-1.81)	0.730	0.75 (0.46-1.23)	0.248
Age	1.00 (0.96-1.04)	1.000	1.03 (0.98-1.09)	0.220	1.09 (1.04-1.13)	<0.001
Sex	0.72 (0.34-1.52)	0.380	0.51 (0.22-1.19)	0.120	0.53 (0.29-0.99)	0.046
Thickness	4.10 (1.90-8.82)	<0.001	4.60 (1.96-10.77)	0.004	1.57 (0.84-2.92)	0.151
Tumor horizontal size	2.26 (1.15-4.43)	0.018	2.37 (1.07-5.26)	0.033	2.36 (1.25-4.45)	0.008
Tumor differentiation	0.43 (0.23-0.81)	0.010	0.30 (0.13-0.66)	0.003	0.39 (0.22-0.68)	0.001

positive tumors did not exhibit an increased risk of death compared to FAK-negative tumors ($P = 0.621$). In marked contrast, no differences were observed between cortactin-positive and cortactin-negative patients in nodal metastasis-free survival rates ($P = 0.947$) (Figure 3, *right panel*), nor in overall survival ($P = 0.863$).

4 | DISCUSSION

This study investigates for the first time the clinical significance of FAK and cortactin expression as predictive factors for nodal metastases and survival in cSCC patients. We retrospectively analyzed FAK and cortactin protein expression using a large homogeneous cohort of cSCCHN patients. These two proteins were prioritized for analysis based on their demonstrated role in tumor cell motility and invasion,²⁹ and correlations with a more aggressive clinical course and nodal metastasis in other cancers.^{8,10}

We provide original evidence demonstrating that FAK-positive expression is an independent risk factor for nodal metastasis in cSCCHN patients. Similar results were obtained when performing the analysis from other points of view, considering a linear effect of the markers, non-clustered data, and other cut-off points for the protein expression (such as strong staining against others). The FAK studies published are based mainly on immunohistochemical with a negative versus positive approach and immunoblotting analysis.^{9,25,30} FAK expression has been rarely assessed in cSCC samples. FAK expression has been detected in premalignant intra-epithelial lesions and cSCC, but not in the perilesional skin¹⁷ and it has been suggested that FAK plays an active role in cell proliferation. Nevertheless, its role as prognostic factor in cSCC has not yet been explored.

FAK overexpression and/or hyper-phosphorylation have been frequently detected in different cancer types, including head and neck, breast, colon, melanoma, thyroid, ovarian, and hepatocellular carcinoma.³¹ However, most studies did not assess the correlations of FAK expression with the disease stage, patient outcome, or prognosis, except in hepatocellular carcinoma¹⁵ and head and neck squamous cell carcinoma¹⁰ where FAK expression has been associated with a worse outcome. Our findings are in good agreement to the so far reported data in these cancers.

In relation to overall survival, even though FAK-positive patients showed lower survival rates compared to the FAK-negative subgroup (multivariate model), these differences did not reach statistical significance. This may be related to the median age of our patients, which was very high. Alternatively, another possible explanation could be that the number of patients might be too small to obtain enough statistical power to detect significant associations. Nevertheless, the results of forest plot showed that FAK expression are very specific of disease.

Recently, it has been described that FAK inhibition increases immune surveillance in pancreatic adenocarcinoma.³² Noteworthy, this has quickly resulted in various clinical trials to test the FAK inhibitor defactinib and pembrolizumab (anti-PD-1) in advanced pancreatic cancer (clinicalTrials.gov NCT02546531) and defactinib and pembrolizumab in pancreatic cancer, non-small cell lung cancer, and mesothelioma (clinicalTrials.gov NCT02758587).³³ On the other hand, a recent study has demonstrated using a mouse model of cSCC that nuclear FAK regulates transcription of chemokines driving the recruitment of tumor-associated regulatory T cells, thus creating a tumor suppressive microenvironment by inhibiting cytotoxic CD8+ T cell activity.³⁴ Together these data suggest that, in addition to the application of FAK as a biomarker for metastasis risk stratification in cSCC patients, is also emerges a promising therapeutic target also for cancer treatment.

Immunohistochemical analysis of cortactin expression has thus far not been reported in cSCC. Cortactin overexpression has been found in multiple cancers, including head and neck squamous cell carcinoma,¹⁹ oral squamous cell carcinoma,³⁵ lung squamous cell carcinoma, gliosarcoma, breast cancer, colorectal cancer, and melanoma.³⁶ Cortactin has been associated with tumor spreading and aggressive phenotypes, and suggested as a biomarker to predict metastasis.³⁷ In marked contrast to these data, cortactin expression was not found to correlate with nodal metastasis in our cohort of cSCC patients and showed no impact on survival. Nevertheless, our findings are in good agreement with those reported by Sato *et al* in Head and neck squamous cell carcinoma.³⁸

We are aware that there are several limitations in our work. First, there are potential biases due to its retrospective nature. Second, the study is limited to cSCCHN. Third, these findings are based on patients treated in a University Hospital; hence the percentage of poor prognostic tumors might be higher due to referral than in the daily ambulatory practice. Fourth, the study was performed in a single institution. Fifth, immunohistochemical analysis was carried out using tissue microarrays; however, FAK and cortactin expression pattern was quite homogeneous and concordant in the three representative tissue cores selected from each tumor. In conclusion, this study unveils the independent prognostic relevance of FAK expression using a large homogeneous cohort of cSCCHN patients. The herein presented data reveal that FAK expression is a significant independent predictor for the risk of nodal metastasis in cSCCHN patients. Nevertheless, these results require validation in prospective studies also including cSCC from other sites to further confirm the potential of FAK expression as a useful biomarker for risk stratification. Ultimately, this could also provide the rationale for the use of molecular therapies targeting FAK in inoperable or metastatic cSCC, as FAK inhibitors have emerged as a promising therapeutic strategy^{31,39,40} and are currently being evaluated in various clinical trials in cancer patients.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Aitana Vallina and Eva Allonca for excellent technical assistance.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflict of interest to declare.

ORCID

Juana María García-Pedrero  <https://orcid.org/0000-0002-5891-9488>

Juan Pablo Rodrigo  <https://orcid.org/0000-0003-3063-0890>

Jorge Santos-Juanes  <https://orcid.org/0000-0001-5578-3522>

REFERENCES

- Karia PS, Han J, Shmuku CD. Cutaneous squamous cell carcinoma: estimated incidence of disease, nodal metastasis, and death from disease in the United States, 2012. *J Am Acad Dermatol*. 2013;68:957-966.
- Rogers HW, Weinstock MA, Harris AR, et al. Incidence estimate of non-melanoma skin cancer in the United States, 2006. *Arch Dermatol*. 2010;146:283-287.
- Que SKT, Zwaal FO, Schmulz CD. Cutaneous squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol*. 2018;78:237-247.
- Thompson AK, Kelley BF, Protop LJ, Mural MH, Baum CL. Risk factors for cutaneous squamous cell carcinoma recurrence, metastasis, and disease-specific death: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Dermatol*. 2016;152:419-428.
- Eigenler TK, Leiker U, Häfner HM, Garbe RM, Breuninger H. Survival of patients with cutaneous squamous cell carcinoma: results of a prospective cohort study. *J Invest Dermatol*. 2017;137:2309-2315.
- Ashford BG, Clark J, Gupta R, Iyer NG, Yu B, Ranson M. Reviewing the genetic alterations in high-risk cutaneous squamous cell carcinoma: a search for prognostic markers and therapeutic targets. *Head Neck*. 2017;39:1462-1469.
- Clark IS, Whigham AS, Yarbrough WG, Weaver AM. Cortactin is an essential regulator of matrix metalloproteinase secretion and extracellular matrix degradation in invadopodia. *Cancer Res*. 2007;67:4227-4235.
- Rodrigo JP, García-Carracedo D, García LA, et al. Distinctive clinicopathological associations of amplification of the cortactin gene at 11q13 in head and neck squamous cell carcinomas. *J Pathol*. 2009;217:5123-5165.
- McLean GW, Caragher NO, Avizienyte E, et al. The role of focal-adhesion kinase in cancer—a new therapeutic opportunity. *Nat Rev Cancer*. 2005;5:505-515.
- Canel M, Secades P, Garzon-Arango M, et al. Involvement of focal adhesion kinase in cellular invasion of head and neck squamous cell carcinomas via regulation of MMP-2 expression. *Br J Cancer*. 2008;98:1274-1284.
- Kleinschmidt EG, Schläpfer DD. Focal adhesion kinase signaling in unexpected places. *Curr Opin Cell Biol*. 2017;45:24-30.
- Serrels A, McLeod K, Canel M, et al. The role of focal adhesion kinase catalytic activity on the proliferation and migration of squamous cell carcinoma cells. *Int J Cancer*. 2012;131:287-297.
- Frame MC, Patel H, Serrels B, Letha D, Eck MJ. The FERM domain organizing the structure and function of FAK. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11:802-814.
- Canel M, Byron A, Sims AH, et al. Nuclear FAK and Run1 cooperate to regulate IGF1R3, cell-cycle progression, and tumor growth. *Cancer Res*. 2017;77:5301-5312.
- Panera N, Crudele A, Romito I, Gnani D, Alisi A. Focal adhesion kinase: insight into molecular roles and functions in hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2017;18.
- Chatzizacharias NA, Giaginis C, Gatzidou E, et al. Expression and clinical significance of FAK and Sec proteins in human endometrial adenocarcinoma. *Pathol Oncol Res*. 2011;17:277-285.
- Choi CW, Kim YH, Sohn JH, Lee H, Kim WS. Focal adhesion kinase and Sec expression in premalignant and malignant skin lesions. *Exp Dermatol*. 2015;24:361-364.
- Li YY, Hanna GI, Laga AC, Hadad RL, Lorch JH, Hammerman PS. Genomic analysis of metastatic cutaneous squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2015;21:1447-1456.
- Rothchild BL, Shim AH, Ammer AG, et al. Cortactin overexpression regulates actin-related protein 2/3 complex activity, motility, and invasion in carcinomas with chromosome 11q13 amplification. *Cancer Res*. 2006;66:8017-8025.
- Kirkbride KC, Sung BH, Sinha S, Weaver AM. Cortactin: a multifunctional regulator of cellular invasiveness. *Cell Adh Migr*. 2011;5:187-198.
- Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A III, eds. *American Joint Committee on Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York, NY: NYL Springer; 2010.
- Gonzalez-Guerrero M, Martínez-Cambor P, Vivanco B, et al. The adverse prognostic effect of tumor budding on the evolution of cutaneous head and neck squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol*. 2017;76:1139-1145.
- Karayamopoulou G, Eward S, Kanitakis J. Tumor budding correlates with aggressiveness of cutaneous squamous-cell carcinoma. *Anticancer Res*. 2016;36:4781-4785.
- Fujimoto M, Yamamoto Y, Matsuzaki I, et al. Tumor budding is an independent risk factor for lymph node metastasis in cutaneous squamous cell carcinoma: a single center retrospective study. *J Cutan Pathol*. 2016;43:766-771.
- Menéndez ST, Rodrigo JP, Alvarez-Tejero S, et al. Role of HERG1 potassium channel in both malignant transformation and disease progression in head and neck carcinomas. *Mod Pathol*. 2012;25:1069-1078.
- Rodrigo JP, Alvarez-Añija G, Menéndez ST, et al. Cortactin and focal adhesion kinase as predictors of cancer risk in patients with laryngeal premalignancy. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011;4:1333-1341.
- Gray RJ. A class of K-sample tests for comparing the cumulative incidence of a competing risk. *Ann. Stat.* 1998;16:1141-1154.
- Fine J, Gray R. A proportional hazards model for the subdistribution of a competing risk. *J Am Stat Assoc*. 1999;94:486-509.
- Kelley LC, Shahab S, Weed SA. Actin cytoskeletal mediators of motility and invasion amplified and overexpressed in head and neck cancer. *Clin Exp Metastasis*. 2008;25:289-304.
- Villaronga MA, Hermida-Prado F, Granda-Díaz R, et al. Immunohistochemical expression of Cortactin and focal adhesion kinase predicts recurrence risk and laryngeal cancer risk beyond histologic grading. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2018;27:805-813.
- Golubovskaya VM. Targeting FAK in human cancer: from finding to first clinical trials. *Front Biosci*. 2014;19:687-706.
- Jiang H, Hegde S, Koolhoff BL, et al. Targeting focal adhesion kinase renders pancreatic cancers responsive to checkpoint immunotherapy. *Nat Med*. 2016;22:851-860.
- Symeonides SN, Anderson SM, Serrels A. FAK-inhibition opens the door to checkpoint immunotherapy in pancreatic cancer. *J Immunother Cancer*. 2017;21:5-17.
- Serrels A, Lund T, Serrels B, et al. Nuclear FAK controls chemokine transcription, Tregs, and evasion of anti-tumor immunity. *Cell*. 2015;163:160-173.
- Noorlag R, Boeve K, Wijes MB, et al. Amplification and protein overexpression of cyclin D1: predictor of occult nodal metastasis in early oral cancer. *Head Neck*. 2017;39:326-333.
- MacGrath SM, Koleske AJ. Cortactin in cell migration and cancer at a glance. *J Cell Sci*. 2012;125:1621-1626.
- Zhang X, Liu K, Zhang T, et al. Cortactin promotes colorectal cancer cell proliferation by activating the EGFR-MAPK pathway. *Oncotarget*. 2017;8:1541-1554.
- Sato H, Hatanaka KC, Hatanaka Y, et al. High level expression of AMAP1 protein correlates with poor prognosis and survival after surgery of head and neck squamous cell carcinoma patients. *Cell Commun Signal*. 2014;12:12-17.
- Süßmaier FJ, Jean C, Schläpfer DD. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nat Rev Cancer*. 2014;14:598-610.
- Serrels A, Frame MC. FAK goes nuclear to control anti-tumor immunity—a new target in cancer immunotherapy. *Oncotarget*. 2016;5:119356.

How to cite this article: Munguía-Calzada P, Fernández-Vega I, Martínez-Cambor P, et al. Correlation of focal adhesion kinase expression with nodal metastasis in patients with head and neck cutaneous squamous cell carcinoma. *Head & Neck*. 2018;1-7. <https://doi.org/10.1002/hed.25556>